




Meyve İşleme Endüstrisi Atık Posalarından *Aspergillus parasiticus* ile Biyopigment Üretimini Araştırılması

Investigation of Biopigment Production from Fruit Processing Industry Waste Pulp with *Aspergillus parasiticus*

Ezgi Bezirhan Arıkan ^{1*} 

¹ Çevre Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Mersin Üniversitesi, Mersin, TÜRKİYE
Sorumlu Yazar / Corresponding Author *: ezgibezirhan@gmail.com

Geliş Tarihi / Received: 22.02.2020

Kabul Tarihi / Accepted: 05.05.2020

Araştırma Makalesi/Research Article
DOI:10.21205/deufmd.2020226618
Atıf şekli/ How to cite: ARIKAN BEZIRHAN, E.(2020). Meyve İşleme Endüstrisi Atık Posalarından *Aspergillus parasiticus* ile Biyopigment Üretimini Araştırılması. DEUFMD 22(66), 841-849.

Öz

Pigmentlerin, renklendirme amacı ile kozmetik, tekstil, kağıt, ilaç ve gıda gibi birçok endüstride kullanıldıkları bilinmektedir. Özellikle Türkiye’de, çoğunlukla sağlığa zararlı olan sentetik pigmentler kullanılırken, dünya çapında biyopigment adı verilen doğal kaynaklardan üretilen pigmentlerin üretimine odaklanılmıştır. Biyopigmentlerin endüstriyel üretiminde maliyeti etkileyen en önemli etkenlerden biri substrattır. Ayrıca, endüstriyel üretimde, bir çok avantajının bulunması nedeni ile funguslardan biyopigment üretimi oldukça dikkat çekmektedir. Bu nedenlerle, bu çalışmada, *Aspergillus parasiticus* filamentli fungusu ile meyve işleme endüstrisi atıklarından biyopigment üretimi araştırılmıştır. Bu amaçla, çalışmanın birinci aşamasında, kara havuç, nar, elma ve pancar posası atıkları *A. parasiticus* ile katı hal fermantasyon koşullarında 5 gün boyunca fermente edilerek en yüksek pigment üretiminin gerçekleştirildiği atık posa belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise, en yüksek pigment üretiminin gerçekleştirildiği nar atık posasının optimum başlangıç pH’ı ve optimum inkübasyon süresi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, atık başlangıç pH’ı 6,5 ve inkübasyon süresinin 15. gününde en yüksek pigment üretiminin sarı renk olarak 14, 28 A/g olduğu belirlenmiştir. Üretilen biyopigmentin ayrıca %20,54 antioksidan aktivitesinin bulunduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, nar atık posası atıklarının değerlendirilmesi ile *A. parasiticus* fungusundan değerli bir ürün olan sarı renkli biyopigmentin üretimi başarı ile gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Atık yönetimi, *Aspergillus parasiticus*, Biyopigment, Endüstriyel atık, Fungus, Meyve işleme endüstrisi

Abstract

Pigments have been used for coloring in many industries such as cosmetics, textiles, paper, pharmaceuticals, and food. Synthetic pigments which are harmful to health are used, especially in Turkey. However, it is focused on biopigment production obtained from natural resources in the world. It is known that one of the most important factors affecting the cost of industrial production of biopigments is substrate. Furthermore, biopigment production from fungi has a great attention due to their advantages. Therefore, in this study, biopigment production from fruit processing industry wastes with *Aspergillus parasiticus* known to be a filamentous fungus was investigated. For this purpose, in the first stage of the study, black carrot, pomegranate, apple and beet waste pulps

fermented with *A. parasiticus* for 5 days under solid-state fermentation conditions for determining optimal waste. In the second stage of the study, the optimum initial pH and optimum incubation time of pomegranate waste pulp which have the highest pigment production was carried out. As a result, it was determined that optimal pH of the beginning of waste and incubation time was 6.5 and 15 days, respectively. In these optimal conditions, the highest pigment production was 14, 28 AU/g as yellow color. In addition, produced biopigment in this study has 20.54% antioxidant activity. It was concluded that the production of yellow biopigment, which was a valuable product, from *A. parasiticus* was successfully carried out with the evaluation of waste pulp.

Keywords: *Aspergillus parasiticus*, Biopigment, Fruit processing industry, Fungus, Industrial waste, Waste valorization.

1. Giriş

Renklendirici bileşikler olarak tanımlanan pigmentlerin, MÖ 1900 yıllarından bu yana, hayvanlardan, bitkilerden ve kayaçlar gibi doğal ürünlerden elde edildiği bilinmektedir. Fakat 1856 yılında William Perkin tarafından anilinden pigment üretiminin keşfi [1], maliyetinin daha az olması nedeni ile endüstriyi sentetik pigment üretimine yönlendirmiştir. Günümüzde ise sentetik pigmentlerin tekstil, kozmetik, boya, ilaç, gıda ve süt gibi birçok endüstride kullanım alanı bulunmaktadır [2]. Ancak, son zamanlarda yapılan çalışmalar, sentetik pigmentlerin kanserojen, teratojen ve alerjen etkilerinin bulunduğunu kanıtlamıştır [3]. Bu nedenle, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Avrupa Gıda Standartları Kurumu (EFSA) gibi kuruluşlar [4] ve Türk Gıda Kodeksi gibi standartlar ile gıda, ilaç ve kozmetik ürünlerindeki bazı sentetik pigmentlerin kullanımı sınırlandırılmış, bazılarının kullanımını ise yasaklamıştır. Son yıllarda artan bu yasal zorunluluklar ve tüketici bilinci, endüstrileri doğal kaynaklardan üretilen pigmentlerin kullanımına teşvik etmiş ve bilimsel araştırmalar, biyopigment olarak da adlandırılan doğal pigment üretimine odaklanmıştır.

Biyopigmentlerin, biyo-uyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir, çevre dostu ve düşük toksisiteye sahip olduğu [5,6] önemle vurgulanmakla birlikte, bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi doğanın sunduğu kaynaklardan üretilebildiği bilinmektedir. Ancak, biyopigment üretiminde bitkilerin kullanılmasının, elde edilen pigmentlerin stabilitesinin düşük ve çözünürlüğünün yüksek olması, üretimde kullanılan bitkinin yılın belirli zamanlarında kullanılabilmesi gibi dezavantajlara sahip olduğu belirtilmektedir. Hayvanlardan biyopigment üretiminde ise büyük ölçekli

üretimde bazı hayvan türlerinin azalmasına neden olması gibi problemler bulunmaktadır [7]. Buna karşın, mikrobiyal biyopigment üretiminde mikroorganizmaların büyüme hızınının bitki ve hayvanlara kıyasla daha yüksek olması, mikroorganizmaların bitkiler gibi iklimsel koşullardan etkilenmemesi, daha yüksek verimde üretimin gerçekleştirilmesi ve üretilen pigmentin daha yüksek stabiliteye sahip olması gibi bir çok avantajın bulunduğu belirtilmektedir [2,3].

Diğer taraftan, mikrobiyal biyopigmentin endüstriyel ölçekte üretilmesi ve üretim talebini karşılaması, verimli bir üretim prosesinin dizayn edilmesine bağlıdır. Bu kapsamda, endüstriyel ölçekte mikrobiyal pigment üretiminde göz önüne alınması gereken en önemli parametreler (i) üretimde kullanılacak olan mikroorganizmanın, (ii) hammaddenin ve (iii) biyoteknolojik prosesin seçimidir [8].

Pigment üretimi için kullanılacak mikroorganizmaların, patojenik ve toksik olmaması, birçok çeşitteki karbon ve azot kaynaklarını kullanabilmesi, tuz konsantrasyonuna ve pH'a toleranslı ve ayrılma kolaylığı sağlayabilen mikroorganizmalar olması gerekmektedir [3]. Bu kapsamda değerlendirildiğinde, alglerin güneş ışığına ihtiyaç duyması ve bakterilerin de funguslara göre çevre koşullarına daha az toleransının olması nedeni ile biyopigmentin endüstriyel ölçekte üretimde çoğunlukla funguslar tercih edilmektedir. Bunlara ek olarak, filamentli fungusların da karotenoidler, melaninler, flavinler, fenazinler, kinonlar, monasinler ve indigo gibi birçok çeşitte pigment ürettiği bilinmektedir [9]. Literatür incelendiğinde, *Monascus ruber*, *Monascus purpureus*, *Aspergillus ruber*, *Penicillium oxalicum*, *Ashbya gossypii* ve *Fusarium* sp. gibi birçok fungus türünün biyopigment üretim potansiyelinin araştırıldığı

[3] ancak, filamentli bir fungus türü olan *Aspergillus parasiticus*'un [10] biyopigment üretim potansiyelinin henüz araştırılmadığı belirlenmiştir.

Ham maddenin fungal biyopigment üretiminde üretim maliyetinin %38-73'ünü etkilediği bilinmektedir [3]. Bu nedenle, mikroorganizmalardan biyopigment üretiminde substrat olarak seçilen ham maddenin hem ucuz hem de karbon ve azot yönünden zengin içerikte olması gerekmektedir.

Diğer taraftan, tarımsal ürünlerin işlenmesi ve üretimi her zaman katı, sıvı veya gaz formlarda atık üretimine neden olmaktadır. Son zamanlarda, sadece endüstrilerden kaynaklanan atıkların artırılarak çevresel kirliliklerin en aza indirilmesine değil, aynı zamanda sıfır atık yaklaşımı ile bu atıklardan katma değeri yüksek yeni ürünler elde edilmesine de odaklanılmış durumdadır [11]. Bu kapsamda, endüstrilerden kaynaklanan organik açıdan zengin tarımsal atıklar veya gıda atıkları, atıklardan yeni değerli ürün eldesi konusunda uygulanabilirliği nedeni ile ilgi çekmektedir [12].

Bu nedenlerle, bu çalışmada, maliyeti düşük meyve işleme endüstrisi atık posalarından, daha önce biyopigment üretimine dair herhangi bir çalışmaya dahil edilmemiş bir tür olan *Aspergillus parasiticus* ile biyopigment üretimi araştırılmıştır. Ayrıca bu çalışmada, meyve işleme endüstrisi atık çeşidinin, inkübasyon süresinin ve pH'ın fungal biyopigment üretimine etkisi de araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Fungus ve kültür koşulları

Çalışmada kullanılan filamentli fungus *Aspergillus parasiticus*, Mersin Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü Laboratuvarlarında +4 °C'de patates dektroz agar (PDA) içeren petri kaplarında muhafaza edilen ve her 15 güne bir yenilenen stok kültürlerden elde edilmiştir. Biyopigment üretiminde kullanılması amacı ile, stok petri kaplarında bulunan fungal sporlar, 121 °C'de 20 dk boyunca steril edilmiş 100 mL patates dektroz broth içeren 250 mL'lik erlenlere steril koşullar altında inoküle edilmiştir. Daha sonra, erlenler 25 °C'de 100 rpm'deki bir çalkalamalı inkübatörde 5 gün süre ile inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından, UV ışınli bir ekim kabininde erlenle

bulunan fungal miselyumlar sıvı besiyerinden süzülerek ayrılmıştır. Fungus, besi yerinden arındırılması amacı ile de sterilize edilmiş distile su ile 3 kez yıkanmıştır. Ardından, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere, fungus steril koşullar altında el homojenizatörü ile 10000 rpm'de homojenize edilmiştir.

2.2. Atık posaların hazırlanması

Bu çalışmada, substrat olarak kullanılan elma, nar, siyah havuç ve kırmızı pancar posa atıkları Mersin İlinde bulunan Anadolu Etap Tarım ve Gıda Ürünleri San. ve Tic. A.Ş.'den temin edilmiştir. Daha sonraki çalışmalar için, tüm atık posalar, 24 saat 60 °C'de kurutulduktan sonra partikül boyutunun küçültülmesi amacı ile mutfak tipi öğütücüde ayrı ayrı öğütülmüştür. Öğütülen atıklar, atık partikül boyutunun 1,4 mm'den küçük olması amacı eleklere (Tyler mesh 10-12) geçirilmiştir. Çalışma süresince, tüm kurutulmuş atık posa partikülleri 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.3. Atık posa türünün seçimi

Aspergillus parasiticus fungusunun farklı atık posalardaki biyopigment üretim kapasitelerinin belirlenmesi çalışmaları, daha önce yapılan çalışmalar esas alınarak katı hal fermantasyon koşulları altında gerçekleştirilmiştir [13]. Bu amaçla, her bir farklı türdeki öğütülmüş (<1.4 mm) atık posadan (elma, nar, siyah havuç ve kırmızı pancar) 5'er g tartılmış ve 250 mL'lik erlenlere ilave edilerek 121 °C'de 20 dk boyunca otoklavda steril edilmiştir. Sterilizasyonun ardından, oda sıcaklığına gelen her bir erlene, aseptik koşullar altında başlangıç nem içeriğinin %50 olması amacı ile sterilize edilmiş distile su ilave edilmiştir [14,15]. Ardından erlenlerin bir kısmına, 5'er mL homojenize edilmiş fungal biyokütle ilave edilmiştir. Kontrol numune olması ve atık posadan gelen pigmentleri elimine etmek amacı ile erlenlerin bir kısmına ise fungal biyokütle ilavesi yapılmamıştır. Tüm erlenler, 25 °C'deki bir inkübatörde statik koşullarda 5 gün süre ile inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresi sonunda, tüm erlenlerdeki fungal biyokütleler katı kısımdan ayrılmış ve her biri 24 saat boyunca 60 °C'de kurutulduktan sonra pigment ekstraksiyonu analizlerine tabi tutulmuştur. Ayrıca bu aşamada, erlenlerden elde edilen yaş biyokütleler doğrudan/kurutulmadan ekstraksiyon işlemlerine tabi tutularak pigment üretiminde ekstraksiyon verimliliği de test

edilmiştir. Tüm çalışmalar 3 tekrar gerçekleştirilmiştir.

2.4. Optimizasyon çalışmaları

Bir önceki çalışma ile, en yüksek pigment üretiminin gerçekleştirildiği atık posa türü ve ekstraksiyon yönteminin (kuru/yaş) belirlenmesinin ardından, katı hal fermantasyon koşulları altında atık posanın başlangıç pH'ının 4,5-5,5-6,5 ve 7,5 ve inkübasyon süresinin (5-10-15 gün) pigment üretimine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, her bir erlene (250 mL), en yüksek pigment üretim veriminin elde edildiği atık posa türünden (<1.4 mm) 5'er g ilave edilmiş, başlangıç nem içeriklerinin %50 olması amacı ile belirli miktarlarda distile su ilave edilmiştir. Daha sonra, 1 M Sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi ilavesi ile erlenlerin başlangıç pH'ları sırası ile 4,5-5,5-6,5 ve 7,5'e ayarlanmıştır. Tüm erlenlerin 121 °C'de 20 dk boyunca otoklavda steril edilmesinin ardından, her bir erlene homojenize fungal biyokütle (5 mL) ilave edilmiş ve tüm erlenler sırası ile 5, 10 ve 15 gün süre ile 25 °C'deki bir inkübatörde statik koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süreleri sonunda, başlangıç pH'ı farklı olan her bir erlendeki biyokütle katı kısmından ayrılmış ve daha önce belirlenmiş yöntem ile (yaş/kurutulmuş) biyopigment ekstraksiyon analizine tabi tutulmuştur.

Bu aşamada, en yüksek pigment üretiminin belirlendiği numunenin ekstraksiyon çözeltisine antioksidan aktivite analizi uygulanmıştır. Antioksidan aktivite analizinde fungusun nar atık posasında ürettiği antioksidan aktivitesinin karşılaştırılması amacı ile, sadece sıvı besiyerinde (PDB) büyütülmüş fungustan ve sadece nar posasından elde edilen ekstraksiyon çözeltilerine de antioksidan aktivite analizleri uygulanmıştır.

2.5. Analitik yöntemler

Bu çalışmada, atık posaların nem içeriği başlangıç kütlesi bilinen atık posaların, 130°C'de 2 saat boyunca etüvde bekletilmesinin ardından kütle kaybına dayanan yöntem ile belirlenmiştir [16]. Pigment ekstraksiyonu için Kantifedaki ve diğerleri (2018) [17] tarafından belirlenen yöntem kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda hasat edilen kuru/yaş biyokütle, 0,5 g tartılıp bir tüpe aktarılmış ve üzerine 5 mL etanol (%95 v/v) ilave edilmiştir. Daha sonra bu karışım, oda sıcaklığında 30 dakika süre ile 60 Hz'de ultrasonik banyoda bekletilmiştir.

Karışımın, 1 saat boyunca 30 ° C'de 180 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde çalkalanmasının ardından, karışım 6000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj süresi sonunda elde edilen üst fazın, UV-vis spektrofotometrede (DR3900, Hach) sarı, turuncu ve kırmızı pigment üretimi için sırası ile 400 nm, 475 nm ve 500 nm olmak üzere üç farklı dalga boyunda [18] absorbansları belirlenmiştir. Her adımda, fungal biyokütlenin ilave edilmediği sadece atık posa içeren kontrol numuneler de pigment ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Pigment ekstraksiyon analizleri sonucunda, üretim sonuçları 1 g biyokütleden elde edilen absorbans olarak A/g biriminde ifade edilmiştir.

Antioksidan aktivite analizi için, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)'in serbest radikal giderme etkinliği Gökşen ve diğerleri (2018) [19] tarafından tarif edilen yöntemle değerlendirilmiştir. Yöntemde, metanol (%97 v/v, pH=2) içerisinde çözündürülerek hazırlanan DPPH çözeltisinden (0.08 mM) 5,7 mL alınarak bir tüpe aktarılmış ve üzerine 0,3 mL ekstraksiyon sonucunda elde edilen üst fazdan ilave edilmiştir. Bu karışım, karanlıkta 30 dakika bekletildikten sonra, UV-vis spektrofotometrede 517 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Yöntemde kontrol olarak metanol (%97 v/v, pH=2) kullanılmıştır. DPPH'in inhibisyonu % olarak aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

$$\%İnhibisyon = \left(\frac{Ac - As}{Ac} \right) \times 100 \quad (1)$$

Denklemden, Ac ve As sırasıyla kontrol ve numunenin absorbans değerlerini ifade etmektedir [17, 20].

3. Bulgular

3.1. Atık posa türü seçimi deney sonuçları

A. parasiticus fungusunun farklı atık posalara aşılmasının ardından 3 gün sonrasında, tüm atık posaların üzerinde erlen yüzeyini kaplayacak şekilde fungal gelişimin olduğu gözlemlenmiştir. Katı hal fermantasyon koşullarında, 5 gün boyunca fungusun fermente edilmesinin ardından, hasat edilen yaş ve kuru biyokütlelerin ekstrakte edilmesi ile elde edilen pigment çözeltilerinde tespit edilen pigment üretimleri (A/g) Şekil 1'de gösterilmektedir.

Atık posa türlerinin katı hal fermantasyon koşullarında 5 gün inkübe edilmesinin ardından

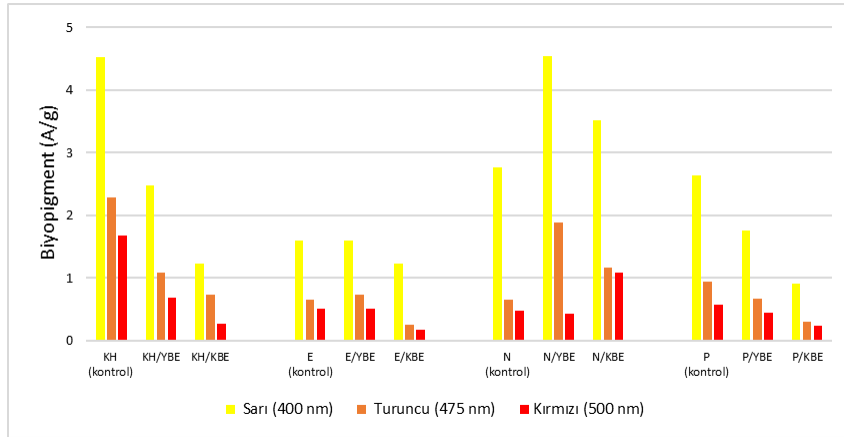
gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, fungal aşılama yapılmış kara havuç (KH) ve pancar (P) atık posası içeren numunelerin, fungal aşılama yapılmayan ve sadece atık posa içeren KH ve E kontrol gruplarından daha fazla absorbansa sahip olduğu belirlenmiştir. Benzer biçimde, elma (E) atık posası ile yapılan çalışmalar sonucunda kontrol gruplarının absorbans değerlerinin tüm dalaga boyları için (400, 475 ve 500 nm), fungal aşılama yapılmış diğer numunelerden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın, nar (N) atık posaları ile gerçekleştirilen yarı katı hal fermantasyon çalışmaları sonucunda, kontrol grubunun fungal aşılama yapılmış numunelerden daha az absorbans değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, *A. parasiticus* fungusunun sadece nar atık posalarında (N/YBE) en yüksek değerde (toplam 4,54; posadan gelen absorbansın elimine edilmesiyle (ham) 1,78 A/g) sarı renkte pigment ürettiği tespit edilmiştir (Şekil 1). Bu nedenle, bir sonraki optimizasyon çalışmaları da nar atık posası ile gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca, ekstraksiyon yönteminde, erlenlenlerden hasat edilen yaş ve kuru biyokütelerin kullanımının ekstraksiyon verimine etkisi incelendiğinde ise tüm numunelerde, kurutulma

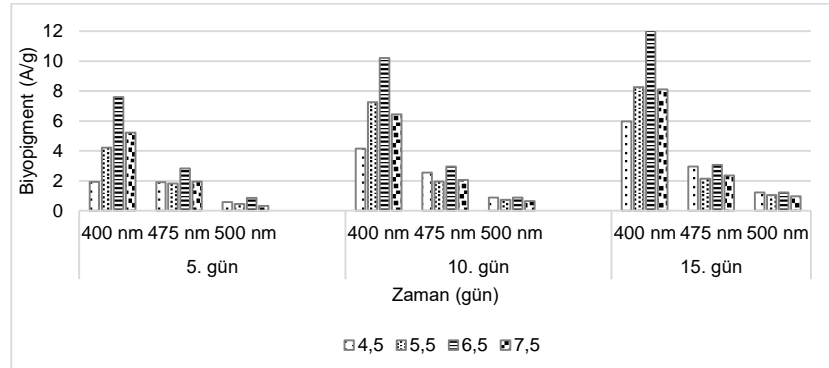
yapılmadan doğrudan yaş biyokütelerden ekstraksiyon yapılması durumunda, tüm dalga boyları için daha fazla absorbans değerlerinin elde edildiği tespit edilmiştir. Bu nedenle, bir sonraki optimizasyon çalışmalarında biyopigmentin ekstraksiyonunda, erlenlerden hasat edilen biyoküteler kurutulmadan doğrudan yaş halde kullanılmıştır.

3.2. Optimizasyon deney sonuçları

Farklı başlangıç pH değerlerine (4,5-5,5,-6,5 ve 7,5) sahip nar atık posasının, katı hal fermantasyon koşullarında *A. parasiticus* fungusuyla fermente edilmesi sonucunda, inkübasyonun 5, 10 ve 15. günlerinde elde edilen ham pigment üretim sonuçları Şekil 2'de gösterilmektedir. En yüksek ham pigment üretiminin, 15. günde 14,28 A/g olarak sarı renkte başlangıç pH'ı 6,5 olan nar atık posasında üretildiği tespit edilmiştir (Şekil 2). pH'ın 4,5'ten 6,5'e kadar artması ile birlikte pigment üretiminin arttığı, bununla birlikte, pH 7,5'ta pigment üretiminin azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, elde edilen sonuçlar, pigmentin türünün (sarı, kırmızı veya turuncu) substratın başlangıç pH'ından etkilenmediğini göstermiştir. Dahası, pigment üretiminin artan inkübasyon süresi ile arttığı belirlenmiştir.



Şekil 1. Biyopigment ekstraksiyonu sonucunda farklı atık posa türlerinde elde edilen absorbanslar (KH:kara havuç, E:Elma, N:Nar, P pancar, YBE:Yaş biyokütle ekstraksiyonu, KBE:Kuru biyokütle ekstraksiyonu)



Şekil 2. Farklı pH'lardaki atık posalardan elde edilen pigmentlerin absorbens değerleri

Bu aşamada, en yüksek pigment üretiminin tespit edildiği başlangıç pH'ı 6,5 olan nar atık posasında 15 gün boyunca inkübe edilen fungusun ekstraksiyon çözeltisinin antioksidan aktivite içeriğinin (%20,54), sadece fungusun ürettiği antioksidandan (%8,45) ya da nar atık posasından elde edilen antioksidandan (%18,5) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1). Bu nedenle, *A. parasiticus*'un nar atık posalarında pigment üretirken antioksidan bileşikler ürettiği de tespit edilmiştir.

Tablo 1. Farklı substratların ekstraksiyon çözeltilerinin antioksidan aktiviteleri

Substrat	Antioksidan aktivitesi (%)
Nar atık posasında (pH=6,5) fermente edilmiş (15 gün) fungus	20,54
Patates dekstroz sıvı besiyerinde büyütülmüş (15 gün) fungus	8,45
Nar atık posası	18,5

4. Tartışma ve Sonuç

Çalışmanın ilk aşamasında, fungusun tüm türdeki atık posalar üzerinde büyüdüğünün gözlemlenmesi, atık posaların fungal büyüme için gerekli olan esansiyel bileşenleri içerdiğini göstermektedir [20]. Bununla birlikte, tüm atık posalarda *A. parasiticus*'tan en yüksek absorbensin ve sarı renkli pigmentin üretilmesinin, bir çok *Aspergillus* türünde olduğu

gibi, sarı renkli hidroksikininleri üretmesinden [22] kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca yaş fungal biyokütleden elde edilen absorbens değerlerinin önemli ölçüde kuru fungal biyokütleden elde edilen absorbens değerlerinden daha düşük olması ekstraksiyon veriminin yaş biyokütleden daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, 60 ° C'den yüksek sıcaklıklarda biyopigmentlerin termal bozunmaya uğrayabileceği bilinmektedir [23]. Bu nedenle de bu çalışmada kuru fungal biyokütleden daha düşük ekstraksiyon verimi elde edildiği düşünülmektedir.

Biyopigment üretiminde ve verimliliğinde, pH'ın önemli bir parametre olduğu bilinmektedir. Çalışmanın ikinci aşamasında, nar atık posalarından *A. parasiticus* ile biyopigment üretiminde, pH'ın 4,5'ten 6,5'e kadar artması ile pigment üretiminin de arttığı belirlenmiştir. Bunun nedeninin, pigmentlerin biyosentezinde yer alan enzimlerin aktivitesinin [24] de artmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, bu artışın çoğu fungus için optimum büyüme pH'ının 5,0-6,5 arasında olmasından [25] ileri gelebileceği de düşünülmektedir. *Penicillium purpurogenum* fungusunun biyopigment üretim potansiyelinin araştırıldığı bir çalışmada da benzer biçimde, optimum biyopigment üretiminin pH=7'nin altında elde edildiği tespit edilmiştir [26].

Pigmentler, funguslar tarafından ikincil metabolitler olarak sentezlenen bileşiklerdir [27] ve bu metabolitler genellikle nutrient sınırlamaları ve/veya stres koşulları altında fungal büyümenin durağan fazında üretilirler

[28]. Ayrıca, pigment üretiminin, bazı fungus türleri için hem eşeyli hem de eşeysiz sporların oluşumu ile ilişkili olabileceği de bilinmektedir [29]. *Aspergillus* türlerinde, fungal hifaların büyümesi ve ardından farklılaşması sonucunda oluşan konidioforlarda konidya adı verilen aseksüel sporların üretildiği bilinmekte [30] ve bu konidya adı verilen yapılarda melanin pigmentinin üretildiği [31] ileri sürülmektedir. Bu nedenlerle, inkübasyon süresi arttıkça pigment üretiminin artmasının iki olası nedeninin olduğu düşünülmektedir. Inkübasyon süresi arttıkça, funguslar tarafından atık posası içerisindeki nutrientlerin kullanılması nedeniyle stres koşullarının oluşması ve sonuç olarak (i) funguslar durağan faza geçerek pigment ikincil metabolitini üretmiş olabilir; (ii) funguslar stres koşullarında pigment içeren konidia yapılarını üretmiş olabilir. Ayrıca inkübasyon süresi ile atık başlangıç pH'ı birlikte ele alındığında, inkübasyon süresinin başında optimum büyüme aralığında olan pH'ın, artan inkübasyon süresi ile azalması nedeni ile biyopigment üretiminin artabileceği de düşünülmektedir [24].

Bu zamana kadar, farklı fungus türlerinden ve atıklardan pigment üretimi için farklı inkübasyon süreleri test edilmiştir. Örneğin, Jak meyve tohumundan *Monascus purpureus* tarafından pigment üretiminin araştırıldığı bir çalışmada, maksimum pigment üretiminin inkübasyonun 6. gününde olduğunu tespit edilmiştir [32]. Padmavathi ve Prabhudessai (2013) [33] tarafından yapılan çalışmada ise *Monascus sanguineus*'un patates kabuğundan en yüksek pigment üretiminin inkübasyonun 15. gününde elde etmişlerdir. Bu çalışmada ise, *Aspergillus parasiticus* fungusundan atık nar posalarında en yüksek pigment üretimi inkübasyonun 15. gününde tespit edilmiştir. Bu çalışmada, inkübasyon süresinin 15 gün ile sınırlandırılmasının nedeni, daha uzun sürelerde endüstriyel üretimde rekabetçi bir proses elde edilemeyeceğinin düşünülmesinden kaynaklanmıştır [5].

Bu zamana kadar atıklardan fungal biyopigment üretimi konusunda yapılan bazı çalışmaların pigment üretim sonuçları ile bu çalışmada elde edilen sonuç Tablo 2'de gösterilmektedir.

Tablo 2. Atıktan fungal biyopigment üretimi gerçekleştirilen bazı çalışmaların sonuçları

Fungus Türü	Atık substrat türü	Inkübasyon süresi (gün)	Pigment üretimi (A/g)	Kaynak
<i>Monascus purpureus</i>	Üzüm posası	9	9,340	[23]
<i>M. purpureus</i>	Portakal kabukları	16	4,160	[17]
<i>M. purpureus</i>	Jak meyvesi tohumu	7	12,113	[32]
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Nar posası atıkları	15	14,28	Bu çalışma

Diğer taraftan, antioksidanlar hasarlı molekülleri onarma ve çeşitli hastalıkları önleme gibi birçok işleve sahip bileşiklerdir [34]. Bununla birlikte bu çalışmada da kullanılan narın bir antioksidan kaynağı olduğu bilinmektedir [35]. Ayrıca fungusların ikincil bir metabolit olarak antioksidan üretebildikleri de kanıtlanmıştır [25]. Bununla birlikte, en yüksek antioksidan aktivite, optimum koşullar altında nar atık posaları üzerinde fermente edilen *A. parasiticus* fungusundan elde edilen ekstraktlardan elde edilmiştir. Bu nedenle, hem narın hem de fungusun antioksidan madde içermesinin, fermentasyon süreci sonunda antioksidan aktivite içeriğini arttırdığı düşünülmektedir. Ancak, *A. parasiticus*

fungusundan nar posası atıklarından elde edilen pigmentin antioksidan içeriğinin biyoteknolojik kullanım alanının belirlenmesi için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak, gıda işleme endüstrisinden elde edilen nar posası atığından *A. parasiticus* tarafından sarı biyo-pigment üretimi için yüksek bir potansiyele sahip olduğu tespit edilmiştir. En yüksek sarı pigment üretiminin, katı hal fermentasyon koşulları altında başlangıç pH'ı 6,5 olan nar posası atıklarından inkübasyon süresinin 15. gününde 14,28 A/g olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada, *A. parasiticus* fungusundan biyopigment üretiminde kullanılabilecek atık türü, inkübasyon süresi,

başlangıç pH'ı gibi optimal koşullar verilmiştir. Bununla birlikte, bu biyopigmentden, endüstriyel alanda potansiyel olarak yararlanılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca fermantasyon sonrasındaki atık posanın gübre ya da hayvan yemi gibi potansiyel kullanım alanlarının da araştırılması gerekmektedir.

Teşekkür

Çalışma gerçekleştirirken, desteğini ve değerli fikirlerini esirgemeyen Mersin Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Nadir DİZGE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kaynakça

- [1] Barnett, J.R., Miller, S., Pearce, E. 2006. Colour and art: A brief history of pigments, *Optics and Laser Technology*, Cilt. 38, s. 445-453. DOI: 10.1016/j.optlastec.2005.06.005.
- [2] Nigam, P.S., Luke, J.S. 2016. Food additives: production of microbial pigments and their antioxidant properties, *Current Opinion in Food Science*, Cilt. 7, s. 93-100. DOI: 10.1016/j.cofs.2016.02.004
- [3] Panesar, R., Kaur, S., Panesar, P.S. 2015. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review, *Current Opinion in Food Science*, Cilt. 1, s. 70-76. DOI: 10.1016/j.cofs.2014.12.002
- [4] Tuli, H.S., Chaudhary, P., Beniwal, V., Sharma, A.K. 2015. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives, *Journal of Food Science and Technology*, Cilt. 52, s. 4669-4678. DOI: 10.1007/s13197-014-1601-6
- [5] Aruldass, C.A., Dufossé, L., Ahmad, W.A. 2018. Current perspective of yellowish-orange pigments from microorganisms- a review, *Journal of Cleaner Production*, Cilt. 180, s. 168-182. DOI: 10.1016/j.jclepro.2018.01.093
- [6] Gupta, N., Poddar, K., Sarkar, D., Kumari, N., Padhan, B., Sarkar, A. 2019. Fruit waste management by pigment production and utilization of residual as bioadsorbent, *Journal of Environmental Management*, Cilt. 244, s. 138-143. DOI: 10.1016/j.jenvman.2019.05.055
- [7] Narsing Rao, M.P., Xiao, M., Li, W.-J., 2017. Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications, *Frontiers in Microbiology*, Cilt. 8. DOI: doi.org/10.3389/fmicb.2017.01113
- [8] Sánchez-Muñoz, S., Mariano-Silva, G., Leitea M. O., Mura, F. B., Verma, M. L., da Silva, S. S., Chandel, A. K. 2019. Production of fungal and bacterial pigments and their applications. ss 327-361. Verma, M. L., Chandel, A. K., ed. 2019. *Biotechnological Production of Bioactive Compounds*, Elsevier, Netherlands, 508s.
- [9] Dufossé, L., Fouillaud, M., Caro, Y., Mapari, S.A.S., Sutthiwong, N. 2014. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry, *Current Opinion in Biotechnology*, Cilt. 26, s. 56-61. DOI: 10.1016/j.copbio.2013.09.007
- [10] Sanchis, V., Vinas, I., Roberts, I. N., Jeenes, D. J., Watson, A. J., Archer, D. B. 1994. A pyruvate decarboxylase gene from *Aspergillus parasiticus*, *FEMS Microbiology Letters*, Cilt. 117, s. 207-210. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb06766.x
- [11] Uz Zaman, A. 2014. Measuring waste management performance using the 'Zero Waste Index': the case of Adelaide, Australia, *Journal of Cleaner Production*, Cilt. 66, s. 407-419. DOI: doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.10.032
- [12] Karimi, S., Mahboobi Soofiani, N., Mahboubi, A., Taherzadeh, M. 2018. Use of Organic Wastes and Industrial By-Products to Produce Filamentous Fungi with Potential as Aqua-Feed Ingredients, *Sustainability*, Cilt. 10, s. 3296. DOI: 10.3390/su10093296
- [13] Agboyibor, C., Kong, W.-B., Chen, D., Zhang, A.-M., Niu, S.-Q. 2018. *Monascus* pigments production, composition, bioactivity and its application: A review, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Cilt. 16, s. 433-447. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.09.012
- [14] Babitha, S., Soccol, C.R., Pandey, A. 2007. Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed, *Bioresource Technology*, Cilt. 98, s. 1554-1560. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.06.005
- [15] Johns, M.R., Stuart, D.M. 1991. Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid culture, *Journal of Industrial Microbiology*, Cilt. 8, s. 23-28. DOI: 10.1007/BF01575587
- [16] Obi, O. F., Ezeoha, S. L., Egwu, C. O. 2016. Evaluation of Air Oven Moisture Content Determination Procedures for Pearl Millet (*Pennisetum glaucum* L.), *International Journal of Food Properties*, Cilt. 19:2, s. 454-466, DOI: 10.1080/10942912.2015.1038566
- [17] Kantifedaki, A., Kachrimanidou, V., Mallouchos, A., Papanikolaou, S., Koutinas, A.A. 2018. Orange processing waste valorisation for the production of bio-based pigments using the fungal strains *Monascus purpureus* and *Penicillium purpurogenum*, *Journal Cleaner Production*, Cilt. 185, s. 882-890. DOI: 10.1016/j.jclepro.2018.03.032
- [18] De Carvalho, J.C., Cardoso, L.C., Ghiggi, V., Woiciechowski, A.L., de Souza Vandenberghe, L.P., Soccol, C.R. 2014. *Microbial Pigments*. s. 73-97. Brar, S. K., Dhillon, G. S., Fernandes M., ed. 2014. *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*. Springer-Verlag New York, 504s.
- [19] Gökşen, G., Durkan, Ö., Sayar, S., Ekiz, H.İ. 2018. Potential of date seeds as a functional food components, *Journal of Food Measurement and Characterization*, Cilt. 12, s.1904-1909. DOI: 10.1007/s11694-018-9804-6
- [20] Gardeli, C., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T., Komaitis, M. 2008. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts, *Food Chemistry*, Cilt. 107, s. 1120-1130. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.09.036
- [21] Sankaran, S., Khanal, S.K., Jasti, N., Jin, B., Pometto, A.L., Van Leeuwen, J.H. 2010. Use of Filamentous Fungi for Wastewater Treatment and Production of

- High Value Fungal Byproducts: A Review, Critical Reviews in Environmental Science and Technology, Cilt. 40, s. 400-449. DOI: doi.org/10.1080/10643380802278943
- [22] Caro, Y., Venkatachalam, M., Lebeau, J., Fouillaud, M., Dufossé, L., 2017. Pigments and Colorants from Filamentous Fungi, s. 499-568. Mérillon, J.M., Ramawat, K. G., ed. 2017. Fungal Metabolites. Springer International Publishing, Cham, Switzerland, 1001s.
- [23] Silveira, S.T., Daroit, D.J., Sant'Anna, V., Brandelli, A. 2013. Stability modeling of red pigments produced by *Monascus purpureus* in submerged cultivations with sugarcane bagasse, Food and Bioprocess Technology, Cilt. 6(4), s. 1007-1014. DOI: 10.1007/s11947-011-0710-8
- [24] Afsharia, M., Shahidia, F., Mortazavia, S. A., Tabatabaia, F., Es'hagh, Z. 2015. Natural Product Research, Cilt. 29(14), s. 1300-6. DOI: 10.1080/14786419.2014.999059
- [25] Arora, D.S., Chandra, P. 2011. Antioxidant Activity of *Aspergillus fumigatus*, ISRN Pharmacology, Cilt. 2011, s. 1-11. DOI: 10.5402/2011/619395
- [26] Méndez, A., Pérez, C., Montañéz, J.C., Martínez, G., Aguilar C. N., 2011. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. Journal of Zhejiang University SCIENCE B, Cilt. 12, S. 961-968. DOI: 10.1631/jzus.B1100039
- [27] Mukherjee, G., Mishra, T., Deshmukh, S. K. 2017. Fungal Pigments: An Overview, ss. 525-541. Satyanarayana, T., Deshmukh, S.K., Johri, B.N. ed. 2017. Developments in Fungal Biology and Applied Mycology, Springer Singapore, Singapore, 605s.
- [28] Gmoser, R., Ferreira, J.A., Taherzadeh, M.J., Lennartsson, P.R. 2019. Post-treatment of Fungal Biomass to Enhance Pigment Production, Applied Biochemistry and Biotechnology, Cilt. 189, s. 160-174. DOI: 10.1007/s12010-019-02961-y
- [29] Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W., Keller, N.P., 2002. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Cilt. 66, s. 447-459. DOI: 10.1128/MMBR.66.3.447-459.2002
- [30] Baker, S., Bennett, J. 2007. An Overview of the Genus *Aspergillus*, s. 3-13. Goldman, G. H., Osmani S. A., ed. 2007. The *Aspergilli*: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods, CRC Press, USA, 576s.
- [31] Teertstra, W.R., Tegelaar, M., Dijksterhuis, J., Golovina, E.A., Ohm, R.A., Wösten, H.A.B. 2017. Maturation of conidia on conidiophores of *Aspergillus niger*, Fungal Genetics and Biology, Cilt. 98, s. 61-70. DOI: 10.1016/j.fgb.2016.12.005
- [32] Babitha, S., Soccol, C. R., Pandey, A. 2006. Jackfruit Seed - A Novel Substrate for the Production of *Monascus* Pigments through Solid-State Fermentation, Food Technology and Biotechnology, Cilt. 44 (4), s. 465-471.
- [33] Padmavathi, T., Prabhudessai, T., 2013. A Solid Liquid State Culture Method to Stimulate *Monascus* Pigments by Intervention of Different Substrates, International Research Journal of Biological Sciences, Cilt. 2 (10), s. 22-29.
- [34] Maqsoodlou, A., Assadpour, E., Mohebodini, H., Jafari, S. M. 2020. Improving the efficiency of natural antioxidant compounds via different nanocarriers, Advances in Colloid and Interface Science, 102122. DOI:10.1016/j.cis.2020.102122
- [35] Duman, A., Ozgen, M., Dayisoğlu, K., Erbil, N., Durgac, C. 2009. Antimicrobial Activity of Six Pomegranate (*Punica granatum* L.) Varieties and Their Relation to Some of Their Pomological and Phytonutrient Characteristics, Molecules, Cilt. 14, s. 1808-1817. DOI: 10.3390/molecules14051808