

***Monascus purpureus*'dan Katı Kültür Fermantasyon Yöntemi ile Renk Pigmenti Üretimi**

Yekta Göksungur¹  , Seda Sarııldız² 

¹Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bornova, İzmir
²Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Bornova, İzmir

Geliş Tarihi (Received): 11.04.2021, Kabul Tarihi (Accepted): 28.05.2021

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): yekta.goksungur@ege.edu.tr (Y. Göksungur)

☎ 0 232 311 30 27 📠 0 232 311 48 31

ÖZ

Bu çalışmada katı kültür fermantasyon tekniği ile *Monascus purpureus* CMU 001 küfünden mikrobiyal pigment üretimi gerçekleştirilmiştir. Substrat olarak bira mayşe atığı ve gofret yaprağı tozu kullanılmış ve en yüksek kırmızı renk pigmenti sentezinin gerçekleştiği fermantasyon koşulları belirlenmiştir. En yüksek pigment üretimi olan 59.55 AU₅₀₀/g değeri, ilave besin elementi kullanılmadan 1:4 (g/g) oranında karıştırılmış bira mayşe atığı ve atık gofret yaprağı tozu substrat olarak kullanıldığında, optimum koşullar olan %85 başlangıç nem oranında, başlangıç pH 7.5 değerinde, 3 mL aşı hacmi ve 28°C inkübasyon sıcaklığında, fermantasyonun 9. gününde elde edilmiştir. Bu çalışma proses atıkları olan bira mayşe atığı ve gofret yaprağı tozunun katı kültür fermantasyon tekniği ile renk pigmenti üretiminde beraber kullanıldığı ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: *Monascus*, Pigment, Katı kültür fermantasyonu, Bira mayşe atığı, Atık gofret yaprağı, Atık değerlendirme

Production of Microbial Pigments by Solid-State Fermentation Technique using *Monascus purpureus*

ABSTRACT

In this study, microbial pigment was produced by *Monascus purpureus* CMU 001 by using the solid-state fermentation technique. Brewer's spent grain and waste wafer sheets were used as a substrate, and process parameters for the best pigment yield were determined. Brewer's spent grain and waste wafer sheets mixed at a ratio of 1:4 (w/w) gave the highest pigment yield values. Extra nutrients were not used in the fermentation medium. The highest pigment concentration of 59.55 AU₅₀₀/g was obtained under the optimized process conditions of initial moisture content 85%, initial pH 7.5, inoculum size 3 mL, fermentation temperature 28°C and incubation period 9 days. This was the first study on the use of brewer's spent grain and waste wafer sheet in microbial pigment production using the solid-state fermentation technique.

Keywords: *Monascus*, Pigments, Solid-state fermentation, Brewers' spent grain, Waste wafer sheet, Waste evaluation

GİRİŞ

Son yıllarda insan ve çevre sağlığına potansiyel tehdit olan sentetik katkı maddeleri yerine doğal katkı

maddelerinin kullanılması tercih edilmekte olup, buna bağlı olarak doğal renk pigmentleri ve alternatif kaynaklardan üretimi üzerine yapılan çalışmalar yoğunlaşmıştır [1]. *Monascus* cinsi küfler tarafından

üretilen renk pigmentlerinin Doğu Asya ülkelerinde yüzyıllardır doğal renk maddesi ve geleneksel gıda katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır. *Monascus* türlerinin sekonder metabolit olarak renk pigmentlerinin yanı sıra monakolinler ve γ -amino butirik asit gibi sağlıklı yararlı biyoaktif bileşenleri sentezlediği ve bu bileşenlerin anti-mutajenik, antikanser özelliklerinin ve antimikrobiyal aktivitelerinin olduğu bilinmektedir [2-4]. *Monascus* küfleri üç ana grupta incelenen, altı adet renk pigmenti sentezleyebilmektedir. Bu pigmentler; turuncu pigmentler olan rubropunctatin ($C_{12}H_{22}O_5$) ve monascorubin ($C_{23}H_{26}O_5$); sarı pigmentler olan monascin ($C_{21}H_{26}O_5$) ve ankaflavin ($C_{23}H_{30}O_5$); kırmızı pigmentler olan rubropunctamine ($C_{21}H_{23}NO_4$) ve monoscorubramine ($C_{23}H_{27}NO_4$) olarak isimlendirilmektedir [5]. Genelde pirinç ve ekmekten katı kültür fermantasyonu (KKF) yoluyla üretilen *Monascus* pigmentleri (MP), çoğunlukla Uzak Doğu ülkelerinde, fermente soya peynirinde, riboflavin kaynağı olarak bebek mamaları ve kahvaltılık gevreklerinde, soslarda, enerji içeceklerinde, aromalı yoğurtlarda ve sütlerde kullanılmaktadır [3, 6]. Ayrıca sosis gibi paketli ve işlenmiş et ürünlerine kırmızı renk verme ve bakteriyostatik etki yaratma amacıyla sodyum nitrite alternatif olarak kullanılabilir [2]. MP üretimi için geleneksel bir yöntem olan katı kültür fermantasyonu tekniği, düşük atık su üretimi, düşük enerji ve su ihtiyacı gibi avantajlara sahiptir, ayrıca gıda sanayi atıklarının substrat olarak kullanımına elverişlidir. Ek olarak katı kültür fermantasyonu ile elde edilen pigmentler herhangi bir alt akım işlemine uğramadan direkt olarak renklendirme amacıyla ürünlerde kullanılabilir [5, 7].

Gıda endüstrisi küresel olarak milyonlarca tüketiciye hizmet vermekle beraber, bir yandan da büyük miktarlarda organik atık üretimine sebep olmaktadır. Bu atıklar karbonhidratlar, lipitler, proteinler, azot kaynakları ve vitaminler açısından oldukça zengindir ve mikroorganizmalar tarafından kullanılarak katma değeri yüksek ürünler elde edilmesine uygundur [8]. Bira üretiminde mayşeleme aşamasında ortaya çıkan lignoselülozik yapıdaki bira mayşe atığı, bira üretiminde en fazla oluşan atık olup, genellikle hayvan yemi olarak değerlendirilmektedir [9, 10]. Ancak bira mayşe atığı, yüksek karbon, mineral ve protein içeriğiyle tek başına veya farklı atıklarla beraber substrat olarak biyoteknolojik proseslerde kullanılmaya uygun bir atıktır [11]. Katı kültür fermantasyon tekniğinde substrat olarak kullanılabilen bir diğer atık ise gofret yaprağıdır. Gofretler buğday unundan elde edilen ince ve gevrek yapıdaki hububat ürünleridir [12]. Tipik bir şekerleme fabrikasında oluşan en yaygın biyoatıklardan biri olan gofret yaprakları, hatalı şekil verilmiş, yapılandırılmış, kırılmış, kirlenmiş ve yanlış etiketlenmiş gofret yaprakları olup, toplam gofret üretiminin yaklaşık %10'una karşılık gelebilmektedir [13].

Çalışma kapsamında bira mayşe atığı ve gofret yaprağı tozu, katı kültür fermantasyon tekniği ile *Monascus* pigmenti sentezinde substrat olarak kullanılmış ve pigment sentezine etki eden fermantasyon koşulları optimize edilmiştir. Bu çalışma bira mayşe atığı ve gofret

yaprağı tozunun renk pigmenti üretiminde beraber kullanıldığı ilk çalışmadır.

MATERYAL ve METOT

Materyal ve Mikroorganizma

Bira mayşe atığı, Türk Tuborg Bira ve Malt Sanayi A.Ş tarafından temin edilmiştir. 55°C etüvde (Memmert GmbH, Almanya) kurutulmuş ve hava almayan saklama kaplarında muhafaza edilmiştir. Denemelerde kullanılan bira mayşe atığı %53.1 hemiselüloz, %19.2 selüloz, %8.5 lignin, %2.76 azot ve %3.68 kül içeren, lignoselülozik yapıda bir bira sanayi atığıdır [14]. Gofret yaprakları, Tören Gıda San. ve Tic. A.Ş tarafından temin edilmiş olup üretiminde un, su, yağ, emülgatör, NaCl ve kabartıcılar (sodyum bikarbonat ve sodyum asit pirofosfat) kullanıldığı ve gofret yapraklarının içeriğinin %35-40 arasında olduğu üretici firma tarafından belirtilmiştir. Gofret yaprakları valsli değirmen aracılığıyla toz haline getirilerek (Bühler GmbH, Almanya) hava almayan saklama kaplarında muhafaza edilmiştir. Deneyler süresince bira mayşe atığı için 2 mm ve üzerindeki partikül boyutları, gofret yaprağı için ise 1 ve 2 mm arasındaki partikül boyutları kullanılmıştır. *Monascus purpureus* CMU 001 suşu Chiang Mai Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden Prof. Saisamorn Lumyong'dan temin edilmiştir. Çalışma süresince mikroorganizma Patato Dextrose Agar (PDA) (Merck, Almanya) besiyerinde geliştirilmiş, 3 haftada bir yenilenmiş ve 4°C 'de muhafaza edilmiştir.

Aşı Hazırlanması

Monascus purpureus CMU 001 suşu spor süspansiyonu elde edilmesi amacıyla PDA besiyerinde, 30°C sıcaklıkta, 7 gün süreyle, statik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Fermantasyon sonunda 10 mL steril saf su petrilere aktarılmış ve aseptik koşullarda spor kazınması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen spor süspansiyonunun Neubauer lamı aracılığıyla spor sayımı gerçekleştirilmiş (1 x 10⁶ spor/mL) ve denemelerde aşı olarak kullanılmıştır.

Katı Kültür Fermantasyonu

Fermantasyon denemeleri, içerisinde 5 gram katı substrat bulunan 250 mL'lik erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon ortamlarına hepsinden 2'şer mL hacimde, dört farklı nemlendirme sıvısı ilave edilmiştir. Kullanılan nemlendirme sıvısı içerikleri; a) mineral madde çözeltisi (2 g/L KH₂PO₄; 5 g/L NH₄NO₃, 1 g/L NaCl, 1 g/L MgSO₄·7H₂O [15]; b) monosodyum glutamat (25 g/L); c) mineral madde + monosodyum glutamat çözeltisi; d) saf su 'dur. Fermantasyon ortamlarının pH değerleri nemlendirme sıvısı aracılığıyla ayarlanmıştır; nemlendirme sıvısı pH değerleri otoklavlama işleminden sonra arzu edilen ortam pH değerine ulaşılacak şekilde hazırlanmıştır. Nemlendirme sıvısı aracılığıyla belirlenen nem oranına getirilmiş ortamlar 121°C sıcaklıkta 20 dakika süresince otoklavda sterilize edilmiş ve oda sıcaklığına getirildikten sonra spor süspansiyonu (1x10⁶ spor/mL) inokule

edilmiştir. Farklı substrat oranlarının (bira mayşe atığı (BMA) ve gofret yaprağı tozu (GYT)), ve kullanılan nemlendirme sıvısı içeriklerinin pigment sentezine etkisinin incelendiği fermantasyon denemeleri, statik koşullarda, 30°C'deki inkübatörde (Sanyo MIR- 254, Sanyo Electric Co., Ltd., Japonya), %80 başlangıç nem oranı, başlangıç pH 6.5 ve 3 mL aşı hacmi ile 8 gün süresince gerçekleştirilmiştir. Pigment sentezine etki ettiği bilinen parametreler olan başlangıç nem oranı (%50-90), başlangıç pH'sı (pH 5.5-8.5), aşı hacmi (0.5-4 mL) (1×10^6 spor/mL) ve inkübasyon sıcaklığı (26-32°C) parametrelerinin pigment sentezine etkisini belirlemek amacıyla *Monascus purpureus* ile fermantasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Her deneme setinde bir parametre değiştirilmiş ve aksi belirtilmediği takdirde maksimum pigment sentezinin elde edildiği koşul, diğer denemelerde kullanılmıştır.

Pigment Analizi

Fermantasyonu biten ortamlarda pigment analizi için Carvalho ve ark. [16] ve Gomah ve ark. [17] 'dan

$$\text{Absorbans birimi} \left(\frac{\text{AU}}{\text{g}} \right) = \frac{\text{OD} \times \text{Toplam çözücü hacmi} \times \text{Seyreltme faktörü}}{\text{Kuru örnek(g)}} [18]$$

İstatistiksel Analiz

Analiz verileri SPSS programı (SPSS Inc., SPSS Statistics 20.0, Chicago, ABD) kullanılarak değerlendirilmiştir. Denemeler iki tekrar, analizler üç paralel olarak gerçekleştirilmiş ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Tüm şekillerde, farklı küçük harfler (a-f) taşıyan tüm faktörlerin ortalama değerleri arasındaki fark anlamlıdır ($P < 0.05$).

BULGULAR ve TARTIŞMA

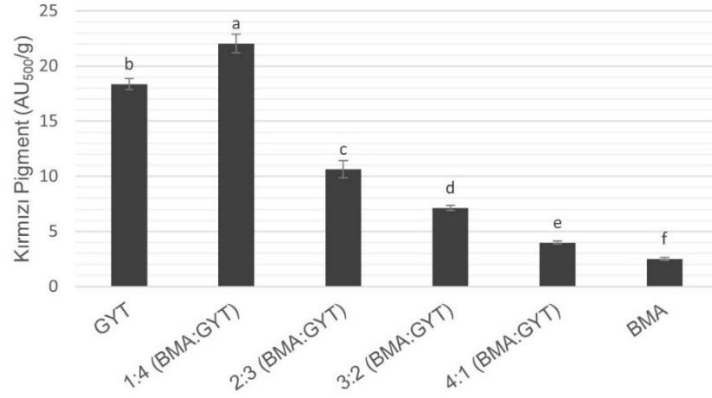
Substrat Seçimi

Katı kültür fermantasyon süreçlerinde kullanılan substrat, içerdiği karbon, azot gibi bileşenler ve mikroorganizmaların üzerinde gelişebileceği fiziksel bir yapı oluşturmaları sebebiyle oldukça önemlidir [7, 19, 20]. Çalışma kapsamında substrat olarak bira mayşe atığı (BMA) ve gofret yaprağı tozu (GYT) farklı oranlarda karıştırılarak kullanılmış ve nemlendirme sıvısı olarak saf su kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 1'de paylaşılmıştır. En yüksek kırmızı pigment sentezi 1:4 (g/g) oranında karıştırılmış BMA ve GYT ortamında, 22.04 AU₅₀₀/g olarak elde edilmiştir. En düşük pigment sentezi 2.50 AU₅₀₀/g değeri ile yalnızca bira mayşe atığı

modifiye edilen yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla, 1 gram fermantasyon ortamı için 5 mL %95'lik etanol kullanılarak pigment ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon çalkalamalı inkübatörde (Certomat® BS-1, Sartorius Stedim, Almanya) 30°C/200 rpm'de, 1 saat süre ile yapılmıştır. Ekstraksiyon sonrası 15 dakika oda sıcaklığında bekletilen örnekler, 7500 rpm'de 5 dakika süre ile santrifügasyon (Daihan Scientific CF-10, Korea) işlemine tabi tutulmuştur. Santrifügasyon sonrasında elde edilen supernatant sıvısında gerekli seyreltmeler yapılarak, sentezlenen kırmızı pigment konsantrasyonu 500 nm'de spektrofotometrik (Thermo Scientific, Genesys 10S UV-Vis) ölçümler alınarak belirlenmiştir [16, 17]. Spektrofotometrik ölçümlerde kör örnek olarak, fermente olmamış substrattan elde edilen ekstrakt kullanılmıştır. Bu çalışmada sadece hücre dışı pigmentlerin analizi gerçekleştirilmiştir. Seyreltme faktörü, çözücü hacmi, kullanılan substrat miktarı ve spektrofotometrik ölçümler sonucu elde edilen veriler aşağıdaki denklemde yerine konularak pigment konsantrasyonu hesaplanmış ve AU₅₀₀/g olarak ifade edilmiştir [18].

kullanılan ortamda elde edilmiştir. Fermantasyon süresince BMA'nın zengin protein ve aminoasit içeriğiyle ortamda azot kaynağı olarak, karbonhidratça zengin GYT'nin ise ortamda karbon kaynağı olarak rol oynadığı düşünülmektedir. Çalışma boyunca devam eden denemelerde 1:4 (g/g) oranında karıştırılmış BMA ve GYT substrat olarak kullanılmıştır.

Literatürde farklı substratlar kullanılarak gerçekleştirilmiş birçok çalışma bulunmaktadır. Srianta ve ark. [21], piriñç, mısır, sorgum tanesi, kabuğu soyulmuş sorgum tanesi ve sorgum kepeğini pigment üretiminde substrat olarak kullanmış ve en yüksek pigment üretimini piriñç ve kepeği alınmış sorgum tanesinde elde etmişlerdir. Aynı araştırmacılar, nişasta içermeyen polisakkaritlerin *Monascus purpureus* tarafından hidrolizinin etkin bir şekilde gerçekleştirilemediğini ifade etmişlerdir. Bu durum lignoselülozik yapıda olan BMA'nın tek başına substrat olarak kullanıldığında elde edilen düşük pigment sentezini de açıklamaktadır. Benzer bir çalışmada, Sehwat ve ark. [22], en yüksek kırmızı pigment sentezini bezelye ve tatlı patates kabuğunu substrat olarak kullandıkları denemede elde etmişler; bezelyenin organik azot, tatlı patates kabuğunun ise karbon kaynağı olarak mikroorganizma tarafından kullanıldığını belirtmişlerdir.



Şekil 1. Farklı oranlarda karıştırılmış bira mayşe atığı (BMA) ve gofret yaprağı tozu (GYT) kullanımının kırmızı pigment sentezi üzerine olan etkisi (Fermantasyon koşulları: Başlangıç nem oranı %80, başlangıç pH 6.5, 3 mL aşı hacmi, 30°C, 8 gün)

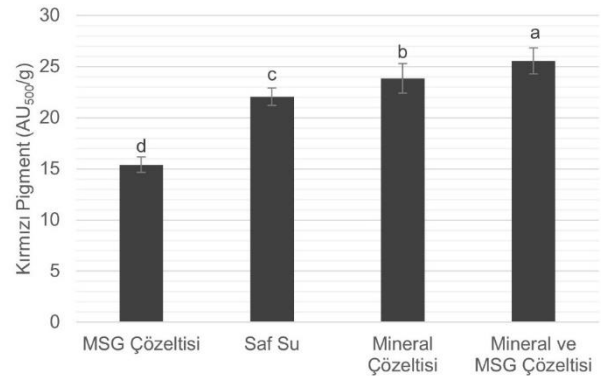
Figure 1. The effect of using different amounts of brewer's spent grain (BSG) and wafer sheet powder (WSP) on red pigment synthesis (Fermentation conditions: Initial humidity 80%, initial pH 6.5, 3 mL inoculum volume, 30°C, 8 day)

Nemlendirme Sıvısı İçeriği

Monascus purpureus'un metabolizmasında ve hücre yapılarının sentezinde fermantasyon ortamında bulunan organik besin maddelerinin ve minerallerin etkisi oldukça yüksektir [22]. Çalışma kapsamında kırmızı pigment sentezi üzerine etkisi incelenen nemlendirme sıvısı içerikleri ve elde edilen sonuçlar Şekil 2'de gösterilmektedir. En yüksek kırmızı pigment konsantrasyonu 25.55 AU₅₀₀/g değeri ile mineral madde ve monosodyum glutamat (MSG) çözeltisinin beraber kullanıldığı ortamda elde edilmiştir. Mineral madde çözeltisinin kullanıldığı ve hiçbir besin elementinin kullanılmadığı ortamlarda ise sırasıyla 23.84 AU₅₀₀/g ve 22.04 AU₅₀₀/g pigment konsantrasyonu değerleri elde edilmiştir. En düşük kırmızı pigment konsantrasyonu ise 15.4 AU₅₀₀/g değeri ile monosodyum glutamat çözeltisi kullanılan ortamda elde edilmiştir. Farklı mineral ve azot kaynağı kombinasyonlarının kullanımı, ortam pH'sını, mikroorganizma gelişimini ve pigment sentezini olumlu etkileyebilmektedir [23,24]. Çalışma kapsamında en yüksek pigment sentezi mineral madde ve monosodyum glutamat çözeltisinin beraber kullanıldığı ortamda elde edilmekle beraber, hiçbir besin elementi içermeyen ortamda da benzer konsantrasyonda pigment elde edilmesi sebebiyle, proses maliyeti ve çevre kirliliği açısından çalışmanın geriye kalan kısımda nemlendirme sıvısında herhangi bir besin elementinin kullanılmadığı saf su, nemlendirme sıvısı olarak kullanılmıştır.

Monascus pigmentlerinin renginin aminoasit, peptit ve protein gibi çeşitli bileşiklerin amino grubu ile monascorubrine ve rubropunctatine'in yapısında bulunan oksijenin yer değiştirmesi sonucunda turuncudan kırmızıya döndüğü bilinmektedir [5]. Bu nedenle organik (monosodyum glutamat, pepton vb) veya inorganik azot kaynakları (amonyum nitrat vb.) kullanımı kırmızı pigment sentezinde önemli bir yere sahiptir [25]. Babitha ve ark. [15], *Monascus* spp. ile katı kültür fermantasyon tekniği ile gerçekleştirdikleri çalışmada monosodyum glutamat, pepton, soya unu ve

kitin tozu kullanımının kırmızı pigment sentezi üzerine etkilerini araştırmış ve en yüksek kırmızı pigment sentezini azot kaynağı olarak mineral monosodyum glutamat kullandıkları denemede elde etmişlerdir. Şilbir ve Göksungur [14], bira mayşe atığından *Monascus purpureus* CMU001 mikroorganizması ile kırmızı pigment ürettikleri çalışmalarında değişik azot kaynaklarının pigment sentezine etkisini araştırmışlar ve en yüksek pigment üretimi olan 22.25 UA₅₀₀ değerini azot kaynağı olarak 8 g/L MSG kullandıklarında elde etmişlerdir.



Şekil 2. Farklı nemlendirme sıvısı içeriklerinin kırmızı pigment sentezi üzerine olan etkisi (Fermantasyon koşulları: Başlangıç nem oranı %80, başlangıç pH 6.5, 3 mL aşı hacmi, 30°C, 8 gün)

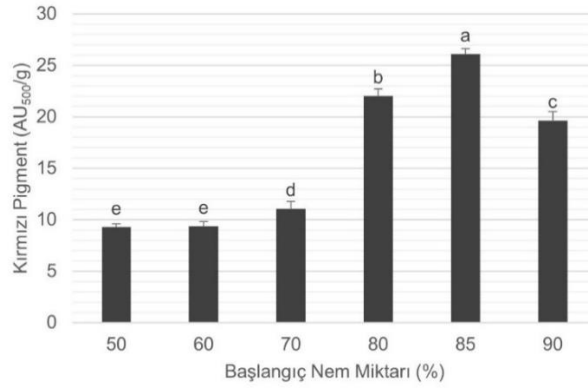
Figure 2. The effect of different moistening liquid contents on red pigment synthesis (Fermentation conditions: Initial humidity 80%, initial pH 6.5, 3 mL inoculum volume, 30°C, 8 days)

Başlangıç Nem Oranı

Katı kültür fermantasyonunda kullanılan nem oranı mikroorganizma gelişimi için oldukça önemlidir [25, 26] ve genel olarak, %30 ile %85 arasında değişen nem oranları kullanılmaktadır [27]. Çalışmada farklı başlangıç nem oranlarının kırmızı pigment sentezi üzerine olan

etkisi incelenmiş ve sonuçlar, Şekil 3'te verilmiştir. En yüksek kırmızı pigment konsantrasyonu 26.10 AU₅₀₀/g değeri ile %85 başlangıç nem oranında elde edilmiştir. %90 başlangıç nem oranında ise ortamda sıvı birikimi gözlenmiş ve KKF prensiplerinden uzaklaşmıştır. En düşük kırmızı pigment konsantrasyonu 9.28 AU₅₀₀/g olarak, %50 başlangıç nem oranında elde edilmiştir. Başlangıç nem oranı düşük olduğunda, çözünmüş besin maddeleri ve oksijen transferinin azalması sebebiyle ürün sentezinde düşüşler gözlemlendiği birçok araştırmacı tarafından ifade edilmektedir [7, 27]. Sonraki denemelerde fermantasyon ortamının başlangıç nem oranı, en yüksek pigment sentezinin elde edildiği % 85 değerine ayarlanmıştır. Literatürde yapılan benzer

çalışmalarda kırmızı pigment sentezi için farklı substratlar kullanılarak elde edilen farklı optimum başlangıç nem oranları bulunmaktadır. Srianta ve ark. [28], Duriyan tohumu kullanarak gerçekleştirdikleri katı kültür fermantasyonunda en yüksek kırmızı pigment konsantrasyonunu 3.73 AU/g olarak, %60 nem oranında elde etmişlerdir. Carvalho ve ark. [29] ise manyok küspesi kullanarak gerçekleştirdikleri katı kültür fermantasyonunda %50'den %90'a değişen başlangıç nem oranlarının pigment sentezi üzerine etkisini incelemiş ve en yüksek kırmızı pigment konsantrasyonunu 25 AU/g olarak %70 başlangıç nem oranında elde etmişlerdir.



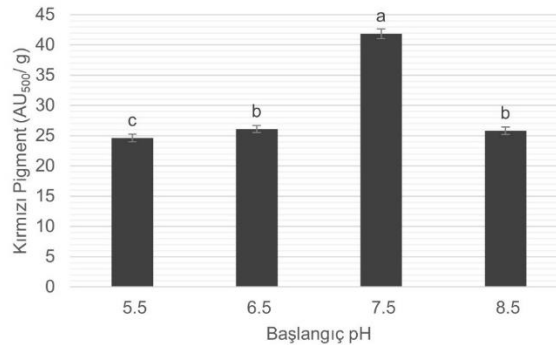
Şekil 3. Başlangıç nem oranlarının kırmızı pigment sentezi üzerine olan etkisi (Fermantasyon koşulları: Başlangıç pH 6.5, 3 mL aşı hacmi, 30°C, 8 gün)

Figure 3. The effect of initial humidity on red pigment synthesis (Fermentation conditions: Initial pH 6.5, 3 mL inoculum volume, 30°C, 8 days)

Başlangıç pH Değeri

Başlangıç pH'sı, KKF'de metabolik aktiviteyi belirleyen en önemli faktörlerden bir tanesidir [30]. *Monascus* türlerinin düşük pH değerlerinde sarı pigmentleri, daha yüksek pH değerlerinde ise kırmızı pigmentleri yoğun olarak sentezlediği belirtilmektedir [31]. Çalışma kapsamında farklı pH değerlerinin kırmızı pigment sentezi üzerine etkileri incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4'te verilmiştir. En yüksek kırmızı pigment konsantrasyonu olan 41.87AU₅₀₀/g değeri, başlangıç pH

7.5 değerinde elde edilmiştir. En düşük kırmızı pigment konsantrasyonu 24.62 AU₅₀₀/g değeri ise başlangıç pH 5.5 değerinde elde edilmiştir. Bu çalışmada, sonraki denemelerde en yüksek pigment sentezinin elde edildiği başlangıç pH 7.5 değeri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara paralel olarak, Babitha ve ark. [15], *Monascus purpureus* LPB 97 mikroorganizmasından substrat olarak Jackfruit tohumu kullanarak gerçekleştirdikleri katı kültür fermantasyonunda bu çalışmayla paralel sonuçlar elde etmiş ve en yüksek kırmızı pigment sentezini başlangıç pH 7.5 ortamında elde etmişlerdir.

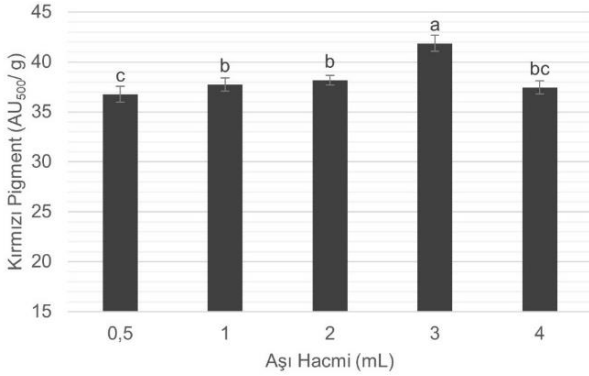


Şekil 4. Farklı başlangıç pH değerlerinin kırmızı pigment sentezi üzerine olan etkisi (Fermantasyon koşulları: Başlangıç nem oranı %85, 3 mL aşı hacmi, 30°C, 8 gün)

Figure 4. The effect of different initial pH values on red pigment synthesis (Fermentation conditions: Initial humidity 85%, 3 mL inoculum volume, 30°C, 8 days)

Aşı Hacmi

Aşı hacminin pigment üretimine etkisini belirlemek amacıyla, 1×10^6 spor/mL konsantrasyonda spor içeren çözelti hazırlanmıştır. Önceki denemelerde en yüksek pigment sentezinin elde edildiği başlangıç pH 7.5 ve %85 nem oranına getirilmiş, 1:4 oranında BMA ve GYT içeren ortamlar farklı hacimlerde aşılanarak fermantasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 5'te verilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda en yüksek kırmızı pigment konsantrasyonu olan 41.87 AU₅₀₀/g değeri, 3 mL aşı hacmi kullanılan ortamda elde edilmiştir. En düşük kırmızı pigment konsantrasyonu ise 36.77 AU₅₀₀/g değeriyle 0.5 mL aşı kullanılan ortamda elde edilmiştir. Literatürde yüksek aşı hacimlerinde, besin maddelerinin biyokütle artışı için tüketilmesi ve pigment sentezi için yeterli besin maddesinin ortamda bulunmaması sebebiyle pigment konsantrasyonlarında düşüş görüldüğü ifade edilmektedir. Düşük aşı hacmi kullanılan ortamlarda ise yetersiz mikrobiyal gelişim sebebiyle ürün dönüşümünde azalmalar meydana gelebileceği belirtilmektedir [8, 32]. Babitha ve ark. [33], *Monascus* sp. ile gerçekleştirdikleri katı kültür fermantasyonunda farklı aşı hacimlerinin kırmızı pigment sentezi üzerine etkisini incelemişler ve bu çalışmaya paralel olarak en yüksek kırmızı pigment konsantrasyonu olan 25.45 OD/g değerini 3 mL aşı hacmi kullandıkları denemede elde etmişlerdir.



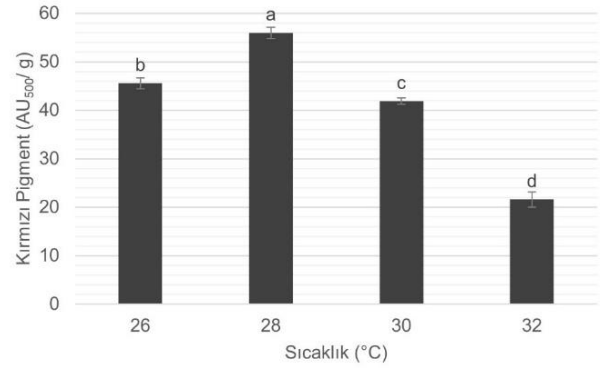
Şekil 5. Farklı aşı hacimlerinin kırmızı pigment sentezi üzerine olan etkisi (Fermantasyon koşulları: Başlangıç nem oranı %85, başlangıç pH 7.5, 30°C, 8 gün)

Figure 5. The effect of different inoculum size on red pigment synthesis (Fermentation conditions: Initial humidity 85%, initial pH 7.5, 30°C, 8 days)

İnkübasyon Sıcaklığı

İnkübasyon sıcaklığı, mikrobiyal gelişim, enzim sentezi ve sekonder metabolit sentezi gibi süreçleri etkileyen önemli bir faktördür ve mikrobiyal gelişim ve ürün dönüşümü için gerekli optimum sıcaklıklar farklılık gösterebilmektedir [34, 35]. Genellikle pigment sentezi için *Monascus* spp. ile gerçekleştirilen çalışmalarda 25 ve 30°C arasında sıcaklık değerleri kullanılmaktadır. Çalışma kapsamında kullanılan inkübasyon sıcaklıkları ve elde edilen sonuçlar Şekil 6'da gösterilmiştir. Buna göre; en yüksek kırmızı pigment konsantrasyonu olan 55.99 AU₅₀₀/g değeri 28°C sıcaklıkta, en düşük kırmızı

pigment konsantrasyonu olan 21.59 AU₅₀₀/g değeri ise 32°C sıcaklıkta elde edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar fermantasyon sıcaklığının pigment sentezi üzerinde önemli etkisi olduğunu göstermekte olup, 28°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda fermantasyon ortamında buharlaşmaya bağlı nem oranının azalması sebebiyle pigment sentezinin de azaldığı düşünülmektedir. İnkübasyon sıcaklığının pigment sentezi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, Dikshit ve ark. [18], 28°C- 30°C aralığında en yüksek pigment sentezini elde etmişlerdir. Nimnoi ve ark. [25] ve Babitha ve ark. [33], *Monascus* türleri ile katı kültür fermantasyonunda gerçekleştirdikleri çalışmalarda, 25°C ve 30°C inkübasyon sıcaklıklarını kullanarak pigment sentezi gerçekleştirmişler ve en yüksek kırmızı pigment sentezini 30°C inkübasyon sıcaklığında elde etmişlerdir.

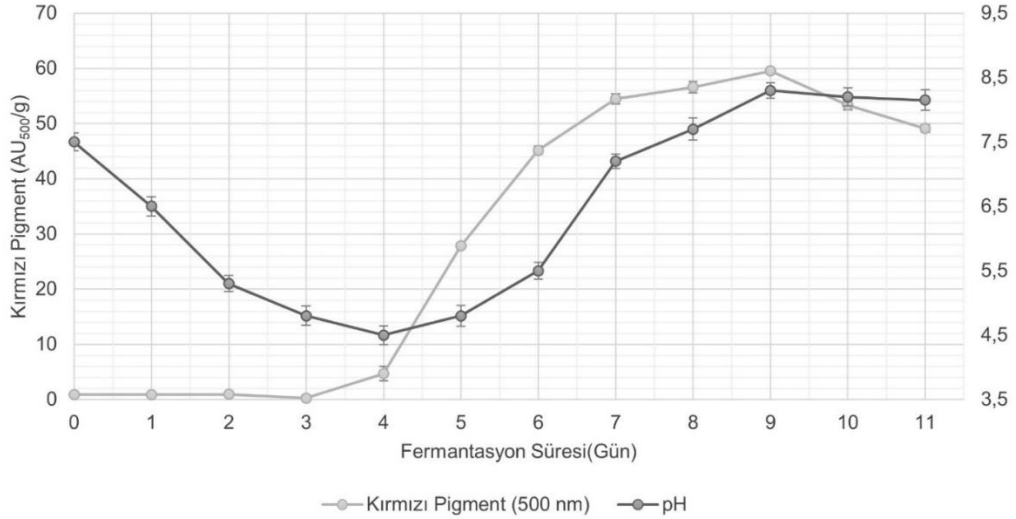


Şekil 6. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının kırmızı pigment sentezi üzerine olan etkisi (Fermantasyon koşulları: Başlangıç nem oranı %85, başlangıç pH 7.5, 3 mL aşı hacmi, 8 gün)

Figure 6. The effect of different incubation temperatures on red pigment synthesis (Fermentation conditions: Initial humidity 85%, initial pH 7.5, 3 mL inoculum volume, 8 days)

Pigment Üretim Kinetiği

Katı kültür fermantasyonu ile *Monascus* türleri kullanılarak yapılan çalışmalar incelendiğinde en yüksek pigment konsantrasyonunun fermantasyon ortamına ve mikroorganizmaya bağlı olarak farklı sürelerde elde edilebileceği görülmüştür [29, 30, 36]. Zamana bağlı pigment sentezinin belirlenmesi amacıyla 5 gram 1:4 (g/g) oranında karıştırılmış BMA:GYT ortamı substrat olarak kullanılarak, optimum koşullar olan başlangıç pH 7.5 ve %85 başlangıç nem oranında fermantasyon ortamları hazırlanmıştır. 3 mL aşı hacmi kullanılarak 28°C'de, statik koşullarda, 11 gün süreyle fermantasyon süreci takip edilmiş, pigment oluşumu ve pH gelişimi incelenmiştir. Elde edilen veriler Şekil 7'de paylaşılmıştır. Kırmızı pigment konsantrasyonundaki artış fermantasyonun 4. gününde başlamıştır. En yüksek kırmızı pigment konsantrasyonu olan 59.55 AU₅₀₀/g değeri ise fermantasyonun 9. gününde elde edilmiştir. Fermantasyonun 9. gününden sonra pigment konsantrasyonundaki düşüşün pigment yapısında gerçekleşen ayrışma, farklı bileşenlere dönüşüm veya oksidasyon sebebiyle gerçekleştiği düşünülmektedir.



Şekil 7. 1:4 (g/g) oranında karıştırılmış bira mayşe atığı ve gofret yaprağı tozu (BMA: GYT) kullanılarak gerçekleştirilen 11 günlük fermantasyon takibi (Fermantasyon koşulları: Başlangıç nem oranı %85, başlangıç pH 7.5, 3 mL aşı hacmi, 28°C, 11 gün)

Figure 7. The kinetics of red pigment synthesis using brewer's spent grain and wafer sheet powder mixed at a ratio of 1:4 (w/w) (BMA: GYT) (Fermentation conditions: Initial humidity 85%, initial pH 7.5, 3 mL inoculum volume, 28°C, 11 days)

Metabolik aktivite ve organik asit üretimine bağlı olarak ilk 4 gün içerisinde ortam pH'sının pH 4.5 değerine kadar düştüğü, devam eden süreçte ise aminoasitlerin *M. purpureus* tarafından deaminasyonu ve amonyak açığa çıkması sonucunda pH değerinde artış gözlemlenmiştir [37, 38].

Literatürde *Monascus* türleri ile kırmızı pigment sentezi gerçekleştirilmiş bazı çalışmalar ve sonuçları Tablo 1'de paylaşılmaktadır. Kullanılan substrat ve fermantasyon koşullarına bağlı olarak pigment konsantrasyonları değişkenlik göstermektedir ve en yüksek kırmızı pigment konsantrasyonları, *Monascus* pigmentleri için Uzak Doğu'da geleneksel olarak kullanılan pirinç

substratında elde edilmektedir. Pirincin *Monascus* türleri gelişimi ve pigment sentezi için oldukça uygun bir substrat olduğu birçok araştırmacı tarafından ifade edilmektedir [2,29]

Bu çalışma, katı kültür fermantasyon tekniği ile *Monascus* pigmenti üretiminde, substrat olarak pirinç veya ilave karbon kaynağı kullanılanlar dışında en yüksek pigment konsantrasyonunun elde edildiği çalışmalardan bir tanesidir. Ayrıca fermantasyon ortamında ilave besin elementlerinin kullanılmaması, proses ekonomisi ve çevre kirliliği açısından bir avantaj olarak ortaya çıkmaktadır.

Tablo 1. Katı kültür fermantasyon yöntemi ile *Monascus* suşları kullanılarak kırmızı pigment sentezinin gerçekleştirildiği çalışmalar

Table 1. Studies on red pigment synthesis by Monascus sp. using solid state fermentation method

Mikroorganizma	Substrat	Fermantasyon yöntemi	Kırmızı pigment konsantrasyonu	Referans
<i>Monascus</i> sp., LPB-31	Pirinç	KKF	216 AU/g	[29]
<i>Monascus sanguineus</i> NFCCI 2453	Pirinç	KKF	143.3 ODU/gds	[39]
<i>Monascus purpureus</i> AS3.531	Pirinç	KKF	112.2 U/g	[40]
<i>Monascus purpureus</i> CMU001	Mısır unu + %8 glikoz	KKF	129.63 U/g	[25]
<i>Monascus purpureus</i>	Sorgum tanesi	KKF	59.7 AU/g	[41]
<i>Monascus purpureus</i> KACC 42430	Mısır koçanı	KKF	25.42 OD Unit/ g	[30]
<i>Monascus purpureus</i> MTCC 369	Patates kabuğu tozu ve bezelye tanesi	KKF	9.57 CVU/g	[22]
<i>Monascus</i> sp. KJR2	Durian meyvesi tohumu	KKF	8.11 AU/g	[28]
<i>Monascus purpureus</i> CMU001	Bira mayşe atığı ve gofret yaprağı tozu	KKF	59.55 AU/g	Bu çalışma

SONUÇ

Günümüzde gerek tarım gerek gıda işleme alanlarında artan su tüketiminin ve küresel bir sorun haline gelen su kıtlığının önlenmesi adına farklı yaklaşımlar geliştirilmesi gerekliliği, düşük su ve enerji ihtiyacı gibi avantajları bulunan ve temelleri çok eskiye dayanan katı kültür fermantasyonunun biyoteknolojik proseslerde kullanılmasının önünü açmaktadır. Çalışma kapsamında gıda atıklarından değerli bir ürün olan *Monascus* pigmenti üretimi katı kültür fermantasyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda 1:4 oranında (g/g) bira mayşe atığı ve atık gofret yaprağı substrat olarak, hiçbir ilave besin maddesi içermeyen saf su ise nemlendirme sıvısı olarak kullanılmıştır. Çalışma kapsamında kırmızı *Monascus* pigment sentezi için belirlenen optimum koşullar olan %85 başlangıç nem oranı, 7.5 başlangıç pH, 3mL aşı hacmi (1×10^6 spor/mL) ve 28°C inkübasyon sıcaklığında fermantasyon gerçekleştirilmiştir. En yüksek kırmızı pigment konsantrasyonu olan 59.55 AU₅₀₀/g değerine fermantasyonun 9. gününde ulaşılmıştır. İlave besin ögesi ve mineral çözeltisi kullanılmadan elde edilen sonuç mevcut ortamın *Monascus* pigmenti sentezi için uygunluğunun bir göstergesidir. Bira mayşe atığı ve atık gofret yaprağının pigment sentezinde ilk defa beraber kullanıldığı bu araştırmanın, gelecekte yapılacak çalışmalara ve pilot ölçekli üretimlere ışık tutması beklenmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: FYL-2019-21067). Çalışma kapsamında kullanılan gofret yapraklarını temin eden Tören Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş. ve bira mayşe atığını temin eden Türk Tuborg Bira ve Malt Sanayi A.Ş.'ye çalışmaya verdikleri desteklerden ötürü teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- [1] Venil, C.K., Yusof, N.Z., Aruldass, C.A., Ahmad, W.A. (2017). Microbial Pigment Production Utilizing Agro-industrial Waste and Its Applications. In *Biopigmentation and biotechnological implementations*, Edited by O. Singh, Wiley, Hoboken, 279p.
- [2] Manan, M., Mohamad, R., Ariff, A. (2017a). *Monascus* spp: A source of natural microbial color through fungal biofermentation. *Journal of Microbiology and Experimentation*, 3(5), 00148.
- [3] Chen, W., He, Y., Zhou, Y., Shao, Y., Feng, Y., Li, M., Chen, F. (2015). Edible filamentous fungi from the species *Monascus*: Early traditional fermentations, modern molecular biology, and future genomics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), 555-567.
- [4] Feng, Y., Shao, Y., Chen, F. (2012). *Monascus* pigments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 1421-1440.
- [5] Babitha, S. (2009). Microbial Pigment. In *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, Edited by P. Singh nee' Nigam, A., Pandey, Springer, Dordrecht, 466p.
- [6] Panesar, R., Kaur, S., Panesar, P. (2015). Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. *Current Opinion in Food Science*, 1, 70-76.
- [7] Manan, M., Webb, C. (2017b). Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*, 4(1), 511-532.
- [8] Sadaf, A., Kumar, S., Nain, L., Khare, S. (2021). Bread waste to lactic acid: Applicability of simultaneous saccharification and solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 32, 101934.
- [9] Atalay, P., Göksungur, Y., Altınay Perendeci, N. (2020). Bira Atıkları ve Değerlendirme Yöntemleri. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik ve Bilim Dergisi*, 26(7), 1257-1266.
- [10] Cooray, S., Chen, W. (2018). Valorization of brewer's spent grain using fungi solid-state fermentation to enhance nutritional value. *Journal of Functional Foods*, 42, 85-94.
- [11] Xiros, C., Christakopoulos, P. (2012). Biotechnological potential of brewers spent grain and its recent applications. *Waste and Biomass Valorization*, 3(2), 213-232.
- [12] Tiefenbacher, K., Wrigley, C. (2016). Wafers: Methods of Manufacture. In *Encyclopedia of Food Grains*, Edited by C. Wrigley, H. Corke, K. Seetharaman, J. Faubion, Academic Press, Cambridge, 1976p.
- [13] Rusin, J., Kasakova, K., Chamradova, K. (2015). Anaerobic digestion of waste wafer material from the confectionery production. *Energy*, 85, 194-199.
- [14] Silbir, S., Goksungur, Y. (2019). Natural red pigment production by *Monascus purpureus* in submerged fermentation systems using a food industry waste: Brewer's spent grain. *Foods*, 8(5), 161.
- [15] Babitha, S., Soccol, C., Pandey, A. (2006). Jackfruit seed-A novel substrate for the production of *Monascus* pigments through solid-state fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 44(4), 465-471.
- [16] Carvalho, J., Oishi, B., Pandey, A., Soccol, C. (2005). Biopigments from *Monascus*: strain selection, citrinin production and color stability. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, 885-894.
- [17] Gomah, N., Abdel-Raheem, H. (2017). Stability and components identification of *Monascus ruber's* pigments. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 8(1), 31-36.
- [18] Dikshit, R., Tallapragada, P. (2011). *Monascus purpureus*: A potential source for natural pigment production. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1(4), 164-174.
- [19] Ooijkaas, L., Weber, F., Buitelaar, R., Tramper, J., Rinzema, A. (2000). Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends in Biotechnology*, 18(8), 356-360.
- [20] Thomas, L., Larroche, C., Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 81, 146-161.

- [21] Srianta, I., Zubaidah, E., Estiasih, T., Yamada, M., Harijono. (2016). Comparison of *Monascus purpureus* growth, pigment production and composition on different cereal substrates with solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 181-186.
- [22] Sehrawat, R., Panesar, R., Panesar, P., Kumar, A. (2017). Biopigment produced by *Monascus purpureus* MTCC 369 in submerged and solid state fermentation: a comparative study. *Pigment and Resin Technology*, 46(6), 425-432.
- [23] Mitchell, D., Berovic, M., Krieger, N. (2000). Biochemical engineering aspect of solid state bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 68, 61-138.
- [24] Shi, K., Song, D., Chen, G., Pistolozzi, M., Wu, Z., Quan, L. (2015). Controlling composition and color characteristics of *Monascus* pigments by pH and nitrogen sources in submerged fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(2), 145-154.
- [25] Nimnoi, P., Lumyong, S. (2011). Improving solid-state fermentation of *Monascus purpureus* on agricultural products for pigment production. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 1384-1390.
- [26] Singh nee' Nigam, P. (2009). Production of Bioactive Secondary Metabolites. In *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, Edited by P. Singh nee' Nigam, A. Pandey, Springer, Dordrecht, 466p.
- [27] Krishna, C. (2005). Solid-state fermentation systems-An overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(1-2), 1-30.
- [28] Srianta, I., Hendrawan, B., Kusumawati, N., Blanc, P. (2012). Study on durian seed as a new substrate for angkak production. *International Food Research Journal*, 19(3), 941-945.
- [29] Carvalho, J., Oishi, B., Woiciechowski, A., Pandey, A., Babitha, S., Soccol, C. (2007). Effect of substrates on the production of *Monascus* biopigments by solid-state fermentation and pigment extraction using different solvents. *Indian Journal of Biotechnology*, 6(6), 194-199.
- [30] Velmurugan, P., Hur, H., Balachandar, V., Kamala-Kanan, S., Lee, K., Lee, S., Chae, J., Shea, P.J., Oh, B. (2011). *Monascus* pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112(6), 590-594.
- [31] Chen, G., Wu, Z. (2016). Production and biological activities of yellow pigments from *Monascus* fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(8):136.
- [32] Lee, B., Piao, H., Chung, W. (2002). Production of Red Pigments by *Monascus purpureus* in solid-state culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 7, 21-25.
- [33] Babitha, S., Soccol, C., Pandey, A. (2007). Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. *Bioresource Technology*, 98(8), 1554-1560.
- [34] Kumar, V., Ahluwalia, V., Saran, S., Kumar, J., Kumar Patel, A., Rani Singhania, R. (2020). Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites, challenges and solutions. *Bioresource Technology*, 323, 124566.
- [35] Gowthaman, M., Krishna, C., Moo-Young, M. (2001). Fungal solid state fermentation-an overview. In *Agriculture and Food Productions*, Edited by G. Khachatourians, D. Arora, Elsevier, The Netherlands, 448p.
- [36] Danuri, H. (2008). Optimizing angkak pigments and lovastatin production by *Monascus purpureus*. *HAYATI Journal of Biosciences*, 15(2), 61-66.
- [37] Şilbir, M. (2019). *Bira atığından Monascus renk pigmentleri üretimi ve stabilitesinin belirlenmesi*. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, İzmir.
- [38] Yoon, L., Ang, T., Ngoh, G., Chua, A. (2014). Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass and Bioenergy*, 67, 319-338.
- [39] Kumar Shetty, A., Dave, N., Murugesan, G., Pai, S., Pugazhendhi, A., Varadavenkatesan, T., Vinayagam, R., Selvaraj, R. (2021). Production and extraction of red pigment by solid-state fermentation of broken rice using *Monascus sanguineus* NFCCI 2453. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33, 101964.
- [40] Zhang, L., Li, Z., Dai, B., Zhang, W., Yuan, Y. (2013). Effect of submerged and solid-state fermentation on pigment and citrinin production by *Monascus purpureus*. *Acta Biologica Hungarica*, 64(3), 385-394.
- [41] Srianta, I., Harijono, H. (2015). *Monascus*-fermented sorghum: pigments and monacolin K produced by *Monascus purpureus* on whole grain, dehulled grain and bran substrates. *International Food Research Journal*, 22(1), 377-382.