

FARKLI KAYNAKLARDAN DOĞAL RENK MADDESİ ÜRETEN MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU, TANISI VE ELDE EDİLEN PİGMENTLERİN KARAKTERİZASYONU

Tuba Büyüksirit*, Hakan Kuleaşan²

¹Hitit Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Çorum

²Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta

Geliş tarihi / Received: 17.12.2012

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 10.03.2013

Kabul tarihi / Accepted: 08.04.2013

Özet

Bu çalışmada çeşitli kaynaklardan renk maddesi üreten mikroorganizmalar izole edilmiş ve uygun çözücüler kullanılarak renk maddeleri ortamdan ayrılmıştır. Çözünen renk maddeleri saflaştırılmış ve elde edilen renk maddelerine stabilizasyon testleri yapılmıştır. Işık ortamında bekletilen renk maddeleri ve buzdolabında bekletilen paralellerinde gözle görülür renk değişiminin olmadığı ve ışık karşısında stabil oldukları belirlenmiştir. Optimum pH değerlerinin K1, K2 için 7, B ve T22 için 6, K3 için ise 5 olarak tespit edilmiştir. Pigmentlerin kimyasal yapılarının belirlenmesi amacıyla ışık spektroskopisinde ve FT-IR spektroskopisinde spektrum analizleri yapılmıştır. Pigment üreten maya ve bakterilerin tanımlanması amacıyla 18S ve 16S ribozomal DNA dizi analizi kullanılmıştır. Tanımlamalar sonucunda izolatların *Rhodotorula glutinis* (kavuniçi renk maddesi), *Sporobolomyces roseus* (pembe renk maddesi), *Cellulosimicrobium funkei* (sarı renk maddesi), ve *Dietzia natronolimnaea* (kırmızı-turuncu renk maddesi) oldukları belirlenmiştir. Sarı renk maddesi üreten ve Gram pozitif bir bakteri olduğu belirlenen K2 örneğinin ise tanımlanması yapılamamıştır. Çalışmanın son aşamasında ise renk maddeleri model gıda olarak seçilen dondurmaya uygulanarak pigmentlerin bu ortamdaki stabilizasyonları incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: Mikrobiyel renk maddesi, çözücü, stabilizasyon testi, mikroorganizma.

ISOLATION OF NATURAL PIGMENT PRODUCING MICROORGANISMS FROM DIFFERENT SOURCES AND CHARACTERIZATION OF THEIR PIGMENTS

Abstract

In this study, pigment producing microorganisms were isolated and the coloring compounds were separated by using suitable solvents. Then pigments were purified and some stabilization tests were applied for each pigment. Stability of coloring compounds kept under refrigerated and under room conditions were compared. It was determined that the pigments were stable in both conditions. Optimum pH values were found as 7 for K1 and K2, 6 for B and T22, and 5 for K3. Light and FT-IR spectroscopy techniques were applied for the determination of their chemical structures. Identification of pigmented microorganisms done by 16S and 18S ribosomal DNA sequencing analysis. According to the results, isolates were *Rhodotorula glutinis* (orange colored) *Sporobolomyces roseus* (pink colored), *Cellulosimicrobium funkei* (yellow colored) and *Dietzia natronolimnaea* (red-orange colored). The identification of yellow pigment producing K2 bacterial strain could not be achieved. Finally, stability of the pigments was determined in ice-cream selected as a model food.

Keywords: Pigment, solvent, stabilization test, microorganisms

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ tubabuyuksirit@hitit.edu.tr,

☎ (+90)364 227 4533,

☎ (+90) 364 227 4535

GİRİŞ

Bir gıdanın rengi insanların ilk olarak önem verdiği temel bir gıda özelliğidir. Gıda maddesinin rengi, insan üzerinde olumlu veya olumsuz etki yaratabilir. Bundan dolayı gıda ürünlerinin doğal rengini korumak ve hatta bazen düzeltmek amacıyla renk maddeleri kullanılabilir (1).

Gıdalarda renk maddelerinin kullanılması M.Ö. 400 yıllarına kadar uzanmaktadır. O zamandan bu yana yapay boyalar renk tonu ve stabilitelelerinin yanı sıra kolay kullanılabilirliği ve düşük maliyeti nedeniyle doğal olanlara göre daha yaygın kullanılmaktadırlar (2). Ancak sonraki yıllarda yapılan toksikolojik araştırmalarda, yapay renklendiricilerin sağlık üzerindeki olumsuz etkilerinin ortaya konması nedeniyle gıdaların renklendirilmesinde doğal renk maddeleri daha fazla kullanılmaya başlanmıştır (3, 4). Doğal renk maddelerinin büyük çoğunluğu organik kökenli (bitkiler, hayvanlar veya mikroorganizmalar tarafından sentezlenen) renk maddeleridir (5). Bu renk maddeleri kimyasal yapıları, elde edilmiş kaynakları, kullanış özellikleri gibi birçok kimyasal ve fiziksel faktörler ile birbirlerinden ayrılmaktadır (6). Gıdalarda renk maddeleri, tüketici beğenisi kazanmak, doğal rengi kuvvetlendirmek, işlem sırasında kaybolan rengi kazandırmak veya renksiz olan bir ürünü renklendirmek amacıyla gıdalarda kullanılabilir (7). Rengin lezzet üzerindeki etkisinin gösterilmesinde yumurtalı keklerle yapılan bir çalışmada, aynı bileşimde ve aynı yöntemle yapılan dört farklı kek örneğine değişik niceliklerde yapay yumurta boyası katıldığında eğitilmiş panelistler sarısı daha fazla olan iki kekin lezzetini yeğlemişlerdir (8).

İnsanların yoğun bir şekilde tükettikleri gıda, kozmetik, ilaç ve boya üretiminde yaygın olarak kullanılan bazı yapay renk maddelerinin zararlı etkilerinin olabileceği, dünya çapında insanları doğal kaynaklardan pigment üretimine yönlendirmiştir (9). Doğal kaynaklardan elde edilen karmin (böcekler), annatto, curcuma (bitkilerden) veya Monascus (küfden) gibi pigmentlerin daha fazla üretilmesi amacıyla geleneksel teknolojilere olan ilgi artmıştır (10). Mikrobiyel pigmentler, hiçbir mevsimsel üretim sorunu göstermediğinden ve yüksek verimlilik sağlamaları nedeniyle bitki veya hayvanlardan

elde edilen doğal renk maddelerine umut verici bir alternatiftir (9-11).

Doğada birçok bakteri, alg, küf ve mayanın yapısında β -karoten ve türevleri sentezlenmektedir. Biyoteknolojik olarak en yaygın çalışmalar *Phycomyces blakeleeanus* (Mucoraceae) ve *Blakesleea trispora* (Choanopheraceae) algleri üzerinde yapılmıştır. Bunun yanında *Mucor mucedo*, *Ustilago violaceae*, *Neurospora crassa*, *Fusarium aquaeductum*, *Choanophora cucurbitarum* küfleri, Rhodotorula mayaları, *Dunalinella salina* ve *Dunalinella bardawill* mikroalglerinin de β -karoten sentezlediği belirtilmiştir (12). Mavi-yeşil algler tarafından üretilen en yaygın karotenoidler β -karoten, ekinenon, zeaksantin ve kantaksantin olarak belirlenmiştir (6). Son yıllarda *Staphylococcus aureus* tarafından sentezlenen altın renginde stafiloksantin, *Pseudomonas* spp. tarafından sentezlenen mavi-yeşil fikosiyanın, *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus* spp. tarafından sentezlenen koyu kahverengi pigmentler üretilmiştir (13). Yapılan bir diğer çalışmada, 27 °C ve 37 °C 'lerde üretilen *Coriolus versicolor*, *Paecilomyces canadensis* ve *Streptomyces werraensis* suşlarının sıcaklığa bağlı olarak farklı renkte pigment sentezledikleri belirlenmiştir (14). Benzer şekilde *Monascus* cinsi küflerin kendilerine özgü ve gıdalarda kullanılabilir kırmızı renkli azafilonlar olarak adlandırılan pigmentleri ürettikleri belirlenmiştir (15). *Monascus purpureus* küfünün kullanıldığı ve katı besin ortamında yapılan renk maddesi üretiminde ağaç kavunu (*Artocarpus heterophyllus*) tohumu besin maddesi olarak kullanılmıştır (16).

Bu araştırmada çeşitli materyallerden ekim yapılmış ve doğal ortamlardan renkli mikroorganizmalar izole edilmiştir. Gelişen pigmentli mikroorganizmalar büyük hacimde üretilmiştir. Renk maddeleri çözücülerle mikroorganizmalardan ayrılmış ve saflaştırılmıştır. Sade dondurmaya ilave edilerek renk değişimi ortaya konan renk maddelerine ısı ve ışık uygulayarak, pH değişikliği yapılarak renk ölçümleri yapılmıştır ve stabilite testleri uygulanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Bu araştırmada kullanılan pigment üretme özelliğine sahip mikroorganizmalar yılın farklı zamanlarında

meyve, sebze, süt ürünleri, toprak, çiçek, ağaç yaprağı ve kabuk gibi doğal ortamlardan izole edilmiştir. Bu amaçla doğadan toplanan izolasyon kaynağı materyaller 25 mL FTS içerisine konularak çalkalanmış ve materyal üzerinde bulunan mikroorganizmaların sıvıya geçmesi sağlanmıştır. Bu işlemin ardından suspansiyondan 0.1 mL hacminde sıvı alınarak pH 3.5 Malt Ekstrakt Agar (MEA, Merck, Almanya) ve Plate Count Agar (PCA, Merck, Almanya) besiyerlerine yayma yöntemi ile ekimleri yapılmıştır. MEA petripleri 25 °C'de 5 gün, PCA petripleri ise 30 °C'de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sürecinin ardından oluşan kolonilerden renkli olanları seçilmiştir. Bu amaçla pigmentli koloni oluşturan suşlar öze yardımıyla alınarak tekrar MEA ve PCA besiyerleri üzerine tek koloni düşürme tekniğiyle ekilmiş ve saf kültürlerin elde edilmesi sağlanmıştır. Katı besiyerinde gelişen mikroorganizmalar 8 mL hacminde sıvı besiyerine alınmışlardır. K1 ve B kodlu izolatlar Malt Ekstrakt Broth, K2, K3 ve T22 kodlu örnekleri ise Triptik Soya Broth (CASO, Merck, Almanya) besiyerinde üretilmiştir. Kültürler daha büyük miktarlarda renk maddesi elde edilmesi amacıyla önceden belirlenen besiyerlerinde 800 mL hacminde üretilmişlerdir. Uygulanan katalaz testi sonucunda aerobik oldukları belirlendiğinden büyük hacimli üretimde mikroorganizmalara hem yeterli oksijen sağlanması hemde çökmelerinin önlenmesi amacıyla besiyeri ortamına hava pompası yardımıyla 0.45 µm filtreden geçirilen hava verilmiştir. Büyük hacimli üretimlerde yeterli hücre sayısına ulaşılabilmesi amacıyla inkübasyon süresi 7 güne uzatılmıştır.

Yapılan ön santrifüj işlemi sonrasında besiyerinin renksizleştiği ve renkli hücrelerin dibe çöktüğü dolayısıyla çalışmadaki pigmentlerin hücre dışına salınmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle kullanılmış besiyerinin pigmentli hücre kitlesinden ayrılması amacıyla 3500 devir/dk hızda 10 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Hücrelerin hücre zarı yapılarının farklılık gösterebileceği ve ürettikleri pigmentlerin farklı çözünme özelliğine sahip olabilecekleri düşünüldüğünden yapılan ön denemelerde farklı çözücüler kullanılmıştır. Kullanılan çözücüler sırasıyla saf su, metanol, etanol, hekzan, aseton, dietil eter, ve diklorometan: etilasetat (9:1 v/v) karışımıdır. Ekstraksiyon işleminde 7 adet 50 mL'lik santrifüj tüplerine alınan hücre kitleleri üzerine her bir çözücülerden 40 mL

konulmuş ve tüp içeriği 10000 d/d hızda homojenize (PRO Scientific, ABD) edilmiştir. Homojenizasyon işleminin ardından tüpler buzdolabı sıcaklığında (+4 °C) bekletilmiştir. 2 gün arayla çözeltiyeye geçen renk maddesi alınmış, kalan hücre kitlesi üzerine tekrar çözücü eklenmiştir. Ekstraksiyon işlemi dipte kalan hücre kitlesinin renksizleşip, oluşturduğu pigmentin tamamı çözücüye geçtiğinde sonlandırılmıştır. Çözücünün uzaklaştırılması amacıyla pigment içeren çözücü çeker ocak altında uçurulmuş ve toz halde pigment elde edilmiştir.

Toz halde elde edilmiş olan renk maddelerinin farklı ortam koşullarındaki stabiliteyi tespit edilmiştir. Çalışmada elde edilen renk maddelerinin gıdalarda kullanımı düşünüldüğünden bu aşamada örneklerin suda çözümleri sağlanmıştır. Bu amaçla toz haldeki renk maddesi 40 mL suya katılmış ve çözümleri veya suspansiyon oluşturmaları sağlanmıştır. Çözünürlüğü arttırmak için suda çözümleri zor olan B ve K1 örneklerinin bulunduğu çözelti içerisine 0.1 g EDTA (etilendiamin-tetraasetikasit), 0.1 g safra tuzu (Merck, Almanya) ve 0.2 mL Tween-20 ilave edilerek çözümleri sağlanmıştır. Renk maddeleri farklı pH, sıcaklık ve ışık ortamlarına maruz bırakılarak bu koşullardaki stabiliteyi belirlenmiştir.

Renk maddelerinin farklı pH derecelerindeki stabiliteyi tespiti amacıyla suda çözünen renk maddelerinden her birinde 5 mL olacak şekilde tüplere aktarılmıştır. Her tüp 0.1 N NaOH veya 0.1 N HCl kullanılarak 3 ila 9 arasında farklı pH derecelerine ayarlanmıştır. Farklı pH'larda olan tüplerdeki renk maddeleri renk ölçer cihazı (Minolta CR-400, Japonya) ile sahip oldukları renk değerleri Hunter Lab değerlendirme sistemine göre tespit edilmiştir. Yapılan tüm renk ölçümleri üçerli paraleller şeklinde yapılmış ve değerlerin ortalaması alınmıştır. Elde edilen L, a ve b değerleri kullanılarak renklerin insan gözü ile görülen şekliyle ifade edilmesini kolaylaştıran H° açılı (Renk tonu-Hue angle) hesaplanmıştır. Son olarak farklı pH koşullarında yapılan renk ölçümlerinin aralarındaki farklar;

$$\Delta E = [(L_1 - L_2)^2 + (a_1 - a_2)^2 + (b_1 - b_2)^2]^{1/2}$$

formülü kullanılarak hesaplanmıştır (17,18).

Renk maddelerinin sıcaklığa karşı stabiliteyi tespiti edilmesi amacıyla renk ölçümleri tamamlanan

tüpler otaklavda, 110 °C'de 10 dakikalık ısıtma işlemi tabii tutulmuşlardır. Ardından oluşan renk ısıtma işlemi görmemiş renk ile kıyaslanmış ve renk maddelerinin ısıtma işlemi ile çökelti oluşturup oluşturmadıkları gözlenmiştir. Renk maddelerinin ışık ortamındaki stabilite test edilmesinde tüplere dağıtılan renk maddesi çözeltileri direk güneş ışığına maruz kalmaksızın ışıklı bir ortamda (laboratuvar koşullarında) gündüz ve gece döngüsü ile 7 gün bekletilerek renklerdeki değişim buzdolabında bekletilen örneklerle karşılaştırılmıştır.

Renk maddelerinin kimyasal yapılarının ortaya konması ve tanımlanması amacıyla görünür ve mor ötesi ışık spektrumları ile kızılötesi dalga boylarındaki absorban spektrumları elde edilmiştir. Bu amaçla UV-Görünür ışık spektrofotometresi (Shimadzu-UV-1601) ile Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektrofotometre (FTIR, Perkin Elmer Spektrum 100, ABD) kullanılmıştır. Spektrofotometrik ölçümlerde içerisinde % 1 (w/v) renk maddesi içerecek şekilde hazırlanan çözeltilerin 1100 nm ile 190 nm dalga boyları arasındaki bölgede gösterdikleri absorban değerleri belirlenmiştir. Elde edilen absorban verileri uluslararası bir veri tabanındaki referans (19) değerlerle karşılaştırılarak renk maddelerinin tanımlanmasına çalışılmıştır. Aynı şekilde kızılötesi spektrofotometre kullanılarak renk maddelerinin 4000 ila 400 cm⁻¹ dalga boyları arasında 16 kez tarama yapılarak absorpsiyon spektrumları tespit edilmiştir. Renk maddeleri sıvı formda yatay ZnSe pencere ATR aparatı kullanılmak suretiyle analize alınmıştır. FTIR spektrumları uluslararası bir veri bankasında (20) bulunan referans spektrumlarla karşılaştırılmıştır. Her renk maddesi için spektrofotometrik analizler tekrar edilmiştir.

Elde edilen izolatların tür düzeyinde tanımlamaları Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Teknokenti bünyesinde faaliyet gösteren REFGEN şirketinde (Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti.) mayalarda 18S ribozomal DNA gen bölgesi dizi analizi, bakterilerde ise 16S ribozomal DNA gen bölgesi dizi analizi ile yapılmıştır.

Renk maddelerinin herhangi bir gıdaya uygulandığındaki renk stabilite testlerinin belirlenmesi amacıyla model gıda olarak ticari bir markaya ait sade dondurma seçilmiştir. Model olarak sade dondurmanın tercih edilmesinin başlıca sebepleri

renk maddesinin kolay uygulanabilir olması, ilave rengi açık bir şekilde göstermesi ve saklama koşullarının uygunluğudur. Bu amaçla 25 g yumuşak formda sade dondurma içerisine 5 mL suda çözülmüş 0.1 g renk maddesi ilave edilerek homojenize edilmiştir. Homojenizasyon işleminin ardından örnekler tekrar dondurularak -18 °C sıcaklıkta 3 ay bekletilmiş ve başlangıçtaki renkleri ile olan farklılıklar gözlenmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Mikroorganizmaların İzolasyon Kaynakları ve Tanımlanması

Çalışmada izole edilen mikroorganizmalardan K1 ve B izolatları sırasıyla Konya ve Isparta illerinden alınan toprak örneklerinden, K2 izolatu kaşar peynirinden, K3 ve T22 izolatları ise pastörize peyniraltı suyundan izole edilmiştir. İzolatlara ait koloni morfolojisi ve mikroskop görüntülerinin incelenmesi ile şekil ve büyüklüklerine göre K1 ve B örneklerinin maya, K2, K3 ve T22 örneklerinin ise bakteri oldukları belirlenmiştir. Ön tanımların ardından DNA dizi analizi sonuçlarına göre izolatlar *Rhodotorula glutinis* (kavuniçi, BLAST No:KC574082), *Sporobolomyces roseus* (pembe, BLAST No:KC574083), *Cellulosimicrobium funkei* (sarı, BLAST No:KC574084) ve *Dietzia natronolimnaea* (kırmızı, BLAST No:KC574085) olarak tanımlanmışlardır. K2 örneği (sarı) ise hem sıvı ortamdan hem de katı besiyerinden alınmak suretiyle iki kez analiz edilmiş ancak uygun primer bulunmadığından tür düzeyinde tanımlaması yapılamamıştır.

Renk Maddelerinin Üretimi ve Saflaştırılması

Yapılan küçük hacimli denemelerde her bir renk maddesi için en uygun çözücü belirlenmiş ve büyük hacimli renk maddesi üretiminde seçilen çözücü kullanılmıştır. Ekstraksiyon işleminde en uygun çözümlerin T22 izolatu için su, K1 izolatu için metanol, B ve K3 mikroorganizmaları için metanol/ diklorometan+etil asetat karışımı, K2 mikroorganizması tarafından üretilen renk maddesi için ise etanol ve metanol karışımı olduğu belirlenmiştir. Santrifüjleme işlemiyle hücre kitlesi atık besiyerinden ayrılmış ve ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Renk maddelerinin çözünmesinde kullanılan çözücü veya çözücü karışımlarının polarite özelliklerinin belirleyici olduğu sonucuna

Farklı Kaynaklardan Doğal Renk Maddesi Üreten...

varılmıştır. T22 izolatına ait renk maddesinin suda kolay çözünmesinden ve suyun dipol yapısının bilinmesinden dolayı polar bir yapıda olduğu belirlenmiştir. Polar olmayan maddelerin suda çözünmediği sadece su molekülleri tarafından çevrelendiği bildirilmektedir (21). Renk maddesi üreten bazı hücrelerin ürettiği pigmenti hücre dışına kolay verdiği bazıları ise

çözünme için daha uzun sürelere ihtiyaç gösterdiği belirlenmiştir. Bunun temel sebebi olarak hücre zarı veya hücre duvarı yapılarındaki farklılık olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bazı izolatlarda uygulanan çözücü miktarının yetersiz kalmasından dolayı belli bir süre renk maddesi geçişi sağlandıktan sonra süzülerek tekrar çözücü ilavesi yapılarak ekstraksiyon sağlanabilmektedir.

Çizelge 1. Renk maddelerinin farklı pH değerlerindeki renk ölçümlerinin karşılaştırılması
Table 1. Comparison of measurements of the color pigments at different pH values

	L	a	B	Hue (RAD)	Hue°	Optimum pH'daki renk ile toplam renk arasındaki farklar Differences between optimum pH color and total color (ΔE)
pH	B					
3.5	32.43±0.48	7.36±0.23	6.82±0.03	0.747	43	5.175
4.5	29.66±1.25	9.09±0.37	7.08±0.21	0.662	38	1.897
5.5	29.69±1.22	9.33±0.12	7.45±0.18	0.674	39	1.741
6	32.42±1.73	4.60±0.19	2.44±0.13	0.487	28*	0.000
7	31.44±1.23	4.59±0.17	3.09±0.07	0.593	34	0.699
8.5	30.82±1.77	4.46±0.12	3.26±0.19	0.631	36	0.316
K1						
5	27.39±0.35	4.46±0.10	5.31±0.06	0.872	50	1.008
6	27.06±0.20	4.28±0.16	5.85±0.10	0.939	54	0.352
7	28.16±0.34	4.47±0.13	5.96±0.06	0.928	53*	0.000
8	27.21±0.93	4.13±0.13	6.05±0.03	0.972	56	0.182
9	28.24±0.16	3.82±0.18	5.85±0.13	0.993	57	0.187
K2						
3.5	30.10±2.13	0.60±0.10	6.48±0.08	1.478	85	3.563
4.5	30.60±1.16	0.75±0.02	7.42±0.06	1.471	84	2.485
5	30.12±1.00	0.84±0.06	7.14±0.10	1.454	83	2.861
6	33.03±0.43	0.51±0.14	9.32±0.17	1.516	87	0.837
7*	32.07±2.50	0.45±0.05	9.44±0.47	1.523	87*	0.000
8	33.45±1.75	0.74±0.05	9.57±0.03	1.494	86	0.999
9	33.97±1.60	0.87±0.23	10.49±0.28	1.488	85	2.021
K3						
3	27.35±0.09	6.73±0.11	5.84±0.07	0.714	41	2.276
3.5	27.59±0.22	7.76±0.29	6.68±0.28	0.711	41	0.927
4	28.28±0.29	8.78±0.25	7.21±0.23	0.687	39	0.357
5	27.33±0.72	8.77±0.90	6.85±0.59	0.663	38*	0.000
5.5	28.04±0.36	10.12±0.34	7.31±0.40	0.626	36	1.479
6.5	26.24±0.70	9.08±0.64	5.34±0.48	0.531	30	0.373
7	28.05±0.19	10.80±0.15	6.51±0.08	0.543	31	1.908
9	28.37±1.13	12.18±0.56	7.66±0.47	0.561	32	3.552
T22						
3	31.06±0.18	0.66±0.04	4.87±0.42	1.436	82	3.003
4	31.61±0.48	0.84±0.06	5.31±0.25	1.414	81	2.281
5	34.33±0.77	1.27±0.05	7.90±0.11	1.411	81	4.497
6	32.87±0.58	1.17±0.06	7.22±0.17	1.410	81*	0.000
7	34.46±0.12	1.08±0.02	7.35±0.62	1.424	82	1.494
8	32.42±0.23	0.64±0.05	6.43±0.04	1.472	84	0.940
9	34.94±0.17	1.19±0.08	8.81±0.11	1.436	82	2.545

* işaretli renk değerleri en iyi rengin gözlemlendiği pH'daki Hue değerini göstermektedir.

* marked numbers shows the value of Hue observed pH in the best color

Renk Maddelerinin Farklı pH, Işık ve Isıl Stabiliteilerinin Belirlenmesi

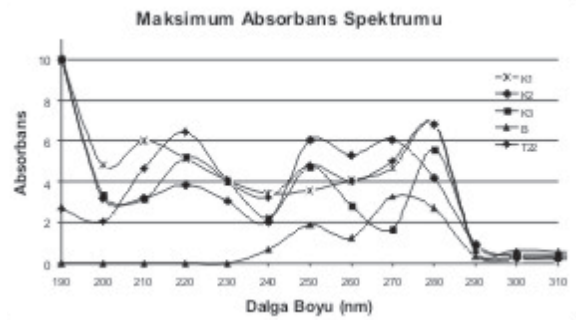
Renk maddelerinin farklı pH aralıklarındaki stabiliteileri belirlenmiştir. pH stabiliteileri ile ilgili elde edilen sonuçlar Çizelge 1'de sunulmuştur. Renk maddelerinin optimum pH değerinde verdiği toplam renk değeri ile ölçüm yapılan pH'daki toplam renk değerlerinin farkları (ΔE) alınmıştır. K1 renk maddesinde çok geniş pH aralığında renk değişimi gözlenmemiş ve herhangi bir çökme olmamıştır. Farklı pH'lardaki renk değerleri ile olan renk farklılıklarının (ΔE) düşük olması da buna paralel bir sonuçtur. B renk maddesinin doğal yapısındaki pH değeri 5.5'dir. Çözeltinin pH değeri 6 olduğunda ise renk maddesi daha iyi çözülmüş ancak renk bir miktar değişim göstermiştir. pH 5 in altındaki değerlerde ise koyu kırmızı renk gözlenmiş ancak renk maddesi partiküller halinde toplanarak çözünürlük özelliğini kaybederek dibe çökmüştür. Bu nedenle bu renk maddesinin protein yapısında veya peptid yapıları içeren bir yapıda olduğu düşünülmektedir. Daha sonra yapılan analizlerde de bu bulguyu doğrulayan sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan çalışmalarda fotosentetik bazı bakteri türlerinde pigment-protein komplekslerinin bulunduğu kanıtlanmış (22,23) ancak benzer yapıları fotosentetik olmayan bakterilerde gösteren literatür bulunamamıştır. K2 renk maddesinin en iyi çözünürlük ve renk özelliklerini pH 7'de gösterdiği belirlenmiştir. Parlak sarı renkte olan K2 renk maddesinde pH değeri arttıkça, yani ortam bazikleştikçe rengin koyulaşması ile pH 9'a kadar çıkartılmıştır ve yüksek pH'da çökme olmamıştır. Bu durum K2 renk maddesinin izoelektrik noktasının protein yapısındaki moleküllerden çok farklı olduğunu ve izoelektrik noktaya bağımlı olmadan çözünebildiğini göstermiştir. K3 renk maddesi için rengin iyi korunduğu pH aralığı 4-5.5 olarak belirlenmiştir. K3 renk maddesi 3.5'in altında ve 7'nin üzerindeki pH derecelerinde çökme eğilimi göstermiştir. T22 renk maddesi için optimum pH değerinin 7 olduğu tespit edilmiştir. Bu renk maddesi dar bir pH aralığında (6.5-7.5) çökme eğilimi göstermeksizin stabilitesini korumuştur. Ancak bu aralıktan daha asidik veya bazik pH'larda partiküller oluşturarak topaklanma (veya çökme) eğilimi gözlenmiştir.

Elde edilen renk maddelerinin ışık ortamlarında ve ısı işlem karşısındaki stabiliteilerinin belirlenmesinde en iyi renk özelliklerini göstermiş oldukları pH

aralığı tercih edilmiştir. Işık ortamında bekletilen renk maddeleri ve buzdolabında bekletilen paralellerinde gözle görülür renk değişiminin olmadığı ve ışık karşısında stabil oldukları belirlenmiştir. Isıl işlem uygulaması sonrasında K1, K2, K3 ve T22 renk maddeleri stabiliteilerini korurlarken, B renk maddesinde çökme olmuş ve çözelti rengini kaybetmiştir.

Spektrofotometrik Spektrumların Belirlenmesi

Çözelti halinde hazırlanan her renk maddesi için 190 ile 1100 nm dalga boylarında absorpsiyon taraması yapılmış (24) ve renk maddelerinin 190 ila 290 nm dalga boylarında yüksek absorpsanslar verdiği belirlenmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda kinon moleküllerinde özellikle 280 nm dalga boylarından başlayarak 300 nm dalga boylarına kadar olan bölgelerde yüksek absorpsans noktalarının olduğu tespit edilmiştir (25). Şekil 1'de görüldüğü üzere çalışma kapsamında incelenen örneklerin saf pigment maddesi olmadığı ve bazı proteinlerin de özellikle de kısa polipeptid yapısında olanların spektrumu etkilediği düşünülmektedir. Spektrofotometrik analizlerde ortamda farklı maddelerin bulunması durumunda analizin nispeten duyarsız olabildiği ve 280 nm'de absorpsiyon veren çeşitli maddelerin girişim etkilerine açık olduğu belirtilmektedir. (26).

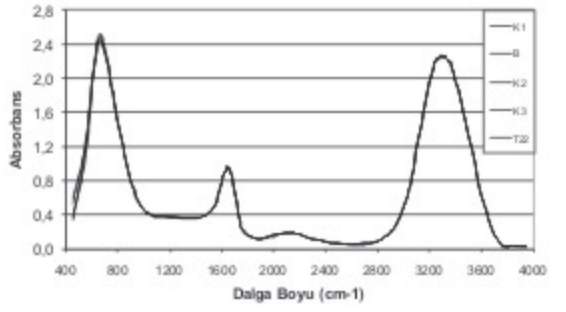


Şekil 1. Renk maddelerinin spektrumlarının karşılaştırılması
Figure 1. Comparison of spectra of pigments

Renk Maddelerinin FTIR Spektroskopisi ile Değerlendirilmesi

Bu çalışmada da olduğu gibi sıvı bileşenler için ZnSe katı ortamında (27) FTIR analizi yapılmıştır ve elde edilen spektrumlar birbirleriyle karşılaştırılmıştır (Şekil 2.). 1600-1700 cm^{-1} bölgelerinde en fazla titreşim bantları elde edilmiştir. Bu bantların kinon türlerinde olduğu gibi C-O bağlarına ait olduğu tespit edilmiştir. FTIR spektroskopisi ile kinonların IR titreşim bantlarının ölçüldüğü bir

çalışmada en önemli titreşimler 1650-1700 cm^{-1} bölgelerinde elde edilmiştir. Tüm nötral türlerde C-O bağları 1660-1680 cm^{-1} güçlü asimetrik titreşimler göstermiştir (28). Bu bulgular ışığında kinon türleri yapısal olarak açıklanmıştır. Pigmentlerin kimyasal yapılarının belirlenmesinde ve karakterizasyonunda UV görünür bölge ve FTIR spektrofotometrik yöntemleri yetersiz olmaktadır. İleri dönemlerde yapılacak çalışmalarda kimyasal karakterizasyonun HPLC veya GC-MS gibi yöntemlerle de desteklenmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.



Şekil 2. Renk maddelerinin FTIR spektrumları
Figure 2. FTIR spectra of pigments

Bir çalışmada FTIR spektroskopisi, kaolenin molekül-mineral yapıları ile kendi aralarındaki benzerlikleri ve farklılıkları belirlemek için kullanılmıştır. FTIR analizi ile elde edilen spektrumlardan Si-O bağları (458, 470, 472, 473, 690, 692, 695, 1032, 1034, 1039 cm^{-1}) Al-O-Si bağları (520, 521, 540, 551 cm^{-1}) Si-O-Si bağları (780, 797, 799 cm^{-1}) Al-O-H bağları (915, 916 cm^{-1}) Al-O-Al bağları (1102 cm^{-1}) Si-H bağları (1960, 1968, 1970 cm^{-1}) OH bağları (3619, 3620, 3690, 3693 cm^{-1}) titreşim değerlerinde görülmüştür (29). FTIR analizlerinde 1650 ve 3240 cm^{-1} bölgelerinde ortaya çıkan temel absorban bölgelerinin ayırt edici özelliğe sahip olmadığı, kinon moleküllerinin yapıları hakkında genel bilgi verdiği asıl ayrımların ise parmak izi bölgesi olarak adlandırılabilir 420-500 cm^{-1} dalga boyları arasında olduğu tespit edilmiştir. T22 renk maddesine ait olan 458 cm^{-1} bölgesindeki ve K3 renk maddesine ait olan 473 cm^{-1} bölgesindeki güçlü titreşim Si-O bağlarını göstermiştir.

Renk Maddelerinin Model Gıdaya Uygulanması

Elde edilen renk maddeleri stabilite açısından kolaylık sağlayacağı ve katılan rengi en iyi

yansıtabileceği düşünüldüğü için model gıda olarak dondurmaya uygulanmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen pigmentlerin sade dondurmaya istenen düzeyde renk kazandırabildikleri belirlenmiştir. Depolama sürecinin başında ve sonunda yapılan gözlemlerde ise 3 ay süresince renklerini koruyabildikleri ve dondurmada istenmeyen bir renk değişikliğine yol açmadıkları gözlenmiştir. Çalışmanın gelinen aşamasında renk maddelerine toksik testler yapılmadığından dolayı dondurmanın duyu özellikleri belirlenmemiştir. Bundan dolayı depolama boyunca sadece gözlemsel değerlendirmeler yapılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı 2312-YL-10 nolu yüksek lisans projesi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri (SDÜ-BAP) birimine teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Dufossé L, Galaup P, Yaron A, Arad MS, Philippe Blanc P, Murthy CNK, Ravishankar AG, 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Sci & Tech*, 16:389-406.
2. Lee Y, Khng H, 2002. Food Additives. Chapter 17: Natural Color Additives. eBook ISBN: 978-0-8247-4170-9.
3. Aksan E, 2005. Çeşitli Mayalardan Karotenoidlerin Elde Edilmesi ve Sucukta Renklendirici Olarak Kullanım Olanaklarının Araştırılması, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
4. Ashfaq N, Masud T, 2002. Surveillance on Artificial Colours in Different Ready to Eat Foods. *Pak J Nutr* 1 (5): 223-225.
5. Sajilata MG, Singhal RS, Kamat MY, 2008. The Carotenoid Pigment Zeaxanthin-A Review. Institute of Food Technologists. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7:29-49.
6. Altuğ T, 2006. Gıda Katkı Maddeleri. Meta Basım, ISBN 975-97408-2-6, sayfa 276, İzmir.

7. Yurttagül M, Ayaz A, 2008. Katkı Maddeleri: Yanlışlar ve Doğrular. Hacettepe Üniversitesi - Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara.
8. Ural A, 1983. Gıdalarda Renk ve Kalite İlişkisi. *GIDA*, Cilt 08, Sayı 1.
9. Venil CK, Lakshmanaperumalsamy P, 2009. An Insightful Overview on Microbial Pigment, Prodigiosin. *Electron J Biol*, 5(3): 49-61.
10. Carvalho JC, Soccol CR, Babitha S, Pandey A, Waiciehowski AL, 2008. Production of Pigment. *Springer*, ISBN: 978-0-387-75212-9, USA.
11. Goswami G, Chaudhuri S, Dutta D, 2010. Effect of pH and temperature on pigment production from an isolated bacterium. Department of Biotechnology, *Nat Inst of Technol*, West Bengal, India.
12. Kahyaoglu M, Kıvanç M, 2006. Endüstriyel Atık Maddelerden Mikrobiyal Yolla Beta Karoten Üretimi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi (*J. Agric. Sci.*), 17(2): 61-6.
13. Liu GY, Nizet V, 2009. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends in Microbiol*, Vol.17 No.9, 0966-842X/\$.
14. Terasawa N, Murata M, Homma S, 1996. Comparison of Brown Pigments in Foods by Microbial Decolorization. *J Food Sci*, 61:669.
15. Nee'Nigam PS, Pandey A, 2009. Microbial Pigments, *Biotechnol for Agro-Industrial Residues Utilisation*. 10.1007/978-1-4020-9942-7_8.
16. Babitha S, Soccol CR, Pandey A, 2005. Jackfruit Seed for Production of Monascus Pigments, *Food Technol Biotechnol*. 44 (4) 465-471.
17. Batu A, Thompson AK, Ghafir SAM, Rahman NAA, 1997. Minolta ve Hunter Renk Ölçüm Aletleri ile Domates, Elma ve Muzun Renk Değerlerinin Karşılaştırılması, *GIDA* (1997) 22 (4): 301-307.
18. Anon 2008. Insight on Color. Hunter L,a,b color scale. *Applic. Note*. Vol.8, No 9.
19. Anon 2012a. NIST, *Nat Inst of Standards and Technol*. <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C106514&Mask=400#UV-Vis-Spec>.
20. Anon 2012b). Spectral Database for Organic Compounds. Web : <http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/> (Giriş tarihi 04.02.2012).
21. Ölmez H, 2009. Suyun Yapısı ve Özellikleri. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Samsun.
22. Prince SM, Papiz MZ, Freer AA, McDermott G, Hawthornthwaite-Lawless AM, Cogdell RJ, Isaacs NW, 1997. Apoprotein Structure in the LH2 Complex from *Rhodospseudomonas acidophila* Strain 10050:Modular Assembly and Protein Pigment Interactions. *J Mol Biol* 268;412-423.
23. Valcke R, 2000. Regulation of the pigment-protein complexes by light. Molecular coordination between nuclear and plasmid genomes. *Bulletin de la Société Royale de Liège*, 69:137-156.
24. Hışıl Y, 2002. Enstrümental Gıda Analizleri – I. Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ege Üniversitesi Basımevi, sayfa 218, İzmir.
25. Zhu BZ, Shan GQ, Huan CH, Balaraman K, Mao Yu-Guo L, 2009. Metal-independent decomposition of hydroperoxides by halogenated quinones: Detection and identification of a quinone ketoxy radical. *PNAS J*, 106 11466-11471.
26. İmamoğlu Ö, 2011. Muğla Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Biyokimya Lab. www.bekirkol.com Erişim Tarihi: 19.10.2011.
27. Griffiths PR, Haseth JA, 1986. Fourier Transform Infrared Spectrometry. A Wiley-Interscience Publication, *John Wiley & Sons*, 83:656, New York.
28. Büschel M, Stadler C, Lambert C, Beck M, Daub J, 1999. Heterocyclic quinones as core units for redox switches: UV-vis/NIR, FTIR spectroelectrochemistry and DFT calculations on the vibrational and electronic structure of the radical anions. *J Electron Chem*, 484 (2000) 24-32.
29. Öteyaka B, Yılmaz B, Uçar A, Işık İ, Aydın A, 2008. The Production of the Micro Silika Monolithic Material. Dumlupınar Üniversitesi, *Fen Bil Derg*, Sayı 18, Nisan 2009, ISSN-1302-3.