

**SIVI BESİYERİNDE *Monascus purpureus*'UN  
KIRMIZI PİGMENT ÜRETİMİNİN YAPAY SİNİR  
AĞLARI KULLANILARAK OPTİMİZASYONU VE  
PİGMENTİN STABİLİTESİNİN BELİRLENMESİ**

**SERAP DURAKLI VELİOĞLU**

**Doktora Tezi**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**I. DANIŞMAN: PROF. DR. Osman ŞİMŞEK**

**II. DANIŞMAN: PROF. DR. İsmail Hakkı BOYACI**

**2012**

T.C.  
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

SIVI BESİYERİNDE *Monascus purpureus*'UN KIRMIZI PİGMENT ÜRETİMİNİN  
YAPAY SİNİR AĞLARI KULLANILARAK OPTİMİZASYONU VE PİGMENTİN  
STABİLİTESİNİN BELİRLENMESİ

Serap DURAKLI VELİOĞLU

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. Osman ŞİMŞEK  
II. DANIŞMAN: PROF. DR. İsmail Hakkı BOYACI

TEKİRDAĞ-2012

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Osman ŞİMŞEK danıŐmanlıęında, Serap DURAKLI VELİOğLU tarafından hazırlanan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Juri Başkanı : Prof. Dr. Osman ŞİMŞEK (Danışman)

*İmza :*

Üye :Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI (II. Danışman)

*İmza :*

Üye :Prof. Dr. Muhammet ARICI

*İmza :*

Üye :Prof. Dr. Muhittin ÖZDER

*İmza :*

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mustafa Tahsin YILMAZ

*İmza :*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU  
**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Doktora Tezi

SIVI BESİYERİNDE *Monascus purpureus*'UN KIRMIZI PİGMENT ÜRETİMİNİN YAPAY SİNİR AĞLARI KULLANILARAK OPTİMİZASYONU VE PİGMENTİN STABİLİTESİNİN BELİRLENMESİ

Serap DURAKLI VELİOĞLU

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

1.Danışman : Prof. Dr. Osman ŞİMŞEK

2.Danışman : Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI

Gıda endüstrisinde doğal renklendiricilere olan talep giderek artmaktadır. *Monascus* pigmentleri de özellikle Doğu Asya'da kullanılan doğal renklendiricilerdendir. Bu çalışmada, besin ortamı olarak süne hasarlı buğday kullanılarak *Monascus purpureus* (*M. purpureus*) went DSM1604 suşunun kırmızı pigment üretimi yapay sinir ağları (YSA) ile modellenmiştir. Besin ortamı olarak ülkemizde oldukça fazla miktarda bulunan bir tarım endüstrisi atığı olan süne hasarlı buğday kullanılarak 27, 30, 32, 35 ve 37°C fermentasyon sıcaklıklarında ve 0, 50, 100, 150, 200, 250 devir/dak çalkalama hızlarında, ışıklı ve ışısız ortam koşullarında toplam 60 farklı deneme gerçekleştirilmiştir. Bu koşullarda üretilen pigment miktarları belirlenmiş, *M. purpureus*'un pigment üretiminin optimizasyonu YSA kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen YSA'nın eğitim, validasyon ve test veri setleri için  $R^2$  değerleri 0,993, 0,961 ve 0,944 olarak belirlenmiştir. Elde edilen modele göre, en yüksek pigment üretimi ( $1,874 A_{510nm}$ ), 29 sıcaklık ve 150 devir/dak çalkalama hızında, ışıklı ortamda gerçekleşmektedir. Belirlenen optimum şartlarda üç deney daha gerçekleştirilmiş ve sonuç olarak  $1,787 \pm 0,072 A_{510nm}$  değeri elde edilmiştir. Optimum şartlarda gerçekleştirilen üretimde elde edilen bu değer,  $35,740 A_{510nm}$  birim/g pigment verimine karşılık gelmektedir. Son ürünlerdeki kırmızı pigment ve sitrinin analizinde LC-MS, görünür bölge spektrofotometri ve HPLC yöntemleri kullanılmıştır. Örnekte yapılan sitrinin analizi sonucunda Teşhis Limitinin ( $10 \text{ ng/mL}$ ) üzerinde sitrinin belirlenmemiştir. Ayrıca üretilen renk maddesinin stabilitesinin ısı, UV ışık, pH ve süre ile değişimi belirlenmiş ve renk maddesi kullanılarak salam üretimi gerçekleştirilmiştir. Stabilitate sonuçlarına göre, *Monascus* pigmentlerinin, çok yüksek olmayan sıcaklıklarda ısıl işlem gören, hafif asidik veya hafif bazik gıdalarda kullanılabilmesi tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda endüstriyel anlamda düşük değeri olan süne hasarlı buğdayın, *M. purpureus* kullanılarak kırmızı pigment üretiminde değerlendirilmesinin mümkün olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *M. purpureus*, Kırmızı pigment, Süne hasarlı buğday, Yapay sinir ağları

2012, 101 sayfa

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

### OPTIMIZATION OF RED PIGMENT PRODUCTION BY SUBMERGED CULTURE OF *Monascus purpureus* USING ARTIFICIAL NEURAL NETWORKS AND DETERMINATION OF PIGMENT STABILITY

Serap DURAKLI VELİOĞLU

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Food Engineering

Supervisor : Prof. Dr. Osman ŞİMŞEK

Co-Supervisor : Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI

There is an increasing demand for natural food colorants in the food industry. *Monascus* pigments are used as natural colorant especially in East Asia. In the present study, red pigment production of *Monascus purpureus* (*M. purpureus*) went DSM1604 on a medium composed of bug damaged wheat was modelled using artificial neural networks (ANN). Sixty different experiments were carried out using bug damaged wheat, an agricultural waste product, as a medium at fermentation temperatures of 27, 30, 32, 35 and 37 °C, and at agitation speeds of 0, 50, 100, 150, 200 and 250 rpm, under light and dark conditions. The amount of pigment produced in these conditions were determined and the information retrieved from the ANN was used to determine the optimal operating conditions for pigment production of *M. purpureus*. The developed ANN had *R*-square values for training, validation, and testing data sets as 0.993, 0.961, and 0.944, respectively. According to the model, the highest pigment production, 1.874 A<sub>510nm</sub>, was achieved at 29 °C and 150 rpm under light conditions. Three additional experiments were performed in the optimum conditions and the mean value of the experimental results obtained was 1.787 ± 0.072 A<sub>510nm</sub>. This value corresponds to a pigment yield of 35.740 A<sub>510nm</sub> units/g. The red pigment and the citrinin analysis of the coloring agent were performed using LC-MS, visible spectrophotometry and HPLC methods. Citrinin could not be detected over the limit of quantification (10 ng/mL). The heat, UV light, pH and storage stability of the colorant was also determined and the product was used for the production of a model food product, salami. According to the stability test results, it was determined that the *Monascus* pigments can be used in slightly acidic and slightly basic foods which are not processed at very high temperatures. The study showed that bug damaged wheat, a low priced agro-industrial product, can be used as a substrate for red pigment production of *M. purpureus*.

**Keywords:** *M. purpureus*, Red pigment, Bug damaged wheat, Artificial neural networks

2012, 101 pages

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında ilgi ve desteklerini gördüğüm Namık Kemal Üniversitesi Rektörü ve danışman hocam Prof. Dr. Sayın Osman ŞİMŞEK'e ve Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi ve danışman hocam Prof. Dr. Sayın İsmail Hakkı BOYACI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam ve Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Sayın Mehmet DEMİRCİ'ye ve Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanı Prof. Dr. Sayın Muhammet ARICI'ya, yine çalışmalarımın her aşamasında desteklerini ve değerli görüşlerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Sayın Şefik KURULTAY ve Doç. Dr. Sayın Tuncay GÜMÜŞ'e, laboratuvar analizleri sırasında desteklerini esirgemeyen mesai arkadaşlarım Araştırma Görevlileri Gülnaz ÇELİKYURT ve Kadir Gürbüz GÜNER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

“Sıvı besiyerinde *Monascus purpureus*'un kırmızı pigment ve sitrinin üretimine ortam koşullarının ve besiyeri bileşiminin etkisi, pigment üretiminin yapay sinir ağları kullanılarak optimizasyonu” isimli ve NKUBAP00.24.DR.09.04 nolu proje ile tez çalışmasına destek sağlayan N.K.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

Ayrıca, hayatım boyunca hep yanımda olan canım anneme, babama ve ablama, yaptığım çalışmalar sırasında yardımlarını, desteğini ve sabrını esirgemeyen sevgili eşim ve mesai arkadaşım Dr.H.Murat VELİOĞLU'na ve canım oğlum Ege VELİOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma
$\lambda$	Lamda
$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{L}$	Mikrolitre
$L^*$	Beyazlık
$a^*$	Kırmızılık
$b^*$	Sarılık
	Derece santigrad
dak	Dakika
L	Litre
mL	Mililitre
N	Normalite
ng	Nanogram
nm	Nanometre
$R$	Korelasyon katsayısı
$R^2$	Regresyon katsayısı
$R_f$	Alıkonma faktörü
rpm	Devir/dakika
sa	Saat
s	Saniye

### Kısaltmalar

A	Absorbans
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HPTLC	Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi
LC-MS	Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi
MSG	Monosodyum glutamat
OD	Optik dansite
PDA	Potato Dekstroz Agar
TLC	İnce tabaka kromatografisi
UV	Ultraviyole
YSA	Yapay sinir ağları

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ.....</b>	<b>4</b>
2.1 <i>Monascus</i> Cinsi Küfler Kullanılarak Kırmızı Pigment Üretimi.....	8
2.2 <i>Monascus</i> Ürünlerinde Sitrinin Varlığı.....	13
2.3 Tarım Endüstrisi Atık/Artıklarının Pigment Üretiminde Kullanımı.....	15
2.4 Buğday ve Buğdayda Süne Zararı.....	18
2.5 <i>Monascus</i> Pigmentlerinin Stabilitesi.....	20
2.6 <i>Monascus</i> Ürünlerinde Renk Ölçümü.....	22
2.7 Modelleme ve Yapay Sinir Ağlarının Kullanımı.....	23
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>25</b>
3.1 Materyal.....	25
3.2 Yöntem.....	25
3.2.1 Küf gelişimi ve inokülasyon.....	25
3.2.2 Kültivasyon ortamının hazırlanması.....	26
3.2.2.1 Kültivasyon ortamı seçimi için yapılan ön denemeler.....	26
3.2.2.2 Substrat olarak kullanılacak süne hasarlı buğdayın özelliklerinin belirlenmesi....	26
3.2.2.3 Süne hasarlı buğday kullanılarak kültivasyon ortamının hazırlanması.....	27
3.2.3 Küf sayımı.....	27
3.2.4 pH değerinin belirlenmesi.....	28
3.2.5 Spektrofotometrik kırmızı pigment ölçümü.....	28
3.2.6 Deneme dizaynı.....	28
3.2.7 Yapay sinir ağı tasarımı ve pigment üretiminin optimizasyonu.....	30
3.2.8 Kırmızı pigment ve sitrinin için LC-MS analizi.....	31
3.2.9 Sitrinin analizi.....	32
3.2.9.1 HPLC mobil fazının hazırlanması.....	32
3.2.9.2 Sitrinin standart çözeltisinin hazırlanması.....	32



3.2.9.3 Sitrinine ait kalibrasyon grafiğinin oluşturulması, alıkonma zamanı, belirleme sınırı, nicelik sınırı ve geri alma oranlarının belirlenmesi.....	32
3.2.9.4 HPLC ile sitrinin analizi.....	33
3.2.10 Pigment türevlerinin saflaştırılması.....	34
3.2.11 Pigment stabilitesinin belirlenmesi.....	35
3.2.11.1 Isıl stabilitenin belirlenmesi.....	35
3.2.11.2 Stabiliteye depolama süresinin etkisinin belirlenmesi.....	35
3.2.11.3 Fotostabilitenin belirlenmesi.....	36
3.2.11.4 pH stabilitesinin belirlenmesi.....	36
3.2.11.5 Kinetik analizlerde kullanılan prosedürler.....	37
3.2.11.6 Reaksiyon hız sabitinin (k) hesaplanması.....	37
3.2.11.7 Yarılma süresinin ( $t_{1/2}$ ) hesaplanması.....	37
3.2.12 Boya maddesinin salam üretiminde kullanılması.....	38
3.2.13 Üretilen salamların renk analizi.....	39
3.2.14 İstatistiksel analizler.....	39
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>40</b>
4.1 Kültivasyon Ortamının Hazırlanması.....	40
4.1.1 Substrat seçimi için yapılan ön denemeler.....	40
4.1.2 Süne hasarlı buğday örneğine ait özellikler.....	40
4.2 Kırmızı Pigment Üretimi.....	41
4.2.1 Kırmızı pigment miktarının spektrofotometrik olarak belirlenmesi.....	41
4.2.2 Ortam koşullarına bağlı olarak pigment üretim miktarındaki değişim.....	43
4.2.3 Besin ortamı denemeleri.....	51
4.3 Sitrinin Analizi.....	51
4.3.1 Sitrinine ait kalibrasyon grafiğinin oluşturulması, alıkonma zamanı, belirleme sınırı, nicelik sınırı ve geri alma oranlarının belirlenmesi.....	51
4.3.2 Sıvı ortamdan sitrinin ekstraksiyonu yönteminin belirlenmesi.....	54
4.3.3 Sıvı besin ortamındaki sitrinin miktarının belirlenmesi.....	56
4.4 Sitrinin ve Pigmentlerin LC-MS Analizi.....	56
4.5 Maksimum Pigment Üretimi İçin Ortam Koşullarının Modellenmesi.....	56
4.6 TLC ile Ayırma.....	63
4.7 Renk Maddesinin Stabilite Analizleri.....	64
4.7.1 Isıl stabilite.....	64
4.7.2 Depolama boyunca pigment stabilitesi.....	68

4.7.3 Fotostabilite.....	71
4.7.4 pH stabilitesi.....	75
4.8 <i>Monascus</i> ile Üretilen Renk Maddesi Kullanılarak Salam Üretimi ve Salamların Renk Analizi.....	76
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>79</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>82</b>
EKLER.....	88
Ek 1.Pigment çözeltilerinin görünür bölgedeki (380-750 nm) absorpsiyon değerleri.....	88
Ek 2.Belirli ortam koşulları için YSA tarafından tahmin edilen absorbans değerleri.....	98
ÖZGEÇMİŞ.....	101

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Monascus</i> pigmentlerinin kimyasal yapıları.....	6
Şekil 2.2. Kompleks <i>Monascus</i> pigmentlerinin kimyasal yapıları.....	7
Şekil 3.1. Çalkalamalı inkübatördeki inkübasyon.....	29
Şekil 3.2. Kırmızı pigment üretim aşamaları.....	30
Şekil 3.3. Pigment çözeltilerinin UV ışığa maruz bırakıldığı ortamın görünümü.....	36
Şekil 4.1. Pigment çözeltilerine ait absorpsiyon spektrumu.....	42
Şekil 4.2. Kültivasyon sonu ortam pH'sı değişim grafiği, ışıklı ortam(a), ışısız ortam(b).	46
Şekil 4.3. Işısız ortamda karıştırma hızına bağlı olarak renk üretimi.....	48
Şekil 4.4. Işık varlığında karıştırma hızına bağlı olarak renk üretimi.....	48
Şekil 4.5. Işısız ortamda sıcaklığa bağlı olarak renk üretimi.....	50
Şekil 4.6. Işık varlığında sıcaklığa bağlı olarak renk üretimi.....	50
Şekil 4.7. Sitrinin kalibrasyon grafiği.....	52
Şekil 4.8. Sitrinin standardına ait kromatogram.....	53
Şekil 4.9. 1 ng/mL düzeyinde sitrinin içeren örneğe ait HPLC kromatogramı.....	53
Şekil 4.10. Ekstraksiyon sonucu sitrininin geri alımına ait kromatogramlar Etanol ile ekstraksiyon(a) Kloroform ile ekstraksiyon(b).....	55
Şekil 4.11. Renk değerlerinin tahmin edilmesinde kullanılmak üzere oluşturulan YSA... 57	57
Şekil 4.12. YSA'nın eğitim verilerine ait grafik (a), YSA'nın validasyon verilerine ait grafik (b), YSA'nın test verilerine ait grafik (c).....	59
Şekil 4.13. Karıştırma hızı ve sıcaklığa bağlı olarak absorpsiyon değişim grafikleri ışık varlığında gerçekleşen üretim (a), ışısız ortamda gerçekleşen üretim.....	60
Şekil 4.14. <i>Monascus</i> pigmentlerinin optimum koşullarda üretim grafiği.....	61
Şekil 4.15. Pigmente ait TLC kromatogramı.....	63
Şekil 4.16. Farklı sıcaklıklara maruz kalan pigmentin ısı etkisiyle parçalanma grafiği.....	67
Şekil 4.17. Farklı sıcaklıklarda depolanan pigmentin depolama etkisiyle parçalanma grafiği.....	70
Şekil 4.18. UV ışık ile muamele edilmiş pigment örneğinin parçalanma grafiği.....	71
Şekil 4.19. UV ışığa maruz bırakılmış pigment çözeltileri.....	72
Şekil 4.20. Pigment stabilitesinin pH ile değişimi.....	75
Şekil 4.21. <i>Monascus</i> kullanılarak üretilen renk maddesi ilave edilen salam örnekleri.....	76

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>Monascus</i> 'un sınıflandırılması ve orijini.....	5
Çizelge 2.2. <i>Monascus</i> pigmentlerinin üretiminde besin ortamı olarak tarımsal atık/artıkların kullanıldığı çalışmalar.....	17
Çizelge 3.1. Süne hasarlı buğdayda yapılan analizler.....	27
Çizelge 3.2. Salam üretiminde kullanılan reçete.....	35
Çizelge 4.1. Süne hasarlı buğday örneğine ait özellikler.....	40
Çizelge 4.2. Kültivasyon boyunca <i>Monascus</i> pigmentlerinin maksimum absorbans yaptıkları dalgaboyları.....	43
Çizelge 4.3. Çalkalama hızı, sıcaklık ve ışığa bağlı olarak pigment üretim miktarları.....	44
Çizelge 4.4. Kalibrasyon grafiğinin oluşturulmasında kullanılan sitrinin konsantrasyonu ve pik alanları.....	52
Çizelge 4.5. Sitrinin geri alım oranları.....	54
Çizelge 4.6. Renk değerleri ile oluşturulan YSA'na ait değerler.....	57
Çizelge 4.7. Optimum koşullarda pigment üretimine ilişkin değerler.....	62
Çizelge 4.8. Farklı sıcaklıklara maruz kalan pigmentlerin ısıl stabilite değerleri.....	66
Çizelge 4.9. Pigmentin ısı etkisiyle parçalanma reaksiyonuna ait değerler.....	68
Çizelge 4.10. Depolama boyunca pigment çözeltisine ait stabilite değerleri.....	69
Çizelge 4.11. Pigmentin depolama boyunca parçalanma reaksiyonuna ait değerler.....	70
Çizelge 4.12. UV ışık ile muamele edilmiş pigmentin stabilitesi.....	71
Çizelge 4.13. Pigmentin UV ışık etkisiyle parçalanma reaksiyonuna ait değerler.....	73
Çizelge 4.14. pH etkisiyle pigment stabilitesi.....	75
Çizelge 4.15. <i>Monascus</i> kullanılarak üretilen renk maddesi ilave edilen salamların renk ( <i>L, a, b</i> ) değerleri.....	77

## 1.GİRİŞ

Gıdalarda mikrobiyolojik kalitenin dışında kalan kalite kavramı içine ürünün rengi, tat-kokusu, tekstürü ve besleyici özellikleri girmektedir. Bu nedenle tüketici açısından fark edilen kalite daha çok duyuşsal özelliklere ve bunun da ötesinde gıdanın rengine dayanmaktadır. Gıdanın tüketim öncesi gözlenen bu özelliği hammaddenin yetiştirilmesi sırasındaki etmenlerle ve imalat sürecindeki üretim parametrelerinin etkisi ile değişmeye uğrar. Renkte görülen bu farklılaşmalar, tüketici tercihini olumsuz bir biçimde etkilemektedir (Saldamlı ve Uygun, 1998). Örneğin, bir tüketici beğenmediği bir renkle karşılaştığında gıdanın kalitesiz veya bozuk olduğunu düşünebilmektedir. Diğer taraftan, yeşil peynir veya mavi içecek gibi alışılmış rengin dışında olan gıdalar tüketici tarafından reddedilmektedir. Tipik olarak bazı renkler bazı gıdalarla eşleşmiş durumdadır: çilek-kırmızı, limon-sarı veya havuç-turuncu gibi. Gıdanın rengi, hem onu tanımlamada çok önemli bir özellik hem de bozulduğunda o gıdanın tüketilmesini engelleyen bir belirteçtir (Dufosse 2006).

Renk maddeleri, günümüzde ayrı ve özel bir önem taşımaktadır. Gıda endüstrisinde hammaddeden son ürün elde edilinceye kadar değişik aşamalarda kullanılabilen renk maddelerini; renk verenler, renk koruyucular ve renk şiddetini arttırıcılar olmak üzere gruplandırmak mümkündür (Gökalp ve ark. 2002). Gıda endüstrisinde kullanılan renk maddeleri, doğal renklendiriciler, doğala özdeş renklendiriciler ve sentetik renklendiriciler şeklinde de gruplandırılabilir (Hendry ve Houghton 1992, Mapari ve ark. 2010).

Genellikle pigment, boya veya renklendirici olarak isimlendirilen renk maddeleri, (Hendry ve Houghton 1992, Mapari ve ark. 2010), özellikle teknolojik işlem görmüş et, meyve-sebze, fırıncılık, sütçülük ürünlerinde ve şekerleme endüstrisinde kaybolan rengi geri vermek veya kısmen kayba uğramış olan ya da hiç olmayan rengi yapıya kazandırmak gibi amaçlarla çok sık kullanılan gıda katkı maddeleridir (Saldamlı ve Uygun, 1998).

Günümüzde gıda endüstrisinde sentetik renklendiriciler de kullanılmasına rağmen, tüketici tercihlerinin doğal gıda katkı maddeleri lehine artması nedeniyle, renklendiriciler alanında yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu doğal renklendiriciler ile ilgili olmaktadır. Doğal renklendiriciler, bitkiler (karotenoidler ve pancar kökü kırmızısı), böcekler (karminik asit ve

kermesik asit) ve mikroorganizmalar (*Monascus* kırmızısı ve *Penicillium* kırmızısı) gibi canlı organizmalardan elde edilebilmektedir.

Endüstriyel boyutta doğal renklendirici üretiminde mikroorganizmalar, diğer yüksek yaşam formlarına göre, yüksek verimlilik ve üretim kapasitesi gibi avantajlara sahiptir. Ayrıca mikrobiyal pigment üretiminin diğer kimyasal üretim proseslerine göre daha hızlı ve verimli bir üretim şekli olduğu bildirilmektedir (Velmurugan ve ark. 2010). Pigment üretiminde kullanılan birçok farklı mikroorganizma türü içerisinde *Monascus* türleri, yüksek kimyasal stabiliteye sahip pigment üretim yeteneklerinden dolayı özel bir öneme sahiptir (Cho ve ark 2002).

*Monascus* türleri tarafından üretilen metabolitler, enzimler, doymamış yağ asitleri, alkol ve esterler gibi birincil metabolitler ve pigmentler, monakolinler ve  $\gamma$ -amino bütirik asit gibi ikincil metabolitler olarak sıralanabilir (Chang ve ark. 2006). İçerdiği bu fonksiyonel bileşenler nedeniyle, *Monascus* kullanılarak üretilen kırmızı fermente pirinç, birçok endüstriyel firma tarafından, kan kolesterolünü düşürücü besin desteği olarak da satılmaktadır (Carvalho ve ark. 2005). Japonya'da *Monascus* pigmentlerinin tüketimi 1981'de 100 ton iken, 20. yüzyılın sonlarında tüketimin 600 tona ulaştığı, bunun da yaklaşık 1,5 milyon \$'lık bir değere karşılık geldiği bildirilmektedir (Dufosse ve ark 2005).

Yaygın olarak Doğu Asya'da doğal renklendirici ve geleneksel gıda katkısı olarak kullanılan (Mukherjee ve Singh 2011) *Monascus* pigmentleri, aynı zamanda Batı ülkelerinde et işleme endüstrisinde de kullanılmaktadır (Mukherjee ve Singh 2011). Ülkemiz et endüstrisinde de kırmızı *Monascus* pigmentleri diğer bir doğal renklendirici olan karmin ile birlikte kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde kullanılan birçok katkı maddesi gibi bu renklendiriciler de ülkemize diğer ülkelerden ithal edilmekte olup, yurtiçinde *Monascus* pigmentlerinin üretimi ile ilgili herhangi bir ticari faaliyet de bulunmamaktadır. *Monascus* pigmentleri et ürünlerinde yaygın olarak kullanılmasına karşın mevcut Türk Gıda Mevzuatı bu ürün hakkında herhangi bir bilgi içermemekte olup ülkemizde üretimi ve kullanımı ile ilgili bilimsel çalışmalar da oldukça sınırlıdır. Konu ile ilgili yapılacak çalışmalar, ülkemizde gıda endüstrisinde kullanılmasına rağmen Türk Gıda Mevzuatında yer almayan bu ürün hakkında yasal düzenlemelere zemin hazırlayabilir.

Bu araştırmada *M. purpureus*'un sıvı ortam fermentasyonu ile doğal renklendirici üretimini optimizasyonu amaçlanmıştır. Kırmızı pigment üretiminde besin ortamı olarak, bir tarım endüstrisi artığı olan süne hasarlı buğday kullanılmıştır. Ülkemizde süne hasarlı buğdayın oldukça fazla bulunması göz önünde bulundurulduğunda, daha değerli bir ürün üretimi için süne hasarlı buğdayın kullanılması, ülkemiz ekonomisine fayda sağlayabilecek bir uygulamadır.

Çalışma kapsamında 27, 30, 32, 35 ve 37 °C fermentasyon sıcaklıklarında ve 0, 50, 100, 150, 200, 250 devir/dak çalkalama hızlarında, ışıklı ve ışısız ortam koşullarında toplam 60 farklı deneme gerçekleştirilmiştir. Bu koşullarda üretilen pigment miktarları belirlenmiş, pigment üretiminin optimizasyonu YSA kullanılarak gerçekleştirilmiş ve optimum koşullarda *Monascus* pigmenti üretimi yapılmıştır. Bir çok alanda olduğu gibi, mikrobiyal üretim proseslerinin optimizasyonunda da kullanılan YSA, veriden öğrenebilme, genelleme yapabilme, sınırsız sayıda değişkenle çalışabilme, sınıflandırma, veri ilişkilendirme, teşhis ve yorumlama ve optimizasyon vb. gibi bir çok önemli özelliği sayesinde oldukça önemli avantajlar sağlamaktadır (Yurtoğlu 2005, Baş ve ark. 2006). Klasik modelleme teknikleriyle fermentasyon koşullarının belirlenmesine alternatif olarak, YSA kullanılarak *Monascus* pigmentlerinin üretimini modellenmesi, bu konu ile ilgili yapılan çalışmalara farklı bir yaklaşım sunabilir.

Optimum koşullarda üretilen doğal renklendirici örneğinde yapılan kırmızı pigment ve sitrinin analizlerinde, LC-MS, görünür bölge spektrofotometrisi ve HPLC yöntemleri kullanılmıştır. Gıdanın sahip olduğu pH, göreğeği ısıl işlem ve depolama süresi, kullanılacak doğal renklendiricinin stabilitesini etkileyebileceğinden, stabilite analizlerinin yapılması, renklendiricinin kullanılabilme potansiyeli açısından önemli bilgiler sunabilir. Bu nedenle de, üretilen renk maddesinin stabilitesinin ısı, UV ışık, pH ve süre ile değişimi belirlenmiş ve renk maddesi kullanılarak laboratuvar koşullarında salam üretimi gerçekleştirilmiştir.

## 2.KAYNAK ÖZETLERİ

Gıdalarda sentetik renklendiricilerin kullanımı yıllardır üzerinde tartışılan bir konudur. Günümüz tüketicilerinin sentetik gıda renklendiricilerine karşı negatif tutumu ve soruşturmacı yaklaşımı ise doğal renklendiricilere olan ilgiyi oldukça arttırmıştır (Dufosse 2006). Doğal renklendiricilerin üretiminde doğada yaygın bulunan mikroorganizmalar ve mikroalgler kullanılabilir. Üretilen karotenoid, melanin, flavin ve kinon yapısındaki moleküllere monascin, violacein, phycocyanin veya indigo isimli pigmentler örnek olarak verilebilir (Dufosse ve ark. 2005).

Mikroorganizma kaynaklı pigmentler içinde Avrupa’da izin verilen ilk pigment, *Blakeslea trispora* tarafından üretilen  $\beta$ -karoten olmuştur. 1995 yılında lanse edilen bu doğal renklendiriciden sonra, Ascolor isimli bir Çek firması, 2004 yılında *Penicillium* kullanılarak antrakinon yapısındaki Arpink Red<sup>TM</sup> renk maddesini ürettiğini bildirmiştir. Bununla birlikte pigment üreten mikroorganizma ve mikroalglerin çok az miktarı (*Monascus*, *Penicillium*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Porphyridium*) ticari olarak kullanılma olanağı bulmuştur. Bu doğal renklendiricilerden en eskisi, *Monascus* cinsi küfler kullanılarak üretilen “red koji”, “ang-kak” veya “anka” olarak da bilinen kırmızı fermente pirinçtir. “Ang-kak” veya “kırmızı pirinç” terimlerinin geçtiği ilk kaynak, birinci yüzyılda basılmış olan bitkilerle ilgili bir Çin tıp kitabıdır (Dufosse ve ark. 2005). Dufosse ve ark. (2005) tarafından bildirildiğine göre, 1884’te Fransız botanikçi Philippe van Thieghem, patatesten ve keten tohumu küspesinden kırmızı-mor renkli bir küf izole etmiş ve bu küfe *Monascus ruber* ismini vermiştir. “*Monascus*” isminin seçilmesinin nedeni, bu küfün çok miktarda spor içeren bir adet askusunun olmasıdır. 1895’te Went, Endonezya’da kırmızı fermente pirinçten farklı bir *Monascus* türü izole etmiş ve bu küf de *M. purpureus* olarak isimlendirilmiştir. Daha sonraki zamanlarda birçok farklı tür izole edilmiştir.

*Monascus* cinsi içerisinde üç tür (*M.pilosus*, *M. purpureus* ve *M. ruber*) mevcut olup, taksonomik olarak *Ascomycetae* sınıfı, *Monascaceae* familyasına aittir. Çizelge 2.1’de görüldüğü gibi *Monascus* cinsine ait bu üç tür daha çok doğuya özgü gıdalardan izole edilmiş suşları içermektedir (Duffose ve ark. 2005).



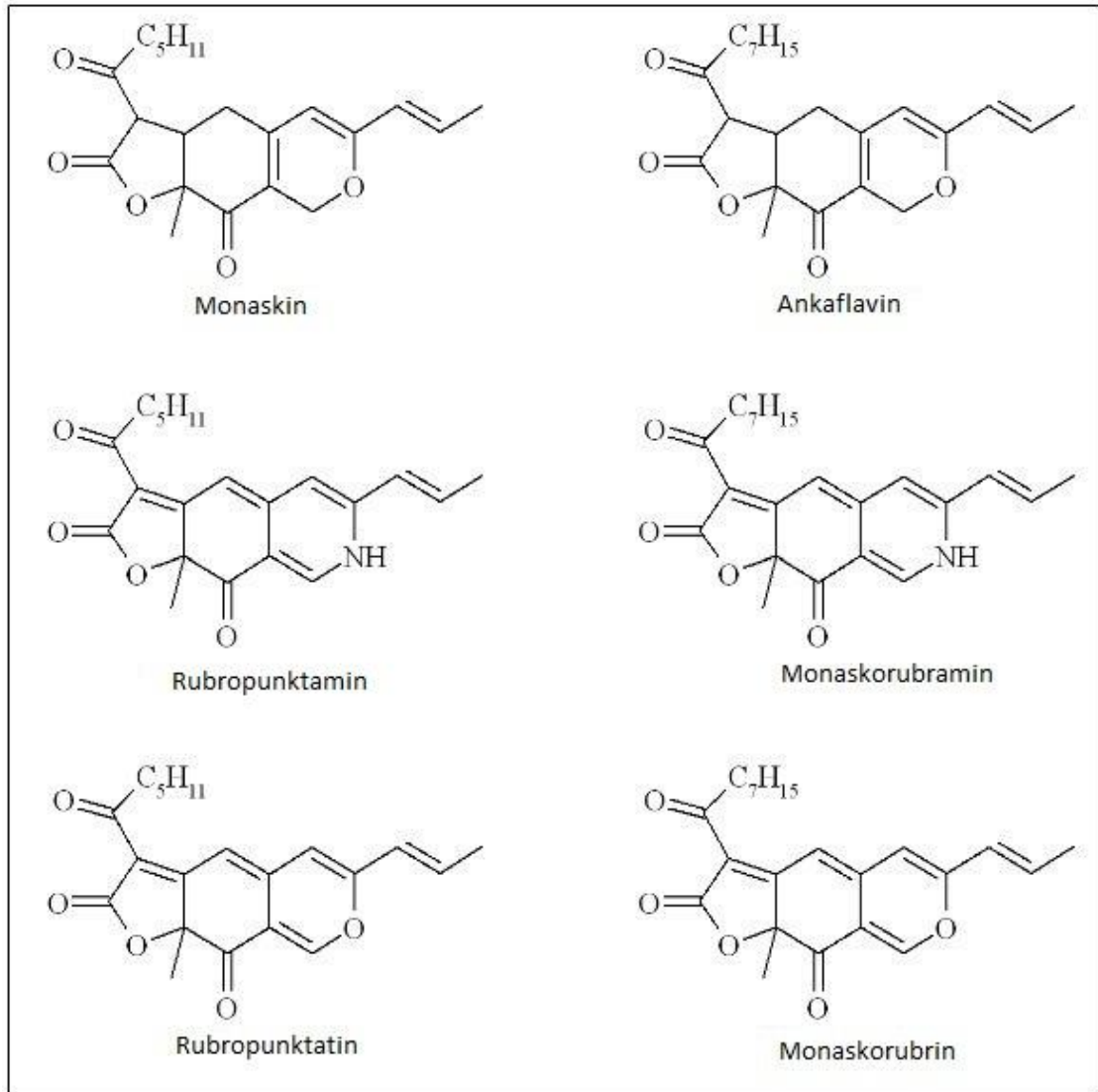
Çizelge 2.1. *Monascus*'un sınıflandırılması ve orijini (Dufosse ve ark. 2005)

Suş	Kaynak	Tür
<i>albidus</i>	tofu	<i>purpureus</i>
<i>albidus</i> var. <i>glaber</i>	tofu	<i>purpureus</i>
<i>anka</i>	anka	<i>purpureus</i>
<i>anka</i> var. <i>rubellus</i>	anka	<i>purpureus</i>
<i>araneosus</i>	küflenmiş kepek	<i>purpureus</i>
<i>barkeri</i>	kırmızı koji	<i>ruber</i>
<i>fuliginosus</i>	küflenmiş kepek	<i>ruber</i>
<i>koilang</i>	anka	<i>purpureus</i>
<i>major</i>	anka	<i>purpureus</i>
<i>paxii</i>	bitki	<i>ruber</i>
<i>pilosus</i>	küflenmiş kepek	<i>pilosus</i>
<i>pubigerus</i>	küflenmiş kepek	<i>pilosus</i>
<i>purpureus</i>	anka	<i>purpureus</i>
<i>ruber</i>	bitki	<i>ruber</i>
<i>rubiginosus</i>	anka	<i>purpureus</i>
<i>rubropunctatus</i>	küflü kepek	<i>pilosus</i>
<i>serorubescens</i>	tofu	<i>pilosus</i>
<i>vitreus</i>	tofu	<i>ruber</i>

*Monascus* tarafından fermente edilmiş ürünler, antihiperkolesterolemik bir ajan olan monacolin K, hipotansif bir ajan olan  $\gamma$ -amino bütirik asit ve antioksidan olan dimerumik asit gibi maddeler içerdiğinden dolayı fonksiyonel gıda olarak kabul edilmektedir (Arunachalam ve Narmadhapriya 2011). Literatürde *Monascus* cinsine ait türlerin pigment haricinde ürettiği metabolik ürünlerle ilgili de birçok çalışma bulunmasına rağmen, gıda endüstrisinde doğal katkı maddelerine olan ilginin artması nedeniyle, bu cinse ait türler esas olarak pigment üretimi ile ilgili çalışmaların konusu olmaktadır (Daroit ve ark. 2007).

*Monascus* cinsinin en önemli karakteristik özelliği, ikincil metabolit olarak çok güçlü sarı, turuncu veya kırmızı pigment üretmesidir. Pigment üretiminde *M. pilosus* ve *M. purpureus* daha önemli kabul edilmekte, *M. ruber* ise değişik gıdaların parçalanma ve bozulma reaksiyonlarından sorumlu tutulmaktadır (Carvalho ve ark. 2005).

*Monascus* pigmentleri poliketid kromoforlar ve beta-keto asitlerden esterifikasyon yoluyla sentezlenen metabolitler olan azofilonlar grubuna dahildir (Nimnoi ve Lumyong 2011). *Monascus* pigmentlerinin tipik olarak 6 ana azofilon pigmentini kapsadığı bildirilmesine rağmen (Blanc ve ark. 1994, Mapari ve ark. 2010), son yıllarda yapılan çalışmalar sonucu sözkonusu altı ana pigmentten türediği kabul edilen yeni bazı pigmentlerin de bulunmuş olduğu bildirilmektedir (Arunachalam ve Narmadhapriya 2011). Şekil 2.1’de kimyasal yapıları verilen *Monascus* pigmentlerinden, ankaflavin ( $C_{23}H_{30}O_5$ ) ve monaskin ( $C_{21}H_{26}O_5$ ) sarı, rubropunktatin ( $C_{21}H_{22}O_5$ ) ve monaskorubrin ( $C_{23}H_{26}O_5$ ) turuncu, rubropunktamin ( $C_{21}H_{23}NO_4$ ) ve monaskorubramin ( $C_{23}H_{27}NO_4$ ) kırmızı mor renklidir (Dufosse ve ark. 2005).



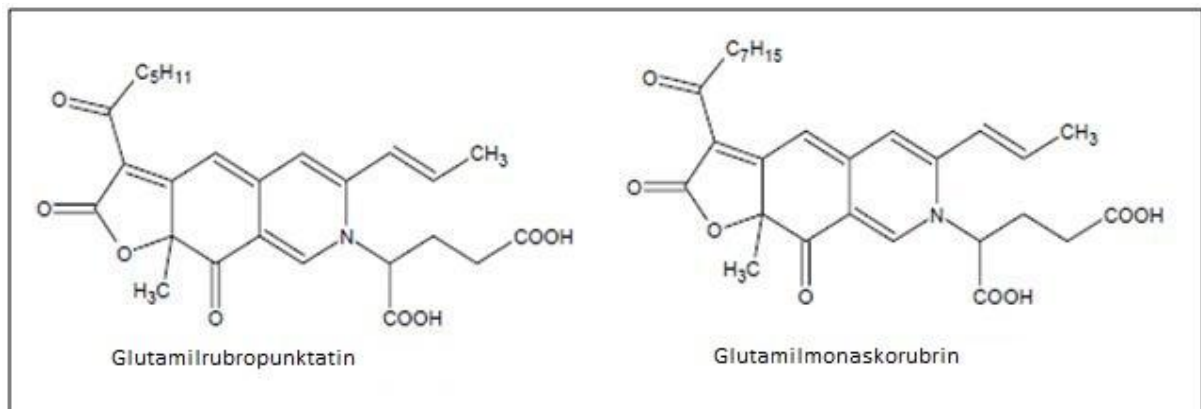
Şekil 2.1. *Monascus* pigmentlerinin kimyasal yapıları

Şekil 2.1’de görüldüğü gibi kırmızı pigmentler, rubropunktamin ve monaskorubramin, aynı kromoforik sistemi içermektedir. Bu iki molekülün sadece karbonil grubuna bağlı olan alifatik zincir uzunlukları farklıdır (Zheng ve ark. 2009). Bu özellik turuncu ve sarı pigmentlerde de gözlenir (Teng ve Feldheim 1998, Zheng ve ark. 2009).

İki turuncu pigment, monaskorubrin ve rubropunktatin, hücre sıvısı içinde asetil koenzim A’dan, multienzimatik kompleks poliketid yolu ile sentezlenir. Bu pigmentler birincil aminoasit gruplarını içeren bileşiklere karşı yüksek afinite gösteren bir yapıya sahiptir. Bu pigmentlerin aminoasitlerle reaksiyonu sonucu, monaskorubramin ve rubropunktamin gibi suda çözünebilir kırmızı pigmentler oluşmaktadır (Babitha ve ark. 2007).

Amino asitler, peptidler, nükleik asitler gibi azotlu bileşiklerin, *Monascus* pigmentlerine eklenmesi ile üretilmiş *Monascus* pigment türevlerinin oluşumu ile ilgili raporlar mevcuttur. Azotlu bileşiğin azot bölgesiyle, turuncu *Monascus* pigmentinin oksijen bölgesinin yer değiştirmesi sonucu rengin turuncudan kırmızıya kaydığı bildirilmektedir (Jung ve ark 2011).

*Monascus* pigmentleri, bazı durumlarda indirgenebilir, okside olabilir ve aminoasitler gibi bazı maddelerle etkileşime girerek daha büyük kompleksler oluşturabilir. Glutamil-monaskorubrin ve glutamil-rubropunktatin sıvı ortamlardan izole edilen pigment komplekslerine örnek olarak verilebilir. Bu maddelerin kimyasal yapıları Şekil 2.2’de verilmektedir (Blanc ve ark. 1995).



Şekil 2.2. Kompleks *Monascus* pigmentlerinin kimyasal yapıları

*Monascus* pigmentleri, geleneksel olarak şarap, peynir ve et gibi birçok gıda maddesinin renklendirilmesi ve etlerin korunması amacıyla kullanılmaktadır. (Carvalho ve ark 2005).

Sosis, jambon gibi işlenmiş et ürünlerine ek olarak balık ezmesi, surimi, ketçap, meyveli yoğurt gibi gıdalarda da renklendirici olarak kullanım uygulamalarının olduğu rapor edilmektedir (Dufosse ve ark 2005, Nimnoi ve Lumyong 2011). Ayrıca *Monascus* pigmentleri arasında kırmızı renkli olanların özellikle et ürünlerinde nitrit, nitratı ikame etmek amacıyla talep görmekte olduğu bildirilmektedir (Nimnoi ve Lumyong 2011, Mukherjee ve Singh 2011).

Yin ve ark (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, balık etinin yapısını geliştirmek ve yeni bir balık ürünü üretmek amacıyla % 30 uskumru eti ve % 2,1 pirinç unu içeren ortama, *M. purpureus* ve diğer *Monascus* çeşitleri inoküle edilmiştir. 25 'de gerçekleştirilen fermentasyonun 7. gününde ortamda Enterobacteriaceae, *Staphylococcus* ve *Pseudomonas* grubu bakterilere rastlanmamıştır. Üretilen fermente balık ürünlerinin aroma ve renk özelliklerinin test paneli tarafından beğenildiği bildirilmektedir.

Liu ve ark (2010) tarafından yapılan çalışmada ise, düşük nitritli sosis üretiminde *M. purpureus* ile fermente edilmiş pirinç kullanımı denenmiştir. 100 mg/L nitrit eklenen kontrol örneğine kıyasla, 25 mg/L nitrit ve % 0,5 *M. purpureus* ile elde edilen renklendiricinin kullanıldığı örneğin *L*, *a* ve *b* değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Renklendirici kullanılan örneklerin, diğer örneklere kıyasla daha koyu kırmızı renge sahip olduğu rapor edilmiştir.

## **2.1. *Monascus* Cinsi Küfler Kullanılarak Kırmızı Pigment Üretimi**

Günümüzde tüketici tercihlerinin doğal gıda katkı maddeleri lehine artması nedeniyle, renklendiriciler alanında yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu doğal renklendiriciler ile ilgili olmaktadır. Doğal renk maddeleriyle ilgili çalışmalar, pigmentlerin üretim maliyetlerini, sentetik veya bitki kaynaklı pigmentlerin maliyetlerinden daha düşük seviyeye çekmek üzerinde yoğunlaşmıştır. Yeni mikroorganizmaların izolasyonu veya proses koşullarının optimizasyonu gibi çalışmaların, pigment üretimini ekonomik anlamda geliştirmekte olduğu da bildirilmektedir (Dufosse 2006).

Doğal renklendiriciler grubunda yer alan *Monascus* pigmentlerinin, ekstraselüler olması ve suda çözünme özelliğini taşıması nedenleriyle kullanım kolaylığı bulunmakta ve bahsi geçen özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde bu pigmentlere olan ilgi artmaktadır (Nimnoi ve

Lumyong, 2011). Bu nedenle *Monascus* pigmentlerinin gıda endüstrisinde kullanılmak üzere üretiminin hem katı ortamda hem de sıvı ortamda denendiği çok sayıda çalışma mevcuttur.

Kırmızı pigment üretiminde katı ve sıvı ortam fermentasyonlarının her ikisi de kullanılabilir (Zhao 1998). *Monascus* pigment fermentasyonu genelde katı kültürlerde yapılmasına karşın bu tip üretimde verim endüstriyel anlamda düşüktür. Kim ve ark. (2002) tarafından bildirildiğine göre pigment verimini artırmak amacı ile yapılan çalışmalar kapsamında türlerin mutasyonu, besiyeri bileşenlerinin değiştirilmesi ve kültür ortamının fiziksel özelliklerinin değiştirilmesi gibi yöntemler denenmektedir.

Kırmızı fermente pirincin klasik yöntemle üretiminde büyük tepsilere konulmuş buharda pişirilmiş pirinç *Monascus* ile inoküle edilmekte ve havalandırılmalı ve sıcaklık kontrollü ortamda 20 gün inkübasyona bırakılmaktadır. Bu tip üretimde, nem miktarı ve gaz ortamındaki oksijen ve karbondioksit seviyesine ek olarak ortam kompozisyonunun da önemli bir parametre olduğu bildirilmektedir (Duffosse ve ark. 2005). Katı ortam fermentasyonu, ürün kalitesinin standart olmayışı, fermentasyon şartlarının kontrolündeki zorluklar, özellikle *Penicillium* ve *Bacillus* türlerinin kontaminasyonuna açık bir sistem oluşu gibi dezavantajlar taşırken, alet-ekipman ve proses maliyeti yönünden çok avantajlıdır (Zhao 1998).

Yang ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada, katı ortam fermentasyonu ile kırmızı fermente pirinç üretiminde *M. purpureus* went (CCRC 31498) kullanılmıştır. Malt ekstrakt agara inoküle edilerek 25°C sıcaklıkta 72 saat inkübasyona bırakılan *Monascus*'a ait saf kültür elde edildikten sonra miseller, Potato Dextrose Agar (PDA) besiyerine yeniden inoküle edilerek 25°C sıcaklıkta 7 gün inkübe edilmiştir. Elde edilen kültür blenderda homojenize edilerek, daha önceden % 45 saf su ilavesi ile otoklavda sterilize edilmiş olan pirinç üzerine % 5 oranında inoküle edilmiştir. 25°C sıcaklıkta 7 günlük inkübasyon sonrasında elde edilen ürünün, 40°C sıcaklıktaki kurutmalı fırında kurutulmuş ve 20 mesh düzeyinde öğütülerek hazır hale getirildiği bildirilmektedir (Yang ve ark 2005).

Katı ortam fermentasyonlarının kompleks kontrol sistemleri gerektirmekte olduğu bilinmesine rağmen, geleneksel olarak *Monascus* tarafından üretilen ürünlerin çoğu katı ortam fermentasyonu ile elde edilmektedir (Johns ve Stuart 1991, Chang ve ark 2006, Pattanagul ve ark 2008). Ancak endüstriyel anlamda ekonomik bir üretim gerçekleştirmek için bu fermentasyon şeklinin verimi oldukça düşük olmasına (Lin 1973) rağmen, endüstriyel ölçekte

pigment üretiminin daha çok sıvı ortam fermentasyonu ile gerçekleştirildiği belirtilmektedir (Arunachalam ve Narmadhapriya 2011). Pigment verimini arttırmak için sıvı ortam fermentasyonu üzerinde araştırmaların yoğunlaşması gerekmektedir (Lin 1973).

Batık kültür veya sıvı ortam fermentasyonunda, pigment geri kazanım oranının düşük olması ve yüksek maliyet gibi dezavantajlar olmasına rağmen (Zhao 1998), bu yöntemin avantajlarını ortaya koyan çalışmalar da bulunmaktadır (Dominguez-Espinoza ve Webb 2003, Chung ve ark. 2007). Sıvı ortamda fermentasyonun kontrolünün daha kolay olduğu ve fermentasyon süresinde önemli kısaltmalar elde edilebildiği bildirilmektedir (Dominguez-Espinoza ve Webb 2003). Sıvı ortam fermentasyonu pH, sıcaklık, havalandırma gibi parametrelerin kontrol edilebilmesi, kontaminasyon riskinin çok düşük olması gibi avantajlar sağlamaktadır (Zhao 1998). Bu nedenle *Monascus*'un sıvı ortam fermentasyonu, kontrollü koşullarda istenen ürün üretimi için alternatif bir yaklaşım olmaktadır (Chang ve ark. 2006).

*Monascus*'un pigment üretimine etki eden faktörleri belirleyebilmek için yapılan çalışmalar özellikle azot ve karbon kaynağı gibi fermentasyon ortamındaki bileşenlerin önemi üzerinde durmaktadır (Dufosse ve ark. 2005, Chung ve ark. 2007). *Monascus* fermentasyonunda etkili olan diğer faktörler de sıcaklık (Ahn ve ark. 2006), pH (Chung ve ark. 2007), karıştırma hızı (Kim ve ark. 2002), buna bağlı olarak çözülmüş oksijen (Chang ve ark. 2006), havalandırma koşulları (Hamdi ve ark. 1996) ve ışık (Wang ve ark. 2009) olarak ifade edilmiştir.

Sıvı ortamda en yüksek pigment verimi için hangi karbon kaynağının daha uygun olduğunu ortaya koyan çalışmalarda farklı sonuçlar mevcuttur (Dufosse ve ark. 2005). Genel olarak *Monascus*, nişasta, dekstrin, glukoz, maltoz ve fruktoz içeren ortamlarda iyi gelişme göstermektedir. Glukoz ve maltoz kullanıldığında, yüksek pigment verimi elde edildiği bildirilmektedir (Hamdi ve ark. 1995, Dufosse ve ark. 2005). Ayrıca ortama etanol eklenmesinin pigment üretimini geliştirdiği de ifade edilmektedir (Arunachalam ve Narmadhapriya 2011). Azot kaynağının ise karbon kaynağına kıyasla daha önemli olduğu ve azot kaynağı olarak nitrate kıyasla, amonyum ve pepton kullanımının pigment üretimini arttırdığı bildirilmektedir (Hamdi ve ark. 1995). Bunun yanında Silveira ve ark. (2008)'in Pastrana ve ark. (1995)'den bildirdiğine göre, suda çözünebilir komplekslerin oluşumu için gerekli olan amino grubunu içeren bileşiklerin ortamda bulunması nedeniyle, yüksek pepton içeriği pigment üretimini teşvik etmektedir.

Hajjaj ve ark. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada glukoz, etanol gibi farklı karbon kaynakları, monosodyum glutamat (MSG), soya pepton ve histidin gibi azot kaynakları kullanılmış; karbon ve azot kaynağı olarak glukoz ve histidin kullanıldığı durumda en yüksek pigment üretiminin sağlandığı belirlenmiştir. Ayrıca karbon/azot oranının önemli olduğu belirlenmiş olup; 50 g/g düzeyinde üremenin, 7-9 g/g düzeyinde ise pigment üretiminin teşvik edildiği ifade edilmektedir. Hajjaj ve ark. (1999) tarafından yapılan bu çalışmada karbon ve azot kaynağı olarak, glukoz-histidin, etanol-MSG, etanol-histidin kullanılması durumlarında sırasıyla, 15, 9 ve 10 g/L düzeylerinde pigment üretildiğinin belirlendiği, produktivitelelerin de sırasıyla, 94, 20, 62 mg/L sa olarak hesaplandığı bildirilmektedir.

*Monascus* pigmentlerinin kromofor gruplarında süstitüsyon reaksiyonlarının gerçekleştiği rapor edilmiştir. Jung ve ark. (2003) yaptıkları çalışma sonucu ortamda bulunan aminoasitlerin pigmentin yapısına katıldığını göstermişlerdir. Söz konusu çalışmada, *Monascus* fermentasyonunda fermentasyon ortamına azot kaynağı olarak 20 farklı aminoasit ayrı ayrı eklenmiş ve üretilen renk maddelerinin analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak farklı aminoasitler kullanılarak yeni renk tonları üretilebildiği gösterilmiştir. Serin, glutamin, glisin ve alanin aminoasitleri ile elde edilen rengin kırmızı, diğer aminoasitlerle elde edilen rengin ise kontrol örneğine kıyasla daha turuncumsu olduğu bildirilmektedir. HPTLC analizi sonucunda, serin, glutamin, glisin, alanin ve histidin ile elde edilen renk maddelerinde ana spotların % 50'den fazlası kırmızı olarak belirlenirken, fenilalanin, valin, lösin, izolösin ile elde edilenlerde ise sarı ve turuncu spot oranının % 50'den fazla olduğu belirlenmiştir (Jung ve ark. 2003). Ortamdaki aminoasitten bağımsız olarak, tüm renk maddesi örneklerindeki sarı spotların *R<sub>f</sub>* değerlerinin aynı olduğu, turuncu spotların değerlerinin ise birbirine çok yakın olduğu belirtilmektedir. Bu sonuçlar, fermentasyon boyunca aminoasit ilavesinden bağımsız olarak aynı sarı ve turuncu bileşiklerin üretildiğini göstermektedir. Kırmızı spotlara ait *R<sub>f</sub>* değerlerinin, ortama eklenen aminoaside bağlı olarak 0,1 ile 0,6 arasında değiştiği tespit edilen Jung ve ark. (2003)'e ait bu çalışmada; ortamdaki farklı amino asitlerin pigment yapısına katılması nedeniyle, farklı kırmızı pigmentlerin üretilebildiği gösterilmiştir.

Fabre ve ark. (1993)'in *M. ruber* kullanarak pigment üretimi ile ilgili yaptığı çalışmada, 1 L'de 20 g etil alkol, 5 g MSG, 5g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5g MgSO<sub>4</sub>, 0,1g CaCl<sub>2</sub>, 0,03 g MnSO<sub>4</sub>, 0,01 g ZnSO<sub>4</sub>, 0,01 g FeSO<sub>4</sub> oranları ile hazırlanan besiyeri kullanılmış, başlangıç pH'sı 6,5 olarak ayarlanmıştır. 20 L'lik fermentör içerisine alınan besin ortamı 120°C sıcaklıkta 20 dakika sterilize edilmiştir. Daha sonra 2 L *M. ruber* sıvı kültürü inoküle edilerek

28°C sıcaklıkta 80 saat, havalandırılmalı ve karıştırılmalı fermentörde inkübasyona bırakılmıştır. Fermentasyon sonunda mikrofiltreden geçirilen ortamdan elde edilen filtrat dondurarak kurutma yöntemiyle kurutulmuştur. 1 L ortamdan 12,5 g veriminde elde edilen kırmızı toz haldeki pigment karışımının, suda çözünen safsızlıkların uzaklaştırılması için, metanol-kloroform karışımı ile ekstrakte edildiği, filtrasyon sonrası kırmızı renkli solüsyonun vakum altında konsantre edilip, kurutulan ekstraktın su içerisinde yeniden süspansiyon hale getirildiği belirtilmektedir. Kloroform ile bir kez daha yıkanarak vakum altında yeniden konsantre edildikten sonra 1 L ortamdan 5,2 g saf pigment elde edildiği bildirilmektedir (Fabre ve ark. 1993).

Mukherjee ve Singh (2011) tarafından yapılan çalışmada da, 250 mL'lik erlenlerdeki 50 mL'lik fermentasyon ortamı, 32 °C'de 150 devir/dak çalkalama hızında 13 gün boyunca inkübe edilmiştir. Üretim koşullarının optimizasyonu için, 25-40 °C aralığında, başlangıç pH'sı 2-8 arasında olacak şekilde denemeler gerçekleştirilmiştir. Ayrıca farklı konsantrasyonlarda glukoz (10-40 g/L) ve farklı azot kaynakları denenmiştir. Pigment üretiminin inkübasyonun 3. gününde başladığı ve fermentasyon periyodu boyunca devam ettiği bildirilmektedir. Pigment veriminin en yüksek seviyesine (64 U/g kuru hücre kütlesi) 10. günde ulaştığı tespit edilmiştir. Çalışmada denemesi yapılan bir çok farklı sıcaklık derecesi içinde, 30 °C'de yapılan fermentasyon en yüksek pigment üretimini sağlamıştır. Pigment kalitesinin fermentasyon ortamının başlangıç pH'sına bağlı olarak değişebildiği belirlenmiştir. Kırmızı pigment pH 6 seviyesinde daha fazla üretilirken, asidik pH değerleri sarı pigment üretimini teşvik etmektedir. Düşük başlangıç pH'sında (2,0-4,0) sarı pigment baskın iken, pH 5,0 üzerinde keskin bir şekilde azalmaktadır. Turuncu fraksiyonun ise pH koşullarından bağımsız olarak sabit bir şekilde ortamda bulunduğu belirlenmiştir. Yüksek pH değerlerinde (6,0-8,0) ise kırmızı pigmentin ortamda yaygın olarak bulunduğu tespit edilmiştir.

Ahn ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada, *Monascus* sp. J101 kullanılarak sıvı ortam fermentasyonu 25 ve 30 °C sıcaklık değerlerinde gerçekleştirilmiştir. Yüksek sıcaklıkta artan mikroorganizma gelişme hızından dolayı fermentasyon ortamında ortaya çıkan yüksek viskozite, pigment verimini düşürmüş ve sonuç olarak 30 °C'de elde edilen pigment verimi 25 °C'de elde edilen verimden 10 kat daha düşük bulunmuştur. Lee ve ark. (2004) ise 35 °C'den daha yüksek fermentasyon sıcaklığının kırmızı pigment üretimini önemli düzeyde azalttığını bildirmektedir.



Chang ve ark. (2006) tarafından yapılan *M. anka* ile pigment ve glukoamilaz üretiminin yapay sinir ağları ile modellenmesi çalışmasında fermentasyon parametrelerinden sıcaklık ve çözünmüş oksijen, değişken parametreler olarak seçilmiştir. Sıcaklık aralığı olarak 27-42 ve çözünmüş oksijen aralığı olarak da % 10-40 değerleri seçilmiş ve bu parametre aralıklarında modelleme yapılarak yapay sinir ağlarının başarılı bir şekilde sonuç verdiği belirlenmiştir.

Kim ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada ise fermentördeki karıştırma hızının *Monascus* hücre morfolojisi ve pigment verimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Denemelerde 350 devir/dak ve altındaki karıştırma hızlarında küf misellerinin dibe çöktüğü ve pigment veriminin yaklaşık 37,5 optik dansite (OD) birim olduğu ancak hızın 500 devir/dak seviyesine arttırılmasıyla 220 OD birim pigment verimi elde edildiği belirtilmiştir. 600 ve 700 devir/dak seviyelerinde yapılan denemelerde ise aşırı hızdan dolayı küf misellerinin zarar gördüğü belirlenmiştir.

Hamdi ve ark. (1996) *M. purpureus* kullanılarak yaptıkları çalışmada, fermentasyon ortamına kısa süreli ve uzun süreli olarak çözünmüş oksijen vererek iki farklı deneme yapmışlardır. Kısa süreli oksijen verilen fermentasyon ortamında pigment üretim hızının 0,08 g/sa, uzun süreli oksijen verilen ortamda ise bu değer 0,2 g/sa olduğu belirlenmiş olup ortamdaki çözünmüş oksijen miktarının pigment üretimini olumlu yönde etkilediği vurgulanmıştır.

Silveira ve ark. (2008) tarafından bildirildiğine göre, oksijenin kısmi basıncının düşük olmasının hem katı ortam fermentasyonunda (Han ve Mudgett 1992) hem de sıvı ortam fermentasyonunda (Lee ve ark. 1994) *Monascus*'un pigment üretimini inhibe etmektedir. Wang ve ark. (2009) *Monascus* cinsi küflerin sıvı ortam fermentasyonu ile pigment ve sitrinin üretimine mavi ışığın etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda aydınlatmada mavi ışık kullanılan fermentasyon ortamında, karanlık ortamda yapılan fermentasyona göre % 28,5 daha fazla pigment ve % 79 daha az sitrinin oluştuğu belirlenmiştir.

## **2.2. *Monascus* Ürünlerinde Sitrinin Varlığı**

Uzun zamandır Çin'de sindirimi ve kan dolaşımını düzenleyici geleneksel bir ilaç olarak tüketilen kırmızı fermente pirinç, ticari olarak Mevacor, Cholestin, Lovastatin gibi isimler ile de bilinen ve vücudun kolesterol üretimini azaltarak kandaki yağ seviyesini düzenleyen

monacolin-K gibi fonksiyonel maddeler içermesinden dolayı tüm dünyada besin desteği olarak da tüketilmektedir (Velioğlu ve Yılmaz 2006, Arunachalam ve Narmadhapriya 2011). Ancak son 10 yılda, bazı araştırmacılar tarafından bazı *Monascus* türlerinin, esas olarak *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin ürettiği bir nefrotoksin olan, sitrinini üretebildiği belirlenmiştir (Chen ve Hu 2005).

Sitrinin, insan ve hayvanlarda karaciğer, böbrek veya sinir sistemi hasarları, bağışıklık sistemi baskılanması ve karsinojenik etkilere yol açarak çok farklı sağlık sorunlarına sebep olabilen bir mikotoksindir. Bu mikotoksin ilk olarak filamentli bir küf olan *Penicillium citrinum*'dan izole edilen ve diğer *Penicillium*, *Aspergillus* ve *Monascus* türleri tarafından da üretilen bir ikincil metabolittir. Antibakteriyel etkilerinden dolayı ilk olarak antibiyotik olarak araştırılmış fakat hayvanlarda böbrek tüplerinde nefrotoksik etki göstererek Balkan nefropatisinin sebebi olduğu belirlenince çalışmalar bu yönde yoğunlaşmıştır (Xu ve ark. 2006).

Eski çağlardan beri uzak doğuda *Monascus* kullanılarak üretilen kırmızı fermente pirincin gıda renklendiricisi olarak kullanımına Japonya yasaları izin vermekte fakat Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Avrupa Birliği (AB) yasaları izin vermemektedir (Hendry ve Houghton 1992). Bunun yanında Japonya, ABD, Fransa ve Almanya'da gıda amaçlı *Monascus* pigmentleri ile ilgili verilmiş 50'den fazla patent mevcuttur (Dufosse ve ark. 2005). Ülkemizde ise *Monascus* pigmentleri ile ilgili herhangi bir yasal düzenleme bulunmamaktadır (Anon. 2002).

*Monascus* pigmentlerinin üretiminin yanı sıra, birçok araştırmacı kırmızı fermente pirinçteki sitrininin kontrol altına alınmasına çalışmaktadır. Japonya'da kırmızı fermente pirinçte izin verilen maksimum sitrinin değeri 200 ng/g'dır. Çin ve Avrupa Birliği'nde de bu değere yakın sitrinin değerleri tartışılmaktadır. Bu yüzden, düşük sitrinin içeriğine sahip kırmızı fermente pirinç üretilmesi üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (Chen ve Hu 2005).

Literatürde sitrinin üretme yeteneğinin, kullanılan suşa bağlı olduğu kadar besin ortamı ve inkübasyon koşullarına da bağlı olduğu bildirilmektedir (Mapari ve ark. 2010). Bu sebeple *Monascus* ile yapılan pigment üretme çalışmalarında sitrinin analizlerinin de yapılması gerekmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, sitrinin üretmeyen *Monascus* suşlarının belirlenmesi (Chen ve ark. 2008), *Monascus* ürünlerindeki sitrinin oranının düşürülmesi (Lee ve ark. 2007a), farklı fiziksel ve kimyasal metotlarla sitrininin ortamdaki uzaklaştırılması (Lee

ve ark. 2007b) üzerine yoğunlaşmıştır. Yapılan çalışmalarda *Monascus* türlerinin hepsinin toksijenik olup olmadığı araştırılmış ve koleksiyonlarda bulunan bazı *Monascus* türlerine ait toksijenik olmayan suşların bulunduğu gösterilmiştir (Dufosse vd., 2005). Ayrıca genetik yöntemlerle sitrinin üretmeyen mutant *M. purpureus* suşlarının üretimi ile ilgili çalışmalar (Jia ve ark 2010) da yapılmaktadır.

*Monascus* ürünlerinde sitrininin bulunmasını engellemenin bir diğer yolu ise, bu metabolitin biyosentezini kontrol etmektir. Fermentasyon ortamında sitrinin üretimini en aza indirmek için yapılan çalışmalarda bu mikotoksinin üretiminde kullanılan metabolik yolun anlaşılmasına ağırlık verilmiştir. Sitrinin ve pigment üretiminin aynı metabolik yol ile üretildiği ortaya konmuştur. Pigment üretiminde, metabolik yolun sonunda kromofor grubuna bir yağ asidi bağlanarak renkli moleküller oluşmaktadır. Ortama yağ asitleri eklemenin pigment üretimini teşvik ettiği fakat sitrinin miktarını değiştirmedeği bildirilmektedir. Glukoz ve farklı aminoasitleri içeren sıvı besiyerinde, *M. ruber* kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyonda, sitrinin üretimini azaltmak için, azot kaynağı olarak birçok aminoasit denendiği ve sonuç olarak histidin kullanılması durumunda sitrinin üretiminin inhibe edilebildiği bildirilmektedir (Hajjaj ve ark. 2000b, Xu ve ark. 2003, Dufosse ve ark. 2005). Aynı biyosentetik metabolik yola sahip olmalarına rağmen, besiyeri bileşimi ve ortam koşullarının sitrinin ve pigment üretimini farklı şekilde etkilediği bildirilmektedir. Hajjaj ve ark. (2000a) yaptıkları çalışmada, *M. ruber* tarafından kırmızı pigment ve sitrinin üretiminin kinetik analizini, organik asit birikiminin fonksiyonu olarak incelemişlerdir. Glukoz ve glutamat içeren sentetik besiyerinde, sınırlı oksijen içeren ortamda *M. ruber* tarafından kırmızı pigment ve sitrinin üretiminin, primer metabolitlere benzer olarak hücre gelişimi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Oksijenli ortamda ise sitrinin üretim profilinin tipik bir sekonder metabolitinkine benzer olduğu, daha çok durağan fazda üretildiği belirlenmiştir. Pigment üretiminin ise fermentasyon boyunca hızlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir. Fermentasyon boyunca üretilen organik asitlerin, pigment üretimi üzerinde hafif inhibitör etkisi olduğu, ancak sitrinin üretimini etkilemediği belirtilmektedir (Hajjaj ve ark. 2000a).

### **2.3. Tarım Endüstrisi Atık/Artıklarının Pigment Üretiminde Kullanımı**

*Monascus* pigmentlerinin üretiminde kullanılan teknoloji halen oldukça maliyetli olduğu için, düşük maliyetli proseslerin geliştirilmesine gereksinim duyulduğu bildirilmektedir (Nimnoi ve Lumyong 2009). Mikrobiyal pigment üretiminde fermentasyon ortamı yani substratın

maliyeti oldukça yüksek olmaktadır. Bu yüzden son yıllarda farklı tarım endüstrisi atık ve artıklarının pigment üretiminde substrat veya besin ilavesi olarak kullanılması çalışmaları yapılmaktadır (Babitha ve ark. 2007).

Tarım endüstrisi artıklarının çeşitli mikroorganizmaların üretilmesinde substrat olarak kullanılması, enerjinin korunması ile ilgili artan bilince uygun bir yaklaşım olarak, endüstriye değer katacak bir uygulamadır (Silveira ve ark. 2008). Bu maddelerin mikrobiyal metabolitlerin üretiminde substrat olarak kullanılması, nihai ürün maliyetine etki etmenin yanında, atık yönetiminin bir yolu olarak da görülmektedir. Bu nedenle günümüzde düşük maliyetli bu maddelerin biyoteknolojik proseslerde kullanımında artış görüldüğü bildirilmektedir (Daroit ve ark 2007, Silveira ve ark 2008, Silveira ve ark 2011).

Pirinç ürünleri ve sentetik besin ortamlarından *Monascus* cinsi küfler kullanılarak pigment üretimini konu alan oldukça fazla miktarda çalışma bulunmasına rağmen, *Monascus* pigmentlerinin bunlar haricindeki besin ortamları kullanılarak üretimi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Özellikle de tarımsal atık / artıkların bu amaçla kullanımı ile ilgili çok az sayıda çalışma mevcuttur (Silveira ve ark. 2008).

Buğday artıkları, süt enüstrisi atıkları, şarap endüstrisi atıkları gibi atık / artıkların farklı *Monascus* türlerinin fermentasyonunda besin ortamı veya besin takviyesi olarak kullanımı üzerinde çalışmalar bulunmaktadır.

Çizelge 2.2'de *Monascus* pigmentlerinin üretiminde besin ortamı olarak tarımsal atık/artıkların kullanıldığı çalışmalardan bazıları ile ilgili bilgiler verilmiştir.

Çizelge 2.2. *Monascus* pigmentlerinin üretiminde besin ortamı olarak tarımsal atık/artıkların kullanıldığı çalışmalar

Besin Ortamı	İlave bileşenler	Fermentasyon şekli	Kaynak
Şeker kamışı küspesi	Pepton, NH <sub>4</sub> Cl Soya protein izolatu, Soya kepeği, Peynir altı suyu tozu,	Sıvı ortam	(Silveira ve ark 2011)
Mısır kırması, Fıstık kırması, Hindistan cevizi artığı, Soya kırması	Glukoz, galaktoz, sorboz, mannitol	Katı ortam	(Nimnoi ve Lumyong 2011)
Kırık pirinç, Kırmızı pirinç, Patates Süne hasarlı buğday	-	Katı ortam	(Gümüş ve ark 2009)
Şarap endüstrisi atığı	Pepton, MSG	Sıvı ortam	(Silveira ve ark 2008)
Jackfruit meyvesi çekirdeği	-	Katı ortam	(Babitha ve ark 2007)
Tapyoka nişastası	-	Sıvı ortam	(Timotius 2005)
Tam buğday unu	PO <sub>4</sub> , Zn, NH <sub>4</sub>	Sıvı ortam	(Dominguez-Espinosa ve Webb 2003)

Silveira ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada, *M. purpureus*'un kırmızı pigment üretiminde karbon kaynağı olarak şeker kamışı küspesi, buna ek olarak da çeşitli azot kaynakları kullanılmıştır. Şeker kamışı küspesine ek olarak pepton ve soya proteini izolatının en yüksek pigment verimini sağladığı bildirilmektedir.

Nimnoi ve Lumyong (2011) tarafından yapılan çalışmada ise, *M. purpureus*'un katı ortam fermentasyonu ile kırmızı pigment üretiminde, ucuz tarımsal ürünler veya artıklar kullanılması denenmiştir. Mısır kırmısı ile elde edilen renk değeri (19,40 A/g katı madde), fıstık kırmısı (3,03 A/g katı madde), soya kırmısı (3,01 A/g katı madde) ve hindistan cevizi artığıyla (0,59 A/g katı madde) elde edilen değerlerden yüksek bulunmuştur. Mısır kırmısına % 8 oranında glukoz eklenmesiyle ise, pigment miktarının 6 kat arttığı bildirilmiştir.

Silveira ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada, pigment üretiminde, şarap endüstrisi atığı, lif içeriği yüksek soya fasülyesi kalıntısı, soya fasülyesi kepeği, pirinç kepeği ve peynir altı suyu tozu gibi atıklar ayrı ayrı denenmiştir. İlave bileşen olarak pepton ve MSG'ın denendiği bu çalışmalarda kullanılan ortamlar içerisinde en iyi gelişme üzüm atığında gözlenmiş, onu soya fasülyesi kepeği takip etmiştir. Diğer atıklarda ise daha az pigment üretiminin gerçekleştiği bildirilmektedir. Çalışmada *M. purpureus* ile pigment üretiminde şarap endüstrisi atığının kullanımı faktöriyel dizayn ve cevap yüzeyi yöntemleri ile optimize edilmiştir. Üzüm çekirdeği ve kabuklarından oluşan üzüm atığı, pepton ve MSG konsantrasyonu olmak üzere üç farklı değişkenin değerlendirildiği çalışma için, pepton konsantrasyonunun en önemli parametre olduğu belirlenmiştir. MSG eklenmesinin de sadece yüksek pepton konsantrasyonlarında, pigment üretimini artırdığı belirlenmiştir. Pepton konsantrasyonunun 20-22,5 g/L, üzüm atığının 5-30 g/L olduğu ortamda pigment üretiminin 5,0 OD<sub>500nm</sub> düzeyinde olduğu, 0,1 g/L MSG eklenmesiyle de bu değer 9,0 OD<sub>500nm</sub>'e çıktığı bildirilmektedir (Silveira ve ark. 2008).

Dominguez-Espinosa ve Webb (2003) tarafından yapılan çalışmada ise, *Monascus* pigmentlerinin sıvı ortamda üretimi için tek besin kaynağı olarak farklı buğday unları kullanılmıştır. Çalışma sonucunda pigment sentezinin un miktarı ve fermentasyon boyunca gelişen viskozite profili ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Artan karıştırma hızı nedeniyle artan çözünmüş oksijen oranı, hem sarı hem de kırmızı pigment üretimini artırmıştır. Farklı un oranlarının (% 3-10) denendiği çalışmanın sonucunda, kırmızı pigment üretiminin en yüksek olarak belirlendiği un konsantrasyonunun % 5 (w/v) olduğu bildirilmektedir. Buğday unu içeren substrata az miktarda çinko sülfat eklenmesi ile de kırmızı pigment üretiminin artmakta olduğu belirtilmiştir. Gümüş ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada da buğdayın pigment üretiminde *M. purpureus* için substrat olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

#### **2.4. Buğday ve Buğdayda Süne Zararı**

Buğday dünyada en fazla tarımı yapılan ve birçok fırıncılık mamulü için çok uygun bir hammadde özelliği taşıyan tarımsal bir üründür. İçeriğindeki önemli vitamin ve minerallerle beraber alternatif bir nişasta ve protein kaynağı olarak kabul edilmektedir (Dominguez-Espinoza ve Webb 2003). *Monascus* kullanılarak renk maddesi üretiminde geleneksel olarak pirinç kullanılmasına rağmen yapılan bilimsel çalışmalarda buğdayın veya farklı buğday ürünlerinin besin ortamı olarak kullanılabilmesi vurgulanmaktadır.

*Monascus pigmenti* üretiminde, üretilecek kırmızı pigmenti ve pigment stabilitesini etkileyebileceği için (Jung ve ark 2003, Jung ve ark 2005), kullanılacak substratın hem protein miktarı hem de bu proteinin amino asit bileşimi önemlidir. Buğday ve pirincin protein oranları karşılaştırıldığında, buğday % 11,7 protein içeriği ile % 7,4 protein içeren pirince göre daha zengin bir protein kaynağı olarak bilinmektedir. Kınacı ve Kınacı (2004) tarafından yapılan çalışmada da incelenen 8 farklı buğday çeşidine ait ortalama protein içeriği % 11,45-12,20 aralığında bulunmuştur.

Buğdayda bulunan proteinler içerisindeki aminoasit dağılımı incelendiğinde ise glutamik asit (% 31,1), prolin (% 12,6), lösin (% 6,8) ve serin (% 6,6) en fazla bulunan aminoasitler olarak karşımıza çıkmaktadır. Buna ilaveten pirinç proteinleri içerisinde glutamik asit (% 15,4), aspartik asit (% 8,8), lösin (% 8,1) ve alanin (% 8,1) en çok bulunan aminoasitlerdir (Belitz ve Grosch, 1987). Ning ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada iki pirinç çeşidinin aminoasit içerikleri belirlenmiştir. İki çeşit için aminoasit içerikleri sırasıyla 80,2 ve 81,2 mg/g olarak bulunmuştur. Glutamik asit 13,2 ve 13,7 mg/g, lösin 7,0 ve 6,9 mg/g, aspartik asit 7,1 ve 6,9 mg/g, arjinin 5,4 ve 5,9 mg/g olarak belirlenmiştir.

Jiang ve ark. (2008) buğday üzerine yaptıkları çalışmada toplam aminoasit miktarını 109,7 mg/g olarak belirlemişlerdir. Buğday örneklerinde aminoasit dağılımı ise 78,2 mg/g esansiyel olmayan aminoasit, 31,5 mg/g esansiyel aminoasit, 8,3 mg/g lösin, 9,9 mg/g prolin ve 35,2 mg/g glutamik asit olarak belirlenmiştir.

Buğdayın olgunlaşma periyodundaki iklim koşullarına bağlı olarak süne (*Eurygaster spp.*, *Aelia spp.*) hasarı görmesi, buğdayın verimini, gluten kalitesini (Olanca ve ark. 2009) ve işlenebilirlik kalitesini (Werteker ve Kramreither 2008) etkilemektedir. Bununla birlikte, Kınacı ve Kınacı (2004)' ün Ertugay ve ark. (1995)' ten bildirdiğine göre; süne zararlısı tarafından salgılanan proteolitik ve amilolitik enzimlerin buğday proteini üzerine sınırlı bir

etkisi olmaktadır. Hariri ve ark. (2000) tarafından, süne hasarlı ekmeklik ve makarnalık buğday üzerinde yapılan çalışma sonucunda da süne zararı sonucu protein içeriğinin önemli oranda etkilenmediği belirlenmiştir. Bu etki ortalama olarak ekmeklik buğdayda protein oranında % 2,8 oranında, makarnalık buğdayda ise % 1,9 oranında düşme şeklinde rapor edilmiştir.

Kınacı ve Kınacı (2004) tarafından yapılan çalışmada ise, % 3 oranında süne zararına uğramış buğdayların protein miktarlarının en az % 3,3 en fazla % 9,4 oranında azaldığı belirlenmiştir. Araştırmacılar buğdaydaki süne zararı arttıkça protein miktarındaki düşüşün de arttığını ve yumuşak buğday çeşitlerinin sert çeşitlere göre böcek zararından daha fazla etkilendiğini de vurgulamışlardır.

Süne zararına uğramış buğdayın fırıncılık endüstrisinde kabul görmeyeceği ve ekonomik kayıplara sebep olacağı açıktır. Ancak, süne hasarlı buğdayın mikrobiyal üretim yoluyla daha değerli ürünlere (pigmentler, enzimler) dönüştürülmesi, fırıncılık endüstrisi açısından düşük kaliteli kabul edilen bu hammaddenin değerlendirilmesi yolunda önemli faydalar sağlayabilecektir. Ülkemizde çok fazla bulunabilen süne hasarlı buğday, *M. purpureus* ile pigment üretiminde geleneksel olarak kullanılan pirincin yerine denenebilecek potansiyel bir kaynak olabilir.

## **2.5. *Monascus* Pigmentlerinin Stabilitesi**

Mikrobiyal metabolitlerin ticari/endüstriyel potansiyeli değerlendirilirken, bu maddelerin stabilite ölçümlerinin oldukça önemli olduğu bildirilmektedir. Özellikle farklı proses koşullarında gıda renklendiricisi olarak kullanılacak pigmentlerin degradasyonu ile ilgili bilgiler, gıda teknolojisi uygulamaları açısından önemlidir (Silveira ve ark. 2011).

Birçok bileşen gibi, *Monascus* pigmentleri de çeşitli faktörlerin etkisiyle parçalanmaktadır. *Monascus* pigmentlerini etkileyen faktörler; asitlik, sıcaklık, ışık, oksijen, su aktivitesi ve zaman olarak sıralanabilir (Dufosse ve ark. 2005). Parçalanma etkisiyle meydana gelen renk kaybı, doğal renk maddelerinde rastlanan bir olgudur. Doğal renk maddelerinin gıda uygulamaları sırasında, uygun dozajda kullanımları ile renk kaybının telafi edilebileceği bildirilmektedir (Carvalho ve ark 2005).



Sarıdan kırmızıya farklı renklerde olan *Monascus* pigmentlerinin, genel olarak pH 2-10 aralığında stabil özellik gösterdikleri ve otoklav sıcaklığına dayanıklı oldukları bildirilmektedir (Mapari ve ark. 2006).

*M. anka* tarafından üretilen pigmentlerin özellikleri ve stabilitesi ile ilgili yapılan bir çalışmada, bu pigmentlerin UV ve floresan ışık altında stabil olduğu ancak güneş ışığına duyarlı olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışma, tartarik ve sitrik asidin *Monascus* pigmentleri üzerinde zarar verici etki gösterdiğini ve en yüksek zararlı etkinin bakır iyonları tarafından oluşturularak bu pigmentlerde renk değişimlerine sebep olduğunu ortaya koymuştur (Kim ve ark. 1997).

*Monascus* pigmentlerinin stabilitesinin artırılması ile ilgili yapılan bir çalışmada, 18 farklı aminoasidin azot kaynağı olarak kullanılmasıyla elde edilen pigmentlerinin fotostabilitesi, güneş ışığı ve UV ışık kullanılarak belirlenmiştir. UV (365 nm) ışığa maruz kalan pigmentin stabilitesinin güneş ışığına maruz kalan çözeltiler ile benzer özellik gösterdiği belirlenmiştir. Stabilitenin artan pigment konsantrasyonu ile arttığı, pH 7'den daha düşük ve daha yüksek pH'larda azaldığı bildirilmektedir. 30 °C'de 30 gün boyunca inkübe edilen pigment çözeltilerinin % 80'den daha büyük oranda stabil kaldığı, ancak azot kaynağı olarak sadece NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> kullanılan kontrol örneğinin sadece % 29'unun parçalanmadan kalabildiği bildirilmektedir (Jung ve ark. 2005).

Silveira ve ark. (2011) tarafından yapılan, *M. purpureus*'un kırmızı pigment üretiminde şeker kamışı küspesinin kullanıldığı çalışmada, üretilen pigmentlerin ısıl ve pH stabilitesi incelenmiştir. Isıl stabilitenin belirlenmesi için, pigment çözeltileri 30, 40, 60 ve 80 °C'lerde 6 saat inkübe edilmiştir. Pigment stabilitesi otoklavlama işlemi (121 °C'de 15 dak.) sonrasında da belirlenmiştir. Ayrıca, pH 4,0-8,0 aralığında pH stabilitesi tespit edilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre pigmentin, düşük sıcaklıklarda (30-60 °C) ve nötral pH değerlerinde (6,0-8,0), daha yüksek sıcaklık (60 °C üzeri) ve asidik pH'lara (4,0-5,0) kıyasla daha stabil olduğu belirlenmiştir. Arunachalam ve Narmadhapriya (2011) da *Monascus* kullanılarak elde edilen kırmızı pigmentlerin pH 6,0-8,0 arasında stabil olduğunu rapor etmiştir.

Nimnoi ve Lumyong (2011), mısır kırmısının substrat olarak kullanıldığı çalışma sonucu üretilen kırmızı pigmentin, ısıl stabilitesini ve fotostabilitesini belirlemişlerdir. 40, 50 ve 60 °C'de 6 saat inkübe edilen pigment çözeltilerinin absorbanlarında sırasıyla, % 21,65, % 25,50

ve % 31,27'lik azalma tespit edildiği bildirilmiştir. 121 °de 15 dak otoklavlama ve 70 °de 10 s pastörizasyon işlemleri sonrası sırasıyla, kırmızı pigment miktarında % 30,57 ve % 5,41 düzeylerinde azalma tespit edilmiştir (Nimnoi ve Lumyong 2011). 6 saat boyunca UV ışığa maruz bırakılan pigment çözeltisinin absorbansında ise % 35,29'luk bir azalma tespit edilmiştir. Sonuç olarak pigmentin yüksek sıcaklığa ve UV ışığa duyarlı olduğu bildirilmiştir (Nimnoi ve Lumyong, 2011).

Stabilite çalışmaları pigmentin üründeki stabilitesi şeklinde de gerçekleştirilebilmektedir. Dufosse ve ark. (2005)'in Fabre ve ark. (1993)'dan bildirdiğine göre sosislere ve konserve pateye eklenen pigmentlere ait stabilite değerleri, 4 °de 3 aylık bir depolama boyunca % 98-92 düzeylerinde belirlenmiştir.

Bir renk maddesinin parçalanmasına ilişkin, reaksiyon derecesi ve buna ait kinetik değerler, parçalanmanın gerçekleştiği ortama ve bu ortamda bulunan çeşitli bileşiklere bağlıdır. Bu nedenle, gıda bileşenlerinin ısıl degradasyonunu modellemek için farklı kinetik eşitlikler önerilmektedir. Silveira ve ark. (2011), *Monascus* pigmentlerinin ısıl degradasyonu için önerilen 5 farklı eşitliği, istatistiksel yöntemlerle incelemiş ve en düşük  $\chi^2$  (Ki kare) ve ortalamanın standart hatası değerlerine, en yüksek  $R^2$  (belirleme katsayısı) değerine sahip olan birinci derece eşitliği en iyi model olarak seçmiştir. Farklı sıcaklıklara maruz kalan *Monascus* pigmentlerinin ısıl degradasyonu için önerilen birinci derece eşitliklere ait  $R^2$  değerleri, 0,802-0,995 aralığında bulunmuştur.

Birinci derece reaksiyon kinetiğinin, meyve suyundaki antosiyaninler gibi doğal pigmentlerin ısıl degradasyonunu açıklamak üzere yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir (Silveira ve ark. 2011). Literatürde yer alan diğer çalışmalarda da *Monascus* pigmentlerinin parçalanması genellikle birinci derece bir reaksiyon kinetiği ile açıklanmıştır. Örneğin, Jung ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada, *Monascus* pigment türevlerinin birinci derece reaksiyon kinetiğine uygun olarak parçalandığı; histidin kullanılan örnek hariç, güneş ışığı etkisiyle gerçekleşen parçalanma reaksiyonlarının hepsine ait  $R^2$  değerlerinin 0,99'dan büyük olduğu belirlenmiştir (Jung ve ark. 2005).

## 2.6. *Monascus* Ürünlerinde Renk Ölçümü

Renk algısal bir olgu olarak kabul edilmesine rağmen, rengin sayısal olarak ifade edilmesi hem gıda maddelerinde kullanılan renk maddeleri üzerinde yapılan bilimsel çalışmalar, hem de endüstriyel uygulamalar için önemlidir. Fiziksel spektrumlar ve maksimum absorptans gibi kalitatif araştırmalar her zaman doğru rengi belirtmemektedir. Bu nedenle rengi tanımlamak için daha sayısal bir yaklaşıma ihtiyaç vardır. Rengi sayısal olarak tanımlamada kullanılan yöntemlerden biri Lambert-Beer kanununa bağlı olarak renkli çözeltilerin maksimum absorptans yaptıkları dalgaboyunda ekstinksiyonlarının kullanılmasıdır (Zolinger 2003).

Literatürde *Monascus* pigmentlerinin analizi için, 480 nm (Hajjaj ve ark. 2000a), 495 nm (Dominguez-Espinosa ve Webb 2003), 500 nm (Chang ve ark. 2006, Silveira ve ark. 2008) ve 510 nm (Lim ve ark. 2000) gibi farklı dalga boylarında absorptans ölçümüne dayalı spektrofotometrik yöntemler kullanılmaktadır.

Rengi tanımlamada başvurulan bir diğer yöntem ise farklı dalga boyu ve yoğunluktaki görünür ışığın insan gözünde oluşturduğu uyarının kullanılmasıdır. Bu sistem, herhangi bir renkli yüzeyden yansıyan ışığın görsel olarak üç temel renk olan kırmızı, yeşil ve mavinin karışımı olarak tanımlanması temeline dayanır (Zolinger 2003). Bu kolorimetrik sistem şu şekilde yorumlanmaktadır:  $L^*$  değeri 0 (siyah) ile 100 (beyaz) arasında parlaklığı ifade eder. Pozitif  $a^*$  değeri kırmızı rengi ifade ederken, negatif  $a^*$  değeri ise yeşil rengi ifade eder. Benzer şekilde, pozitif ve negatif  $b^*$  değerleri sırasıyla sarı ve mavi renkleri ifade etmektedir (Mapari ve ark. 2006).

## **2.7. Modelleme ve Yapay Sinir Ağlarının Kullanımı**

Farklı *Monascus* türlerinin fermentasyon prosesleri birçok optimizasyon tekniği kullanılarak modellenmiştir (Chang ve ark. 2002, Panagou ve ark. 2003, Chatterjee ve ark. 2008). YSA proses optimizasyonu (Goncalves ve ark. 2005, Movagharnejad ve Nikzad 2007, Baş ve ark. 2007a, Baş ve ark. 2007b), tahmine dayalı mikrobiyoloji ve mikrobiyal gelişme modelleme (Dutta ve ark. 2004, Panagou ve ark. 2007, Yin ve Ding 2009) ve aynı zamanda *Monascus* fermentasyonunun modellenmesi (Chang ve ark. 2006) gibi birçok çalışmada kullanılmış doğrusal olmayan, kesin bir modelleme tekniği olarak bilinmektedir.

YSA modelleme tekniği günümüzde bir çok alanda yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Basit bir şekilde insan beyninin çalışma şeklini taklit eden YSA, Yapay Zeka

çalışmaları içinde önemli bir yere sahiptir. YSA metodolojisi veriden öğrenebilme, genelleme yapabilme, sınırsız sayıda değişkenle çalışabilme, sınıflandırma, veri ilişkilendirme, teşhis ve yorumlama ve optimizasyon vb. birçok önemli özelliğe sahiptir. Bu özellikleri sayesinde oldukça önemli avantajlar sağlayan YSA metodolojisi birçok alanda olduğu gibi mühendislik alanında da kullanım olanağı bulmaktadır (Yurtoğlu 2005, Baş ve ark. 2006).

Chang ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada, kontrol edilen parametreler, fermentasyon sıcaklığı ve çözülmüş oksijen, çıktılar ise glukoamilaz aktivitesi ve kırmızı pigment konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada *M. anka* fermentasyonu için sıcaklık 27-42°C aralığında, çözülmüş oksijen ise % 10-40 aralığında değiştirilmiş, toplam fermentasyon süresi ise 120 saat olarak belirlenmiş, her 24 saatte bir glukoamilaz ve pigment ölçümü yapılmıştır. Çalışmada, geliştirilen YSA'nın hız fonksiyonunun tahmin yeteneği gösterilmiş ve *M. anka*'nın sıvı ortam fermentasyonu için optimum operasyon koşullarının belirlenmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir. Chang ve ark. (2006), klasik modelleme teknikleriyle koşulların belirlenmesinin zor olduğu kompleks proseslerde, YSA modeli yaklaşımının uygulanabileceğini belirtmektedir.

Klasik modelleme teknikleriyle fermentasyon koşullarının belirlenmesine alternatif olarak YSA kullanılarak *Monascus* pigmentlerinin üretiminin optimizasyonu, bu konu ile ilgili yapılan çalışmalara farklı bir yaklaşım sunabilir.

Bu araştırmanın amacı, *M. purpureus* went 1604'ün sıvı ortam fermentasyon prosesinde, süne hasarlı buğdayın başlıca besin ortamı bileşeni olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktır. Öncelikle kırmızı pigment üretimi için optimum fermentasyon periyodu belirlenmiş, daha sonra sıcaklık, karıştırma hızı ve ışığın kırmızı pigment üretimi üzerine birleşik etkisi araştırılarak bu parametrelerin optimum değerleri YSA kullanılarak modellenmiştir. Son ürünlerdeki kırmızı pigment miktarı ve sitrinin miktarı HPLC, LC-MS ve görünür bölge spektrofotometresi ile analiz edilmiştir. Ayrıca üretilen renk maddesinin stabilitesinin ısı, UV ışık, pH ve süre ile değişimi belirlenmiş ve renk maddesinin salam üretiminde kullanımı denenmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Çalışmada yurtdışından (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Almanya) sağlanmış olan ve Namık Kemal Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Kültür Koleksiyonu'nda bulunan *M. purpureus* Went DSM 1604 suşu kullanılmıştır.

Analiz ve denemelerde kullanılan Potato dextrose agar (PDA) besiyeri, sodyum hidroksit (NaOH), hidroklorik asit (HCl), sülfürik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), laktik asit, fosforik asit (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), etanol (EtOH), 2-propanol (IPA), bromfenol mavisi, çinko sülfat (ZnSO<sub>4</sub>), glukoz (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), LC grade asetonitril (MeCN), metanol, kloroform ve su Merck KGaA (Darmstadt, Almanya)'dan temin edilmiştir. Standart sitrinin ise Acros Organics (Geel, Belçika) firmasından alınmıştır.

Substrat olarak kullanılan süne hasarlı buğday, yerel bir un fabrikasından (Tekirdağ, Türkiye) temin edilmiştir. Denemelerde kullanılan karabuğday ve salam ürün denemesinde kullanılan % 25 yağlı tavuk kıyması ise yerel bir marketten alınmıştır.

Katkı maddesi olarak kullanılan izole soya proteini (ADM Company, ABD), modifiye patates nişastası (Roquette Freres, Fransa), nitritli tuz (% 0,6 sodyum nitrit içeren sofr tuzu) ve baharat karışımı (karabiber, yenibahar, kişniş, kırmızı biber) ise katkı maddeleri sağlayan yerel bir firmadan tedarik edilmiştir.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Küf gelişimi ve inokülasyon

*Monascus* kültürlerinin saklanması, geliştirilmesi ve sayımının yapılması amacıyla PDA besiyeri kullanılmıştır (Baumgart 1993). 30°C'de 7 günde PDA besiyerinde gelişmiş olan kültürlerden misel/spor süspansiyonu steril saf su ile hazırlanmış (Hajjaj ve ark. 2000a) ve bu süspansiyondan % 3 oranında (yaklaşık 10<sup>5</sup> spor/mL olacak şekilde) inokülasyon yapılmıştır. Sterilize edilmiş besin ortamlarına inokülasyon, steril kabin içerisinde aseptik ortamda mikropipet yardımı ile yapılmıştır.

### **3.2.2. Kùltivasyon ortamının hazırlanması**

#### **3.2.2.1. Kùltivasyon ortamı seçimi için yapılan ön denemeler**

Yapılan ön denemelerde *M. purpureus*'un kùltivasyonunda kullanılacak besin ortamını belirlemek amaçlı, süne hasarlı buğday, karabuğday, mısır ve kepekli pirinç kullanılmıştır.

Araştırma kapsamında ayrıca optimum ortam koşulları tespit edildikten sonra, besin ortamı bileşimi değiştirilerek renk maddesi üretiminin artıp artmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla da süne hasarlı buğdaya ek olarak kara buğday unu, etanol, glukoz ve ZnSO<sub>4</sub> besin ortamı ilavesi olarak kullanılmıştır. Cevap yüzeyi yöntemi ile deney tasarımı yapılan ön çalışmalarda buğday unu (0,5-10,5 g/100mL), glukoz (1-9 g/100mL), etanol (0,1-0,9 mL/100 mL) ve ZnSO<sub>4</sub> (0-0,0075 g/100 mL) oranlarında ilave edilerek sıvı besin ortamları hazırlanmış ve *Monascus* inokülasyonu ve inkübasyon sonrası absorbans (A) değerleri belirlenmiştir.

#### **3.2.2.2. Substrat olarak kullanılacak süne hasarlı buğdayın özelliklerinin belirlenmesi**

Substrat olarak un üretiminde kullanılmayacağı tespit edilip, iade edilen süne hasarlı buğday kullanılmıştır. Yerel bir un fabrikasından (Tekirdağ, Türkiye) temin edilmiş olan süne hasarlı buğdayın, nem (%), kül (%), protein (%), yağ (%), gluten index, yaş gluten (%), Zeleny sedimentasyon (mL) ve beklemeli sedimentasyon (mL) ve hektolitre ağırlığı (kg/hL) değerleri AACCC onaylı yöntemlere göre belirlenmiştir (Anon. 1990). Süne hasarlı buğday oranı, Köksel ve ark. (2002) tarafından önerilen yöntemle göre belirlenmiştir. Çizelge 3.1'de süne hasarlı buğdayda yapılan analizler ve kullanılan yöntemler verilmiştir.

Çizelge 3.1. Süne hasarlı buğdayda yapılan analizler

Özellik	Kullanılan Metod
Süne hasarlı tane oranı (%)	Köksel ve ark. (2002)
Nem (%)	AACC Metot 44-15.02
Kül (%)	AACC Metot 08-01.01
Protein (%)	AACC Metot 46-12.01
Yağ (%)	AACC Metot 30-25.01
Gluten index	AACC Metot 38-12.02
Yaş Gluten (%)	AACC Metot 38-12.02
Zeleny sedimentasyon	AACC Metot 56-60.01
Beklemeli sedimentasyon	AACC Metot 56-60.01
Hektolitre ağırlığı (kg/hL)	AACC Metot 55-10.01

### 3.2.2.3. Süne hasarlı buğday kullanılarak kültivasyon ortamının hazırlanması

Süne hasarlı buğday, IKA® Werke M20 Model laboratuvar tipi değirmende (IKA®-Werke GmbH Co., Staufen, Almanya) parçalandıktan sonra, 70 mesh elekten elenerek buğday kırması elde edilmiştir. Süne hasarlı buğday kırmasını % 5 (w/v) oranında içeren 50'şer mL'lik süspansiyonlar saf su ile erlenmayerlerde hazırlanmış, gerektiğinde başlangıç pH'sı 0,1 N NaOH veya 0,1 N HCl kullanılarak 6,5'e ayarlanmıştır.

Besin ortamları, Hirayama Hiclave HV-85 model otoklavda (Hirayama, Saitama, Japonya) 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edilmiş ve oda sıcaklığına soğutulduktan sonra misel/spor süspansiyonu inoküle edilmiştir.

### 3.2.3. Küf sayımı

İnokülasyonda kullanılacak misel/spor süspansiyonundan PDA besiyerine ekim yapılmış ve inkübasyon sonunda gelişen koloniler sayılmıştır. İnkübasyon sonunda PDA besiyerinde gelişen koloni adetleri belirlenmiştir (Chen ve Hu 2005).

### 3.2.4. pH değerinin belirlenmesi

Fermentasyon boyunca Hanna pH 211 model pH metre (Hanna, ABD) kullanılarak 24 saatte bir pH ölçümü yapılmıştır.

### 3.2.5. Spektrofotometrik kırmızı pigment ölçümü

*Monascus* pigmentlerinin maksimum absorbans yaptığı dalgaboyunu ( $\lambda$  max) belirlemek amaçlı olarak, etanol ekstraktlarının 380-750 nm aralığındaki absorpsiyon spektrumu oluşturulmuştur. Bu işlem Agilent 8453 UV-Visible Spektrofotometre (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kırmızı pigment ekstraksiyonu için sıvı kültürden 10 mL alınmış ve 20 mL % 95'lik etanol ile birlikte 100 mL'lik erlenmayere eklenmiştir. Çalkalayıcıda 1 saat boyunca 30 °C'de 180 devir/dak hızla ekstrakte edilmiştir (Lim ve ark. 2000). Ekstrakte edilen besin ortamı, 3000 devir/dak hızla 15 dakika santrifüj edilmiş ve böylece pigment çözeltisi elde edilmiştir (Johns ve Stuart 1991, Pattanagul ve ark 2008).

Kırmızı pigment miktarını belirlemek amacıyla, pigment çözeltisinin maksimum absorbans yaptığı dalga boyundaki absorbans değerleri UV-Vis spektrofotometre (UV-1208 Shimadzu, Japonya) ile ölçülmüştür. Negatif kontrol olarak taze besin ortamı kullanılmıştır. Maksimum absorbans yaptığı dalgaboyundaki absorbans değeri kırmızı pigment miktarı olarak ifade edilmiştir (Babitha ve ark. 2007). Çalışmada sadece ekstraselüler pigment dikkate alınmış ve pigment verimi, gram katı madde başına maksimum absorbansın gerçekleştiği dalgaboyundaki absorbans birim (A/g katı madde) olarak da hesaplanmıştır (Johns ve Stuart 1991).

### 3.2.6. Deneme dizaynı

İnkübasyon, farklı sıcaklık ve çalkalama hızlarında, ışıklı ve ışısız olarak, WiseCube WIS-S10 model çalkalamalı inkübatör (Dahian Scientific, Seoul, Kore) kullanılarak 120 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Çalkalamalı inkübatördeki erlenler Şekil 3.2'de görülmektedir.

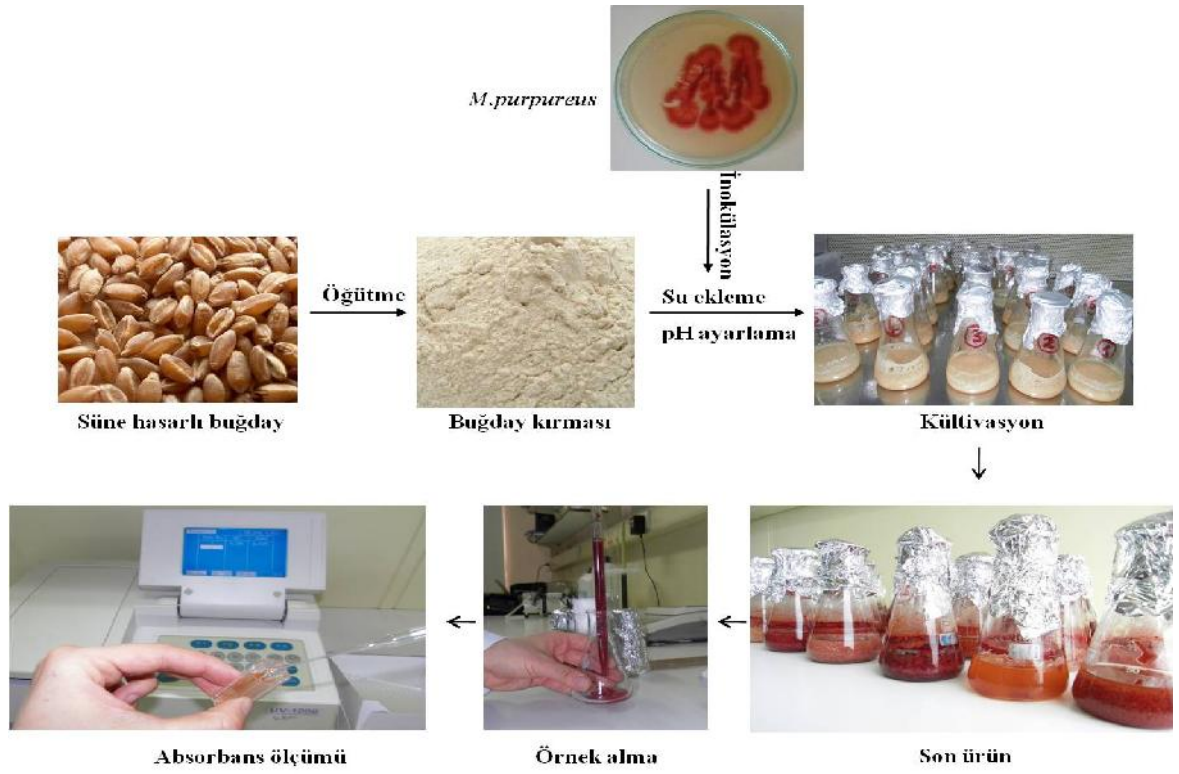




Şekil 3.1. Çalkalamalı inkübatördeki inkübasyon

*M. purpureus* went 1604'ün pigment üretimi, 27-37°C arasında 5 farklı fermentasyon sıcaklığında ve 0-250 devir/dak arasında 5 farklı çalkalama hızında, ışıklı ve ışısız ortamda gerçekleştirilmiştir. 2 tekerrürlü olacak şekilde 60 deneme tamamlanmıştır.

Erlenler ışık kaynağının (Cool Day Light, 100 W, 6500 K, Philips Electronics, Hollanda) altında olacak şekilde çalkalamalı inkübatöre yerleştirilmiş ve 120 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Işıksız ortam elde etmek için ise erlenler alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Kültivasyon periyotlarının sonunda her farklı deneme için ortam pH değeri ve kırmızı pigment miktarı belirlenmiştir. Bu aşamalar Şekil 3.2'de verilmiştir. Analizler üç paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Kırmızı pigment üretim aşamaları

### 3.2.7. Yapay sinir ağı tasarımı ve pigment üretiminin optimizasyonu

Araştırmada kullanılan YSA dizaynı Windows Vista™ Professional ortamında, MATLAB® Versiyon 7.5.0 Neural Network Toolbox kullanılarak yapılmıştır (The Mathworks, Natick, MA, ABD). Ön denemelerin sonucunda iki katmanlı ileri beslemeli, giriş katmanında üç nöron, gizli katmanda altı nöron ve çıkış katmanında bir nöron olan YSA modeli oluşturulmuştur. Giriş katmanındaki üç nöron; sıcaklık, karıştırma hızı ve ışık, çıkış katmanındaki bir nöron ise absorbanı temsil etmektedir. Giriş katmanı ve gizli katmanı arasındaki transfer fonksiyonu 'tansig', gizli katman ve çıkış katmanı arasındaki fonksiyon ise 'logsig' olarak seçilmiştir.

Yapılan 60 deneme sonucunda elde edilen veriler YSA'nın eğitimi, doğrulanması ve test edilmesi amacıyla üçe ayrılmıştır. Najjar ve ark. (1997) tarafından önerilen şekilde verilerin % 60'ı eğitim, % 20'si doğrulama ve kalan % 20'si test verisi olarak kullanılmıştır.

Ağ girdileri farklı ölçüm aralıklarında doğabilecek dalgalanmaları azaltmak için aşağıdaki eşitlik kullanılarak [-1 1] aralığına normalize edilmiştir.

$$x_n = \frac{(x_i - (x_{maks} + x_{min})/2)}{((x_{maks} - x_{min})/2)}$$

Bu eşitlikte kullanılan  $x_n$ ,  $x_i$ ,  $x_{maks}$  ve  $x_{min}$  sırasıyla, girdilerin normalize, gerçek, maksimum ve minimum değerlerini ifade etmektedir.

YSA, Levenberg-Marquardt optimizasyon kuralı kullanılarak eğitilmiştir. Deneme yanılma yaklaşımı ile denenen çok sayıda iterasyon sonucu optimum YSA modeli oluşturulmuştur. YSA için performans değerlendirmesi deneysel ve tahmini absorbans değerleri arasında hata kareleri ortalaması ve regresyon analizi sonuçları ile yapılmıştır. Araştırmada kabul edilen hedef hata kareleri ortalaması değeri  $1 \times 10^{-4}$  tür.

YSA'ndan elde edilen çıktılar, *M. purpureus* ile en yüksek kırmızı pigment üretimi prosesinin optimizasyonunda kullanılmıştır. Belirli kültürasyon koşullarında elde edilecek absorbans sonuçlarının, herhangi bir laboratuvar denemesi yapmadan YSA ile tahmin edilmesi sağlanmıştır. Girdi matrisinde 252 farklı kültürasyon koşulu öngörölmüş ve bu koşullarda üretilebilecek kırmızı pigmentin absorbans değeri YSA ile tahmin edilmiştir. Bu veri setleri kontor plot grafiğine aktarılarak optimum üretim koşulları belirlenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen optimum koşullarda üç laboratuvar denemesi yapılarak tahmin edilen absorbans değerlerinin doğruluğu araştırılmıştır.

### 3.2.8. Kırmızı pigment ve sitrinin için LC-MS analizi

Örneklerin etanol ekstraktlarına ait ayırma işlemi HPLC (LC-20 AT, Shimadzu, Japonya) cihazında gerçekleştirilmiştir. Renk maddelerinin LC/MS spektrumu Micromass® ZQ™ Mass Spectrometer (Waters Corporation, Milford, MA, ABD) sisteminde gerçekleştirilmiştir.

Analiz ESI kullanılarak pozitif iyon modunda gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrometresi, rubropunktamin (354,1717 m/z), monaskorubramin (382,1990 m/z) ve sitrinin (251,0387 m/z) pozitif iyonlarını 1 saniyelik tarama sürecinde tespit edebilmek amacıyla, daughter iyon

taraması modunda çalıştırılmıştır. İyonlar herbir pigment ve sitrinin için protonlanmış moleküler iyonu  $[M+H]^+$  göstermektedir.

### **3.2.9. Sitrinin analizi**

Sitrinin analizi, izokratik koşullarda Shimadzu RF-10AXL model floresans dedektörlü (Shimadzu, Japonya) Shimadzu HPLC sistemi (LC-20 AT, Shimadzu, Japonya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.9.1. HPLC mobil fazının hazırlanması**

Mobil faz (0,33 N  $H_3PO_4$ /asetonitril/ 2-propanol (75:20:5 v:v:v)), 750 mL 0,33 N  $H_3PO_4$ , 200 mL Asetonitril ve 50 mL 2-propanol karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözelti, 0,45  $\mu$ m 47 mm çapında PTFE (politetrafloretillen) membran filtre kullanılarak vakum pompası yardımıyla vakum altında süzöldükten sonra HPLC sisteminde kullanılmıştır.

#### **3.2.9.2. Sitrinin standart çözeltisinin hazırlanması**

5 mg olarak satın alınan % 98 saflıkta toz sitrinin standardı amber renkli şişede 3 mL metanol kullanılarak çözülmüş ve bu çözelti 25 mL'lik balon jöjeye aktararak hacmi 25 mL'ye tamamlanmıştır. Bu şekilde 200 mg/L konsantrasyonunda sitrinin stok standart çözeltisi hazırlanmış ve bu çözelti  $-18^\circ C$ 'de muhafaza edilmiştir.

4 mg/L sitrinin çalışma çözeltisinin hazırlanması amacıyla stok çözülden 500  $\mu$ L alınmış ve 25 mL'ye tamamlanmıştır. Çalışma standardı  $-18^\circ C$ 'de muhafaza edilmiş ve maksimum 3 ay içinde kullanılmıştır. Çalışma standart çözeltisi kullanılmadan önce, sıcaklığının oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir.

#### **3.2.9.3. Sitrinine ait kalibrasyon grafiğinin oluşturulması, alıkonma zamanı, belirleme sınırı, nicelik sınırı ve geri alma oranlarının belirlenmesi**

Sitrinin standardı kullanılarak hazırlanan stok çözelti ile 25, 50, 100 ve 200 ng/mL olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda sitrinin standart çözeltisi hazırlanmıştır. Sitrinin konsantrasyonuna karşılık, HPLC kromatogramında elde edilen pik alanları grafiğe

geçirilerek sitrinin kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Örneklerdeki sitrinin konsantrasyonları da sitrinin kalibrasyon grafiği kullanılarak LC Solutions (Shimadzu, Japonya) paket programı ile hesaplanmıştır.

Belirleme sınırı (Limit of Detection; LOD), metodun ve cihazın hassasiyetini yansıtan bir parametredir. Nicelik sınırı (Limit of Quantification; LOQ) ise, düşük konsantrasyonda madde içeren örnekler için kullanılması durumunda metodun güvenilirliğini ifade eder. LOD, kromatogramda oluşan gürültü seviyesinin 3 katı, LOQ ise gürültü seviyesinin 10 katı olarak hesaplanmıştır (Zheng ve ark. 2009).

Araştırmada kullanılan yöntem performansının belirlenmesi amacıyla geri alma çalışması yapılmıştır. Bu amaçla, çözelti konsantrasyonu 40, 80 ve 160 ng/mL olacak şekilde 4 mg/L konsantrasyonunda sitrinin çalışma çözeltisi ile kontamine edilmiş, geri alma oranları ayrı ayrı belirlenmiştir. Bu çalışmada iki farklı ekstraksiyon yöntemi denenmiştir. Birinci yöntemde, ekstraksiyon işlemi, % 95'lik etanolle gerçekleştirilmiştir. Çözelti 65 °C'de 30 dakika etüvde bekletilmiş, bu çözülden 1 mL alınmış ve ependorf tüpüne eklenmiş, düşük sıcaklıkta etanol uzaklaştırılmıştır (Lee ve ark. 2006). İkinci yöntemde ise sitrinin ekstraksiyonunda kloroform kullanılarak deneme gerçekleştirilmiştir. 1 mL sıvı örnek üzerine 4 mL kloroform eklenmiş ve 100 devir/dak çalkalama hızında 37 °C'de 30 dakika ekstrakte edilmiştir. Bu süspansiyondan 1 mL alınmış, ependorf tüpüne eklenmiş ve düşük sıcaklıkta kloroform uzaklaştırılmıştır (Lee ve ark. 2006).

#### **3.2.9.4. HPLC ile sitrinin analizi**

Cam deney tüpüne 1 mL örnek alınmış, üzerine 5 mL kloroform eklenmiş ve 65 °C'de 30 dakika etüvde bekletilmiştir. Bu çözülden 1 mL alınmış ve ependorf tüpüne eklenmiş, düşük sıcaklıkta etanol uzaklaştırılmıştır (Lee ve ark. 2006). Kurutulan ekstraktların üzerine 1'er mL Asetonitril eklenmiş ve bu çözümler 0,45 µm 25 mm çapında PTFE Syringe filtre kullanılarak süzöldükten sonra 1,5 mL kapasiteli viallere alınarak HPLC'de analiz edilmiştir. Örnekler analiz edilinceye kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Sitrinin miktarı, izokratik koşullarda floresans detektörlü HPLC sisteminde belirlenmiştir. 20 µl örnek direkt olarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Inertsil (GL Sciences, Inc., CA, ABD) ODS-3 C18 paslanmaz çelik kolon (150 x 4,6 mm, 5 µm) kullanılmıştır. Akış hızı 1,0

mL/dakika olarak ayarlanmıştır. Floresans dedektörü, 330 nm eksitasyon ve 500 nm emisyon dalga boylarına ayarlanmıştır. Mobil faz, pH değeri 2,5 olan 0,33 N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/asetonitril/ 2-propanol (75:20:5 v:v:v) karışımı olarak hazırlanmıştır (Franco ve ark. 1996, Orti ve ark. 1986, Lee ve ark. 2006).

### 3.2.10. Pigment türevlerinin saflaştırılması

Fermentasyon ortamı, İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) yöntemi ile analiz edilmiştir. Konsantre edilmiş etanol ekstraktı, Silika jel tabakaya (Silica Gel 60 plates, Merck, Darmstadt, Germany) spotlanmış ve kloroform/ metanol/ su (90:25:4) çözeltisinin bulunduğu tanka yerleştirilmiştir (Jung ve ark. 2003).

Kromatogram görüntüsü UV ışık altında elde edilmiştir. Kırmızı pigment spotuna ait R<sub>f</sub> değeri aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır.

$$R_f = \frac{\text{Bileşiğin uygulama noktasından itibaren aldığı yol}}{\text{Çözücünün orijinden itibaren aldığı yol}}$$

### 3.2.11. Pigment stabilitesinin belirlenmesi

Üretilen pigmentin sıcaklık, süre, ışık ve pH stabilitesi belirlenmiştir. 100 mL besin ortamı, 500 mL'lik erlene alınarak üzerine 100 mL etil alkol eklenmiş, çalkalayıcıda 30 °C'de ve 180 devir/dak hızla ekstrakte edilmiştir (Jung ve ark. 2005). Ekstrakte edilen besin ortamı, 3000 devir/dak hızla 15 dakika santrifüj edilmiştir (Johns ve Stuart 1991, Pattanagul ve ark. 2008). Elde edilen pigment çözeltisi stabilite analizlerinde kullanılmıştır.

Tüm stabilite testlerinde, pigment ölçümü, 3.2.5 Pigment Ölçümü bölümünde anlatıldığı gibi yapılmıştır. Stabilite değerlerine ait sonuçlar, çözeltinin başlangıç absorbansına göre % olarak aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Stabilite} = \frac{A \times 100}{A_0}$$

A, t anında pigment çözeltisinin maksimum absorbans yaptığı dalgaboyundaki absorbansı

A<sub>0</sub>, t = 0 anında pigment çözeltisinin maksimum absorbans yaptığı dalgaboyundaki absorbansı

### 3.2.11.1. Isıl stabilitenin belirlenmesi

Pigmentin ısıl stabilitesinin belirlenmesi amacıyla, kapaklı tüplere 2'şer mL pigment ekstraktı eklenmiş, 0 °C, 4 °C, 12 °C, 25 °C, 72 °C'lerde 6 saat boyunca inkübe edilmiştir. Her saat sonunda örneklerin absorbansları okunmuş ve % stabilite değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca pastörizasyon ve sterilizasyon işlemleri sonrasındaki stabilite değerleri de hesaplanmıştır.

4 °C, buzdolabı sıcaklığı olarak kabul edildiği için seçilmiştir. 12 °C, et ürünleri üretim tesisinde kullanılmak üzere üretilen boya maddesinin, tesiste maruz kalacağı maksimum sıcaklık olarak düşünüldüğü için seçilmiştir. Çünkü, Türk Gıda Kodeksi "Kırmızı Et ve Et Ürünleri Üretim Çalışma ve Denetleme Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" uyarınca, ürünün teknolojisi başka bir sıcaklık derecesini gerektirmedikçe üretim işlemlerinin yapıldığı odaların sıcaklığı 12 °C'yi geçmemelidir (Anon. 2005). 25 °C, depolanan ürünlerin maruz kalacağı oda sıcaklığı olarak kabul edilmiş ve bu nedenle seçilmiştir. Salam ve sosiste hastalık etmeni bakterilerin inaktivasyonu ile ilgili literatür tarandığında uygulanan pişirme sıcaklıklarının çok farklı olduğu görülmektedir. Thomas ve ark. (2008) uzun raf ömürlü sosis üretimi üzerine yaptıkları çalışmada pişirme işlemini buharda gerçekleştirmişler ve sosislerin merkez sıcaklığı 75 °C'ye ulaşana dek pişirme işlemine devam etmişlerdir. Oteiza ve ark. (2003) yerel bir sosis türünde *E.coli* O157:H7 bakterisini sıcaklıkla inaktive etmek üzerine yaptıkları bir çalışmada pişirme koşulları olarak 54-62 °C'ler arasında farklı süreler kullanmışlardır. Ülkemizde genel olarak uygulanan pişirme işleminin de ürün merkez sıcaklığı 72 °C'ye ulaşana dek pişirme şeklinde olduğu bilinmektedir. 72 °C salam üretiminde pişirme işleminde ürün merkez sıcaklığının yaklaşık bu değere çıkması gerektiği için seçilmiştir.

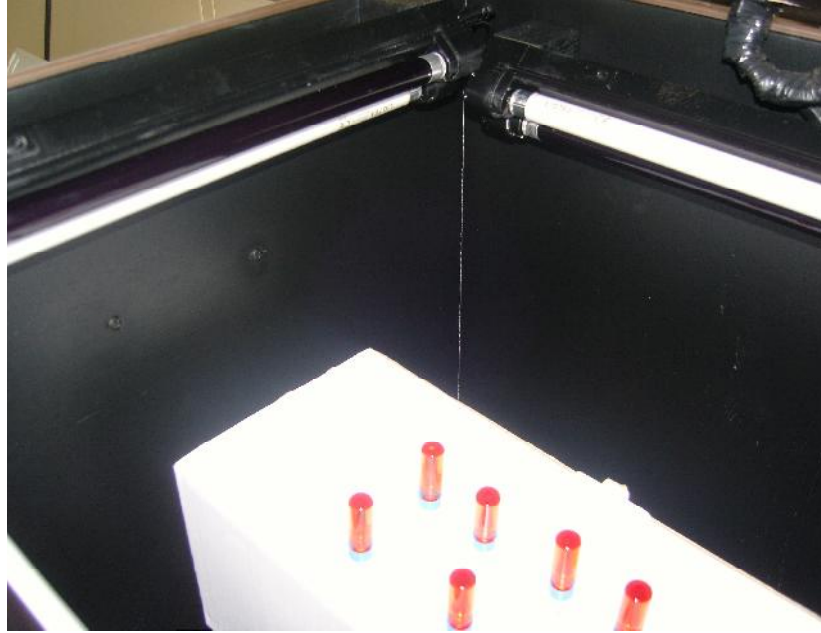
### 3.2.11.2. Stabiliteye depolama süresinin etkisinin belirlenmesi

Boya maddesinin bir işletmede ortalama üç ay depolanabileceği ve olası depolama sıcaklığının buzdolabı sıcaklığı veya oda sıcaklığı olabileceği kabul edilmiştir. Bu nedenle stabilite için örnekler, ayrıca 4°C ve 25°C'de 12 hafta boyunca ışısız ortamda, VELP FTC 90 E model soğutmalı inkübatörde (VELP Scientifica, Usmate, İtalya) depolanmıştır. Depolama süresince 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. haftaların sonunda çözeltilerin absorbansları belirlenmiştir.

### 3.2.11.3. Fotostabilitenin belirlenmesi

Pigmentin fotostabilite testi için UV ışık kullanılmıştır. Pigment çözeltilerini içeren cam vialler, siyah bir kutu içerisine yerleştirilmiş ve iç cepheye bağlı 4 adet UV lamba (365 nm, 15 W, PL15, Philips Electronics, Hollanda) kullanılarak UV ışığa maruz bırakılmıştır. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24, 29, 48, 72 ve 120. saat sonunda çözeltilerin absorbans ölçümleri yapılmıştır (Jung ve ark. 2005).

Fotostabilite testi için kullanılan sistem Şekil 3.3'te görülmektedir.



Şekil 3.3. Pigment çözeltilerinin UV ışığa maruz bırakıldığı ortamın görünümü

### 3.2.11.4. pH stabilitesinin belirlenmesi

pH stabilite testleri için, 5 farklı pH değerinde (4,5 – 8,5) tampon çözelti hazırlanmıştır. Pigment çözeltileri 1:1 oranında bu tampon çözeltiler ile karıştırılmıştır. Çözeltilerin absorbansları 6 saat sonra ölçülmüştür (Jung ve ark 2005).



Türk Gıda Kodeksi “Et Ürünleri Tebliği” uyarınca salam, sosis gibi emülsifiye et ürünlerinde pH en çok 6,4 olmalıdır (Anon. 2000). Üretilecek renk maddesinin et ürünlerinde kullanımı deneneceği için, stabilite ölçümü de bu değeri kapsayan bir aralıkta gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.11.5. Kinetik analizlerde kullanılan prosedürler

Pigmentin parçalanma reaksiyonunun birinci dereceden bir reaksiyon olduğu kabul edilmiş ve reaksiyon eşitliği aşağıdaki şekilde ifade edilmiştir (Jung ve ark. 2005).

$$\frac{dA}{dt} = -kA$$

Bu eşitlik aşağıdaki şekilde integre edilmiştir.

$$\ln(A/A_0) = -kt$$

Yukarıdaki eşitlikte;

$A$ ,  $t$  anındaki pigment konsantrasyonunu

$A_0$ ,  $t = 0$  anındaki pigment konsantrasyonunu

$k$ , hız sabitini

$t$ , süreyi ifade etmektedir.

### 3.2.11.6. Reaksiyon hız sabitinin ( $k$ ) hesaplanması

Her faktör için  $t$ 'ye karşılık  $\ln(A/A_0)$  değerleri grafiğe geçirilmiştir. Yarı logaritmik ölçekli bu grafiklerde elde edilen eğrilere linear regresyon analizi uygulanarak eğrilerin denklemleri hesaplanmış ve elde edilen denklemler kullanılarak, reaksiyon hız sabitleri ( $k$ ) hesaplanmıştır (Jung ve ark. 2005).

### 3.2.11.7. Yarılanma süresinin ( $t_{1/2}$ ) hesaplanması

Yarılanma süresi, incelenen bileşenin % 50'sinin parçalanması için gerekli süre olarak tanımlanabilir. Birinci derece kinetiğe uyan reaksiyonlar için aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmaktadır.

$$t_{1/2} = -\ln(0,5) \times k^{-1}$$

Yukarıdaki eşitlikte;

$k$ , hız sabitini

$t_{1/2}$  süreyi ifade etmektedir.

### 3.2.12. Boya maddesinin salam üretiminde kullanılması

Salam üretim denemesi, 8 litre kapasiteli Hobart 84186 Model laboratuvar tipi kuter (Hobart, Offenburg, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dolum işlemi 60 kalibrelik plastik kılıflara laboratuvar tipi dolum makinesi ile yapılmıştır. Kılıflara doldurulan salamlar 90 °C su içerisinde merkez sıcaklık 72 °C olana kadar pişirilmiştir. Sıcaklık kontrolü saplama tipi termometre ile yapılmış ve pişirme işlemi yaklaşık 2,5 sa sürmüştür.

Pişirme işleminin ardından oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk bekletilen salamlar soğuk su banyosuna alınmış ve renk ölçümleri yapılmaya kadar buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Salam üretiminde kullanılan reçete 100 kg toplam salam hamuru üzerinden Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Salam üretiminde kullanılan reçete

Tavuk kıyması (% 25 yağlı)	70 kg
İzole soya proteini	5 kg
Su/buz	15 kg
Nitritli tuz	2 kg
Modifiye nişasta	5 kg
Baharat karışımı	2 kg
Tütsü aroması	0,1 L

Bu temel reçete kullanılarak öncelikle hiç boya maddesi içermeyen kontrol örneği üretilmiştir. Araştırmada elde edilen boya maddesi, 100 kg salam hamurunda; 0,2 L, 0,4 L, 1,2 L, 2,4 L, 4,8 L, 7,2 L ve 9,6 L olacak şekilde hamura ilave edilmiştir.

### **3.2.13. Üretilen salamların renk analizi**

Salamların renk analizi Hunter-Lab tristimulus kolorimetre (D25LT, Hunter Associates Laboratory, Reston, Virginia, ABD) sistemi kullanılarak yapılmış, sonuçlar  $L^*$ ,  $a^*$ , and  $b^*$  değerleri olarak verilmiştir.

### **3.2.14. İstatistiksel analizler**

Gruplar arası farklılıklar, tek yönlü varyans analizi uygulanarak % 5 güven aralığında ( $P < 0,05$ ) belirlenmeye çalışılmıştır. Ortalamaların karşılaştırılmasında Duncan's Çoklu Karşılaştırma Testi MSTAT-C istatistik paket programı kullanılmıştır (Anon. 1988).

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1.Kültivasyon Ortamının Hazırlanması

#### 4.1.1.Substrat seçimi için yapılan ön denemeler

*M. purpureus*'un kültivasyonunda kullanılacak besin ortamını belirlemek amaçlı yapılan ön denemelerde, süne hasarlı buğday, karabuğday, mısır ve kepekli pirinç örnekleri arasında, süne hasarlı buğday ile en yüksek A değeri elde edildiği belirlenmiştir.

#### 4.1.2.Süne hasarlı buğday örneğine ait özellikler

Hammadde olarak kullanılan süne hasarlı buğdayın özelliklerine ait sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek, sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olacak şekilde Çizelge 4.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Süne hasarlı buğday örneğine ait özellikler

Özellik	Sonuç <sup>a</sup>	Kullanılan Metot
Süne hasarlı tane oranı (%)	5 $\pm$ 1	Kökssel ve ark. (2002)
Nem (%)	10,36 $\pm$ 0,04	AACC Method 44-15.02
Kül (%)	1,62 $\pm$ 0,01	AACC Method 08-01.01
Protein (%)	10,29 $\pm$ 0,27	AACC Method 46-12.01
Yağ (%)	0,84 $\pm$ 0,03	AACC Method 30-25.01
Gluten index	69,67 $\pm$ 5,69	AACC Method 38-12.02
Yaş Gluten (%)	24,00 $\pm$ 2,65	AACC Method 38-12.02
Zeleny sedimentasyon	46 $\pm$ 1	AACC Method 56-60.01
Beklemeli sedimentasyon	34 $\pm$ 1	AACC Method 56-60.01
Hektolitire ağırlığı (kg/hl)	79,57 $\pm$ 0,57	AACC Method 55-10.01

<sup>a</sup> Sonuçlar, ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde verilmiştir.

Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi çalışmada kullanılan buğday örneğinde süne hasarlı tane oranı  $\% 5 \pm 1$  olarak belirlenmiştir ve bu değer örneğin fırıncılık ürünleri üretimine uygun olmadığını ifade etmektedir (Köksel ve ark. 2002).

Analiz sonuçları incelendiğinde örneğe ait Zeleny sedimentasyon değeri ve beklemeli sedimentasyon değerlerinin sırasıyla  $46 \pm 1$  ve  $34 \pm 1$  olduğu görülmektedir. Beklemeli sedimentasyon değeri, Zeleny sedimentasyon değerinden düşüktür. Greenway ve ark. (1965) tarafından bildirildiğine göre bu iki sedimentasyon değeri arasındaki fark örnekteki süne zararı yoğunluğu hakkında fikir vermektedir. Araştırma sonuçları, kullanılan buğday örneğinin süne zararına uğramış olan bir örnek olduğunu doğrulamaktadır. Buğday örneğine ait fizikokimyasal özellikler incelendiğinde de ürünün fırıncılık endüstrisi için kabul edilemez özellikte olduğu görülmektedir.

Süne hasar oranı  $\% 5 \pm 1$  olarak tespit edilen buğday örneğinin, protein içeriğinin  $\% 10,29 \pm 0,27$  olması protein miktarının süne hasarı ile çok fazla azalmadığını göstermektedir.

## **4.2. Kırmızı Pigment Üretimi**

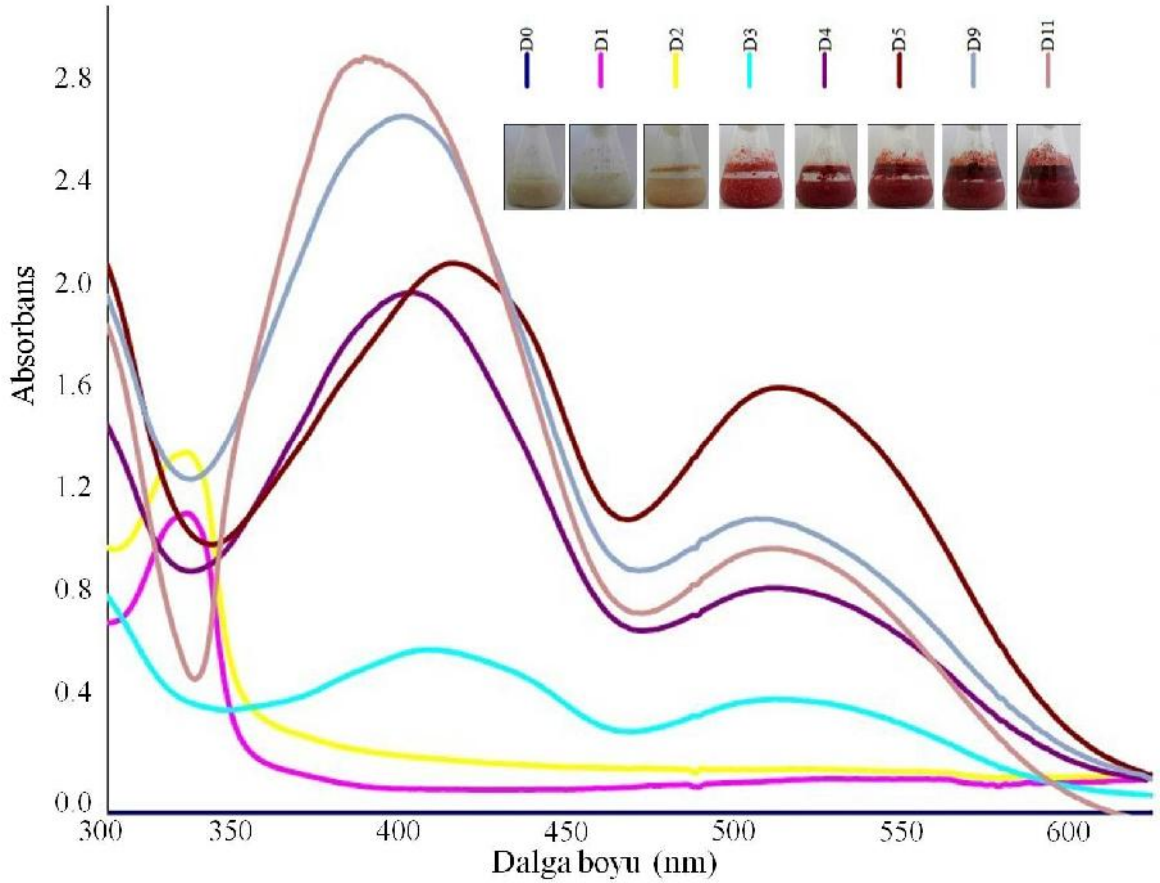
### **4.2.1. Kırmızı pigment miktarının spektrofotometrik olarak belirlenmesi**

*Monascus* pigmentlerinin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyunu ( $\lambda$  max) ve inkübasyon süresini belirlemek amaçlı olarak, 11 günlük inkübasyondan oluşan bir ön deneme yapılmıştır. Kültivasyon ortamlarının etanol ekstraktlarının 380-750 nm aralığındaki absorpsiyon spektrumu oluşturulmuştur. Bu işlem Agilent 8453 UV-Visible Spektrofotometre (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Değerler Ek 1’de verilmiştir.

11 günlük kültürün başlangıç (D0), 1., 2., 3., 4., 5., 9. ve 11. (D11) günlerine ait pigment çözeltilerinin görünür bölgedeki absorpsiyon spektrumları, Şekil 4.1’de verilmiştir. 11 günlük kültürde, 3. günde pigment üretiminin başladığı, maksimum pigment üretiminin 5. günde gerçekleştiği, inkübasyonun ilerleyen günlerinde absorpsiyon değerlerinin düştüğü belirlenmiştir. Bu nedenle inkübasyon süresi 5 gün olarak tespit edilmiştir. Mukherjee ve Singh (2011) tarafından yapılan çalışmada, 25-40 aralığında, başlangıç pH’sı 2-8 arasında

olacak şekilde denemeler gerçekleştirilmiş ve pigment üretiminin inkübasyonun 3. gününde başladığı ve fermentasyon periyodu boyunca devam ettiği bildirilmektedir.

Absorbsiyon değerleri kullanılarak oluşturulan spektrumda, inkübasyonun 5. gününe ait çözeltinin 410 nm ve 510 nm dalgaboylarında maksimum absorbands yaptığı görülmüştür.



Şekil 4.1. Pigment Çözeltilerine Ait Absorbsiyon Spektrumu

Görünür bölgedeki absorbsiyon spektrumunda, 3. günden itibaren biri 410 nm civarında diğeri de 510 nm civarında olmak üzere ikişer adet pik görülmektedir. Babitha ve ark (2007) tarafından yapılan çalışmada da, başlangıç pH'ları 4,5-7,5 arasında değişen farklı kültürasyon ortamlarına ait absorbsiyon spektrumlarında, 410 nm ve 510 nm civarında ikişer pik olduğu bildirilmiştir. Literatürde, *Monascus* ekstraktlarında sentezlenmiş iki tip pigmentin mevcut olduğu bildirilmektedir (Dominguez-Espinosa ve Webb 2003). Bu iki pigment, görünür bölgedeki spektrumda iki büyük pike karşılık gelmektedir.  $\lambda$  max değeri 400-410 nm arasında

olan ilk pik sarı pigmentlerin varlığını, 490-500 nm arasında olan ikinci pik ise kırmızı pigmentlerin varlığını göstermektedir (Juzlova ve ark 1996).

Şekil 4.1’de görüldüğü gibi, farklı günlere ait örneklerin  $\lambda$  max değerlerinde hafif kaymalar mevcuttur. Ancak elde edilen bu değerler daha önceki çalışmalarla uyumludur (Babitha ve ark 2007, Dominguez-Espinosa ve Webb 2003, Juzlova ve ark 1996). Çizelge 4.2.’de kültivasyon boyunca *Monascus* pigmentlerinin maksimum absorbans yaptıkları dalgaboyları verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kültivasyon boyunca *Monascus* pigmentlerinin maksimum absorbans yaptıkları dalgaboyları

Kültivasyon süresi	Absorbsiyon spektrumu (nm)	
	$\lambda_{max1}$	$\lambda_{max2}$
3. gün	401	510
4. gün	395	509
5. gün	410	510
9. gün	393	504
11. gün	381	509

Literatürde kırmızı *Monascus* pigmentlerinin analizi için kullanılan, 480 nm (Hajjaj ve ark 2000a), 495 nm (Dominguez-Espinosa ve Webb 2003), 500 nm (Silveira ve ark 2008, Chang ve ark 2006) ve 510 nm (Lim ve ark 2000) gibi farklı  $\lambda$  max değerleri mevcuttur. Bu çalışmada kırmızı pigment için belirlenen  $\lambda$  max değeri, 510 nm olup, bu değer spektrofotometrik analizlerde kullanılmıştır.

#### 4.2.2.Ortam koşullarına bağlı olarak pigment üretim miktarındaki değişim

*M. purpureus* went 1604’ün pigment üretimi, 27-37°C arasında 5 farklı sıcaklıkta ve 0-250 devir/dak arasında 5 farklı çalkalama hızında, ışıklı ve ışısız ortamda gerçekleştirilmiştir. 2 tekerrürlü olacak şekilde 60 deneme tamamlanmıştır.

Üretilen pigment solüsyonlarının 510 nm’deki absorbans değerleri UV-Vis spektrofotometrede (UV-1208, Shimadzu) okunmuştur. 120 saatlik kültivasyon sonunda

üretilen kırmızı pigment miktarı, dilüsyon faktörü de dikkate alınarak  $A_{510 \text{ nm}}$  birim olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar ayrıca,  $A_{510 \text{ nm}}$  birim/ g kuru madde olarak hesaplanmış, 4.3'te ortalama ve standart sapma şeklinde verilmiştir.

Gruplar arası farklılıklar, varyans analizi uygulanarak % 5 güven aralığında ( $P < 0,05$ ) belirlenmiş, Duncan's Multiple Range Test ile ortalamalar karşılaştırılmış ve sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir. Kırmızı pigment üretim miktarlarına ilişkin sonuçlar 6' şar verinin ortalamasıdır.

Çizelge 4.3. Çalkalama hızı, sıcaklık ve ışığa bağlı olarak pigment üretim miktarları

Çalkalama Hızı (devir/dak) Işık		Kırmızı Pigment Üretim Miktarları*				
		(A <sub>510 nm</sub> / g kuru madde)				
		Kültivasyon sıcaklığı (°C)				
		27	30	32	35	37
0	-	0,0±0,0 <sup>x,C,F</sup>	4,3±0,1 <sup>y,A,F</sup>	1,7±0,1 <sup>x,B,F</sup>	3,8±0,2 <sup>x,A,F</sup>	1,2±0,1 <sup>x,B,e</sup>
50	-	3,8±0,3 <sup>x,D,e</sup>	9,1±0,4 <sup>x,A,e</sup>	4,6±0,2 <sup>x,C,d</sup>	7,8±0,8 <sup>x,B,c</sup>	2,7±0,2 <sup>x,E,d</sup>
100	-	11,1±0,3 <sup>x,B,d</sup>	13,0±0,3 <sup>y,A,d</sup>	3,5±0,1 <sup>x,D,e</sup>	5,3±0,3 <sup>y,C,e</sup>	5,3±0,2 <sup>x,C,b</sup>
150	-	30,7±0,4 <sup>x,B,a</sup>	35,1±0,4 <sup>y,A,a</sup>	24,7±0,1 <sup>y,C,a</sup>	24,9±0,5 <sup>x,C,a</sup>	17,1±0,3 <sup>x,D,a</sup>
200	-	23,2±0,2 <sup>x,A,b</sup>	21,1±0,4 <sup>y,B,c</sup>	8,9±0,4 <sup>x,C,c</sup>	7,0±0,2 <sup>y,D,d</sup>	5,2±0,3 <sup>x,E,bc</sup>
250	-	21,3±0,3 <sup>x,B,c</sup>	22,9±0,4 <sup>x,A,b</sup>	12,7±0,2 <sup>y,C,b</sup>	11,4±0,2 <sup>x,D,b</sup>	4,6±0,3 <sup>x,E,c</sup>
0	+	0,0±0,0 <sup>x,D,F</sup>	5,4±0,1 <sup>x,A,e</sup>	1,7±0,1 <sup>x,C,F</sup>	3,7±0,2 <sup>x,B,e</sup>	1,3±0,1 <sup>x,C,e</sup>
50	+	4,3±0,3 <sup>x,D,e</sup>	9,3±0,3 <sup>x,A,d</sup>	5,0±0,2 <sup>x,C,d</sup>	7,4±0,8 <sup>x,B,c</sup>	2,7±0,1 <sup>x,E,d</sup>
100	+	11,3±0,3 <sup>x,B,d</sup>	14,3±0,6 <sup>x,A,c</sup>	3,7±0,2 <sup>x,E,e</sup>	6,7±0,5 <sup>x,C,d</sup>	5,6±0,4 <sup>x,D,b</sup>
150	+	30,6±0,2 <sup>x,B,a</sup>	35,7±0,6 <sup>x,A,a</sup>	26,8±0,3 <sup>x,C,a</sup>	25,4±0,3 <sup>x,D,a</sup>	17,4±0,4 <sup>x,E,a</sup>
200	+	23,5±0,2 <sup>x,A,b</sup>	22,2±0,2 <sup>x,B,b</sup>	9,0±0,5 <sup>x,C,c</sup>	7,7±0,1 <sup>x,D,c</sup>	5,4±0,3 <sup>x,E,b</sup>
250	+	21,8±0,4 <sup>x,A,c</sup>	21,8±0,3 <sup>y,A,b</sup>	13,8±0,2 <sup>x,B,b</sup>	11,6±0,2 <sup>x,C,b</sup>	4,5±0,3 <sup>x,D,c</sup>

\* Değerler, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

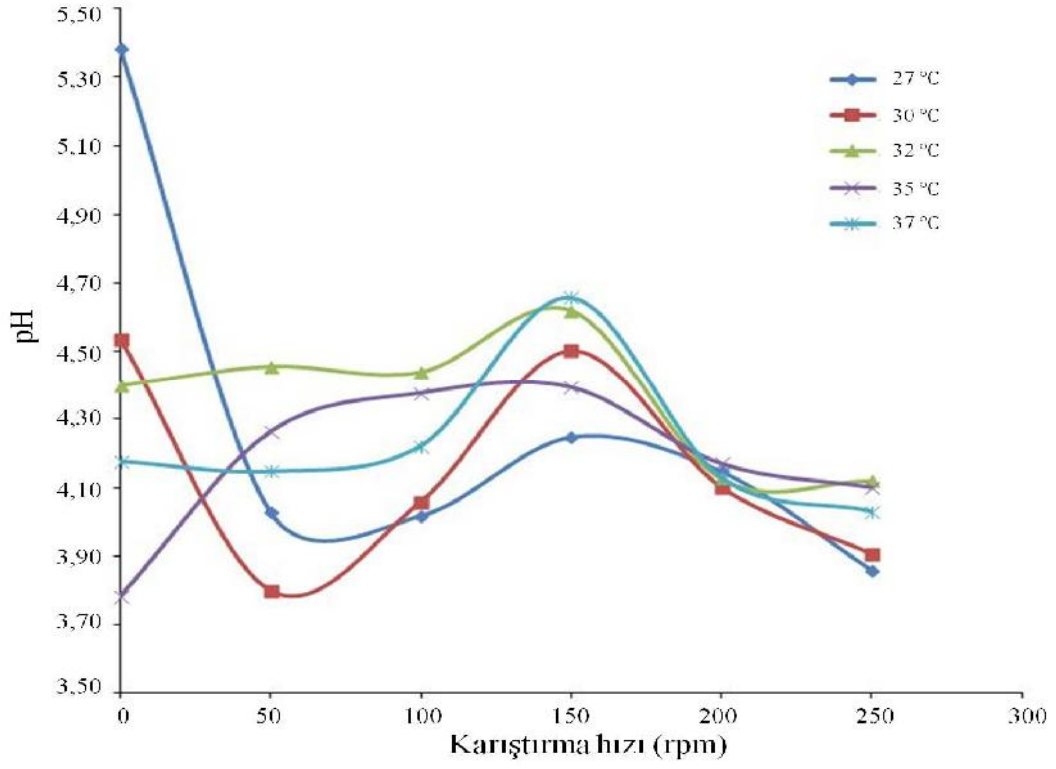
<sup>x, y</sup> Her bir sütunda farklı harfle gösterilen, aynı çalkalama hızı, sıcaklık ve farklı ışık değerine sahip ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır ( $P < 0,05$ ).

<sup>A, B, C, D, E</sup> Her bir satırda farklı harfle gösterilen, farklı sıcaklıklar için ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır ( $P < 0,05$ ).

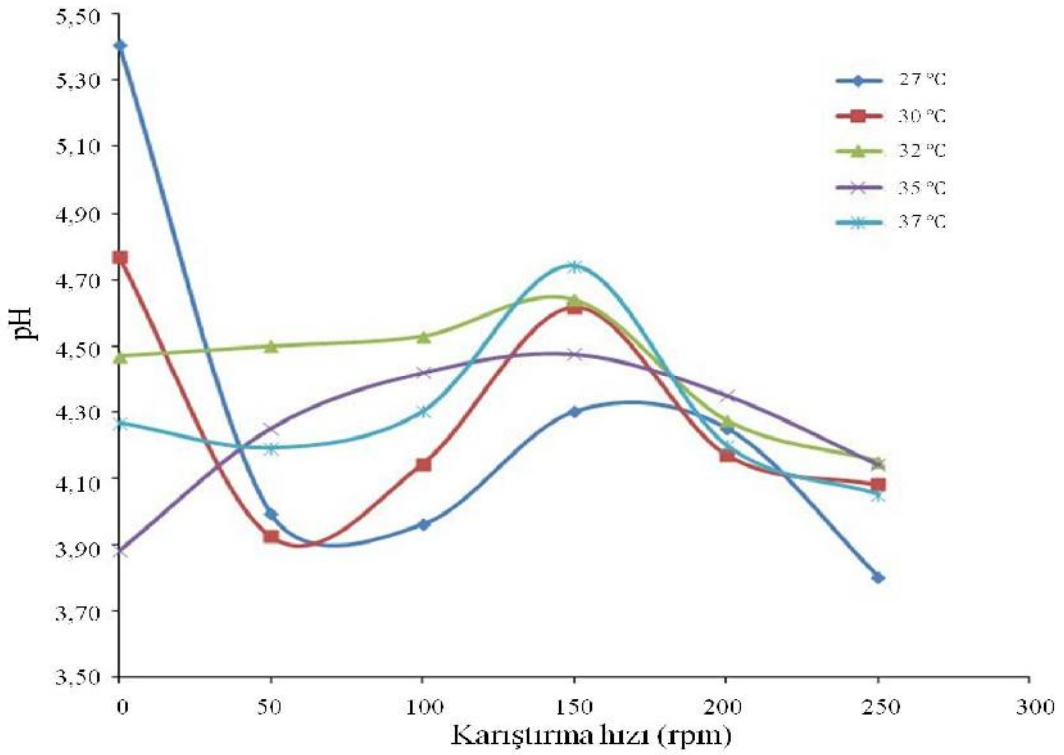
<sup>a, b, c, d, e, f</sup> Her bir sütunda farklı harfle gösterilen, aynı ışık, aynı sıcaklık ve farklı çalkalama hızı değerine sahip ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır ( $P < 0,05$ ).



Çizelge 4.3’de görüldüğü gibi *M. purpureus* kullanılarak kırmızı pigment üretimine sıcaklık ve karıştırma hızı, ışıklı ve ışısız ortamda önemli ( $P < 0,05$ ) etki yapmaktadır. Işık etkisi incelendiğinde ise etkinin sadece 30 °C’de önemli ( $P < 0,05$ ) olduğu, diğer sıcaklık değerlerinde (27, 32, 35, 37 °C) ise ışık varlığı ya da yokluğunun önemsiz ( $P > 0,05$ ) olduğu gözlenmiştir. Araştırma sonuçları Wang ve ark. (2009) tarafından bildirilen sonuçlarla kısmen de olsa uyumlu gözükmektedir. Bu çalışmada *M. ruber* fermentasyonu ile üretilen pigment konsantrasyonuna mavi ışığın etkisi incelenmiş ve fermentasyonun erken evrelerinde (3-5 gün) ışıklı ve ışısız ortam arasında pigment konsantrasyonlarının istatistiki olarak farklı olmadığı sonucu elde edilmiştir. Mevcut araştırmada ise özellikle 30 °C civarında optimum koşulların sağlanabileceğinin dikkate alınması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır. Şekil 4.2. (a) ve (b)’de farklı sıcaklık ve farklı karıştırma hızlarında kültürasyon sonu ortam pH’sındaki değişim grafiği verilmiştir.



(a)

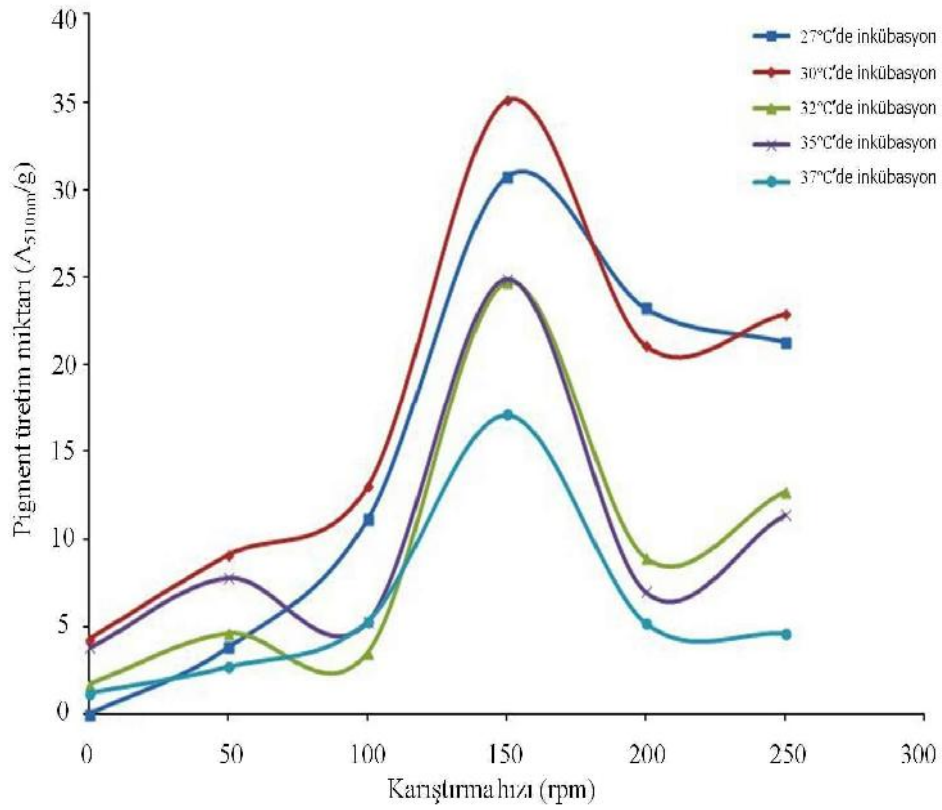


(b)

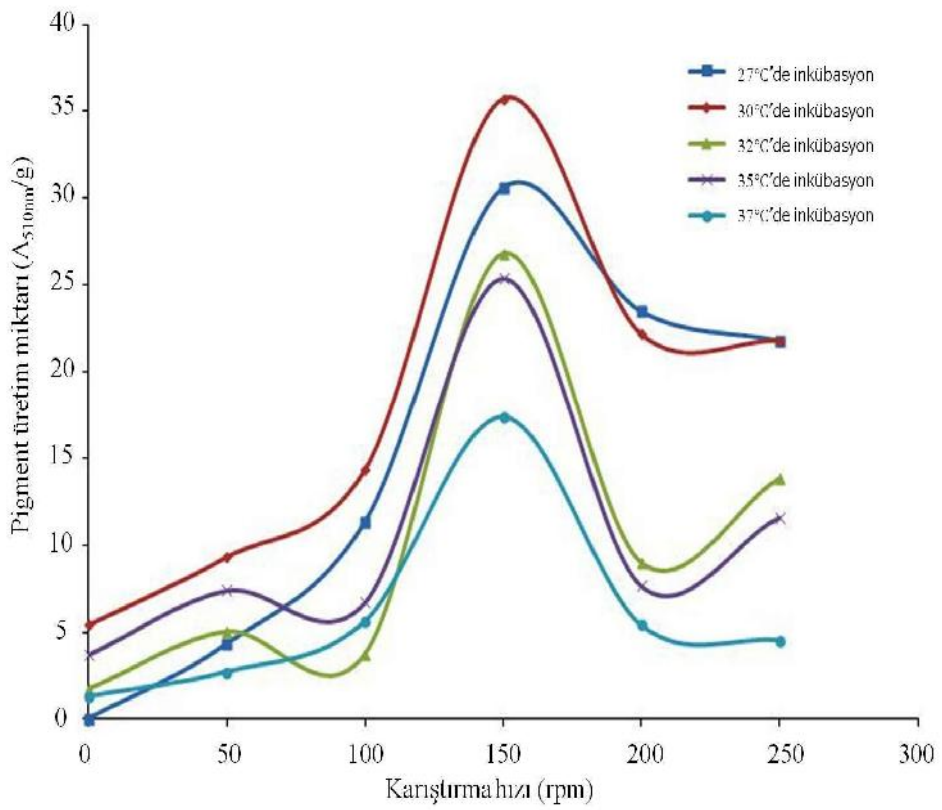
Şekil 4.2. Kültivasyon sonu ortam pH'sı değişim grafiği  
Işıklı ortam (a) Işıksız ortam (b)

Tüm sıcaklık değerleri için 150 devir/dak değerinde, nihai pH'nın 4,70-4,10 arasında olduğu görülmektedir. 200 devir/dak değerinde pH 4,10 değeri civarında, 250 devir/dak değerinde ise tüm sıcaklıklarda elde edilen nihai pH 4,10-3,90 civarındadır. 150 devir/dak değerinden daha düşük karıştırma hızlarında, farklı sıcaklıklardaki kültürasyon sonrası nihai pH değerleri, daha geniş aralıklarda değişmektedir. Karıştırma hızı, ortam homojenizasyonunu sağlayarak çözünmüş oksijen miktarını ve küfün ortamdaki substrata erişimini etkilemiştir. Bu değişimler de mikrobiyal gelişmeyi etkilemiş ve farklı pH değerleri elde edilmesine neden olmuştur.

Şekil 4.3 ve 4.4'te karıştırma hızına bağlı olarak renk üretimini gösteren grafikler verilmiştir. Denenen tüm kültürasyon sıcaklıklarında, karıştırma hızının 150 devir/dak civarında olduğu durumda, kırmızı pigment üretim miktarının maksimum olduğu belirlenmiştir. Bu durum hem ışıklı ve hem de ışısız ortamda gerçekleştirilen kültürasyon için geçerlidir. Daha düşük karıştırma hızı ile pigment üretiminde gözlenen düşüş, viskozitesi yüksek kültürasyon ortamında küf ile substratın bir şekilde temas edememesinden kaynaklanabilir. Yüksek karıştırma hızlarında ise küfün morfolojisinin olumsuz yönde etkilenmesi söz konusu olabilir. Ayrıca, optimum karıştırma hızı değerinde ortamda optimum düzeyde oksijen varlığı sağlanmış olabilir. Lee (2004) tarafından yapılan çalışmada da karıştırma hızındaki değişimin ortamdaki çözünmüş oksijen miktarını değiştirdiği belirtilmiştir.



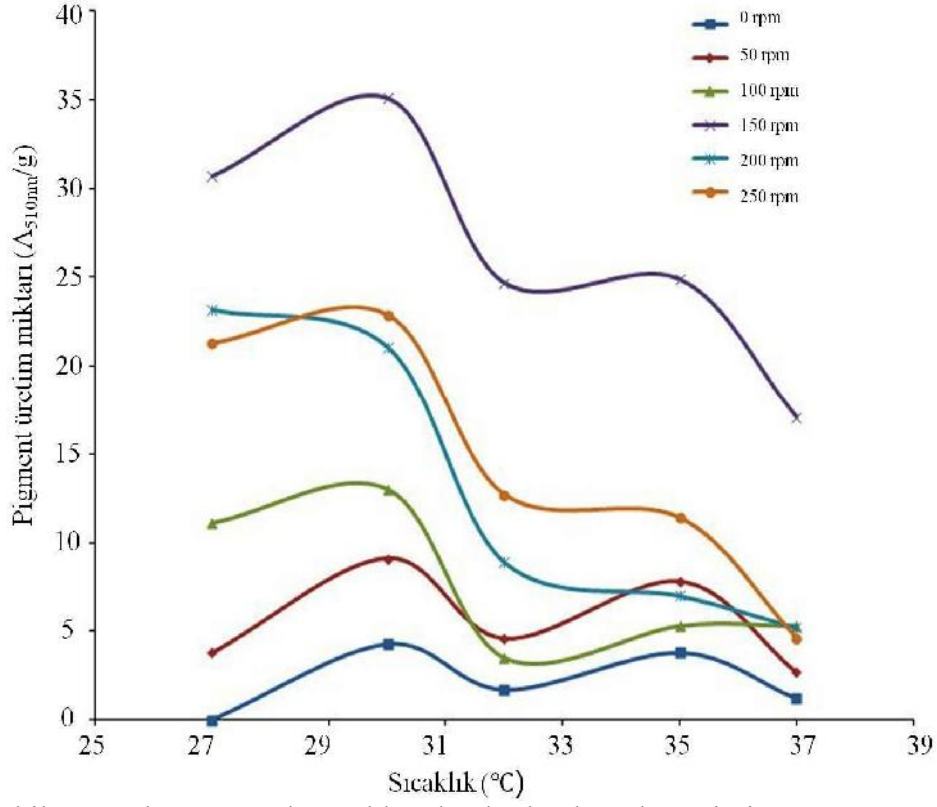
Şekil 4.3. Işıksız ortamda karıştırma hızına bağlı olarak renk üretimi



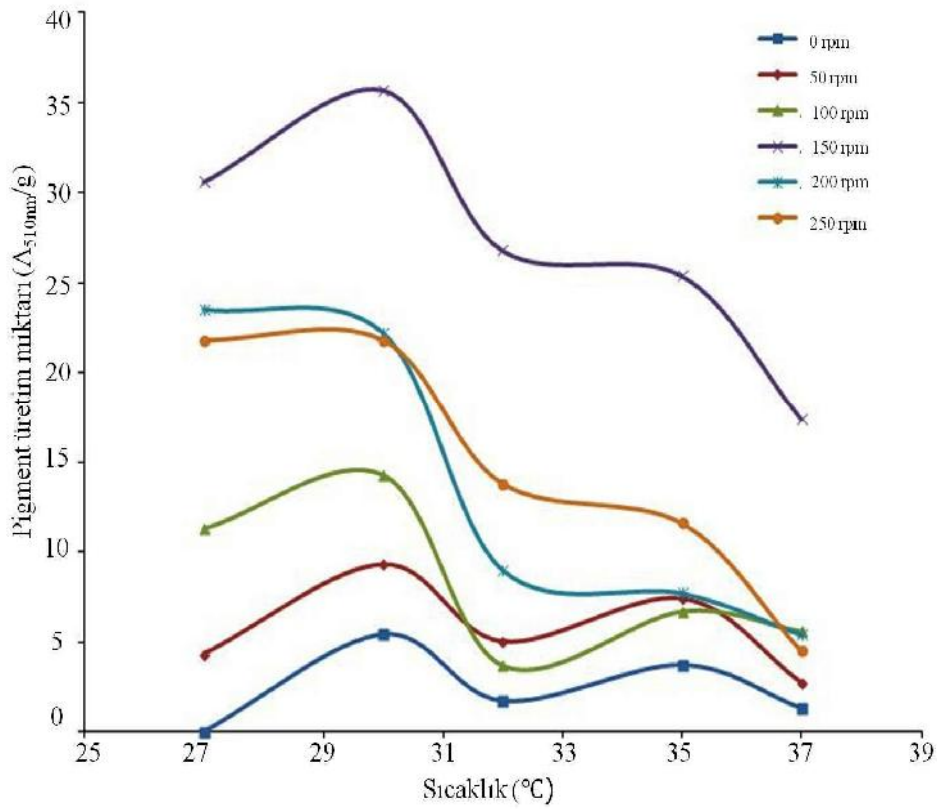
Şekil 4.4. Işık varlığında karıştırma hızına bağlı olarak renk üretimi

Şekil 4.5 ve 4.6’da ise sıcaklığa bağlı olarak renk üretimi grafikleri verilmiştir. Sıcaklığa bağlı olarak renkteki değişim incelendiğinde de 30 °C civarında en yüksek pigment üretimi elde edildiği görülmektedir. Bu sonuçlar literatür bilgileriyle uyumludur. Sıcaklık, metabolik aktiviteyi ve mikrobiyal gelişmeyi etkileyen önemli bir faktördür. Babitha ve ark. (2007) *Monascus*’un maksimum pigment üretiminin 30 °C’de gerçekleştiğini bildirmektedir. Babitha ve ark. (2007)’in Domsch ve ark. (1980)’den bildirdiğine göre, farklı *Monascus* izolatları için optimum sıcaklık 30-37 °C arasındadır. Nimnoi ve Lumyong (2011) da *M. purpureus* CMU001 ile en yüksek pigment üretiminin elde edildiği sıcaklığı 30 °C olarak belirlemişlerdir.

Mukherjee ve Singh (2011) tarafından yapılan çalışmada da, 25-40 aralığında, başlangıç pH’sı 2-8 arasında olacak şekilde denemeler gerçekleştirilmiştir. 30 ’de yapılan fermentasyonun en yüksek pigment üretimini sağladığı bildirilmektedir.



Şekil 4.5. Işıksız ortamda sıcaklığa bağlı olarak renk üretimi



Şekil 4.6. Işık varlığında sıcaklığa bağlı olarak renk üretimi

### 4.2.3. Besin ortamı denemeleri

Araştırma kapsamında ayrıca en yüksek miktarda renk maddesinin üretilebileceği besin ortamı bileşiminin belirlenmesi için denemeler yapılmıştır. Literatür incelendiğinde *Monascus* ile renk maddesi üretiminde birçok farklı besin ortamı veya besin ortamı ilavesinin kullanıldığı görülmektedir. Bu çalışmada da besin ortamı ön denemeleri kapsamında süne hasarlı buğday ile karşılaştırma yapabilmek amacıyla buğday unu ve kara buğday unu ana besin maddesi olarak, etanol, glukoz ve ZnSO<sub>4</sub> besin ortamı ilavesi olarak kullanılmıştır. Cevap yüzeyi yöntemi ile deney tasarımı yapılan ön çalışmalarda buğday unu (0,5-10,5 g/100 mL), glukoz (1-9 g/100 mL), etanol (0,1-0,9 mL/100 mL) ve ZnSO<sub>4</sub> (0-0,0075 g/100 mL) oranlarında ilave edilerek sıvı besin ortamları hazırlanmış ve *Monascus* inokülasyonu ve inkübasyon sonrası A değerleri belirlenmiştir. Bu denemelerde en yüksek A değeri 3 g/100 mL buğday unu, 3 g/100 mL glukoz, 0,3 mL/100 mL etanol ve 0,0025 g/100 mL ZnSO<sub>4</sub> ilave edilen besin ortamında 1,752 A<sub>500nm</sub> olarak belirlenmiştir. Bir diğer ön denemede buğday (0-3,0113 g/100 mL), karabuğday (0-3,0113 g/100 mL) ve etanol (0-1,1704 mL/100 mL) oranlarında ilave edilerek sıvı besin ortamları hazırlanmış ve *Monascus* inokülasyonu ve inkübasyon sonrası A değerleri belirlenmiştir. Bu denemelerde ise en yüksek A değeri 1 g/100 mL buğday kırmacı, 1 g/100 mL karabuğday kırmacı ve 1 mL/100 mL etanol ilave edilen besin ortamında 1,770 A<sub>500nm</sub> olarak belirlenmiştir. Sadece süne hasarlı buğday kırmacısının kullanıldığı ve herhangi bir besin ortamı ilavesinin bulunmadığı ön denemelerde daha yüksek A<sub>500nm</sub> değerleri belirlendiği için çalışmada besin ortamı olarak sadece süne hasarlı buğday kullanılmıştır.

### 4.3. Sitrinin Analizi

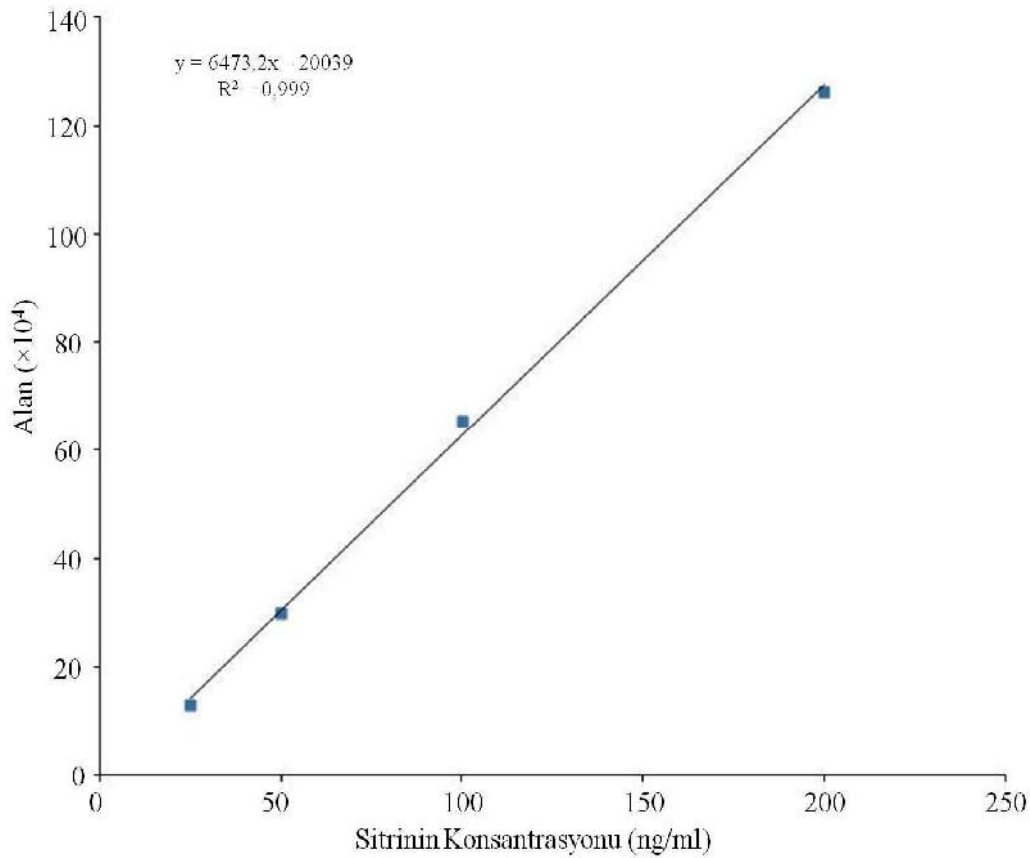
#### 4.3.1. Sitrinine ait kalibrasyon grafiğinin oluşturulması, alıkonma zamanı, belirleme sınırı, nicelik sınırı ve geri alma oranlarının belirlenmesi

Kalibrasyon grafiğinin çizilmesi amacıyla değişik konsantrasyonlarda hazırlanan sitrinin standart çözeltileri HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Kalibrasyonda 25, 50, 100 ve 200 ng/mL olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda sitrinin standart çözeltisi kullanılmıştır. Çizelge 4.4'te farklı konsantrasyonlarda hazırlanan sitrinin standart çözeltilerine ait pik alanları verilmiştir.

Çizelge 4.4. Kalibrasyon grafiğinin oluşturulmasında kullanılan sitrinin konsantrasyonu ve pik alanları

No	Sitrinin Konsantrasyon (ng/mL)	Alan
1	25	128775
2	50	300497
3	100	654753
4	200	1263283

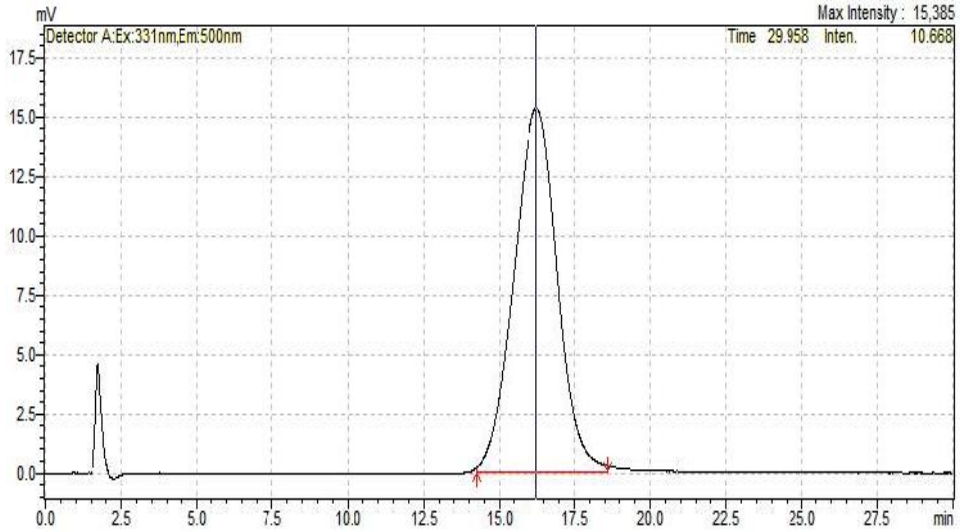
Sitrinin konsantrasyonuna karşılık, HPLC kromatogramında elde edilen pik alanları grafiğe geçirilerek sitrinin kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur ( $R^2=0,999$ ). Şekil 4.7’de sitrinin kalibrasyon grafiği verilmiştir. Örneklerdeki sitrinin konsantrasyonlarına ilişkin hesaplamalar da sitrinin kalibrasyon grafiği kullanılarak LC Solutions (Shimadzu, Japonya) paket programı ile hesaplanmıştır.



Şekil 4.7. Sitrinin Kalibrasyon Grafiği



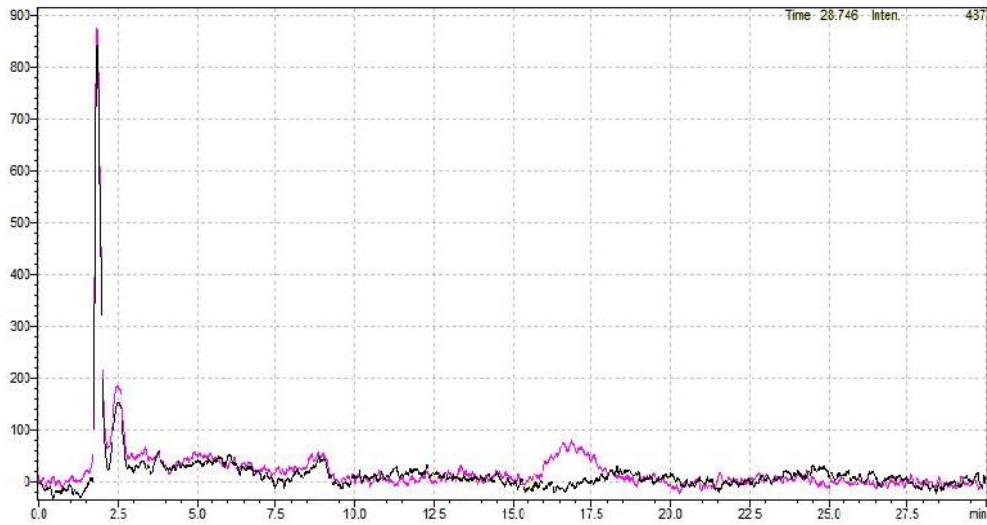
Şekil 4.8’de sitrinin standardına ait HPLC kromatogramı verilmiştir. Sitrininin alıkonma zamanı 16,1-17,3 dakika arasında belirlenmiştir.



Şekil 4.8. Sitrinin Standardına Ait Kromatogram

LOD, kromatogramda oluşan gürültü seviyesinin 3 katı, LOQ ise gürültü seviyesinin 10 katı olarak hesaplanmış (Zheng ve ark. 2009) ve bu değerler sırasıyla yaklaşık 3 ng/mL ve 10 ng/mL olarak belirlenmiştir.

Şekil 4.9’da 1 ng/mL düzeyinde sitrinin içeren örnek çözeltisine ve sitrinin içermeyen örneğe ait HPLC kromatogramı verilmiştir.



Şekil 4.9. 1 ng/mL Düzeyinde Sitrinin İçeren Örneğe Ait HPLC Kromatogramı

Geri alma oranlarını belirlemek amacıyla, çözelti konsantrasyonu 40, 80 ve 160 ng/mL olacak şekilde 4 mg/L konsantrasyonunda sitrinin çalışma çözeltisi ile kontamine edilmiş, geri alma oranları ayrı ayrı belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.5'te verilmiştir.

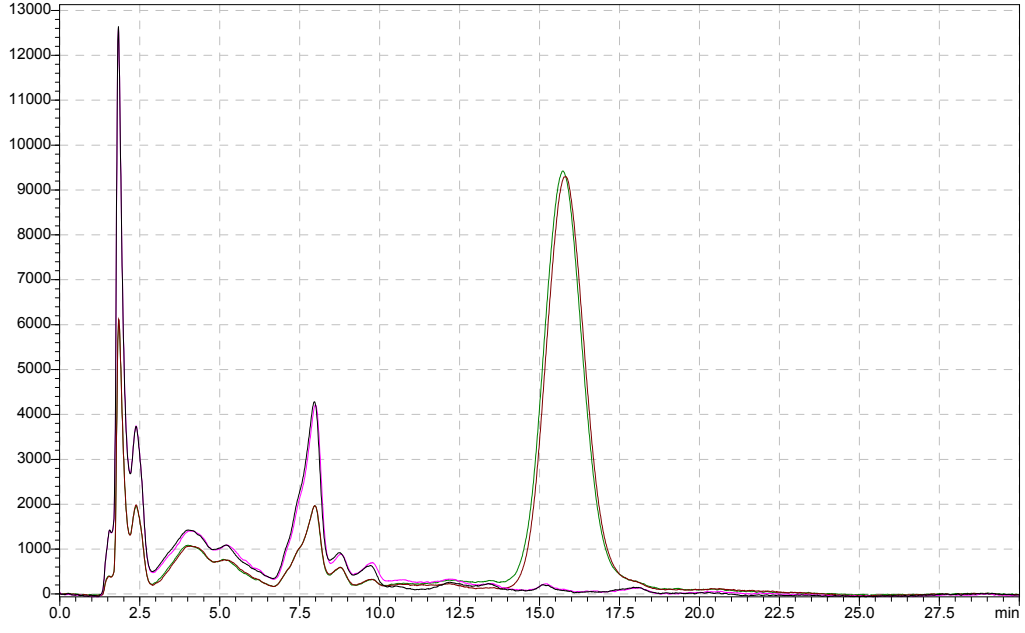
Çizelge 4.5. Sitrinin geri alım oranları

<b>Konsantrasyon (ng/mL)</b>	<b>Geri alınan miktar (ng/mL)</b>	<b>Geri alma oranı (%)</b>
40	31,35	78,37
80	63,10	78,87
160	149,47	93,42

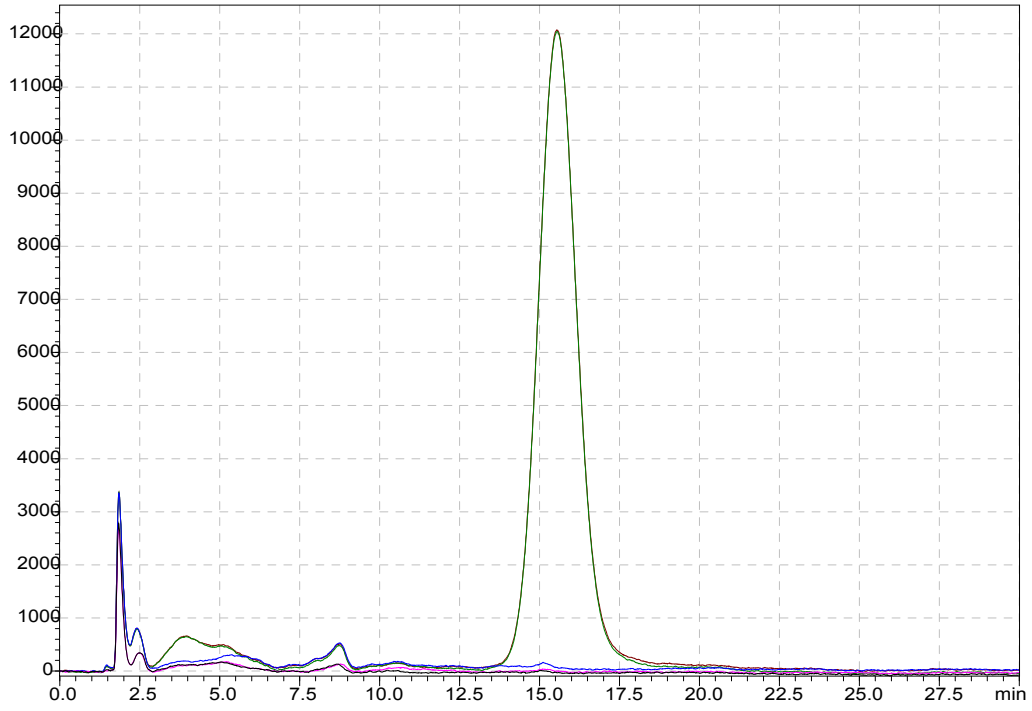
#### **4.3.2. Sıvı ortamdan sitrinin ekstraksiyonu yönteminin belirlenmesi**

Şekil 4.10'da etanol ve kloroform ile yapılan ekstraksiyonlar ile hazırlanan örneklere ait kromatogramlar verilmiştir.

Aynı sitrinin konsantrasyonunu içeren örnekler ile elde edilen kromatogramlardan, kloroform ile yapılan ekstraksiyon ile daha büyük pik alanı elde edildiği görülmektedir. Buna göre, kloroform kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon yönteminin geri alma oranlarının etanolle yapılan ekstraksiyonda elde edilen oranlardan daha yüksek olduğu görülmüş ve çalışmada kloroform ile ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır.



(a)



(b)

Şekil 4.10. Ekstraksiyon sonucu sitrininin geri alınmasına ait kromatogramlar  
Etanol ile ekstraksiyon(a) Kloroform ile ekstraksiyon(b)

#### 4.3.3.Sıvı besin ortamındaki sitrinin miktarının belirlenmesi

Belirlenen yöntem ile farklı sıcaklık ve karıştırma hızları kullanılarak gerçekleştirilen kültürasyon ortamlarından alınan örneklerde sitrinin analizi yapılmıştır. Bu örneklerin hiçbirinde LOQ değerinin (10 ng/mL) üzerinde sitrinin belirlenememiştir. Çalışmada inkübasyon periyodu 5 gün olarak belirlenmiştir. Katı ortam yerine sıvı ortam fermentasyonu kullanımı kültürasyon periyodunu kısaltmaktadır; böylece de sitrinin üretimi gerçekleşmeden kültürasyon sonlandırılmıştır. 5 günlük periyot sekonder metabolit olan sitrinin tespit edilebilir düzeyde üretilmesi için kısa bir süredir. Shimizu ve ark. (2005, 2007), *M. purpureus* BCRC33325 (IFO30873) tarafından sitrinin üretimi ile ilgili yaptıkları çalışmalarda, kültürasyon boyunca sitrinin üretiminin arttığını tespit etmişlerdir. Chen ve ark. (2008) de *Monascus* spp. tarafından üretilen sitrinin miktarını 14 günlük kültürasyon sonrasında belirlemiştir. Wang ve ark. (2005) de sitrinin analizini iki haftalık inkübasyondan sonra gerçekleştirmiştir. Sitrinin üretimi inkübasyon koşulları ve besin ortamının bileşiminden etkilenmektedir. Çalışma sonucunda, sitrinin içermeyen kırmızı pigment üretimi için süne hasarlı buğdayın, sıvı ortam fermentasyonunda *M. purpureus*'un substratı olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

#### 4.4.Sitrinin ve Pigmentlerin LC-MS Analizi

Örneklerin etanol ekstraktları LC-MS ile analiz edilmiş ve üretilen pigmentlerin kolonda kalma süreleri ve moleküler ağırlıkları ölçülmüştür. Pigmentlerin alıkonma zamanları yan zinciri  $C_5H_{11}$  olan için 3.35 dakika,  $C_7H_{15}$  olan için ise 4.23 olarak belirlenmiştir. Molekül ağırlıkları  $C_5H_{11}$  ve  $C_7H_{15}$  için sırasıyla, 354.1717  $m/z$  ve 382.1990  $m/z$  olarak ölçülmüştür. Bu molekül ağırlıklarına göre, elde edilen maddelerin rubropunktamin ve monaskorubramin olduğu belirlenmiştir. LC-MS analizine göre, kültürasyon örneklerinde sitrinin belirlenmiştir. Bu sonuç da HPLC ile sitrinin analizini doğrulamaktadır.

#### 4.5. Maksimum Pigment Üretimi İçin Ortam Koşullarının Modellenmesi

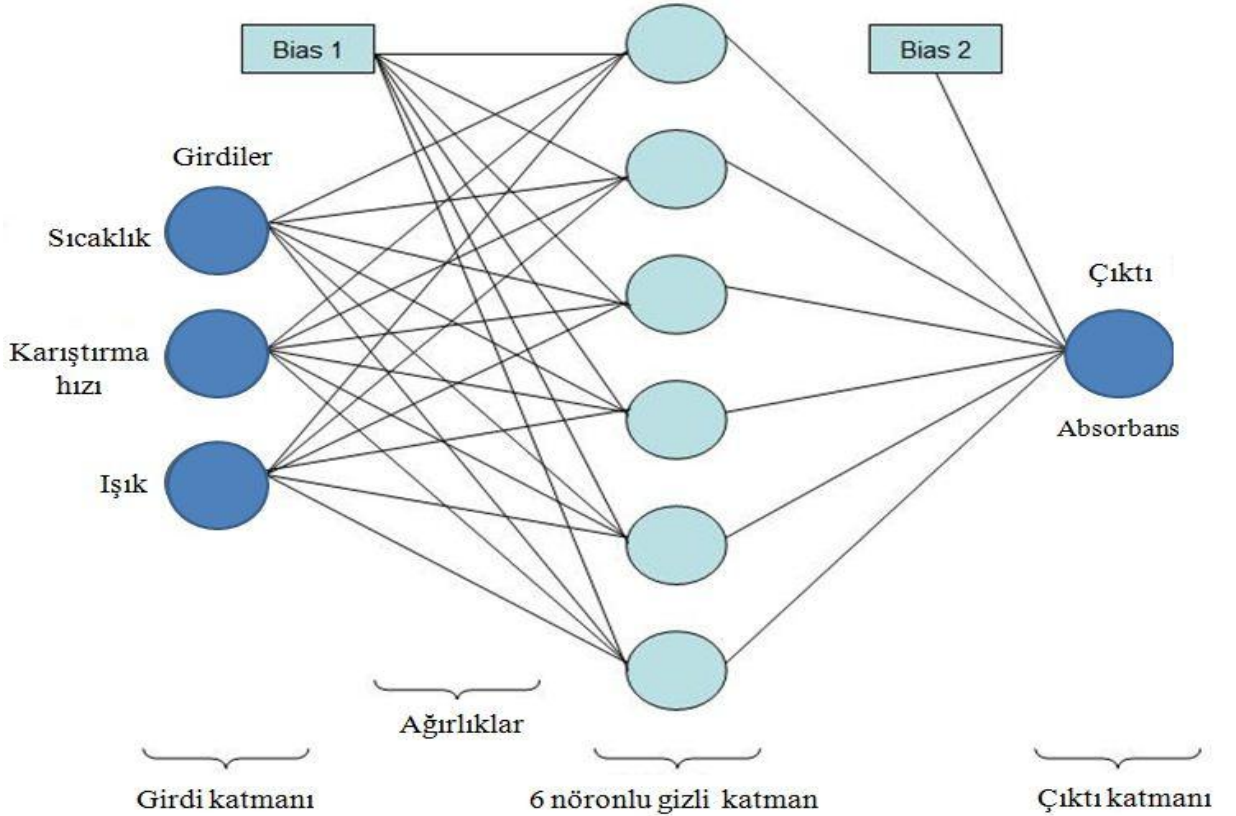
27, 30, 32, 35 ve 37°C kültürasyon sıcaklıklarında ve 0, 50, 100, 150, 200 ve 250 devir/dak çalkalama hızlarında toplam 60 deneme tamamlanmıştır. Her farklı deneme için kırmızı pigment miktarı belirlenmiştir.

Elde edilen renk verileri, YSA kullanılarak pigment üretiminin modellenmesinde kullanılmıştır. Farklı koşullarda üretilen renk değerlerine ait verilerin % 60'ı yapay sinir ağının eğitiminde, % 20'si validasyonda, % 20'si de test amaçlı kullanılmıştır. Çizelge 4.6'da ise Oluşturulan YSA'na ait değerler görülmektedir.

Çizelge 4.6. Renk değerleri ile oluşturulan YSA'na ait değerler

	Eğitim	Validasyon	Test
$R^2$	0,993	0,961	0,944
RMSE	0,045	0,101	0,170
Eğim	1,032	0,950	1,026
Kesim Noktası	-0,007	0,056	0,044

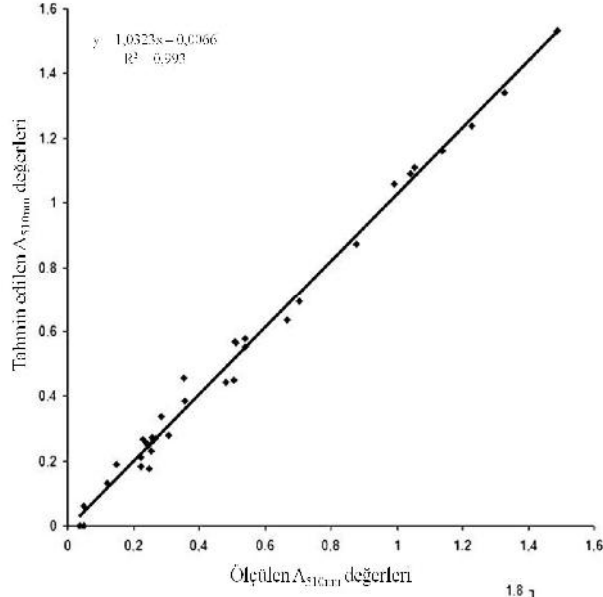
Şekil 4.11'de kullanılan YSA dizaynı verilmiştir.



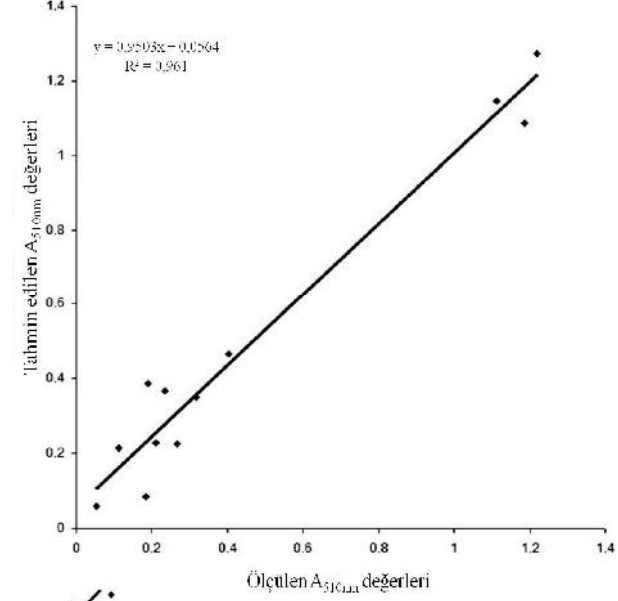
Şekil 4.11. Renk Değerlerinin Tahmin Edilmesinde Kullanılmak Üzere Oluşturulan YSA

Gerçek değerlere karşılık, oluşturulan YSA'nın tahmin ettiği değerler grafiğe geğirilmiştir. Şekil 4.12'de eğitim, validasyon ve test verilerine ait grafikler görülmektedir. Bu grafikler için elde edilen  $R^2$  değerleri sırasıyla, 0,993, 0,961 ve 0,944 olarak belirlenmiştir. Bu değerler, oluşturulan YSA modelinin kırmızı pigment üretimine, sıcaklık, karıştırma hızı ve ışığın etkisini yüksek korelasyonda tahmin edebilme yeteneğinde olduğunu göstermektedir.

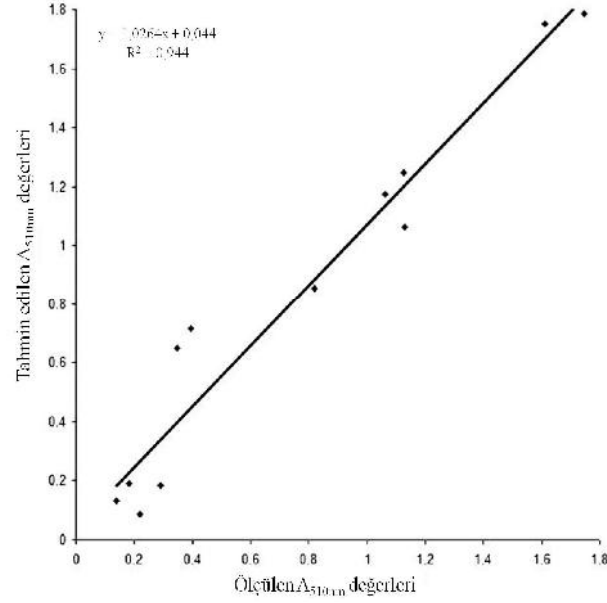
a)



b)

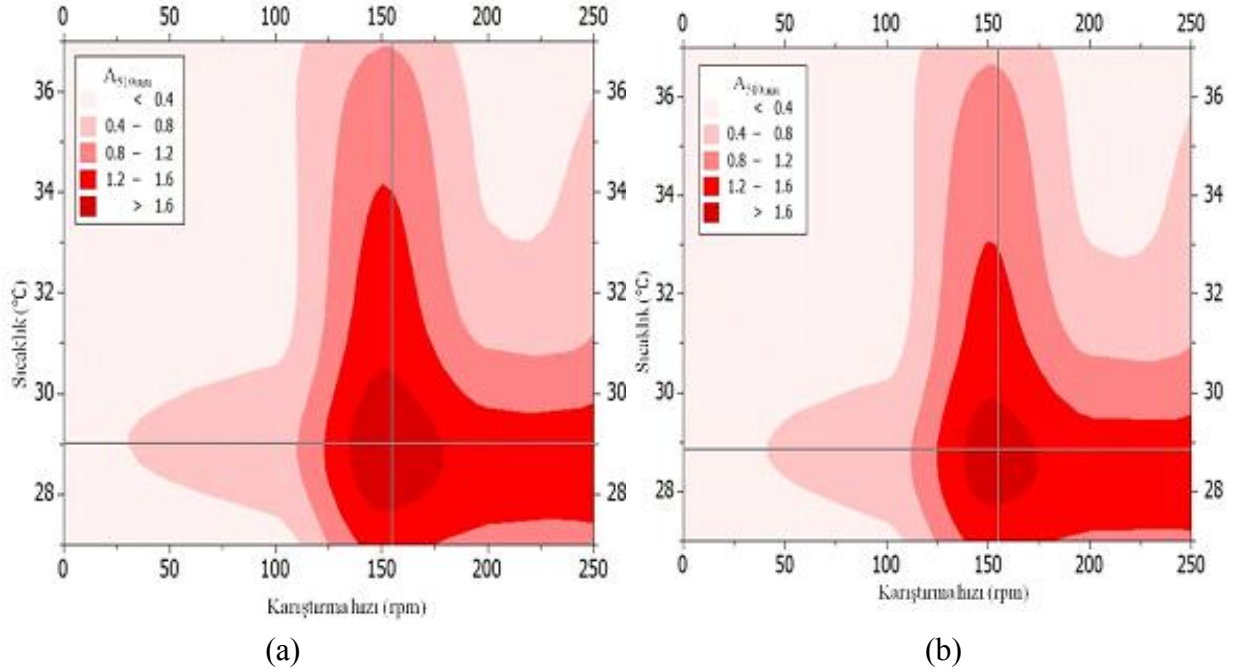


c)



Şekil 4.12. YSA'nın eğitim verilerine ait grafik (a), YSA'nın validasyon verilerine ait grafik (b), YSA'nın test verilerine ait grafik (c)

Çalışılan aralıktaki belirli kültürasyon koşullarına karşılık gelen A değerleri, YSA kullanılarak tahmin edilmiş ve Ek 2'deki çizelgede verilmiştir. Bu veri serisi kullanılarak Şekil 4.13'de verilen grafikler oluşturulmuştur. Bu grafikler yardımı ile optimum pigment üretim koşulları belirlenmiştir.



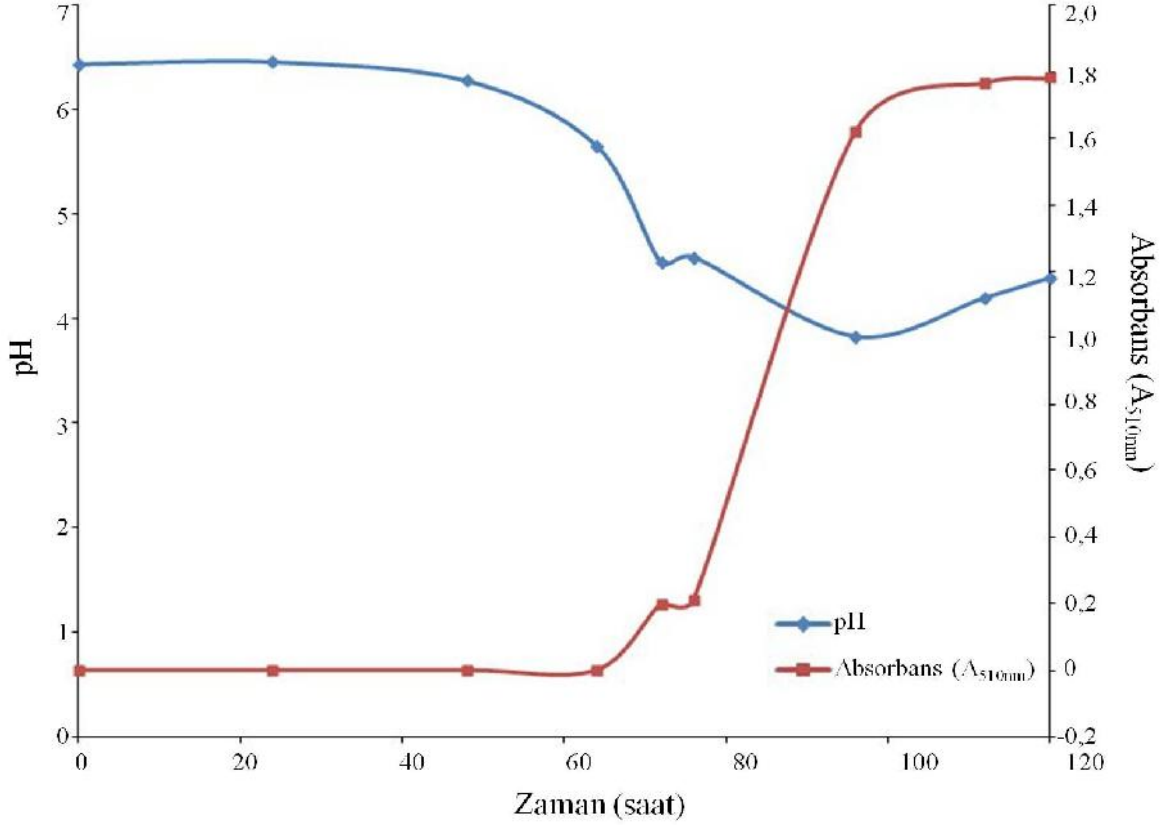
Şekil 4.13. Karıştırma Hızı ve Sıcaklığa Bağlı Olarak Absorbans Değişim Grafikleri, Işık Varlığında Gerçekleşen Üretim (a), Işıksız Ortamda Gerçekleşen Üretim (b)

Şekil 4.13'de en yüksek pigment üretiminin ışıklı ortamda 29 °C ve 150 devir/dak çalkalama hızında gerçekleştiği görülmektedir. Oluşturulan model ile, bu noktadaki pigment miktarı 1,874  $A_{510nm}$  olarak tahmin edilmiştir. Bu değeri test etmek amaçlı olarak bu noktada üç deney daha gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.14'te *Monascus* pigmentinin optimum koşullarda üretiminin gerçekleştiği 120 saatlik fermentasyon boyunca, renk üretimi ve pH değerlerindeki değişim görülmektedir. 3. günün sonuna kadar renk üretiminin başlamadığı, ortam pH'sının ise 2. güne kadar değişmediği, 2. günden sonra ise çok az bir düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. 3. günden sonra renk üretiminin çok hızlı gerçekleştiği, eş zamanlı olarak da pH'da hızlı bir düşüş olduğu görülmektedir. Renk



miktarının en yüksek seviyeye çıktığı 4. gün sonrasında, pH'nın tekrar yükselmeye başladığı belirlenmiştir. 5. gün en yüksek renk değeri elde edilmiş ve inkübasyon sonlandırılmıştır.



Şekil 4.14. *Monascus* pigmentlerinin optimum koşullarda üretim grafiği

Optimum noktada yapılan denemede elde edilen sonuç  $1,787 \pm 0,072 A_{510nm}$  olarak bulunmuştur. Çizelge 4.7'de optimum koşullarda pigment üretimine ilişkin değerler verilmiştir.

Hajjaj ve ark. (1999), 1 birim  $A_{480nm}$  değerinin, 15 mg/L kırmızı pigmente eşdeğer olduğunu ve bu eşitliğin absorbans değerlerini kırmızı pigment ağırlığına çevirmede kullanılabileceğini rapor etmiştir. Çalışmada süne hasarlı buğday kullanılarak elde edilen en yüksek pigment üretim değeri, bu eşitlik yardımı ile 0,027 g/L olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu değer, Dominguez-Espinosa ve Webb (2003) tarafından % 10 tam buğday unu kullanılarak yapılan çalışmada elde edilen 0,01 g/L kırmızı pigment değerinden yüksektir.

Üretim miktarları A/g katı madde olarak da verilebilir. Buna göre süne hasarlı buğday kullanılarak *M. purpureus*'un kırmızı pigment üretim miktarı 35,740 A<sub>510nm</sub>/g katı madde olarak hesaplanmıştır. Mukherjee ve Singh (2011) tarafından yapılan çalışmada ise 10. günde ulaşılan maksimum pigment verimi 64 A/g kuru hücre kütlesi olarak verilmiştir. Bu çalışmada elde edilen 35,740 A<sub>510nm</sub>/g katı madde değeri, Mukherjee ve Singh (2011) tarafından elde edilen değerden düşüktür. Bunun nedeni ise, Mukherjee ve Singh (2011)'in sentetik besin ortamı kullanmış olması ve farklı ortam koşullarının seçilmesi olabilir. Bu çalışmada bulunan pigment üretim miktarını, literatürdeki *M. purpureus* kullanılarak yapılan diğer çalışmalardaki ait pigment üretim miktarları ile karşılaştırırken, besin ortamlarının farklı olduğu göz önünde bulundurulmalıdır.

Çizelge 4.7. Optimum koşullarda pigment üretimine ilişkin değerler

	Yapay Sinir Ağı Tarafından Tahmin Edilen Değer	Deneysel Değer*
<b>Ortalama</b> <b>(A<sub>510nm</sub>)</b>	1,874	1,787 ± 0,072
<b>Pigment</b> <b>(g/L)</b>	-	0,027 ± 0,001
<b>Miktarı</b> <b>(A<sub>510nm</sub>/g kuru madde)</b>	-	35,740 ± 1,440

\* Deneysel değer, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Babitha ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada ise, *M. purpureus*'un kırmızı pigment üretimi için substrat olarak "jackfruit" isimli tropikal meyvenin çekirdeği, palm çekirdeği küspesi, buğday kepeği, tapyoka unu, hint hurması çekirdeği, susam küspesi, yer fıstığı küspesi, hindistan cevizi küspesi gibi tarım endüstrisi artıkları denenmiş ve üretim miktarları sırasıyla 12,113 OD/g katı madde, 7,650 OD/g katı madde, 3,525 OD /g katı madde, 1,458 OD /g katı madde, 1,146 OD /g katı madde, 0,375 OD /g katı madde, 0,150 OD /g katı madde, 0,118 OD /g katı madde olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen maksimum üretim miktarı değeri, Babitha ve ark. (2007) tarafından elde edilen değerlerden daha yüksektir.

Sonuç olarak düşük ekonomik değerli tarımsal bir ürün olan süne hasarlı buğdayın, kırmızı pigment üretiminde *M. purpureus*'un substratı olarak kullanılabileceği belirlenmiştir. Böcek hasarlı buğdayın, genellikle hayvan beslemesinde kullanılması ve maliyetinin pirinç (870 TL/ton), patates (600 TL/ton) ve normal buğdaydan (640 TL/ton) daha düşük olması (500 TL/ton) nedeniyle, doğal gıda renklendiricisi gibi değerli bir ürün üretiminde kullanılması bu hasar ile oluşan ekonomik kaybı azaltmaya yardım edebilir (Anon. 2012 a, 2012 b).

#### 4.6. TLC ile Ayırma

Kırmızı pigmente ait TLC kromatogramının UV ışık altındaki görüntüsü Şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.15. Kırmızı pigmente ait TLC kromatogramı

Pigmente ait Rf değeri 0,46 olarak belirlenmiştir. Mukherjee ve Singh (2011) ise, kırmızı pigmente ait Rf değerini 0,42 olarak belirlemiştir. Jung ve ark (2003)'ün çalışmasında ise farklı amino asitlerle üretilen kırmızı pigmentlerin Rf değerleri, 0,1-0,6 arasında belirlenmiştir. Nimnoi ve Lumyong (2011) da, pigment ekstraktlarını TLC ile ayırmıştır. Pigmentlerin farklı Rf değerlerine sahip olmalarını, bunların farklı substratlar kullanılarak üretilmiş olmalarıyla açıklamıştır.

## 4.7. Renk Maddesinin Stabilite Analizleri

Üretilen renk maddesinin stabilitesinin belirlenmesi amacıyla, süre, ışık, sıcaklık ve pH gibi stabiliteyi etkileyen faktörler incelenmiştir.

### 4.7.1. Isıl stabilite

Çizelge 4.8'de pigment stabilitesinin farklı sıcaklıklarda ve farklı ısıl işlemler etkisiyle değişimi verilmiştir. Çizelge 4.8'den, 0 ve 4 °C'de 6 saat boyunca inkübe edilen çözeltilerin stabilitelerinin % 99'un üzerinde olduğu, 12 ve 25 °C'ler için ise bu değerlerin % 98'in üzerinde olduğu görülmektedir. Sıcaklığın 72 °C olduğu durumda ise stabilite değeri % 95,31 ± 0,96 olarak tespit edilmiştir. Pastörizasyon (85 °C'de 30 dakika) ve sterilizasyon (121 °C'de 20 dakika) işlemleri sonrasındaki stabilite değerleri ise sırasıyla, % 85,82 ± 1,19 ve % 46,84 ± 0,93 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre pigmentin yüksek sıcaklıklara duyarlı olduğu sonucuna varılabilir.

Isıl stabilite ile ilgili sonuçlar, daha önceki çalışmalar ile uyumludur. Şeker kamışı küspesi kullanılarak üretilen *Monascus* pigmentinin ısıl stabilitesinin belirlendiği bir çalışmada, 6 saatlik inkübasyon sonunda 30 ve 40 °C'lerdeki pigment degradasyonunun % 5 ve 7 olarak tespit edildiği belirtilmiştir. 60 °C'de 6 saat sonunda pigmentin % 86'sının parçalanmadığı, sıcaklık 80 °C'ye çıktığında ise rengin % 32'sinin kaybolduğu rapor edilmiştir (Silveira ve ark 2011). Pigment çözeltilerinin 30, 40, 60 ve 80 °C'lerde 6 saat inkübe edildiği ve pigmentin, düşük sıcaklıklarda (30-60 °C), daha yüksek sıcaklık (60 °C üzeri) kıyasla daha stabil olduğu belirlenmiştir. *Monascus* pigmentlerinin pastörizasyon koşullarını tolere edebileceği de bildirilmiştir. Otoklavlama işlemi sonrasında (121 °C'de 15 dakika) ise rengin % 40'ının kaybolduğu tespit edilmiştir (Silveira ve ark 2011). Nimnoi ve Lumyong (2011) tarafından yapılan ve mısır kırmızı kullanılarak üretilen renk maddesinin stabilitesi ile ilgili çalışmada ise, 40, 50 ve 60 °C'de 6 saat inkübe edilen pigment çözeltilerinin absorbanlarında sırasıyla, % 21,65, % 25,50 ve % 31,27'lik azalma belirlenmiştir. Bu çalışmada, 72 °C'de 6 saat inkübasyon için belirlenen belirlenen % 95'in üzerindeki stabilite değerleri, yani % 5'in altındaki parçalanma değerleri, Nimnoi ve Lumyong (2011) tarafından rapor edilen stabilite değerleri ile uyumlu değildir. Sonuçlardaki farklılığın nedeni; çalışmamızda süne hasarlı buğday kullanılarak üretilen pigmentin stabilitesinin mısır kırmızı kullanılarak üretilen

pigmentin stabilitesinden yüksek olması olabilir. Çünkü daha önceki çalışmalarda, substratın, pigment stabilitesi üzerinde önemli etkisi olduğu (Jung ve ark 2005) vurgulanmıştır.

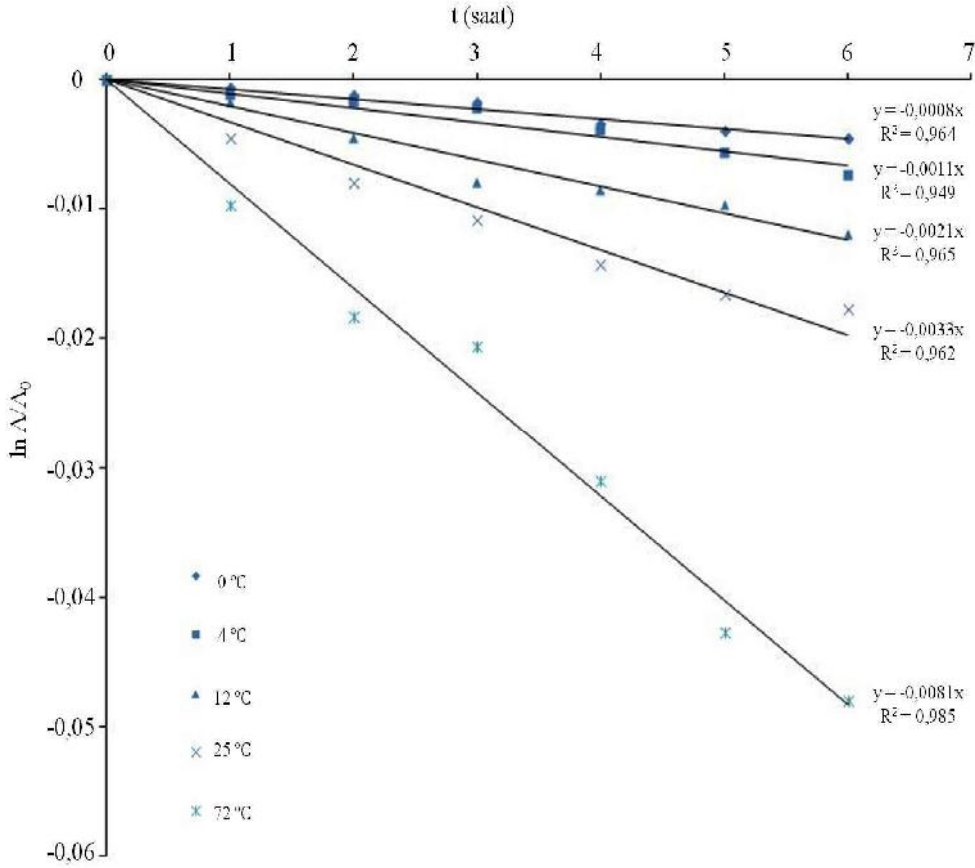
Pigmentin yüksek sıcaklıkta stabil olmadığı tespit edilmiştir. 70 °C'de 10 s pastörizasyon ve 121 °C'de 15 dak otoklavlama işlemleri sonrası sırasıyla, kırmızı pigment miktarında % 5,41 ve % 30,57 düzeylerinde azalma tespit edilmiştir (Nimnoi ve Lumyong 2011). Çalışmamızda pastörizasyon (85 °C'de 30 dakika) ve sterilizasyon (121 °C'de 20 dakika) işlemleri sonrasında, renkteki azalma değerleri sırasıyla, % 14,18 ve % 53,16 olarak hesaplanabilir. Rengin parçalanmasına ilişkin değerleri ise, Nimnoi ve Lumyong (2011) tarafından belirlenen değerlerden yüksektir. Bunun nedeni ise pastörizasyon ve sterilizasyon işlemleri için seçilen sıcaklık-süre normlarının Nimnoi ve Lumyong (2011) tarafından kullanılan değerlerden daha yüksek olmasıdır.

Çizelge 4.8. Farklı sıcaklıklara maruz kalan pigmentin ısıl stabilite değerleri

t (saat)	% Stabilite <sup>a</sup>					Pastörizasyon 85 'de 30 dk	Sterilizasyon 121 'de 20 dk
	0	4	12	25	72		
0	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	85,82 ± 1,19	46,84 ± 0,93
1	99,94 ± 0,10	99,89 ± 0,20	99,83 ± 0,45	99,55 ± 0,43	99,04 ± 0,52		
2	99,89 ± 0,10	99,83 ± 0,17	99,55 ± 0,10	99,21 ± 0,71	98,19 ± 0,52		
3	99,83 ± 0,00	99,77 ± 0,10	99,21 ± 0,20	98,93 ± 0,68	97,97 ± 1,28		
4	99,66 ± 0,29	99,60 ± 0,54	99,15 ± 0,34	98,59 ± 0,49	96,95 ± 1,22		
5	99,60 ± 0,26	99,44 ± 0,60	99,04 ± 0,93	98,36 ± 0,60	95,82 ± 0,80		
6	99,55 ± 0,26	99,27 ± 0,35	98,81 ± 1,02	98,25 ± 0,76	95,31 ± 0,96		

<sup>a</sup> Sonuçlar, ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir.

Pigmentin ısı etkisiyle parçalanması ile ilgili deneysel verilerin, birinci dereceden eşitliğe uygunluğunu gösteren grafik ise Şekil 4.16'da verilmiştir. 0 , 4 , 12 , 25 ve 72 için çizilen grafiklere ait  $R^2$  değerleri sırasıyla, 0,964, 0,949, 0,965, 0,962 ve 0,985 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4. 16. Farklı sıcaklıklara maruz kalan pigmentin ısı etkisiyle parçalanma grafiği

72 °C için,

$\ln(A/A_0) = -kt$  eşitliğinden hız sabiti  $k$ , 0,0081 saat<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır.

$t_{1/2} = -\ln(0,5) \times k^{-1}$  eşitliği kullanılarak da yarılanma ömrü;

$t_{1/2} = 85,57$  saat olarak hesaplanmıştır.

Pigmentin ısı etkisiyle parçalanma reaksiyonuna ait parçalanma hız sabiti ve yarılanma ömrü değerleri Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Pigmentin ısı etkisiyle parçalanma reaksiyonuna ait değerler

Sıcaklık (°C)	Parçalanma hız sabiti k (sa <sup>-1</sup> )	Yarılanma ömrü t <sub>1/2</sub> (sa)
0	0,0008	866,43
4	0,0011	630,13
12	0,0021	330,07
25	0,0033	210,04
72	0,0081	85,57

*Monascus* pigmentine ait parçalanma hız sabitleri, 0 °C'de 0,0008 sa<sup>-1</sup>, 4 °C'de 0,0011 sa<sup>-1</sup>, 12 °C'de 0,0021 sa<sup>-1</sup>, 25 °C'de 0,0033 sa<sup>-1</sup>, 72 °C'de ise 0,0081 sa<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Yarılanma ömrü değerleri de sırasıyla, 866,43 sa, 630,13 sa, 330,07 sa, 210,04 sa, 85,57 sa olarak hesaplanmıştır.

Silveira ve ark (2011) tarafından yapılan çalışmada ısıl degradasyon için yarılanma ömürleri, 30, 40, 60 ve 80 °C'ler için sırasıyla, 107.52 ± 4.81, 63.99 ± 4.16, 29.77 ± 1.35 ve 10.23 ± 4.09 saat olarak tespit edilmiştir.

Birbirine yakın olan sıcaklık değerlerinde elde edilen yarılanma ömürleri karşılaştırıldığında, sonuçların uyumlu olduğu görülmektedir. Örneğin, 25 °C'de 210,04 sa olarak belirlenen yarılanma ömrü değeri, Silveira ve ark (2011) tarafından 30 °C için belirlenen 107.52 sa değeri ile uyumludur. 25 °C için tespit edilen yarılanma ömrü değerinin, 30 °C için Silveira ve ark (2011) tarafından belirlenen değerden fazla olması, düşük sıcaklıkta pigment parçalanmasına ilişkin yarılanma ömrünün daha yüksek olması ile açıklanabilir.

#### 4.7.2. Depolama boyunca pigment stabilitesi

Pigment çözeltileri, 4°C ve 25°C'de 12 hafta boyunca ışıksız ortamda depolanmıştır. Çizelge 4.10'da pigment stabilitesinin farklı depolama sıcaklıklarındaki değişimi verilmiştir. 12 haftalık depolama sonunda, 4 °C ve 25 °C için belirlenen stabilite değerleri sırasıyla, % 84,24 ± 0,45 ve % 78,25 ± 0,26 olarak belirlenmiştir.



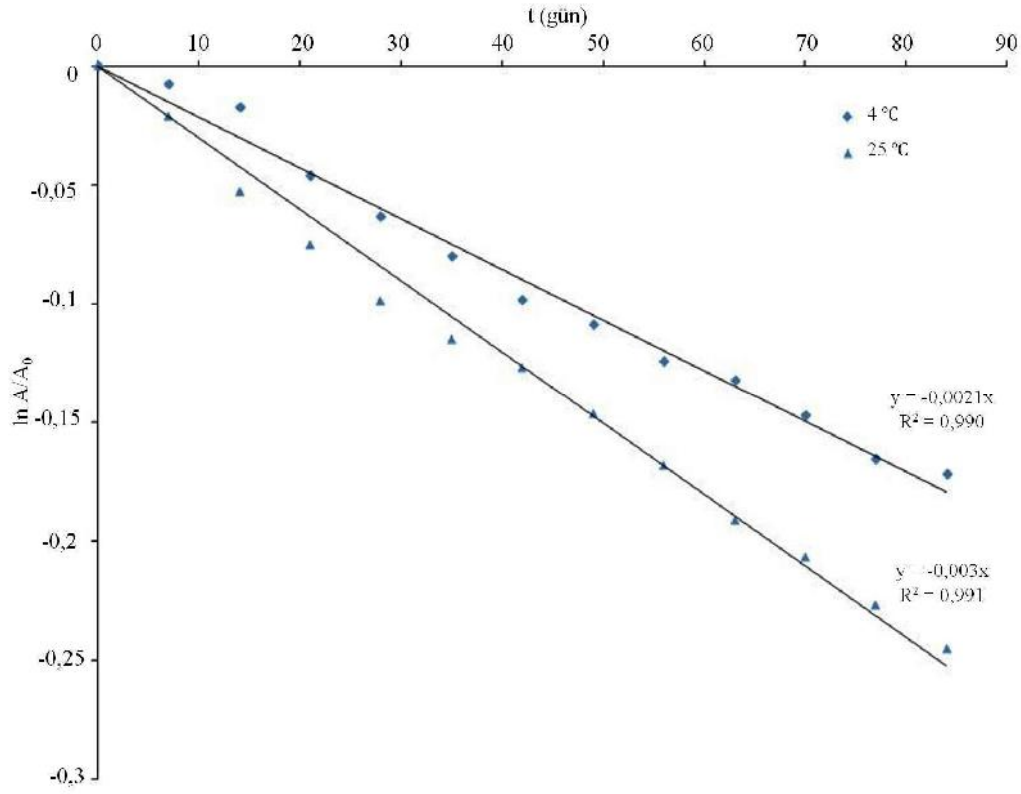
Çizelge 4.10. Depolama boyunca pigment çözeltisine ait stabilite değerleri

t (gün)	% Stabilite <sup>a</sup>	
	4 'de depolama	25 'de depolama
0	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
7	99,27 ± 0,43	97,91 ± 0,10
14	98,31 ± 0,68	94,86 ± 0,26
21	95,54 ± 0,43	92,77 ± 0,43
28	93,90 ± 0,68	90,62 ± 0,10
35	92,32 ± 0,35	89,15 ± 0,17
42	90,68 ± 0,34	88,08 ± 0,10
49	89,72 ± 0,26	86,38 ± 0,10
56	88,36 ± 0,54	84,52 ± 0,10
63	87,63 ± 0,45	82,60 ± 0,43
70	86,33 ± 0,20	81,30 ± 0,10
77	84,75 ± 0,17	79,72 ± 0,26
84	84,24 ± 0,45	78,25 ± 0,26

<sup>a</sup> Sonuçlar, ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir.

Elde edilen değerler, literatürdeki çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Jung ve ark (2005) tarafından yapılan çalışmada, 30 'de 30 gün boyunca inkübe edilen pigment çözeltilerinin % 80'den daha büyük oranda stabil kaldığı bildirilmektedir. 25 'de 28 gün depolama sonucu % 90,62 ± 0,10, 35 gün depolama sonucu ise % 89,15 ± 0,17 düzeylerinde belirlenen stabilite değerleri, Jung ve ark (2005) tarafından belirlenen değerlerle uyumludur. Jung ve ark (2005)'in çalışmasında, 4 'de 30 gün depolama sonucu ise pigmentin % 95'ten fazlasının parçalanmadan kaldığı bildirilmiştir. Çalışmamızda 4 'de 30 gün depolama sonucu stabilitenin % 93,90 ± 0,68 olarak belirlendiği göz önünde bulundurulduğunda, bu değer de Jung ve ark (2005) tarafından tespit edilen değer ile uyumlu olduğu sonucuna varılabilir.

Elde edilen deneysel verilerin birinci dereceden eşitliğe uygunluğunu gösteren grafik Şekil 4.17'de verilmiştir. 4 ve 25 'de depolama için çizilen grafiklere ait  $R^2$  değerleri sırasıyla, 0,990, 0,991 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.17. Farklı sıcaklıklarda depolanan pigmentin depolama etkisiyle parçalanma grafiği

Farklı sıcaklıklarda depolanan pigmentin depolama etkisiyle parçalanma reaksiyonuna ait hız sabitleri ve yarılanma ömürleri hesaplanarak Çizelge 4.11’de verilmiştir. 4 °C’de depolama için parçalanma hız sabiti  $0,0021 \text{ gün}^{-1}$ , yarılanma ömrü 330,07 gün olarak hesaplanmıştır. 25 °C için ise bu değerler sırasıyla,  $0,0030 \text{ gün}^{-1}$  ve 231,05 gün olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.11. Pigmentin depolama boyunca parçalanma reaksiyonuna ait değerler

Sıcaklık (°C)	Parçalanma hız sabiti	Yarılanma ömrü
	$k$ ( $\text{gün}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (gün)
4	0,0021	330,07
25	0,0030	231,05

### 4.7.3. Fotostabilite

Siyah bir kutunun iç cephesine bağlı 4 adet UV lamba ile 365 nm dalgaboyuna sahip UV ışığa maruz bırakılan pigment çözeltilerinin 120 saat sonunda, 510 nm’de absorbansları ölçülmüştür. Şekil 4.18’de UV ışığa maruz bırakılmış örnekler görülmektedir. UV ışığın pigment stabilitesine etkisi de Çizelge 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.18. UV ışığa maruz bırakılmış pigment çözeltileri

Çizelge 4.12. UV ışık ile muamele edilmiş pigmentin stabilitesi

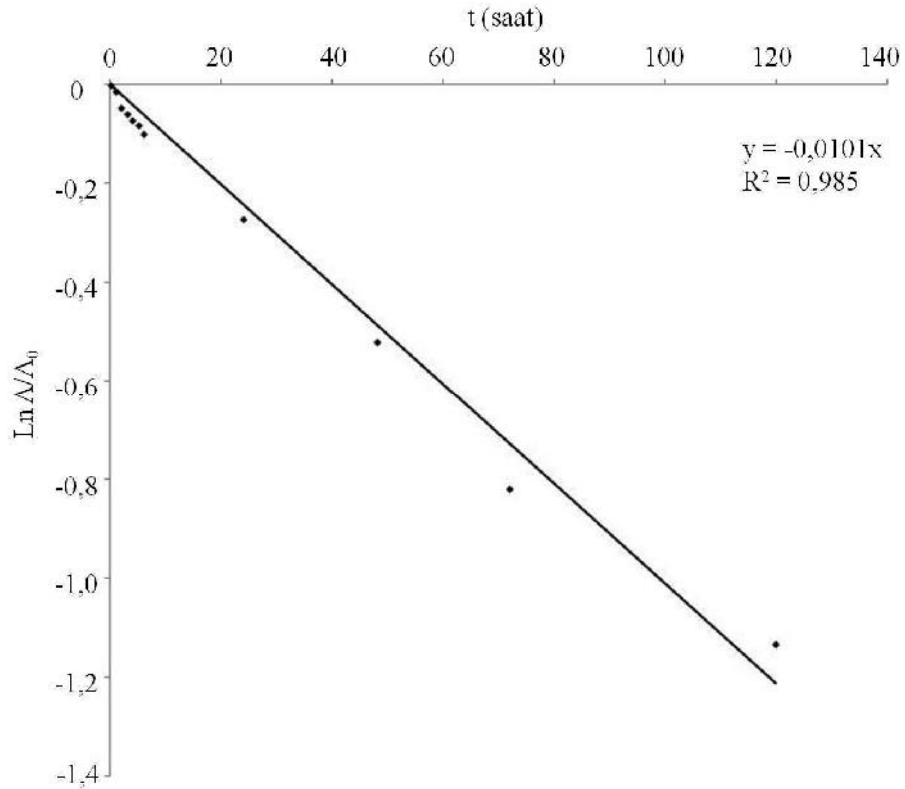
t (saat)	% Stabilite <sup>a</sup>
0	100 ± 0,00
1	98,87 ± 0,43
2	95,54 ± 0,10
3	94,35 ± 0,43
4	93,22 ± 0,00
5	92,20 ± 0,61
6	90,68 ± 0,00
24	76,21 ± 0,64
48	59,44 ± 0,10
72	44,12 ± 1,09
120	32,15 ± 0,10

<sup>a</sup> Sonuçlar, ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir.

Çizelge 4.12'den UV ışık ile muamele edilmiş pigmentin stabilitesinin, 6 saat sonunda % 90'dan fazla olduğu, ancak UV ışığa maruz kalma süresi 120 saate çıktığında stabilitenin % 32,15 değerine indiği görülmektedir.

Nimnoi ve Lumyong (2011) tarafından yapılan çalışmada ise mısır kırmızı kullanılarak elde edilen pigmentin sulu ekstraktının fotostabilitesi belirlenmiştir. 6 saat boyunca UV ışığa maruz bırakılan pigment çözeltisinin absorbansında % 35,29'luk bir azalma tespit edilmiştir. Bu değer de, çalışmamızda elde edilen pigmentin UV stabilitesinin, Nimnoi ve Lumyong (2011) tarafından elde edilen pigmentin stabilitesine göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, substratın pigment stabilitesine etkisinin olduğunu gösteren çalışmaları (Jung ve ark 2005) da doğrulamaktadır.

UV ışık etkisiyle pigmentin parçalanma değerlerinin birinci dereceden eşitliğe uygunluğunu gösteren grafik Şekil 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.19. UV ışık ile muamele edilmiş pigment örneğinin parçalanma grafiği

$\ln(A/A_0) = -kt$  eşitliğinden hız sabiti  $k$ ,  $0,0101 \text{ saat}^{-1}$  olarak belirlenmiştir.

$t_{1/2} = -\ln(0,5) \times k^{-1}$  eşitliği kullanılarak da yarılanma ömrü;

$t_{1/2} = 68,63$  saat olarak hesaplanmıştır.

Pigmentin UV ışık etkisiyle parçalanma reaksiyonuna ait değerler Çizelge 4.13’de verilmiştir.

Çizelge 4.13. Pigmentin UV ışık etkisiyle parçalanma reaksiyonuna ait değerler

Parçalanma hız sabiti $k$ ( $\text{saat}^{-1}$ )	Yarılanma ömrü $t_{1/2}$ (saat)
0,0101	68,63

Pigmentin UV ışık etkisiyle parçalanma reaksiyonuna ait hız sabiti değeri  $0,0101 \text{ sa}^{-1}$ , yarılanma ömrü ise  $68,63 \text{ sa}$  olarak belirlenmiştir. Elde edilen yarılanma ömrü değeri, Jung ve ark (2005) tarafından gerçekleştirilen ve amino asit bulunmayan kontrol örneği için tespit edilen  $24,02 \text{ sa}$  değerinden yüksektir. Bu durum da buğday kullanılarak üretilen pigmentin UV stabilitesinin Jung ve ark (2005) tarafında elde edilen değerden yüksek olduğunu göstermektedir. Jung ve ark (2005), yapısında farklı amino asitler bulunan kırmızı pigment türevlerinin  $k$  hız sabiti değerlerinin  $0,002-0,004 \text{ sa}^{-1}$  arasında, yarılanma ömrü değerlerinin ise  $167,84-351,07 \text{ sa}$  arasında olduğu rapor etmiştir. Tek amino asidin azot kaynağı olarak kullanılması ile elde edilen değerlerin hepsi,  $68,63 \text{ sa}$  değerinden yüksektir (Jung ve ark 2005).

Üretimlerinde azot kaynağı olarak farklı amino asitlerin kullanıldığı *Monascus* pigmentlerinin stabilitesine ilişkin çalışmada, Jung ve ark (2005) bazı amino asitlerin pigment stabilitesini artırdığını belirlemişlerdir. Güneş ışığı etkisiyle parçalanan pigmentlerin yarılanma ömürleri, azot kaynağı olarak sadece  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  kullanılan kontrol grubunda  $0,22 \text{ sa}$  iken, farklı aminoasitler kullanılarak üretilen pigmentlerde  $1,45-5,58 \text{ sa}$  aralığında belirlenmiştir. Bu çalışma sonucu Jung ve ark (2005) farklı amino asitlerle üretilen pigmentleri, üç gruba ayırmıştır. Bunlardan asparajin, tirozin, alanin, treonin, glisin veya izolösin içerenler, güneş

ışığı maruziyetinde yarılanma ömürleri en yüksek yani güneş ışığına en dayanıklı pigment türevleri olarak nitelendirilmiştir. Asparajin, tirozin, alanin, treonin ve glisin amino asitleriyle üretilen pigmentlerin yarılanma ömürleri sırasıyla, 5,58, 5,28, 5,25, 5,07, 5,06 sa olarak verilmiştir. Glutamik asit, serin, triptofan, valin ve fenilalanin içerenlere ait değerlerin ise 4-5 sa arasında olduğu bildirilmiştir. Diğer amino asitleri içeren pigmentlere ait değerler ise 4 saatin altında tespit edilmiştir (Jung ve ark. 2005). Birinci ve ikinci grupta yer alan amino asitleri yapısında bulunduran substratlar kullanıldığında, üretilecek pigmentin fotostabilitesinin de göreceli olarak yüksek olacağı düşünülebilir. Glutamik asit içeren pigment türevi için, direkt güneş ışığı etkisiyle gerçekleşen parçalanma reaksiyonuna ait yarılanma ömrü 4,96 sa olarak tespit edilmiştir. Bu değer glutamik asidin, stabiliteyi artırıcı özellik gösterebilecek bir amino asit olduğunu düşündürmektedir. *Monascus* pigmenti üretiminde buğday kullanılması, üretilen boya madesinin stabilitesini etkilemiş olabilir.

Buğday ve pirincin amino asit içerikleri incelendiğinde, hem buğday hem de pirinç proteininde en çok bulunan amino asidin glutamik asit olduğu görülmektedir. Buğday proteinlerinde % 31,1, pirinç proteinlerinde ise % 15,4 oranlarında glutamik asit mevcuttur. Buğday ve pirincin protein oranları karşılaştırıldığında, buğdayın (% 11,7) pirinçten (% 7,4) daha iyi bir protein kaynağı olduğu görülmektedir. (Belitz ve Grosch, 1987). Buğday ve pirincin protein oranları ve içerdikleri aminoasitler düşünüldüğünde ise buğdaydaki glutamik asit miktarının, pirinçtekinin yaklaşık 4 katı olabileceği tahmin edilebilir.

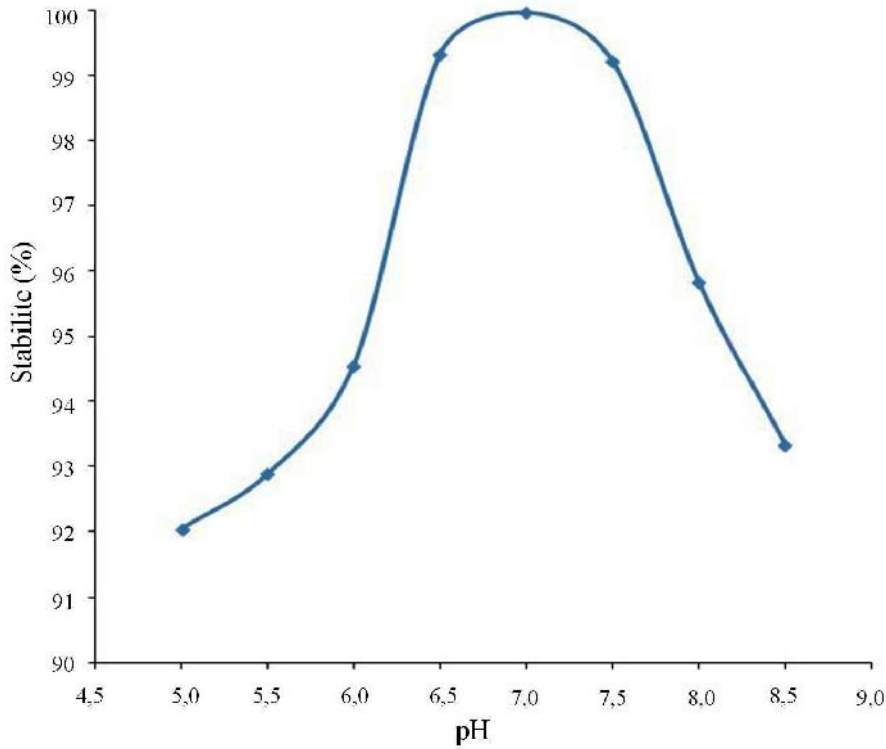
#### 4.7.4. pH stabilitesi

8 farklı pH değerine (5-8,5) sahip pigment çözeltilerinin 6 saatlik inkübasyon sonucu 510 nm’de absorbansları belirlenmiştir. Stabilite değerleri Çizelge 4.14’de verilmiştir.

Çizelge 4.14. pH etkisiyle pigment stabilitesi

pH	% Stabilite <sup>a</sup>
5	92,04 ± 0,89
5,5	92,88 ± 1,02
6	94,56 ± 0,59
6,5	99,32 ± 0,31
7	99,95 ± 0,08
7,5	99,21 ± 0,69
8	95,83 ± 0,48
8,5	93,33 ± 0,31

<sup>a</sup> Sonuçlar, ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir.

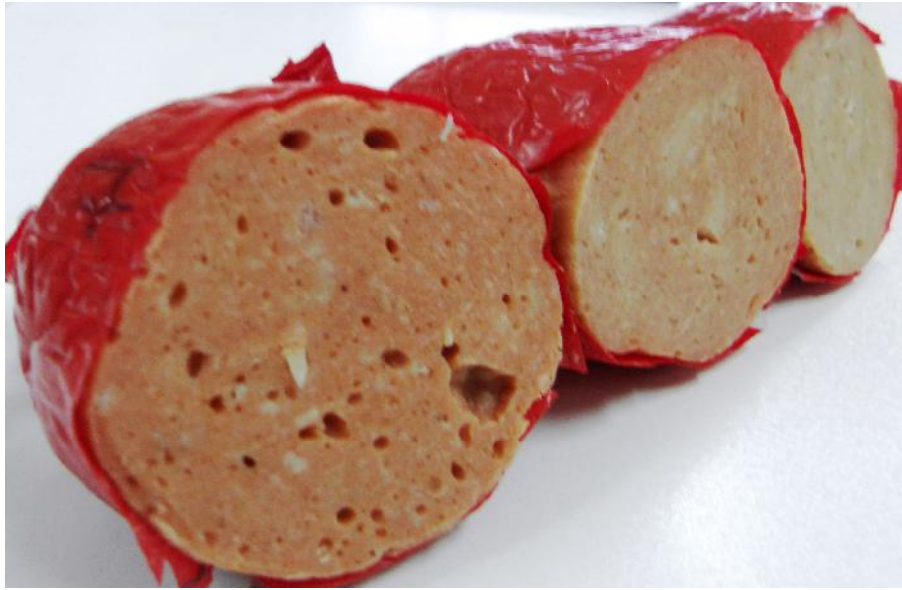


Şekil 4.20. Pigment stabilitesinin pH ile değişimi

Şekil 4.20'de görüldüğü gibi pigmentin stabilitesinin pH 6,5-7,5 aralığında % 99'un üzerinde olduğu belirlenmiştir. pH'nın bu aralığın üzerine çıktığı veya altına düştüğü durumlarda, stabilitenin düştüğü görülmektedir. Bununla birlikte, belirlenen pH aralığında stabilite % 92'nin üzerindedir. Elde edilen stabilite değerleri oldukça yüksek değerlerdir. Buna göre, süne hasarlı buğday kullanılarak üretilen *Monascus* pigmentinin nötral pH'larda stabilitesinin oldukça yüksek olduğu sonucuna varılabilir. Bu sonuç Silveira ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada elde edilen sonuç ile uyumludur. Silveira ve ark. (2011), şeker kamışı küspesi kullanılarak üretilen *Monascus* pigmentinin nötral pH değerlerinde (6,0-8,0), daha asidik pH'lara (4,0-5,0) kıyasla daha stabil olduğunu belirlemiştir. Bahsi geçen çalışmada, pH 6, 7 ve 8'de 6 saatlik inkübasyon sonucu, başlangıç renginin % 81, 84 ve 85'inin parçalanmadan kaldığı tespit edilmiştir.

#### 4.8. *Monascus* ile Üretilen Renk Maddesi Kullanılarak Salam Üretimi ve Salamların Renk Analizi

Optimum noktada gerçekleştirilen üretim sonucu elde edilen renk maddesi, salam üretimi denemesinde kullanılmıştır (Şekil 4.21). *Monascus* ile üretilen renk maddesi kullanılarak üretilen salamların, *L*, *a*, and *b* değerleri HunterLAB sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Çizelge 4.15'de renk maddesi ilave edilen salamlara ait renk değerleri verilmiştir.



Şekil 4.21. *Monascus* kullanılarak üretilen renk maddesi ilave edilen salam örnekleri



Çizelge 4.15. *Monascus* kullanılarak üretilen renk maddesi ilave edilen salamların renk (*L*, *a*, *b*) değerleri

Renk Maddesi (%)	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
Kontrol	53,18 ± 0,02 <sup>a</sup>	8,13 ± 0,03 <sup>f</sup>	12,20 ± 0,04 <sup>b</sup>
0,2	52,80 ± 0,08 <sup>c</sup>	8,22 ± 0,07 <sup>e</sup>	12,40 ± 0,08 <sup>a</sup>
0,4	52,93 ± 0,01 <sup>b</sup>	8,48 ± 0,04 <sup>d</sup>	12,32 ± 0,02 <sup>a</sup>
1,2	51,23 ± 0,02 <sup>d</sup>	8,61 ± 0,05 <sup>c</sup>	11,62 ± 0,01 <sup>d</sup>
2,4	50,49 ± 0,05 <sup>e</sup>	10,25 ± 0,07 <sup>a</sup>	11,91 ± 0,06 <sup>c</sup>
4,8	49,88 ± 0,07 <sup>g</sup>	9,92 ± 0,07 <sup>b</sup>	11,56 ± 0,03 <sup>d</sup>
7,2	49,89 ± 0,05 <sup>g</sup>	9,84 ± 0,03 <sup>b</sup>	11,24 ± 0,07 <sup>e</sup>
9,6	50,31 ± 0,01 <sup>f</sup>	9,90 ± 0,08 <sup>b</sup>	11,24 ± 0,01 <sup>e</sup>

<sup>a,b,c</sup> Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arasında istatistiki olarak önemli ( $P < 0,05$ ) fark bulunmaktadır.

Tavuk kıyması kullanılarak üretilen salam örneklerine ait renk değerlerinin renk maddesi ilavesi ile anlamlı şekilde değiştiği görülmektedir. Kırmızı rengi ifade eden *a* değerinin hiç renk maddesi ilave edilmemiş kontrol örneğinde 8,13 iken % 2,4 renk maddesi ilavesi ile 10,25 seviyesine yükseldiği belirlenmiştir. Bu seviyeden sonra bir miktar düşen *a* değeri, % 4,8, 7,2 ve 9,6 renk maddesi ilavesi sonucunda istatistiki olarak değişmemiştir. % 2,4 renk ilavesinin salamda en yoğun kırmızı rengin eldesi için optimum nokta olduğu görülmektedir. Aşırı renk maddesi ilavesine karşın kırmızılık değerinin düşmesi ise eklenen renk maddesinin sulu çözelti olması ve ortamdaki su miktarının artışına bağlı olarak rengin açılmasından dolayı gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu düşüncüyü destekleyen bir diğer gösterge de % 2,4 seviyesine kadar düşen ve bu aşamadan sonra yükselmeye başlayan beyazlık ya da açıklık olarak tanımlanan *L* değeridir. Sarılığın ifadesi olan *b* değeri ise çizelgeden de görüleceği gibi *L* ve *a* değerlerinden bağımsız olarak sınırlı bir değişime uğramış olup renk maddesi ilavesinden anlamlı olarak etkilenmediği ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak tavuk kıyması ile üretilen salamlara % 2,4 renk maddesi ilavesinin en yüksek kırmızı rengi elde etmede optimum seviye olduğu görülmüştür.

Liu ve ark. (2010) tarafından yapılan ve düşük nitritli sosis üretiminde, *M. purpureus* ile elde edilen renklendirici kullanımının denendiği çalışmada ise, % 1,5 düzeyinde renklendirici kullanılması durumunda, üretilen düşük nitritli sosisin kabul edilebilir özellikte olduğu sonucuna varılmıştır. Renklendirici kullanılmayan kontrol örneğinde 11,51 olan *a* değeri, %

0,5, % 1 ve % 1,5 oranlarında renklendirici içeren örneklerde sırasıyla, 14,43, 16,54 ve 20,05 olarak belirlenmiştir. *L* değerleri, kontrol için 33,91, örnekler için ise sırasıyla 32,67, 31,26 ve 30,66 olarak verilmiştir. *b* değerleri ise kontrol için 6,89, örnekler için ise sırasıyla 7,75, 8,04 ve 8,16 olarak rapor edilmiştir. Bununla birlikte, kontrol örneğe kıyasla, renklendirici kullanılarak nitrit içeriğinin azaltıldığı örneklerde mikrobiyal yükün daha yüksek bulunduğu bildirilmektedir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde doğal gıda katkı maddelerine olan talep artmaktadır. Bu nedenle doğal renklendiricileri konu alan çalışmalar, renklendiriciler alanında yapılan çalışmaların önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Doğu Asya'da doğal renklendirici ve geleneksel gıda katkısı olarak kullanılan *Monascus* pigmentleri, Batı ülkelerinde et işleme endüstrisinde de kullanılmaktadır. Ülkemiz et endüstrisinde de kırmızı *Monascus* pigmentleri diğer bir doğal renklendirici olan karmin ile birlikte kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde kullanılan birçok katkı maddesi gibi bu renklendiriciler de ülkemize diğer ülkelerden ithal edilmekte olup, yurtiçinde *Monascus* pigmentlerinin üretimi ile ilgili herhangi bir ticari faaliyet de bulunmamaktadır. *Monascus* pigmentleri et ürünlerinde yaygın olarak kullanılmasına karşın mevcut Türk Gıda Mevzuatı bu ürün hakkında herhangi bir bilgi içermemekte olup ülkemizde üretimi ve kullanımı ile ilgili bilimsel çalışmalar da oldukça sınırlıdır.

Bu çalışmada *M. purpureus*'un sıvı ortam fermentasyonu ile doğal renklendirici üretiminin optimizasyonu amaçlanmıştır. Kırmızı pigment üretiminde besin ortamı olarak ülkemizde oldukça fazla miktarda bulunan bir tarım endüstrisi artığı olan süne hasarlı buğday kullanılmıştır. Çalışma kapsamında 27, 30, 32, 35 ve 37°C fermentasyon sıcaklıklarında ve 0, 50, 100, 150, 200, 250 devir/dak çalkalama hızlarında, ışıklı ve ışısız ortam koşullarında toplam 60 farklı deneme gerçekleştirilmiştir. Bu koşullarda üretilen pigment miktarları belirlenmiş, pigment üretiminin optimizasyonu yapay sinir ağları kullanılarak gerçekleştirilmiş ve optimum koşullarda *Monascus* pigmenti üretimi yapılmıştır. Kırmızı pigment ve sitrinin analizinde, LC-MS, görünür bölge spektrofotometrisi ve HPLC yöntemleri kullanılmıştır. Ayrıca üretilen renk maddesinin stabilitesinin ısı, UV ışık, pH ve süre ile değişimi belirlenmiş ve renk maddesi kullanılarak laboratuvar koşullarında salam üretimi gerçekleştirilmiştir.

Klasik modelleme teknikleriyle fermentasyon koşullarının belirlenmesine alternatif olarak, yapay sinir ağları kullanılarak *Monascus* pigmentlerinin üretiminin modellenmesi, bu konu ile ilgili yapılan çalışmalara farklı bir yaklaşım sunabilir.

Çalışmada, süne hasarlı tane oranı  $\% 5 \pm 1$  olan ve fırıncılık endüstrisi için kabul edilemez fizikokimyasal özelliklere sahip buğday örneği kullanılmıştır. 5 günlük inkübasyon sonucu

elde edilen renk maddesinin, 410 nm ve 510 nm dalgalı boylarında maksimum absorbanı yaptığı görülmüştür.

Örnekte yapılan sitrinin analizi sonucunda Teşhis Limitinin (10 ng/mL) üzerinde sitrinin belirlenememiştir. Katı ortam yerine sıvı ortam fermentasyonu kullanımının kültivasyon periyodunu kısaltarak, sitrinin üretimi gerçekleşmeden inkübasyonun sonlandırılmasını sağladığı sonucuna varılmıştır. Çalışma sonucunda, sitrinin içermeyen kırmızı pigment üretimi için süne hasarlı buğdayın, sıvı ortam fermentasyonunda *M. purpureus*'un substratı olarak kullanılabilceği gösterilmiştir.

27, 30, 32, 35 ve 37°C kültivasyon sıcaklıklarında ve 0, 50, 100, 150, 200, 250 devir/dak çalkalama hızlarında kırmızı pigment miktarı belirlenmiştir. Renk verileri, YSA kullanılarak pigment üretiminin modellenmesinde kullanılmıştır. Farklı koşullarda üretilen renk değerlerine ait verilerin % 60'ı yapay sinir ağının eğitiminde, % 20'si validasyonda, % 20'si de test amaçlı kullanılmıştır. Gerçek değerlere karşılık, oluşturulan YSA'nın tahmin ettiği değerler grafiğe geçirilmiştir. Eğitim, validasyon ve test verilerine ait grafikler için elde edilen  $R^2$  değerleri sırasıyla, 0,993, 0,961 ve 0,944 olarak belirlenmiştir. Oluşturulan YSA modelinin, kırmızı pigment üretimine, sıcaklık, karıştırma hızı ve ışığın etkisini yüksek korelasyonda tahmin edebilme yeteneğinde olduğunu sonucuna varılmıştır.

Çalışılan aralıktaki belirli kültivasyon koşullarına karşılık gelen A değerleri, YSA kullanılarak tahmin edilmiş ve bu veri serisi kullanılarak oluşturulan grafikler yardımı ile optimum pigment üretim koşulları belirlenmiştir. En yüksek pigment üretiminin, ışıklı ortamda 29 °C sıcaklıkta ve 150 devir/dak çalkalama hızında gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu noktadaki pigment miktarı 1,874  $A_{510nm}$  olarak tahmin edilmiştir. Bu değeri test etmek amaçlı olarak bu noktada üç deney daha gerçekleştirilmiş ve sonuç  $1,787 \pm 0,072 A_{510nm}$  olarak bulunmuştur.

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen stabilite analizleri ile, *Monascus* pigmentlerinin, çok yüksek sıcaklıkları içermeyen ısıl işlemlere tabi tutulan, hafif asidik veya hafif bazik gıdalarda kullanılabilceği sonucuna varılabilir. Diğer doğal pigmentlerde olduğu gibi, *Monascus* pigmentlerinde de çeşitli faktörler etkisiyle bir miktar renk kaybı gerçekleşmektedir. Bununla birlikte, uygun koşulların sağlanması ve pigment dozunun ayarlanması ile bu renk kaybının etkisinin azaltılabilceği de unutulmamalıdır.

Sonuç olarak genellikle hayvan beslemesinde kullanılan düşük ekonomik değerli tarımsal bir ürün olan süne hasarlı buğdayın, kırmızı pigment üretiminde *M. purpureus* 'un substratı olarak kullanılabileceği belirlenmiştir. Düşük ekonomik değerli süne hasarlı buğdayın, doğal gıda renklendiricisi gibi değerli bir ürün üretiminde kullanılması bu hasar ile oluşan ekonomik kaybı azaltmaya yardım edebilir.

Konu ile ilgili yapılması gereken öncelikli öneri ise, Türk Gıda Mevzuatı'nda hakkında herhangi bir bilgi bulunmayan *Monascus* pigmentlerinin kullanımıyla ilgili yasal düzenlemelerin yapılması olabilir.

Renklendiriciler, koruyucular gibi katkı maddelerinin ithalinden kaynaklanan döviz kaybının önüne geçmek amacıyla, bu maddeler ile ilgili daha fazla sayıda çalışma yapılmalı ve bunların ülkemizde üretiminin sağlanması ile ilgili Sanayi-Üniversite işbirliğiyle yapılan bilimsel çalışmalara daha fazla destek verilmelidir. Özellikle tarım endüstrisi atık/artıklarının değerlendirilerek, doğal katkı maddeleri gibi daha değerli ürünlerin üretimini ele alan bilimsel çalışmalara ağırlık verilmesi gerekmektedir.

Ayrıca doğal katkı maddelerinin ticari potansiyeli değerlendirilirken, bu maddelerin stabilite ölçümlerinin de mutlaka yapılması gerektiği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu konuda yapılacak çalışmalara, üretilen maddelerin üründeki stabilitelerinin belirlenmesi de eklenebilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Ahn J, Jung J, Hyung W, Haam S, Shin C (2006). Enhancement of *Monascus* pigment production by the culture of *Monascus* sp. J101 at low temperature. *Biotechnology Progress*, 22: 338-340.
- Anonim (1988). User's Guide to MSTAT-C. A software program for the design, management and analysis of agronomic research experiments. Michigan State University, ABD.
- Anonim (1990). American Association of Cereal Chemists (AACC) International. Approved Methods of Analysis, 11<sup>th</sup> Ed. AACC International, St. Paul, MN, U.S.A.
- Anonim 2000. Türk Gıda Kodeksi Et Ürünleri Tebliği (Tebliğ No: 2000/4).
- Anonim 2002. Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Kullanılan Renklendiriciler Tebliği (Tebliğ No: 2002/55).
- Anonim 2005. Türk Gıda Kodeksi Kırmızı Et ve Et Ürünleri Üretim Çalışma ve Denetleme Usül ve Esaslarına Dair Yönetmelik (05.01.2005 tarih ve 25691 sayılı resmi gazete).
- Anonim (2012a). Toprak Mahsulleri Ofisi alım fiyatları. TMO, Ankara, Türkiye. <http://www.tmo.gov.tr/Main.aspx?ID=126>. Erişim 09.01.2012.
- Anonim (2012b). Nevşehir Ticaret Borsası. Nevşehir, Türkiye. [www.ntb.org.tr/index.php?icerik=aylik](http://www.ntb.org.tr/index.php?icerik=aylik). Erişim 09.01.2012.
- Arunachalam C, Narmadhapriya D (2011). *Monascus* fermented rice and its beneficial aspects: A new review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 4: 29-31.
- Babitha S, Soccol CR, Pandey A (2007). Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. *Bioresource Technology*, 98: 1554-1560.
- Baş D, Kılıç K, Dudak FC, Boyacı İH (2006). Yapay sinir ağlarının gıda alanında kullanılması. Türkiye 9. Gıda Kongresi Bildiriler Kitabı, 953, Bolu.
- Baş D, Dudak FC, Boyacı İH (2007a). Modeling and optimization III: Reaction rate estimation using artificial neural network (ANN) without a kinetic model. *Journal of Food Engineering*, 79: 622-628.
- Baş D, Dudak FC, Boyacı İH (2007b). Modelling and optimization IV: Investigation of reaction kinetics and kinetic constants using a program in which artificial neural network (ANN) was integrated. *Journal of Food Engineering*, 79: 1152-1158.
- Baumgart J (1993). *Microbiologische Untersuchung von Lebensmitteln*. 3. Aufl Behr's Verlag, 112-114, Hamburg.
- Belitz HD, Grosch W (1987). *Food Chemistry*, 497-499, Springer-Verlag, Germany.
- Blanc P, Loret M, Santerre A, Pareilleux A, Prome D, Prome J, Laussac J, Goma G (1994). Pigments of *Monascus*. *Journal of Food Science*, 59: 862-865.
- Blanc PJ, Laussac JP, Le Bars P, Lorent MO, Pareilleux A (1995). Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. *International Journal of Food Microbiology*, 27: 201-213.

- Carvalho JC, Oishi OB, Pandey A, Soccol CR (2005). Biopigments from *Monascus*: strains selection, citrinin production and color stability. *Brazilian Archive of Biology and Technology*, 48: 885-894.
- Chatterjee S, Maity S, Roy S, Chattopadhyay P, Sarkar A, Sen SK (2008). Production optimization, purification and toxicological assessment of extracellular red pigment from *M. purpureus* in submerged culture. *Journal of Biotechnology*, 136: 743-750.
- Chang JS, Lee JT, Chang AC (2006). Neural-network rate-function modeling of submerged cultivation of *Monascus anka*. *Biochemical Engineering Journal*, 32: 119–126.
- Chen F, Hu X (2005). Study on Red Fermented Rice with High Concentration of Monacolin K and Low Concentration of Citrinin. *International Journal of Food Microbiology*, 103: 331-337.
- Chen Y-P, Tseng C-P, Chien I-L, Wang W-Y, Liaw L-L, Yuan G-F (2008). Exploring the distribution of citrinin biosynthesis related genes among *Monascus* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 11767–11772.
- Cho YJ, Park JP, Hwang HJ, Kim SW, Choi JW, Yun JW (2002). Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclairii*. *Letters in Applied Microbiology*, 35: 195-202.
- Chung CC, Chen HH, Hsieh PC (2007) Application of the Taguchi method to optimize *Monascus* spp. culture. *Journal of Food Process Engineering*, 30: 241-254.
- Daroit DJ, Silveira ST, Hertz PF, Brandelli A (2007). Production of extracellular  $\beta$ -glucosidase by *M. purpureus* on different growth substrates. *Process Biochemistry*, 42: 904–908.
- Dominguez-Espinosa RM, Webb C (2003). Submerged fermentation in wheat substrates for production of *Monascus* pigments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19: 329-336.
- Dufosse L, Galaup P, Yaron A, Blanc P, Chidambara KN, Ravishankar GA (2005). Microorganisms and Microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 389-406.
- Dufosse L (2006). Microbial Production of Food Grade Pigments. *Food Technol. Biotechnol.* 44: 313–321.
- Dutta JR, Dutta PK, Banerjee R (2004). Optimization of culture parameters for extracellular protease production from a newly isolated *Pseudomonas* sp. using response surface and artificial neural network models. *Process Biochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 39: 2193-2198.
- Ertugay Z, Çelik İ, Elgün A, Ertugay F (1995). Süne zararı görmüş buğday ile görmemiş buğdaya farklı tavlama metodları uygulamasının öğütme değeri ile unun bazı kalitatif özellikleri üzerine etkisi. I. *Un Mamülleri Dünyası*, 4: 4-10.
- Fabre CE, Santerre AL, Loret MO, Baberian R, Pareilleux A, Goma G, Blanc PJ (1993). Production and food applications of the red pigments of *Monascus ruber*. *Journal of Food Science*, 58: 1099-1102.
- Franco CM, Fente CA, Vazquez B, Cepada A, Lallaoui L, Prognon P, Mahuzier G (1996). Simple and Sensitive High-Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Method for the Determination of Citrinin. Application to the Analysis of Fungal Cultures and Cheese Extracts. *Journal of Chromatography, A*, 723: 69-75.

- Goncalves EC, Minim LA, Coimbra JSR, Minim VPR (2005). Modelling sterilization process of canned foods using artificial neural networks. *Chemical Engineering and Processing*, 44: 1269-1276.
- Gökalp HY, Kaya M, Zorba Ö (2002). Et Ürünleri İşleme Mühendisliği 4.baskı, Atatürk Üniversitesi Yayınları No:786, 134-136, Erzurum.
- Greenway WT, Neustadt MH, Zeleny L (1965). A test for stinkbug damage in wheat. *Cereal Chemistry*, 42: 577-579.
- Hamdi M, Blanc PJ, Goma G (1995). A new process for red pigment production by *M. purpureus*. Culture on prickly pear juice and the effect of partial oxygen pressure. *Bioprocess Engineering*, 17: 75–79.
- Hamdi M, Blanc PJ, Goma G (1996). Effect of aeration conditions on the production of red pigments by *M. purpureus* growth on prickly pear juice. *Process Biochemistry* (Amsterdam, Netherlands), 31: 543-547.
- Hariri G, Williams PC, El-Haramein FJ (2000). Influence of pentatomid insects on the physical dough properties and two-layered flat bread baking quality of Syrian wheat. *Journal of Cereal Science*, 31: 111-118.
- Hendry GAF, Houghton JD (1992). *Natural Food Colorants*, Blackie Academic Professional, London.
- Hajjaj H, Blanc PJ, Groussac E, Goma G, Uribe Larrea JL, Loubiere P (1999). Improvement of the red pigment/citrinin production ratio as a function of environmental conditions by *Monascus ruber*. *Biotechnology and Bioengineering*, 64: 497– 501.
- Hajjaj H, Blanc P, Groussac E, Uribe Larrea JL, Goma G, Loubiere P (2000a). Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 619–625.
- Hajjaj H, Kläbe A, Goma G, Blanc PJ, Barbier E, Francois J (2000b). Medium-chain fatty acids affect citrinin production in the filamentous fungus *Monascus ruber*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1120–1125.
- Jia XO, Xu ZN, Zhou LP, Sung CK (2010). Elimination of the mycotoxin citrinin production in the industrial important strain *Monascus purpureus* SM001. *Metabolic Engineering* 12: 1–7.
- Jiang X-L, Tian J-C, Hao Z, Zhang W-D (2008). Protein content and amino acid composition in grains of wheat-related species. *Agricultural Sciences in China*, 7: 272-279.
- Johns M, Stuart D (1991). Production of pigments by *M. purpureus* in solid culture. *Journal of Industrial Microbiology*, 8: 23–28.
- Jung H, Kim C, Kim K, Shin CS (2003). Color characteristics of *Monascus* pigments derived via fermentation with various amino acids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51: 1302-1306.
- Jung H, Kim C, Shin CS (2005). Enhanced photostability of *Monascus* pigments derived with various amino acids via fermentation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53: 7108-7114.
- Juzlova P, Martinkova L, Kren V (1996) Secondary metabolites of the fungus *Monascus* – a review. *J Ind Microbiol* 16:163–170.



- Kınacı E, Kınacı G (2004). Quality and yield losses due to sunn pest (Hemiptera: Scutelleriadae) in different wheat types in Turkey. *Field Crops Research*, 89: 187-195
- Kim S-J, Rhim J-W, Kang S-G, Jung S-T (1997). Characteristics and stability of pigments produced by *Monascus anka* in a jar fermenter. *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition*, 26: 60-66.
- Kim HJ, Kim JH, Oh HJ, Shin CS (2002). Morphology control of *Monascus* cells and scale-up of pigment fermentation. *Process Biochemistry*, 38: 649-655.
- Koksel H, Atli A, Dag A, Sivri D (2002). Commercial milling of suni bug (*Eurygaster* spp.) damaged wheat. *Nahrung/Food*, 46: 25-27.
- Lee, JT (2004). Yüksek Lisans Tezi, Optimization of Submerged Cultivation of *Monascus anka* via Sequential Pseudo Uniform Design Method. Tatung University, Taipei, Taiwan.
- Lee CL, Wang JJ, Pan TM (2006). Synchronous analysis method for detection of citrinin and the lactone and acid forms of monacolin K in red mold rice. *Journal of AOAC International*, 89: 669–677.
- Lee CL, Hung HK, Wang JJ, Pan TM (2007a). Improving the ratio of monacolin K to citrinin production of *M. purpureus* NTU 568 under dioscorea medium through the mediation of pH value and ethanol addition. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55: 6493-6502.
- Lee CL, Chen WP, Wang JJ, Pan TM (2007b). A simple and rapid approach for removing citrinin while retaining monacolin K in red mold rice. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55: 11101-8.
- Lim HS, Yoo SK, Shin CS, Hyun YM (2000). *Monascus* Red Pigment Overproduction by Coculture with Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Secreting Glucoamylase. *The Journal of Microbiology*, 38: 48-51.
- Lin CF (1973). Isolation and cultural condition of *Monascus* sp. for the production of pigment in a submerged culture. *Journal of Fermentation Technology*, 51: 407–414.
- Lin CF, Iizuka H (1982). Production of extracellular pigment by a mutant of *Monascus kaoliang* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 43: 671–676.
- Liu DC, Wu SW, Tan FJ (2010). Effects of addition of anka rice on the qualities of low-nitrite Chinese sausages. *Food Chemistry* 118:245–250.
- Mapari SAS, Anne S, Meyer AS, Thrane U (2006). Colorimetric Characterization for Comparative Analysis of Fungal Pigments and Natural Food Colorants *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54: 7027-7035.
- Mapari SAS, Thrane U, Meyer AS (2010). Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? *Trends in Biotechnology*, 28(6): 300-307.
- Miyake T, Zhang MY, Kono I, Nozaki N, Sammoto H (2006). Repression of secondary metabolite production by exogenous cAMP in *Monascus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70: 1521-1523.
- Movagharnjad K, Nikzad M (2007). Modelling of tomato drying using artificial neural network. *Computers and Electronics in Agriculture*, 59: 78-85.

- Mukherjee G, Singh SK (2011). Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 46: 188-192.
- Najjar YM, Basheer IA, Hajmeer MN (1997). Computational neural networks for predictive microbiology: I. Methodology. *International Journal of Food Microbiology*, 34: 27-49.
- Nimnoi P, Lumyong S (2011). Improving solid-state fermentation of *M. purpureus* on agricultural products for pigment production. *Food and Bioprocess Technology*, 4: 1384-1390.
- Ning H, Qiao J, Liu Z, Lin Z, Li G, Wang Q, Wang S, Ding Y (2010). Distribution of proteins and amino acids in milled and Brown rice as affected by nitrogen fertilization and genotype. *Journal of Cereal Science*, 52: 90-95.
- Olanca B, Sivri-Ozay D, Koksel H (2009). Effects of suni-bug (*Eurygaster* spp.) damage on size distribution of durum wheat (*Triticum durum* L.) proteins. *European Food Research and Technology*, 229: 813-820.
- Orti DL, Hill RH, Liddle JJA, Needham LL (1986). High-performance liquid chromatography of mycotoxin metabolites in human urine. *Journal of Analytical Toxicology*, 10: 41-45.
- Oteiza JM, Giannuzzi L, Califano AN (2003). Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Escherichia coli* isolated from morcilla as affected by composition of the product. *Food Research International*, 36: 703-712.
- Panagou EZ, Skandamiz PN, Nychas G-JE (2003). Modelling the combined effect of temperature, pH and  $a_w$  on the growth rate of *Monascus ruber*, a heat-resistant fungus isolated from green table olives. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 146-156.
- Panagou EZ, Kodogiannis V, Nychas GJ-E (2007). Modelling fungal growth using radial basis function neural networks: The case of the ascomycetous fungus *Monascus ruber* van Tieghem. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 276-286.
- Pastrana L, Blanc PJ, Santerre AL, Loret MO, Goma G (1995). Production of red pigments by *Monascus ruber* in synthetic media with a strictly controlled nitrogen source. *Process Biochemistry*, 30: 333-341.
- Pattanagul P, Pinthong R, Phianmongkhol A, Tharatha S (2008). Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by *Monascus* sp. *International Journal of Food Microbiology*, 126: 20-23.
- Saldamlı İ, Uygun Ü (1998). Gıda Katkı Maddeleri. *Gıda Kimyası*, 487.
- Silveira ST, Daroit DJ, Brandelli A (2008). Pigment production by *M. purpureus* in grape waste using factorial design. *LWT-Food Science and Technology*, 41: 170-174.
- Silveira ST, Daroit DJ, Sant'Anna V, Brandelli A. 2011. Stability Modeling of Red Pigments Produced by *M. purpureus* in Submerged Cultivations with Sugarcane Bagasse. *Food Bioprocess Technology*, DOI 10.1007/s11947-011-0710-8.
- Teng SS, Feldheim W (1998). Analysis of anka pigments by liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry. *Chromatographia*, 47: 529-536.

- Thomas R, Anjaneyulu ASR, Kondaiah N (2008). Development of shelf stable pork sausages using hurdle technology and their quality at ambient temperature ( $37\pm 1$  ) storage. *Meat Science*, 79: 1-12.
- Velioğlu, M. ve Yılmaz, İ., 2006. *Monascus* Türleri Kullanılarak Üretilen Kırmızı Fermente Pirinç. Hububat 2006 Sempozyum Kitabı, 298-300. Gaziantep.
- Wang C, Fu Z-L, Chen M-H, Ban Z, Wang Y-R, Zhang X-W (2009). Blue light effects on pigment and citrinin production in *Monascus*. *Bioinformatics and Biomedical Engineering 3<sup>rd</sup> International Conference*, 1-4, Beijing, China.
- Werteker M, Kramreither G (2008). Relation between susceptibility to wheat bug attack and digestibility of glutenin. *Journal of Cereal Science*, 47: 226-232.
- Xu G, Chen Y, Yu H, Cameleyre X, Blanc PJ (2003). HPLC fluorescence method for determination of citrinin in *Monascus* cultures. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 54: 82-84.
- Xu B, Jia X, Gu L, Sung C, (2006). Review on the Qualitative and Quantitative Analysis of the Mycotoxin Citrinin. *Food Control*, 17: 271-285.
- Velmurugan P, Lee YH, Venil CK, Lakshmanaperumalsamy P, Chae JC, Oh BT (2010). Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(4): 346-350.
- Yang J, Tseng Y, Chang H, Lee Y, Mau J (2005). Storage stability of *Monascus* Adlay. *Food Chemistry*, 90: 303-309.
- Yin LJ, Lu MC, Pan CL, Jiang STS (2005). Effect of *Monascus* fermentation on the characteristics of mackerel mince. *Journal of Food Science*. 70(1): 66-72.
- Yin Y-G, Ding Y (2009). A close to real-time prediction method of total coliform bacteria in foods based on image identification technology and artificial neural network. *Food Research International*, 42: 191-199.
- Yurtoğlu H (2005). Yapay Sinir Ağları Metodolojisi ile Öngörü Modellemesi: Bazı Makroekonomik Değişkenler için Türkiye Örneği. Devlet Planlama Teşkilatı Uzmanlık Tezi.
- Zheng Y, Xin Y, Guo Y (2009). Study on the fingerprint profile of *Monascus* products with HPLC-FD, PAD and MS. *Food Chemistry*, 113: 705-711.
- Zhao H (1998). Production of Monacolin by *M. purpureus* in rice solid-state fermentation. The Symposia on *Monascus* Culture and Applications, Toulouse, France.

## EKLER

Ek 1. Pigment çözeltilerinin görünür bölgedeki (380-750 nm) absorpsiyon değerleri

Dalgaboyu (nm)	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D9	D11
380	0	0,032	0,076	0,173	0,589	0,551	0,811	0,907
381	0	0,032	0,075	0,175	0,595	0,558	0,816	0,913
382	0	0,031	0,075	0,176	0,599	0,562	0,820	0,912
383	0	0,031	0,074	0,178	0,602	0,567	0,823	0,911
384	0	0,031	0,073	0,179	0,605	0,572	0,826	0,911
385	0	0,030	0,073	0,180	0,608	0,577	0,829	0,907
386	0	0,030	0,072	0,182	0,612	0,582	0,831	0,909
387	0	0,030	0,072	0,184	0,615	0,588	0,834	0,906
388	0	0,030	0,071	0,185	0,617	0,592	0,836	0,903
389	0	0,029	0,071	0,187	0,620	0,597	0,838	0,903
390	0	0,029	0,070	0,188	0,622	0,603	0,840	0,901
391	0	0,029	0,070	0,190	0,624	0,608	0,841	0,899
392	0	0,029	0,070	0,191	0,625	0,613	0,841	0,897
393	0	0,029	0,069	0,192	0,627	0,618	0,842	0,894
394	0	0,029	0,069	0,193	0,627	0,623	0,842	0,892
395	0	0,029	0,068	0,194	0,628	0,627	0,842	0,888
396	0	0,029	0,068	0,195	0,628	0,632	0,841	0,884
397	0	0,029	0,068	0,196	0,628	0,637	0,839	0,882
398	0	0,029	0,067	0,197	0,627	0,641	0,837	0,877
399	0	0,029	0,067	0,197	0,626	0,644	0,835	0,873
400	0	0,028	0,067	0,197	0,625	0,648	0,834	0,868
401	0	0,028	0,066	0,198	0,623	0,651	0,830	0,864
402	0	0,028	0,066	0,198	0,621	0,654	0,828	0,857
403	0	0,028	0,066	0,197	0,618	0,656	0,824	0,850
404	0	0,028	0,065	0,198	0,616	0,659	0,820	0,846
405	0	0,028	0,065	0,197	0,613	0,661	0,816	0,838
406	0	0,028	0,065	0,197	0,609	0,662	0,811	0,831
407	0	0,028	0,065	0,196	0,605	0,664	0,806	0,824
408	0	0,028	0,064	0,196	0,601	0,665	0,800	0,816
409	0	0,028	0,064	0,195	0,596	0,665	0,793	0,808
410	0	0,028	0,063	0,194	0,592	0,665	0,786	0,799
411	0	0,028	0,063	0,193	0,587	0,664	0,779	0,789
412	0	0,028	0,063	0,193	0,581	0,663	0,771	0,780
413	0	0,028	0,063	0,191	0,575	0,663	0,762	0,770

---

414	0	0,028	0,063	0,190	0,569	0,661	0,753	0,760
415	0	0,028	0,062	0,189	0,563	0,660	0,744	0,749
416	0	0,028	0,062	0,188	0,556	0,657	0,735	0,738
417	0	0,028	0,062	0,187	0,550	0,655	0,725	0,726
418	0	0,028	0,061	0,186	0,543	0,653	0,716	0,715
419	0	0,028	0,061	0,184	0,536	0,649	0,705	0,702
420	0	0,028	0,061	0,183	0,529	0,647	0,695	0,690
421	0	0,028	0,060	0,182	0,522	0,643	0,684	0,679
422	0	0,028	0,060	0,180	0,514	0,640	0,674	0,666
423	0	0,028	0,060	0,179	0,508	0,637	0,665	0,654
424	0	0,028	0,060	0,177	0,500	0,634	0,654	0,643
425	0	0,027	0,060	0,176	0,493	0,630	0,644	0,631
426	0	0,027	0,059	0,174	0,486	0,625	0,633	0,618
427	0	0,027	0,059	0,173	0,478	0,621	0,622	0,606
428	0	0,028	0,059	0,171	0,470	0,616	0,612	0,593
429	0	0,028	0,059	0,170	0,463	0,611	0,601	0,581
430	0	0,028	0,058	0,168	0,456	0,606	0,590	0,568
431	0	0,028	0,059	0,166	0,447	0,600	0,580	0,556
432	0	0,028	0,059	0,164	0,439	0,594	0,569	0,544
433	0	0,028	0,058	0,162	0,431	0,586	0,557	0,531
434	0	0,028	0,058	0,160	0,423	0,580	0,546	0,517
435	0	0,028	0,058	0,158	0,415	0,572	0,535	0,505
436	0	0,028	0,058	0,156	0,406	0,564	0,524	0,492
437	0	0,028	0,057	0,153	0,398	0,555	0,513	0,479
438	0	0,028	0,057	0,151	0,389	0,545	0,501	0,467
439	0	0,028	0,057	0,148	0,380	0,536	0,489	0,453
440	0	0,028	0,057	0,146	0,372	0,526	0,477	0,441
441	0	0,028	0,056	0,143	0,362	0,515	0,465	0,428
442	0	0,028	0,056	0,140	0,353	0,505	0,454	0,415
443	0	0,028	0,056	0,137	0,344	0,494	0,443	0,404
444	0	0,028	0,056	0,134	0,336	0,484	0,432	0,391
445	0	0,028	0,056	0,131	0,327	0,473	0,421	0,379
446	0	0,028	0,056	0,128	0,319	0,463	0,410	0,368
447	0	0,028	0,055	0,126	0,311	0,452	0,400	0,357
448	0	0,028	0,056	0,123	0,303	0,442	0,390	0,346
449	0	0,028	0,055	0,120	0,295	0,432	0,380	0,335
450	0	0,029	0,055	0,118	0,288	0,422	0,371	0,326
451	0	0,029	0,055	0,115	0,280	0,413	0,362	0,316
452	0	0,029	0,055	0,113	0,274	0,404	0,353	0,308
453	0	0,029	0,055	0,111	0,267	0,397	0,345	0,299

---

---

454	0	0,030	0,055	0,109	0,262	0,389	0,339	0,292
455	0	0,030	0,055	0,107	0,256	0,382	0,332	0,284
456	0	0,030	0,055	0,106	0,251	0,376	0,325	0,278
457	0	0,029	0,055	0,104	0,246	0,371	0,320	0,272
458	0	0,030	0,054	0,103	0,241	0,366	0,314	0,266
459	0	0,030	0,054	0,102	0,237	0,363	0,310	0,261
460	0	0,030	0,054	0,101	0,234	0,360	0,307	0,258
461	0	0,030	0,055	0,100	0,231	0,357	0,303	0,254
462	0	0,030	0,054	0,099	0,228	0,355	0,301	0,250
463	0	0,031	0,054	0,099	0,226	0,355	0,298	0,248
464	0	0,031	0,054	0,099	0,225	0,354	0,295	0,245
465	0	0,031	0,053	0,099	0,223	0,354	0,294	0,244
466	0	0,031	0,054	0,099	0,221	0,355	0,294	0,242
467	0	0,031	0,054	0,099	0,221	0,356	0,293	0,242
468	0	0,031	0,054	0,099	0,220	0,358	0,292	0,242
469	0	0,032	0,054	0,099	0,220	0,360	0,293	0,241
470	0	0,032	0,054	0,100	0,220	0,362	0,293	0,242
471	0	0,033	0,054	0,101	0,221	0,365	0,294	0,242
472	0	0,033	0,054	0,102	0,221	0,368	0,294	0,243
473	0	0,033	0,054	0,103	0,222	0,372	0,295	0,244
474	0	0,033	0,053	0,103	0,222	0,375	0,297	0,246
475	0	0,033	0,053	0,105	0,223	0,379	0,299	0,248
476	0	0,033	0,054	0,105	0,224	0,383	0,300	0,250
477	0	0,033	0,053	0,106	0,225	0,388	0,302	0,252
478	0	0,033	0,053	0,108	0,227	0,392	0,304	0,254
479	0	0,034	0,053	0,109	0,228	0,397	0,306	0,256
480	0	0,033	0,053	0,110	0,230	0,402	0,308	0,259
481	0	0,034	0,053	0,111	0,231	0,407	0,311	0,262
482	0	0,034	0,053	0,113	0,233	0,412	0,314	0,265
483	0	0,034	0,053	0,114	0,235	0,416	0,316	0,268
484	0	0,034	0,052	0,115	0,237	0,422	0,318	0,271
485	0	0,032	0,049	0,118	0,239	0,428	0,320	0,276
486	0	0,032	0,049	0,118	0,238	0,430	0,320	0,275
487	0	0,031	0,052	0,118	0,240	0,436	0,327	0,278
488	0	0,033	0,054	0,120	0,244	0,442	0,331	0,284
489	0	0,035	0,053	0,122	0,246	0,447	0,331	0,286
490	0	0,035	0,053	0,123	0,248	0,452	0,334	0,289
491	0	0,035	0,053	0,124	0,250	0,457	0,336	0,291
492	0	0,035	0,053	0,125	0,252	0,462	0,338	0,294
493	0	0,035	0,053	0,127	0,254	0,467	0,340	0,296

---

494	0	0,036	0,053	0,128	0,256	0,471	0,342	0,299
495	0	0,036	0,053	0,129	0,258	0,476	0,345	0,302
496	0	0,036	0,052	0,130	0,259	0,480	0,346	0,304
497	0	0,036	0,053	0,131	0,261	0,484	0,348	0,306
498	0	0,036	0,053	0,132	0,262	0,488	0,350	0,309
499	0	0,036	0,052	0,133	0,264	0,491	0,350	0,310
500	0	0,037	0,053	0,134	0,265	0,495	0,352	0,312
501	0	0,037	0,052	0,134	0,266	0,498	0,353	0,313
502	0	0,037	0,053	0,135	0,267	0,501	0,354	0,315
503	0	0,037	0,052	0,136	0,268	0,503	0,354	0,316
504	0	0,037	0,053	0,136	0,269	0,506	0,355	0,317
505	0	0,037	0,052	0,136	0,270	0,508	0,355	0,318
506	0	0,037	0,052	0,137	0,270	0,509	0,355	0,318
507	0	0,038	0,053	0,137	0,271	0,511	0,355	0,319
508	0	0,038	0,053	0,137	0,271	0,512	0,355	0,319
509	0	0,038	0,053	0,137	0,272	0,513	0,355	0,320
510	0	0,039	0,053	0,138	0,271	0,514	0,355	0,320
511	0	0,039	0,053	0,138	0,272	0,514	0,353	0,320
512	0	0,039	0,053	0,138	0,272	0,515	0,353	0,320
513	0	0,039	0,053	0,137	0,271	0,515	0,351	0,319
514	0	0,039	0,053	0,138	0,271	0,515	0,350	0,319
515	0	0,039	0,053	0,137	0,271	0,514	0,350	0,318
516	0	0,040	0,053	0,137	0,271	0,514	0,349	0,318
517	0	0,040	0,053	0,137	0,270	0,513	0,348	0,316
518	0	0,040	0,053	0,137	0,269	0,512	0,346	0,316
519	0	0,040	0,053	0,137	0,268	0,511	0,344	0,315
520	0	0,040	0,053	0,136	0,268	0,509	0,343	0,313
521	0	0,040	0,053	0,136	0,267	0,508	0,341	0,312
522	0	0,040	0,053	0,135	0,266	0,507	0,339	0,311
523	0	0,041	0,053	0,135	0,266	0,505	0,338	0,309
524	0	0,041	0,053	0,135	0,265	0,503	0,336	0,308
525	0	0,041	0,053	0,134	0,263	0,501	0,335	0,306
526	0	0,041	0,053	0,133	0,262	0,499	0,332	0,304
527	0	0,041	0,053	0,133	0,261	0,497	0,330	0,302
528	0	0,041	0,053	0,133	0,260	0,494	0,328	0,300
529	0	0,041	0,052	0,132	0,259	0,492	0,326	0,298
530	0	0,041	0,052	0,131	0,257	0,489	0,324	0,295
531	0	0,041	0,052	0,130	0,256	0,486	0,321	0,293
532	0	0,041	0,052	0,130	0,254	0,483	0,319	0,291
533	0	0,041	0,052	0,129	0,253	0,480	0,317	0,288

---

534	0	0,041	0,052	0,128	0,251	0,477	0,314	0,286
535	0	0,041	0,052	0,127	0,249	0,473	0,312	0,283
536	0	0,041	0,052	0,126	0,247	0,470	0,309	0,280
537	0	0,041	0,052	0,125	0,246	0,467	0,307	0,278
538	0	0,041	0,051	0,124	0,243	0,463	0,304	0,274
539	0	0,041	0,051	0,123	0,241	0,459	0,301	0,271
540	0	0,041	0,051	0,122	0,239	0,455	0,299	0,268
541	0	0,041	0,051	0,121	0,237	0,451	0,295	0,264
542	0	0,040	0,051	0,120	0,235	0,447	0,292	0,261
543	0	0,040	0,051	0,118	0,233	0,443	0,290	0,258
544	0	0,040	0,051	0,117	0,230	0,438	0,286	0,254
545	0	0,041	0,051	0,116	0,228	0,433	0,283	0,250
546	0	0,041	0,051	0,115	0,226	0,429	0,280	0,247
547	0	0,041	0,051	0,114	0,224	0,424	0,277	0,243
548	0	0,040	0,050	0,112	0,221	0,418	0,273	0,239
549	0	0,040	0,050	0,110	0,218	0,414	0,270	0,235
550	0	0,041	0,050	0,109	0,216	0,408	0,267	0,231
551	0	0,041	0,051	0,108	0,213	0,404	0,264	0,227
552	0	0,040	0,050	0,107	0,210	0,398	0,260	0,223
553	0	0,041	0,050	0,105	0,207	0,392	0,256	0,219
554	0	0,041	0,050	0,104	0,205	0,387	0,253	0,214
555	0	0,041	0,050	0,102	0,202	0,381	0,249	0,210
556	0	0,040	0,050	0,100	0,199	0,375	0,245	0,206
557	0	0,041	0,050	0,099	0,196	0,369	0,242	0,201
558	0	0,041	0,050	0,097	0,193	0,363	0,238	0,197
559	0	0,041	0,050	0,096	0,190	0,357	0,234	0,192
560	0	0,040	0,049	0,094	0,187	0,350	0,230	0,188
561	0	0,040	0,049	0,092	0,183	0,344	0,225	0,183
562	0	0,040	0,050	0,091	0,180	0,338	0,222	0,179
563	0	0,041	0,049	0,089	0,177	0,331	0,218	0,174
564	0	0,040	0,049	0,087	0,174	0,325	0,214	0,169
565	0	0,040	0,049	0,086	0,171	0,318	0,210	0,165
566	0	0,040	0,049	0,084	0,168	0,312	0,206	0,160
567	0	0,039	0,048	0,082	0,164	0,304	0,201	0,156
568	0	0,039	0,048	0,080	0,160	0,298	0,197	0,151
569	0	0,038	0,047	0,079	0,157	0,290	0,192	0,147
570	0	0,037	0,046	0,076	0,153	0,283	0,188	0,142
571	0	0,036	0,045	0,074	0,149	0,276	0,183	0,137
572	0	0,036	0,045	0,072	0,146	0,270	0,179	0,133
573	0	0,035	0,045	0,071	0,143	0,263	0,175	0,129

---



574	0	0,035	0,044	0,069	0,139	0,255	0,171	0,124
575	0	0,035	0,044	0,067	0,136	0,249	0,167	0,120
576	0	0,035	0,044	0,066	0,133	0,243	0,163	0,116
577	0	0,034	0,043	0,064	0,129	0,236	0,159	0,111
578	0	0,033	0,043	0,062	0,125	0,229	0,155	0,107
579	0	0,034	0,044	0,061	0,123	0,223	0,152	0,103
580	0	0,034	0,043	0,059	0,120	0,217	0,148	0,099
581	0	0,032	0,042	0,058	0,116	0,210	0,143	0,095
582	0	0,032	0,042	0,055	0,112	0,203	0,139	0,090
583	0	0,034	0,044	0,054	0,111	0,199	0,138	0,087
584	0	0,034	0,044	0,054	0,109	0,193	0,134	0,083
585	0	0,034	0,042	0,052	0,105	0,186	0,129	0,079
586	0	0,034	0,043	0,050	0,103	0,181	0,126	0,075
587	0	0,034	0,043	0,050	0,100	0,176	0,123	0,072
588	0	0,034	0,043	0,048	0,097	0,169	0,119	0,068
589	0	0,035	0,044	0,047	0,095	0,165	0,117	0,065
590	0	0,036	0,045	0,046	0,093	0,160	0,114	0,062
591	0	0,037	0,045	0,045	0,091	0,155	0,111	0,058
592	0	0,036	0,044	0,044	0,089	0,150	0,108	0,055
593	0	0,035	0,043	0,042	0,085	0,144	0,104	0,052
594	0	0,036	0,044	0,041	0,083	0,140	0,102	0,049
595	0	0,035	0,043	0,040	0,081	0,135	0,099	0,046
596	0	0,036	0,044	0,039	0,079	0,131	0,097	0,043
597	0	0,037	0,045	0,039	0,078	0,127	0,094	0,041
598	0	0,037	0,044	0,038	0,075	0,122	0,091	0,038
599	0	0,036	0,044	0,037	0,073	0,118	0,089	0,035
600	0	0,036	0,044	0,036	0,071	0,113	0,086	0,033
601	0	0,036	0,043	0,035	0,069	0,110	0,084	0,031
602	0	0,036	0,044	0,034	0,068	0,106	0,082	0,028
603	0	0,035	0,043	0,033	0,066	0,102	0,079	0,026
604	0	0,036	0,044	0,032	0,064	0,099	0,077	0,024
605	0	0,037	0,044	0,032	0,063	0,096	0,076	0,022
606	0	0,037	0,044	0,031	0,061	0,092	0,073	0,020
607	0	0,037	0,044	0,030	0,060	0,089	0,072	0,018
608	0	0,037	0,044	0,030	0,059	0,086	0,070	0,016
609	0	0,037	0,044	0,029	0,058	0,084	0,068	0,014
610	0	0,037	0,044	0,029	0,056	0,080	0,066	0,013
611	0	0,037	0,044	0,028	0,055	0,078	0,064	0,011
612	0	0,037	0,044	0,028	0,054	0,076	0,063	0,009
613	0	0,038	0,044	0,027	0,053	0,073	0,062	0,008

---

<b>614</b>	0	0,038	0,044	0,027	0,051	0,071	0,060	0,006
<b>615</b>	0	0,038	0,044	0,026	0,050	0,068	0,059	0,005
<b>616</b>	0	0,038	0,045	0,026	0,050	0,066	0,057	0,004
<b>617</b>	0	0,038	0,045	0,026	0,049	0,065	0,057	0,003
<b>618</b>	0	0,039	0,045	0,025	0,048	0,063	0,055	0,001
<b>619</b>	0	0,039	0,045	0,025	0,047	0,061	0,054	0,000
<b>620</b>	0	0,039	0,045	0,025	0,046	0,059	0,053	-0,001
<b>621</b>	0	0,040	0,046	0,024	0,046	0,058	0,052	-0,002
<b>622</b>	0	0,039	0,045	0,024	0,045	0,056	0,051	-0,003
<b>623</b>	0	0,039	0,045	0,023	0,044	0,054	0,049	-0,004
<b>624</b>	0	0,039	0,045	0,023	0,043	0,053	0,049	-0,005
<b>625</b>	0	0,040	0,046	0,023	0,043	0,051	0,048	-0,006
<b>626</b>	0	0,040	0,046	0,023	0,042	0,050	0,047	-0,007
<b>627</b>	0	0,040	0,046	0,022	0,041	0,049	0,046	-0,008
<b>628</b>	0	0,040	0,045	0,022	0,041	0,047	0,045	-0,009
<b>629</b>	0	0,040	0,044	0,022	0,040	0,045	0,042	-0,011
<b>630</b>	0	0,041	0,044	0,022	0,040	0,044	0,041	-0,012
<b>631</b>	0	0,043	0,048	0,023	0,041	0,046	0,044	-0,009
<b>632</b>	0	0,043	0,049	0,022	0,041	0,046	0,045	-0,008
<b>633</b>	0	0,041	0,048	0,021	0,039	0,044	0,042	-0,011
<b>634</b>	0	0,040	0,045	0,020	0,037	0,041	0,041	-0,013
<b>635</b>	0	0,039	0,046	0,020	0,037	0,041	0,042	-0,013
<b>636</b>	0	0,040	0,049	0,021	0,037	0,043	0,044	-0,013
<b>637</b>	0	0,041	0,048	0,021	0,037	0,041	0,042	-0,013
<b>638</b>	0	0,041	0,046	0,020	0,037	0,038	0,038	-0,014
<b>639</b>	0	0,041	0,046	0,020	0,036	0,038	0,038	-0,015
<b>640</b>	0	0,041	0,046	0,020	0,036	0,038	0,038	-0,015
<b>641</b>	0	0,041	0,047	0,020	0,035	0,037	0,038	-0,016
<b>642</b>	0	0,041	0,046	0,020	0,035	0,036	0,037	-0,017
<b>643</b>	0	0,041	0,046	0,020	0,035	0,036	0,036	-0,017
<b>644</b>	0	0,042	0,046	0,020	0,035	0,035	0,036	-0,017
<b>645</b>	0	0,042	0,047	0,020	0,035	0,035	0,035	-0,017
<b>646</b>	0	0,042	0,047	0,020	0,035	0,035	0,035	-0,017
<b>647</b>	0	0,042	0,047	0,019	0,034	0,034	0,035	-0,017
<b>648</b>	0	0,041	0,046	0,019	0,034	0,033	0,034	-0,018
<b>649</b>	0	0,040	0,046	0,019	0,033	0,033	0,035	-0,018
<b>650</b>	0	0,041	0,047	0,019	0,033	0,033	0,035	-0,018
<b>651</b>	0	0,041	0,046	0,019	0,033	0,033	0,034	-0,019
<b>652</b>	0	0,041	0,046	0,019	0,033	0,032	0,034	-0,019
<b>653</b>	0	0,041	0,046	0,019	0,033	0,032	0,034	-0,019

---

---

654	0	0,041	0,046	0,019	0,033	0,032	0,033	-0,019
655	0	0,036	0,040	0,019	0,032	0,030	0,031	-0,017
656	0	0,023	0,030	0,016	0,024	0,023	0,024	-0,021
657	0	0,031	0,039	0,012	0,025	0,024	0,026	-0,021
658	0	0,038	0,046	0,018	0,033	0,031	0,035	-0,018
659	0	0,041	0,045	0,018	0,032	0,030	0,032	-0,020
660	0	0,041	0,046	0,019	0,032	0,031	0,032	-0,020
661	0	0,041	0,046	0,019	0,032	0,031	0,032	-0,020
662	0	0,041	0,046	0,018	0,032	0,030	0,032	-0,020
663	0	0,041	0,046	0,018	0,032	0,030	0,032	-0,020
664	0	0,041	0,046	0,018	0,032	0,030	0,031	-0,020
665	0	0,041	0,046	0,018	0,031	0,030	0,031	-0,021
666	0	0,041	0,046	0,018	0,031	0,030	0,031	-0,021
667	0	0,041	0,046	0,018	0,031	0,030	0,031	-0,020
668	0	0,041	0,046	0,018	0,031	0,029	0,031	-0,021
669	0	0,041	0,046	0,018	0,031	0,029	0,030	-0,021
670	0	0,041	0,046	0,018	0,031	0,029	0,031	-0,021
671	0	0,041	0,045	0,018	0,031	0,029	0,030	-0,021
672	0	0,040	0,045	0,018	0,031	0,029	0,030	-0,021
673	0	0,040	0,045	0,018	0,030	0,028	0,030	-0,021
674	0	0,041	0,045	0,018	0,031	0,029	0,030	-0,021
675	0	0,041	0,045	0,018	0,031	0,028	0,030	-0,021
676	0	0,041	0,045	0,018	0,030	0,028	0,030	-0,021
677	0	0,041	0,045	0,018	0,030	0,028	0,030	-0,021
678	0	0,040	0,045	0,018	0,030	0,028	0,029	-0,021
679	0	0,040	0,045	0,018	0,030	0,028	0,029	-0,021
680	0	0,040	0,045	0,017	0,030	0,028	0,029	-0,021
681	0	0,040	0,045	0,018	0,030	0,027	0,029	-0,021
682	0	0,040	0,044	0,017	0,030	0,027	0,029	-0,021
683	0	0,040	0,045	0,018	0,030	0,027	0,029	-0,021
684	0	0,040	0,044	0,017	0,030	0,027	0,029	-0,021
685	0	0,039	0,044	0,017	0,029	0,027	0,028	-0,021
686	0	0,039	0,044	0,017	0,029	0,027	0,028	-0,021
687	0	0,040	0,044	0,017	0,029	0,027	0,028	-0,021
688	0	0,040	0,044	0,017	0,029	0,027	0,028	-0,021
689	0	0,040	0,044	0,017	0,029	0,027	0,028	-0,021
690	0	0,040	0,044	0,017	0,029	0,027	0,028	-0,021
691	0	0,040	0,044	0,017	0,029	0,027	0,028	-0,021
692	0	0,039	0,044	0,017	0,029	0,026	0,027	-0,021
693	0	0,039	0,043	0,017	0,029	0,026	0,027	-0,021

---

694	0	0,040	0,044	0,017	0,029	0,026	0,027	-0,021
695	0	0,040	0,044	0,017	0,029	0,026	0,027	-0,021
696	0	0,040	0,044	0,017	0,029	0,026	0,028	-0,021
697	0	0,039	0,043	0,017	0,029	0,026	0,027	-0,021
698	0	0,039	0,043	0,017	0,029	0,026	0,027	-0,021
699	0	0,039	0,043	0,017	0,029	0,026	0,027	-0,021
700	0	0,039	0,043	0,017	0,029	0,026	0,027	-0,021
701	0	0,039	0,044	0,017	0,029	0,026	0,027	-0,021
702	0	0,039	0,043	0,017	0,029	0,026	0,027	-0,021
703	0	0,039	0,043	0,017	0,029	0,026	0,027	-0,021
704	0	0,039	0,043	0,017	0,029	0,026	0,027	-0,021
705	0	0,039	0,043	0,017	0,029	0,026	0,027	-0,021
706	0	0,039	0,043	0,017	0,028	0,026	0,027	-0,021
707	0	0,038	0,043	0,017	0,028	0,025	0,026	-0,021
708	0	0,039	0,043	0,016	0,028	0,025	0,026	-0,021
709	0	0,039	0,043	0,017	0,028	0,026	0,026	-0,020
710	0	0,039	0,043	0,017	0,028	0,026	0,026	-0,020
711	0	0,039	0,043	0,017	0,028	0,026	0,026	-0,020
712	0	0,039	0,043	0,017	0,028	0,026	0,027	-0,020
713	0	0,039	0,043	0,017	0,028	0,026	0,027	-0,020
714	0	0,038	0,043	0,016	0,028	0,025	0,026	-0,020
715	0	0,039	0,043	0,017	0,028	0,025	0,026	-0,020
716	0	0,039	0,043	0,017	0,028	0,025	0,026	-0,020
717	0	0,039	0,043	0,017	0,028	0,026	0,026	-0,020
718	0	0,039	0,043	0,017	0,028	0,026	0,026	-0,020
719	0	0,038	0,043	0,017	0,028	0,025	0,026	-0,020
720	0	0,039	0,043	0,017	0,028	0,025	0,026	-0,020
721	0	0,038	0,043	0,017	0,028	0,025	0,026	-0,020
722	0	0,039	0,043	0,017	0,028	0,025	0,026	-0,020
723	0	0,039	0,043	0,017	0,028	0,025	0,026	-0,020
724	0	0,039	0,043	0,017	0,028	0,025	0,026	-0,020
725	0	0,038	0,042	0,017	0,028	0,025	0,026	-0,020
726	0	0,038	0,042	0,017	0,028	0,025	0,026	-0,020
727	0	0,038	0,042	0,017	0,028	0,025	0,026	-0,020
728	0	0,038	0,042	0,017	0,028	0,025	0,026	-0,020
729	0	0,038	0,042	0,017	0,028	0,025	0,026	-0,020
730	0	0,038	0,042	0,017	0,028	0,025	0,026	-0,020
731	0	0,038	0,041	0,016	0,027	0,025	0,025	-0,020
732	0	0,038	0,042	0,016	0,027	0,025	0,025	-0,020
733	0	0,038	0,042	0,017	0,028	0,025	0,025	-0,019

---

<b>734</b>	0	0,037	0,041	0,016	0,027	0,024	0,025	-0,020
<b>735</b>	0	0,038	0,041	0,016	0,027	0,025	0,025	-0,020
<b>736</b>	0	0,038	0,041	0,016	0,027	0,024	0,025	-0,019
<b>737</b>	0	0,038	0,041	0,016	0,027	0,024	0,025	-0,019
<b>738</b>	0	0,038	0,041	0,016	0,027	0,025	0,025	-0,019
<b>739</b>	0	0,038	0,041	0,016	0,027	0,024	0,025	-0,019
<b>740</b>	0	0,037	0,041	0,016	0,027	0,024	0,024	-0,019
<b>741</b>	0	0,038	0,041	0,016	0,027	0,024	0,025	-0,019
<b>742</b>	0	0,038	0,041	0,016	0,027	0,024	0,025	-0,019
<b>743</b>	0	0,038	0,041	0,016	0,027	0,024	0,025	-0,019
<b>744</b>	0	0,038	0,041	0,016	0,027	0,024	0,025	-0,019
<b>745</b>	0	0,038	0,041	0,016	0,027	0,024	0,025	-0,019
<b>746</b>	0	0,038	0,041	0,016	0,027	0,024	0,024	-0,019
<b>747</b>	0	0,038	0,041	0,016	0,027	0,024	0,024	-0,019
<b>748</b>	0	0,038	0,041	0,016	0,027	0,024	0,024	-0,019
<b>749</b>	0	0,038	0,041	0,016	0,027	0,024	0,024	-0,019
<b>750</b>	0	0,037	0,040	0,016	0,026	0,023	0,024	-0,019

---

Ek 2. Belirli ortam koşulları için YSA tarafından tahmin edilen absorbands değerleri

T ( )	devir/dak	Işıklı ortam	Işıksız ortam
		Absorbans	
27	0	-0,014	0,001
27	50	0,090	0,127
27	100	0,233	0,295
27	150	1,317	1,328
27	200	1,062	1,137
27	250	1,041	1,128
27,5	0	0,078	0,086
27,5	50	0,215	0,247
27,5	100	0,381	0,433
27,5	150	1,534	1,533
27,5	200	1,227	1,283
27,5	250	1,225	1,286
28	0	0,174	0,168
28	50	0,341	0,354
28	100	0,523	0,549
28	150	1,721	1,689
28	200	1,356	1,378
28	250	1,361	1,383
28,5	0	0,251	0,226
28,5	50	0,437	0,421
28,5	100	0,623	0,610
28,5	150	1,842	1,767
28,5	200	1,417	1,396
28,5	250	1,424	1,403
29	0	0,288	0,249
29	50	0,473	0,432
29	100	0,649	0,602
29	150	1,874	1,760
29	200	1,389	1,333
29	250	1,401	1,345
29,5	0	0,282	0,241
29,5	50	0,447	0,395
29,5	100	0,600	0,536
29,5	150	1,820	1,686
29,5	200	1,275	1,203
29,5	250	1,297	1,222
30	0	0,254	0,220
30	50	0,385	0,337
30	100	0,508	0,447
30	150	1,714	1,581
30	200	1,105	1,039
30	250	1,139	1,066

---

30,5	0	0,229	0,201
30,5	50	0,323	0,283
30,5	100	0,414	0,363
30,5	150	1,600	1,479
30,5	200	0,925	0,876
30,5	250	0,973	0,914
31	0	0,216	0,189
31	50	0,278	0,243
31	100	0,345	0,301
31	150	1,507	1,396
31	200	0,769	0,736
31	250	0,836	0,790
31,5	0	0,213	0,184
31,5	50	0,253	0,218
31,5	100	0,304	0,261
31,5	150	1,439	1,335
31,5	200	0,646	0,622
31,5	250	0,741	0,701
32	0	0,217	0,183
32	50	0,241	0,204
32	100	0,284	0,239
32	150	1,388	1,287
32	200	0,554	0,531
32	250	0,680	0,643
32,5	0	0,222	0,183
32,5	50	0,237	0,196
32,5	100	0,277	0,229
32,5	150	1,346	1,246
32,5	200	0,485	0,460
32,5	250	0,641	0,604
33	0	0,226	0,184
33	50	0,235	0,192
33	100	0,278	0,226
33	150	1,305	1,206
33	200	0,435	0,405
33	250	0,614	0,576
33,5	0	0,228	0,185
33,5	50	0,234	0,190
33,5	100	0,283	0,229
33,5	150	1,261	1,165
33,5	200	0,400	0,364
33,5	250	0,589	0,553
34	0	0,228	0,185
34	50	0,232	0,188
34	100	0,291	0,235
34	150	1,214	1,121

---

---

34	200	0,374	0,335
34	250	0,562	0,528
34,5	0	0,225	0,183
34,5	50	0,228	0,185
34,5	100	0,300	0,242
34,5	150	1,162	1,072
34,5	200	0,355	0,314
34,5	250	0,528	0,499
35	0	0,217	0,178
35	50	0,221	0,180
35	100	0,309	0,251
35	150	1,104	1,020
35	200	0,339	0,297
35	250	0,488	0,463
35,5	0	0,201	0,168
35,5	50	0,207	0,171
35,5	100	0,316	0,259
35,5	150	1,041	0,963
35,5	200	0,322	0,282
35,5	250	0,441	0,419
36	0	0,173	0,149
36	50	0,182	0,154
36	100	0,317	0,264
36	150	0,968	0,899
36	200	0,300	0,264
36	250	0,390	0,370
36,5	0	0,126	0,115
36,5	50	0,140	0,123
36,5	100	0,307	0,261
36,5	150	0,882	0,824
36,5	200	0,269	0,239
36,5	250	0,333	0,317
37	0	0,049	0,054
37	50	0,072	0,069
37	100	0,279	0,240
37	150	0,776	0,731
37	200	0,218	0,198
37	250	0,267	0,254

---



## ÖZGEÇMİŞ

08.12.1979 tarihinde Kırklareli'nin Pınarhisar İlçesi'nde doğdum. İlköğrenimimi Pınarhisar İlçesinde, ortaokul ve lise öğrenimimi Çorlu Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 1997-2001 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde lisans eğitimi aldım.

Edindiğim temel mühendislik bilgi ve becerilerine, işletmecilik bilgi ve becerilerini eklemek ve böylece mesleğimi daha etkin bir şekilde icra edebilmek için İstanbul Üniversitesi İşletme Fakültesi İşletme İktisadi Enstitüsü Uluslararası İşletmecilik İhtisas Programı'na başvurduğum ve eğitim dili İngilizce olan bir yıl süreli programı, dönem ikincisi olarak tamamlayarak 06.07.2002 tarihinde Uluslararası İşletmecilik İhtisas Programı'ndan mezun oldum.

17.06.2003 tarihinde, Marmarabirlik Genel Müdürlüğü'nün açmış olduğu sınavı kazanarak Müfettiş Yardımcısı olarak göreve başladım. Sanayi ve Ticaret Bakanlığı onayı ile Marmarabirlik'e bağlı üç kooperatifte Bakanlık kontrolörleri refakatinde Genel Denetim çalışmalarında yer aldım. Bununla birlikte Marmarabirlik Teftiş Kurulu bünyesinde ilgili Kooperatiflerde inceleme ve denetim işlerini gerçekleştirdim.

19.11.2004 tarihinde Tarım ve Köylüleri Bakanlığı Kırklareli İl Müdürlüğü'nde gıda mühendisi olarak göreve başladım. 24.01.2005-04.09.2007 tarihleri arasında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde 04.09.2007-26.04.2011 tarihleri arasında ise Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yaptım.

2003-2006 yılları arasında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Eğitimi tamamladım. 2006 yılında Namık Kemal Üniversitesi'nde Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda doktora programına başladım. 26.04.2011 tarihinde Namık Kemal Üniversitesi bünyesinde Ziraat Fakültesi'ne Araştırma Görevlisi olarak atandım ve halen aynı kurumda görev yapmaktayım.

Serap DURAKLI VELİOĞLU