



Gıdalarda Kullanılan Mikrobiyal Kaynaklı Pigmentler

P. ERDAL* G. ÖKMEN

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kötekli, Muğla, Türkiye

*Sorumlu Yazar:
E-posta: ppinarr0@gmail.com

Geliş Tarihi : 13 Ekim 2012
Kabul Tarihi : 24 Kasım 2012

Özet

Pigmentler görünür dalga boyunda ışığı absorbe eden kimyasal bileşiklerdir. Pigmentler kaynaklarına göre doğal, sentetik veya inorganik olarak sınıflandırılabilir. En yaygın olarak kullanılan gıda sınıfı pigmentler nitrit ve nitrat tuzları içeren kimyasal bileşiklerdir. Bu sentetik bileşiklerin karsinojenik ve teratojenik etkileri rapor edilmiştir. Bu, bitkiler ve mikroorganizmalar gibi biyolojik kökenli pigmentlerin üretimine artan ilginin en önemli nedenlerinden biri olmuştur. Doğal pigmentler bitki, hayvan, funguslar ve mikroorganizmalar gibi canlı organizmalar tarafından üretilmektedirler. Sentetik pigmentler laboratuvarlardan sağlanmaktadır. Doğal ve sentetik pigmentler organik bileşiklerdir. İnorganik pigmentler doğada bulunabilir veya sentez yoluyla üretilebilirler. Doğal ve sentetik pigmentler tıpta, gıdalarda, giysilerde, mobilyada, kozmetiklerde ve diğer ürünlerde kullanılmaktadırlar. Renklendirici bileşikler olarak, doğal pigmentler çok önemlidir. Açıkça rapor edilmiştir ki doğal ürünlerdeki pigmentler antioksidan, antimikrobiyal ve antimutajenik aktiviteye sahiptir. Bu derleme gıdalarda kullanılan mikrobiyal pigmentler için temel bir bilgi sağlamaktadır.

Anahtar kelimeler: mikrobiyel pigment, gıda

Microbial Pigments Used in Foods

Abstract

Pigments are chemical compounds that absorb light in the wavelength range of the visible region. Pigments can be classified by their origin as natural, synthetic, or inorganic. The most commonly used food grade pigments are chemical compounds containing nitrite and nitrate salts. These synthetic compounds have been reported to have carcinogenic and teratogenic effects. This has been one solid of the major reasons for the increased interest in producing pigments from biological origin like plants and microorganisms. Natural pigments are produced by living organisms such as plants, animals, fungi, and microorganisms. Synthetic pigments are obtained from laboratories. Natural and synthetic pigments are organic compounds. Inorganic pigments can be found in nature or reproduced by synthesis. Natural and synthetic pigments are used in medicines, foods, clothes, furniture, cosmetics, and in other products. As colorant substances, natural pigments are very important. It has been clearly reported that pigments in natural products have antioxidant, antimicrobial and antimutagenic activities. This review provides an basic information to microbial pigments used in foods.

Key words: microbial pigment, food

GİRİŞ

Gıda tüketiminde rengin yeri tartışılmazdır. Özellikle gıda maddelerinin güvenliği renklerde meydana gelen değişikliklere ile belirlenmektedir. Bu değişiklikler kötü işlem süreci ve hatalı taşıma yöntemlerine bağlanmaktadır. Aynı zamanda, doğal olmayan renkteki ürünler (yeşil peynir ya da mavi renkli içecek) çoğu durumda tüketiciler tarafından reddedilmektedir (1). Bu nedenle renk, gıdanın primer tanımlanmasında ve bozulmuş gıdaların tüketimine karşı önlem olarak görev yapmaktadır (2).

Pigment kelimesi Latince "pigmentum" dan gelmektedir ve aslında renklendirici madde anlamına gelmektedir ancak sonraları renkli dekorasyon anlamında kullanılmaya başlanmıştır.

✓ Pigmentler, görünür dalga boyundaki ışığı absorbe eden bileşiklerdir. Bu absorblama, molekülün spesifik yapısının (kromofor), radyant kaynağından ışığı yakalamasıyla gerçekleşmektedir. Bazı enerjiler absorblanmadığı zaman yansıtılır veya kırılır; bu enerjinin uyarılar tarafından beyne iletilmesiyle renk algılanmaktadır (3).

✓ Kuru Renk Üreticileri Birliği (KRÜB), pigment ve boya arasında net bir ayırım yapmaktadır. Buna göre pigment; siyah, beyaz veya flöresan renklendirici organik veya inorganik, genellikle çözünmeyen, ortam veya substrata dahil edildiğinde kimyasal ve fiziksel yapısı değişmeyen parçacık yapılı katılara verilen isimdir. Pigmentler kristal veya parçacık yapısını korumakta ancak boyalar taşıma ortamı içinde çözünür ve boya maddeleri solüsyonu içinde kristal/ parçacık özellikleri kaybolur (4).

Ancak günümüzde **renklendirici** terimi tercih edilmektedir. Renklendiriciler, nesnelere algılanan rengini değiştirmek ya da rensiz nesnelere renk vermek amacıyla kullanılan maddeler olarak tanımlanmıştır (5).

FDA yönetmeliğine (6) göre ise bir renklendirici, kaynağı ne olursa olsun doğal kabul edilemez (gıdanın kendine ait doğal rengi olmadıkça). Örneğin dondurmaya pembe rengi vermek için kullanılan çilek suyu veya kırmızı pancar rengi, doğal renkler olarak kabul görmemektedir.

Gıdalarda uzun yıllar kullanılan sentetik renklendiricilerin sağlık üzerine olumsuz etkilerinin ortaya çıkmasından sonra, gerek bilim adamlarının gerekse tüketicinin tercihi, doğal renklendiriciler üzerinde odaklanmıştır (7). Ancak doğal renklendiricilerin gıda-pigment ajanı olarak tanıtımındaki en büyük engel, yüksek yatırım gerektirmesidir.

Pigmentlerin sınıflandırılması

Belirli bir uygulama için daha iyi renk verecek bir madde seçerken çeşitli faktörler dikkate alınmalıdır (8). Pigmentler farklı özellikleri dikkate alınarak farklı şekilde sınıflandırılmıştır (Tablo 1) (9).

1. Renk tonu
2. Fiziksel form (sıvı, katı, emülsiyon)
3. Renklendirici olabilecek gıda maddelerinin özellikleri (yağ veya su bazlı ürünler, pH, tanen içeriği)
4. Üretim koşulları (depolama koşulları, süreç sırasında ısıtma veya soğutma gerekliliği)
5. Çözünürlük
6. Mikrobiyal kalite (yüksek su aktivitesi olan ürünler mikrobiyolojik saldırıya daha duyarlıdır)
7. Düşük maliyet
8. Yüksek verim
9. Stabilité
10. Güneş ışığına duyarlılıkları

Tablo 1. Renklendiricilerin sınıflandırılması (9)

Sınıflandırma Şekli	Pigment Grubunun Türü	Karakteristikleri	Örnekler
Kökenine Göre	Doğal	Yaşayan organizmalardan elde edilen organik bileşikler	Karotenoid, antosiyanin, kurkumin
	Sentetik	Kimyasal sentez yoluyla elde edilen organik bileşikler	FD&C (Food, Drug and Cosmetic) renklendiricileri (gıda, ilaç ve kozmetikte kullanımına izin verilen belgelenmesi zorunlu renklendiriciler)
	İnorganik	Sentez ile elde edilen ya da doğada bulunan bileşikler	TiO ₂
Yapısal Özelliğine Göre	Aynı Sistem Kökeniyle Türetilmiş Kromoforlar	Sadece bir tek bağ ile ayrılmış birden fazla çift bağ	Karotenoidler, antosiyaninler, FD&C renklendiricileri
	Metalle Düzenlenmiş Bileşikler	Kimyasal yapılarında bir metal mevcut	'Hem' grubu içeren renkler (miogloblin, hemogloblin, klorofil)
Spesifik Yapısına Göre	Tetrapirrol Türevleri	Dört pirol yapısına sahip bileşikler	Klorofiller, 'Hem' grubu içeren pigmentler
	Karotenoidler	Isoprenoid türevleri, çoğu polimer bileşikler	Likopen, karoten, lutein, kapsantin
	İridoidler	Isoprenoid türevleri	Geniposid, randiosid
	Tetrapirrol Olmayan N-Heterosiklik Bileşikler	Kimyasal yapısında azot bulunur	Pürinler, pterinler, flavinler, fenazinler, fenoksazinler, betalainler
	Benzopiran Türevleri	Oksijenlenmiş heterosiklik bileşikler	Antosiyanin ve diğer flavonoidler
	Kuinonlar	Kimyasal yapılarında kuinon fonksiyonel grupları bulunur	Benzokuinon, naftokuinon, antrakuinon
	Melaninler	Azot içeren monomerlerden elde edilen polimerik yapılar	Ömelanin, faomelanin
Mevzuata Göre	Beyan Edilmesi Zorunlu Olanlar	Antropojenik sentetikler	FD&C renklendiricileri
	Sertifikasyondan Muaf Olanlar	Doğal orijinlerden (bitki, mineral ya da hayvan) ya da sentetik benzeri bileşiklerden	Üzüm suyu, TiO ₂ , karmin ve sentetik β-karoten

Pigment Kaynakları

Bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan (fungi, maya, bakteri) elde edilen doğal biyorendiriciler, ticari olarak pek çok alanda kullanılmaktadır. Pigment üreten mikroorganizmalar doğada oldukça yaygındır ve renk bakımından zengindir. Pigmentlerdeki çeşitliliğin nedeni, farklı kimyasal kompozisyonları ve spesifik kromofor varlığından kaynaklanmaktadır (10). Bitki ve mikroorganizmalardan biyoteknolojik yöntemlerle elde edilen bazı renklendiriciler, kültür teknikleri ve üretimlerinin daha elverişli olmasından dolayı tercih edilmektedir (6, 11).

Mikrobiyal pigmentler gibi ikincil metabolitlerin üretimi bakteriyel, algal ya da fungal kültürlerin büyüme fazından sonra gerçekleşir ve pigment miktarı, biyokütle üzerinde birikimle doğrudan ilişkilidir (12). Tablo 2 'de ticari olarak öneme sahip pigmentleri ve elde edikleri mikroorganizma kaynakları özetlenmiştir.

Tablo 2. Mikrobiyal pigmentler ve renkleri (13)

Mikroorganizma	Renkler
<i>Achromobacter</i>	Krem
<i>Bacillus sp.</i>	Kahverengi
<i>Brevibacterium sp.</i>	Turuncu, sarı
<i>Corynebacterium michiganense</i>	Kremsi ya da grimsi
<i>Pseudomonas sp.</i>	Sarı
<i>Rhodococcus maris</i>	Mavimsi kırmızı
<i>Streptomyces</i>	Sarı, kırmızı, mavi
<i>Aspergillus sp.</i>	Turuncu, kırmızı
<i>A. glaucus</i>	Koyu kırmızı
<i>Blakeslea trispora</i>	Krem
<i>Helminthosporium catenarium</i>	Kırmızı renkleri
<i>H. gramineum</i>	Kırmızı
<i>H. cynodontis</i>	Bronz renkler
<i>H. avenae</i>	Bronz renkler
<i>H. catenarin</i>	Koyu kestane rengi
<i>Monascus purpureus</i>	Sarı, turuncu, kırmızı
<i>P. cyclopium</i>	Turuncu
<i>P. nalgovensis</i>	Sarı
<i>Cryptococcus sp.</i>	Kırmızı
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Kırmızı
<i>Rhodotorula sp.</i>	Kırmızı
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Kahverengi
<i>Dunaliella salina</i>	Kırmızı

Gıdada kullanılacak renklendirici kaynağı olabilecek mikroorganizmaların sahip olması gereken bazı özellikler mevcuttur (9). Bunlar;

- Geniş C ve N kaynağını kullanabilme kabiliyeti,
- pH, sıcaklık, mineral konsantrasyonuna toleranslı olması ve kolay büyüme koşullarına sahip olması,
- Makul renk ürünlerine sahip olması,
- Toksik veya patojenik olmaması,
- Renk içeriği, hücre kütlelerinden kolayca ayrılabilir.

Pigment Üretimi

Bir pigmentin, başarılı şekilde piyasada kabul görmesi için, ürünü piyasaya sürmek için gereken yatırımın büyüklüğü ve düzenleyici makamın onayı önem taşımaktadır. Günümüzde yapılan çalışmalar, maliyeti düşürecek süreçlere kaymış ve fermentasyon ile pigment üretimine yönelmiştir. Bundan başka yeni pigment kaynakları arayışları sürdürülmekte, özellikle de mikroorganizmalar üzerinde yoğunlaşmıştır (7).

Günümüzde gıda sektörüne, fermentasyon kökenli maddelerin girişi yıldan yıla artmaktadır (13, 14). Dolayısı ile piyasada bazı fermentatif gıda sınıfı pigmentler bulunmakta olup (Tablo 3), mikroorganizmalar ya da bitkilerden elde edilen pigmentlerin hem gıda renklendiricisi hem de besin takviyesi olarak kullanımı yüksektir. Örneğin *Serratia* ve *Streptomyces* iyi miktarda biyorenk üretmektedir (15).

Pigment Üretimini Etkileyen Faktörler

Pigmentlerin fermentasyon yoluyla üretimi üzerine çok sayıda çevresel şartların etkili olduğu rapor edilmiştir. Bunlar arasında karbon kaynakları yüksek etkili olup, bu karbon kaynakları arasında sukroz, glukoz bulunmaktadır. Ancak ortam şartları azot sınırlı olduğu takdirde karbon kaynaklarının stimüle edici etkisi söz konusudur (39).

Bundan başka ortam pH (pH7), kültürasyon ortamı, sıcaklık (30°C'e kadar artış gözlenirken yüksek sıcaklıklarda pigment üretimi hızla azalmaktadır), havalandırma oranı, ışık şiddeti ve kalitesi, inorganik maddeler [Co(NO₃)₂, Na₂CO₃, ZnSO₄, MgSO₄, FeSO₄, MnSO₄, Al₂(SO₄)₃] ayrıca deterjan katkıları, yağlar ve surfaktantlar da pigment üretimini artırıcı aktivatörler olarak yer almaktadır (Tablo 4) (40, 39).

Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda çok sayıda kimyasal bileşiğin de karotenoid üretimi üzerine etkili olduğu rapor edilmiştir. Bunlar arasında özellikle terpenler, iyonlar, aminler, alkaloidler ve antibiyotikler (penisilin) bulunmaktadır (41). Bazı çözücülerin kültür ortamına ilavesi de karotenoid üretimini stimüle ettiği rapor edilmiştir. Bunlar arasında özellikle etanol, metanol, izopronaol, etilen glikol yer almaktadır (42).

Pigmentlerin Kullanım Alanları

Pigmentler günümüzde toplum hayatına hızla artarak katılmaktadır. Özellikle tıp (Tablo 5), gıda, mürekkep, kağıt, tekstil, akuakültür, hayvan yemi ve besini gibi pek çok alanda kullanımı olan maddelerdir. Örneğin biyolojik olarak üretilmiş karotenoidlerin tıbbi etkileri vardır çünkü karotenoidlerin besinsel (provitamin A), antioksidan (Şekil 1) ve fotokoruyucu etkileri rapor edilmiştir (53).

Boyama, cilalama, ressam boya, plastikler, tekstil ve kağıt için baskı mürekkepleri, deri dekorasyonu, imitasyon deri, inşaat materyalleri, yüzey kaplamaları, kauçuk, kağıt, kozmetik, seramik ve emayeler pigment kullanımının önemli alanlarını oluştururlar (Şekil 2 ve 3). Boyama endüstrisinde yüksek kaliteli pigmentler kullanılmakta ve bunların düzgün tanecikli olması gerekmektedir bunun nedeni etkili parlaklık, kapaticılık, renklendirme gücü ve aydınlatma gücüne olan katkılarıdır. Beyaz pigmentler yalnızca beyaz renklendirici ve kaplamalarda değil aynı zamanda renkli (parlak) ve siyah pigmentleri indirgemek için de kullanılmaktadır.

Tablo 3. Fermantasyon ile üretilen bazı gıda sınıfı pigmentler ve üreticileri (16)

Molekül	Renk	Mikroorganizma	Durumu	Kaynak
Ankaflavin	Sarı	<i>Monascus</i> sp.	EÜ	17
Antrakuinon	Kırmızı	<i>Penicillium oxalicum</i>	EÜ	18
Astaksantin	Pembe-kırmızı	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> (eski adı <i>Phaffia rhodozyma</i>)	GB	19, 20
		<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	AP	21
		<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	AP	22
Kantaksantin	Koyu kırmızı	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	AP	23
Likopen	Kırmızı	<i>Blakeslea trispora</i>	GB	24
		<i>Fusarium sporotrichioides</i>	AP	25
Melanin	Siyah	<i>Saccharomyces neoformans</i> var. <i>nigricans</i>	AP	26
Monaskorubramin	Kırmızı	<i>Monascus</i> sp.	EÜ	17
Naftokuinon	Koyu kan kırmızı	<i>Cordyceps unilateralis</i>	AP	27
Riboflavin	Sarı	<i>Ashbya gossypii</i>	EÜ	28
Rubrolon	Kırmızı	<i>Streptomyces echinoruber</i>	GB	29
Rubropunktatin	Turuncu	<i>Monascus</i> sp.	EÜ	17
Torularhodin	Turuncu-kırmızı	<i>Rhodotorula</i> sp.	GB	30
Zeaksantin	Sarı	<i>Flavobacterium</i> sp.	GB	31
		<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i>	AP	32
β-karoten	Sarı-turuncu	<i>Blakeslea trispora</i>	EÜ	33
		<i>Fusarium sporotrichioides</i>	AP	25
		<i>Mucor circinelloides</i>	GB	34
		<i>Neurospora crassa</i>	AP	35
		<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	AP	36
Bilinmeyen	Kırmızı	<i>Penicillium purpurogenum</i>	GB	37
		<i>Paecilomyces sinclairii</i>	AP	38

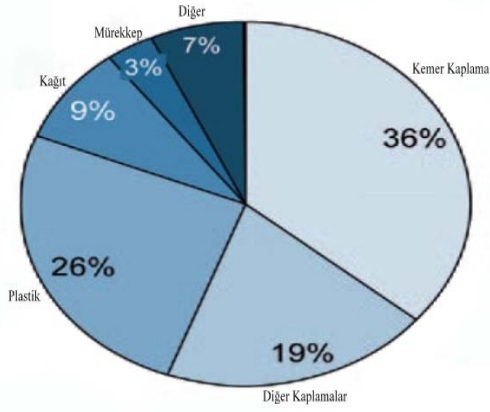
EÜ: Endüstriyel Üretim, GB: Geliştirme Basamağı, AP: Araştırma Projesi

Tablo 4. Bazı mikroalglerde karotenoidlerin üretimi için optimal şartlar (43)

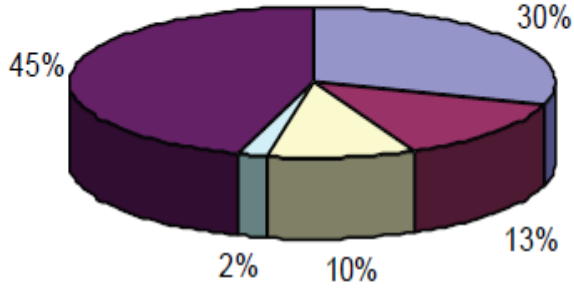
Karotenoid	Mikroalg kaynağı	Üretim koşulları	Reaktör tipi	Üretim	Kaynak	
β-karoten	<i>Dunaliella salina</i>	T: 25 °C; pH: 7.5	Yarı sürekli, kapalı tüpler (55 L)	Biyokütle: 2 gm ² d ⁻¹ Total karotenoid: 102.5 mg m ² d ⁻¹ (biyokütlenin % 10' u β-karoten)	44	
		T: 30 °C; pH: 7.5	Sürekli, düz panel (2.5 L)	β-karoten: 13.5 mg L ⁻¹ d ⁻¹	45	
		T: 30 °C; pH: 7.5	Sürekli, <i>in situ</i> ekstraksiyon ile düz panel (1.9 L)	β-karoten : 0.7 mg L ⁻¹ d ⁻¹ β-karoten: 8.3 mg L ⁻¹ d ⁻¹		
Lutein	<i>Muriellopsis sp.</i>	T: 28 °C; pH: 6.5	Yıgın (4-7 gün, 0.2 L)	Lutein içeriği: 5.5 mg g ⁻¹ L ⁻¹ d ⁻¹ Lutein: 0.8-1.4 mg g ⁻¹ L ⁻¹ d ⁻¹	46	
		T: 28 °C; pH: 7	Sürekli, tübüler (55 L)	Biyokütle: 7.2 mg L ⁻¹ d ⁻¹ Lutein: 5.5 mg g ⁻¹ L ⁻¹ d ⁻¹		
	<i>Scenedesmus almeriensis</i>	T: 30 °C; pH: 8	Sürekli (2 L)	Lutein: 4.9 mg L ⁻¹ d ⁻¹	47	
		T: 35 °C	Sürekli, tübüler	Lutein: 5.31 mg m ² d ⁻¹	48	
	<i>Chlorella protothecoides</i>	T: 28 °C; pH: 6.5	Yıgın (16 L)	Lutein: 10 L ⁻¹ d ⁻¹	49	
	<i>Chlorella zoofingiensis</i>	T: 28 °C; pH: 7	Yıgın (0.2 L)	Lutein: 3.4 mg L ⁻¹ d ⁻¹	46	
	<i>Chlorococcum sp.</i>			Lutein: 1.05 mg L ⁻¹ h ⁻¹		
	<i>Neosporangiococcus gelatinosum</i>			Lutein: 0.70 mg L ⁻¹ h ⁻¹		
	Astaksantin	<i>Chlorella zoofingiensis</i>	T: 30 °C; pH: 6.5	Yıgın (250 mL)	Astaksantin: 10.3 mg L ⁻¹	50
		<i>Haematococcus pulvialis</i>	T: 15-25 °C	Dışarıda kapalı (25.000 L)	Biyokütle: 90 g m ⁻² Astaksantin: 13 g m ⁻² d ⁻¹	51
T: 28 °C			Yıgın (1 L)	Astaksantin içeriği: 98 mg g ⁻¹ biyokütle	52	

Tablo 5. Deniz bakterilerinden izole edilen biyolojik olarak aktif pigment bileşikleri (54)

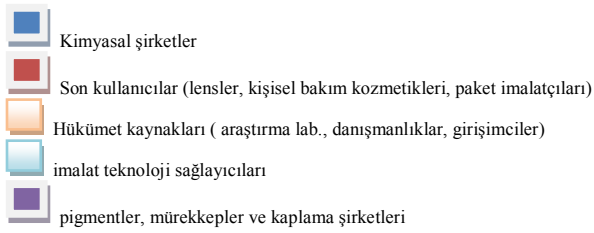
Pigment	Aktivitesi	Bakteri	Kaynak
Astaksantin	Antioksidan	<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	55
Violasin	Antikanser, antibiyotik, antiprotozoa	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>	56, 57, 58
		<i>Pseudoalteromonas tunicata</i>	
		<i>Pseudoalteromonas sp. 520P1</i>	
		<i>Collimonas CT</i>	
Metil sülfat (fenazin türevi)	Antibiyotik	<i>Pseudonocardia sp. B6273</i>	59
Fenazin türevleri	Sitotoksik	<i>Bacillus sp.</i>	60
Melanin	UV radyasyonuna karşı koruyuculuk	<i>Vibrio cholerae</i>	61, 62, 63
		<i>Shewanella colwelliana</i>	
		<i>Cellulophaga tyrosinoydans</i>	
		<i>Alteromonas nigrifaciens</i>	
Sitonemin	UV radyasyonuna karşı koruyuculuk, anti-inflamatuar, anti-proliferasyon	Siyanobakteri	64



Şekil 2. Pigmentleri kullanım alanlarına göre dağılımı (65)



Şekil 3. Pigmentlerin ana iş kollarına göre dağılımı (66)



Belirli bir uygulama için pigment seçerken bazı noktalar göz önüne alınmalıdır. Renklendirme özellikleri, uygulama verimliliğini belirlemede ve ekonomik açıdan önemlidir. Bu önemli özellikler:

1. Genel kimyasal ve fiziksel özellikleri: kimyasal bileşimi, nem ve tuz içeriği, su ve asit maddelerde çözünürlüğü, partikül boyutu, yoğunluk ve sertliği,

2. Stabilité özellikleri: ışık, kimyasallar, sıcaklık ve hava koşullarına karşı direnç, korozyon önleyici özellikleri, parlaklığını koruma,

3. Bağlayıcı davranışları: bağlayıcı özellikleri ile etkileşim, dispersiyon, uyumluluk ve katılaştırma etkisi (67)

Ticarileştirilebilen işlem görmüş ya da depolanmış doğal gıdaların, bu süreçler sırasında, özellikle renkleri etkilendiği için renklendiriciler kullanılmaktadır. Günümüzde özellikle iyi pazar değeri olan gıdalar, doğal bileşiklerle boyanmaktadır. Örneğin çedar peyniri (68). Gıda maddelerinde renklendirici kullanımının bazı geçerli nedenleri bulunmaktadır. Bunlar;

1. Gıdanın orijinal görünümünü korumak için,
2. Mevsime bağlı renk değişimi önlemek için,
3. Renk bütünlüğünü sağlamak için,
4. Gıdanın normal rengini güçlendirmek ve kalitesini korumak için,
5. Aromasını korumak için,
6. Işığa duyarlı vitaminlere destek vermek için,
7. İştah açıcı bir öge olarak kabul edilebilirliğini artırmak için kullanılmaktadır (69).

Bundan başka pigment maddeleri özellikle bazı mikroorganizmaların karakterizasyonunda da kullanılmaktadır.

Örneğin *Cyanidium*, *Nostoc* ve *Anabaena* spp. yalnızca fikosiyanın içeriği ile, *Phormidium* ise fikoeritrin ile karakterize edilmektedir (70).

Gıda Sınıfında Kullanılan Doğal Biyorenlendiriciler

Gıdalarda kullanılan sentetik boyalar yıllardır tartışılmaktadır. Sentetik gıda boyalarının olumsuz etkileri modern tüketicinin kaygılarını artırmış ve doğal renklendiricilere doğru yönelmesine neden olmuştur (7). Özellikle sentetik boyaların çocuklarda davranış bozukluklarına ve hiperaktiviteye yol açtığını bildiren raporlar bulunmaktadır. Bu amaç için yaygın olarak kullanılmaya başlanan organik pigmentlerin global pazar payları giderek artmaktadır. Doğal renklendiriciler toksik olmamaları, endüstriyel üretimlerinin kolay olmasının yanında maliyetin düşük olması da bu renklendiricileri cazip hale getirmektedir. Bunların dışında tıbbi açıdan antioksidan olmaları gıdalarda güvenle kullanımını sağlamıştır. Ancak doğal renklendiriciler kullanım amaçlarına göre, sentetik renklendiricilerden daha pahalıdır, kullanımı daha zor ve daha az stabilite göstermektedir (71).

Gıda maddelerinden ve diğer kaynaklardan fiziksel ve/veya kimyasal ekstraksiyonla elde edilen besleyici veya aromatik bileşenleri içermeyecek şekilde elde edilen pigmentlerin selektif ekstraksiyonuyla oluşturulan maddelere renklendirici adı verilmektedir. Ancak bir gıda maddesinin üretiminde aromatik veya besleyici özelliklerinden dolayı kullanılan, ancak ikinci etkisi renk vermek olan çeşitli renklendiriciler bu sınıfa dahil edilmezler. Peynir kaplamaları, salam ve sucuk kılıfları gibi gıdaların yenilmeyen dış kısmında kullanılan boyalar renklendirici olarak değerlendirilmeyiz. Gıda sanayinde kullanılan ve biyolojik öneme sahip pigmentler Tablo 6 'te özetlenmiştir.

Tablo 6. Biyolojik önemi olan pigmentlerin renk özellikleri ve örnekleri (72)

Kimyasal Grubu	Pigmenti	Baskın renk
Tetrapiroller	Klorofiller	Yeşil
	Bilinler Siklik (Hem grupları) Hemoglobin Miyogloblin Lineer Fitokrom	Kırmızı Mavi-yeşil, sarı-kırmızı
	Karotenler (β -karoten, likopen) Ksantofiller (lutein, zeaksantin) İridoidler	Sarı-kırmızı Sarı
N-Heterosiklik bileşikler	Pürinler (guanin)	Sarı(altın ve gümüş)
	Pterinler	Beyaz-sarı
	Flavinler (riboflavin)	Sarı
	Fenazinler	Sarı-mor
	Fenoksazinler	Sarı-kırmızı
	Betalainler	Sarı-kırmızı
Benzopiran türevleri	Flavonoidler (antosiyenin, flavonolar, flavoneler, antoklorlar)	Mavi-kırmızı, sarı- beyaz, beyaz krem, sarı
	Taninler	Kahverengi-kırmızı
Kuionlar	Benzokuinon (plastokuinon)	Yüksek konsantrasyonlarda pembe renk
	Naftokuinon (vitamin K)	Kırmızı-mavi-yeşil
	Antrokuinon (karminik asit)	Kırmızı-mor
Melaninler	Allomelanin	Sarı-kahverengi
	Ömelanin	Siyah-kahverengi
	Faomelanin	Kahverengi
Metalloproteinler	Cu-proteinleri	Mavi-yeşil
	Adenokrom	Mor-kırmızı

Klorofil

Klorofil, tetrapirool grubu içinde yer alan en önemli pigmenttir. Yüksek bitkiler, eğreltiler, yosunlar, yeşil algler ve prokaryotik organizmalarda yaygın olarak klorofil-a (mavi-yeşil) ve klorofil-b (yeşil) olmak üzere 2 tip klorofil bulunmaktadır (72, 73).

Siyanobakteriler ve kırmızı algler de (*Rhodophyta*) ise fikobilin bulunmaktadır. Fikobilinler suda çözünen, koyu renkli ve floresan etkili pigment protein kompleksidir. Alglerde bulunan fikobilinler protein içeriğinin %40 kadarını kapsamaktadır (70).

- **Fikoeritrin**, kırmızı renkli, 490- 570 nm arasında en yüksek absorpsiyonu veren ve floresan ışık altında parlak turuncu renk gösteren bir pigmenttir.

- **Fikosiyenin**, mavi renkli, 610- 665 nm dalga boyunda en yüksek absorpsiyonu veren pigmenttir. Antioksidan özellikte olduğu için gıda renklendirilmesinde sağlıklı bileşik olarak nitelendirilir ve floresan ışık altında kırmızı renk vermektedir.

- **Allofikosiyeninler** ise bilinin farklı bir grubu olup 650 nm' de absorpsiyon vermektedir. Allofikosiyenin, fikosiyenin veya fikoeritrin molekülleri ile çevrilidir.

Tetrapirool grubu pigmentler pek çok enzimin düzenlenmesinde ayrıca biyokimyasal ve transkripsiyonel düzeyde işlev görmektedir. Mikroalglerde ve siyanobakterilerde verimli bir fotosentetik süreç ve dolayısı ile pigment birikimi önemli süreçlerdir (3). Tablo 7, doğadaki tetrapirool grubu içeren pigmentler ve organizmalarda dağılımı verilmektedir.

Fikobilinler gıda ve kozmetik alanları dışında biyoteknolojik anlamda teşhis ve ilaçlarda kullanılmaktadır. Siyanobakterilerden elde edilen fikosiyenin kendi besin değeri dışında, bağışıklık sistemini artırıcı, kolesterol düşürücü, antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral ve antikanser özellikler de göstermektedir (74).

Klorofillerin gıdada kullanılan en yüksek miktarı çikolata ve çikolata ürünlerinde 700 mg/kg iken en düşük kullanım miktarı ekmek temelli ürünlerde 6,4 mg/kg' dır (75).

Tablo 7. Doğadaki tetrapirool grubu içeren pigmentler ve organizmalarda dağılımı (72)

Tetrapirool grupları	Organizma
Fitokrom (turuncu-kırmızı)	Yeşil bitkiler içinde geniş dağılımlı
Fikosiyenin (mavi)	Siyanobakteriler; <i>Spirulina platensis</i>
Fikoeritrin (sarı-turuncu)	Kırmızı algler (<i>Rhodophyta</i>); <i>Cyanidium caldarium</i> , <i>Galdieria sulphuraria</i>
Klorofil-a (mavi-yeşil) ve klorofil-b (yeşil)	Yüksek bitkiler, eğrelti otu, yeşil algler, kara yosunları
Bilirubin (turuncu)	Omurgalılar
Heme (kırmızı)	Yaşayan organizmalarda ubikuinon şeklinde

Karotenoidler

Karotenoidler yağda çözünebilir, merkezi iskeleti 8 izoprenoid ünitesinin yan yana dizilmesiyle oluşmuş renk maddeleridir. Genel olarak renkleri, konsantrasyona ve molekülün yapısına bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca farklı karotenoidlerin karışım halinde bulunmasıyla farklı renk tonları da elde edilmektedir (76). İzoprenoid grupları da 2 ana alt grup altında toplanmaktadır. Bunlar: karotenoidler ve iridoidlerdir.

Pek çok mikroorganizma da karotenoidlerin üretimi söz konusudur. Hatta günümüzde ticari olarak kullanımı izinli ürünler piyasada yerini almıştır. Mikroorganizmalardan elde edilen karotenoidler Tablo 8 ' de özetlenmiştir.

β -karoten

Yağda çözünen fakat sulu çözeltilerde emülsiyeye olan, sarı turuncu rengi veren bir pigmenttir. Ticari olarak alglerden elde edilirler (80). *Dunaliella salina* ve *Dunaliella bardawil*, yüksek ışık hassasiyetiyle çok tuzlu ve besin stresi kombinasyonu altında, yüksek miktarda β -karoten biriktirdikleri rapor edilmiştir (81).

Tablo 8. Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen karotenoidler (77, 78, 79)

Mikroorganizma	Pigment			
	β -karoten	Kantaksantin	Astaksantin	Zeaksantin
Alg	<i>Dunaliella salina</i>	<i>Hematococcus</i> <i>Chlorella</i> <i>Chamydomonas</i> <i>Scenedesmus</i> <i>Ankistrodesmus</i> <i>Dictyococcus</i> <i>cinnarinus</i>	<i>Hematococcus pluvialis</i>	
Bakteri		<i>Corynebacterium sp.</i> <i>Rhodococcus maris</i> <i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Agrobacterium aurantiacum</i> <i>Paracoccus carotinifaciens</i>	<i>Flavobacterium sp.</i> <i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i>
Fungus	<i>Blakeslea trispora</i> <i>Fusarium</i> <i>sporotrichioides</i> <i>Mucor circinelloides</i> <i>Neurospora crassa</i> <i>Phycomyces</i> <i>blakesleeanus</i>	<i>Rhodococcus maris</i>	<i>Mycobacterium lacticola</i>	
Siyanobakteri	<i>Synechococcus</i> ; <i>Crocospaera watsonii</i> ; <i>Lyngbya sp.</i> ; <i>Nostoc sp.</i> ; <i>Anabaena variabilis</i> ; <i>Cyanothece</i> ; <i>Nostoc punctiforme</i> <i>Nodularia spumigena</i> ; <i>Gloeobacter violaceus</i> ; <i>Thermosynechococcus elongates</i> ; <i>Acaroychloris marina</i>			

Blakeslea trispora fungusu, β -karoten üreticisi olup, 35 mg/g' a kadar verim saptanmıştır (82). Çeşitli sürfaktanları içeren ortamlarda β -karoten üretiminin arttığı bilinmektedir (15). HPLC analizi, stabilite testleri ve mikrobiyal testlerle, *Blakeslea trispora*' nın fermantasyonuyla elde edilen β -karoten üretiminin EC şartnamesine uyduğu rapor edilmiştir (34). β -karoten üretimi için diğer ilginç model, *Phycomyces blakesleeanus*' dur (83). Standart koşullar altında geliştirilen yabancı türlerin karoten içeriği, kuru kütlelerde 0,05 mg/g; ancak bu miktarın bazı mutant suşlarda 10 mg' a kadar çıktığı bildirilmiştir (84). *Mucor circinelloides*' nin yabancı tipi β -karoten biriktirdiği için sarı renkli olup, gıda renklendiricisi olarak kullanılmaktadır (85). *Mucor circinelloides*, β -karoten üretimi üzerine ışığın etkisi üzerine yapılan çalışmalar sonucunda karanlıkta β -karoten miktarı az iken şiddetli ışıkta pigment içeriği artmaktadır (86). *Phycomyces*, katı veya sıvı ortamlarda karotenojenik potansiyele sahip suşlar içermekte olup, standart koşullar altında yetişen yabancı tipinin karoten içeriği az iken (0.05 mg/g kuru ağırlık), bazı mutantları 10 mg' a kadar β -karoten biriktirmiştir (84). Karotenoid üreten organizmalardan biri de *Rhodotorula* olup, üzerinde çalışma yapılan türü ise *Rhodotorula glutinis*' dir. Bundan başka *Rhodotorula gracilis*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula graminis* üzerine de çalışmalar bulunmaktadır (Tablo 10) (87).

Yabani tip mayalafta β -karoten β -karoten üretimi düşük bulunduğundan, çalışmalar optimizasyon ve mutant türleri üzerine kaymıştır. Hatta yabancı türden 76 kat daha fazla β -

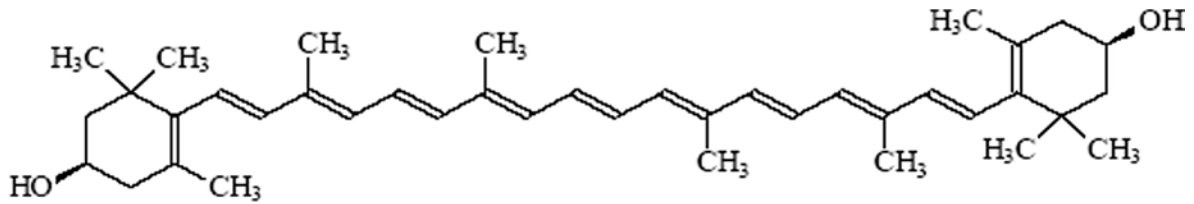
karoten üreten (70 mg/L) mutant türler elde edilmiştir. Günümüzde artık araştırmaların yeni odak noktası biyoteknolojide faydalı olabilen mutantlardır (34).

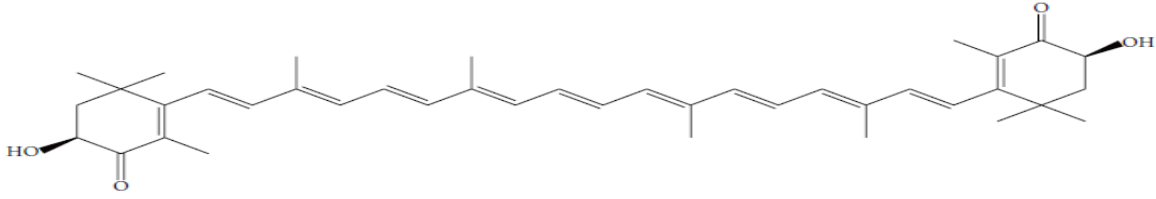
Torulen ve toruladin, β -karotenin temel bileşenleri olup kırmızı mayalar tarafından üretimi gösterilmiştir. Buna ilaveten toksik etkiye sahip olmaması da ayrı bir avantaj sağlamaktadır; hatta tavuk besini olarak kullanımı uygun görülmüştür (30).

β -karotenin gıdalarda kullanımına izin verilen en yüksek miktarı günlük içeceklerde, süt ve süt tozlarında, yoğurtta, jel ve marmelatlarda 1000 mg/kg kadardır. En düşük kullanım miktarı ise taze et ile krema türevlerinde 20 mg/kg kadardır (88).

Zeaksantin

Sarı pigment olarak kullanım alanı bulunan zeaksantin, her biri diğerinden farklı, çift bağ sayısı fazla olan bir pigmenttir (Şekil 4) özellikle kümes hayvanı yumurtasının renklendirilmesinde, gıda ve kozmetik sektöründe kullanılmaktadır (89). *Flavobacterium*' dan elde edilen zeaksantin üretimi için besi ortamında iz elementler, aminoasit, glukoz ve sukroz bulunması gerekmektedir. Kültürleri (31) glukoz, sukroz, metiyonin, sistin ya da sistein gibi kükürt içeren aminoasitleri ve iki değerlikli metal iyonlarını içeren besi ortamında kuru hücre kütlelerinin 16 mg/g hücre konsantrasyonunda 190 mg/L kadar zeaksantin üretmektedir (31). Zeaksantin, fermente süt ürünlerinde maksimum kullanım seviyesi 150 mg/kg' dır.

**Şekil 4.** Zeaksantin yapısı (90)



Şekil 5. Astaksantin yapısı (54)

Astaksantin

Astaksantin hayvanlar ve balıklar için gıda katkısı olarak insanlar için önemli gıda destekleyicisi olarak ticari önemi fazla olan bir karotenoidtir (Şekil 5). Özellikle alg ve funguslar stres koşulları altında astaksantin biriktirmektedir. *Haematococcus lacustris*, büyük miktarda içerdiği astaksantin esterleri nedeniyle, günümüzde astaksantin potansiyel kaynağı sayılmakta ve biyoreaktörler kullanılarak ticari üretimi yapılmaktadır (91). *In vivo* (92) ve *in vitro* (93) çalışmalarda, yüksek astaksantin üretimi için yüksek düzeyde oksijen ve C/N oranının yüksek olması gerekmektedir (81).

Astaksantin üreten mikroorganizmalar arasında ticari öneme sahip bir diğer aday *Xanthophyllomyces dendrorhous*' tur. An ve arkadaşlarının (94) yaptığı optimizasyon çalışmaları sonucunda astaksantin üretimi 8.1 mg/L olarak saptanmıştır. Farklı çalışmalardan elde edilen bilgiler ise, bir kırmızı maya olan *Xanthophyllomyces dendrorhous*' un, astaksantin ve zeaksantin gibi ana karotenoidleri sentezledikleri yönündedir (95, 96), bu mayanın fermentasyon sürecindeki en büyük dezavantajı, hayvan yemlerine ilave edilmeden önce hücre duvarının bozulmamasıdır. Hücre duvarının bozulması için bazı kimyasal, fiziksel, otolitik ve enzimatik metotlar uygulanmasına rağmen mayalardan astaksantin üretimi ekonomik açıdan uygun bulunmamıştır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda hem fermentasyon teknolojisinde (97) hem de patent çalışmalarında (AB-20030049241) ilerlemeler kaydedilmiştir (98). *Agrobacterium auranticum*' dan astaksantin üretimi üzerine çalışmalar az iken (21), *Xanthophyllomyces dendrorhous*' a yönelik araştırmalar daha fazladır. Bundan başka *Paracoccus carotinifaciens* (99) veya *Halobacterium salinarium* (100) gibi astaksantin üreten yeni organizmaların izolasyonu ve astaksantin yeni biyolojik kaynaklarının karakterizasyonu üzerine araştırmalar bulunmaktadır.

Kantaksantin

Kantaksantin *Haematococcus lacustris*' den ticari olarak elde edilen, sarı-turuncu rengi veren, AB düzenlemesine göre gıda katkı maddesi olarak değerlendirilmemiş bir pigmenttir. Tuz stresi altında vitamin A' ya dönüşmektedir. Kümes hayvanlarına sarımsı renk tonunu vermek için, kozmetikte, balık ve et ürünleri, meyve ürünleri, içecekler, çerez, bira ve şarap gibi gıda ürünlerinde kullanılmaktadır (Tablo 11). β -karotene göre ışıktan daha az etkilenmektedir (101). *Bradyrhizobium* sp. yapısında bir kantaksantin tanımlanmış olup gen dizisi tamamen saptanmıştır (23). Bu ketokarotenoid aynı zamanda, *Halobacterium* genusuna ait olan, tuz çiftliklerinden elde edilen ekstrem halofilik bakterilerde de bulunmaktadır (102). İsoeniraten ve hidroksil türevleri

Mycobacterium aurum, *Streptomyces mediolani* ya da *Brevibacterium linens*' ten üretilmiştir (103, 104). Bunlar arasında *B. linens*, yumuşak peynir yapımında peynirlerin dış yüzeyini kaplayan kırmızı tabaka halinde bulunmaktadır (105). Kantaksantin gıdalarda kullanımına izin verilen en yüksek miktarı jel ve marmelat gibi ürünlerde 200 mg/kg iken en düşük kullanım miktarı alkol, karbonatlanmış ve karbonatlanmamış su temelli içeceklerde 5 mg/kg' dır (106)

N-Heterosiklik Bileşikler

Bu gruba giren pigmentler; pürinler, pterinler, flavinler, fenazinler ve fenoksalinlerdir.

Flavinler

Bitki ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenen, yaygın bir bileşiktir. Bu grubun ana bileşiği **riboflavindir**. Bu bileşikler, pteridin ve benzen halkalarından oluşmaktadır (107, 3). Riboflavin, gıdalarda sarı renklendirici olarak uygulanan çoğu ülkede kullanımına izin verilen bir renklendiricidir. Uygulama alanını soslar, şerbet, içecekler, çabuk ve kolay hazırlanabilen tatlılar, dondurma oluşturmaktadır.

Riboflavin daha çok fungus ve mayalarda bulunmaktadır. *Candida flaveri*, *Candida guilliermondii*, *Debaromyces subglobosus*, *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces* ve *Torulopsis xylinus* türleri patentli olarak kullanılmaktadır. Riboflavini fermentasyon yoluyla üreten çok sayıda mikroorganizma vardır (108). Riboflavini fermentasyon yolu ile üreten mikroorganizmalar 3 katagoride toplanmıştır,

- zayıf üreticiler (100 mg/L ya da daha az; *Clostridium acetobutylicum*),
- orta üreticiler (600 mg/L' ye kadar; *Candida flaveri*, *Candida guilliermondii*, *Debaromyces subglobosus*),
- güçlü üreticiler (1 g/L üzerinde; *Eremothecium ashbyii*, *Ashbya gossypii*, *Candida flaveri*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*) 98).

Riboflavin, gıdalarda renklendirici olarak uygulanmasına izin verilmesine rağmen yine de gıdalara katkı miktarı sınırlı tutulmaktadır. Riboflavinin gıdalarda kullanımına izin verilen en yüksek miktarı patates gibi nışaşa temelli ürünlerde 1000 mg/kg kadarken en düşük kullanım miktarı aromatlama alkollü içeceklerde 100 mg/kg kadardır (109).

Melaninler

Melaninler, fenolik veya indolik monomerlerin farklı polimerizasyonu sonucunda oluşan pigmentlerdir. Genellikle protein ve karbonhidratlarla kompleks oluşturan siyah, gri, kahverengi renkleri veren makromoleküllerdir. Melaninler yapısal olarak su ya da organik solventlerde

çözünmezler ve kıvamsız yapıdadırlar. Melaninlerin fonksiyonları arasında serbest radikalleri temizlemek ve nötralize etmek, buna bağlı olarak da hücreyi UV ve elektrik ışınlarının zararlı etkilerinden korumaktır (110). Çernobil'den sonra radyoaktiflerle kirlenmiş topraklarda yapılan araştırma sonucunda mikrobiyal komunitenin, melanin üreten türlere doğru kaydığı belirlenmiştir. İnsanlarda bulunan melanin ise, güneş ışığına karşı koruyucu etkisinin yanında bağışık yanıtta da önemlidir (111). Melaninlere bağlanabilen metaller organizma için toksikse, melaninin hücreye girişi engellenebilmektedir. *Azotobacter salinestris*'in melaninlerinin, hücreyi oksidatif hasardan korumak için demir tuzağı gibi hareket ettiği ileri sürülmüştür. Organizma için önemli olan metallerin az bulunduğu bir ortamda, bu metaller melaninlerle kompleks oluşturarak hücreye alınabilir (112).

Allomelaninler tohum, spor ve funguslarda birikmektedir. Mikrobiyal melaninler, bir dizi monomerden oluşmaktadır (110, 111). Mantarlar stres koşullarına karşı kendilerini korumak için melanin üretmektedirler. *Cochliobolus sativus* fungusunun konidialarının hücre duvarında bulunan melaninler sayesinde, doğal toprak lizisi ve litik enzimlere karşı hücreyi koruduğu saptanmıştır. Melaninler aynı zamanda ekstrem sıcaklıklara karşı da koruma sağlamaktadır; örneğin *Streptomyces galvus* yalnızca yüksek sıcaklıklarda melanin üretmektedir (42-47 C) (113).

ANKA pigmenti

Gıda bileşeni olarak kullanılan 'Anka' adındaki kırmızı renklendiricinin üretimi, Asya ülkelerinde katı ortamda geliştirilen *Monascus*' tan yapılmaktadır. Kırmızı pirinç küfü, gıda renklendirici veya pirinç yemeklerinde baharat olarak kullanılmaktadır. Mor bir küf olan *Monascus ruber*, ilk olarak patates ve keten tohumundan izole edilmiştir. İkinci suş Java ve Endonezya piyasalarından elde edilen, küflü kırmızı pirinçten izole edilen *Monascus purpureus* suşudur. Günümüzde Japonya, ABD, Fransa ve Almanya'da *Monascus* pigmentlerinin gıdalarda kullanımına ilişkin 50' den fazla patent tanzim edilmiştir (114). Gıdalardaki uygulama alanları arasında işlenmiş etin renklendirilmesi, balık ezmesi gibi deniz ürünleri, surimi (Japonya'da kıyılmış balık, et) ve keçap üretimi yer almaktadır (17).

Monascus fungusunda ankaflavin ve monaskin (sarı), rubropunktatin ve monaskorubrin (turuncu), rubropunktamin ve monaskorubramin (mor) pigmentleri bulunmaktadır (17). Pigmentlerin kararlılıkları asitlik, sıcaklık, ışık, oksijen, su aktivitesi ve zamandan etkilenir. Pigmentler genellikle hücreye bağlı durumda üretilmekte ve suda çözünürlüğü düşük, pH 2-10 aralığında kararsız, ısıya karşı hassas, ışıkta ise rengini kaybetmektedir (115).

Kırmızı ya da sarı pigmentlerin ticari üretimi için *Monascus*' un birkaç suşu kullanılmaktadır. Çin ve Japonya'da substrat olarak pirincin kullanılmasıyla *Monascus* fermentasyonunun eksiksiz gerçekleştiği bilinmektedir. Yoğurt ve diğer gıdaların renklendirilmesinde de kullanılmaktadır (115).

Arpink Red

Gıda ve kozmetik endüstrisinde uygulanan, yeni fungal suşlar tarafından üretilen kırmızı renklendirici bileşiklerine Çek Cumhuriyeti Ascolor Biotech tarafından patent verilmiştir. Toprakta elde edilen *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* CCM 8242 suşu, antrakuinon tipte bir kromofor üretmektedir. Aynı türlerin benzer suşları biyolojik kontrol ajanı olarak etki göstermektedir; örneğin *Fusarium*, sera ve

tarla koşulları altında domatesin solma sıklığını azaltmaktadır. Arpink Red' in et ürünleri ve alkolsüz içeceklerde 100 mg/kg, süt ürünleri içeren dondurma kremasında 150 mg/kg, ve şekerlemelerde 300 mg/kg olarak kullanılması önerilmektedir (18).

Bu kırmızı pigmente yönelik çok sayıda toksikolojik çalışma mevcuttur. Arpink Red' e 2001 yılında, anti-kanser etkileri nedeniyle gıda ve ilaç yapımındaki uygulamalarına yönelik yeni bir patent verilmiştir (116). Codex Alimentarius Commission tarafından Arpink Red' in kırmızı renklendirici olarak kullanımında herhangi bir engel bulunmadığı rapor edilmiştir (117).

KAYNAKLAR

- 1) Clydesdale FM. Color as a factor in food choice. Crit. Rev. Food Sci. Nutr 1993; 33: 83-101.
- 2) Stich E, Chaundry Y, Schnitter C. Colour, you eat with your eyes. Int. Food Inged 2002; 1: 6-8.
- 3) Hari RK, Patel TR, Martin AM. An overview of pigment production in biological systems: functions, biosynthesis, and applications in food industry. Food Reviews International 1994; 10: 49-70.
- 4) Lewis PA. 1988. Introductory notes, in Pigment Handbook, Vol. 1. P.A. Lewis, Ed. John Wiley & Sons, New York, p. 1.
- 5) Billmeyer FW and Saltzman M. 1981. Principles of Color Technology. 2nd Edition. John Wiley & Sons, New York. pp.62FDA/IFIC. 1993. Regulation of color additives, Food and Drug Administration. FDA/IFIC Brochure.
- 6) Dufosse L. 2004. Pigments in Food, More than Colours. Université de Bretagne Occidentale Publ. Quimper, France.
- 7) Wissgott U, Bortlik K. Prospects for new natural food colorants, Trends Food Sci. Technol 1996; 7:298-302.
- 8) Delgado-Vargas F and Paredes-López O, 2002. Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses.
- 9) Delgado-Vargas F and Paredes-López O, 2002. Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses. CRC Press. Boca
- 10) Raton. pp.342. Bridle P, Timberlake CF. Anthocyanins as natural food colourselected aspects. Food Chem 1997; 58: 103-109.
- 11) Bhosale P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol 2004; 63: 351-361.
- 12) Joshi V K, Devender A, Anju B and Shashi B. 2003. Microbial Pigment. Indian Journal of Biotechnology, Vol. 2, pp. 362-369.
- 13) Downham A, Collins P. Colouring our foods in the last and next millennium, Int. J. Food Sci. Technol 2000; 35: 5-22.
- 14) Kim SW, Seo WT, Park YH. Enhanced production of β -carotene from *Blakeslea trispora* with span 20. Biotechnol. Lett 1997; 19: 561-562.
- 15) Liu GY, Nizet V. Color me bad: microbial pigments as virulence 418 factors. Trends Microbiol 2009; 17(9): 406-13.
- 16) Blanc PJ, Loret MO, Santerre AL, Pareilleux A, Prome D, Prome JC, Laussac JP, Goma G. Pigments of *Monascus*. J. Food Sci 1994; 59: 862-865.
- 17) Sardaryan E, Zihlova H, Strnad R, Cermakova Z. 2004. Arpink Red – Meet a New Natural Red Food Colorant of Microbial Origin. In: Pigments in Food, More

than Colours... (ed. Dufossé L), pp. 207–208, Université de Bretagne Occidentale Publ., Quimper, France.

18) Sardaryan E, Zihlova H, Strnad R, Cermakova Z. 2004. Arpink Red – Meet a New Natural Red Food Colorant of

19) Microbial Origin. In: Pigments in Food, More than Colours. (ed. Dufossé L), pp. 207–208, Université de Bretagne

20) Occidentale Publ., Quimper, France. Flores-Cotera LB, Sanchez S. Copper but not iron limitation increases astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in a chemically defined medium. *Biotechnol Lett* 2001; 23:793–797.

21) Yokoyama A, Izumida H, Miki W. Production of astaxanthin and 4-ketozeaxanthin by the marine bacterium, *Agrobacterium aurantiacum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1994; 58: 1842–1844.

22) Tsubokura A, Yoneda H, Mizuta H. *Paracoccus carotinifaciens* sp. nov., a new aerobic Gram-negative astaxanthin-producing bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49: 277–282.

23) Hannibal L, Lorquin J, D’Ortoli NA, Garcia N, Chaintreuil C, Masson-Boivin C, Dreyfus B, Giraud E. Isolation and characterization of canthaxanthin biosynthesis genes from the photosynthetic bacterium *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278. *J Bacteriol* 2000; 182: 3850–3853.

24) Application for the approval of lycopene from *Blakeslea trispora*, under the EC regulation No 258/97 of the European

25) Parliament. 2003. Vitatene Inc. <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/lycopene.pdf> Jones JD, Hohn TM, Leathers TD. 2004. Genetically Modified Strains of *Fusarium sporotrichioides* for Production of Lycopene and β -Carotene, Society of Industrial Microbiology Annual Meeting, p. 91. San Diego, USA.

26) Vinarov A, Robucheva Z, Sidorenko T, Dirina E. Microbial biosynthesis and making of pigment melanin. *Commun Agric Appl Biol Sci* 2003; 68: 325–326.

27) Unagul P, Wongsap P, Kittakoop P, Intamas S, Srikitikulchai P, Tanticharoen M. Production of red pigments by the insect pathogenic fungus *Cordyceps unilateralis* BCC 1869. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2005; 32: 135–140.

28) Santos MA, Mateos L, Stahmann KP, Revuelta JL. 2005. Insertional Mutagenesis in the Vitamin B2 Producer Fungus *Ashbya gossypii*. In: *Methods in Biotechnology: Microbial Processes and Products* (ed. Barredo JL), Vol. 18, pp. 283–300. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA.

29) Iacobucci GA, Sweeney LG. 1981. Process for enhancing the sunlight stability of rubrolone. US patent 4,285,985.

30) Sakaki H, Nakanishi T, Satonaka KY, Miki W, Fujita T, Komemushi S. Properties of a high-torularhodin mutant of *Rhodotorula glutinis* cultivated under oxidative stress. *J Biosci Bioeng* 2000; 89: 203–205.

31) Shepherd D, Dasek J, Suzanne M, Carels C. 1976. Production of zeaxanthin. US patent 3,951,743.

32) Hümbelin M, Thomas A, Lin J, Jore J, Berry A. Genetics of isoprenoid biosynthesis in *Paracoccus zeaxanthinifaciens*. *Gene* 2002; 297: 129–139.

33) Lampila LE, Wallen SE, Bullerman LB. A review of factors affecting biosynthesis of carotenoids by the order Mucorales. *Mycopathologia* 1985; 90: 65–80.

34) Iturriaga EA, Papp T, Breum J, Arnau J, Eslava AP. Strain and Culture Conditions Improvement for b-

Carotene Production with *Mucor*. In: *Methods in Biotechnology: Microbial Processes and Products, Vol. 18*, J.L. Barredo (Ed.), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA (2005) pp. 239–256.

35) Hausmann A, Sandmann G. A single five-step desaturase is involved in the carotenoid biosynthesis pathway to b-carotene and torulene in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 2000; 30: 147–153.

36) Cerdá-Olmedo E. *Phycomyces* and the biology of light and color. *FEMS Microbiol Rev* 2001; 25: 503–512.

37) Watanabe H. 1974. Pigment red W59. Japanese patent. 74,093, 587.

38) Cho YJ, Hwang HJ, Kim SW, Song CH, Yun JW. Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor. *J Biotechnol* 2002; 95: 13–23.

39) Gurpreet KC, Balmeet SG. Production and Characterization of Microbial Carotenoids as an Alternative to Synthetic Colors: a Review. *International Journal of Food Properties* 2011; 14: 503–513.

40) Del Campo JA, Moreno J, Rodriguez H, Angeles Vargas M, Rivas J, Guerrero MG. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *J Biotechnol* 1999; 76: 51–59.

41) Govind NS, Amin AR, Modi VV. Stimulation of carotenogenesis in *Blakeslea trispora* by cupric ions. *Phytochemistry* 1982; 21: 1043–1044.

42) Daraseliya GY, Daushvili LP. Effect of various carbon sources on the growth and carotenogenesis of *Mycobacterium rubrum* strain 44. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 1982; 18: 191–196.

43) Guedes AC, Amaro HM, Malcata FX. Microalgae as Sources of Carotenoids. *Marine Drugs* 2011; 9: 625–644.

44) García-González M, Moreno J, Manzano JC, Florêncio FJ, Guerrero MG. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-*cis*- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *J Biotechnol* 2005; 115: 81–90.

45) del Campo JA, Moreno J, Rodriguez H, Vargas MA, Rivas J, Guerrero MG. Lutein production by *Muriellopsis* sp. in an outdoor tubular photobioreactor. *J Biotechnol* 2001; 85: 289–295.

46) Kleinegris DMM, Janssen M, Brandenburg WA, Wijffels RH. Continuous production of carotenoids from *Dunaliella salina*. *Enzyme Microb Technol* 2011; 48: 253–259.

47) Sánchez JF, Fernández JM, Ación FG, Rueda A, Pérez-Parra J, Molina E. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. *Proc Biochem* 2008; 43: 398–405.

48) Fernández-Sevilla JM, Ación-Fernández FG, Molina-Grima E. Biotechnological production of lutein and its applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 86: 27–40.

49) Wei D, Chen F, Chen G, Zhang XW, Liu LJ, Zhang H. Enhanced production of lutein in heterotrophic *Chlorella protothecoides* by oxidative stress. *Sci China Ser C Life Sci* 2008; 51: 1088–1093.

50) Ip PF, Chen F. Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. *Process Biochem* 2005; 40: 733–738.

- 51) Olaizola M. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photo-bioreactors. *J Appl Phycol* 2000; 12: 499–506.
- 52) Domínguez-Bocanegra AR, Guerrero LI, Jerónimo FM, Campocoso AT. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Biores Technol* 2004; 92: 209–214.
- 53) Maury J, Asadollahi MA, Moller K, Clark A, Nielsen J. Microbial isoprenoid production: an example of green chemistry through metabolic engineering. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2005; 100: 19–51.
- 54) Soliev AB, Hosokawa K, Enomoto K. 2011. Bioactive Pigments from Marine Bacteria: Applications and Physiological Roles. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 17 pages. 10: 1155-670349.
- 55) Misawa N, Satomi Y, Kondo K. 1995. Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *Journal of Bacteriology*, vol. 177, no. 22, pp. 6575–6584.
- 56) Matz C, Deines P, Boenigk J. 2004. Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no. 3, pp. 1593–1599.
- 57) Yada S, Wang Y, Zou Y. 2008. Isolation and characterization of two groups of novel marine bacteria producing violacein. *Marine Biotechnology*, vol. 10, no. 2, pp. 128–132.
- 58) Hakvag S, Fjærvik E, Klinckenberg G. 2009. Violacein-producing *Collimonas* sp. from the sea surface microlayer of coastal waters in Trøndelag, Norway. *Marine Drugs*, vol. 7, no.4, pp. 576–588.
- 59) Maskey RP, Kock I, Helmke E, Laatsch H. 2003. Isolation and structure determination of phenazostatin, a new phenazine from a marine actinomycete isolate *Pseudonocardia* sp. B6273. *Zeitschrift für Naturforschung*, vol. 58b, no. 7, pp. 692–694.
- 60) Li D, Wang F, Xiao X, Zeng X, Gu QQ, Zhu W. 2007. A new cytotoxic phenazine derivative from a deep sea bacterium *Bacillus* sp.. *Archives of Pharmacol Research*, vol. 30, no. 5, pp. 552–555.
- 61) Ruzafa C, Sanchez-Amat A, Solano F. 1995. Characterization of the melanogenic system in *Vibrio cholerae*, ATCC 14035. *Pigment Cell Research*, vol. 8, no. 3, pp. 147–152.
- 62) Ivanova EP, Kiprianova EA, Mikhailov VV. 1996. Characterization and identification of marine *Alteromonas nigrifaciens* strains and emendation of the description. *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 46, no. 1, pp. 223–228.
- 63) Kahng HY, Chung BS, Lee DH, Jung JS, Park JH, Jeon CO. 2009. *Cellulophaga tyrosinioxidans* sp. nov., a tyrosinase-producing bacterium isolated from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 59, no. 4, pp. 654–657.
- 64) Stevenson CS, Capper EA, Roshak AK. 2002. Scytonemin—a marine natural product inhibitor of kinases key in hyperproliferative inflammatory diseases. *Inflammation Research*, vol. 51, no. 2, pp. 112–114.
- 65) TZ Minerals International. TZMI Database. 1994. [www.tzmi.com]
- 66) The Future of Pigments, 3-5 November, 2009. Hamburg, Germany, 2007.
- 67) Industrial Inorganic Pigments. Edited by G. Buxbaum and G. Pfaff. 2005. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 3-527-30363-4
- 68) Freund PR, Washam CJ, Maggion M. Natural color for use in foods. *Cereal Foods World* 1988; 33: 553-559.
- 69) FNB, 1971. Food Colors. Food and Nutrition Board, National Academy Chattopadhyay et al. 2983 of Sciences,
- 70) Washington, D.C. Houghton JD. 1996. Haems and bilins, in *Natural Food Colorants*, Vol. 1, pp. 157–196. . Hendry GAF and Houghton JD, Eds. Chapman & Hall, New York.
- 71) Christine DL, John BH, Steve LT. The role of natural color additives in food allergy. *Advances in Food and Nutrition*
- 72) Research 2002; 43: 195-216. Henry GAF. 1996. Natural pigments in biology. In: *Natural Food Colorants* (ed. Hendry GAF and Houghton JD), pp. 1–39. Chapman & Hall, New York.
- 73) Delgado-Vargas F, Jiménez AR and Paredes-López O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains — characteristics, biosynthesis, processing and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2000; 40: 173–289.
- 74) Cornejo J, Beale SI. Phycobilin biosynthetic reactions in extracts of cyanobacteria. *Photosynth Res* 1997; 51: 223–230.
- 75) Codex Stan- 260-2007, Codex Standard for Pickled fruits and vegetables.
- 76) Bağdatlıoğlu N, Demirbükür B. Gıda İşlemede Karotenoidlerde Meydana Gelen Gelismeler. *Gıda* 1999; 9: 48-51.
- 77) Anke T. 1997. Strobilurins. In T Anke, *Fungal Biotechnology*, Chapman & Hall, London, p: 206-212.
- 78) Nellis HJ, Leenheer AP. A review: Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *J Appl Bacteriol* 1991; 70: 181-1911.
- 79) Chengwei L, Fangqing Z, Wei W, Zhangxiao W, Song Q. Carotenoid Biosynthesis in Cyanobacteria: Structural and Evolutionary Scenarios Based on Comparative Genomics. *Int J Biol Sci* 2006; 2(4):197-207.
- 80) Barth MM, Zhou C, Kute KM, Rosenthal GA. Determination of optimum conditions for supercritical fluid extraction of carotenoids from carrot (*Daucus carota* L.) tissue. *J Agric Food Chem* 1995; 43: 2876-2878.
- 81) Phillips LG, Cowan AK, Rose PD, Logie MRR. Operation of the xanthophyll cycle in non stressed and stressed cells of *Dunaliella salina* Teod. in response to diurnal changes in incident irradiation: a correlation with intracellular β -carotene content. *J Plant Physiol* 1995; 146: 547-553.
- 82) Mehta BJ, Salgado LM, Bejarano ER, Cerda-Olmedo E. New mutants of *Phycomyces blakesleanus* for β -carotene production. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 3657-3661.
- 83) Ootaki T, Yamazaki Y, Noshita T, Takahashi S. Excess carotenoids disturb prospective cell-to-cell recognition system in mating responses of *Phycomyces blakesleanus*. *Mycoscience* 1996; 37: 427-435.
- 84) Murillo FJ, Calderon IL, Lopez-Diaz I, Cerda-Olmedo E. Carotene-superproducing strains of *Phycomyces*. *Appl Environ Microbiol* 1978; 36: 639-642.
- 85) Velayos A, Lopez-Matas MA, Ruiz-Hidalgo MJ, Eslava AP. Complementation analysis of carotenogenic

- mutants of *Mucor circinelloides*. Fungal Genet Biol 1997; 22: 19–27.
- 86) Navarro E, Lorca-Pascual JM, Quiles-Rosillo MD, Nicolas FE, Garre V, Torres-Martinez S, Ruiz-Vazquez RM. A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. Mol Genet Genom 2001; 266: 463–470.
- 87) Simova ED, Frengova GI, Beshkova DM. Synthesis of carotenoids by *Rhodotorula rubra* GED8 cocultured with yogurt starter cultures in whey ultrafiltrates. J Ind Microbiol Biotechnol 2004; 31: 115–121.
- 88) Codex Stan-263-1996. Codex Standard for cheddar.
- 89) Alcantara S, Sanchez S. Influence of carbon and nitrogen sources on *Flavobacterium* growth and zeaxanthin biosynthesis. J Ind Microbiol Biotechnol 1999; 23: 697–700.
- 90) R&D Chemicals [http://www.rdchemicals.com/chemicals.php?mode=details&mol_id=8352]
- 91) Yuan JP, Gong XD, Chen F. Separation and analysis of carotenoids and chlorophylls in *Haematococcus lacustris* by highperformance liquid chromatography photodiode array detection. J Agric Food Chem 1997; 45: 952-1956.
- 92) Yamane YI, Higashida K, Nakashimada Y, Kakizono T, Nishio N. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis. Appl Environ Microbiol 1997; 63: 4471-4478.
- 93) Chumpolkulwong N, Kakizono T, Ishii H, Nishio N. Enzymatic conversion of β -carotene to astaxanthin by cell extracts
- 94) of a green alga *Haematococcus pluvialis*. Biotechnol Lett 1997; 19: 443-446. An GH, Jang BG, Cho MH. Cultivation of the carotenoid- hyperproducing mutant 2A2N of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) with molasses. J Biosci Bioeng 2001; 92: 121–125.
- 95) Andrews AG, Phaff HG, Starr MP. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigment fermenting yeast. Phytochem 1976; 15: 1003-1007.
- 96) Roy S, Chatterjee S, Sen SK. Biotechnological potential of *Phaffia rhodozyma*. J Appl Biosci 2008; 5: 115-122.
- 97) Fang TJ, Wang JM. Extractibility of astaxanthin in a mixed culture of a carotenoid over-producing mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Bacillus circulans* in two-stage batch fermentation. Process Biochem 2002; 37: 1235–1245.
- 98) Jacobson GK, Jolly SO, Sedmak JJ, Skatrud TJ, Wasileski JM. 2003. Astaxanthin over producing strains of *Phaffia rhodozyma*, methods for their cultivation and their use in animal feeds. US patent 20030049241.
- 99) Tsubokura A, Yoneda H, Mizuta H. *Paracoccus carotinifaciens* sp. nov. a new aerobic Gram-negative astaxanthin-producing bacterium. Int J Syst Bacteriol 1999; 49: 277–282.
- 100) Calo P, Miguel TD, Sieiro C, Velazquez JB, Villa TG. Ketocarotenoids in halobacteria: 3-hydroxy-echinenone and trans-astaxanthin. J Appl Bacteriol 1995; 79: 282–285.
- 101) Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. FEBS Lett 1996; 384:240-242.
- 102) Asker D, Ohta Y. Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria. J Biosci Bioeng 1999; 88: 617-621.
- 103) Guyomarc'h F, Binet A, Dufossé L. Production of carotenoids by *Brevibacterium linens*: Variation among strains, kinetic aspects and HPLC profiles. J Ind Microbiol Biotechnol 2000; 24: 64–70.
- 104) Dufossé L, de Echanove MC. The last step in the biosynthesis of aryl carotenoids in the cheese ripening bacteria *Brevibacterium linens* ATCC 9175 (*Brevibacterium aurantiacum* sp. nov.) involves a cytochrome P450-dependent monooxygenase. Food Res Int 2005; 38: 967–973.
- 105) Galaup P, Flamin C, Carlet E, Dufossé L. HPLC analysis of the pigments produced by the microflora isolated from the 'Protected Designation of Origin' French red-smear soft cheeses Munster, Epoisses, Reblochon and Livarot. Food Res Int 2005; 38: 855–860.
- 106) Codex Stan-262-2006. Codex Standard for mozzarella.
- 107) Counsell JN, Jeffries GS and Knewstubb CJ. 1979. Some other natural colors and their applications, in Natural Colors for Foods and Other Uses (ed. Counsell JN, Dunastable JS), pp. 122–151. Applied Science, London.
- 108) Stahmann KP, Revuelta JL, Seulberger H. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. Appl Microbiol Biotechnol 2000; 53: 509-516.
- 109) Codex Stan- 243-2003, Revision 2008, 2010 Codex Standard for fermented milks.
- 110) Thomson RH. 1962. Quinones: structure and distribution. In: Comparative Biochemistry (ed. Florkin M and Mason HS), Vol. III: Constituents of Life, Part A, pp. 631–725. Academic Press, New York.
- 111) Butler MJ and Day AW. Fungal melanins: a review. Canadian Journal of Microbiology 1998; 44: 1115–1136.
- 112) Takano Y, Kubo Y, Kawamura C, Tsuge T and Furusawa I. The *Alternaria alternata* melanin biosynthesis gene restores appressorial melanization and penetration of cellulose membranes in the melanin-deficient albino mutant of *Colletotrichum lagenarium*. Fungal Genetics and Biology 1997; 21: 131–140.
- 113) Bell AA, Wheeler MH. Biosynthesis and functions of fungal melanins. Annual Review of Plant Physiology 1986; 24: 411–451.
- 114) Hajjaj H, Blanc PJ, Groussac E, Goma G, Uribelarrea JL, Loubiere P. Improvement of red pigment/citrinin production ratio as a function of environmental conditions by *Monascus ruber*. Biotechnol Bioeng 1999; 64: 497–501.
- 115) Fabre CE, Santerre AL, Loret MO, Baberian R, Pareilleux A, Goma G, Blanc PJ. Production and food applications of
- 116) the red pigments of *Monascus ruber*. J Food Sci 1993; 58: 1099–1102. Sardaryan E. 2002. Food supplement. Patent WO 02/1153
- 117) Joint Fao/Who Food Standards Programme Codex Committee On Food Additives And Contaminants, Thirty-Fourth Session Rotterdam, The Netherlands, 11-15 March 2002, CX/FAC 02/30.