

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



**TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN PİGMENT ÜRETİCİ  
FUNGUSLARIN İZOLASYONU VE PİGMENT OLUŞUMUNA  
ETKİ EDEN FAKTÖRLERİN OPTİMİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SİNAN GÜNER**

**BALIKESİR, HAZİRAN - 2018**

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



**TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN PİGMENT ÜRETİCİ  
FUNGUSLARIN İZOLASYONU VE PİGMENT OLUŞUMUNA  
ETKİ EDEN FAKTÖRLERİN OPTİMİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SİNAN GÜNER**

**Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Tülin AŞKUN (Tez Danışmanı)**

**Prof. Dr. Gülendam TÜMEN**

**Prof. Dr. Semra İLHAN**

**BALIKESİR, HAZİRAN - 2018**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

**SİNAN GÜNER** tarafından hazırlanan “**TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN PİGMENT ÜRETİCİ FUNGUSLARIN İZOLASYONU VE PİGMENT OLUŞUMUNA ETKİ EDEN FAKTÖRLERİN OPTİMİZASYONU**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 05.06.2018 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman  
Prof.Dr. Tülin AŞKUN

Üye  
Prof. Dr. Gülendamar TÜMEN

Üye  
Prof. Dr. Semra İLHAN



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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

**Bu tez alışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından 2015-227 nolu proje ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

# TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN PİGMENT ÜRETİCİ FUNGUSLARIN İZOLASYONU VE PİGMENT OLUŞUMUNA ETKİ EDEN FAKTÖRLERİN OPTİMİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SİNAN GÜNER

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF.DR.TÜLİN AŞKUN)

BALIKESİR, HAZİRAN - 2018

Günümüzde sentetik boya ların kullanılmasının çevre üzerinde zarar verici etkilerinin olduğu ve insanlarda görülen alerjik astım, toksijenik ve karsinojenik hastalıklara sebep olduğu bilinmektedir. Bu nedenle farklı kaynaklardan (bitkiler, böcekler, likenler, bakteriler ve mineraller gibi) insanlara ve çevreye zarar vermeyen doğal pigment arayışı tüm dünyada devam etmektedir. Funguslardan pigment elde etmeye yönelik çalışmalar oldukça yenidir.

Bu çalışmada Manisa ili Akhisar İlçesi, Musaca köyünden toplanan toprak örneklerinin mikrobiyotası araştırılmıştır. Çalışmada topraklardan mikrofungus izole edilmesinde “Toprağı Sulandırma Metodu” kullanılmıştır. Bu metotla 17 toprak örneğinden elde edilen izolatlar arasında moleküler yöntemlerle teşhis edilen *P. purpurogenum* ve *P. canescens* türleri pigment üretici olarak belirlenmiştir.

Pigment üretiminde farklı besiyerlerinde (SDA, MEA, PDA, ve YEA) farklı sıcaklıkta (25, 28, 30 °C)’ de ve farklı pH’ larda (1, 3, 5, 7, 9, 11, 13) 15 gün boyunca inkübe edilerek pigment elde edildi. En yüksek pigment üretimi 5.5 pH’ ta ve 28 °C sıcaklıkta görüldü. Pigment ekstresi için ethanol (w/v: 1/1) çözücüsü kullanıldı ve 72 saat 26 °C’ de 160 rpm çalkalandı ve sonra sırasıyla 45 µm ve 20 µm filtreden geçirildi. Ekstre liyofilize edilerek kırmızı ve sarı pigmentler elde edildi. Pigment çözeltilisinin (500 mg/mL) farklı pH, sıcaklık değerleri ve farklı çözücüler ile renk karakterizasyonu yapıldı. Çalışma sonucunda pigment üretimini etkileyen koşullar belirlendi.

**ANAHTAR KELİMELEER:** Pigment üretimi, *Penicillium canescens*, *Penicillium purpurogenum*, Pigment karakterizasyonu.

## **ABSTRACT**

### **IDENTIFICATION OF NATURAL PIGMENTS PRODUCERS OF FUNGUS ISOLATED FROM SOIL AND OPTIMISATION OF PIGMENT PRODUCTION**

**MSC THESIS**

**SİNAN GUNER**

**BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE**

**BIOLOGY**

**(SUPERVISOR: PROF.DR.TULIN ASKUN )**

**BALIKESİR, JUNE 2018**

It is now known that the use of synthetic dyes has harmful effects on the environment and causes allergic asthma, toxigenic and carcinogenic diseases seen in humans. For this reason, the search for natural pigments from different sources (such as plants, insects, lichens, bacteria and minerals) that do not harm people and the environment continues all over the world. Studies to obtain pigments from fungi are quite new.

This study was carried out in order to determine the microfungal flora of soils in Manisa ,Akhisar Musaca. In this study , the isolation of microfungi from soil samples into culture media was performed via “soil dilution plate method” . , the production of pigments were investigated with strains isolated on soil samples and identified by molecular methods.

Pigment production in different mediums (SDA, MEA, PDA, and YEA), different temperatures (25, 28, 30 °C) and different pH's (5, 7, 9) the pigment was incubated for 15 days. The best pigment production was observed at pH 5.5, temperature 28 °C. Pigment extraction was rinsed with ethanol (w/v: 1/1) solvent for 72 hours at 160 rpm at 26 °C and filtered through 20 µm. The soluble was evaporated and which was then lyophilized to a red and yellow pigment. Pigment solution (500 mg / mL) was color characterized by different pH, temperature values and different solvents. By means of our study, pigment production were determined in the extracts of the isolates and the results were discussed.

**KEYWORDS:** Pigment Production, *Penicillium canescens*, *Penicillium purpurogenum*, Characterization of pigments.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Pigmentlerin Genel Tanımı .....	1
1.2 Pigmentlerin Sınıflandırılması .....	1
1.2.1 Yapay Pigmentler .....	1
1.2.2 Doğal Pigmentler .....	2
1.2.2.1 Bitkisel Pigmentler.....	2
1.2.2.2 Hayvansal Pigmentler .....	3
1.2.2.3 Mikrobiyal Pigmentler .....	3
1.3 Pigmentlerin Kullanım Alanları .....	4
1.4 Küflerin Genel Özellikleri.....	5
1.4.1 Küflerin Üremesini Etkileyen Faktörler .....	6
1.4.1.1 Oksijen Etkisi .....	6
1.4.1.2 Sıcaklığın Etkisi .....	6
1.4.1.3 Ph'ın Etkisi.....	7
1.4.1.4 Suyun Etkisi .....	7
1.5 <i>Penicillium</i> Cinsi Genel Özellikleri .....	7
1.5.1 Sistematikteki Yeri .....	8
1.5.2 Kullanım Alanları .....	9
1.5.3 Gıda Mikrobiyolojisindeki Yeri ve Önemi.....	9
1.5.3.1 Aflatoksinler.....	10
1.5.3.2 Okratoksin A (OTA) .....	10
1.5.3.3 Fumonisinler .....	10
1.5.3.4 Patulin .....	10
1.5.3.5 Penisilik Asit.....	11
1.5.3.6 Sitrinin.....	11
1.6 <i>Penicillium purpurogenum</i> .....	11
1.6.1 Morfolojik Özellikleri.....	11
1.7 <i>Penicillium canescens</i> .....	12
1.7.1 Morfolojik Özellikler .....	12
<b>2. MATERYAL VE METOT</b> .....	<b>13</b>
2.1 Araziden Toprak Örneklerinin Alınması.....	13
2.2 Kullanılan Besiyerleri.....	15
2.3 Toprak Örneklerinin Hazırlanması.....	17
2.3.1 İzolasyon Besiyerinin Seçimi .....	17
2.3.2 Örneklerin Ekimi .....	17
2.3.2.1 Toprağı Sulandırma Metodu .....	17
2.4 Koloni Oluşturan Fungal Birimlerin Sayılması.....	18
2.5 Fungusların Saflaştırılması ve İzolasyonu .....	18
2.6 Pigment Üreticilerin Belirlenmesi .....	19

2.7	Seçilen Pigment Üretici İzolatların Teşhisi.....	19
2.7.1	Morfolojik Analiz .....	19
2.7.1.1	Mikromorfolojik Analiz .....	19
2.7.1.2	Makromorfolojik Analiz .....	20
2.7.2	DNA İzolasyonu .....	20
2.7.3	PCR Reaksiyonu .....	20
2.8	Pigment Üretimine Çeşitli Faktörlere Karşı İncelenmesi .....	21
2.8.1.1	Farklı Sıcaklık Değerlerinin Koloni Gelişimi ve Pigment Üretimi Üzerine Etkisi .....	21
2.8.1.2	Farklı Element Konsantrasyonlarının Koloni Gelişimi ve Pigment Üretimi Üzerine Etkisi .....	21
2.8.1.3	Farklı pH Değerlerinin Koloni Gelişimi ve Pigment Üretimi Üzerine Etkisi.....	22
2.9	Katı Besiyerlerinde Pigment Üretimi .....	22
2.9.1	Pigment Ekstresinin Hazırlanması.....	22
2.9.2	Pigmentlerin Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi .....	23
2.9.2.1	Pigmentlerin Spektral Analizleri.....	23
2.9.2.2	Hunter Renk Sistemine Göre Pigmentlerin Renk Tayini.....	23
2.10	Aflatoksin Analizi .....	24
2.10.1	Kullanılan Cihaz İle İlgili Özellikler .....	24
2.11	Kullanılan Cihazlar.....	25
<b>3.</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>26</b>
3.1	Toprak Örneklerinden Elde Edilen Mikrofungus Sayısı .....	26
3.2	Toprak Örneklerinden İzole Edilen Funguslar .....	26
3.3	İdentifikasyon Bulguları.....	26
3.4	Pigment Üreticilerine Ait Morfolojik Analiz Bulguları .....	27
3.4.1	Pigment Üreticilerine Ait Mikromorfojik Bulgular.....	27
3.4.2	Pigment Üreticilerine Ait Makromorfolojik Bulgular .....	28
3.5	Pigment Üretimine Etki Eden Faktörlere Ait Bulgular .....	35
3.5.1	Farklı Sıcaklık Değerlerinin Koloni Gelişimi ve Pigment Üretimi Üzerine Etkisine Ait Bulgular .....	35
3.5.2	Farklı Element Konsantrasyonlarının Koloni Gelişimi ve Pigment Üretimi Üzerine Etkisine ait Bulgular.....	41
3.5.3	Farklı pH Değerlerinin Koloni Gelişimi ve Pigment Üretimi Üzerine Etkisine ait Bulgular.....	59
3.6	Katı Besiyerinde Pigment Üretimine Ait Bulgular .....	65
3.7	Pigment Eksresinin Elde Edilmesi .....	66
3.8	Spektral Analizler.....	66
3.8.1	Pigment Ekstrelerinin Farklı Çözücülerdeki Spektral Analizleri .....	66
3.8.2	Pigment Ekstrelerinin Farklı pH Değerlerindeki Spektral Analizleri .....	68
3.8.3	Pigment Ekstrelerinin Farklı Sıcaklık Değerlerindeki Spektral Analizleri .....	70
3.8.4	Hunter Renk Sistemine Göre Pigmentlerin Renk Tayini.....	71
3.9	Aflatoksin Analiz Sonuçları .....	72
<b>4.</b>	<b>TARTIŞMA .....</b>	<b>73</b>
<b>5.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>76</b>
<b>6.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>77</b>
<b>7.</b>	<b>EKLER.....</b>	<b>86</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1: Toprak Örneğinin Alınması.....	13
Şekil 2.2: Toprak Örnekleri.....	14
Şekil 2.3: Hunter Renk Sistemi.....	24
Şekil 3.1: <i>P. canescens</i> Filogenetik Ağaç.....	27
Şekil 3.2: <i>P. purpurogenum</i> Filogenetik Ağaç.....	27
Şekil 3.3: <i>P. canescens</i> Mikroskop Görüntüleri.....	28
Şekil 3.4: <i>P. purpurogenum</i> Mikroskop Görüntüleri.....	28
Şekil 3.5: <i>P. purpurogenum</i> ' da Pigment Üretiminde Farklı Besiyerleri için Petri Kabının Üstten Görünümü.....	31
Şekil 3.6: <i>P. purpurogenum</i> ' da Pigment Üretiminde Farklı Besiyerleri için Petri Kabının Altan Görünümü.....	32
Şekil 3.7: <i>P. canescens</i> ' de Pigment Üretiminde Farklı Besiyerleri için Petri Kabının Üstten Görünümü.....	33
Şekil 3.8: <i>P. canescens</i> ' de Pigment Üretiminde Farklı Besiyerleri için Petri Kabının Altan Görünümü.....	34
Şekil 3.9: <i>P. purpurogenum</i> ' da Pigment Üretiminde Farklı Sıcaklık Değerleri İçin Petri Kabının Üstten Görünümü.....	37
Şekil 3.10: <i>P. purpurogenum</i> ' da Pigment Üretiminde Farklı Sıcaklık Değerleri İçin Petri Kabının Altan Görünümü.....	38
Şekil 3.11: <i>P. canescens</i> ' de Pigment Üretiminde Farklı Sıcaklık Değerleri İçin Petri Kabının Üstten Görünümü.....	39
Şekil 3.12: <i>P. canescens</i> ' de Pigment Üretiminde Farklı Sıcaklık Değerleri İçin Petri Kabının Altan Görünümü.....	40
Şekil 3.13: <i>P. purpurogenum</i> ' da Pigment Üretiminde Demir Elementinin Farklı Konsantrasyonlar için Petri Kabının Üstten Görünümü.....	43
Şekil 3.14: <i>P. purpurogenum</i> ' da Pigment Üretiminde Demir Elementinin Farklı Konsantrasyonlar için Petri Kabının Altan Görünümü.....	44
Şekil 3.15: <i>P. canescens</i> ' de Pigment Üretiminde Demir Elementinin Farklı Konsantrasyonlar için Petri Kabının Üstten Görünümü.....	45
Şekil 3.16: <i>P. canescens</i> ' de Pigment Üretiminde Demir Elementinin Farklı Konsantrasyonlar için Petri Kabının Altan Görünümü.....	46
Şekil 3.17: <i>P. purpurogenum</i> ' da Pigment Üretiminde Bakır Elementinin Farklı Konsantrasyonlar için Petri Kabının Üstten Görünümü.....	49
Şekil 3.18: <i>P. purpurogenum</i> ' da Pigment Üretiminde Bakır Elementinin Farklı Konsantrasyonlar için Petri Kabının Altan Görünümü.....	50
Şekil 3.19: <i>P. canescens</i> ' de Pigment Üretiminde Bakır Elementinin Farklı Konsantrasyonlar için Petri Kabının Üstten Görünümü.....	51
Şekil 3.20: <i>P. canescens</i> ' de Pigment Üretiminde Bakır Elementinin Farklı Konsantrasyonlar için Petri Kabının Altan Görünümü.....	52
Şekil 3.21: <i>P. purpurogenum</i> ' da Pigment Üretiminde Alüminyum Elementinin Farklı Konsantrasyonlar için Petri Kabının Üstten Görünümü.....	55
Şekil 3.22: <i>P. purpurogenum</i> ' da Pigment Üretiminde Alüminyum Elementinin Farklı Konsantrasyonlar için Petri Kabının Altan Görünümü.....	56

<b>Şekil 3.23:</b> <i>P. canescens</i> ' de Pigment Üretiminde Alüminyum Elementinin Farklı Konsantrasyonlar için Petri Kabinin Üstten Görünümü.....	57
<b>Şekil 3.24:</b> <i>P. canescens</i> ' de Pigment Üretiminde Alüminyum Elementinin Farklı Konsantrasyonlar için Petri Kabinin Alttan Görünümü. ....	58
<b>Şekil 3.25:</b> <i>P. purpurogenum</i> ' da Pigment Üretiminde Farklı pH Değerleri için Petri Kabinin Üstten Görünümü.....	61
<b>Şekil 3.26:</b> <i>P. purpurogenum</i> ' da Pigment Üretiminde Farklı pH Değerleri için Petri Kabinin Alttan Görünümü. ....	62
<b>Şekil 3.27:</b> <i>P. canescens</i> ' de Pigment Üretiminde Farklı pH Değerleri için Petri Kabinin Üstten Görünümü.....	63
<b>Şekil 3.28:</b> <i>P. canescens</i> ' de Pigment Üretiminde Farklı pH Değerleri için Petri Kabinin Alttan Görünümü. ....	64
<b>Şekil 3.29:</b> <i>P. purpurogenum</i> MEA ile Pigment Üretimi. ....	65
<b>Şekil 3.30:</b> <i>P. canescens</i> MEA ile Pigment Üretimi.....	65
<b>Şekil 3.31:</b> <i>P. canescens</i> Farklı Solventler ile 500 mg/mL Konsantrasyonundaki Pigment Çözeltileri.....	66
<b>Şekil 3.32:</b> <i>P. purpurogenum</i> Farklı Solventler ile 500 mg/mL Konsantrasyonundaki Pigment Çözeltileri.....	67
<b>Şekil 3.33:</b> <i>P. canescens</i> ' in Farklı Solventlerde 500 mg/mL Konsantrasyonundaki Pigment Çözeltilerinin 450 nm Dalga Boyundaki Absorbans Değerleri..	67
<b>Şekil 3.34:</b> <i>P. purpurogenum</i> ' un Farklı Solventlerde 500 mg/ml Konsantrasyonundaki Pigment Çözeltilerinin 450 nm Dalga Boyundaki Absorbans Değerleri..	68
<b>Şekil 3.35:</b> <i>P. purpurogenum</i> 'un 500 mg/mL Konsantrasyondaki Pigment Çözeltisinin Farklı pH (1-13) Değerlerindeki Renk Değişimi. ....	69
<b>Şekil 3.36:</b> <i>P. canescens</i> 'in 500 mg/mL Konsantrasyondaki Pigment Çözeltisinin Farklı pH (1-13) Değerlerindeki Renk Değişimi. ....	69
<b>Şekil 3.37:</b> <i>P. purpurogenum</i> ve <i>P. canescens</i> Pigment Çözeltilerinin Farklı pH Değerlerindeki Absorbans Değerleri. ....	69
<b>Şekil 3.38:</b> <i>P. purpurogenum</i> ' un Pigment Çözeltisinin Farklı Sıcaklık Değerlerinde Renk Değişimi.....	70
<b>Şekil 3.39:</b> <i>P. canescens</i> ' in Pigment Çözeltisinin Farklı Sıcaklık Değerlerinde Renk Değişimi.....	70
<b>Şekil 3.40:</b> <i>P. purpurogenum</i> ve <i>P. canescens</i> Pigment Çözeltilerinin Farklı Sıcaklık Değerlerindeki Absorbans Değerleri.....	71

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 2.1:</b> Toprak Veri Tablosu.....	14
<b>Tablo 2.2:</b> PCR Reaksiyonunda Kullanılan Bileşikler.....	20
<b>Tablo 2.3:</b> PCR Reaksiyonları.....	21
<b>Tablo 3.1:</b> <i>P. purpurogenum</i> türünde farklı besiyerlerinin koloni büyümesi üzerine etkisi. ....	29
<b>Tablo 3.2:</b> <i>P. canescens</i> türünde farklı besiyerlerinin koloni büyümesi üzerine etkisi. ....	29
<b>Tablo 3.3:</b> Petri yüzeyinde pigment oluşumunun derecelendirilmesi. ....	29
<b>Tablo 3.4:</b> Farklı besiyerleri için <i>P. purpurogenum</i> ' da pigment oluşumunun derecelendirilmesi. ....	30
<b>Tablo 3.5:</b> Farklı besiyerleri için <i>P. canescens</i> ' de pigment oluşumunun derecelendirilmesi. ....	30
<b>Tablo 3.6:</b> <i>P. purpurogenum</i> türünde sıcaklık değişimlerinin koloni büyümesi üzerine etkisi.....	35
<b>Tablo 3.7:</b> <i>P. canescens</i> türünde sıcaklık değişimlerinin koloni büyümesi üzerine etkisi. ....	35
<b>Tablo 3.8:</b> Farklı sıcaklık değerleri için <i>P. purpurogenum</i> ' da pigment oluşumunun derecelendirilmesi.....	36
<b>Tablo 3.9:</b> Farklı sıcaklık değerleri için <i>P. canescens</i> ' de pigment oluşumunun derecelendirilmesi.....	36
<b>Tablo 3.10:</b> <i>P. purpurogenum</i> türünde demir (Fe) elementinin koloni büyümesi üzerine etkisi.....	41
<b>Tablo 3.11:</b> <i>P. canescens</i> türünde demir (Fe) elementinin koloni büyümesi üzerine etkisi. ....	41
<b>Tablo 3.12:</b> Farklı demir konsantrasyonları için <i>P. purpurogenum</i> ' da pigment oluşumunun derecelendirilmesi. ....	42
<b>Tablo 3.13:</b> Farklı demir konsantrasyonları için <i>P. canescens</i> ' de pigment oluşumunun derecelendirilmesi.....	42
<b>Tablo 3.14:</b> <i>P. purpurogenum</i> türünde bakır (Cu) elementinin koloni büyümesi üzerine etkisi.....	47
<b>Tablo 3.15:</b> <i>P. canescens</i> türünde bakır (Cu) elementinin koloni büyümesi üzerine etkisi. ....	47
<b>Tablo 3.16:</b> Farklı bakır konsantrasyonları için <i>P. purpurogenum</i> ' da pigment oluşumunun derecelendirilmesi. ....	48
<b>Tablo 3.17:</b> Farklı bakır konsantrasyonları için <i>P. canescens</i> ' de pigment oluşumunun derecelendirilmesi.....	48
<b>Tablo 3.18:</b> <i>P. purpurogenum</i> türünde alüminyum(Al) elementinin koloni büyümesi üzerine etkisi.....	53
<b>Tablo 3.19:</b> <i>P. canescens</i> türünde alüminyum(Al) elementinin koloni büyümesi üzerine etkisi.....	53
<b>Tablo 3.20:</b> Farklı Al konsantrasyonları için <i>P. purpurogenum</i> ' da pigment oluşumunun derecelendirilmesi.....	54
<b>Tablo 3.21:</b> Farklı Al konsantrasyonları için <i>P. canescens</i> ' de pigment oluşumunun derecelendirilmesi.....	54

<b>Tablo 3.22:</b> <i>P. purpurogenum</i> türünde pH değişimlerinin koloni büyümesi üzerine etkisi. ....	59
<b>Tablo 3.23:</b> <i>P. canescens</i> türünde pH değişimlerinin koloni büyümesi üzerine etkisi. ....	59
<b>Tablo 3.24:</b> Farklı pH değerleri için <i>P. purpurogenum</i> ' da pigment oluşumunun derecelendirilmesi.....	60
<b>Tablo 3.25:</b> Farklı pH değerleri için <i>P. canescens</i> ' de pigment oluşumunun derecelendirilmesi. ....	60
<b>Tablo 3.26:</b> Hunter kalorimetresi değerleri. ....	71
<b>Tablo 3.27:</b> Color grap (color detection) uygulaması değerleri. ....	71

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>SDA</b>	:Sabrouaud Dekstroz Agar
<b>MEA</b>	:Malt Extract Agar
<b>PDA</b>	:Patates Dekstroz Agar
<b>YEA</b>	:Yeast Extract Sucrose Agar
<b>OTA</b>	:Okratoksin-A
<b>DNA</b>	:Deoksiribonükleik asit
<b>PCR</b>	:Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>CFU</b>	:Koloni Oluşturan Birim Sayısı
<b>MAM</b>	:Marmara Araştırma Merkezi
<b>TÜBİTAK</b>	:Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu

## ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimimin ilk gününden sonuna kadar geçen sürede, her aşamada desteğini esirgemeyen, bilgi birikimini, tecrübesini ve değerli zamanını benimle paylaşan, tezin oluşumunda, düzenlenmesinde ve değerlendirilmesinde her türlü katkıda bulunan danışman hocam sayın Prof. Dr. Tülin AŞKUN' a teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve yardımlarını benden esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Gülendam TÜMEN'e ve Doktor Öğretim Görevlisi Görkem Deniz SÖNMEZ'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Yardım ve desteğinden dolayı laboratuvar çalışma arkadaşım yüksek lisans öğrencisi Youcef BOUHRİ' ye teşekkür ederim.

Yanımda olup hayatımı daha değerli kılan ve yanımda olmaktan hiç vazgeçmeyen ve asla vazgeçmeyeceğini bildiğim sevgili eşim Pınar GÜNER' e çok teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan desteğini her zaman hissettiğim değerli aileme teşekkür ederim.

Sinan GÜNER

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Pigmentlerin Genel Tanımı

Pigmentler, bitkisel, hayvansal, inorganik ya da mikrobiyal bir kaynaktan elde edilen ekstraksiyon, izolasyon, sentez veya benzeri işlemlerle yapılan boyar maddelerdir. Gıdaya, ilaca, kozmetik veya insan vücuduna uygulandığında ya da eklendiğinde (tek başına veya reaksiyon yoluyla) renk özelliği gösteren karakteristik maddelerdir [1].

Pigmentlerin tarihsel geçmişi, tarih öncesi mağara boyalarının uygulanması sırasında kullanılan hematit ve kahverengi demir cevherine dayanır. M.Ö. 2000 'li yıllarda doğal demir (III) oksit bazen manganez filizleriyle karışık halde yakılarak çömlekçilikte kullanılmak üzere, kırmızı, menekşe, siyah pigmentlerin üretiminde kullanılmıştır. 20. yy'da pigmentlerin kullanım alanları hızla artmıştır ve bilimsel araştırmalar için önemli bir hale gelmiştir. Son 50 yıldır, yapay renkli pigmentler, kadmiyum kırmızısı, manganez mavisi, molibden kırmızısı, bizmutla karışık oksitler pazardaki yerini almıştır [2].

## 1.2 Pigmentlerin Sınıflandırılması

Renklendirici maddeler olarak tanımlanan pigmentler, kimyasal yapıları, elde edilme kaynakları, kullanış alanları gibi birçok faktör göz önüne alınarak birbirinden ayrılmaktadır. Pigmentler için kullanılan en genel sınıflandırmada elde edilme şekline göre yapay ve doğal olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır [3].

### 1.2.1 Yapay Pigmentler

Yapay renk maddeleri kimyasal yapıları nedeniyle doğada bulunmamaktadır fakat kimyasal sentez yolu ile üretilebilmektedir. Yapay renk maddeleri suda veya

yağda çözünebilme özelliğine sahip maddelerdir. Yapay renk maddelerinin sentezinde genellikle kömür katranı kullanılır. Yapay renk maddeleri dayanıklı bir yapıya sahip olmasına rağmen toksik özellik göstermektedir. Yapay renk maddelerinin renk verme gücü, renk aralıkları ve stabiliteleri daha yüksek ve ayrıca kullanımları daha uygun olmalarına rağmen. sentetik boyaların insan sağlığı ve çevre üzerine olan olumsuz etkileri nedeniyle tüketicinin doğal pigmentlere yönelmesine neden olmuştur [4].

### **1.2.2 Doğal Pigmentler**

Renk maddeleri, hayvan bitki veya mikroorganizma gibi biyolojik kaynaklardan elde edildiği zaman doğal olarak kabul edilir. Doğal pigmentler organik kökenli (bitkiler, hayvanlar veya mikroorganizmalar tarafından sentezlenen) renk maddeleridir. Bir kısmı da minerallerin doğal yapısında mevcuttur. Renk aralıkları sınırlı olan bu renk maddeleri zayıf bir renklendirme gücüne sahiptirler, ısı ve pH'dan etkilenirler [5]. İnsanların yoğun bir şekilde tükettikleri gıda, kozmetik, ilaç ve boya üretiminde yaygın olarak kullanılan bazı yapay renk maddelerinin zararlı etkilerinin belirlenmesi, dünya çapında insanları doğal kaynaklardan pigment üretimine yönlendirmiştir [6].

#### **1.2.2.1 Bitkisel Pigmentler**

Bitkiler kullanılarak elde edilen pigment maddeleri ile yapılan boyamaların, ilk olarak M.Ö.3000 yıllarına dayandığı bilimsel olarak tespit edilmiştir [6]. Bitkisel pigmentlerin elde edilmesinde bitkilerin çiçek, meyve, yaprak, gövde ve kök gibi kısımları kullanılır. Bitkilerdeki pigment maddelerinin az miktarda olması, yetiştiği bölgeye göre değişiklik göstermesi, mevsimlere bağlı olması, yılda bir veya birkaç sefer ürün alınabilmesi, iş gücü gerektirmesi bitkisel pigmentlere olan ilgiyi azaltmıştır [7].

### 1.2.2.2 Hayvansal Pigmentler

Hayvansal pigmentler, doğal pigmentler arasında yer almaktadır. Hayvanlar kullanılarak elde edilen pigment maddeleri ile yapılan çalışmalarda; M.Ö. 3000 yıllarında Eski Mezopotamya'da kermes böceği ve M.Ö. 1500 yıllarında Hindistan'da lak böceği kullanılarak elde edilen kırmızı renk yer almaktadır [8]. Hayvansal pigment maddelerinin az miktarda olması, renk maddesinin sınırlı olması ve elde edilmesinin zor olması hayvansal pigmentlere olan ilginin azalmasına neden olmuştur [9].

### 1.2.2.3 Mikrobiyal Pigmentler

Mikroorganizmalar kendi hücreleri içerisinde kalan veya buldukları ortama saldıkları bazı renkli maddeler üretirler. Doğada renk bakımından zengin ve pigment üreten mikroorganizmalar (küfler, mayalar ve bakteriler) oldukça yaygındır. Mikroorganizmalar karotenoidler, melaninler, flavinler, kinonlar, prodigiosinler ve özellikle monaskinler, viyolaseyin veya indigo gibi çeşitli pigmentleri sentezlemektedir. Mikrobiyal pigmentler daha güvenlidir. Bitki ve hayvanlardan elde edilen doğal pigmentlere göre daha ekonomik kaynaklardır. Mikrobiyal pigmentlerin hastalıklara neden olmadığı antibiyotik ve anti-kanser özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Mikroorganizmaların üretilmesi kolay ve ekonomiktir, piyasaya istendiği kadar arz edilebilir [10].

Bazı bakteriler ve bazı mantarlar pigment üretebilmektedirler. Bakteriler hücre içinde kalan veya buldukları ortama renk veren maddeler salgırlar. Hücre içi pigmentler suda erimezler ve besiyerini boyamazlar. Hücre dışı pigment üretenlerde ise pigment besiyeri içerisine diffüzenir ve bu pigmentler suda çözünme özelliğine sahiptirler [11].

Son yıllarda *Staphylococcus aureus* tarafından sentezlenen altın renginde stafiloksantin, *Pseudomonas* spp. tarafından sentezlenen mavi-yeşil fikosiyenin, *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus* spp. tarafından sentezlenen koyu kahverengi pigmentler önem kazanmıştır [12].

Yapılan bir diğer çalışmada, 27 °C ve 37 °C 'lerde üretilen *Coriolus versicolor*, *Paecilomyces canadensis* ve *Streptomyces werraensis* suşlarının sıcaklığına bağlı olarak farklı renkte pigment sentezledikleri belirlenmiştir [13].

Mikrobiyal pigmentler, hiçbir mevsimsel üretim sorunu göstermediğinden ve yüksek verimlilik sağlamaları nedeniyle bitki veya hayvanlardan elde edilen doğal renk maddelerine göre daha etkili ve uygun maddelerdir [14].

### 1.3 Pigmentlerin Kullanım Alanları

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 [15]. Bunun için çeşitli maddelerden boyarmadde elde edilmesi için çalışmalar yapılmıştır. Yapay boyaların kullanılmasının evre üzerinde zarar verici etkisi olduğu ve insanların sağlığını olumsuz etkilediği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu nedenlerle çeşitli doğal kaynaklardan bitkiler, hayvanlar, algler, bakteriler, funguslar ve likenlerden doğal boyar madde üretilmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir. Tüm dünyada çevreye ve insanlara zarar vermeyen doğal pigmentlerin araştırılması büyük önem kazanmıştır ve farklı parametreler (sıcaklık, ph, nem, çalkalama hızı ve farklı besiyeri kaynakları) kullanılarak yapılan çalışmalar giderek önem kazanmıştır. [16]. Filamentli funguslar, çok çeşitli renk profiline sahiptir. Kolay ve ölçek büyütme ile gıdaların boyanmasında da kullanılan pigmentlerin üretilmesi mümkündür [17].

*Aspergillus* ve *Penicillium* genuslarına ait mikroorganizmalar doğal pigmentlerin potansiyel üreticileri olarak tanımlanmıştır. *Penicillium* suşlarından elde edilen pigmentlerin üretimi, sitrin üretimi olmadığı için gıda endüstrisinde etkin bir kullanım alanına sahiptir [18].

Funguslarda pigment üretiminde, sıcaklık ve ph; genel olarak metabolik yolların aktive olmasında etkilidir [19]. Yüksek konsantrasyonda elde edilen ve verimliliği yüksek olan pigmentlerin kültür ortamının pH ve sıcaklığına ek olarak metabolik reglasyonlarda da önemli rol oynar [20].

*Monascus* cinsleri tarafından üretilen kırmızı renkli pigmentler, kanserin önlenmesi, kan şekeri düzeylerini düşürülmesi, gıda ürünlerinin renklendirilmesi ve tatlandırılmasında, korunmasında kullanılır [21].

Sentetik ve doğal pigmentler yiyeceklerde, kozmetik ve farmasötik endüstrilerinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Doğal pigmentler bitkiler [22], böcekler [23], ve mikroorganizmalardan üretilmektedir [24]. Bazı sentetik pigmentlerin potansiyel toksik etkileri konusundaki düşünceler, doğal kaynaklardan türetilmiş pigmentlere olan ilginin artmasına neden olmuştur [25].

Venil ve Lakshmanaperumalsamy (2009) tarafından yapılan çalışmada kimyasal boyaların aksine, mikroorganizmalardan elde edilen pigmentlerin kanser ve alerji gibi hastalıklara neden olmadığı, hatta antibiyotik ya da anti-kanser özelliklere sahip olduğunu tespit edilmiştir [26]. Bu nedenle mikroorganizmalardan elde edilen pigmentler son yıllarda en dikkat çekici konular arasında yer almaktadır.

#### **1.4 Küflerin Genel Özellikleri**

Mikoloji; mayalar, küfler, makromantarlar ve mantara benzeyen mikroorganizmalarla uğraşan bilim dalıdır.

Mantarlar ökaryotik canlılar olup beşinci alemi oluştururlar. Küfler ökaryotik mikroorganizmalardandır. Saprofit (çürükçül) veya parazit olarak yaşayan çok hücreli organizmalardır. Küfler doğada hava, toprak, su ve organik maddeler üzerinde yaygın olarak bulunur. Çok hızlı bir şekilde yayılırlar. Büyüklükleri, değişik görünümleri, gerçek hücre çekirdeğine sahip olmaları ve değişik şekilde üremeleri gibi özellikleri sayesinde bakterilerden ayrılırlar. Küfler bazı gıdalarda renk ve aroma için kullanılır ancak bazı ürünlerde lezzet, renk ve görünüm bozukluklarına neden olurlar. Düşük pH, su aktivitesi ve ısı değerlerinde de yaşamlarını sürdürebilirler [27].

Küflerin temel yapı birimleri hif olarak adlandırılır ve hif topluluğuna misel adı verilir. Miseller besiyerlerinde koloni oluştururlar. Küflerde hifler enine bölünme

gösterebilir. Enine bölmeli yapılarına septum adı verilir ve hifler çok çekirdekli olabilirler [28].

### **1.4.1 Küflerin Üremesini Etkileyen Faktörler**

#### **1.4.1.1 Oksijen Etkisi**

Mikroorganizmaların, üremeleri için oksijene olan ihtiyaçları, farklılık göstermektedir. Mikroorganizmalar ortamda oksijen olup olmaması durumuna göre farklı gruplarda toplanırlar. Gelişmeleri için oksijene ihtiyaç duyan mikroorganizmalara aerob, gelişmek için oksijene ihtiyaç duymayanlara anaerob denir. Aerob olduğu halde oksijen yokluğunda kısmen gelişebilen mikroorganizmalar fakültatif anaerob, mutlak oksijene ihtiyaç duyanlar obligat aerob olarak adlandırılırlar. Küfler aerob mikroorganizmalardır. Bu nedenle daha çok yüzeyde gelişme gösterir [29].

#### **1.4.1.2 Sıcaklığın Etkisi**

Sıcaklık mikroorganizmaların gelişimini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Mikroorganizmalar çok geniş sıcaklık değerlerinde gelişim gösterebilirler. Bir mikroorganizmanın gelişebildiği en düşük sıcaklık  $-34^{\circ}\text{C}$ , en yüksek sıcaklık ise bazı yerlerde  $100^{\circ}\text{C}$ ' dir [30]. Gelişme sıcaklıklarına göre mikroorganizmalar üç gruba ayrılır.  $7^{\circ}\text{C}$  veya altında gelişen ve optimumları  $20-30^{\circ}\text{C}$  arasında olan mikroorganizmalar psikrotroflar olarak adlandırılırlar.  $20-45^{\circ}\text{C}$  arasında gelişen ve optimumları  $30-40^{\circ}\text{C}$  olanlara mezofil,  $45^{\circ}\text{C}$  veya daha yüksek sıcaklıkta gelişebilen, optimumları  $55-65^{\circ}\text{C}$  arasında olan mikroorganizmalara termofil adı verilir [31].

Küfler pH, ozmotik basınç ve besin içeriğinde olduğu gibi bakterilerden daha geniş sıcaklık aralıklarında gelişebilirler. *Aspergillus*, *Cladosporium* ve *Thamnidium* gibi pek çok küf çeşitli ortamlarda gelişebilme yeteneğindedir [32].

### 1.4.1.3 Ph'm Etkisi

Mikroorganizmaların gelişimini ve aktivitesini belirleyen önemli faktörlerden biri pH' dır. Bazı mikroorganizmalar pH 4' ün altında gelişmekle birlikte büyük bir kısmı en iyi pH 7,0 (6,6-7,5) civarında büyümektedirler [33].

Patojen bakteriler başta olmak üzere bakteriler, pH bakımından küf ve mayalara göre daha seçicidirler. Küflerin üreyebildiği pH değerleri çok geniştir. Küfler 1,3 – 9,6 pH'lar arasında faaliyet gösterebilir. Optimum büyüme pH'ları 5- 6 olan hafif asitli ortamlarda daha iyi gelişir [34].

### 1.4.1.4 Suyun Etkisi

Küfler bakterilere ve mayalara oranla daha az su aktivitesine gereksinim duyarlar. Ancak bazı küflerin minimum su aktivite değeri bazı mayaların minimum su aktivite değerinden daha yüksek olabilir. Bozulma etmeni olan küflerin gelişebildiği minimum su aktivitesi 0,80'dir. Küfler nem oranının % 10-13'ün altına düştüğü ortamlarda üreyemez [35].

## 1.5 *Penicillium* Cinsi Genel Özellikleri

*Penicillium* cinsinin taksonomide tanımlanmış 150 türü belirtilmiştir ancak daha sonra yapılan çalışmalar bu sayının yaklaşık 350 olduğunu göstermiştir [36]. *Penicillium* cinsine ait yaygın türler sentetik veya yarı sentetik ortamlarda büyür, yayılır, genelde cins seviyesinde kolayca tanınırlar [37]. *Penicillium* türlerinin büyük çoğunluğu saprofitlerdir. Türlerin çoğu optimum gelişmeyi orta sıcaklıklarda ve su aktivitesi 0.9'un altında gösterirler. Birçoğu toprak kaynaklıdır, bitkisel atıkların parçalanmasına ve gıdaların bozulmasına sebep olurlar [38].

*Penicillium'* da sınıflandırma esas olarak mikroskopik morfolojiye dayanmaktadır *Penicillium'*lar septalı misellere sahiptir. Konidioforlar dallanmış ya da tek halde bulunabilir. Uç taraflarında fırça görünümünde konidi taşıyıcıları bulunur ve konidyumları yuvarlak olup maviden, mavi-yeşile kadar değişen tonlarda

koloni oluştururlar. *Penicillium*'larda konidiyofor hücrelerinde (stipes) bulunan sterigmatalar, metula sayısı ve düzenine bakılarak sınıflandırma yapılır [38].

### 1.5.1 Sistematikteki Yeri

Fungi aleminde yer alan organizmalarda hem eşeyli hem de eşeysiz üreme evreleri görülmektedir. Mantar sınıflandırılmasında kullanılan temel kriterler, eşeyli üreme evresi sırasında oluşturdukları üreme yapılarıdır. Fakat eşeyli üreme yapıları özel koşullar altında meydana geldiği için bazı fungus eşeyli üreme evrelerinin tamamen ortadan kalktığı düşünülebilir ya da bu yapılar henüz tam olarak tanımlanamamış olabilir. Bu sebepten dolayı funguslar günümüzde iki şekilde sınıflandırılmaktadır. Fungusların yaşam döngülerinin eşeyli üreme evrelerinde oluşturdukları fruktifikasyon yapıları, eşeyli sporları ve tallus yapıları dikkate alınarak gerçekteştirilen sınıflandırma şekli olan "teleomorfik" sınıflandırma ve eşeyli üreme yapıları tespit edilemediği için, fungusların tallus yapıları ve eşeysiz sporları dikkate alınarak yapılan sınıflandırma biçimi olan "anamorfik" sınıflandırmalardır [39].

Literatürde, fenotipe dayalı hatalı tanı konusunda oldukça fazla çalışma vardır. Bu tür karışıklıkların önüne geçilmesi için günümüzde güvenilirliğinden dolayı moleküler yöntemler tercih edilmeye başlamıştır. Moleküler yöntemlerde ağırlıklı olarak kullanılan moleköl DNA'dır. DNA molekülleri evrimsel değişikliğin ilk olarak yansıdığı moleküller olduğu için moleküler araştırmalar daha güvenilir ve hızlı sonuçlara ulaşmamızı sağlayabilmektedir [40].

**Kingdom:** Fungi  
**Division:** Ascomycota  
**Class:** Eurotiomycetes  
**Order:** Eurotiales  
**Family:** Trichocomaceae  
**Genus:** *Penicillium* Link (1809)

### 1.5.2 Kullanım Alanları

Major antibiyotiklerin üreticisi olan çeşitli *Penicillium* türleri mevcuttur. *P. chrysogenum* (eski adıyla *P. notatum*) tarafından üretilen penisilin, 1929' da Alexander Fleming tarafından keşfedildi ve Gram pozitif bakterilerin büyümesini inhibe ettiği belirlendi [41].

*Penicillium* cinsinin türleri peynir ve çeşitli et ürünlerinin üretiminde önemli bir rol oynamaktadır. *P. camemberti* ve *P. roqueforti*; Camembert, Brie, Roquefort ve diğer birçok peynirlerin üretiminde yer alan küflerdir. *P. nalgiovense*, sosis ve jambonun tadını arttırmanın yanı sıra diğer küfler ve bakterileri üremesini önlemek için kullanılır. Peynir ve sosis hazırlanmasında kullanılan [42] *Penicillium* türleri ayrıca gıda endüstrisi için renklendirici olarak kullanılabilirler pigmentleri de üretmektedir [43].

*Penicillium* ve *Aspergillus* türlerinin, gıda sanayiindeki önemine ek olarak, biyoteknolojik olarak üretilen enzim ve diğer makromoleküllerin, örneğin glukonik, sitrik ve tartarik asitin, pektinaz, lipaz, amilaz, selülozlar ve proteazların üretilmesinde kullanılır [44].

### 1.5.3 Gıda Mikrobiyolojisindeki Yeri ve Önemi

Mikotoksinler, filamentöz mikrofunguslar tarafından üretilen, omurgalı hayvanlar tarafından sindirim, solunum ve absorpsiyon gibi doğal yollarla alınması sonucunda çeşitli hastalıklara sebep olan sekonder metabolitlerdir [41]. Mantarların tamamı sekonder metabolit üretirler. Bazı mikotoksinler akut olarak, bazıları kronik olarak, bazıları ise hem akut hem de kronik olarak toksik etki gösterirler. Ayrıca mikotoksinlerin birleşerek sinerjik etki göstermesi de mümkündür. Bu da farklı sekonder metabolit türlerinin mikrobiyolojik açıdan incelenmesini farklı bir boyuta taşır [42].

### 1.5.3.1 Aflatoksinler

Aflatoksin, insanlar ve tüm omurgalı hayvanlar üzerinde en etkili kanserojenik etkiye sahip olan doğal bileşik olarak bilinmektedir. Aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 en yaygın olarak üretilen bileşiklerdir. *Aspergillus flavus* tropikal ülkelerdeki birçok gıdada aflatoksin ürettiği bilinen en yaygın türdür [43].

### 1.5.3.2 Okratoksin A (OTA)

Okratoksin A' nın insanlar üzerindeki etkisi tam olarak anlaşılmamıştır. Ancak test edilen bütün hayvan türlerinde nefrotoksijenik etkiye neden olduğu görülmüştür. OTA; mısır, kuru fasulye, kuru üzüm kakao çekirdeği, kahve çekirdeği, soya fasulyesi, arpa, yulaf, turunçgil meyveleri ve yer fıstığı gibi besinlerde küflerin gelişmesi sonucu oluşmaktadır. Başlıca OTA üreten mikrofungusların; *Circumdati* ve *Nigri* ve *Penicillium section Verrucosa* olduğu tespit edilmiştir. [44].

### 1.5.3.3 Fumonisinler

*Fusarium verticillioides* ve *F. proliferatum* türleri mısırlardaki en önemli fumonisin kaynağıdır. Mısır ve pirinç üzerinde gelişen ve fumonisin üreten diğer türler ise; *F. nygamai*, *F. napiforme*, *F. thapsinum*, *F. anthophilum* ve *F. dlaminii* türleridir [45].

### 1.5.3.4 Patulin

Patulin *P. expansum*, *P. patulum* ve *P. byssochlamys*, *P. carneum*, *P. paneum*, *P. clavigerum*, *P. gladioli*, *P. griseofulvum*, *P. sclerotigneum*, ve *A. clavatus*, dahil olmak üzere *Aspergillus* ve *Penicillium* genuslarının çoğu türleri tarafından üretilen bir mikotoksindir Patulin genel olarak hem prokaryotlar hem de eukaryotlarda aşırı toksik etki gösterir fakat insanlardaki toksitesisi kesin olarak ispatlanmamıştır. *Penicillium expansum* şimdiye kadar tespit edilen en önemli patulin kaynağıdır [46].

### 1.5.3.5 Penisilik Asit

Penisilik asit üreten en önemli türler; *Penicillium puberulum* ve *Aspergillus ochraceus* türleridir. Penisilik asitin biyolojik etkileri patulin ile aynıdır. Karaciğer ve mide kanserine yol açtığı bilinmektedir. Buğday, yulaf, peynir ve kahve çekirdekleri toksin kaynağı olarak bildirilmiştir [47].

### 1.5.3.6 Sitrinin

Sitrinin hayvanlarda nöropatiye neden olan bir nörotoksindir. *Penicillium citrinum*, *P. viridicatum* ve bazı birkaç *Aspergillus* türleri tarafından üretilir. Sitrininin en önemli kaynağı; pirinç, küflü ekmeke, jambon, buğday, yulaf, çavdar ve arpadır [48].

## 1.6 *Penicillium purpurogenum*

### 1.6.1 Morfolojik Özellikleri

Malt Extract Agar (MEA) besiyerinde kolonileri hızlı gelişir ve oda sıcaklığında 15 günde 9 cm çapa ulaşır. Morfolojik olarak, fırça benzeri konidi taşıyıcıları ve yuvarlak şekilli uzun yeşil renkli konidi ile ayırt edilirler. Oldukça gevşek kompakt beyaz-açık yeşil bazal miselyum ve bol miktarda dik ve genellikle yığınlar halinde toplanmış yeşil konidi yapıları vardır ve koloni yüzeyini dar bir kenar hariç tamamen kaplamaktadır Koloni altı genellikle koyu kırmızı renktedir. 5. günden itibaren besiyerine pigment maddesi üretimi görülür. *Penicillium purpurogenum* genellikle toprakta, çürümüş organik atıklar üzerinde veya depolanan sebze ve meyveler üzerinde patojen olarak bulunur [49].

## 1.7 *Penicillium canescens*

### 1.7.1 Morfolojik Özellikler

MEA besiyerinde kolonileri yavaş gelişir ve oda sıcaklığında 15 günde 5 cm çapa ulaşır. Morfolojik olarak, fırça benzeri konidi taşıyıcıları ve yuvarlak şekilli uzun yeşil renkli konidileri ile ayırt edilirler. Oldukça sıkı kompakt beyaz bazal miselyum ve bol miktarda dik ve genellikle yığınlar halinde toplanmış yeşil konidi yapıları vardır ve koloni yüzeyini dar bir kenar hariç tamamen kaplamaktadır Koloni altı genellikle koyu kahverengidir. *Penicillium canescens* genellikle toprakta, çürümüş organik atıklar üzerinde veya depolanan sebze ve meyveler üzerinde patojen olarak bulunur ve ksilanaz ve glukosidaz üretimi yoluyla bitkisel materyallere zarar verebilir. *P. canescens* iyi bir kalsiyum fosfat çözücüsüdür [51].

## 2. MATERYAL VE METOT

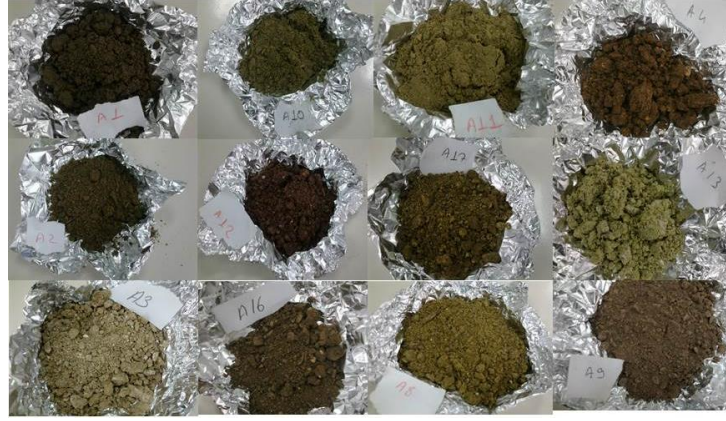
### 2.1 Araziden Toprak Örneklerinin Alınması

Bu çalışma için toprak örnekleri Manisa ili, Akhisar ilçesine bağlı Musaca Köyünden 2015 yılında toplanmıştır. Tablo 2.1’de toprak örneklerine ait veri tablosu yer almaktadır.

Araştırma yapılacak örneklerin alınmasında rastgele bir dağılım göz önünde bulundurulmuştur. Örneklerin alınmasında önce toprak profili açılmıştır ve profil yüzeyi temizlenerek düşey hale getirilmiştir. Daha sonra bir spatül alkol ile dezenfekte edilerek düşey toprak profil yüzeyinden sıyrılarak taze toprak yüzeyi açığa çıkarılmıştır. Spatül alkol ile tekrar dezenfekte edilerek yüzeyden yaklaşık 10 cm derinlikte yüzeye dik olarak spatülün saplanması ile toprak örneği alınmış ve daha önceden hazırlanmış olan torbalara konularak etiketlenmiştir [52].



Şekil 2.1: Toprak örneğinin alınması.



**Şekil 2.2:** Toprak örnekleri.

**Tablo 2.1:**Toprak veri tablosu.

Numune no	Toplandığı yer	Tarih	İzolat sayısı
A-1	Manisa/Akhisar/Musaca	20.10.2015	10
A-2	Manisa/Akhisar/Musaca	20.10.2015	12
A-3	Manisa/Akhisar/Musaca	20.10.2015	10
A-4	Manisa/Akhisar/Musaca	20.10.2015	7
A-5	Manisa/Akhisar/Musaca	20.10.2015	6
A-6	Manisa/Akhisar/Musaca	20.10.2015	8
A-7	Manisa/Akhisar/Musaca	20.10.2015	7
A-8	Manisa/Akhisar/Musaca	20.10.2015	9
A-9	Manisa/Akhisar/Musaca	20.10.2015	10
A-10	Manisa/Akhisar/Musaca	20.10.2015	8
A-11	Manisa/Akhisar/Musaca	20.10.2015	25
A-12	Manisa/Akhisar/Musaca	20.10.2015	7
A-13	Manisa/Akhisar/Musaca	20.10.2015	5
A-14	Manisa/Akhisar/Musaca	20.10.2015	9
A-15	Manisa/Akhisar/Musaca	20.10.2015	10
A-16	Manisa/Akhisar/Musaca	20.10.2015	9
A-17	Manisa/Akhisar/Musaca	20.10.2015	10

## 2.2 Kullanılan Besiyerleri

Agar içeren besiyerleri petri ve tüpte olmak üzere 2 tipte hazırlandı. Kaynatma işleminden sonra petride besiyeri hazırlamak için öncelikle 20 dakika 121 °C’ de sterilizasyon işlemi yapıldı ve beg alevi yanında besiyeri 15 mL olacak şekilde petri plaklarına paylaştırıldı. Tüplerde yatık agar hazırlamak için ise besiyeri tüplere 6 mL olacak şekilde paylaştırıldıktan sonra 1.5 atm basınç altında 20 dakika 121 °C’ de otoklavlanma işlemi gerçekleştirildi. Sterilizasyon işleminden sonra tüpler yatık olarak yerleştirilerek donması sağlandı. Petri ve yatık besiyerleri daha sonra kullanılmak üzere + 4 °C’ de buzdolabında saklandı. Deneysel çalışma için kullanılmış olan besiyeri içerikleri aşağıda verildi.

### **Rose Bengal Chloramphenicol Agar (Oxoid, pH 7.2 ± 0.2)**

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Mikolojik pepton	5,0 g
Glikoz	10,0 g
Dipotasyum fosfat	1,0 g
Magnezyum sülfat	0,5 g
Rose Bengal	0,05 g
Agar	15,5 g
1000 mL distile suyla tamamlanır [53].	

### **Malt Extract Agar (Oxoid, pH 5.5 ± 0.2)**

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Pepton	3,0 g
Agar	15,0 g
Malt ekstraktı	30,0 g
1000 mL distile suyla tamamlanır [54].	

### **Potato Dextrose Agar (Merck, pH 5.6 ± 0.2)**

Pigment üretimi ve karakterizasyonu için kullanıldı.

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Patates infüzyonu	4,0 g
Glucose	20,0 g
Agar-agar	15,0 g
1000 mL distile suyla tamamlanır [55].	

### **Sabrouaud Dekstroz Agar (Oxioid, pH 5.6 ± 0.2)**

Pigment üretimi ve karakterizasyonu için kullanıldı.

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Pepton	10,0 g
Agar	15,0 g
Glukoz	40,0 g
1000 mL distile suyla tamamlanır [56].	

### **Yeast Extract Agar (Merck, 6.5 ± 0.2)**

Kültür tanımlanmasında kullanıldı.

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Yeast Extract	5,0 g
Glukoz	10,0 g
Agar-agar	20,0 g
1000 mL distile suyla tamamlanır [57].	

## **Czapek Dox Agar (Merck, 7,3±0,2)**

Kültür tanımlanmasında kullanıldı.

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Sukroz	30,0 g
NaNO <sub>3</sub>	3,0 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
KCl	0,5 g
Demir(III)sülfat	0,01 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
Agar-agar	13,0 g

1000 mL distile suyla tamamlanır [58].

## **2.3 Toprak Örneklerinin Hazırlanması**

### **2.3.1 İzolasyon Besiyerinin Seçimi**

Toprak örneklerinden mikrofungusların elde edilmesinde toprak mikrobiyolojisi için en çok tercih edilen Rose Bengal Chloramphenicol Agar seçilmiştir [59]. Bunun nedeni; besiyeri bileşimindeki chloramphenicolun bakterilerin gelişimini baskılaması, rose bengalin ise küf hücrelerinin içine girerek bunların aşırı gelişmesini baskılamasıdır.

### **2.3.2 Örneklerin Ekimi**

#### **2.3.2.1 Toprağı Sulandırma Metodu**

Araziden alınan örnekler laboratuvara getirilinceye kadar, araştırma alanının uzaklığından dolayı soğuk termos içinde muhafaza edilmiştir. Laboratuvara getirilen

örnekler için izolasyon işlemine başlanmıştır. Bekleyen toprak örnekleri +4 °C’ de saklanmıştır.

“Toprağı sulandırma” metodu mikrobiyal floranın tespitinde en fazla kullanılan yöntemdir. Metodun uygulanmasında 1 gr firin kurusu toprağa karşılık gelen taze toprak bulunmuş ve 50 gr firin kurusu toprağa karşılık gelen taze toprağın kaç gr olduğu bulunmuştur. Bu miktar üzerine 500 mL tamamlanacak şekilde steril saf su ilave edilmiştir. Elde edilen 1/10 luk süspansiyonlar steril erlenlerde 30 dk çalkalanmıştır. Elde edilen süspansiyonlar, steril tüpler içindeki dilisyonları  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  olacak şekilde hazırlanmıştır. Dilüsyon yapılırken bir önceki örnekten 10 ml süspansiyon üzerine 90 ml steril su ilave edilmiştir. Elde edilen süspansiyonlar toprak parçaları ve organik madde parçacıkları dibe çökmeden 1 ml alınarak Rose Bengal Agara yayma plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriyerler 28 °C’ de 3-5 gün inkübasyon periyodu sonunda ortaya çıkan kolonilerin sayım işlemi yapılmıştır [60]. Açıklanan tüm işlemler 17 toprak örneğinin hepsi için uygulanmıştır.

#### **2.4 Koloni Oluşturan Fungal Birimlerin Sayılması**

Toprağı sulandırma metodu kullanılarak, ekimleri tamamlanan ve 3-5 gün süre ile 28 °C’ de inkübe edilen petriyerlerin yüzeyinde gelişen koloniler sayılmıştır. Ekim sonuçlarına göre toprak örneklerindeki canlı hücre sayısı hesaplanmıştır. Bu şekilde her bir toprak örneğinin 1 gramlık kısmında bulunan toplam fungus sayısı belirlenmiştir. Başka bir deyişle bir gram toprak örneğinde koloni oluşturan birimler (Colony Forming Units = CFU) tespit edilmiştir [61]. Hesaplamalara göre her bir toprak örneğindeki fungus sayısı belirlendikten sonra, bunların ortalaması alınarak araştırma alanındaki toplam mikrofungus sayısı belirlenmiştir.

#### **2.5 Fungusların Saflaştırılması ve İzolasyonu**

Mikroskop altında yapılan incelemelerde, kesin olarak benzerlikleri tespit edilen kolonilerden sadece bir izolasyon yapılmıştır, ancak ilk anda benzerlikleri anlaşılamayan kolonilerden ayrı ayrı izolasyonlar yapılmıştır. Petri kaplarında

gelişmesini tamamlayan tüm kolonilerin teşhis ve saklama amacı ile daha önceden yatık olarak hazırlanmış olan MEA besiyerine ekimleri yapılmıştır [62]. İnkübasyon sonrasında benzer özellik gösteren tüpler gruplandırılmıştır.

## **2.6 Pigment Üreticilerin Belirlenmesi**

Çalışmada kullanılması amaçlanan renk maddesi üretici fungusları belirlemek için MEA’ da renk veren [63] fungus izolatları gruplandırılmıştır. Gruplar arasında en fazla renk maddesi üreten bir sarı bir kırmızı renk üreticisi izolat seçilmiştir.

## **2.7 Seçilen Pigment Üretici İzolatların Teşhisi**

### **2.7.1 Morfolojik Analiz**

Fungusların teşhisi, seçilen izolatların koloni morfolojileri ve mikroskobik özellikleri göz önüne alınarak yapılmıştır.

#### **2.7.1.1 Mikromorfolojik Analiz**

Mikromorfolojik analizler için, seçilen izolatların MEA’ a ekimi yapıldı. Petri, 4 gün boyunca 28 °C’ de inkübe edildi. Mikroskobik teşhisler için hazırlanan preparatlar, gelişmekte olan kolonilerin uç kısımlarından steril iğne uçlu öze yardımı ile alınarak hazırlandı. Öze yardımı ile alınan örnekler Laktofenol damlatılmış inceleme ortamına alındı ve mikroskop altında ölçümler yapıldı, fotoğraflandı. Mikrofunguslar cins seviyesinde, Barnett ve Hunter’ın (1999) “*Illustrated genera of imperfect fungi*” eseri ve Hasenekoğlu'nun “*Toprak Mikrofungusları*” kullanılarak tanısı yapılmıştır [64].

### 2.7.1.2 Makromorfolojik Analiz

Makromorfolojik analiz için seçilen izolatlar; farklı besiyerlerinde MEA, PDA, SDA ve YEA, 15 gün boyunca 28 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda petriyelerdeki kolonilerin makroskopik olarak büyüklüğü (mm cinsinden), şekli, üstten ve alttan rengi, eksudasyon ve pigmentasyon olup olmadığı araştırıldı [65]. Kolonilerin çapları ölçüldü. Konidia rengi ve petriyelerdeki kolonilerin üst ve alt yüzeyleri incelendi, pigment renkleri kaydedildi ve fotoğraflandı.

### 2.7.2 DNA İzolasyonu

PDA besiyerinde saf olarak üretilen kolonilerin hif ve sporları DNA izolasyonu için kullanıldı. DNA izolasyonu için DNeasy plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanıldı ve kitin protokolü takip edildi [66].

### 2.7.3 PCR Reaksiyonu

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

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

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

Bu bileşikler hazırlanarak belirtilen sürece sıcaklıklar uygulanarak PCR cihazı ayarlandı (Tablo 2.3)' de gösterildi. PCR ürünleri 0.5 µg/ml etidyum bromür içeren % 0.8' lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak mantarlara özgü DNA bantları (500-600 baz çifti) ultraviyole ışık altında incelendi [67, 68, 69].

**Tablo 2.3:** PCR reaksiyonu basamakları.

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

## **2.8 Pigment Üretiminin Çeşitli Faktörlere Karşı İncelenmesi**

### **2.8.1.1 Farklı Sıcaklık Değerlerinin Koloni Gelişimi ve Pigment Üretimi Üzerine Etkisi**

Pigment oluşumu ve koloni gelişimi üzerine farklı sıcaklıkların (25 °C, 28 °C ve 30°C) etkisinin belirlenebilmesi için koloniler MEA' de 15 gün inkübe edildi. Bu uygulamalar sonucunda elde edilen kolonilerin çapları mm cinsinden ölçüldü ortalamaları, standart sapmaları hesaplandı ve pigmentin agar içine difüzyonu incelenerek 1+ ile 5+ arasında pigment dağılımı değerlendirildi [70].

### **2.8.1.2 Farklı Element Konsantrasyonlarının Koloni Gelişimi ve Pigment Üretimi Üzerine Etkisi**

Pigment oluşumu ve koloni gelişimi üzerine farklı elementlerin (Demir sülfat, Bakır sülfat ve Alüminyum sülfat) farklı konsantrasyonlarda (1000 µg/mL, 750 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL) etkisinin belirlenebilmesi için koloniler MEA

besiyerinde 28 °C'de 15 gün inkübe edildi. Çalışmada kolonilerin çapları mm cinsinden ölçüldü ortalamaları, standart sapmaları hesaplandı ve pigmentin agar içine difüzyonu incelenerek 1+ ile 5+ arasında pigment dağılımı değerlendirildi [71].

### **2.8.1.3 Farklı pH Değerlerinin Koloni Gelişimi ve Pigment Üretimi Üzerine Etkisi**

Pigment oluşumu ve koloni gelişimi üzerine farklı pH'ların (4.0, 5.5 ve 7.0) etkisinin belirlenebilmesi için koloniler MEA besiyerinde 28 °C'de 15 gün inkübe edildi. Yapılan çalışmalarda kolonilerin çapları mm cinsinden ölçüldü ortalamaları, standart sapmaları hesaplandı ve pigmentin agar içine difüzyonu incelenerek 1+ ile 5+ arasında pigment dağılımı değerlendirildi [72].

## **2.9 Katı Besiyerlerinde Pigment Üretimi**

Pigment üretimi amacıyla agar içeren besiyerlerine öncelikle 20 dakikada 121 °C' de sterilizasyon işlemi yapıldı ve beg alevi yanında besiyeri 10 mL olacak şekilde petri plaklarına paylaştırıldı. Ekimleri tamamlanan petripler 15 gün boyunca 28 °C'de inkübe edilerek pigment oluşumu için uygun koşullar sağlandı [73].

### **2.9.1 Pigment Ekstresinin Hazırlanması**

İnkübasyon periyodu ve koloni büyümesi tamamlandıktan sonra petriplerde pigment maddelerinin oluşumu görüldü. Her petriye 2 mL Tween 80 ekleyerek sporları kazınarak uzaklaştırıldı. Petriplerin agarlı kısmı toplandı. Ethanol (w/v: 1/1) eklenerek çalkalayıcıda (ZHWY-211D) 72 saat boyunca 26 °C' de 160 rpm' de pigmentin etanol içerisine geçmesi sağlandı [74]. Bu aşamadan sonra 0,40 ve 0,20 µm filtrelerden geçirildi. Kullanılan solvent bitene kadar dönerli buharlaştırıcı (İKA RV 10 basic) ile konsantre edildi ve çeker ocakta (HedLab) 24 saat bekletildi. Ayrıca pigmentleri toz haline getirmek için liyofilizator (Christ Alpha 1-2 LD) kullanıldı [75].

## **2.9.2 Pigmentlerin Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi**

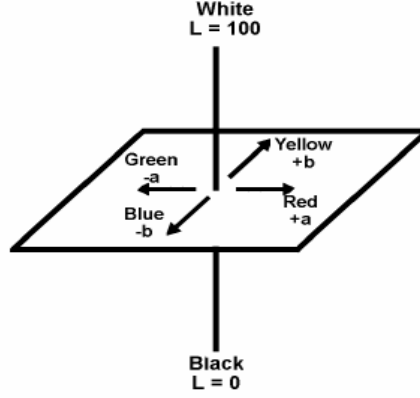
### **2.9.2.1 Pigmentlerin Spektral Analizleri**

Elde edilen pigmentlerin farklı solventler (su, asetik asit, etanol ve metanol ve DMSO) ile 0,5g/0,5 mL olacak şekilde stok çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerden 500 mg/mL' lik konsantrasyona ait farklı pH (1, 3, 5, 7, 9, 11, ve 13) ve sıcaklık (25, 40, 60, 80 ve 100) değerlerinde pigmentlerin spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda absorbanları ölçüldü [76].

### **2.9.2.2 Hunter Renk Sistemine Göre Pigmentlerin Renk Tayini**

Hunter renk sistemi 1950'lerde ortaya çıkmıştır. Bu konuda standart yöntem ilk kez CIE gıdaların renkleri hakkında karar vermek amacıyla (Commission International de L'Eclairage) tarafından 1931' de geliştirilmiştir. Bu amaçla çeşitli cihazlar ve yöntemler geliştirilmiştir. Ancak maddenin dalga boyu % yansıma değeri bilinerek bu maddenin rengi hakkında karar vermek değişik gıdaların renk eğrilerini kullanarak kıyaslama yapmanın pek pratik bir yöntem olmaması üzerine bu yöntem daha sonra geliştirilerek Hunter renk sistemi ortaya çıkmıştır [77].

Çalışmamızda pigmentlerin rengi Hunter kalorimetresi değerlerine göre ifade edilecektir (Şekil 2.3). Hunter kolorimetresinde üç renk değeri vardır; a\* değeri kırmızı veya yeşilliği, b\* değeri sarılık veya maviliği, L\* değeri ise 0 (siyah) ve 100 (beyaz) arasındaki aydınlık derecesini ölçmektedir [78]. Bu çalışmadaki renk analizi, TÜBİTAK MAM Gıda Endüstrisi tarafından yapılmıştır.



Şekil 2.3: Hunter renk sistemi.

## 2.10 Aflatoksin Analizi

Bu çalışmadaki aflatoksin analizi (Aflatoksin B1, Aflatoksin B2, Aflatoksin G1, Aflatoksin G2) TÜBİTAK, MAM Gıda Endüstrisi tarafından yapıldı. Numunelerin analizinde iki çeşit yöntem kullanıldı. Bunlardan ilkinde örneklerden doğrudan enjeksiyon yapıldı. İkincisinde ise örneklerden 20 ml alınarak 200 ml PBS ilave edildikten sonra Immunoafinite kolondan (Vicam, USA) saniyede yaklaşık 1 damla akacak şekilde geçirildi. Daha sonra 2 kez 10 ml saf su geçirilerek yıkama yapıldı. 1 ml metanol alındı ve kolondan yavaşça geçirilerek amber renkli şişeye toplandı. 1 ml su ile işlem tekrarlandı. Toplam hacim 2 ml olan ekstrakt 0.45 µm şırınga ucu filtreden süzülerek HPLC'ye enjeksiyonu yapıldı.

### 2.10.1 Kullanılan Cihaz İle İlgili Özellikler

Marka-Model: Shimadzu LC-10 A; Software: Class-Vp 5; Dedektör: RF-10AXL Floresans dedektör Ex. :365nm, Em. :435nm, Mobil Faz: Su : Asetonitril : Metanol 6:2:3 [(v/v/v)] karışımı hazırlandı. Çözeltinin 1 litresine 120 mg potasyum bromür ve 350 ml nitrik asit ilave edildi. Kullanmadan önce 0,45 µm'lik membran filtre ile süzüldü.

Kolon: ACE C18 kolon 250\*4.6mm, 5 µm, Kolon Sıcaklığı: 35°C, Enjeksiyon Hacmi: 100 µl, Akış Hızı: 1 ml/dk, Analiz Süresi: 12 dakika, Kobra cell türevlendirme cihazı: R-Biopharm AG (Darmstadt, Almanya)

## **2.11 Kullanılan Cihazlar**

Solventin buharlaştırılmasında döner buharlaştırıcı kullanıldı. (Rotary evaporator, IKA RV10 Basic) kullanıldı. Ekstrelerin Mikroorganizmaların uygun sıcaklıklarda inkübasyonu için Elektro-Mag etüv kullanıldı. Çözeltilerin ve inokulumların homojen karışması için Elektro-Mag vortex kullanıldı.

### **3. BULGULAR**

#### **3.1 Toprak Örneklerinden Elde Edilen Mikrofungus Sayısı**

Manisa Akhisar Musaca köyünden toplanan toprak örneklerinin mikrobiyotasının incelenmesi sonucunda 1 gr toprakta en düşük ve en yüksek ortalama değerleri 9.100 ile 78.000 arasında olmak üzere ortalama 50.170 birim mikrofungus bulunmuştur. Bu koloniler içerisinde *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri başta olmak üzere diğer türler tespit edilmiştir.

#### **3.2 Toprak Örneklerinden İzole Edilen Funguslar**

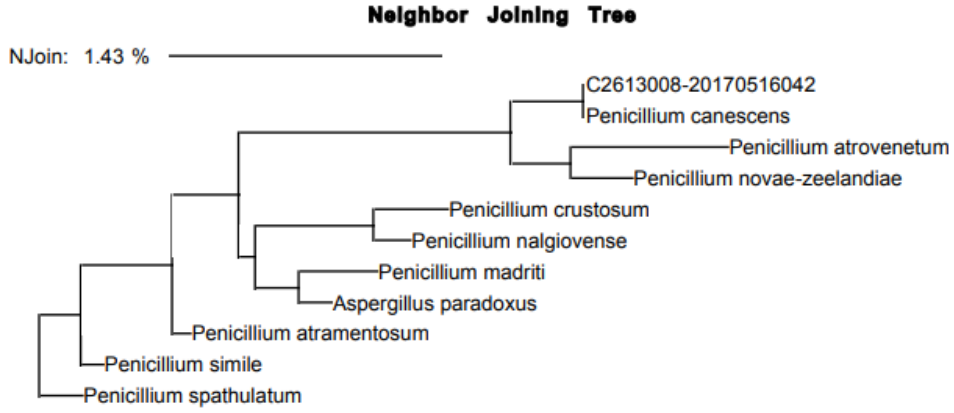
Manisa Akhisar Musaca köyünden toplanan toprak örneklerinin mikrobiyotasını incelemek amacıyla kalitatif ve kantitatif analizler sonucunda, sonbahar mevsiminde alınan 17 çeşit toprak örneğinden “toprağı sulandırma metodu” ile 162 izolat elde edilmiştir. Bu izolatlardan 5 tane pigment üretici fungus elde edilmiştir. Bunlar arasından en koyu renk veren bir sarı ve bir kırmızı izolat pigment üretici olarak belirlenmiştir. Kırmızı pigment üretici fungus (*P. purpurogenum*) A-17 nolu toprak örneğinden, sarı pigment üretici fungus (*P. canescens*) ise A-4 nolu toprak örneğinden izole edilmiştir.

#### **3.3 İdentifikasyon Bulguları**

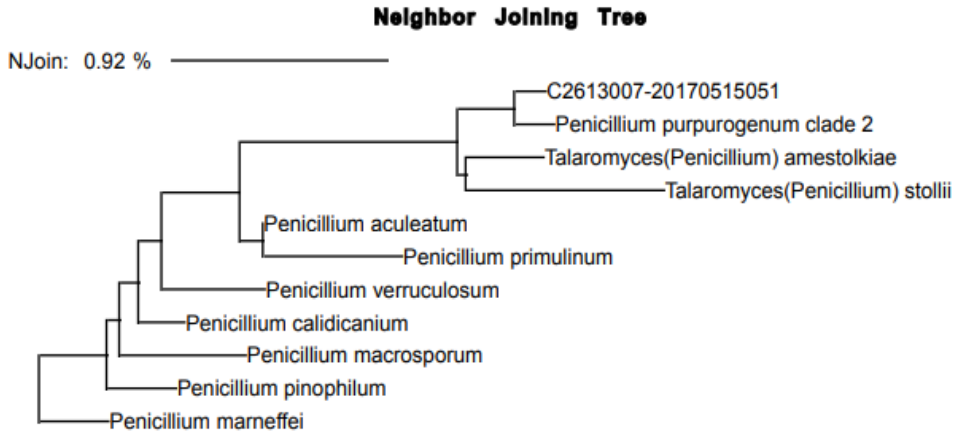
Bu çalışmada kullanılan kırmızı pigment üretici ve sarı pigment üretici suşların, dizi analizi sonucu ilk olarak NCBI veri tabanında nükleotid BLAST yapılarak kontrol edildi. ITS-4 ve ITS-5 primerleri kullanılarak yapılan bir örneğe ait iki nükleotid dizisi ile elde edilmiştir.

Morfolojik ve moleküler analizlerin ardından yapılan tür tanısı sonucunda iki izolata türlerinin tanısı yapılmıştır. Moleküler olarak tanısı yapılan türlerin

aralarındaki akrabalık ilişkilerinin incelenmesi amacıyla filogenetik ağaçları çizilmiştir. Filogenetik ağaçlar Şekil 3.1 ve Şekil 3.2 'de verilmiştir.



Şekil 3.1: *P. canescens* filogenetik ağacı.



Şekil 3.2: *P. purpurogenum* filogenetik ağacı.

### 3.4 Pigment Üreticilerine Ait Morfolojik Analiz Bulguları

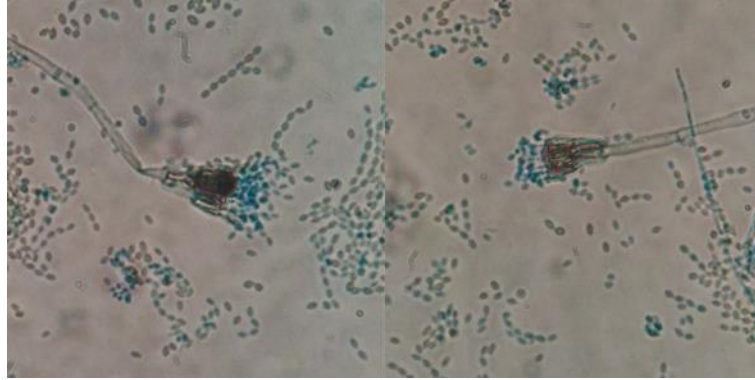
#### 3.4.1 Pigment Üreticilerine Ait Mikromorfojik Bulgular

Mikromorfolojik analizler için, seçilen izolatların MEA'da mikroskop altında görüntüleri fotoğraflandı. *P. canescens* 'te konidia sert pürüzsüz ve çapları 2-2.5 µm olduğu belirlenmiştir. Sterigma sayısı 4 tane olup 3-5 µm arasındadır. Konidiyofor

düzgün septalı, ve dallanmış olup uzunluğu 100-120  $\mu\text{m}$  arasında değişmektedir. *P. purpurogenum*' da konidia sert, pürüzsüz ve çapları 2.2-2.5  $\mu\text{m}$  globoz olduğu belirlendi. Sterigma sayısı 5-8 ile arasında değişmektedir, uzunluğu ise 7-10  $\mu\text{m}$  arasındadır. Konidiyofor düzgün septalı uzunluğu 80-120  $\mu\text{m}$  arasında değişmektedir. Şekil 3.3 ve Şekil 3.4' te mikroskopik görüntülere ait fotoğraflar yer almaktadır.



Şekil 3.3: *P. canescens* mikroskop görüntüleri.



Şekil 3.4: *P. purpurogenum* mikroskop görüntüleri.

### 3.4.2 Pigment Üreticilerine Ait Makromorfolojik Bulgular

*P. purpurogenum*'da ve *P. canescens*'de koloni gelişimi üzerine, farklı besiyerlerinin (MEA, SDA, YEA, PDA) 28 °C 'de etkisi belirlendi ve bu uygulamalar sonucunda elde edilen kolonilerin çapları mm cinsinden ölçülerek sonuçlar Tablo 3.1' ve Tablo 3.2'de verildi. Şekil 3.5, 3.6, 3.7, 3.8' de ise sonuçlara

ait fotoğraflar yer almaktadır. Farklı besiyerlerinde pigment üretimi miktarının derecelendirilmesine ait sonuçlar ise Tablo 3.3, 3.4 ve 3.5' te verildi.

**Tablo 3.1:** *P. purpurogenum* türünde farklı besiyerlerinin koloni büyümesi üzerine etkisi.

Günler	MEA	SDA	YEA	PDA
3. Gün	15±0.33	15±0.66	7±0.33	7±0.66
5. Gün	29±0.66	32±0.33	12±0.33	15±0.66
7. Gün	45±0.33	45±0.66	17±0.33	22±0.66
9. Gün	59±0.33	62±0.66	18±0.33	46±0.33
11. Gün	78±0.33	78±0.66	20±0.66	65±0.33
13. Gün	89±0.66	87±0.33	27±0.33	72±0.66
15. Gün	89±0.66	89±0.33	31±0.66	85±0.33

**Tablo 3.2:** *P. canescens* türünde farklı besiyerlerinin koloni büyümesi üzerine etkisi.

Günler	MEA	SDA	YEA	PDA
3. Gün	14±0.66	11±0.33	8±0.66	4±0.66
5. Gün	21±0.33	18±0.66	15±0.33	8±0.33
7. Gün	29±0.33	25±0.33	19±0.33	11±0.33
9. Gün	35±0.33	31±0.33	24±0.66	19±0.33
11. Gün	39±0.33	36±0.66	28±0.33	25±0.66
13. Gün	49±0.66	42±0.33	30±0.66	27±0.66
15. Gün	59±0.66	47±0.33	35±0.33	30±0.33

**Tablo 3.3:** Petri yüzeyinde pigment oluşumunun derecelendirilmesi.

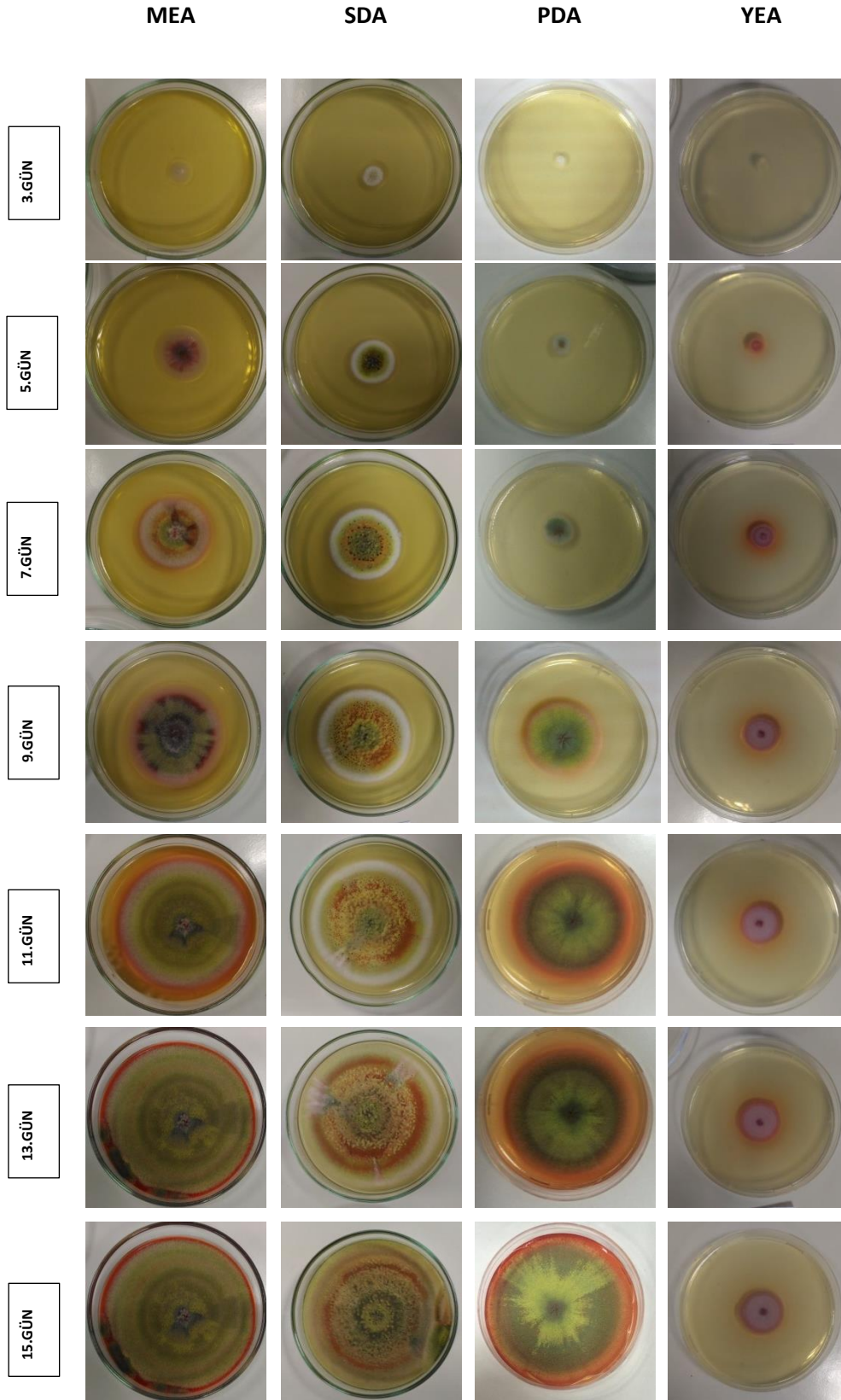
Petri yüzeyinde pigment oluşumu %100 ise	5+
Petri yüzeyinde pigment oluşumu %80 ise	4+
Petri yüzeyinde pigment oluşumu %60 ise	3+
Petri yüzeyinde pigment oluşumu %40 ise	2+
Petri yüzeyinde pigment oluşumu %20 ise	1+
Petri yüzeyinde pigment oluşumu %0 ise	0

**Tablo 3.4:** Farklı besiyerleri için *P. purpurogenum*' da pigment oluşumunun derecelendirilmesi.

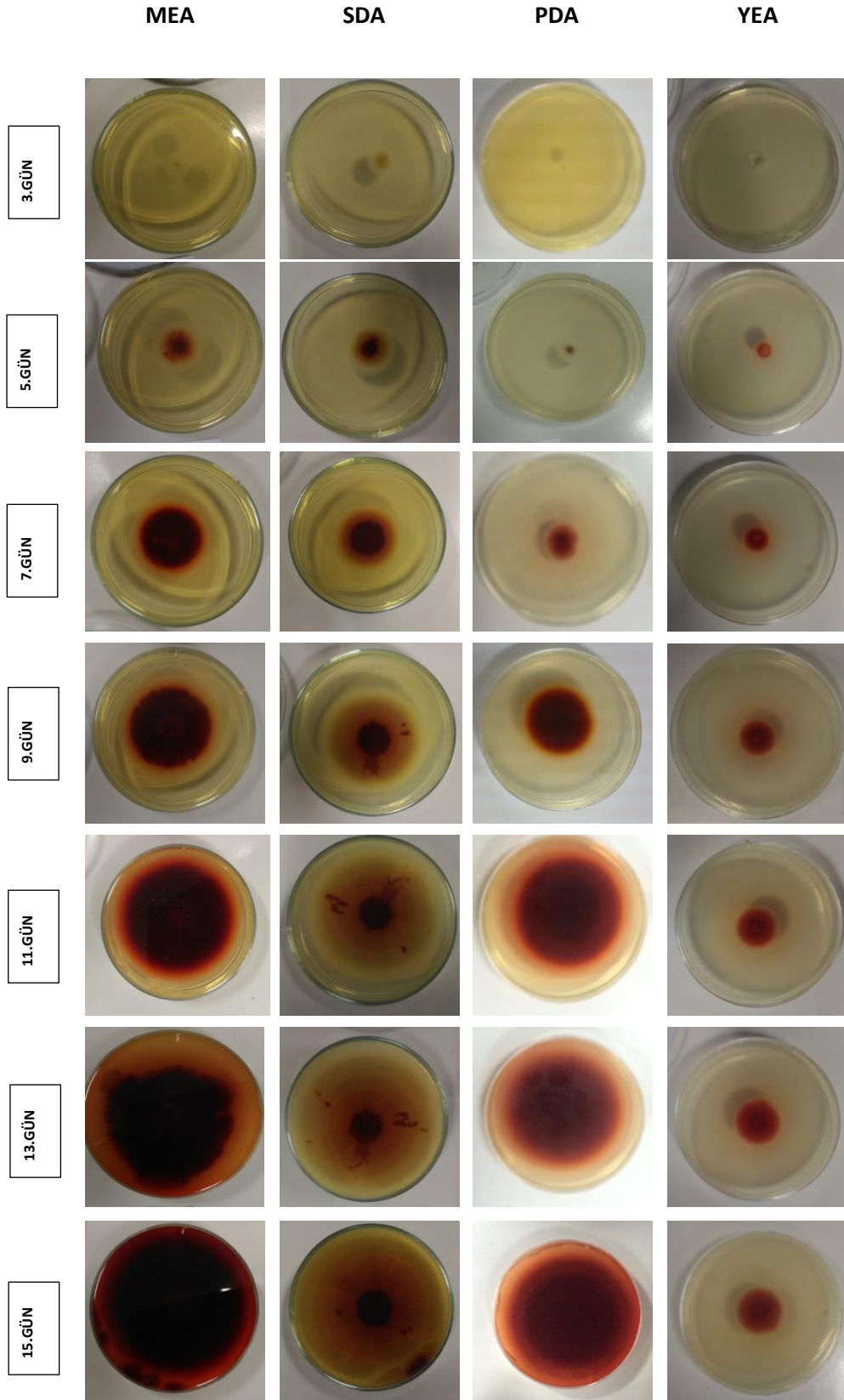
Günler	MEA	SDA	PDA	YEA
3. Gün	0	+0	0	0
5. Gün	+1	+1	0	+1
7. Gün	+2	+1	+1	+1
9. Gün	+3	+1	+2	+1
11. Gün	+3	+1	+3	+1
13. Gün	+4	+1	+4	+1
15. Gün	+5	+1	+5	+1

**Tablo 3.5:** Farklı besiyerleri için *P. canescens*' de pigment oluşumunun derecelendirilmesi.

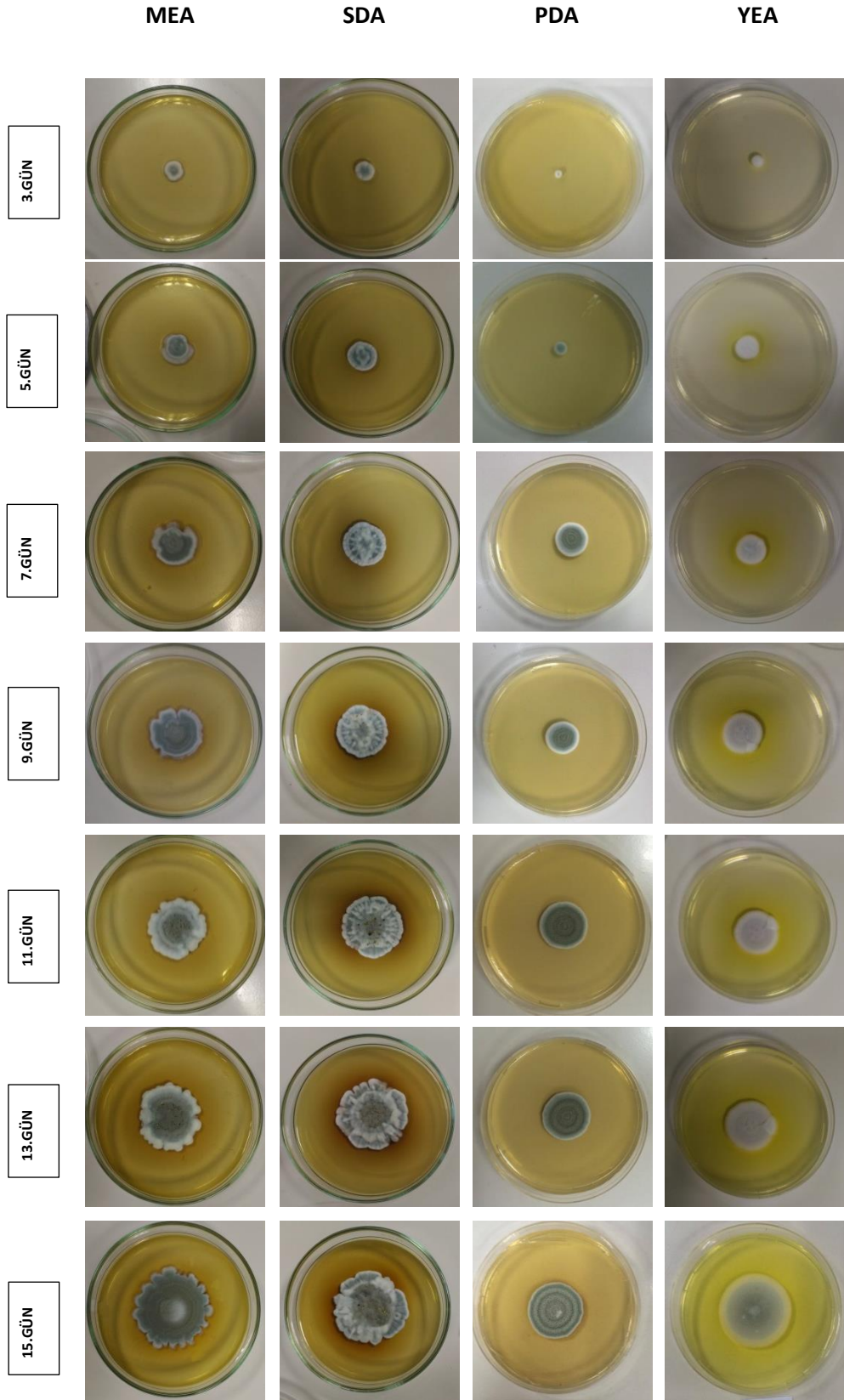
	MEA	SDA	PDA	YEA
3. Gün	0	0	0	0
5. Gün	0	0	0	0
7. Gün	+1	+1	0	+1
9. Gün	+2	+2	+1	+2
11. Gün	+3	+3	+2	+3
13. Gün	+4	+4	+3	+4
15. Gün	+5	+4	+3	+5



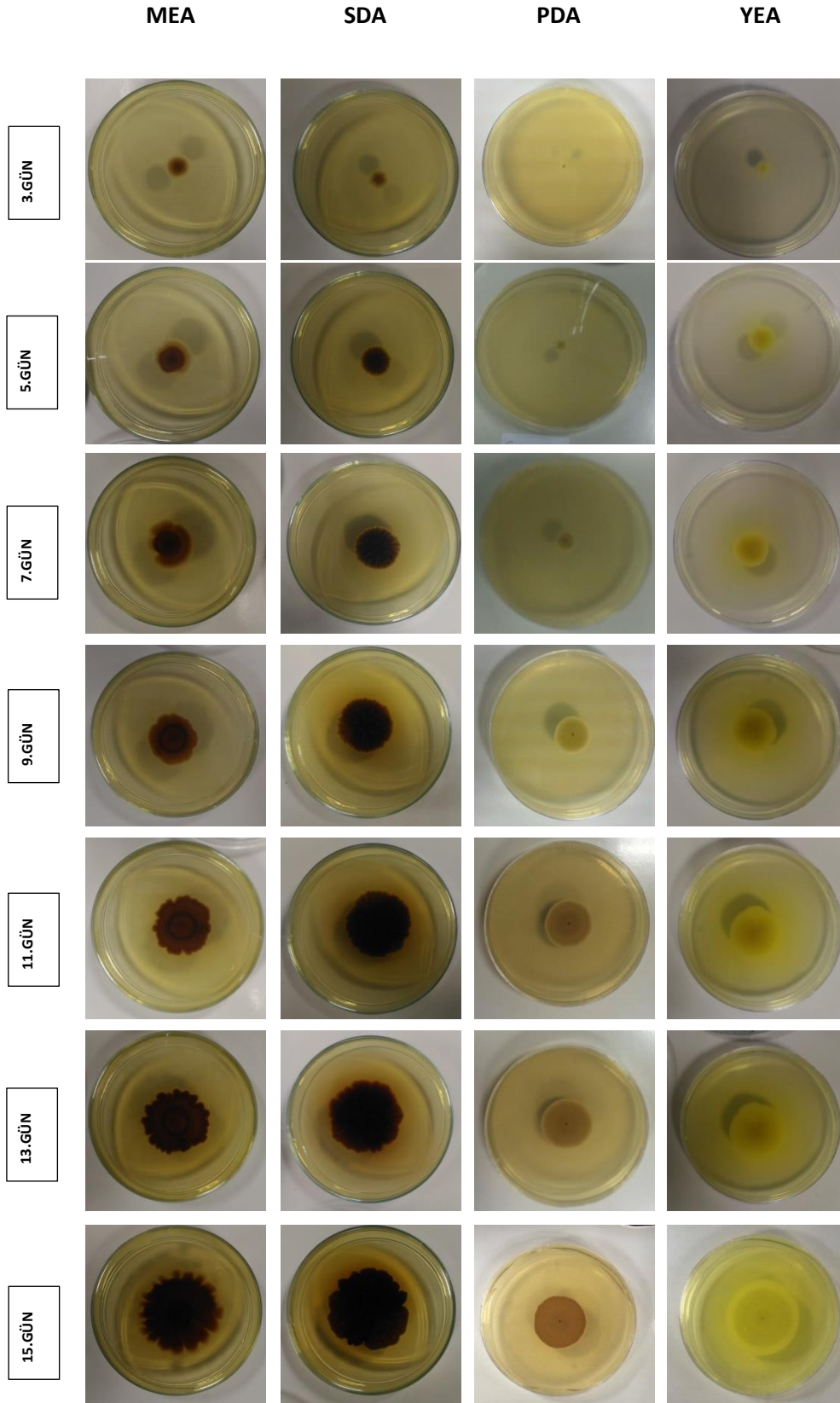
Şekil 3.5: *P. purpurogenum* ' da pigment üretiminde farklı besiyerleri için petri kabının üstten görünümü.



**Şekil 3.6:** *P. purpurogenum* ' da pigment üretiminde farklı besiyerleri için petri kabının alttan görünümü.



Şekil 3.7: *P. canescens*' de pigment üretiminde farklı besiyerleri için petri kabının üstten görünümü.



Şekil 3.8: *P. canescens*' de pigment üretiminde farklı besiyerleri için petri kabının alttan görünümü.

### 3.5 Pigment Üretimine Etki Eden Faktörlere Ait Bulgular

#### 3.5.1 Farklı Sıcaklık Değerlerinin Koloni Gelişimi ve Pigment Üretimi Üzerine Etkisine Ait Bulgular

*P. purpurogenum*'da ve *P. canescens*'de koloni gelişimi üzerine, farklı sıcaklıkların etkisi belirlendi ve kolonilerin çapları mm cinsinden ölçülerek sonuçlar Tablo 3.6 ve 3.7' de verildi. Şekil 3.9 ve 3.12 arasında ise sonuçlara ait fotoğraflar yer almaktadır. Pigment üretiminin derecelendirilmesine ait sonuçlar Tablo 3.3 dikkate alınarak Tablo 3.8 ve 3.9' da verilmiştir.

**Tablo 3.6:** *P. purpurogenum* türünde sıcaklık değişimlerinin koloni büyümesi üzerine etkisi.

Günler	25 °C	28 °C	30°C
3. Gün	15±0.66	15±0.33	11±0.33
5. Gün	31±0.66	29±0.66	23±0.66
7. Gün	46±0.33	45±0.33	40±0.66
9. Gün	61±0.66	59±0.33	58±0.33
11. Gün	74±0.66	78±0.33	73±0.33
13. Gün	81±0.33	89±0.66	85±0.33
15. Gün	84±0.33	89±0.66	89±0.66

**Tablo 3.7:** *P. canescens* türünde sıcaklık değişimlerinin koloni büyümesi üzerine etkisi.

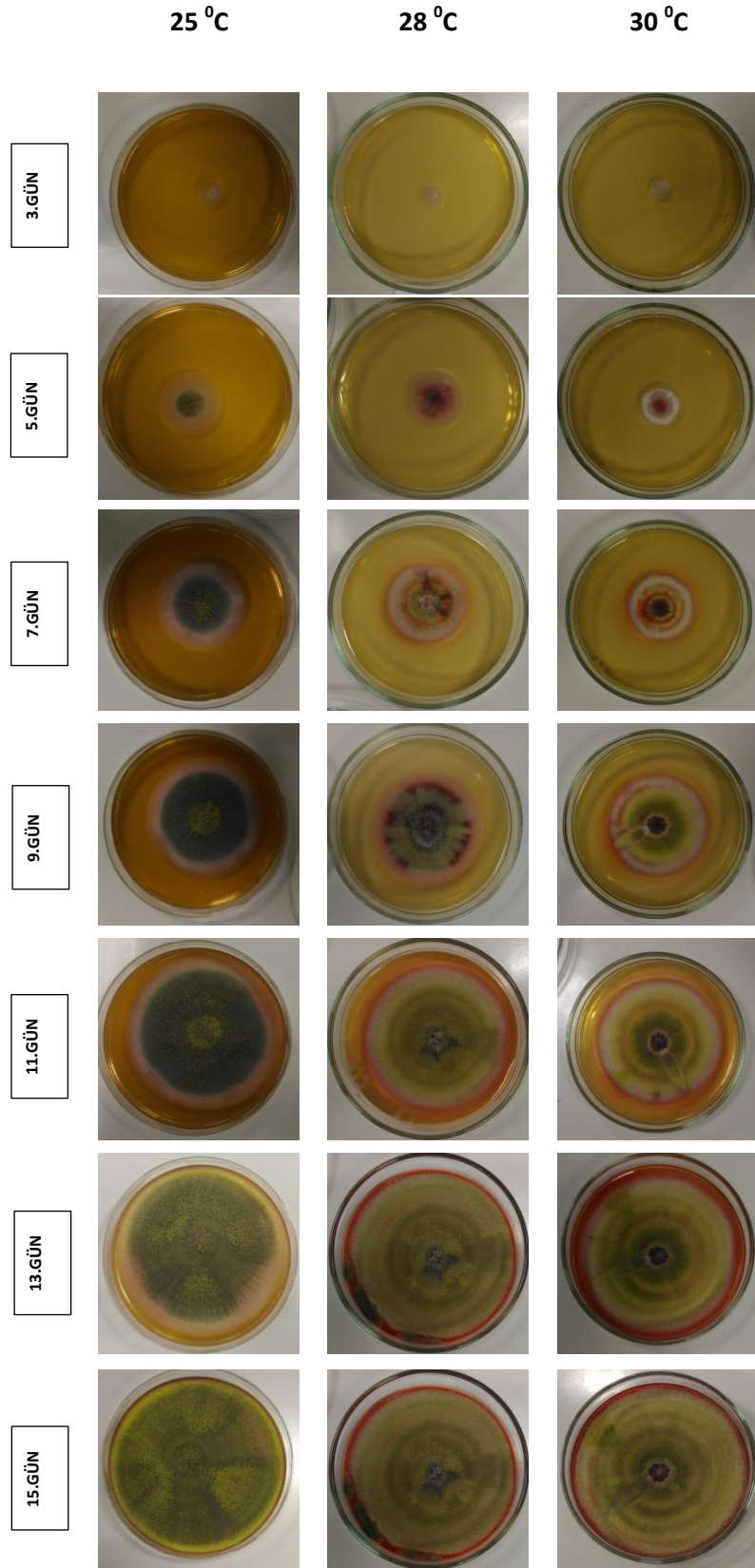
Günler	25 °C	28 °C	30 °C
3. Gün	11±0.33	14±0.66	10±0.33
5. Gün	18±0.66	21±0.33	16±0.66
7. Gün	25±0.33	29±0.33	22±0.33
9. Gün	30±0.33	35±0.33	28±0.33
11. Gün	34±0.66	39±0.33	33±0.33
13. Gün	38±0.66	49±0.66	39±0.33
15. Gün	47±0.33	59±0.66	43±0.33

**Tablo 3.8:** Farklı sıcaklık değerleri için *P. purpurogenum* ' da pigment oluşumunun derecelendirilmesi.

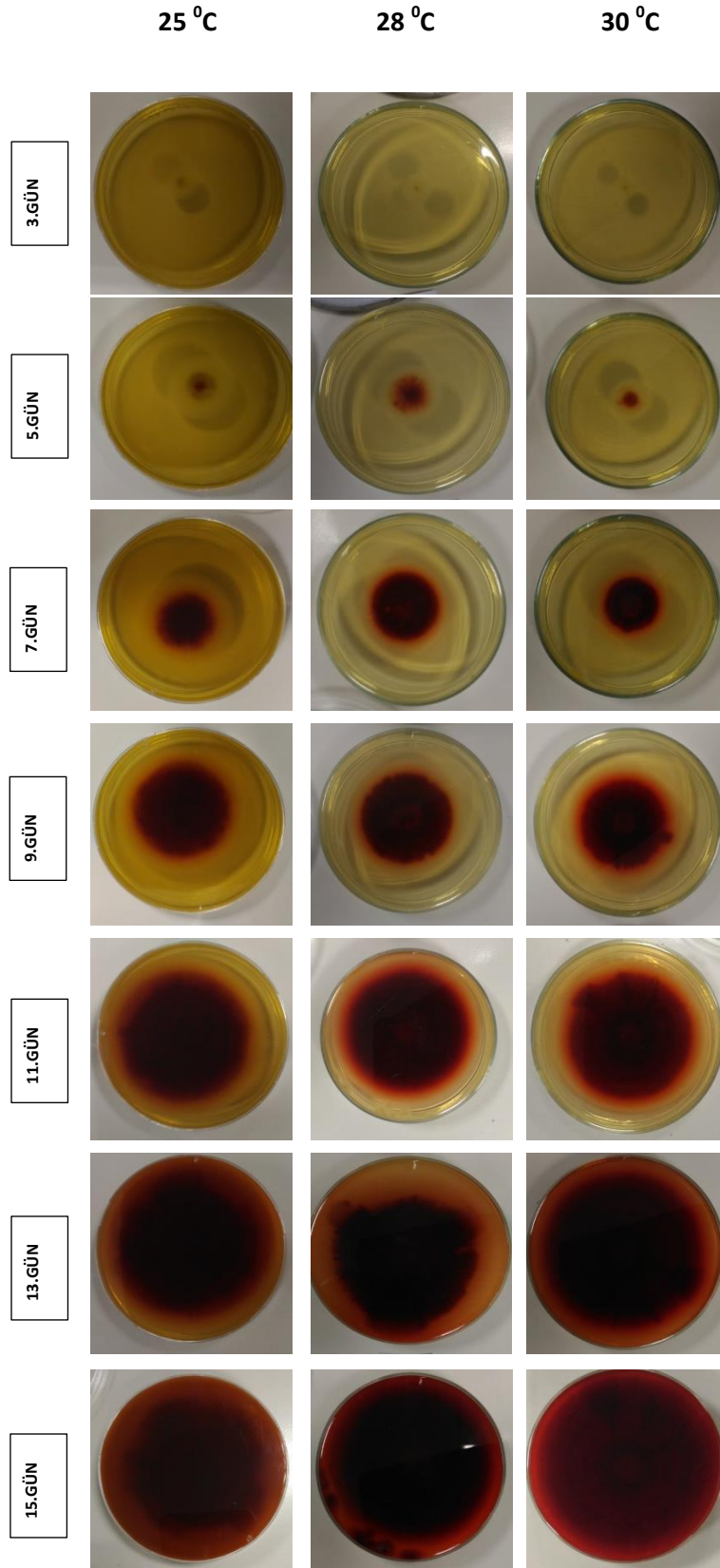
Günler	25 °C	28 °C	30 °C
3. Gün	0	0	0
5. Gün	0	+1	+1
7. Gün	+1	+2	+2
9. Gün	+3	+3	+3
11. Gün	+3	+3	+4
13. Gün	+4	+4	+5
15. Gün	+5	+5	+5

**Tablo 3.9:** Farklı sıcaklık değerleri için *P. canescens* ' de pigment oluşumunun derecelendirilmesi.

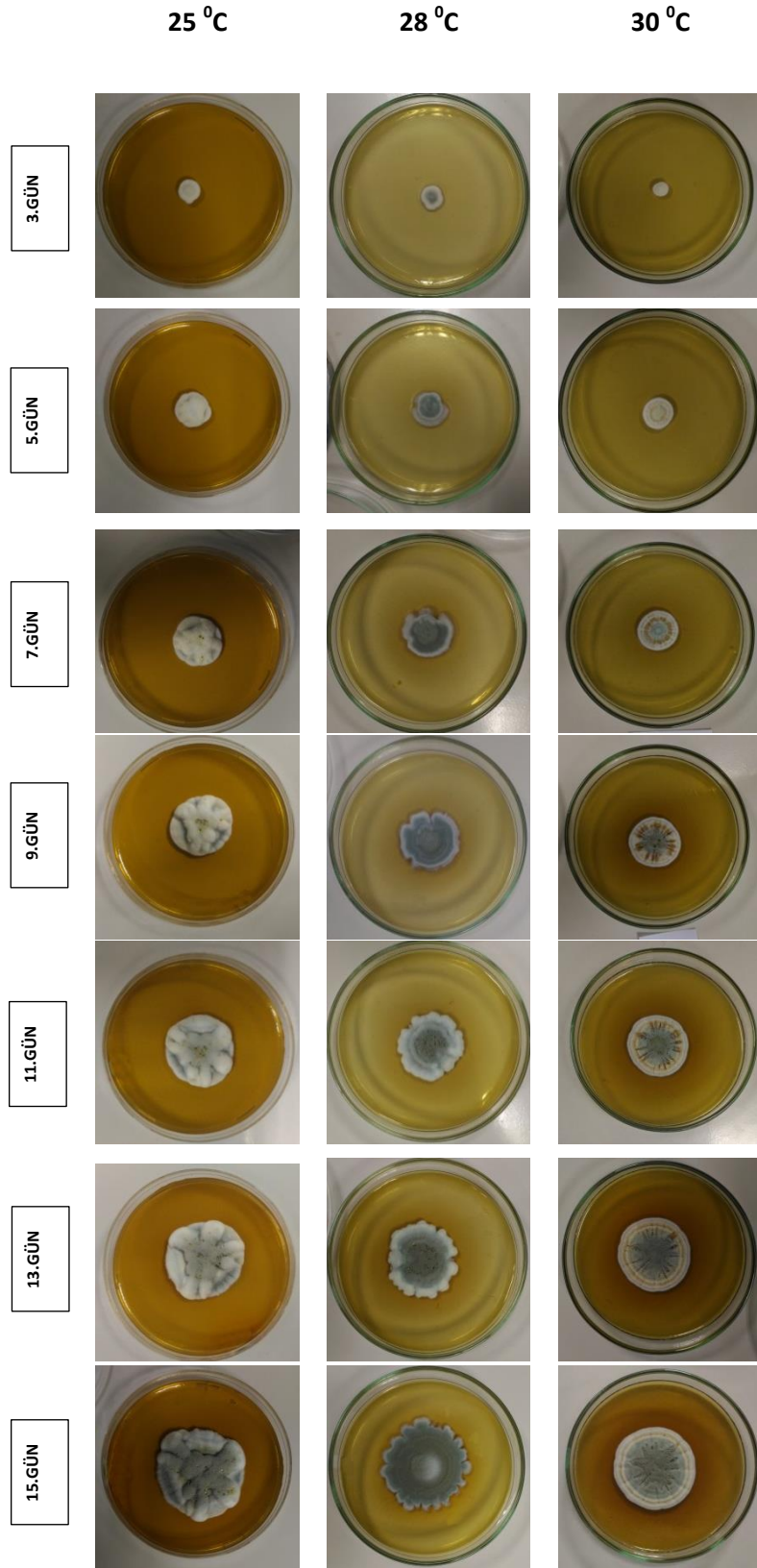
	25 °C	28 °C	30 °C
3. Gün	0	0	0
5. Gün	0	0	0
7. Gün	+1	+1	+1
9. Gün	+1	+2	+1
11. Gün	+2	+3	+2
13. Gün	+3	+4	+3
15. Gün	+4	+5	+4



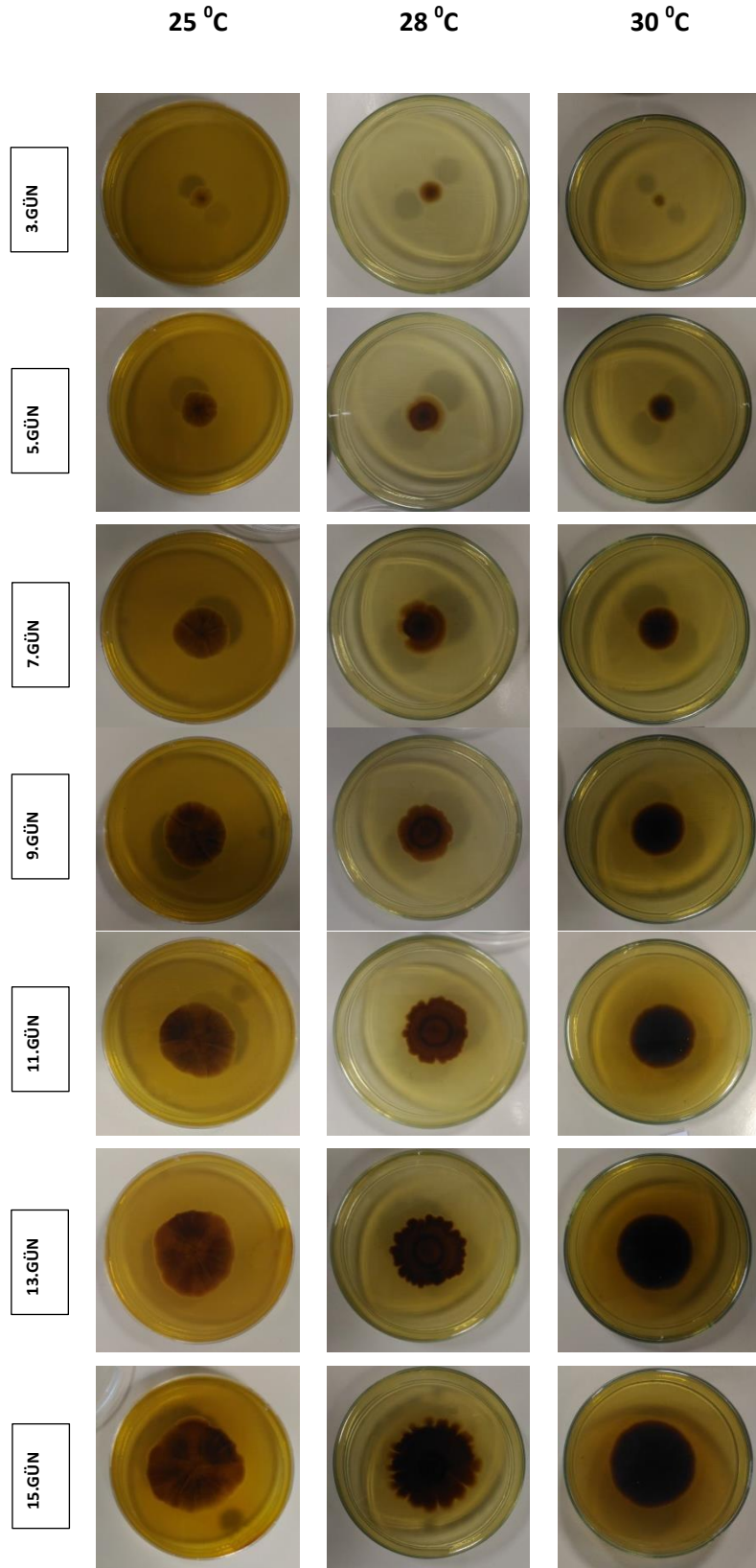
Şekil 3.9 *P. purpurogenum*' da pigment üretiminde farklı sıcaklık değerleri için petri kabının üstten görünümü.



Şekil 3.10: *P. purpurogenum*' da pigment üretiminde farklı sıcaklık değerleri için petri kabının alttan görünümü.



Şekil 3.11: *P. canescens*' de pigment üretiminde farklı sıcaklık değerleri için petri kabının üstten görünümü.



Şekil 3.12: *P. canescens* ' de pigment üretiminde farklı sıcaklık değerleri için petri kabının alttan görünümü.

### 3.5.2 Farklı Element Konsantrasyonlarının Koloni Gelişimi ve Pigment Üretimi Üzerine Etkisine ait Bulgular

*P. purpurogenum*'da ve *P. canescens*'de koloni gelişimi üzerine, demir elementinin farklı konsantrasyonlarda (1000 µg/mL, 750 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL) 28 °C'de etkisi belirlendi ve bu uygulamalar sonucunda elde edilen kolonilerin çapları mm cinsinden ölçülerek sonuçlar Tablo 3.10 ve 3.11'de verildi. Tablo 3.12 ve Tablo 3.13' te pigment üretiminin derecelendirilmesine ait sonuçlar yer almaktadır. Şekil 3.13, 3.14, 3.15, 3.16' de ise pigment üretimine ait fotoğraflar yer almaktadır.

**Tablo 3.10:** *P. purpurogenum* türünde demir (Fe) elementinin koloni büyümesi üzerine etkisi.

	1000 µg/mL	750 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL
3. Gün	15±0.66	15±0.66	15±0.66	15±0.66
5. Gün	30±0.66	31±0.66	32±0.33	32±0.33
7. Gün	46±0.66	46±0.66	47±0.66	48±0.33
9. Gün	60±0.66	62±0.66	63±0.33	64±0.33
11. Gün	73±0.66	75±0.66	76±0.33	77±0.66
13. Gün	81±0.33	85±0.33	85±0.66	85±0.66
15. Gün	85±0.33	88±0.66	89±0.66	89±0.66

**Tablo 3.11:** *P. canescens* türünde demir (Fe) elementinin koloni büyümesi üzerine etkisi.

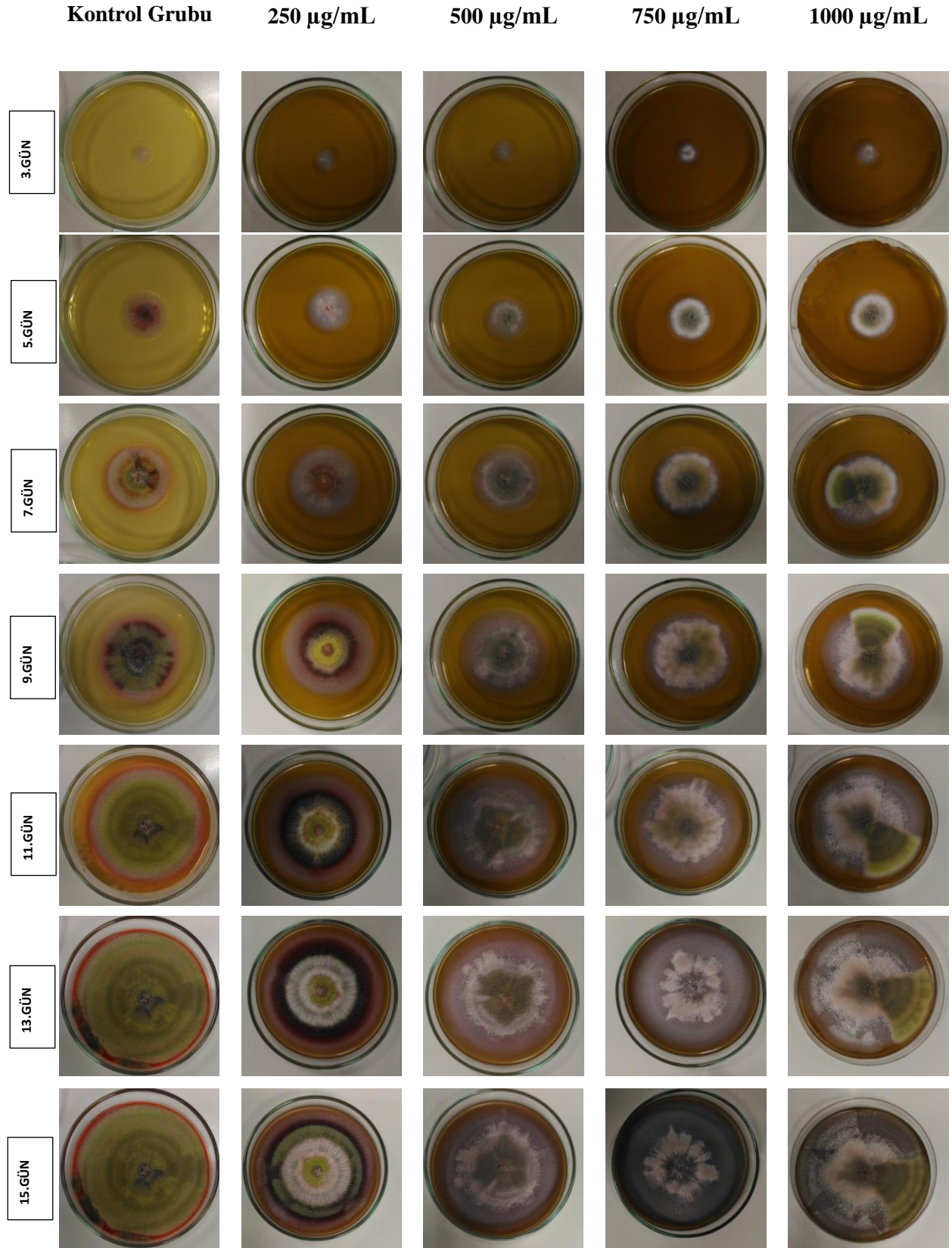
	1000 µg/mL	750 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL
3. Gün	10±0.66	11±0.66	11±0.66	12±0.33
5. Gün	18±0.33	19±0.33	20±0.66	20±0.66
7. Gün	24±0.33	28±0.33	29±0.66	31±0.33
9. Gün	30±0.66	34±0.33	38±0.33	38±0.66
11. Gün	38±0.33	43±0.66	47±0.33	47±0.66
13. Gün	46±0.33	49±0.33	51±0.33	51±0.66
15. Gün	51±0.66	59±0.33	60±0.66	62±0.33

**Tablo 3.12:** Farklı demir konsantrasyonları için *P. purpurogenum* ' da pigment oluşumunun derecelendirilmesi.

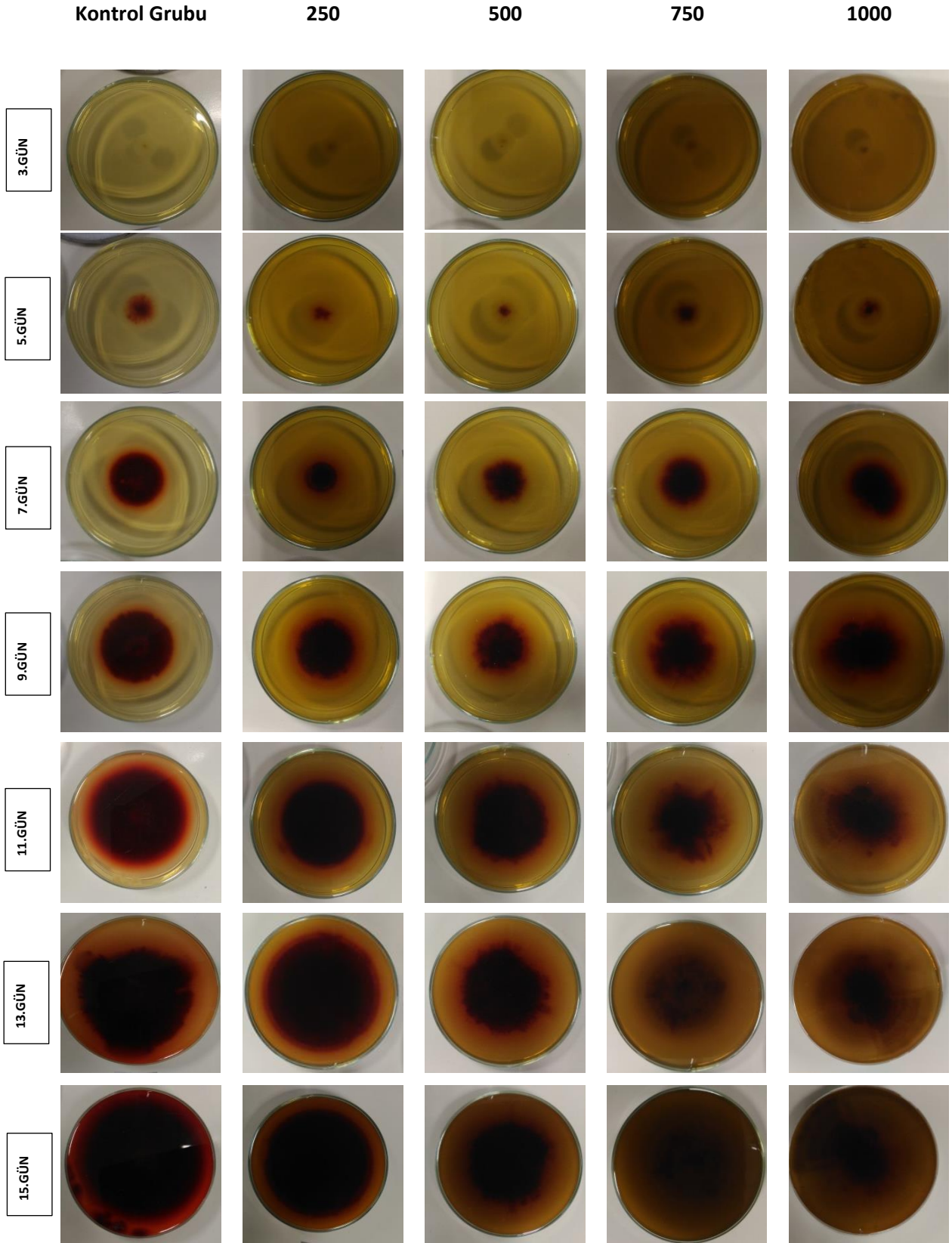
	1000 µg/mL	750 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL
3. Gün	0	0	0	0
5. Gün	+1	+1	+1	+1
7. Gün	+2	+2	+2	+2
9. Gün	+2	+2	+2	+3
11. Gün	+3	+3	+3	+3
13. Gün	+3	+3	+3	+4
15. Gün	+3	+3	+3	+5

**Tablo 3.13:** Farklı demir konsantrasyonları için *P. canescens* ' de pigment oluşumunun derecelendirilmesi.

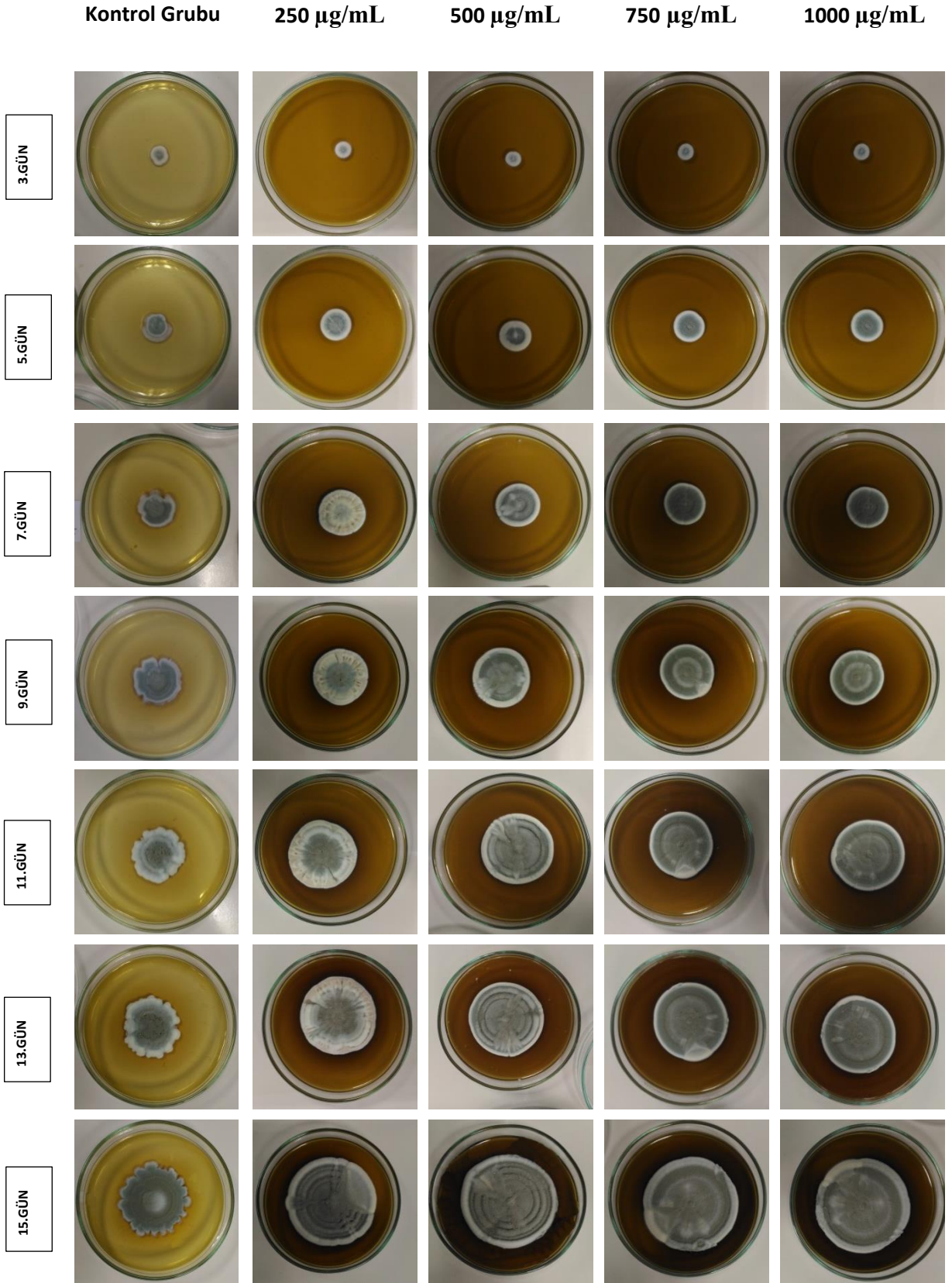
	1000 µg/mL	750 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL
3. Gün	0	0	0	0
5. Gün	0	0	0	0
7. Gün	0	0	0	0
9. Gün	0	0	0	0
11. Gün	0	0	0	0
13. Gün	0	0	0	0
15. Gün	0	0	0	0



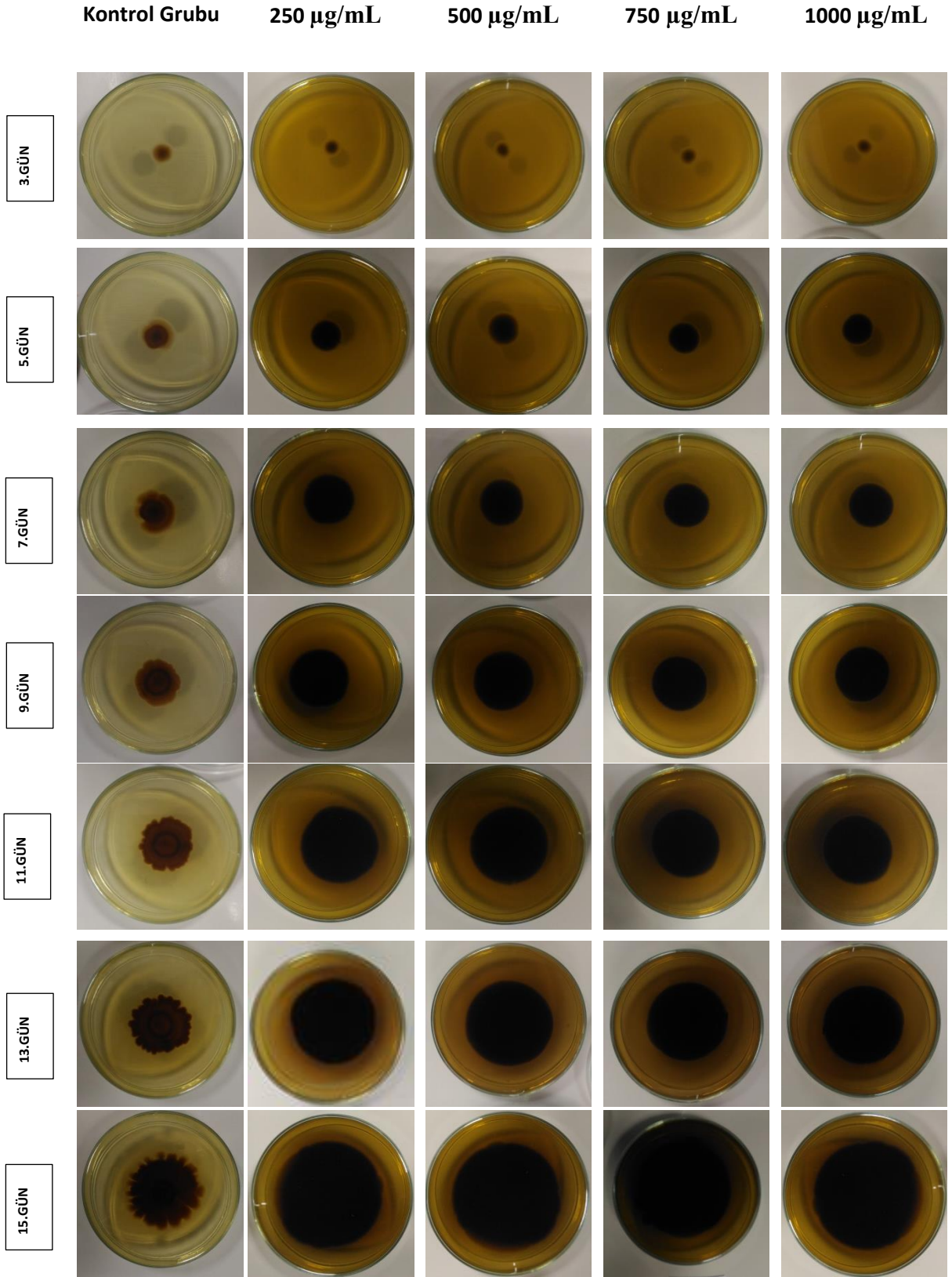
Şekil 3.13: *P. purpurogenum* ' da pigment üretiminde demir elementinin farklı konsantrasyonlar için petri kabının üstten görünümü.



Şekil 3.14: *P. purpurogenum* 'da pigment üretiminde demir elementinin farklı konsantrasyonlar için petri kabının alttan görünümü.



Şekil 3.15: *P. canescens*' de pigment üretiminde demir elementinin farklı konsantrasyonlar için petri kabının üstten görünümü.



Şekil 3.16: *P. canescens*' de pigment üretiminde demir elementinin farklı konsantrasyonlar için petri kabının alttan görünümü.

*P. purpurogenum*'da ve *P. canescens*'de koloni gelişimi üzerine, bakır elementinin farklı konsantrasyonlarda (1000 µg/mL, 750 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL) 28 °C'de etkisi belirlendi ve bu uygulamalar sonucunda elde edilen kolonilerin çapları mm cinsinden ölçülerek sonuçlar Tablo 3.14 ve 3.15'te verildi. Pigment oluşumuna ait sonuçlar ise Tablo 3.16 ve 3.17' de yer almaktadır. Şekil 3.17, 3.18, 3.19, 3.20' de ise sonuçlara ait fotoğraflar yer almaktadır.

**Tablo 3.14:** *P. purpurogenum* türünde bakır (Cu) elementinin koloni büyümesi üzerine etkisi.

	1000 µg/mL	750 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL
3. Gün	18±0.33	18±0.66	19±0.33	19±0.33
5. Gün	26±0.33	26±0.33	27±0.66	28±0.33
7. Gün	38±0.66	39±0.33	41±0.33	41±0.66
9. Gün	53±0.33	56±0.33	58±0.66	59±0.66
11. Gün	68±0.33	69±0.33	73±0.33	74±0.33
13. Gün	79±0.33	79±0.66	80±0.33	80±0.66
15. Gün	89±0.66	89±0.66	89±0.66	89±0.66

**Tablo 3.15:** *P. canescens* türünde bakır (Cu) elementinin koloni büyümesi üzerine etkisi.

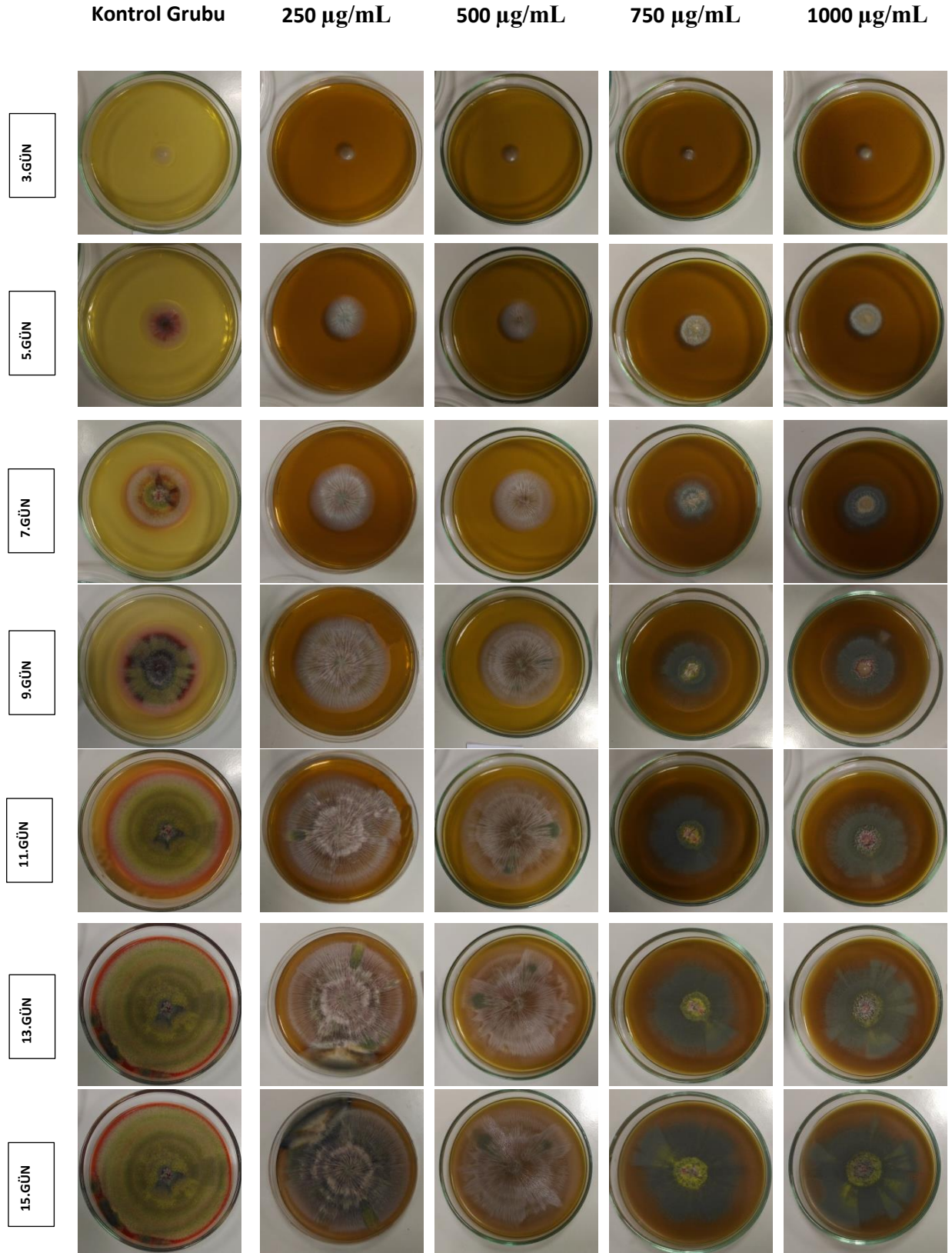
	1000 µg/mL	750 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL
3. Gün	9±0,33	9±0.66	11±0.33	11±0.33
5. Gün	11±0.66	12±0.33	18±0.33	18±0.66
7. Gün	13±0.66	14±0.66	22±0.66	23±0.66
9. Gün	14±0.66	16±0.33	30±0.66	31±0.66
11. Gün	19±0.66	20±0.33	34±0.33	35±0.33
13. Gün	22±0.66	23±0.33	36±0.33	37±0.33
15. Gün	33±0.66	35±0.33	44±0.33	45±0.33

**Tablo 3.16:** Farklı bakır konsantrasyonları için *P. purpurogenum*' da pigment oluşumunun derecelendirilmesi.

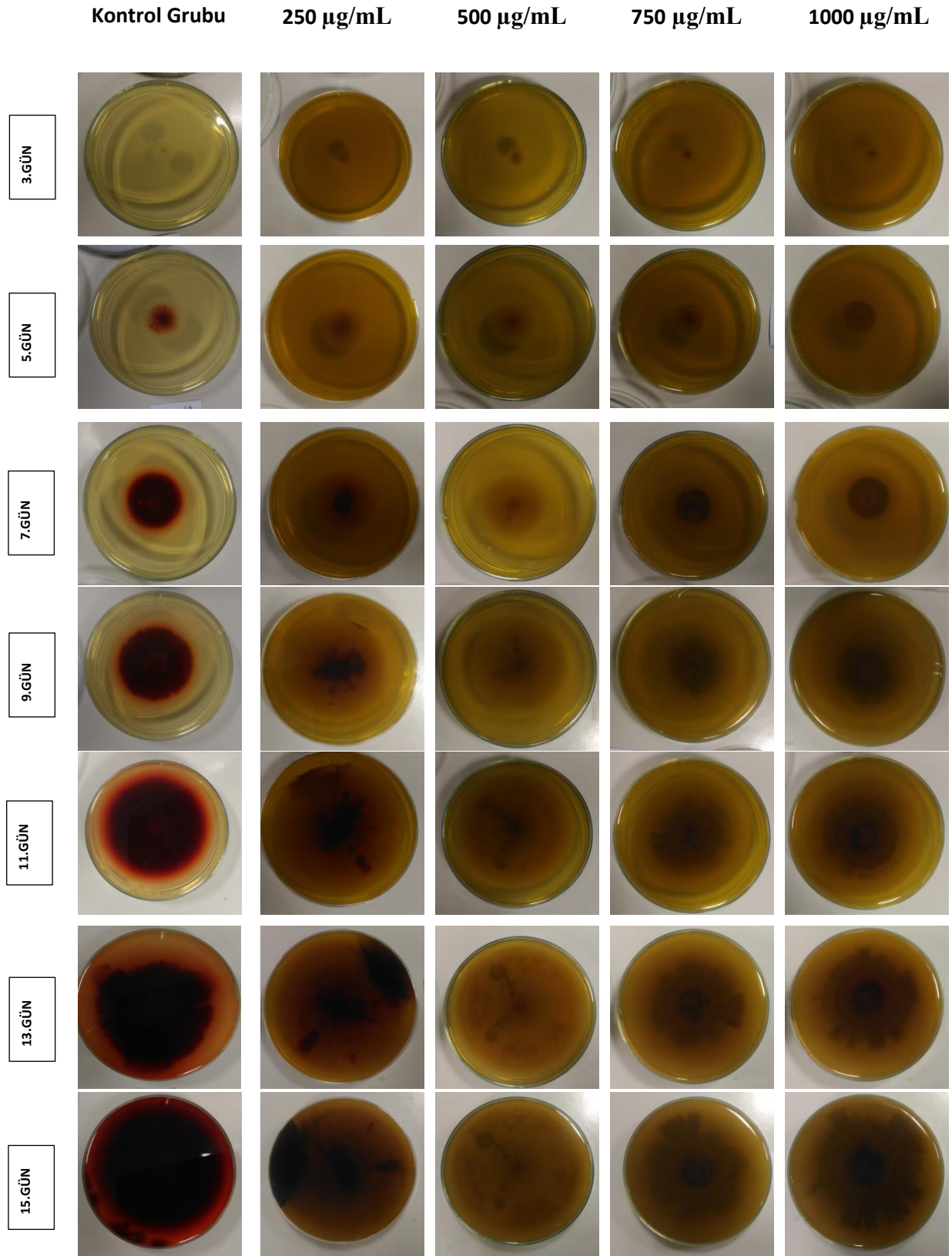
	1000 µg/mL	750 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL
3. Gün	0	0	0	0
5. Gün	0	0	0	0
7. Gün	0	0	0	+1
9. Gün	0	0	0	+1
11. Gün	0	0	0	+1
13. Gün	0	0	0	+2
15. Gün	0	0	0	+2

**Tablo 3.17:** Farklı bakır konsantrasyonları için *P. canescens*' de pigment oluşumunun derecelendirilmesi.

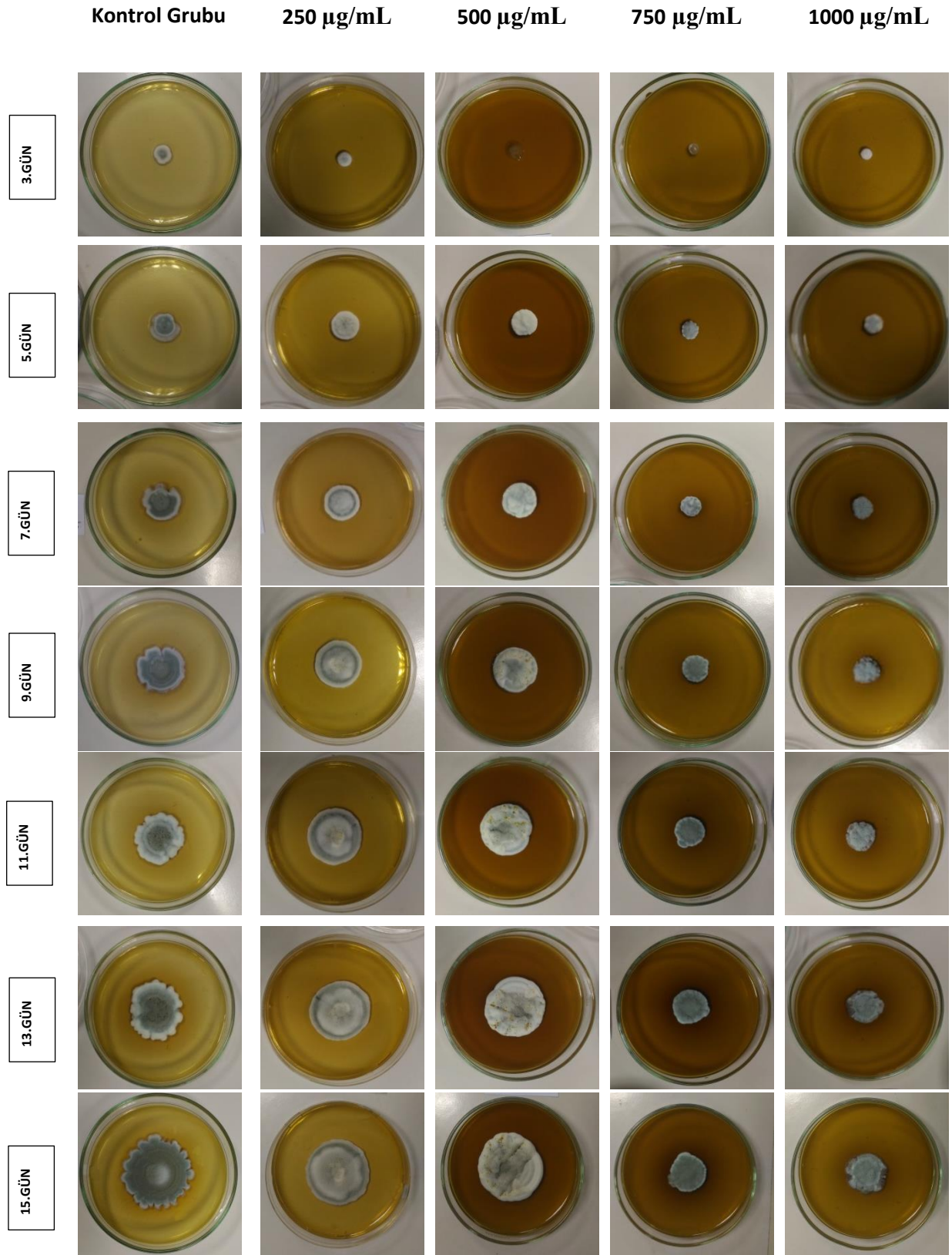
	1000 µg/mL	750 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL
3. Gün	0	0	0	0
5. Gün	0	0	0	0
7. Gün	0	0	0	0
9. Gün	0	0	0	+1
11. Gün	+1	+1	+1	+1
13. Gün	+1	+1	+1	+2
15. Gün	+1	+1	+1	+2



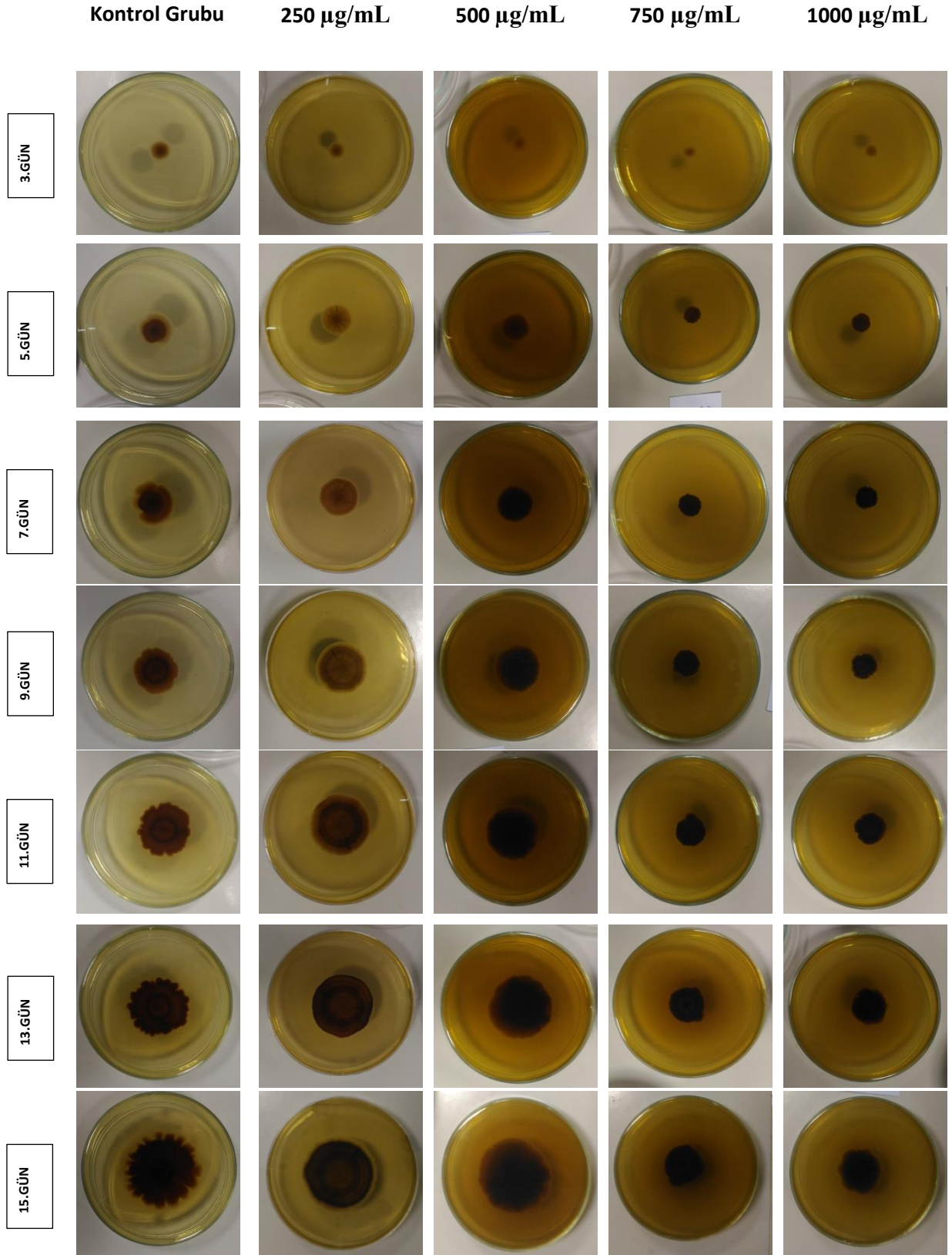
Şekil 3.17: *P. purpurogenum*' da pigment üretiminde bakır elementinin farklı konsantrasyonlar için petri kabının üstten görünümü.



Şekil 3.18: *P. purpurogenum*' da pigment üretiminde bakır elementinin farklı konsantrasyonlar için petri kabının alttan görünümü



Şekil 3.19: *P. canescens*' de pigment üretiminde bakır elementinin farklı konsantrasyonlar için petri kabının üstten görünümü.



Şekil 3.20: *P. canescens*' de pigment üretiminde bakır elementinin farklı konsantrasyonlar için petri kabının alttan görünümü.

*P. purpurogenum*'da ve *P. canescens*'de koloni gelişimi üzerine, alüminyum elementinin farklı konsantrasyonlarda (1000 µg/mL, 750 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL) 28 °C'de etkisi belirlendi ve bu uygulamalar sonucunda elde edilen kolonilerin çapları mm cinsinden ölçülerek sonuçlar Tablo 3.18 ve 3.19'da verildi. Şekil 3.21, 3.22, 3.23, 3.24' de ise sonuçlara ait fotoğraflar yer almaktadır. Pigment oluşumuna ait sonuçlar ise Tablo 3.20 ve 3.21' de yer almaktadır.

**Tablo 3.18:** *P. purpurogenum* türünde alüminyum(Al) elementinin koloni büyümesi üzerine etkisi.

	1000 µg/mL	750 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL
3. Gün	18±0.66	19±0.66	19±0.66	20±0.33
5. Gün	34±0.66	35±0.33	35±0.33	35±0.66
7. Gün	47±0.66	48±0.33	48±0.33	48±0.66
9. Gün	64±0.66	65±0.33	66±0.33	67±0.66
11. Gün	78±0.66	79±0.33	81±0.33	83±0.33
13. Gün	84±0.33	85±0.33	86±0.33	87±0.66
15. Gün	89±0.66	89±0.66	89±0.66	89±0.66

**Tablo 3.19:** *P. canescens* türünde alüminyum(Al) elementinin koloni büyümesi üzerine etkisi.

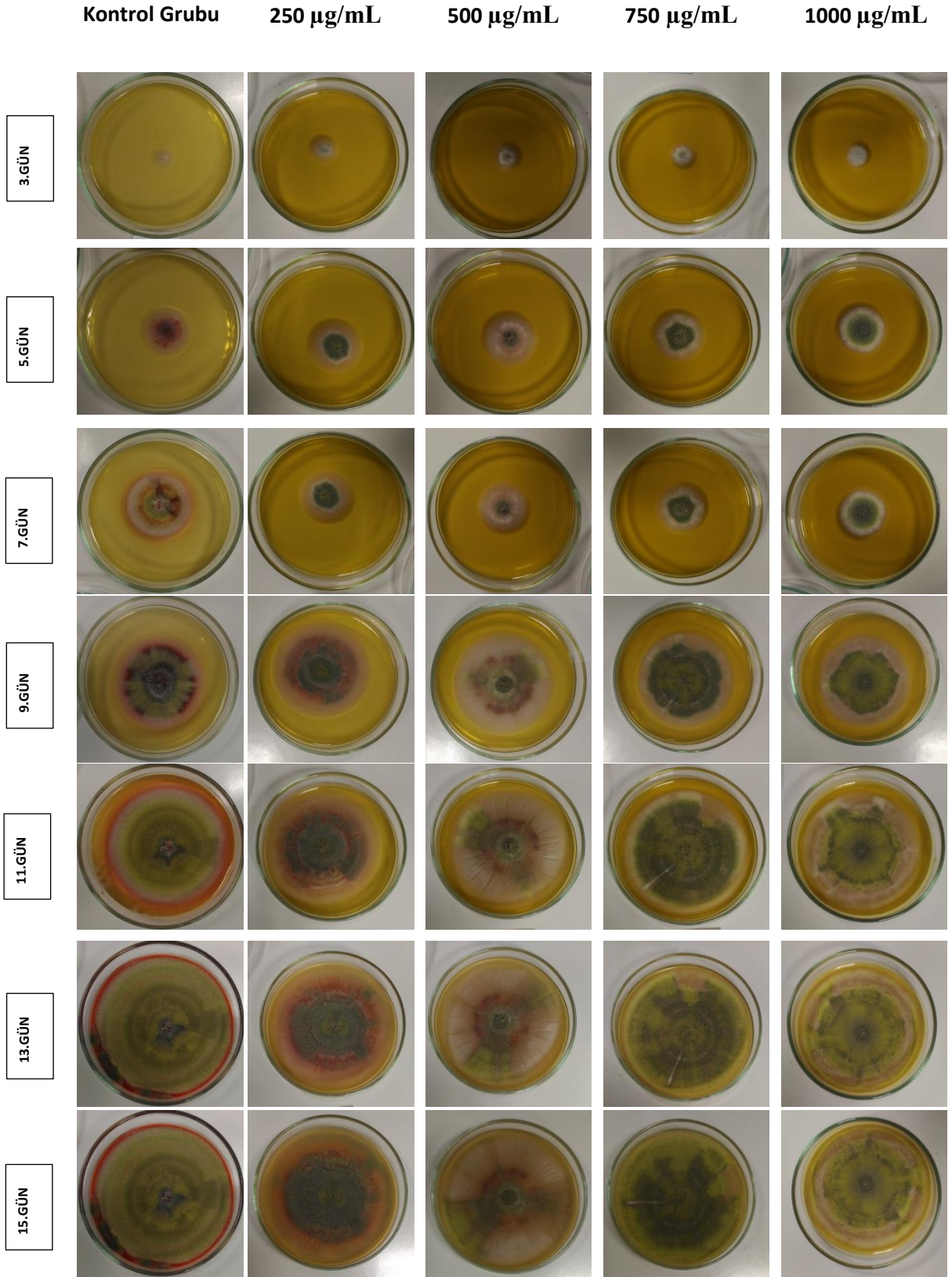
	1000 µg/mL	750 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL
3. Gün	11±0.33	11±0.33	11±0.66	11±0.66
5. Gün	18±0.33	18±0.66	19±0.66	20±0.33
7. Gün	24±0.33	25±0.33	25±0.66	26±0.33
9. Gün	31±0.33	32±0.33	34±0.33	35±0.66
11. Gün	38±0.66	40±0.66	43±0.66	44±0.66
13. Gün	43±0.66	45±0.66	50±0.66	51±0.66
15. Gün	55±0.33	56±0.33	68±0.33	71±0.33

**Tablo 3.20:** Farklı Al konsantrasyonları için *P. purpurogenum* ' da pigment oluşumunun derecelendirilmesi.

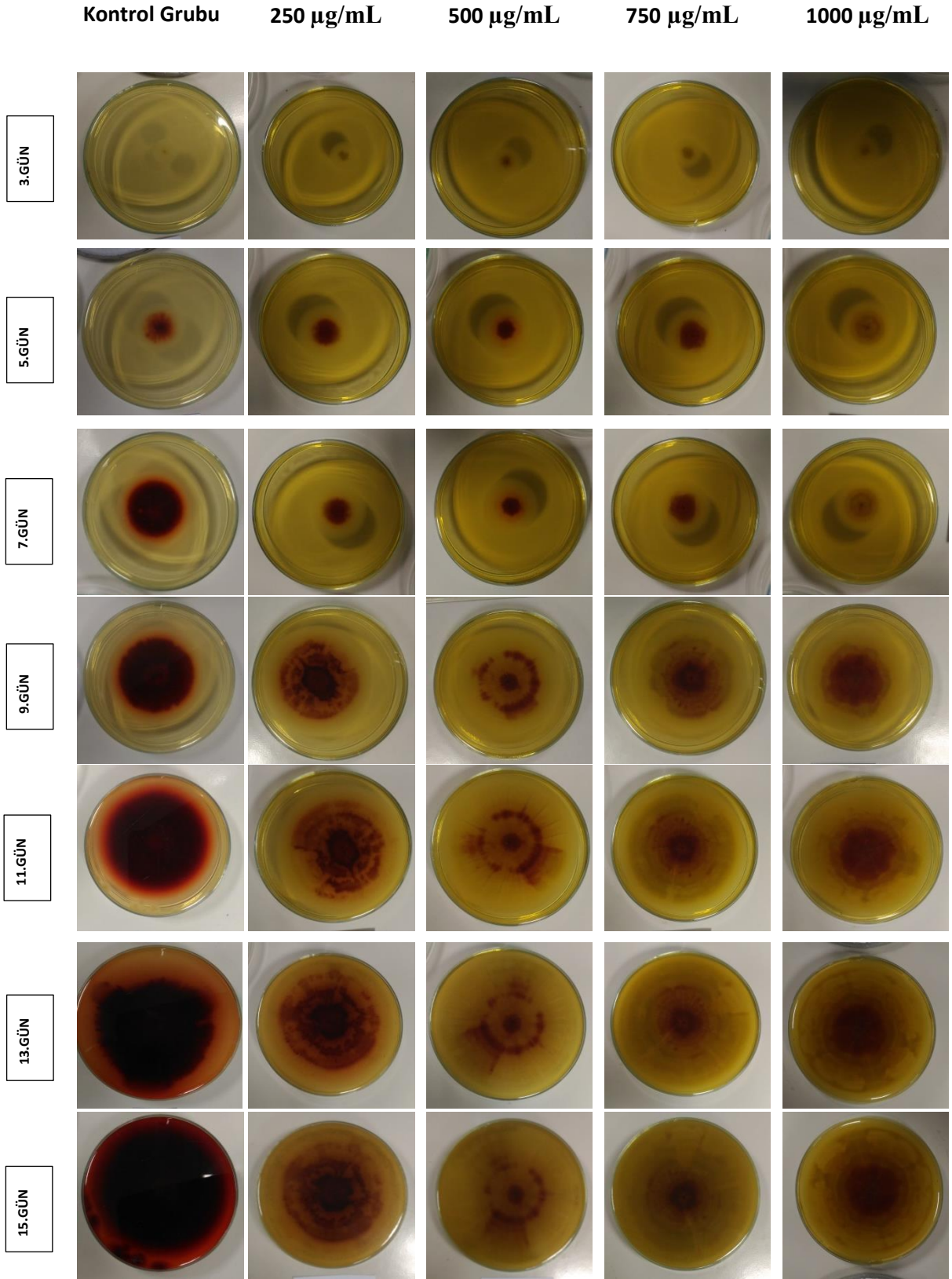
	1000 µg/mL	750 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL
3. Gün	0	0	0	0
5. Gün	+1	+1	+1	+1
7. Gün	+1	+1	+1	+1
9. Gün	+2	+2	+2	+2
11. Gün	+2	+2	+2	+3
13. Gün	+2	+2	+2	+3
15. Gün	+2	+2	+2	+3

**Tablo 3.21:** Farklı Al konsantrasyonları için *P. canescens* ' de pigment oluşumunun derecelendirilmesi.

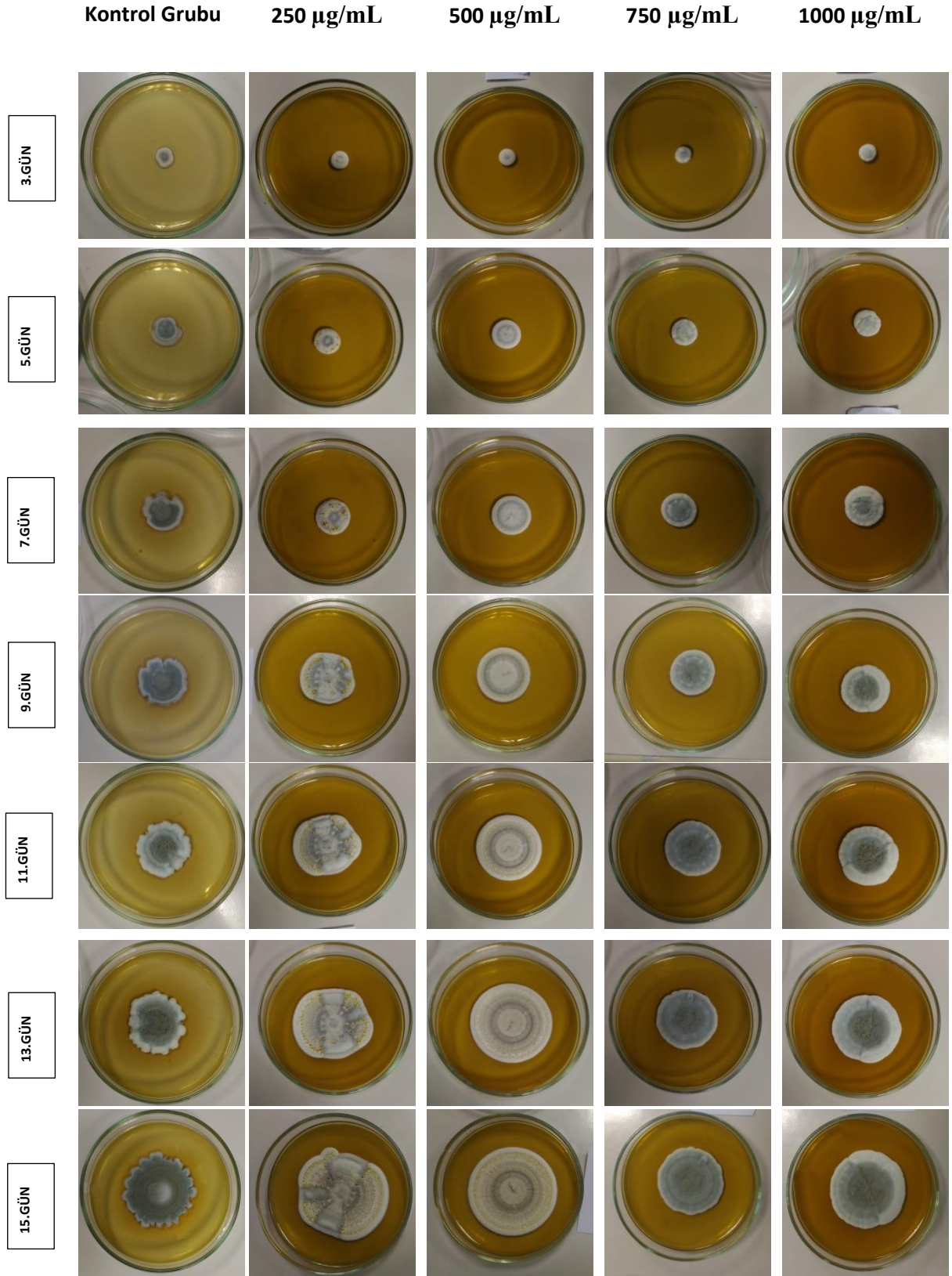
	1000 µg/mL	750 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL
3. Gün	0	0	0	0
5. Gün	0	0	0	0
7. Gün	0	0	+1	+1
9. Gün	0	0	+1	+1
11. Gün	+1	+1	+2	+2
13. Gün	+1	+1	+3	+3
15. Gün	+1	+1	+3	+3



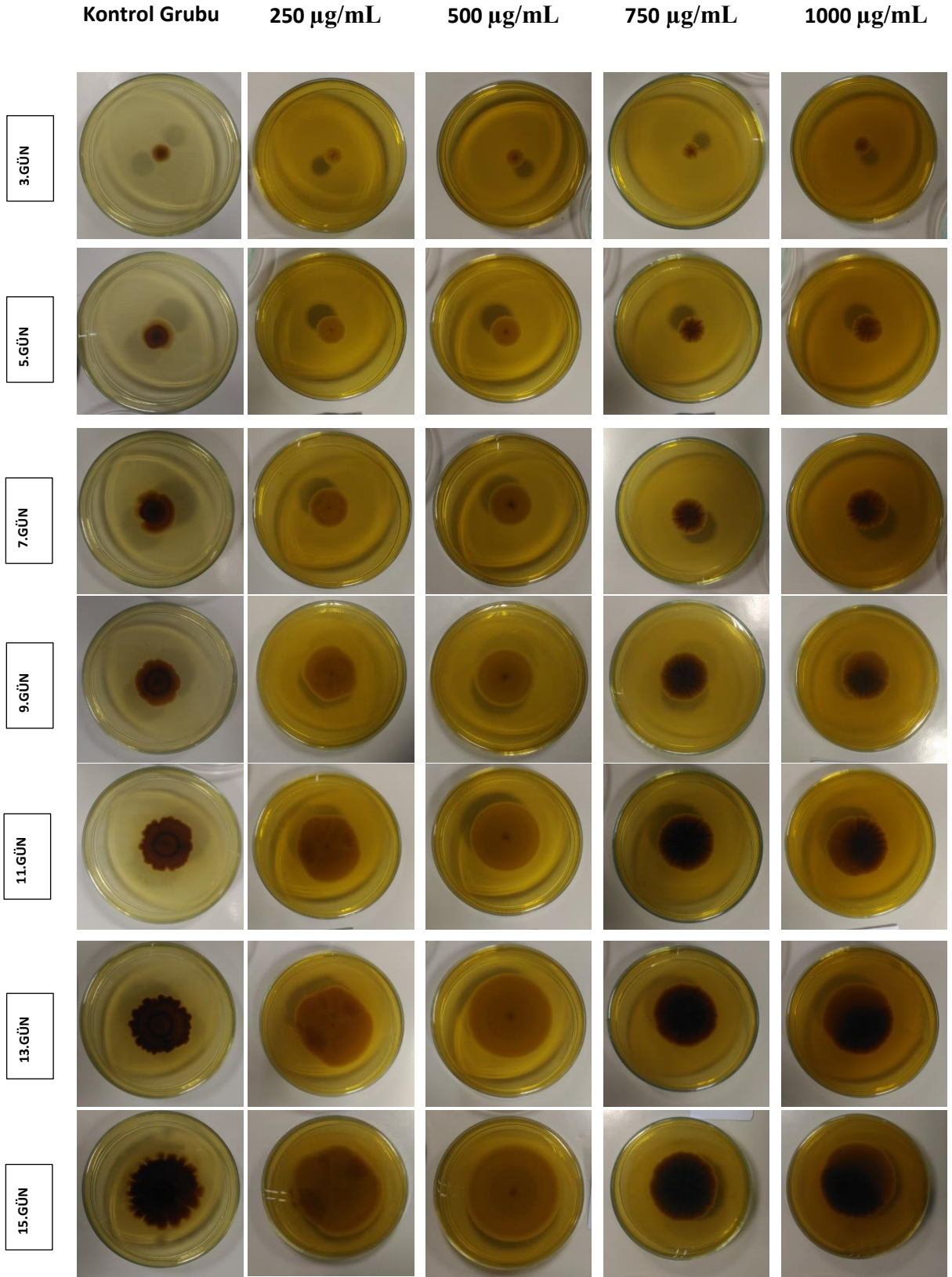
Şekil 3.21: *P. purpurogenum*' da pigment üretiminde aliminyum elementinin farklı konsantrasyonlar için petri kabının üstten görünümü.



Şekil 3.22: *P. purpurogenum* ' da pigment üretiminde alüminyum elementinin farklı konsantrasyonlar için petri kabının alttan görünümü.



Şekil 3.23: *P. canescens*' de pigment üretiminde alüminyum elementinin farklı konsantrasyonlar için petri kabının üstten görünümü.



Şekil 3.24: *P. canescens*' de pigment üretiminde alüminyum elementinin farklı konsantrasyonlar için petri kabının alttan görünümü.

### 3.5.3 Farklı pH Değerlerinin Koloni Gelişimi ve Pigment Üretimi Üzerine Etkisine ait Bulgular

*P. purpurogenum*'da ve *P. canescens*'de koloni gelişimi üzerine, farklı pH ların (4.0, 5.5 ve 7.0) 28 °C'de etkisi belirlendi ve bu uygulamalar sonucunda elde edilen kolonilerin çapları mm cinsinden ölçülerek sonuçlar Tablo 3.22 ve 3.23'te verildi. Şekil 3.25, 3.26, 3.27, 3.28' de ise sonuçlara ait fotoğraflar yer almaktadır. Pigment oluşumuna ait sonuçlar ise Tablo 3.24 ve 3.25' te yer almaktadır.

**Tablo 3.22:** *P. purpurogenum* türünde pH değişimlerinin koloni büyümesi üzerine etkisi.

	pH 4.0	pH 5.5	pH 7.0
3. Gün	19±0.66	15±0.33	18±0.33
5. Gün	34±0.66	29±0.66	33±0.66
7. Gün	48±0.66	45±0.33	47±0.33
9. Gün	63±0.66	59±0.33	65±0.66
11. Gün	78±0.66	78±0.33	78±0.66
13. Gün	83±0.33	89±0.66	83±0.33
15. Gün	89±0.66	89±0.66	89±0.66

**Tablo 3.23:** *P. canescens* türünde pH değişimlerinin koloni büyümesi üzerine etkisi.

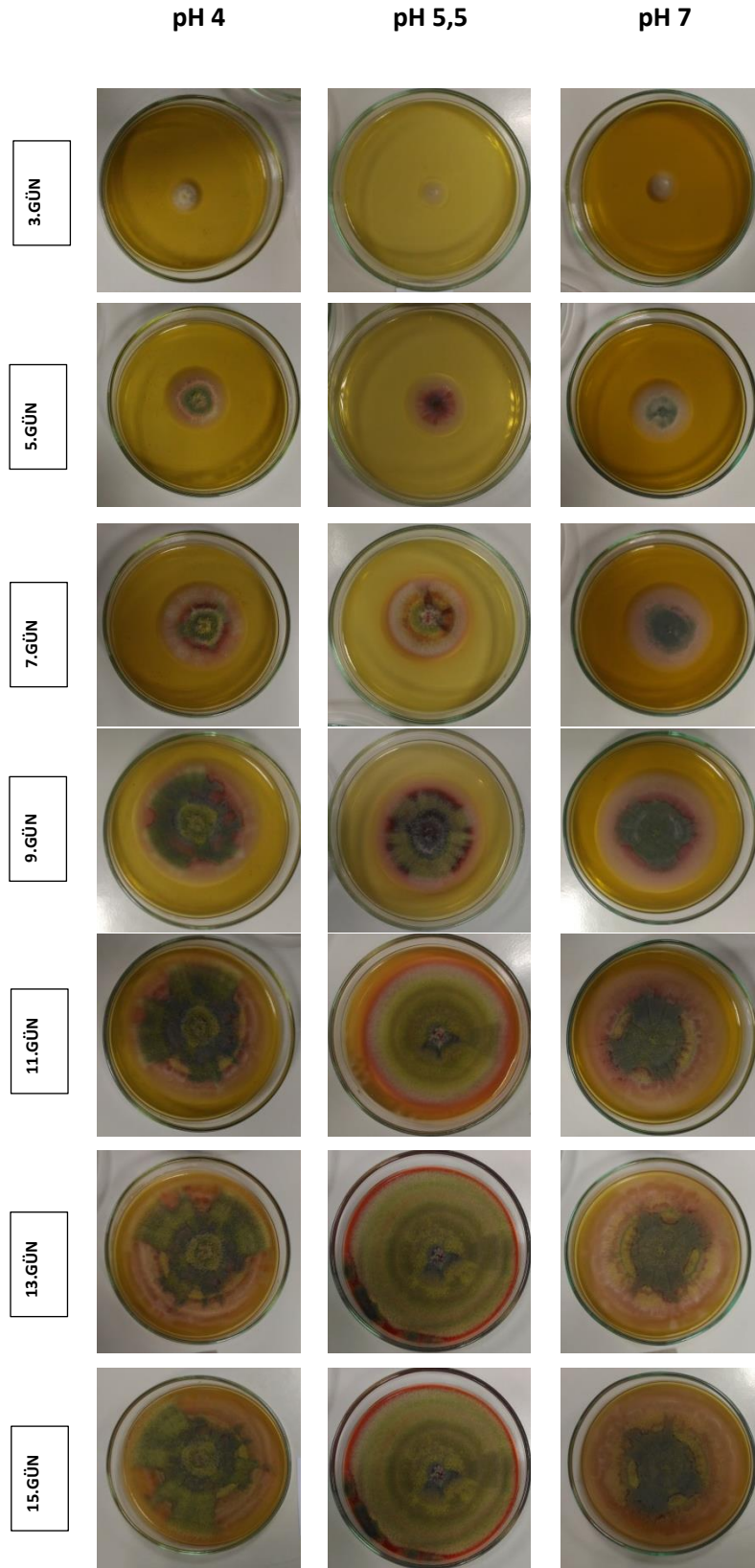
	pH 4.0	pH 5.5	pH 7.0
3. Gün	10±0.66	14±0.66	14±0.66
5. Gün	17±0.33	21±0.33	18±0.66
7. Gün	23±0.66	29±0.33	28±0.66
9. Gün	30±0.33	35±0.33	34±0.66
11. Gün	36±0.33	39±0.33	38±0.66
13. Gün	40±0.66	49±0.66	46±0.66
15. Gün	49±0.66	59±0.66	56±0.33

**Tablo 3.24:** Farklı pH değerleri için *P. purpurogenum*’ da pigment oluşumunun derecelendirilmesi.

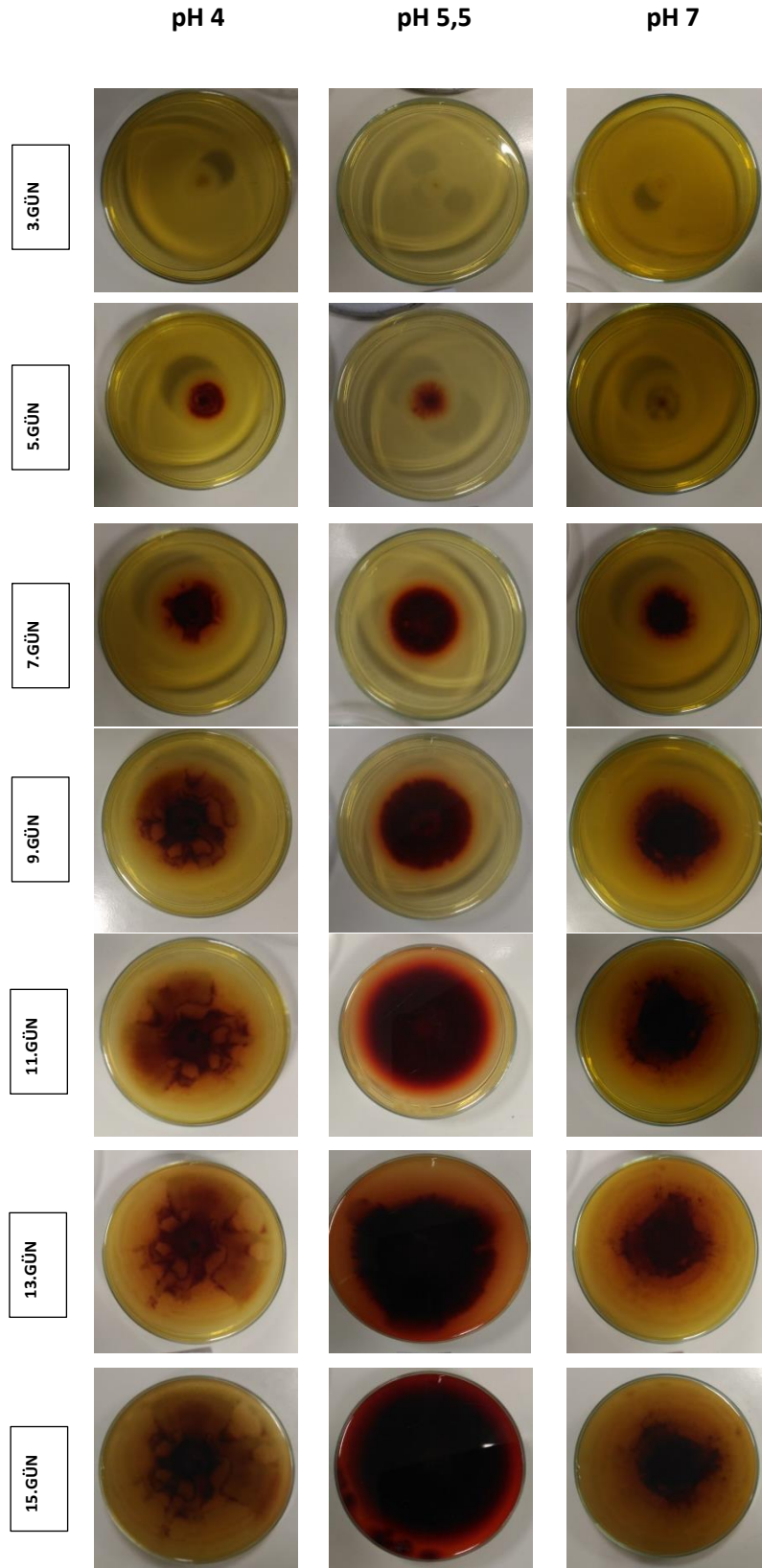
	pH 4.0	pH 5.5	pH 7.0
3. Gün	0	0	0
5. Gün	+1	+1	0
7. Gün	+2	+2	+1
9. Gün	+2	+3	+2
11. Gün	+3	+3	+3
13. Gün	+3	+4	+3
15. Gün	+3	+5	+3

**Tablo 3.25:** Farklı pH değerleri için *P. canescens*’ de pigment oluşumunun derecelendirilmesi.

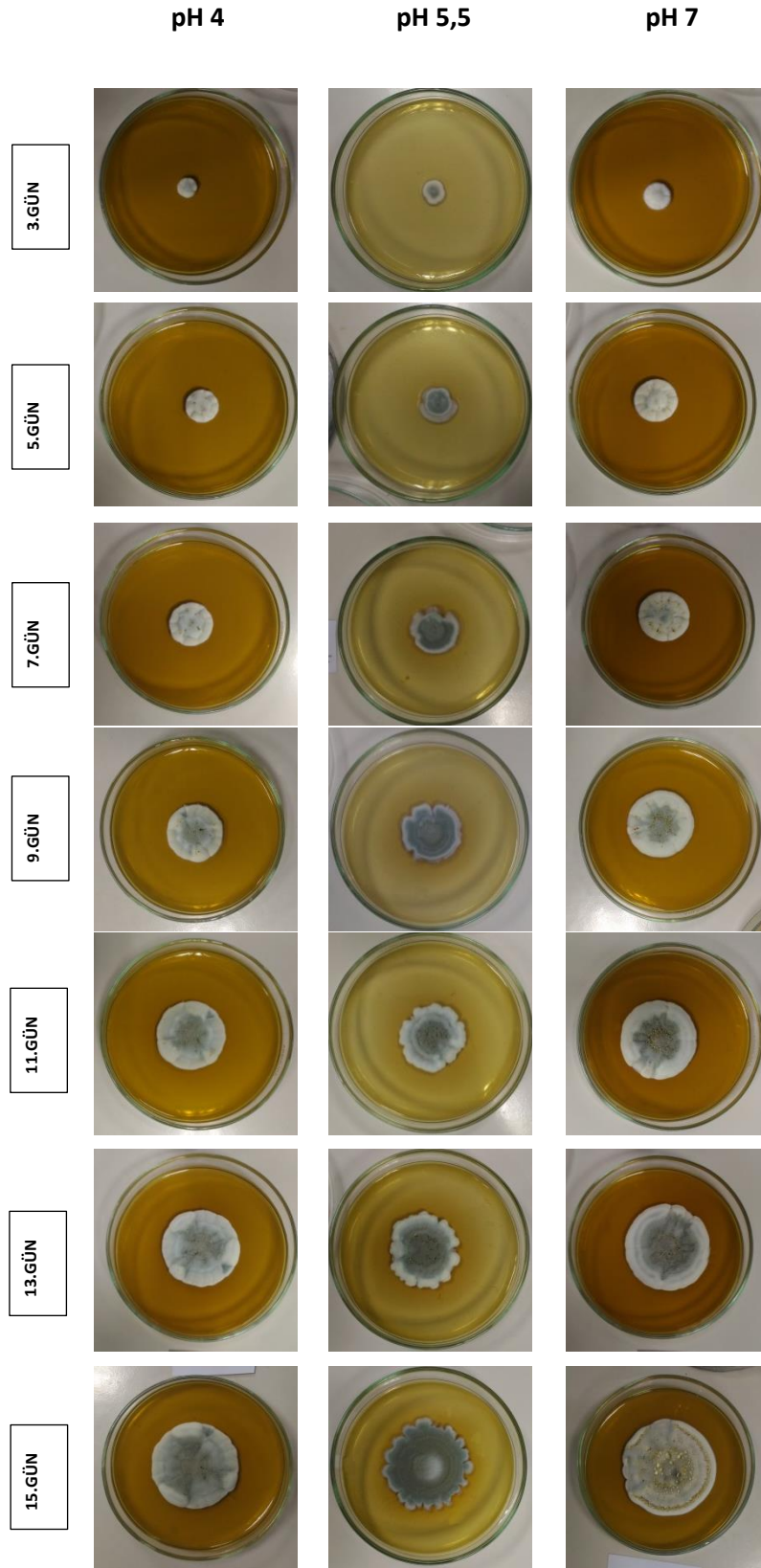
	pH 4.0	pH 5.5	pH 7.0
3. Gün	0	0	0
5. Gün	0	0	0
7. Gün	+1	+1	+1
9. Gün	+2	+2	+2
11. Gün	+2	+3	+2
13. Gün	+3	+4	+3
15. Gün	+3	+5	+3



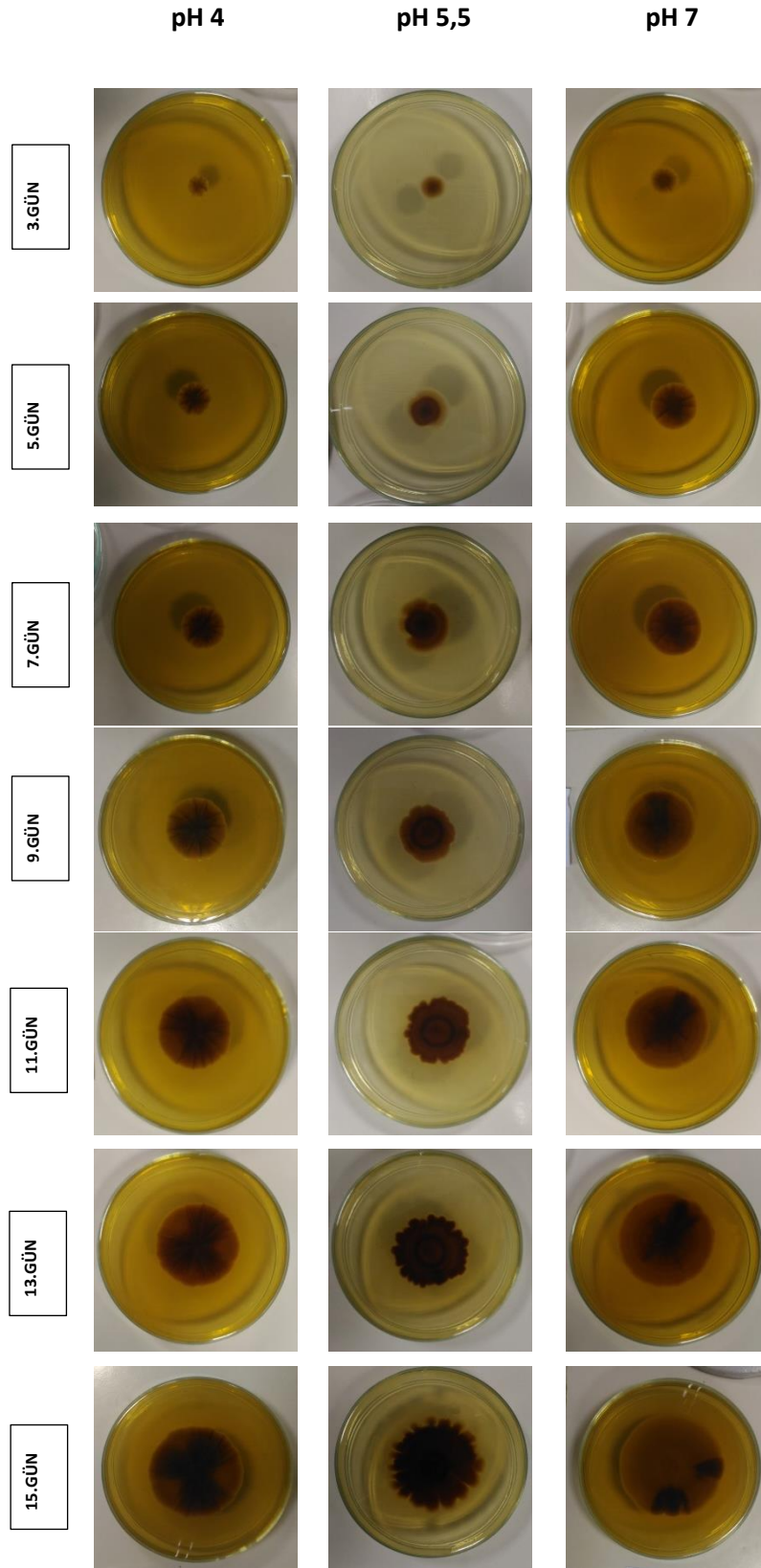
Şekil 3.25: *P. purpurogenum* 'da pigment üretiminde farklı pH değerleri için petri kabının üstten görünümü.



Şekil 3.26: *P. purpurogenum*' da pigment üretiminde farklı ph değerleri için petri kabının alttan görünümü.



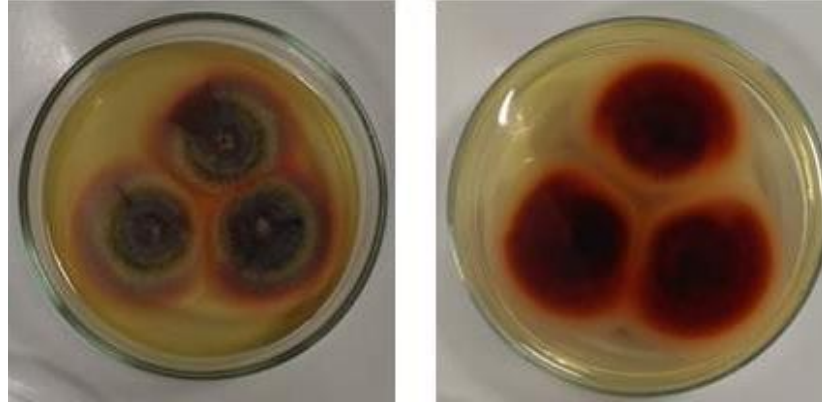
Şekil 3.27: *P. canescens*' de pigment üretiminde farklı pH değerleri için petri kabının üstten görünümü.



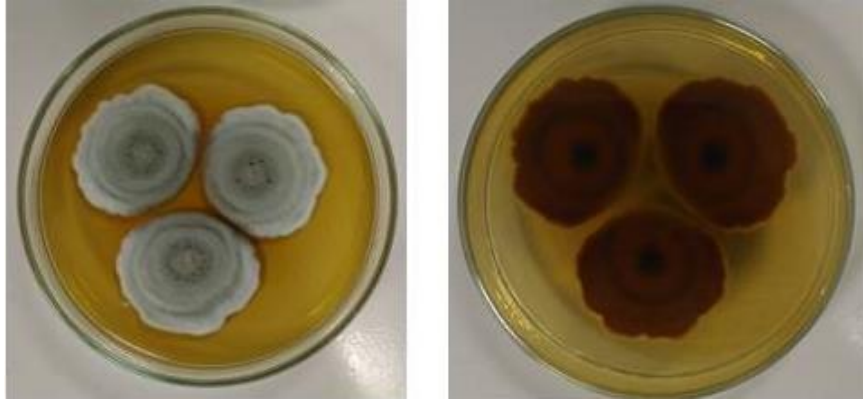
Şekil 3.28: *P. canescens*' de pigment üretiminde farklı pH değerleri için petri kabının alttan görünümü.

### 3.6 Katı Besiyerinde Pigment Üretimine Ait Bulgular

*P.purpurogenum* ve *P. canescens*, için en fazla pigment üretimi görülen besiyeri ortamı, sıcaklık, pH belirlendi. En iyi pigment oluşumu için; besiyeri olarak MEA, 5.5 Ph ve 28 °C sıcaklık seçildi. Belirlenen koşullarda inkübe edilen petrilere *P. purpurogenum*'da 5. günden itibaren kırmızı, *P. canescens*'da 7. günden sonra sarı pigment üretimi gözlemlendi ve pigment üretimi 15. güne kadar artarak devam etti (Şekil 3.29 ve 3.30).



Şekil 3.29: *P. purpurogenum* MEA ile pigment üretimi.



Şekil 3.30: *P. canescens* MEA ile pigment üretimi.

### 3.7 Pigment Eksresinin Elde Edilmesi

Ekstraksiyon işlemi sonucunda *P. canescens*'e ait 1000 mL etanol ekstresinden 5,6 gr koyu sarı macunumsu, *P. purpurogenum*'a ait 1000 mL etanol ekstresinden 5,8 gr koyu kırmızı macunumsu pigment ekstresi elde edildi.

### 3.8 Spektral Analizler

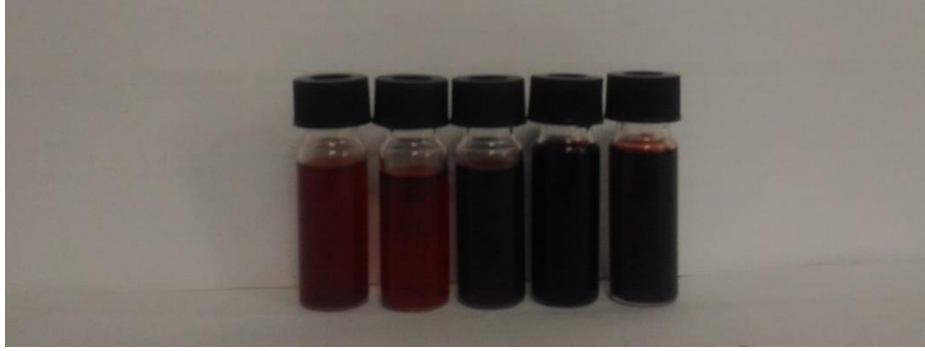
#### 3.8.1 Pigment Ekstrelerinin Farklı Çözücülerdeki Spektral Analizleri

Elde edilen sarı ve kırmızı pigmentlerin farklı çözücülerde sırası ile Su, Etanol, Metanol, DMSO ve Asetik asit çözünme durumları belirlendi. Örneklere ait resimler Şekil 3.31 ve 3.32' de verildi.

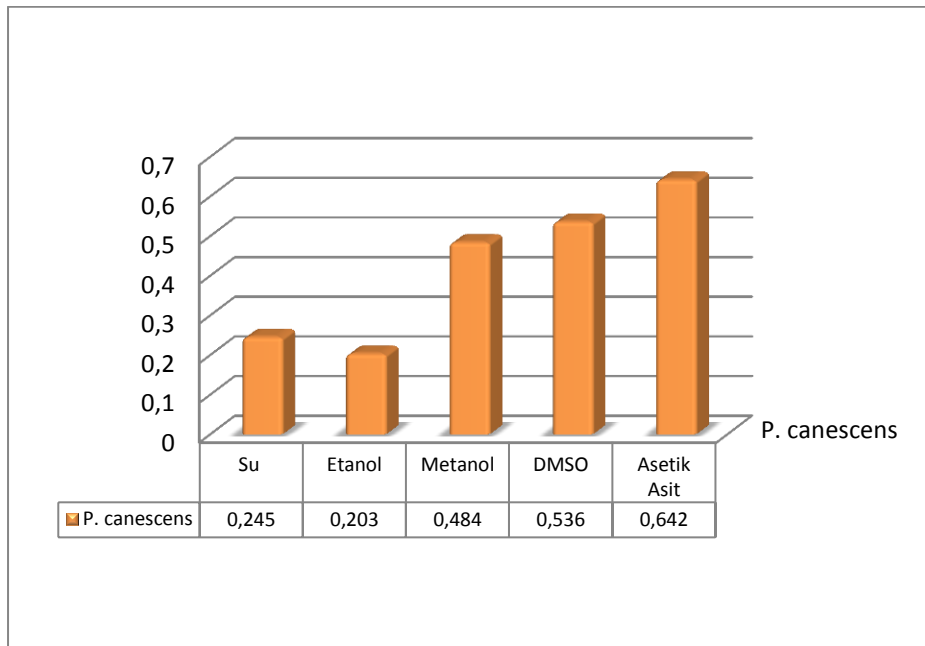
Ayrıca farklı solventler kullanılarak 500 mg/mL konsantrasyonundaki pigment ekstresinin su, etanol, methanol, DMSO ve asetik asit ile 450 nm dalga boyundaki renk değişimlerine ait absorbans değerleri Şekil 3.33 ve 3.34' te verildi.



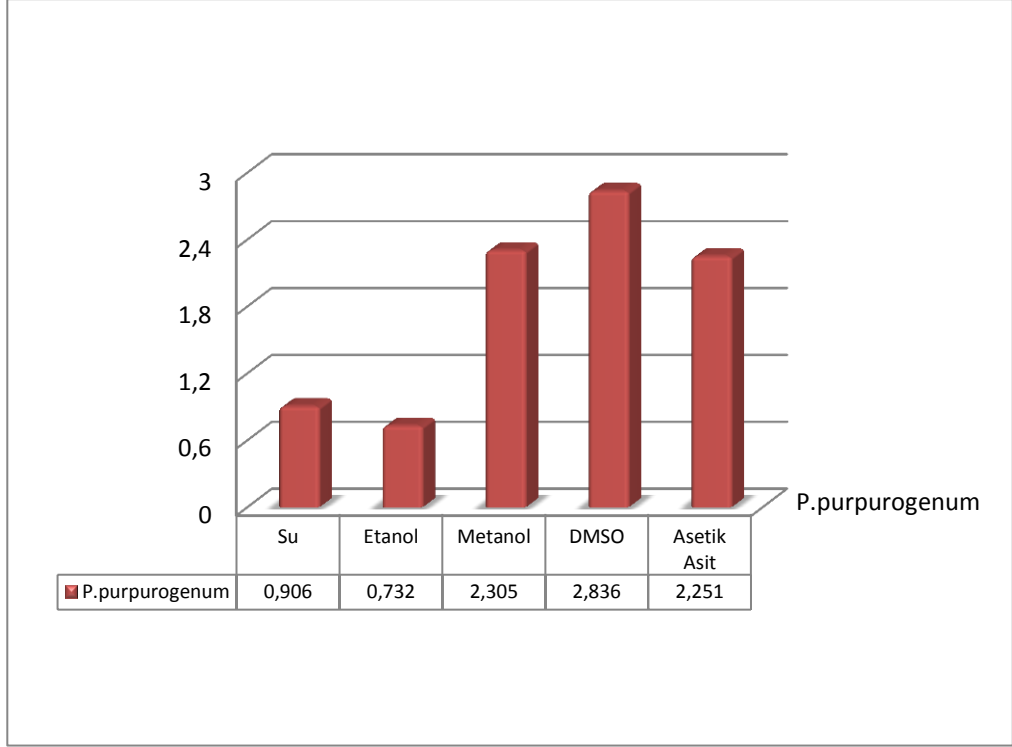
Şekil 3.31: *P. canescens* farklı solventler ile 500 mg/mL konsantrasyonundaki pigment çözeltileri.



**Şekil 3.32:** *P. purpurogenum* farklı solventler ile 500 mg/mL konsantrasyonundaki pigment çözeltileri.



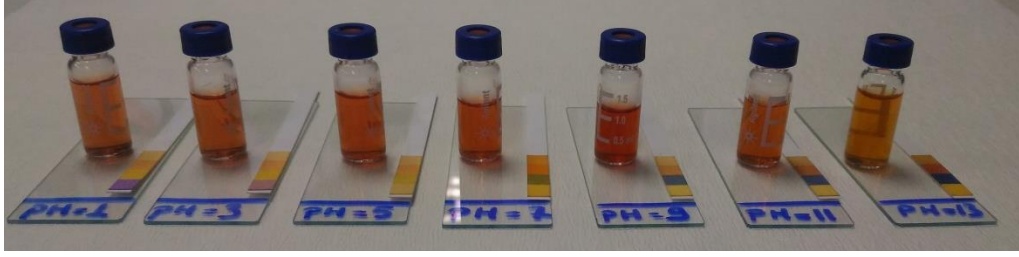
**Şekil 3.33:** *P. canescens*' in farklı solventlerde 500 mg/mL konsantrasyonundaki pigment çözeltilerinin 450 nm dalga boyundaki absorbans değerleri.



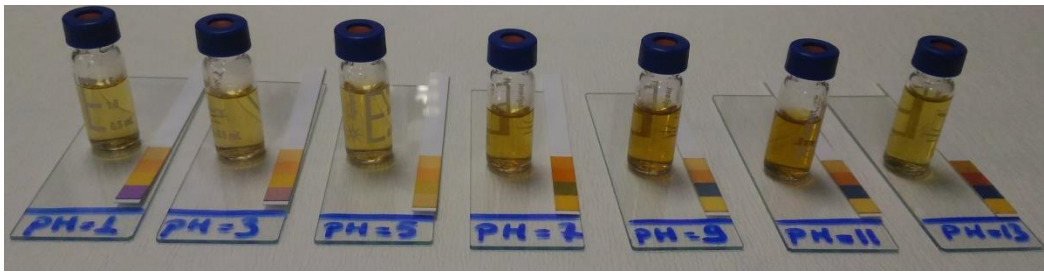
**Şekil 3.34:** *P. purpurogenum*' un farklı solventlerde 500 mg/ml konsantrasyonundaki pigment çözeltilerinin 450 nm dalga boyundaki absorbans değerleri.

### 3.8.2 Pigment Ekstrelerinin Farklı pH Değerlerindeki Spektral Analizleri

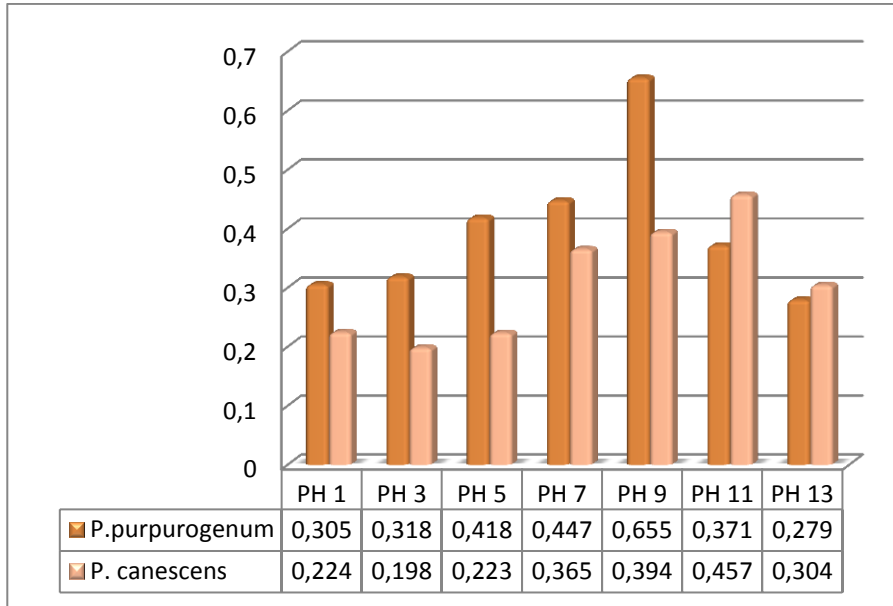
*P.purpurogenum* ve *P.canescens* stok pigment çözeltilerinin 500 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri farklı pH değerlerinde renk karakterizasyonu bakımından test edildi (Şekil 3.35 ve 3.36). *P.purpurogenum* ve *P.canescens*' den elde edilen pigmentlerin 500 mg/mL konsantrasyonunda farklı pH değerlerinde (1, 3, 5, 7, 9, 11 ve 13) oda sıcaklığında 450 nm dalga boyunda absorbans değerleri elde edildi (Şekil 3.37).



Şekil 3.35: *P.purpurogenum* 'un 500 mg/mL konsantrasyondaki pigment çözeltisinin farklı pH (1-13) değerlerindeki renk değişimi.



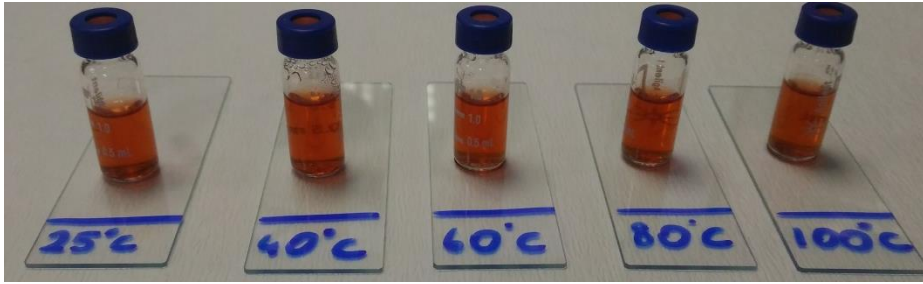
Şekil 3.36: *P. canescens* 'in 500 mg/ml konsantrasyondaki pigment çözeltisinin farklı pH (1-13) değerlerindeki renk değişimi.



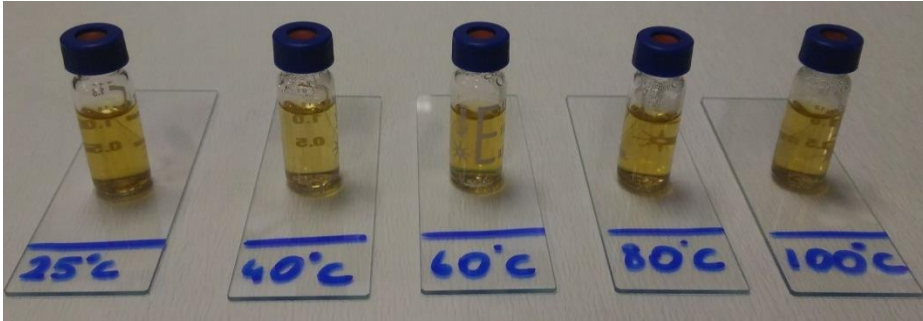
Şekil 3.37: *P. purpurogenum* ve *P. canescens* pigment çözeltilerinin farklı pH değerlerindeki absorbans değerleri.

### 3.8.3 Pigment Ekstrelerinin Farklı Sıcaklık Değerlerindeki Spektral Analizleri

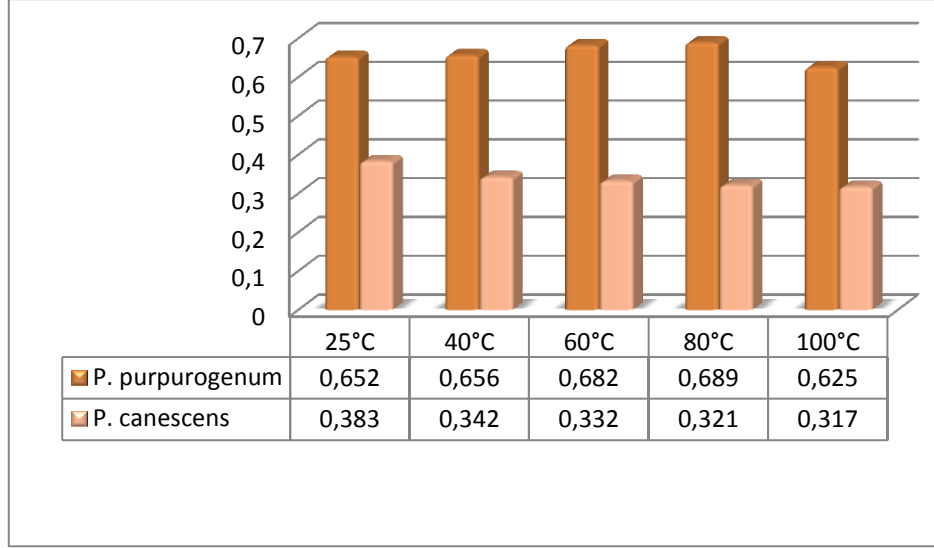
*P. purpurogenum* ve *P. canescens* stok pigment çözeltilerinin 500 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri farklı sıcaklık değerlerinde renk karakterizasyonu bakımından test edildi (Şekil 3.38 ve 3.39). *P. purpurogenum* ve *P. canescens*' den elde edilen pigmentlerin 500 mg/mL konsantrasyonunda farklı sıcaklık derecelerinin (25, 40, 60, 80 ve 100 °C) 450 nm dalga boyunda absorpsiyonlar değerleri elde edildi (Şekil 3.40).



Şekil 3.38: *P. purpurogenum*' un pigment çözeltilisinin farklı sıcaklık değerlerinde renk değişimi.



Şekil 3.39: *P. canescens*' in pigment çözeltilisinin farklı sıcaklık değerlerinde renk değişimi.



**Şekil 3.40:** *P. purpurogenum* ve *P. canescens* pigment çözeltilerinin farklı sıcaklık değerlerindeki absorbans değerleri.

#### 3.8.4 Hunter Renk Sistemine Göre Pigmentlerin Renk Tayini

Çalışmamızda pigmentlerin ekstre rengi Hunter kalorimetresi ile çözeltilerin rengi ise Color Grap (color detection) uygulaması değerlerine ( $L^*a^*b^*$ ) göre belirlenmiştir. Sonuçlar tablo 3.26 ve 3.27’ de verilmiştir.

**Tablo 3.26:** Hunter kalorimetresi değerleri.

Örnek	$L^*$	$a^*$	$b^*$
<i>P. purpurogenum</i>	5.02	3.89	2.09
<i>P. canescens</i>	5.13	3.48	2.21

**Tablo 3. 27:** Color grap (color detection) uygulaması değerleri.

Örnek	$L^*$	$a^*$	$b^*$
<i>P. purpurogenum</i>	56.30	47.10	19.70
<i>P. canescens</i>	94.00	9.60	29.80

### 3.9 Aflatoksin Analiz Sonuçları

Aflatoksin testleri sonucunda *P.purpurogenum* ve *P. canescens*' te Aflatoksin B<sub>1</sub>, Aflatoksin B<sub>2</sub>, Aflatoksin G<sub>1</sub>, Aflatoksin G<sub>2</sub> varlığı tespit edilemedi. Sonuçlar Ek-E ve Ek-F' de verildi.

#### 4. TARTIŞMA

Bu çalışma ile Manisa ili Akhisar ilçesi Musaca köyünden alınan toprak örneklerinde bulunan mikrofungusların incelenmesi amacıyla yapılan kalitatif ve kantitatif analizler sonucunda, sonbahar mevsiminde alınan 17 toprak örneğinin “toprağı sulandırma metodu” ile incelenmesine göre 162 izolat elde edilmiştir. Tür zenginliği bakımından *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor* cinslerinin ön sıralarda yer aldığı görülmektedir. Baskınlık durumları ve koloni sayıları bakımından değerlendirildiğinde ise *Penicillium* cinsinin ardından *Aspergillus* ve *Mucor* cinslerinin ilk sıralarda yer aldığı görülmüştür.

Ayrıca invitro çalışmalarla, izole edilen funguslardan pigment üretici türlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada aynı zamanda sarı pigment üreticisi *P. canescens* ve kırmızı pigment üreticisi *P. purpurogenum* izolatlarının pigment üretiminin optimizasyonu ve pigment üretimine etki eden faktörlerin belirlenmesi sağlanmıştır.

Fungus tür sayısının bitkiler üzerinde yaşayanlar esas alındığında 1.5 milyondan fazla olduğunu tahmin edilmektedir. Buna toprak, su ve organizmalardaki funguslar da eklendiğinde bu sayının 5.1 milyonu geçeceği düşünülmektedir [79, 80]. Henüz tanılanan tür sayısının 70.000 civarında olduğu düşünüldüğünde bu alanda yapılacak pek çok çalışma ile pigment üreticisi fungusu izole etme olasılığını arttırmaktadır. Çalışmamızda topraktan izole edilen fungus türleri içinden 5 tane pigment üretici fungus belirlenmiştir. Bunlar arasından 2 tane güçlü pigment üreticisi seçilmiştir. Araştırma alanı topraklarında bulunan pigment üreticileri *P. purpurogenum* ve *P. canescens* türleridir.

Günümüze gelinceye kadar *Ascomycetes* sınıfına ait pigment üreticisi olarak belirlenmiş bazı türler şunlardır: *Monascus* spp., (sarı ve portakal rengi), *Epicoccum nigrum* (sarı ve portakal rengi), *Paecilomyces sinclairii*, (pH' a göre viole ve pembe), *Penicillium herquei* (kırmızı, mavimsi yeşil ve koyu kırmızı), *Roesleria hypogea* (kırmızı), *Penicillium atrovenerum* (mavimsi yeşil ve koyu kırmızı), *Penicillium oxalicum* var *armenica* (Dark red), *P. purpurogenum* (portakal sarı, portakal kırmızı),

*Penicillium persicinum* (kırmızımsı pembe), *Penicillium fagi* (yeşilimsi mavi) [81]. Çalışmamız bugüne kadar literatürde pigment üreticisi olarak yer almayan yeni bir türün, *P. canescens*'in ve ürettiği sarı pigmentin varlığını ortaya çıkarmıştır. *P. canescens*'in pigment üretimi literatürde ilk defa yer almaktadır.

Bu çalışmada *P. purpurogenum* ve *P. canescens*'e ait farklı besiyerlerinde pigment oluşumu ve koloni büyümesine ait sonuçlar incelendiğinde; en fazla pigment üretimi ve koloni büyüklüğüne MEA besiyerinde ulaşılmıştır. Farklı element konsantrasyonlarında pigment oluşumuna ait sonuçlar incelendiğinde; *P. purpurogenum*'da demir elementinin 1000, 750, 500, 250 µg/mL'lık konsantrasyonlarının koloni büyümesini etkilemediği ancak pigment oluşumunu azalttığı belirlenmiştir. Aynı koşullarda *P. canescens* incelendiğinde demir elementinin pigment üretimini tamamen durdurduğu görülmüştür.

Bakır elementine ait sonuçlar incelendiğinde ise *P. purpurogenum*'da koloni büyümesinin azaldığı pigment üretiminin 250 µg/mL'lık konsantrasyon dışında tamamen durduğu görülmüştür. Aynı koşullarda *P. canescens*'te koloni büyümesi ve pigment üretiminin azaldığı açık şekilde görülmüştür. Alüminyum elementine ait sonuçlar incelendiğinde ise, koloni büyümesi ve pigment üretimini en az etkileyen element olduğu görülmüştür. Farklı pH'larda yapılan çalışmalar incelendiğinde pH değişiminin pigment üretimini azalttığı görülmüştür. Yapılan çalışmalar dikkate alındığında en iyi pigment üretim koşulları 28 °C' de MEA besiyeri ve 5.5 pH olarak belirlenmiştir.

Fungusların toprak içerisindeki dağılımları ve çeşitlilikleri, ortamdaki enerji kaynakları ile alakalıdır. Yaşama alanına ait spesifik özellikler türlerin çoğalma, dağılma ve yaşama şansını belirleyen faktör olarak gösterilebilir. Toprak fungusları için toprağın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin önemli olduğu bilinmektedir [82].

Pradeep ve Pradeep (2013) *Fusarium* türleri üzerine yaptıkları çalışmada pigment biyosentezinin kültür koşullarına ve inkübasyon süresine bağlı olduğunu belirlemişlerdir. Besi ortamına eklenen farklı karbon ve nitrojen kaynaklarının, mineral tuzlarının, amino asit katkılarının fungal gelişimi ve üretilen pigmentlerin sentezini değiştirdiğini göstermişlerdir. Kültür gelişimi için 28 °C sıcaklıkta 5.5 pH'da 8 günlük inkübasyon süresini optimum olarak belirlemişlerdir [83, 84, 85].

Çalışmamızda farklı besiyerlerinde pigment oluşumu ve koloni büyümesi incelendiğinde; *P. purpurogenum* ve *P. canescens* için 28 °C' de MEA besiyerinde en iyi koloni büyüklüğüne ve maksimum pigment üretimine ulaşıldığı gözlemlendi.

*P. purpurogenum*' dan elde edilen kırmızı pigmentin ve *P. canescens*' ten elde edilen sarı pigmentin 500 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltisi farklı pH ve sıcaklık değerlerinde renk karakterizasyonu bakımından test edildi.

Velmurugan ve ark. (2010) canlıların ışığı algılama ve tepki verme yeteneğini, farklı renkteki ışık etkilerini kullanarak, farklı renk tonlarına sahip (kırmızı, pembe, kırmızımsı-kahverengi ve sarı gibi) beş pigment üreticisi tür (*M. purpureus*, *Isaria farinosa*, *Emericella nidulans*, *F. verticillioides* ve *P. purpurogenum*) üzerinde araştırmışlar [86, 87], ve fungal biyokütle, hücre dışı ve hücre içi pigment verimi üzerindeki ışığın değerlendirmişlerdir. Seçilen türlerden pigmentin üretimi için 25 ± 2 °C' de 7 gün boyunca hücre dışı ve hücre içi biyokütlelerinin büyüme miktarının ve pigment üretiminin karanlıkta sırasıyla 36.75±2.1, 29.70±2.6, 32.20±1.6, 30.80±2.2 ve 32.90±1.9 OD/g şeklinde arttığını bildirmişlerdir [88, 89]. Bizim çalışmamızda katı besiyerinde karanlık ortamda pigment üretiminin 15. güne kadar devam ettiği belirlendi.

Christiana (2016) *Monascus* gıda renklendirici üretimi için ilk ve en çok incelenen fungus türüdür. Günümüzde *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Talaromyces* ve *Paecilomyces* gibi birçok tür pigment üretiminde kullanılmaktadır. Çoğu fungus suşu tarafından pigment üretimi için besiyerinin optimum pH değerleri 4 ile 7 arasında değişmektedir. Ancak, birkaç suşun optimum pH değeri 3 ve 9 arasındadır. Optimum pH değeri de pigmente bağlıdır. Çoğu fungus türü tarafından pigment üretimi için optimum sıcaklık 24-30 °C arasında değişmektedir [90].

Pradeep ve ark. (2013) *F. moniliforme* üzerinde yaptıkları çalışmada pigment üretiminde optimal pH' in 5.5 olduğunu belirtmişlerdir [91]. Ayrıca Velmurugan ve ark. (2010) *I. farinosa* [92], Visalakchi ve Muthumary (2010) *Monodictys castaneae* [93], Méndez ve ark. (2012) *P. purpurogenum* ve yaptıkları benzer çalışmalarda pigment üretimi için optimal pH' in 5 olduğu belirtmişlerdir [94-95]. Çalışmamızda 28 °C' de ve pH 5.5' te *P. purpurogenumdan*' den ve *P.canenscens*' ten en yüksek verimde pigment üretimi sağlandı.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada amaç tamamen organik olan fungal pigmentlerin endüstriyel olarak kullanılmasını sağlamak ve sentetik boyar maddelere alternatif olarak doğayla barışık, çevreye zararsız ve çeşitli alanlarda (gıda, tekstil ve halıcılık) ihtiyaç duyulan pigmentleri elde etmektir. Bu amaçla, bundan sonra yapılabilecek çalışmalarda, çeşitli analizler ile (mikotoksite testleri, genotoksite, yapı analizleri) pigmentin güvenilirliği ve yapısının aydınlatılması hedeflenmektedir. Çeşitli çalışmaların yapılması fungal pigmentlerin endüstriyel olarak kullanımının yaygınlaşmasının önünü açacaktır.

Bu çalışma ile, ekosisteme zarar vermeyen ve insanların sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olmayan yeni doğal bir pigmentler ortaya çıkarılmıştır. Mikroorganizmalar birer fabrika olarak iş görerek temiz bir şekilde pigment üretebilir. Üretim prosesi daha basittir. İşletme giderleri yüksek değildir. Yüksek ısı, basınç gerektirmez. Bu durum pigment üretimi açısından endüstriyel olarak bir avantaj sağlayacaktır. Fungal pigment üretimi kimyasal pigment üretimlerine göre daha ucuz bir yöntemdir.

Ayrıca çevre ve iklim koşullarına bağlı olmaksızın her istenildiğinde piyasaya arz edilebilir. Bu nedenle daha ileri çalışmalarda hacim büyütme (yün, kumaş) ve haslık gibi özellikleri endüstriyel olarak ta araştırılmalıdır.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] Nimnoi, P. and Lumyong, S., “Improving solid-state fermentation of *Monascus purpureus* on agricultural products for pigment production”, *Food and Bioproc.Technol*, 4(8), 1384-1390, (2011).
- [2] Tan, A., “Türkiye’de Bitkisel Çeşitlilik ve Bitki Genetik Kaynakları”, *Anadolu J. of AARI, MARA, İzmir*, 2, 50-64, (1992).
- [3] Bennet R.C., Wallsgrave R.M., “Secondary metabolites in plant defence mechanisms”, *Tansley, Review No: 72, New Phytol.*, 127, 617–633, (1994).
- [4] Velmurugan, P., Lee, Y. H., Venil, C. K., Lakshmanaperumalsamy, P., Chae, J-C, and Oh, B-T., “Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium” , *J Biosci Bioeng*, 109(4), 346–50, (2010).
- [5] Méndez, A., Pérez, C., Montañéz, J. C., Martínez, G. and Aguilar, C. N., “Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature”, *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 12(12), 961-968, (2011).
- [6] Ramírez C., “*Manual and atlas of the Penicillia*”, Amsterdam, Elsevier *Biomedical Press*, (1982).
- [7] LaRue, J. H., “Growing Pomegranates in California”, University of California, California Agriculture and Natural Resources Leaflet, No: 2459, s. 8, (1980).
- [8] Hajjaj, H., Blanc, P., Groussac, E., Uribelarrea, J. L., Goma, G. and Loubiere, P., “Kinetics analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation”, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 619–625, (2000).
- [9] Latge, J. P., “*Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis”, *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (2), 310-350, (1999).
- [10] Bechtold T., Turcanu A., Ganglberger E., Geissler S., Natural dyes in modern textile dyehouses- how to combine experiences of two centuries to meet the demands of the future, *Journal of Cleaner Production* 11 499-509, (2003).
- [11] Rappl, B., Bechtold, T., and Mussak, R., “Onions on wool-vegetable dyes for the textile industry”, *Textile finishing*, 40, 4-6, (2005).

- [12] Hajjaj, H., Blanc, P., Groussac, E., Uribelarrea, J. L., Goma, G. and Loubiere, P., “Kinetics analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation”, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 619–625, (2000).
- [13] Delgado-Vargas, F. and Parades-Lopez, O., “*Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*”, CRC Press: New York, 248, (2002).
- [14] Aviram, M., Rosenblat, M., Volkova, N. and Coleman, R., “Pomegranate by product administration to apolipoprotein e-deficient mice attenuates atherosclerosis development as a result of decreased macrophage oxidative stress and reduced cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein”, *J. Agric. Food Chemistry*, 54; 1928-1935, (2006).
- [15] Harmancıoğlu, M., Türkiye’de Bulunan Önemli Bitki Boyalarından Elde Olunan Renklerin Çeşitli Müessirlere Karşı Yün Üzerindeki Haslık Dereceleri, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları:77, Çalışmalar:41, Ankara Üniversitesi, (1955).
- [16] Kültür, S., Medicinal plants used in Kırklareli Province (Turkey). *J. Ethnopharmacol*, 111, 341–364, (2007).
- [17] Grieve, M., *A Modern Herbal*, Penguin, London, UK,(1984).
- [18] de Jonge, B.L., Tomasz, A., “Abnormal peptidoglycan produced in a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of methicillin: functional role for penicillin-binding protein 2A in cell wall synthesis”, *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 342-346, (1993).
- [19] Hasenekoglu, M., Toprak Mikrofungusları, 1, Atatürk Üniversitesi Yayınları, Erzurum, 309-310, (1991).
- [20] Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. and Filtenborg, O., “Introduction to food- and airborne fungi”, *Centraalbureau Voor Schimmelcultures*, Utrecht, ISBN 90-7031-42-0, 72, (2002).
- [21] Duran Kerim, Tekstilde Renk Ölçümü Ve Reçete Çıkarma, E.Ü. Tekstil Ve Konfeksiyon Araştırma-Uygulama Merkezi, Bornova/İzmir, (2001).
- [22] Uruş, S., Serindağ, O., Dığrak, M., Synthesis, “Characterization and antimicrobial activities of Cu(I), Ag(I) and Co(II) Complexes with [CH<sub>3</sub>N(CH<sub>2</sub>PPh<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]”, *Heteroatom Chem.*, 484-491, 16 (6), (2005).

- [23] Bouwmeester, J., Matusova, R., Zhongkui S. and Beale, M.H., "Secondary Metabolite Signalling in Host-Parasitic Plant Interactions", *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6: 358-364, (2003).
- [24] Alzoreky, N.S., Nakahara, K., "Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia", *International Journal of Food Microbiology*, 80: 223-230, (2003).
- [25] Nimnoi, P. and Lumyong, S., "Improving solid-state fermentation of *Monascus purpureus* on agricultural products for pigment production", *Food and Bioproc. Technol.* 4(8), 1384-1390, (2011).
- [26] Venil, C. K., and Lakshmanaperumalsamy, P., "An Insightful Overview on Microbial Pigment, Prodigiosin", *Electronic Journal of Biology*, 5(3)49-61, (2009).
- [27] Nagia, F. A. and EL-Mohamedy, R. S. R., "Dyeing of wool with natural anthraquinone dyes from *Fusarium oxysporum*", *Dyes Pigm.*, 75, 550-555, (2007).
- [28] Huis in't Veld, J. H. J., "Microbial and biochemical spoilage of foods" an overview. Int. (1996).
- [29] Martin, E. J., Kurek, P. R., Schumacher, E. F., ve Rohrbach, R. P., "Reduced *Monascus* pigment derivatives as yellow food colorants", *United States Patent*, US 5013564, (1991).
- [30] Nakashima, T., Sakagami, Y., Ito, H., Matsuo, M., Antimicrobial Activity of Cellulose Fabrics Modified with Metallic Salts, *Textile Research Journal*, 71(8), s688-694,(2001).
- [31] Shao, H., Jiang, L., Meng, W., Qing, F., , Synthesis and Antimicrobial Activity of a Perfluoroalkyl-containing Quaternary Ammonium Salt, *Journal of Fluorine Chemistry*, 124, 89-91, (2003).
- [32] Mazza, G. and Miniati, E., Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. CRCPress. 362 p. London, (1993).
- [33] Simson, M.G. Plant Systematics. Elsevier Academic Pres. California, (2006).
- [34] Vuki'cevi'c, E., Rod Ruscus L. In Flora SR Srbije, Vol. VII. In: Josifovi'c, M, (Ed.),SANU. Odeljenje prirodno matemati'ckih nauka, Beograd, (1975).
- [35] Moss M.O., "Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables", *J Appl Microbiol*; 104(5):1239-43, (2008).

- [36] Groopman, J. D., Cain, L. G., Kensler, T. W., “Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relation to cancer”, *CRC Crit Rev Toxicol*; 19: 113–145, (1988).
- [37] International Agency for Research on Cancer. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Monograph 56. Lyon, (1993).
- [38] Atom, T., Kurumu, E. and Nükleer, S., “Yemlerde Mikotoksin Oluşumu , Toksisiteleri ve Mikotoksin Kalıntı Analizleri”; 20(2):44–58, (2011).
- [39] Waldvogel FA., “*Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock)” Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Mandell, Douglas and Bennet’s Principles and Practice of Infectious Diseases, New York: Churchill Livingstone; 2, 2069-2092, (2000).
- [40] Bretholtz-Emanuelsson, A., Olsen, M., Oskarsson, A., Palminger ,I. and Hult, K., “Ochratoxin A in cow’s milk and human milk with corresponding human blood samples”, *JAOAC Int*; 76: 842–846, (1993).
- [41] Pitt, J. I., “*Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A”, *Appl Environ Microbiol*, 53: 266–269, (1987).
- [42] Reddy, C. S., Reddy, R. V., “Secalonic acid, In Mycotoxins and Phycotoxins”, Edited by Sharma, R. P., Salunkhe, D. K. Florida: CRC Press. 167-190, (1991).
- [43] Beretta, B., Gaiaschi, A., Galli, C. L. and Restani, P., “Patulin in apple-based foods: Occurrence and safety evaluation”, *Food Addit Contam*; 17 (5): 399-406, (2000).
- [44] Rychlik, M., Schieberle, P., “Quantification of the mycotoxin patulin by a stable isotope dilution assay”, *J Agric Food Chem*; 47: 3749-55, (1999).
- [45] Verger, P., Garnier-Sagne, I. and Leblanc, J. C., “Identification of risk groups for intake of food chemicals”, *Regul Toxicol Pharmacol*; 30(2 Pt 2): 103-8, (1999).
- [46] Gökmen, V. and Acar, J., “Incidence of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey”, *J Chromatogr A*; 815: 99-102, (1998).
- [47] Ueno, Y. Citreoviridin from *Penicillium citreo-viride* Biourge. In: Purchase IFH (ed) Mycotoxins. Elsevier, Amsterdam, 283–302, (1974).
- [48] Nishie, K., Cole, R. J. and Dorner, J. W., “Toxicity of citreoviridin.”, *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* , 59:31–52, (1988).

- [49] Lewis, P. R., Donoghue, M. B., Hocking, A. D., Cook, L. and Granger, L. V. "Tremor syndrome associated with a fungal toxin: sequelae of food contamination", *Med. J. Aust*, 182: 582–584, (2005).
- [50] Bahkali, A., "Detection of Aspergillus and Penicillium species producing aflatoxin in rice grains imported into Saudi Arabia Detection of Aspergillus and Penicillium species producing aflatoxin in rice grains imported into Saudi Arabia; (2013).
- [51] Stoloff, L., Aflatoxins - an overview. In: Rodricks, J. V., Hesseltine, C.W., Mehlman, M. A., eds. *Mycotoxins in Human and Animal Health*. Park Forest South, IL: Pathotox Publishers, 7–28, (1977).
- [52] Frobish, R. A., Bradley, B. D., Wagner, D. D., Long-Bradley, P. E. and Hairston, H., "Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain", *J Food Prot*; 49: 781–785, (1986).
- [53] Peers, F., Bosch, X., Kaldor, J., Linsell, A. and Pluumen, M., "Aflatoxin exposure, hepatitis B virus infection and liver cancer in Swaziland", *Int J Cancer*, 39: 545–553, (1987).
- [54] Al-Musallam, A., "A distribution of keratinophilic for sponsoring the color photography. fungi in animals folds in Kuwait", *Mycopathologia*, 112,65–70, (1990).
- [55] Altuğ, T., *Gıda Katkı Maddeleri*, Meta Basım, İzmir,(2006).
- [56] Atienza, J., Naichen, Y., Wang, X., Xu, X., ve Abassi, Y., "Development and Validation of a High Content Label-Free and Real-Time Cell Based Kinase Assay Using Microelectronic Sensor Array for Screening Selective and Potent Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors", *ACEA Biosciences*, (2012).
- [57] Ayaz, A. ve Yurttagül M., *Besinlerdeki Toksik Öğeler-I*, Hacettepe Üniversitesi - Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 727, (2008).
- [58] Babitha S., Soccol, C.R., ve Pandey, A., "Jackfruit Seed for Production of *Monascus* Pigments", *Food Technology and Biotechnology*, 44 (4) 465–471, (2005).
- [59] Babitha, S., Soccol, C.R., ve Pandey, A., "Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed", *Bioresource Technology*, 98(8), 1554-1560, (2007).

- [60] Bessette, A.R., and Besette, A.E., *The rainbow beneath my feet: a mushroom, Dyer's field guide*. New York: University Press, (2001).
- [61] Brunner, N., and Holst-Hansen, C., MTT-cell Proliferation Assay, In: Celis JE (ed.) *Cell Biology A laboratory handbook*, 2nd ed. Academic Press, USA. (1998).
- [62] Bullerman, L.B., "Significance of Mycotoxins to Food Safety and Human Health", *Journal of Food Protection*, 42 (1): 65–86, (1979).
- [63] Büyüksırt, T., ve Kuleaşan, H. "Farklı kaynaklardan doğal renk maddesi üreten mikroorganizmaların izolasyonu, tanısı ve elde edilen pigmentlerin karakterizasyonu", *Gıda*, 38(4),199-206,(2013).
- [64] Carvalho, J.C., Soccol, C.R., Babitha, S., Pandey, A., and Waiciechowski, A.L., *Production of Pigment*, Springer, USA, (2008).
- [65] Çelikay, A., Kurutulmuş Kırmızı Biberin Mikrobiyolojik Kalitesi ve Aflatoksin Aranması, Yüksek Lisans Tezi, *Süleyman Demirel Üni. Fen Bil. Ens.*, Isparta, (2003).
- [66] Dawson, T.L., "Biosynthesis and synthesis of natural colours", *Coloration Technology*, 125,61–73,(2009).
- [67] Delgado-Vargas, F., Jimenez, A.R., ve Paredes-Lopez, O., "Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains characteristics, biosynthesis, processing, and stability", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40,173–289, (2000).
- [68] Dufossé, L. Microbial Pigments Schaechter M, ed. *Encyclopedia of Microbiology* (Üçüncü baskı), 457-471, (2009).
- [69] Durán, N., Teixeira, M.F.S., de Conti, R.,ve Esposito, E., "Ecological-friendly pigments from fungi", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(1), 53-66, (2002).
- [70] Dweck, A.C., "Natural ingredients for colouring and styling", *International Journal of Cosmetic Science*, 24,287–302, (2002).
- [71] Erdal, P., ve Ökmen, G., "Gıdalarda kullanılan mikrobiyal kaynaklı pigmentler", *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 6 (2), 56-68, (2013).
- [72] Fabre, C.E., Santerre, A.L., Loret, M.O., Raberian, R., Pareilleux, A., Goma, G., ve Balanc, D.J., "Production and food applications of the red pigments of *Monascus ruber*", *Journal of Food Science*, 58, 1099-1102, 1110, (1993).

- [73] Freund, P.R., Washam, C.J., ve Maggion, M., “Natural color for use in foods”, *Cereal Foods World*, 33,553-559, (1988).
- [74] Frick D., “The coloration of food”, Review of Progress in Coloration and Related Topics, 33,15–32, (2003).
- [75] Garip, İ., “Turkiye’nin farklı bölgelerinden alınan biralık arpa, malt ve birada Okratoksin A düzeylerinin belirlenmesi”, Doktora Tezi, *Selcuk Üniversitesi Konya*, (2000).
- [76] Goswami, G., Chaudhuri, S., ve Dutta, D., “Effect of pH and temperature on pigment production from an isolated bacterium”, *Department of Biotechnology, National Institute of Technology*, West Bengal, India, (2010).
- [77] Guinot, P., Roge, A., Gargadennec, A., Garcia, M., Dupont, D., Lecoeur, E., Candelier, L., ve Andary, C., “Dyeing plants screening: an approach to combine past heritage and present development”, *Coloration Technology*, 122,93–101, (2006).
- [78] Hunterlab, Applications Note. Hunter Lab. Virginia 8(9) 1-4. Bull. 75 (1), 14-17, (2008).
- [79] Gunasekaran, S., ve Poorniammal, R., “Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp. under submerged cultivation”, *African Journal of Biotechnology*, 7(12),1894-1898, (2008).
- [80] Gupta D., Jain A., ve Panwar S., “Anti-UV and anti-microbial properties of some natural dyes on cotton”, *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, 30,190–195, (2005).
- [81] Hao, S., Wu, J., Huang, Y., ve Lin, J., “Natural dyes as photosensitizers for dye-sensitized solar cell”, *Solar Energy*, 80, 209–214, (2006).
- [82] Holme, I., “Sir William Henry Perkin: a review of his life, work and legacy”, *Coloration Technology*, 122,235–251, (2006).
- [83] Judd, D.B., ve Wyeszchi, G., *Colour in business science and industry*. New York: John Wiley, (1975).
- [84] Kadolph, S.J., “Natural dyes: a traditional craft experiencing new attention”, *The Delta Kappa Gamma bulletin*, 75(1)14–17, (2008).
- [85] Kahyaoğlu, M., ve Kıvanç, M., “Endüstriyel Atık Maddelerden Mikrobiyal Yolla Beta Karoten Üretimi”, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi*, 17(2) 61-6, (2006).

- [86] Kap Pazarbaşı, S., Cekirdeksiz uzumlerde Okratoksin A ureticisi kuflerin dağılımı üzerinde nem ve sıcaklığın etkilerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji A.B.D., İzmir, (2002).
- [87] Karagözlü, N., Cekirdeksiz Okratoksijenik kuflerin uremesine ve okratoksin sentezine etki eden faktörler ve bazı gıdalarda okratoksin A dağılımı üzerine bir araştırma, Doktora Tezi, *Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gıda Muhendisliği A.B.D., İzmir, (1998).
- [88] Ke, N., Wang, X., Xu, X., ve Abassi, Y., “The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability”, *Methods in Molecular Biology*, 740, 33–43, (2011).
- [89] Kirk, P.M., ve Ansell, A.E., “Authors of fungal names. index of fungi supplement”, *International Mycological Institute*, 95, (1992).
- [90] Kumar, J.K., ve Sinha, A.K.. “Resurgence of natural colourants: a holistic view”, *Natural Product Research*, 18, 59–84, (2004).
- [91] Kunz, B., ve Ober, P. “*Monascus fermentate*: a new dietetic raw material”, *Bioengineering*, 3, 18-26, (1987).
- [92] Latge, J.P., “*Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis”, *Clinical Microbiology Reviews*, 12, (2) 310- 350, (1999).
- [93] Lee, Y., ve Khng, H., “Food Additives”, Chapter17, Natural Color Additives. eBook ISBN: 978-0-8247-4170-9, (2002).
- [94] Limame, R., Wouters, A., Pauwels, B., Franssen, E., Peeters, M., Lardon, F., Wever, O, ve Pauwels P., “Comparative Analysis of Dynamic Cell Viability, Migration and Invasion Assessments by Novel Real-Time”, *Technology and Classic Endpoint Assays*, (2012).
- [95] Lin, T.F., ve Demain, A., “Formation of water soluble *Monascus* red pigments by biological and semi synthetic processes”. *Journal of Industrial Microbiology*, 9, 173–179, (1992).

# **EKLER**

## 7. EKLER

### EK A: *P. canescens* ' e ait filogenetik ağaç



Processing Lab:  
223 Lake Drive  
Newark, DE 19702  
www.oliver.com/accugenix  
Del-CustomerSupport@ori.com  
Phone: +1.302.292.8888

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

Customer:	Balkesir University	Account:	602898 ( BUB1 )
Address:	Faculty of Science & Art Department of Biology, Cagis Campus, Balikesir, --, 10145, Turkey		
Accugenix C#:	C2613008-20170516042	ID Request Form #:	271236
Customer Sample ID:	SG-128	Due Date:	2017-05-16

#### Accugenix Database Search Result - FUNITS

Identification: **Penicillium canescens**

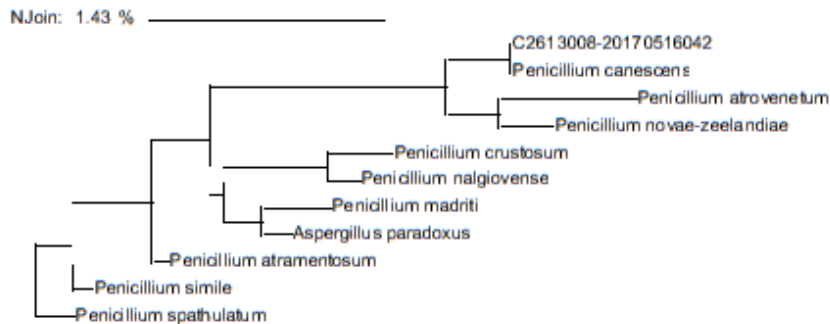
Confidence Level: **Species**

#### Sequence Alignment

Alignment: 351 C2613008-20170516042

0.00 % 351 *Penicillium canescens*  
1.14 % 350 *Penicillium novae-zeelandiae*  
1.42 % 351 *Penicillium atrovenerum*  
2.29 % 350 *Penicillium madriti*  
2.29 % 350 *Penicillium atramentosum*  
2.57 % 350 *Aspergillus paradoxus*  
2.85 % 351 *Penicillium crustosum*  
2.86 % 350 *Penicillium simile*  
2.86 % 350 *Penicillium nalgioense*  
2.86 % 350 *Penicillium spathulatum*

#### Neighbor Joining Tree



Not intended for in vitro diagnostic use

## Ek B: *P. purpurogenum*' a ait filogenetik ağaç



Processing Lab:  
223 Lake Drive  
Newark, DE 19702  
www.criver.com/accugenix  
Del-CustomerSupport@cr.com  
Phone: +1.302.292.8888

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

Customer: Balikesir University Account: 602898 ( BUB1 )  
Address: Faculty of Science & Art Department of Biology, Cagis Campus, Balikesir, --, 10145, Turkey  
Accugenix C#: C2613007-20170515051 ID Request Form #: 271236  
Customer Sample ID: SG-162 Due Date: 2017-05-16

### Accugenix Database Search Result - FUNITS

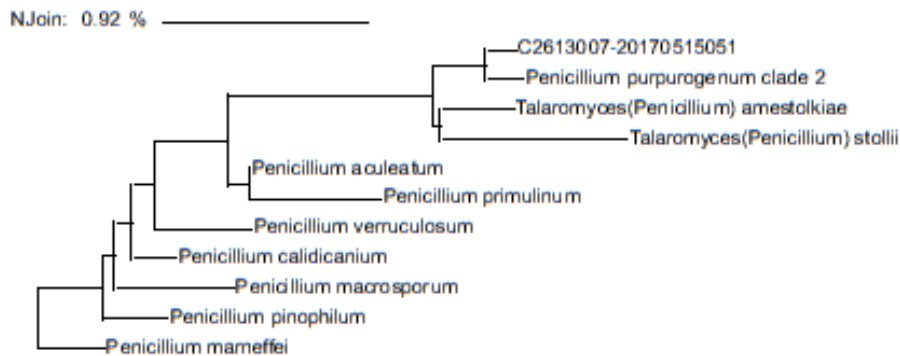
Identification: **Penicillium purpurogenum**

Confidence Level: **Species**

### Sequence Alignment

Alignment: 343 C2613007-20170515051  
0.29 % 343 Penicillium purpurogenum clade 2  
0.58 % 343 Talaromyces(Penicillium) amestolkiae  
1.17 % 345 Talaromyces(Penicillium) stollii  
1.46 % 342 Penicillium aculeatum  
1.75 % 342 Penicillium calidicanium  
2.05 % 342 Penicillium verruculosum  
2.05 % 342 Penicillium primulinum  
2.34 % 342 Penicillium pinophilum  
2.35 % 341 Penicillium macrosporum  
2.64 % 341 Penicillium mameffei


### Neighbor Joining Tree



----- Not intended for in vitro diagnostic use -----

Ek C: *P. canescens*' e ait hunter renk analiz sonuçları




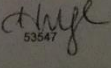
Rapor No : 49362558-125.05-731 , 2081		
Talep Eden : BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN EDEBİYAT FAK. BİYOLOJİ ÖLÜMÜ		
Adres : BALIKESİR ÜNİV. FEF BİYOLOJİ BÖL. BALIKESİR		
Örnek: METANOL 461		
Parti / Lot No : Örnek Sayısı : 1 Örneğin getiriliş şekli : Kargo ile Kabul anındaki durumu : Plastik kap	Son kullanım Trh : Üretim Tarihi : Enstitü örnek kayıt no : 16-683/002 Kabul tarihi ve saati : 17/03/2016 11:00:00 Analiz Tarihi : 25/03/2016 - 25/03/2016	
Şahit numune bilgileri : ( ) Müşteriye geri lade ( ) Şahit numune mevcut ( x ) Şahit numune alınmamıştır		
Analiz	Sonuç	Yöntem
Renk (Hunter Lab.)	L : 5.13 a : 3.48 b : 2.21	Hunter Lab (Lab Scan XE) metodu
Açıklamalar:		
Sorumlu İmzalar:		
 İsmail Kaya 23517		
Bu rapor ve sonuçları taleple bulunan kuruluş ve müşterilerimizce ticaret ve reklam amaçları ile kullanılmamalıdır. Rapor temama veya kısmen çoğaltılmamalı/yayınlanmamalıdır. Raporlar (*) İçerdiği analizler akredite edilmiştir. İmzasız analiz raporları geçerli değildir.		
Bu rapor 4 sayfa olup , 2 sayfa ( 1 sayfa müşteriye, 1 sayfa Enstitü arşivine) olarak hazırlanmıştır.		Sayfa 3 / 4

Ek D : *P. purpurogenum*' e ait hunter renk analiz sonuçları




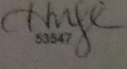
Rapor No : 49362558-125.05-	731	,2081
Talep Eden : BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN EDEBİYAT FAK. BİYOLOJİ ÖLÜMÜ		
Adres : BALIKESİR ÜNİV. FEF BİYOLOJİ BÖL. BALIKESİR		
Örnek: METANOL 462		
Parti / Lot No : Örnek Sayısı : 1 Örneğin getiriliş şekli : Kargo ile Kabul anındaki durumu : Plastik kap	Son kullanım Trh : Üretim Tarihi : Enstitü örneği kayıt no : 16-803/003 Kabul tarihi ve saati : 17/03/2016 11:00:00 Analiz Tarihi : 25/03/2016 - 25/03/2016	
Şahit numune bilgileri : ( ) Müşteriye geri işde ( ) Şahit numune mevcut ( x ) Şahit numune alınmamıştır		
Analiz	Sonuç	Yöntem
Renk (Hunter Lab.)	L : 5.02 a : 3.89 b : 2.00	Hunter Lab (Lab Scan XE) metodu
Açıklamalar:		
Sorumlu İmzalar:		
Bu rapor ve sonuçları talepte bulunan kuruluşa ve müşterilerince ticaret ve reklam amaçları ile kullanılamaz. Rapor tamamı veya kısmen çoğaltılamaz/yayımlanamaz. Raporlarda (*) işaretli analizler akredite edilmeyiştir. İmzamsız analiz raporları geçerlidir.		
Bu rapor 4 sayfa olup, 2 asli ( 1 asli müşteriye, 1 asli Enstitü arşivine) olarak hazırlanmıştır.		Sayfa 4 / 4

## Ek E: *P. canescens*' e ait aflatoksin analiz sonuçları

 MAM		
Rapor No : 49362558-125 05-760 /2171		
Talep Eden : BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN EDEBİYAT FAK. BİYOLOJİ ÖLÜMÜ		
Adres : BALIKESİR ÜNİV. FEF BİYOLOJİ BÖL. BALIKESİR		
Örnek: METANOL-461		
Parti / Lot No : Örnek Sayısı : 1 Örneğin getiriliş şekli : Kargo ile Kabul anındaki durumu : Plastik ambalaj	Son kullanım Trh : Üretim Tarihi : Enstitü örnek kayıt no : 16-708/002 Kabul tarihi ve saati : 22/03/2016 11:00:00 Analiz Tarihi : 01/04/2016 - 01/04/2016	
Şahit numune bilgileri : ( ) Müşteriye geri iade ( ) Şahit numune mevcut ( x ) Şahit numune alınmamıştır		
Analiz	Sonuç	Yöntem
Aflatoksin (B1, B2, G1, G2)	Tespit edilmedi (ng/ml)	D.05.G116 (İşletme İçı Metot-HPLC FLD)
Aflatoksin B1	Tespit edilmedi (ng/ml)	D.05.G116 (İşletme İçı Metot-HPLC FLD)
Açıklamalar:		
Sorumlu İmzalar:  53547		
Bu rapor ve sonuçları talepte bulunan kuruluş ve müşterilerince ticaret ve reklam amaçları ile kullanılamaz. Rapor tamamen veya kısmen çoğaltılamaz/yayınlanamaz. Rapor da (*) işaretli analizler akredite edilmiştir. İmzasız analiz raporları geçersizdir.		
Bu rapor 4 sayfa olup, 2 asıl ( 1 asıl müşteriye, 1 asıl Enstitü arşivine) olarak hazırlanmıştır.		Sayfa 3 / 4
P.K 21. 41470 GEBZE/KOCAELİ T 0 262 677 20 00 F 0 262 641 23 09 http://mam.tubitak.gov.tr		

**Ek F : *P. purpurogenum*' e ait aflatoksin analiz sonuçları**

  
**MAM**

Rapor No : 49362558-125.05-	760 , 2171	
Talep Eden : BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN EDEBİYAT FAK. BİYOLOJİ ÖLÜMÜ		
Adres : BALIKESİR ÜNİV. FEF BİYOLOJİ BÖL. BALIKESİR		
Örnek: METANOL-462		
Parti / Lot No :	Son kullanım Trh :	
Örnek Sayısı : 1	Üretim Tarihi :	
Örneğin getiriliş şekli : Kargo ile	Enstitü örnek kayıt no : 16-708/003	
Kabul anındaki durumu : Plastik ambalaj	Kabul tarihi ve saati : 22/03/2016 11:00:00	
	Analiz Tarihi : 01/04/2016 - 01/04/2016	
Şahit numune bilgileri : ( ) Müşteriye geri iade ( ) Şahit numune mevcut ( x ) Şahit numune alınmamıştır		
Analiz	Sonuç	Yöntem
Aflatoksin (B1, B2, G1, G2)	Tespit edilmedi (ng/ml)	D.05.G116 (İşletme İçin Metot-HPLC FLD)
Aflatoksin B1	Tespit edilmedi (ng/ml)	D.05.G116 (İşletme İçin Metot-HPLC FLD)
Açıklamalar:		
Sorumlu İmzalar:		
 53547		
Bu rapor ve sonuçları talepte bulunan kuruluş ve müşterilerince ticaret ve reklam amaçları ile kullanılamaz. Rapor tamamen veya kısmen çoğaltılamaz/yayınlanamaz. Rapor (*) işaretli analizler akredite edilmiştir. İmzasız analiz raporları geçersizdir.		
Bu rapor 4 sayfa olup, 2 asil ( 1 asil müşteriye, 1 asil Enstitü arşivine) olarak hazırlanmıştır.		Sayfa 4 / 4
P.K 21, 41470 GEBZE/KOCAELİ T 0 262 677 20 00 F 0 262 641 23 09 <a href="http://mam.tubitak.gov.tr">http://mam.tubitak.gov.tr</a>		