

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ENDÜSTRİYEL AÇIDAN ÖNEMLİ OLAN KAROTENOİD ÜRETİCİSİ
EXIGUOBACTERIUM CİNSİ BAKTERİLERİN GELİŞİMLERİNİN VE
PİGMENT ÜRETİMLERİNİN OPTİMİZASYONU

Gaye Ekin GÜRSOY ÇALIŞ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2021

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ENDÜSTRİYEL AÇIDAN ÖNEMLİ OLAN KAROTENOİD ÜRETİCİSİ *EXIGUOBACTERIUM* CİNSİ BAKTERİLERİN GELİŞİMLERİNİN VE PİGMENT ÜRETİMLERİNİN OPTİMİZASYONU

Gaye Ekin GÜRSOY ÇALIŞ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN

Karotenoidler, güçlü antioksidan aktiviteleri ve provitamin A öncülü olmaları sebebiyle yaşlanma, kanser, katarakt, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi pek çok hastalığa karşı koruyucu olacak şekilde tıp, besin takviyesi ve renklendirici olarak gıda, UV hasarına karşı fotokoruyucu etkisiyle kozmetik sektörü ile hayvan yem sanayiinde sıklıkla kullanılan ve yüksek ticari potansiyele sahip pigment grupları arasındadır. Yürütülen yüksek lisans tez çalışması kapsamında, *Exiguobacterium* cinsine ait beş bakterinin mikrobiyal gelişimlerinin optimizasyonu ve ikincil bir metabolit olarak ürettikleri turuncu renkli karotenoid pigmentlerin genel özellikleri çalışılmıştır. APT 13a, APT 14, APT 20b, APT 34 ve APT 44 izolatları için birer endüstriyel atık olan melas ve peynir altı suyu tozu (whey) içeren besiyerlerinin ideal konsantrasyonları, ihtiyaç duydukları pH ve sıcaklık koşulları belirlenmiştir. İdeal koşullarda geliştirilen izolatlardan ekstrakte edilen pigment içeriklerinin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilmiştir. APT 14 ve APT 20b izolatlarına ait pigment özütlerinin antioksidan aktivite sergilediği, APT 13a, APT 34 ve APT 44 özütlerinin ise muhtemel provitamin A öncülü olabilme potansiyelleri belirlenmiştir. Ayrıca, APT 13a, APT 14 ve APT 44 izolatlarından elde edilen pigment içeriklerinin; çeşitli tavuk ve insan patojeni mikroorganizmaların gelişimini de inhibe ettikleri saptanmıştır. Sonuç olarak, doğal karotenoid pigment üreticisi bu bakterilerin mikrobiyal gelişimleri, pigment üretimleri ile pigmentlerinin antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri aydınlatılarak, bundan sonraki çalışmalara ışık tutacak şekilde olası kullanım alanlarına dair çeşitli biyolojik etkinlikleri tespit edilmeye çalışılmıştır.

Haziran 2021, 116 sayfa

Anahtar Kelimeler: Karotenoid, antioksidan, antimikrobiyal, gelişim, pigment, optimizasyon

ABSTRACT

Master Thesis

OPTIMIZATION OF GROWTH AND PIGMENT PRODUCTION IN INDUSTRIALLY IMPORTANT CAROTENOID PIGMENT PRODUCING BACTERIA FROM GENUS *EXIGUOBACTERIUM*

Gaye Ekin GÜRSOY ÇALIŞ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN

Due to their strong antioxidant activities and provitamin A precursors, carotenoids are widely used in medicine, nutritional supplements and colorants in food, cosmetics industry and animal feed industry with their photoprotective effect against UV damage, to be protective against many diseases such as aging, cancer, cataracts, cardiovascular and neurodegenerative diseases. It is among the pigment groups that are used and have high commercial potential. Within the scope of the master thesis study, the optimization of microbial growth of five bacteria belonging to the genus *Exiguobacterium* and the general properties of the orange carotenoid pigments produced as a secondary metabolite were studied. For APT 13a, APT 14, APT 20b, APT 34 and APT 44 isolates, ideal concentrations, required pH and temperature conditions of media containing molasses and whey powder, which are industrial wastes, were determined. Antioxidant and antimicrobial activities of pigment contents extracted from isolates grown under ideal conditions were evaluated. Pigment extracts of APT 14 and APT 20b isolates exhibited antioxidant activity, while APT 13a, APT 34 and APT 44 extracts have potential to be provitamin A precursors. In addition, the pigment contents obtained from APT 13a, APT 14 and APT 44 isolates; It has been determined that they inhibit the growth of various chicken and human pathogenic microorganisms. As a result, the microbial development, pigment production, antioxidant and antimicrobial properties of these natural carotenoid pigment producing bacteria were elucidated, and some of their biological activities on possible usage areas were tried to be determined in a way to shed light on future studies.

June 2021, 116 pages

Key words: Carotenoid, antioxidant, antimicrobial, growth, pigment, optimization

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana her zaman yol gösteren, değerli bilgi ve tecrübelerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, tüm zorluklarda büyük bir sabırla yanımda duran, bana yalnızca akademik bilgi, tecrübe ve çalışma disiplini değil, hayata dair pek çok şey katan, hayatımın önemli dönüm noktalarında her daim destekçim ve şansım olarak yer alan, benim için bir danışmanın ötesinde olan saygıdeğer ve kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Bu süreçte benden desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, saygıdeğer hocam Doç. Dr. Fadime KIRAN'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Yüksek lisans sürecim boyunca gereksinim duyduğum her anda akademik bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, sabır ve güler yüzüyle bu süreçteki en büyük destekçilerimden birisi olan, kendisini tanıdığım için kendimi çok şanslı saydığım saygıdeğer ve kıymetli hocam Araş. Gör. Dr. Başar KARACA'ya (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Laboratuvarlarında çalışma fırsatı bulduğum, enzim aktivitesi deneyleri sürecinde benden tecrübelerini, kıymetli zamanlarını ve emeklerini eksik etmeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Özlem YILDIRIM'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı) ve çok kıymetli yol göstericim Öğr. Gör. Okan ONAR'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Tez çalışmalarım boyunca bana yardım eden, emeklerini ve desteklerini asla esirgemeyen çok sevgili çalışma arkadaşlarım Ayşe Büşra KARAKAYA'ya, Seçil SARAN OKTAŞ'a ve Hikmet CAN'a,

Bu yola çıkmaya karar verdiğim ilk andan itibaren beni destekleyen, kendi akademik tecrübeleri ile bana yol gösteren, hayatım boyunca her türlü zorlukta yanımda olan, benim için her türlü fedakarlığı yapan biricik babama, varlığını her an hissettiğim, hayat ışığım anneme ve bana sabırla destek olan yol arkadaşım, sevgili eşim Mert ÇALIŞ'a

Sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Gaye Ekin GÜRSOY ÇALIŞ
Ankara, Haziran 2021

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI

ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1.GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Karotenoid Pigmentlerin Genel Özellikleri, Çeşitleri, Fonksiyonları ve Kullanım Alanları.....	4
2.1.1 Karotenoid pigmentlerin genel ve kimyasal özellikleri	4
2.1.2 Karotenoid pigmentlerin sınıflandırılması	5
2.1.3 Karotenoid pigmentlerin kaynakları	8
2.1.3.1 Bitkisel pigmentler	8
2.1.3.2 Hayvansal pigmentler	8
2.1.3.3 Ökaryotik mikroorganizmalardaki ve mikroalglerdeki pigmentler	9
2.1.3.4 Arkeler ve fotosentetik olmayan bakterilerdeki pigmentler	10
2.1.3.5 Fotosentetik bakterilerdeki pigmentler.....	10
2.1.4 Karotenoid pigmentlerin en yaygın çeşitleri.....	11
2.1.4.1 β -karoten	11
2.1.4.2 Likopen	11
2.1.4.3 Astaksantin	12
2.1.4.4 Lutein ve zeaksantin	13
2.1.5 Karotenoid pigmentlerin canlı sistemlerdeki fonksiyonları yaygın kullanım alanları.....	13
2.1.5.1 Karotenoid pigmentlerin gıda endüstrisinde kullanımı	14
2.1.5.2 Karotenoid pigmentlerin hastalık önleme ve insan sağlığı alanlarında kullanımı	15
2.2 Karotenoid Üreticisi <i>Exiguobacterium</i> Cinsi Bakteriler.....	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18

3.1 Materyal	18
3.1.1 Tez kapsamında kullanılan bakteri kültürleri ve gelişme koşulları.....	18
3.1.2 Besiyerleri, çözeltiler ve tampon içerikleri	19
3.2 Yöntem	27
3.2.1 Bakteri kültürlerinin aktifleştirilmesi	27
3.2.2 En ideal mikrobiyal gelişim gözlenen üretim koşullarının seçimi	27
3.2.2.1 Bakterilerin bazı endüstriyel atıkların varlığında gelişimlerinin optimizasyonu	27
3.2.2.2 Bakterilerin ideal konsantrasyonlardaki endüstriyel atıklar varlığında optimal pH isteklerinin belirlenmesi	30
3.2.2.3 Bakterilerin ideal konsantrasyonlardaki endüstriyel atıklar varlığında optimal sıcaklık isteklerinin belirlenmesi	31
3.2.3 Nihai üretim koşulları belirlenen bakterilerde pigment üretiminin optimizasyonu ve bakterilerden karotenoid pigmentlerin ekstraksiyonu ...	32
3.2.3.1 Turuncu pigment üreticisi <i>Exiguobacterium</i> cinsi bakterilerin pigment üretimlerinin optimizasyonu	32
3.2.3.2 Bakterilerden karotenoid pigmentlerin ekstraksiyonu	32
3.2.4 Ekstrakte edilen karotenoid pigmentlerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi	33
3.2.4.1 Ekstrakte edilen pigmentlerin katalaz (CAT) enzim aktivitesine etkilerinin analizi.....	34
3.2.4.2 Ekstrakte edilen pigmentlerin glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesine etkilerinin analizi	35
3.2.4.3 Ekstrakte edilen pigmentlerin Glutatyon-S-Transferaz (GST) enzim aktivitesine etkilerinin analizi	36
3.2.4.4 Ekstrakte edilen pigmentlerin süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesine etkilerinin analizi	37
3.2.5 Ekstrakte edilen karotenoid pigmentlerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi	38
3.2.6 İstatistiksel analizler	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	40
4.1 <i>Exiguobacterium</i> Cinsi Beş Bakteri İçin En İdeal Mikrobiyal Gelişimin Gözlemlendiği Üretim Koşullarının Seçimi	40
4.1.1 <i>Exiguobacterium</i> cinsi bakterilerin peynir altı suyu ve melas gibi endüstriyel atıkların varlığında gelişimlerinin optimizasyonu.....	40
4.1.2 Seçilen en etkili ve ekonomik konsantrasyonlardaki peynir altı suyu ve melasın ikili kombinasyonlarının mikrobiyal gelişime katkıları.....	50

4.1.3 İdeal konsantrasyonlardaki endüstriyel atıklar varlığında bakterilerin gelişimleri üzerine çeşitli potasyum ve magnezyum tuzlarının etkisinin belirlenmesi	55
4.1.4 En ideal mikrobiyal gelişim gözlenen pH değerinin belirlenmesi	60
4.1.5 En ideal mikrobiyal gelişim gözlenen sıcaklık değerinin belirlenmesi.....	64
4.2 <i>Exiguobacterium</i> Cinsi 5 Bakterinin Pigment Üretimlerinin Karıştırma ve Işığa Bağlı Optimizasyonu ve Bakterilerden Karotenoid Pigmentlerin Ekstraksiyonu.....	70
4.2.1 <i>Exiguobacterium</i> cinsi bakterilerin karıştırma ve ışığa bağlı pigment üretimlerinin optimizasyonu.....	70
4.2.2 <i>Exiguobacterium</i> cinsi bakterilerden karotenoid pigmentlerin ekstraksiyonu	75
4.3 Ekstrakte Edilen Karotenoid Pigmentlerin Antioksidan Aktiviteleri	77
4.3.1 Katalaz (CAT) aktivitesi sonuçlar	78
4.3.2 Glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesi sonuçlar	83
4.3.3 Glutasyon-s-transferaz (GST) aktivitesi sonuçlar.....	88
4.3.4 Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi sonuçlar.....	93
4.4 Ekstrakte Edilen Karotenoid Pigmentlerin Antimikrobiyal Etkinlikleri.....	100
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	102
KAYNAKLAR	109
ÖZGEÇMİŞ.....	116

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
mm	Milimetre
g	Gram
mg	Miligram
mM	Milimolar
M	Molar
N	Normalite
KH ₂ PO ₄	Potasyum fosfat dibazik
HCl	Hidroklorik asit
HNO ₃	Nitrik asit
KCl	Potasyum klorür
L	Litre
log	Logaritma
MgCl ₂	Magnezyum klorür
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
°C	Derece (Santigrat)

U	Ünite
α	Alfa
β	Beta
v	Hacim
BSA	Sığır serum albümin
dH ₂ O	Distile su
EtOH	Etanol
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
t-BOOH	Ter-butıl hidroperoksit
NaN ₃	Sodyum azid
nm	Nanometre

Kısaltmalar

kob	Koloni oluşturan birim
OD	Optik dansite
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
SF	Serum fizyolojik
sp.	species
TSA	Triptik Soy Agar
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
NBT	Nitro blue tetrazolium

NADPH	Nikotinamidadenin dinökleotit fosfat
OD	Optik dansite
ROT	Reaktif oksijen türleri
KAT	Katalaz
SOD	Süperoksit dismutaz
GST	Glutasyon-s-transferaz
GPx	Glutasyon peroksidaz
XOD	Ksantin oksidaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Bakteriyel pigmentlerin kullanım alanları	1
Şekil 2.1 Karotenoid ve ksantofil örnekleri	6
Şekil 2.2 Tüm trans ve cis-izomerik β -karoten formları	8
Şekil 3. 1 a) APT 13a, b) APT 14, c) APT 44 koloni morfolojileri	19
Şekil 4.1 APT 13a izolatının farklı konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu içeren besiyerlerindeki 24 - 48 saatlik mikrobiyal gelişimi ($\log(kob/mL)$)	40
Şekil 4.2 APT 13a izolatının farklı konsantrasyonlarda melas içeren besiyerlerindeki 24 - 48 saatlik mikrobiyal gelişimi ($\log(kob/mL)$)	41
Şekil 4.3 APT 14 izolatının farklı konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu içeren besiyerlerindeki 24 - 48 saatlik mikrobiyal gelişimi ($\log(kob/mL)$)	42
Şekil 4.4 APT 14 izolatının farklı konsantrasyonlarda melas içeren besiyerlerindeki 24 - 48 saatlik mikrobiyal gelişimi ($\log(kob/mL)$)	43
Şekil 4.5 APT 20b izolatının farklı konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu içeren besiyerlerindeki 24 - 48 saatlik mikrobiyal gelişimi ($\log(kob/mL)$)	44
Şekil 4.6 APT 20b izolatının farklı konsantrasyonlarda melas içeren besiyerlerindeki 24 - 48 saatlik mikrobiyal gelişimi ($\log(kob/mL)$)	45
Şekil 4.7 APT 34 izolatının farklı konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu içeren besiyerlerindeki 24 - 48 saatlik mikrobiyal gelişimi ($\log(kob/mL)$)	46
Şekil 4.8 APT 34 izolatının farklı konsantrasyonlarda melas içeren besiyerlerindeki 24 - 48 saatlik mikrobiyal gelişimi ($\log(kob/mL)$)	47
Şekil 4.9 APT 44 izolatının farklı konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu içeren besiyerlerindeki 24 - 48 saatlik mikrobiyal gelişimi ($\log(kob/mL)$)	48
Şekil 4.10 APT 44 izolatının farklı konsantrasyonlarda melas içeren besiyerlerindeki 24 - 48 saatlik mikrobiyal gelişimi ($\log(kob/mL)$)	49
Şekil 4.11 APT 13a izolatı için seçilen konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu ve melas konsantrasyonlarının birlikte denendiği besiyerindeki mikrobiyal gelişimi ($\log(kob/mL)$)	50
Şekil 4.12 APT 14 izolatı için seçilen konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu ve melas konsantrasyonlarının birlikte denendiği besiyerindeki mikrobiyal gelişimi ($\log(kob/mL)$)	51

Şekil 4.13 APT 20b izolatı için seçilen konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu ve melas konsantrasyonlarının birlikte denendiği besiyerindeki mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))	52
Şekil 4.14 APT 34 izolatı için seçilen konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu ve melas konsantrasyonlarının birlikte denendiği besiyerindeki mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))	53
Şekil 4.15 APT 44 izolatı için seçilen konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu ve melas konsantrasyonlarının birlikte denendiği besiyerindeki mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))	54
Şekil 4.16 APT 13a'nın seçilen konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu ve melas konsantrasyonlarının çeşitli potasyum ve magnezyum tuzlarıyla birlikte denendiği besiyerlerindeki mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))	55
Şekil 4.17 APT 14'ün seçilen konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu ve melas konsantrasyonlarının çeşitli potasyum ve magnezyum tuzlarıyla birlikte denendiği besiyerlerindeki mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))	56
Şekil 4.18 APT 20b'nin seçilen konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu ve melas konsantrasyonlarının çeşitli potasyum ve magnezyum tuzlarıyla birlikte denendiği besiyerlerindeki mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))	57
Şekil 4.19 APT 34'ün seçilen konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu ve melas konsantrasyonlarının çeşitli potasyum ve magnezyum tuzlarıyla birlikte denendiği besiyerlerindeki mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))	58
Şekil 4.20 APT 44'ün seçilen konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu ve melas konsantrasyonlarının çeşitli potasyum ve magnezyum tuzlarıyla birlikte denendiği besiyerlerindeki mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))	59
Şekil 4.21 APT 13a izolatının % 1 peynir altı suyu içeren besiyerinde, farklı pH değerlerinde 24 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))	60
Şekil 4.22 APT 14 izolatının % 3 melas (-H ₂ SO ₄) içeren besiyerinde, farklı pH değerlerinde 48 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))	61
Şekil 4.23 APT 20b izolatının % 2 melas (-H ₂ SO ₄) içeren besiyerinde, farklı pH değerlerinde 24 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))	62
Şekil 4.24 APT 34 izolatının % 3 melas (-H ₂ SO ₄) içeren besiyerinde, farklı pH değerlerinde 24 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))	63
Şekil 4.25 APT 44 izolatının % 0,1 peynir altı suyu içeren besiyerinde, farklı pH değerlerinde 24 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))	64

Şekil 4.26 APT 13a izolatının % 1 peynir altı suyu içeren pH 9,0 besiyerinde, farklı sıcaklıklarda 24 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL)).....	65
Şekil 4.27 APT 14 izolatının % 3 melas (-H ₂ SO ₄) içeren pH 8,5 besiyerinde, farklı sıcaklıklarda 48 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL)).....	66
Şekil 4.28 APT 20b izolatının % 2 melas (-H ₂ SO ₄) içeren pH 9,0 besiyerinde, farklı sıcaklıklarda 24 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL)).....	67
Şekil 4.29 APT 34 izolatının % 3 melas (-H ₂ SO ₄) içeren pH 8,0 besiyerinde, farklı sıcaklıklarda 24 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL)).....	68
Şekil 4.30 APT 44 izolatının % 0,1 peynir altı suyu içeren pH 8,0 besiyerinde, farklı sıcaklıklarda 24 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL)).....	69
Şekil 4.31 APT 13a izolatının statik ve dinamik koşullarda, aydınlık ve karanlık ortamlarda 72 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL)).....	70
Şekil 4.32 APT 14 izolatının statik ve dinamik koşullarda, aydınlık ve karanlık ortamlarda 72 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL)).....	71
Şekil 4.33 APT 20b izolatının statik ve dinamik koşullarda, aydınlık ve karanlık ortamlarda 72 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL)).....	72
Şekil 4.34 APT 34 izolatının statik ve dinamik koşullarda, aydınlık ve karanlık ortamlarda 72 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL)).....	73
Şekil 4.35 APT 44 izolatının statik ve dinamik koşullarda, aydınlık ve karanlık ortamlarda 72 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL)).....	74
Şekil 4.36 APT 44 izolatının a) whey besiyerinde geliştirilen erlen kültürü, b) santrifüj sonrası renkli peleti, c) ekstrakte edilen toz formdaki turuncu pigment	75
Şekil 4.37 APT 44 izolatının base-line alınarak yapılan spektrofotometrik tarama, APT 44 izolatının en yüksek pik verdiği dalga boyu 465 nm olarak belirlenmiştir	77
Şekil 4. 38 APT 13a izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	78
Şekil 4.39 APT 13a izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	78
Şekil 4.40 APT 14 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	79
Şekil 4.41 APT 14 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	79

Şekil 4.42 APT 20b izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	80
Şekil 4.43 APT 20b izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	80
Şekil 4.44 APT 34 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	81
Şekil 4.45 APT 34 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	81
Şekil 4.46 APT 44 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	82
Şekil 4.47 APT 44 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	82
Şekil 4.48 APT 13a izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	83
Şekil 4.49 APT 13a izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	83
Şekil 4.50 APT 14 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	84
Şekil 4.51 APT 14 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	84
Şekil 4.52 APT 20b izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	85
Şekil 4.53 APT 20b izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	85
Şekil 4.54 APT 34 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	86
Şekil 4.55 APT 34 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	86
Şekil 4.56 APT 44 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	87
Şekil 4.57 APT 44 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	87

Şekil 4.58 APT 13a izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin glutatyon-s-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	88
Şekil 4.59 APT 13a izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin glutatyon-s-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	88
Şekil 4.60 APT 14 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin glutatyon-s-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	89
Şekil 4.61 APT 14 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin glutatyon-s-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	89
Şekil 4.62 APT 20b izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin glutatyon-s-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	90
Şekil 4.63 APT 20b izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin glutatyon-s-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	90
Şekil 4.64 APT 34 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin glutatyon-s-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	91
Şekil 4.65 APT 34 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin glutatyon-s-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	91
Şekil 4.66 APT 44 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin glutatyon-s-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	92
Şekil 4.67 APT 44 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin glutatyon-s-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	92
Şekil 4.68 APT 13a izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	93
Şekil 4.69 APT 13a izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	93
Şekil 4.70 APT 14 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	94
Şekil 4.71 APT 14 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	94
Şekil 4.72 APT 20b izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	95
Şekil 4.73 APT 20b izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	95

Şekil 4.74 APT 34 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	96
Şekil 4.75 APT 34 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	96
Şekil 4.76 APT 44 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	97
Şekil 4.77 APT 44 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	97
Şekil 4.78 a) Tavuk patojeni <i>E.coli</i> F1 suşu ve b) insan patojeni <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) suşu üzerine metanolde çözülmüş pigment içeriklerinin antagonistik etkileri	100

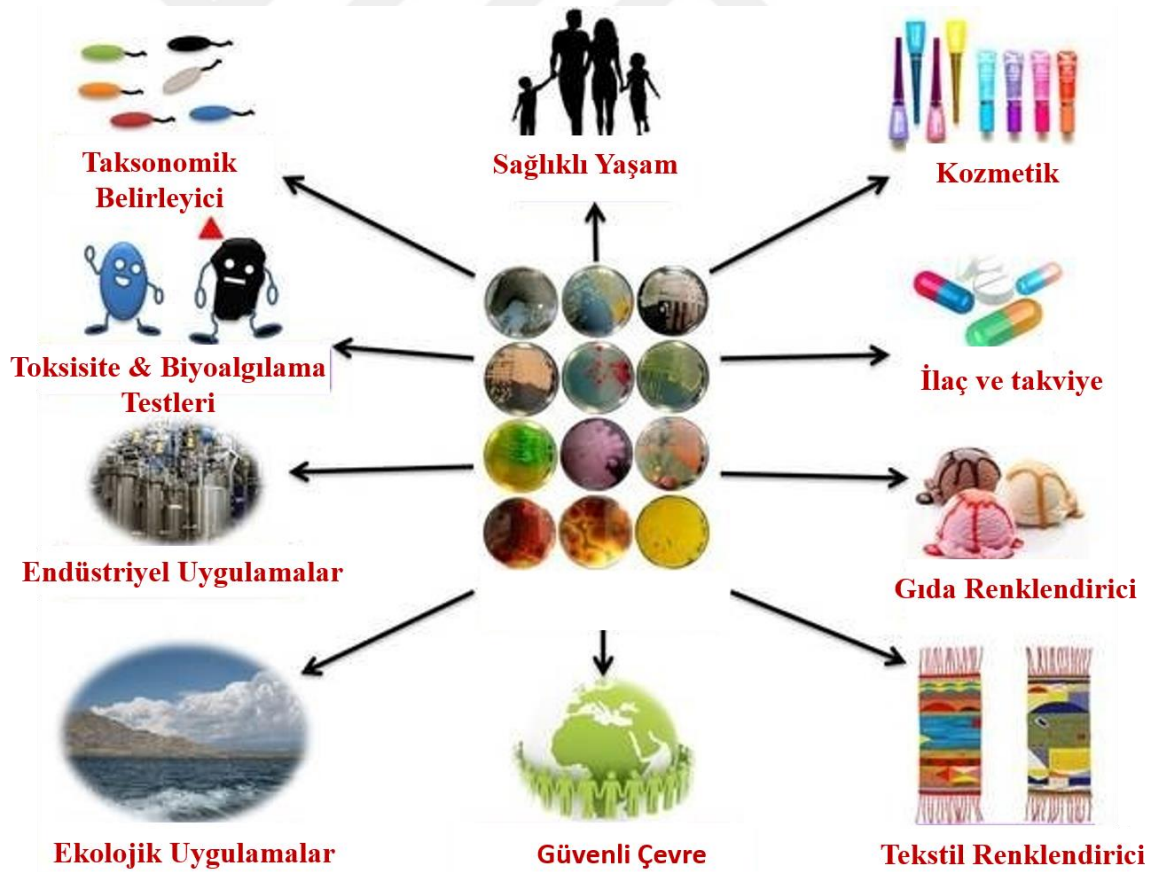
ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Tez çalışmasında kullanılan izolatların listesi	18
Çizelge 3.2 Triptik Soy Agar besiyeri içeriği	19
Çizelge 3.3 Serum Fizyolojik içeriği	20
Çizelge 3.4 1 N NaOH çözeltisi içeriği.....	20
Çizelge 3.5 1 N HCl çözeltisi içeriği	20
Çizelge 3.6 1 M Na ₂ CO ₃ çözeltisi içeriği	21
Çizelge 3.7 Metanol çözeltisi içeriği.....	21
Çizelge 3.8 % 70'lik etanol çözeltisi içeriği	21
Çizelge 3.9 50 mM KP tamponu içeriği.....	22
Çizelge 3.10 150 mM KP tamponu içeriği.....	22
Çizelge 3.11 15 mM NaN ₃ çözeltisi içeriği.....	22
Çizelge 3.12 10 mM H ₂ O ₂ çözeltisi içeriği.....	23
Çizelge 3.13 0,5 mM EDTA içeren 50 mM Tris-HCl tamponu içeriği	23
Çizelge 3.14 30 mM t-BOOH çözeltisi içeriği.....	23
Çizelge 3.15 20 mM GSH çözeltisi içeriği	24
Çizelge 3.16 10 mM NADPH çözeltisi içeriği	24
Çizelge 3.17 20U/mL glutatyon redüktaz çözeltisi içeriği.....	24
Çizelge 3.18 200 mM KP tamponu içeriği.....	25
Çizelge 3.19 200 mM GSH çözeltisi içeriği	25
Çizelge 3.20 50 mM CDNB çözeltisi içeriği	25
Çizelge 3.21 0,6 mM EDTA ve 4 mg/mL BSA (Bovine Serum Albumin) içeren 200 mM Na ₂ CO ₃ çözeltisi içeriği	26
Çizelge 3.22 0,3 mM Xanthine çözeltisi içeriği.....	26
Çizelge 3.23 25 mM NBT çözeltisi içeriği	26

Çizelge 3.24 0,139 U/mL XOD (Xanthine oksidaz) çözeltisi içeriği	27
Çizelge 3.25 Kullanılan besiyeri konsantrasyonları ve ihtiva ettikleri tuz katkıları	29
Çizelge 3.26 Test edilen pH değerleri.....	30
Çizelge 3.27 Test edilen sıcaklık değerleri	31
Çizelge 3.28 Antimikrobiyal aktivite tayininde kullanılan patojen bakteriler	38
Çizelge 4.1 APT 13a, APT 14, APT20b, APT 34 ve APT 44 izolatları için seçilen 72 saat süresince ideal mikrobiyal gelişim ve pigment üretim koşulları	74
Çizelge 4.2 Pigment ekstraksiyonu sonrası APT 13a, APT 14, APT20b, APT 34 ve APT 44 özütlerinin spektrofotometrik ölçüm sonuçları	76
Çizelge 4.3 APT 13a, APT 14, APT20b, APT 34 ve APT 44'ün DMSO ve metanol (Met.) pigment özütlerinin antioksidan enzim aktivitesi etkinlikleri.....	99
Çizelge 4.4 Antimikrobiyal aktivite sonuçları	101

1.GİRİŞ

Renkler, insan duyularının algıladığı ilk özelliklerin başında gelmektedir. Dünyamız bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalarda doğal olarak bulunan ve “biocolors” olarak adlandırılan çeşitli renklerdeki pigmentler açısından oldukça zengindir (Kirti vd., 2014). Hem ökaryotik hem de prokaryotik kaynaklardan elde edilen, yapısal olarak birbirinden farklı, sarı, turuncu ve kırmızı 1000’den fazla doğal pigment molekülü tanımlanmıştır. Doğal olarak elde edilen pigmentler, karotenoidler, flavonoidler (antosiyeninler) ve bazı tetrapiroller (klorofiller ve fikobiliproteinler) ile temsil edilir. Bunlardan karotenoidler, vücutta pigmentasyonu arttıran, biyolojik iletişimde rol alan, A vitamini öncülü olan ve güçlü antioksidan aktivite gösteren poli izoprenoidler olup, kırmızıdan sarıya farklı renk skalasına sahip bir pigment sınıfıdır (Sasidharan vd., 2013).



Şekil 1.1 Bakteriyel pigmentlerin kullanım alanları (Ramesh vd. 2019)

Karotenoidler, güçlü antioksidan aktiviteleri ve provitamin A öncülü olmaları sayesinde yaşlanma, kanser, katarakt, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi pek çok hastalığa karşı korunmada oldukça önemli moleküller olarak görev almaktadırlar. Hücresel sistemdeki sayısız fonksiyonları nedeniyle karotenoidler; gıda katkı maddesi veya besin takviyesi olarak gıda endüstrisinde, anti-tümoral özellikleri, provitamin A ve antioksidan aktiviteleri sebebiyle farmasötik ve tıp alanlarında, UV hasarına karşı fotokoruyucu etkileri ve cilt sağlığına katkıları sayesinde kozmetik sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bunların yanı sıra tekstil ürünlerinin renklendirilmesi ve hayvan yem katkı maddesi olarak da uygulamalı diğer alanlarda kullanım potansiyelleri bulunmaktadır (Sasidharan vd. 2013, Saini vd. 2019).

Karotenoidler; çoğunlukla çeşitli çevresel streslere cevap olarak bitkilerde, mantarlarda, fotosentetik ve fotosentetik olmayan mikroorganizmalarda bulunurlar (Sasidharan vd., 2013). Literatürde yer alan çalışmalara bakıldığında, bu doğal karotenoidlerin ticari üretimleri söz konusu olduğunda üretimlerinin neredeyse tamamının bitkiler ve mikroalglerden kaynaklandığı görülmektedir. Bitkilerden elde edilen doğal pigmentlerin üretiminde pahalı saflaştırma basamaklarının olması, bol miktarda bitkiye ihtiyaç duyulması ve bitkisel üretimin çevresel faktörlere (mevsimsellik, nem ve sıcaklık gibi) bağlı olması, mikroalglerle olan üretimde ise maliyeti yüksek besiyerlerine ihtiyaç olması ve uzun üretim süresine gereksinim duyulması; bu iki doğal kaynağın dezavantajlarını oluşturmaktadır. Bu doğal kaynakların dışında bakteriyel hücreler; belirli kültür koşulları altında, kısa sürede ve daha düşük üretim maliyetiyle geliştirilebilecek geniş bir renk skalasında olan karotenoid içerikli pigmentleri biriktirebilirler. Sahip oldukları bu avantajlara rağmen bakteriyel pigmentlerin henüz ticari boyutta endüstriyel üretim süreçleri gerçekleştirilmemiştir. Bakteriyel pigmentlerin özellikle son yıllarda endüstriyel pigment üretimi boyutundaki avantajlarına dair farkındalık yaratan çok sayıda literatür çalışması bulunmaktadır. Özellikle küresel çapta doğal karotenoid talebindeki artış da göz önüne alındığında, doğal renk maddesi ihtiyacını karşılamada bakteriyel pigmentler araştırmacılar ve ilgili sanayi kollarındaki üreticiler için oldukça dikkat çekici bir konu haline gelmiştir.

Yapılan bu tez çalışması; çeşitli ticari kullanım alanları bulunan karotenoid pigmentlerinin, sentetik kaynaklar yoluyla üretilen veya üretim aşaması çeşitli dezavantajlar barındıran diğer doğal kaynakların kullanımı yerine, başta gıda ve sağlık alanında olmak üzere diğer pek çok sektörde kullanılabilecek, doğal, düşük maliyetli ve kolay üretilen mikrobiyal kaynaklı karotenoid pigmentlerin üretim aşamalarının optimize edilmesi ve hücre yoğunluğunu artırma neticesinde pigment üretim verimlerinin de artırılması sağlanabildiğinden önem arz etmektedir. Tez kapsamında turuncu renkte karotenoid pigmenti üretimi için potansiyel doğal üreticiler olan beş farklı *Exiguobacterium* cinsi bakteri kullanılmıştır. Bu mikroorganizmalardaki mikrobiyal gelişim parametreleri ve çeşitli endüstriyel atıkların varlığındaki gelişimleri gözlemlenmiştir. Çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular sonucunda, melas ve peynir altı suyu tozu gibi endüstriyel atıklar içeren besiyerlerinde geliştirilen karotenoid pigment üreticisi kaynak mikroorganizmaların ideal gelişim parametreleri belirlenmiş ve ayrıca üretmiş oldukları pigmentlerin antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri tespit edilerek daha sonraki süreçlerde ticari boyutta kullanılabilmek potansiyelleri belirlenmeye çalışılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Karotenoid Pigmentlerin Genel Özellikleri, Çeşitleri, Fonksiyonları ve Kullanım Alanları

2.1.1 Karotenoid pigmentlerin genel ve kimyasal özellikleri

Karotenoidler, vücutta pigmentasyonu arttıran, biyolojik iletişimde rol alan, A vitamini öncülü olan, güçlü antioksidan aktivite gösteren ve C5 izoprenoid birimlerden oluşan bir pigment sınıfıdır. Karotenoidlerin karakteristik renkleri, kromofor olarak görev yapan 8 ila 13 konjuge karbon-karbon çift bağlı bir omurgaya sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Bu özellikleri sayesinde görünür ışığı absorbe ederek, polien zincir içeriğine bağlı olarak sarı, turuncu ve kırmızı skalasında olan karakteristik renklere sahip olurlar (Kirti vd., 2014, Saini vd., 2019).

Doğadaki parlak renklerin önemli bir kaynağını oluşturan karotenoidler; çeşitli çevresel streslere cevap olarak bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilmektedirler. Günümüzde 722 canlı türünden toplam 1204 adet farklı moleküler yapıya sahip doğal karotenoid türevi izole edilerek yapıları aydınlatılabilmektedir. Karotenoidlerin doğadaki canlılar arasında bu kadar yaygın olmalarının en önemli sebepleri arasında onların sürdürülebilir sağlık koşullarını ve davranışlarını destekleyecek şekilde vücut pigmentasyonunu arttırma, ışığı absorbe etme, biyoiletişim, vitamin A kaynağı olma, UV ışığına karşı koruma ve potansiyel antioksidan aktivitesi sergileme gibi özellikleri gelmektedir. Karotenoidler, hücreleri fotooksidatif hasara karşı korur ve bu nedenle çevre, gıda, beslenme ve hastalık kontrolü ile ilişkili birçok uygulamalı alanda güçlü antimikrobiyal ve antioksidan ajanlar olarak önemli roller üstlenirler (Kirti vd., 2014, Rodriguez-Concepcion vd., 2018, Saini vd., 2019).

Karotenoid pigmentlerin en belirgin kimyasal özellikleri, kromofor görevi gören ve merkezi konuma sahip konjuge karbon-karbon çift bağ sistemidir. Birden fazla fonksiyon için elzem olan bu durum karotenoidlere karakteristik renklerini sağlamanın yanı sıra onları izomerizasyon ve oksidasyona yatkın hale getirir. Konjuge çift bağ

sistemi karotenoid moleküllerin sert, çubuk benzeri iskeletini oluşturur ve karotenoid moleküllerin yüksek indirgenme potansiyelini sağlar ki, bu da onları güçlü antioksidanlar yapar. Antioksidan aktivite gösteren karotenoidler antioksidan enzimleri olarak bilinen ve toksisiteyi azaltan glutatyon transferaz (GST), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimlerin seviyelerini ve aktivitelerini artırır (Kirti vd., 2014, Rodriguez-Amaya vd.,2018, Elvira-Torales vd., 2019).

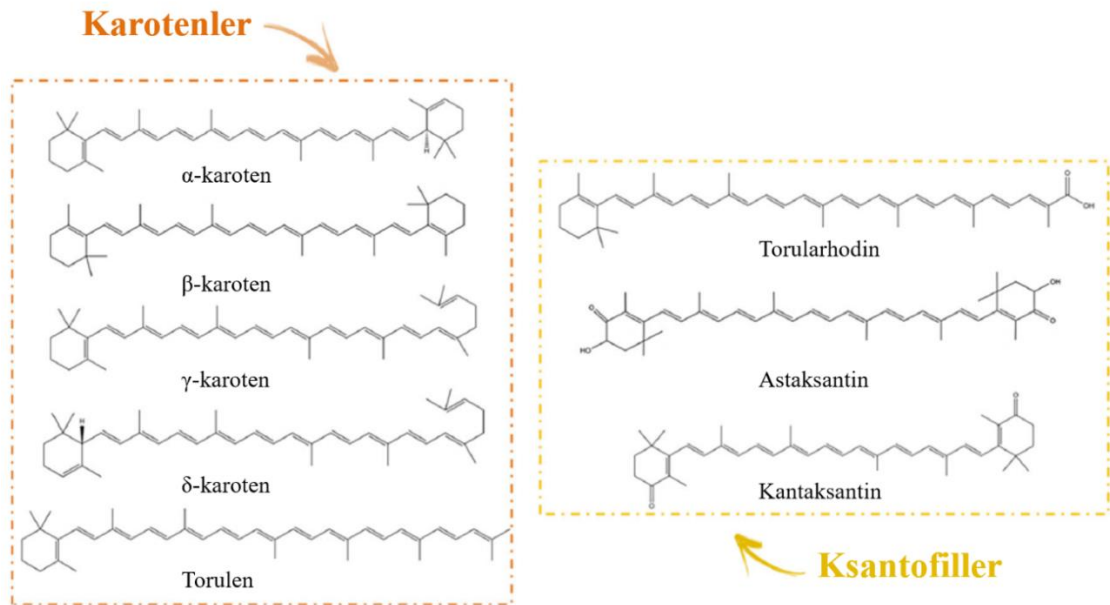
Çoğunlukla mavi ve mor ışığı absorbe eden yani 400-500 nm’de absorpsiyon veren karotenoidler oksijene, ısıya ve ışığa duyarlı, lipitte çözünür molekül sınıflarıdır. Karotenoidler bitkilerde büyüme, gelişme ve stres tepkilerinin ana düzenleyicileri olan ABA ve strigolaktonlar gibi fitohormonların öncülleri olarak görev yapmaktır. Aynı zamanda fazla enerjiyi ısı olarak dağıtarak, serbest radikalleri temizleyerek ve membranları lipid peroksidasyonundan koruyarak güçlü ışığa bağlı zararlı etkileri azaltırlar. Karotenoidler, sudaki çözünürlüğü neredeyse hiç olmayan ve bu çözünürlüğü genellikle sıcaklık yükselse de artmayan, son derece hidrofobik moleküllerdir. Hücre membranında karotenoidler genellikle karmaşık çift tabakalı membran yapısında zara bağlı olarak bulunur. Karotenoidin membran içerisindeki konumu büyük ölçüde moleküler yapısına bağlıdır. Hidrofobisiteyi sebebiyle mevcudiyetlerinin hücrenin çekirdek zarında, hidrofobik alanlarla sınırlı kalmaları beklenirken, proteinlerle ilişkili olduklarında sulu bir ortamla ilişki içerisinde bulunabilirler. Karotenoidlerin polaritesi, içerdikleri polar fonksiyonel gruplar tarafından değiştirilir ve böylece karotenoidlerin diğer moleküller ile etkileşimi de bu durumdan etkilenir (Wisniewska vd., 1998, Higuera-Ciajara vd., 2004, Kirti vd., 2014, Rodriguez-Concepcion vd., 2018).

2.1.2 Karotenoid pigmentlerin sınıflandırılması

Kimyasal yapılarına bağlı olarak karotenoidler iki ana gruba ayrılabilir: **(1)** sadece hidrokarbon içeriyorsa; **karotenler** (likopen, α -karoten ve β -karoten gibi) ve **(2)** hidrokarbonun yanı sıra oksijen içeriyorsa: **ksantofiller** olarak isimlendirilirler. Ksantofillerdeki oksijen bağlı gruplar, hidroksil (lutein, zeaksantin), epoksit (violaksantin, neoksantin), karbonil (kantaksantin, kapsantin), karboksil, asetat, lakton

veya sülfat gruplarıdır. Hidrokarbon omurgalarının uç kısımlarında halka içerip içermediklerine göre de **siklik** (β -karoten) veya **asiklik** (likopen) olarak ayrılırlar. Siklik olan türevlerde hidrokarbon zinciri ucunda tek veya iki adet değişmemiş β -iyonon halkası içerenler **provitamin A öncülü karotenoidler** (α -karoten ve β -karoten), β -iyonon halkası içermeyenler de **provitamin A öncülü olmayanlar** (likopen, astaksantin, lutein) şeklinde adlandırılırlar. Provitamin A öncülü karotenoidlerin değişmemiş β -iyonon halka yapıları retinale dönüştürülebilirken, provitamin A öncülü olmayan karotenoidler de çoğunlukla daha aktif olduklarından güçlü antioksidan aktiviteye sahiptirler (Saini vd., 2019).

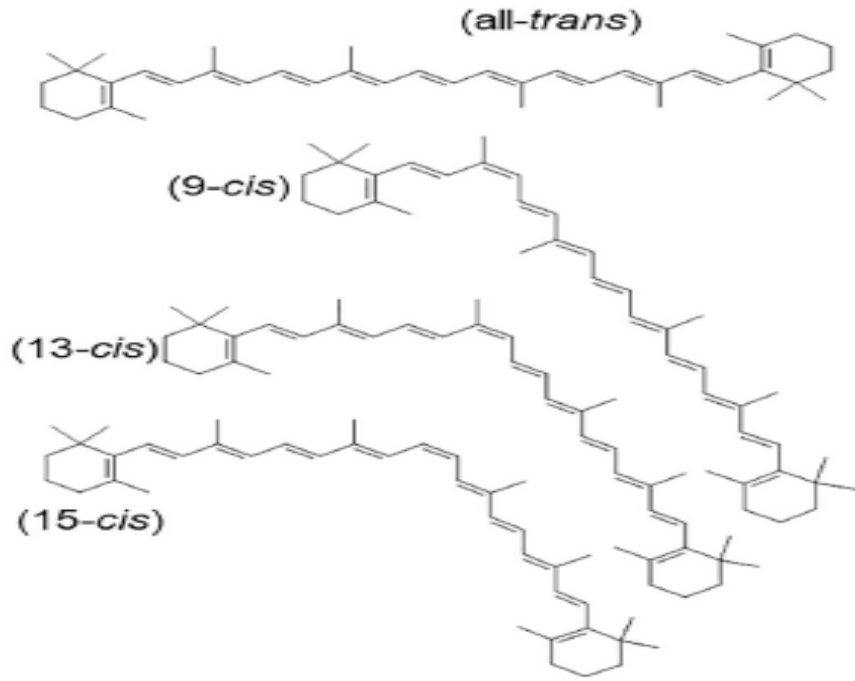
Fonksiyonlarına bağlı olarak karotenoidler yine iki ana gruba ayrılabilir: **(1) primer** karotenodiler (violaksantin, zeaksantin, neoksantin, β -karoten) ve **(2) sekonder** karotenodiler (astaksantin, kantaksantin) olarak isimlendirilirler. Primer (esansiyel) karotenoidler fotosentez olayındaki yapısal ve fonksiyonel bileşenlerle ilişkilendirilir ve fotosentezde ışık toplama pigmentleri olarak işlev gösterirler. Sekonder (özelleşmiş) karotenoidler ise abiyotik stres koşullarında bol miktarda üretilerek hücre korunmasında işlev görürler (Saini vd., 2019).



Şekil 2.1 Karotenoid ve ksantofil örnekleri (Mussagy vd., 2019)

Bu iki genel sınıflandırmanın yanı sıra, karotenoidler içerdikleri karbon ve çift bağ sayısına bağlı olarak da alt gruplara ayrılırlar. Karbon sayılarına bağlı olarak: hidrokarbon iskeletleri her defasında 5 karbonlu izoprenoid birimlerle birleşerek C30, C40, C45 ve C50 türevlerini oluşturur. Likopen, astaksantin ve β -karoten gibi tipik karotenoidler, 40 karbon atomu (C40) içerir ve sekiz C5 izoprenoit ünitesinin yoğunlaşması ile oluşur. C40 karotenoidleri doğada en bol miktarda bulunan karotenoidlerdir. C45 ve C50 karotenoidleri sırasıyla dokuz veya on izoprenoid ünitesi içerir. C50 karotenoidlere bir örnek olarak dekaprenoksantin verilebilir. Bazı karotenoidler, 40'tan az karbon atomundan oluşur yani C40 iskeletinin bir kısmının kaybıyla türetilmiş yapıya sahiptirler. C30 karotenoidleri yalnızca altı C5 izoprenoid ünitesi içerir. Karbon atomları molekülün bir veya her iki uç kısmından dioksijenazlar tarafından hidroliz edildiğinde enzimatik parçalanma sonucu oluşan bu bileşikler, apokarotenoidler (C20) veya norkarotenoidler olarak adlandırılır (Kirti vd., 2014, Rodriguez-Concepcion vd., 2018).

Çift bağ sayılarına bağlı olarak: geometrik izomerleri (*cis/trans* veya *Z/E*) oluşabilmektedir. Karotenoid molekülünün şekli izomerik formlara bağlıdır ve bu durum karotenoidlerin çözünürlük ve emilebilirlik özelliklerini değiştirebilir. İzomer olan *cis* ve *trans* formlar şekilsel olarak farklılık gösterirler ve pek çok doğal karotenoid, daha stabil olması sebebiyle tamamiyle *trans* konfigürasyondadır. Karotenoidlerin *trans* formu daha katıdır ve *cis* formlarından daha çok kristalleşme veya toplanma eğilimi gösterir. Yine de ışık yakalama kompleksleri veya hormonlarla ilişkili olanlarda biyolojik olarak daha aktif olan *cis* karotenoidlere de dönüştürülebilirler. Karotenoidler polaritelerine göre de sınıflandırılırlar. Polar olanlara lutein ve zeaksantin, apolar olanlara da β -karoten ve likopen örnek verilebilir (Kirti vd., 2014, Rodriguez-Concepcion vd., 2018).



Şekil 2.2 Tüm trans ve cis-izomerik β -karoten formları (Rodriguez-Concepcion vd., 2018).

2.1.3 Karotenoid pigmentlerin kaynakları

2.1.3.1 Bitkisel pigmentler

Tüm bitkiler karotenoid çeşitleri içerir ve doğal karotenoidler çoğunlukla bitkisel kaynaklardan elde edilir. Bitkisel karotenoidler birçok meyve ve sebzede de mevcuttur. Bitkilerde bulunan ana karotenoidler, β -karoten, likopen, lutein, violaksantin ve neoksantin'dir. Diğer bitkisel karotenoidler ise α -karoten, zeaksantin, astaksantin ve renksiz ara ürünler olan fitoen ve fitofluen olup çok daha az miktarda bulunurlar. Örneğin, lutein ticari olarak *Tagetes erecta* çiçeklerinden, likopen domatesten ve β -karoten havuçtan elde edilir (Shahidi vd., 1998, Rao vd., 2007, Saini vd., 2019).

2.1.3.2 Hayvansal pigmentler

Bitkilerin aksine, karotenoidlerin hayvansal kaynaklardaki dağılımı temel olarak spesifik diyet alışkanlıklarının, biyoemilimin, metabolik dönüşümlerin ve simbiyozun bir sonucu olarak karşımıza çıkar. Hayvanlar dışarıdan edindikleri bu karotenoidleri

belirli dokularda biriktirirler. Bu durum hayvan karotenoidlerinin daha az olduğu anlamı taşımaz. Bu bağlamda hayvansal kaynaklarda en yaygın olarak gözlenen karotenoid çeşitleri; astaksantin, β -karoten, lutein ve zeaksantin gibi çeşitli oksijenli karotenoid türevleridir. Hayvanlar aleminde astaksantin, en yaygın olarak bulunan karotenoid çeşiti olup, bunu bitki aleminde de yaygın olan lutein ve zeaksantin izler. Bu karotenoidlerin varlıkları ekolojik öneme sahiptir; çünkü renk polimorfizmini belirler ve bu nedenle doğal düşmanlara duyarlılığı etkiler (Moran vd., 2010). (Shahidi vd., 1998). Birçok yenilebilir balığın (somon, alabalık), yumuşakçaların (midye, istiridye) ve kabuklu hayvanların (karides, ıstakoz) ayırt edici renkleri de karotenoidlerden kaynaklanır (Rodriguez-Concepcion vd., 2018). Ayrıca lutein kuşlar ve yumuşakçalarda (midye ve salyangoz) bulunan en yaygın ksantofildir (Shahidi vd., 1998). Lutein ve zeaksantin tavukların yumurta sarısında yaygın olarak bulunur (Perry vd., 2009). Memeliler, adipoz dokularında karotenoid biriktirme yeteneklerine göre geleneksel olarak "beyaz yağlı" (domuz, koyun, keçi ve yarasa) veya "sarı yağlı" (sığır, at) hayvanlar şeklinde sınıflandırılırlar. Beyaz-etli memelilerde karotenoidlerin emilimi çok azken karotenoidleri absorbe edebilen sarı-etli hayvanlar onları adipoz dokularında biriktirirler (Rodriguez-Concepcion vd., 2018). Ayrıca kuşların da sosyal etkileşimin bir göstergesi olarak tüylerinde karotenoidler biriktirdikleri bilinmektedir (Lafountain vd., 2015).

2.1.3.3 Ökaryotik mikroorganizmalardaki ve mikroalglerdeki pigmentler

Karotenoid biyosentezi, karotenoid yolakların fotosentetik organizmalara göre daha basit olduğu funguslarda sık görülen bir özelliktir (Adam vd., 2018, Avalos vd., 2015). Fotosentetik türlerin aksine, karotenoidlerin mantarlarda sadece ikincil roller oynadığı görülmektedir. Fungus ve mayaların genetik manipölasyona ve endüstriyel yetiştiriciliğe uygun olması bir *Zygomycota* üyesi olan *Blakeslea trispora*'yı β -karoten ve likopenin, bir *Heterobasidiomiset* mayası olan *Xanthophyllomyces dendrorhous*'u astaksantin biyoteknolojik olarak üretimi için ideal adaylar yapar (Rodriguez-Concepcion vd., 2018, Ledetzky vd., 2014, Pollmann vd., 2017).

Ökaryotik mikroorganizmalar olan mikroalgler de bitkilere benzer şekilde, fotosentetik işlevlerde yer alan karotenoidleri biriktirirler (Rodriguez-Concepcion vd., 2018).

Özellikle β -karoten, lutein, violaksantin, neoksantin ve zeaksantin mikroalglerde yaygın bulunan karotenoid çeşitleridir. Ayrıca azot yoksunluğu, güçlü güneş ışığı ve kuraklık gibi stresli koşullar bazı mikroalglerin hücrelerinde çok miktarda karotenoid biriktirmelerine neden olur (Shahidi vd., 1998, Solovchenko, 2012, Solovchenko vd., 2017). Örneğin; *Dunaliella salina*'da β -karoten, *Haematococcus pluvialis*'te astaksantin ve *Muriellopsis* sp. ve *Scenedesmus almeriensis*'te lutein bulunur. *Rhodophyta*'da (kırmızı algler) baskın pigmentler sırasıyla, zeaksantin ve lutein olup, bunların yanı sıra α ve β -karotenler de mevcuttur. Violaksantin ise kahverengi alglerin en karakteristik pigmentlerinden biridir (Shahidi vd., 1998, Del Campo vd., 2007, Guedes vd., 2011).

2.1.3.4 Arkeler ve fotosentetik olmayan bakterilerdeki pigmentler

Sadece C40 veya C40 türevli karotenoidler üreten ökaryotların aksine bakteriler, C30, C45 ve C50 karotenoidlerinin çoğunu sentezler. Karotenoid biyosentezi *Archaea*'da daha az görülmesine rağmen, halofilik arkeler olan *Halobacterium salinarum*, *Halorubrum chaoviator*, *Halococcus morrhuae*, *Natromonas pharaonis* ve *Haloarcula japonica*'da tanımlanmıştır (Rodriguez-Concepcion vd., 2018). Son zamanlarda, *Haloferax volcanii* ve *Haloferax mediterranei* gibi diğer karotenoid üreten halofilik arkeler özellikle tuzlu havuzlar veya bataklıklarda karakterize edilmiştir (Chen vd., 2015, Rodrigo-Baños vd., 2015). Fotosentetik olmayan karotenoid üreticisi bakterilere; *Erwinia*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Thermus*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Deinococcus*, *Exiguobacterium* cinslerine ait türler örnek olarak verilebilir.

2.1.3.5 Fotosentetik bakterilerdeki pigmentler

Karotenoid üreten fotosentetik bakteriler arasında mor bakteriler, yeşil kükürt bakterileri ve helikobakteriler bulunur. Üretilen karotenoidlerin yapıları, fotosentetik olmayan bakteriler de dahil olmak üzere diğer organizmalardan farklıdır. Bu bakterilerde çoğu C40 karotenoidleri asiklidir ve sülfat, metoksi, karbonil, karboksil, glikozit ve hidroksil grupları içerir. Karotenoid üreticisi mor ve yeşil kükürt bakterilerine örnekler; *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*,

Chlorobium tepidum ve *Chlorobium phaeobacteroides*'dir. Bitkilere benzer şekilde, hem anoksijenik hem de oksijenik fotosentetik bakterilerde karotenoidlerin ana işlevi aşırı ışığın neden olduğu oksidatif hasarı azaltmaktır. Bunlara ek olarak karotenoidlerin bu tek hücreli canlılarda antioksidan aktivite, yüksek sıcaklık, radyasyon ve alkali koşullar gibi ekstrem ortamlara adaptasyon, patojenlerde bağışıklık sistemi hücrelerine karşı virülans faktörü oluşturma, UV hasarına karşı DNA'nın korunması, lipid peroksidasyonundan hücre zarını koruma gibi sayısız işlevlere sahip oldukları bilinmektedir (Rodriguez-Concepcion vd., 2018).

2.1.4 Karotenoid pigmentlerin en yaygın çeşitleri

2.1.4.1 β -karoten

β -karoten bir gıda katkı maddesi olarak tanımlanır ve kimyasal olarak sentezlenebilir. Bitkilerden ekstrakte edilebilmesinin yanında, ticari olarak *B. trispora* veya *D. Salina* mikroalglerinden de üretilmektedir. β -karoten provitamin A öncülü olarak tanımlandıklarından, bu amaçla besin takviyesi olarak gıdalara ve yem katkı maddesi olarak hayvan yemlerine eklenmektedirler (Berman vd., 2015).

İnsan sağlığı için birçok hayati işlevi olan A vitamini vücutta belirli karotenlerden, özellikle β -karotenden üretilir (Kirti vd., 2014, Rao vd., 2007). β -karoten güçlü bir antioksidandır ve A vitamini etkinliği başta olmak üzere bağışıklık fonksiyonlarını güçlendirmek, gece körlüğünü ve karaciğer fibrozunu önlemek gibi durumlarda kullanılabilir (Saini vd., 2019).

2.1.4.2 Likopen

Likopen de bir gıda katkı maddesi olarak tanımlanır ve çoğunlukla domatesten ekstrakte edilebilir. Likopen meyve/sebze suları, sporcu içecekleri, yağlar ve soslara bir bileşen olarak eklenebilir. Likopen ayrıca belirli beslenme gereksinimlerini elde etmek için özel tıbbi diyetlere dahil edilebilir (Berman vd., 2015).

Likopenin kronik hastalıkların önlenmesini desteklediğini gösterir kanıtlar, epidemiyolojik çalışmaların (Giovannucci, 2002) yanı sıra, insan kanser hücre hatları (Kim vd., 2002, Hall vd.,1995) hayvan çalışmaları (Jain vd., 1999, Rao, 2006) ve ayrıca insan doku kültürleri kullanılarak yapılan klinik çalışmalardan elde edilmiştir (Rao vd., 1999, Rao, 2002, Kucuk vd., 2002, Bowen vd., 2002). Likopen, güçlü antioksidan özelliklere sahiptir. Hücreleri oksidatif hasarlara karşı korurken, kanser riskini kısmen önler veya azaltır. Epidemiyolojik çalışmalar oksidatif stresin osteoporoz ile ilişkili olduğunu ve antioksidanların bu etkiyi önleyebileceğini göstermiştir (Rao vd., 2007). Likopen kaynağı olan domatesi tüketen deneklerdeki okside LDL kolesterol seviyelerinde önemli ölçüde azalma görülmüştür (Agarwal vd., 1998). Aynı zamanda likopenin total kolesterol seviyelerini düşürdüğü ve böylece kardiyovasküler hastalıkların riskini azalttığı gösterilmiştir (Fuhrman vd., 1997).

2.1.4.3 Astaksantin

Astaksantin somon ve alabalık yemlerinde kantaksantin ile birlikte kullanılır. Özellikle *H. pluvialis* mikroalginin astaksantin bakımından zengin olduğu bilinmektedir. Temel olarak insan besin takviyeleri ve kozmetik uygulamalarında kullanılmakla beraber, akuatik canlılar için yem katkı maddesi olarak da farklı uygulama alanları mevcuttur (Berman et vd., 2015).

Astaksantin; lutein, likopen, α -karoten ve β -karoten gibi çeşitli karotenoidlere kıyasla daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir (Naguib, 2000). Astaksantin kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde, bağışıklık sisteminin güçlendirilmesinde ve yüksek antioksidan aktivitesi nedeniyle kataraktın önlenmesinde yararları vardır (Nelis vd., 1991, McNulty vd., 2008). Astaksantin, pankreas β -hücrelerinde hipergliseminin neden olduğu oksidatif stresi azaltabilir ve ayrıca glukoz ve serum insülin seviyelerini de iyileştirebilir (Uchiyama vd., 2002).

2.1.4.4 Lutein ve zeaksantin

Lutein meyvelerden, yoncadan (*Medicago falcata*) ve kadife ağacından elde edilebilir. Bazı lutein ürünleri, *T. erecta*'dan sağlanır. Zeaksantin alg türevli karotenoid preparatlarında bulunabilir (Berman vd., 2015).

2.1.5 Karotenoid pigmentlerin canlı sistemlerdeki fonksiyonları yaygın kullanım alanları

Karotenoidler, renklendiriciler ve besin takviyeleri gibi spesifik uygulamalarda ayrıca tıbbi, kozmetik ve biyoteknolojik amaçlar için de kullanılırlar (Martín vd., 2008). Karotenoidlerin çok çeşitli faydalı fonksiyonları, ticari değerlerini ve tüm dünyadaki endüstriyel uygulamalarını arttırmıştır. Ticari olarak, en geleneksel uygulamalarda, karotenoidler; gıda renklendiricileri, yem katkı maddeleri ve besin takviyeleri olarak kullanılırlar. En yenilikçi kullanım sebepleri, özellikle antioksidan, anti-tümoral, provitamin A aktiviteleri gibi insan sağlığına faydalı özelliklerinden ileri gelmektedir. Özellikle son yıllarda yürütülen epidemiyolojik çalışmalar karotenoidce zengin diyetlerin insan sağlığına yönelik olan faydalarını ortaya çıkarmıştır. Karotenoidlerdeki A vitamini öncülü olan β halkaları, retinol ve 11-cis-retinalin retinoik asite dönüştürülmesi, görme becerisinde ve gen regülasyonunda kritik öneme sahiptir. A vitamini eksikliği, dünya genelindeki en önemli mikrobesein eksiklikleri arasında yer almaktadır. İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, karotenoidlerin A vitamini öncülü olmasının yanısıra, antioksidan özelliklerine bağlı reaktif oksijen türlerini (ROT) nötralize edebilme, bağışıklık sisteminin kuvvetlenmesi, kognitif fonksiyonların uyarılması, güneş ışınlarına karşı koruma, yaşlanma, göğüs, servik, ovaryum, kolon vb. kanser çeşitleri, katarakt, yağ dokusunda artışa bağlı obezite, tip-2 diyabet, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi kronik hastalıklara karşı koruyuculuk sağlama gibi diğer pek çok biyolojik aktivitede görev aldıkları bilinmektedir. Ticari katma değeri en yüksek olan karotenoidler yani, yüksek bir pazar hacmi olanlar, diğer endüstrilerde de büyük ölçüde uygulanmasına rağmen, lutein, β -karoten, likopen, kantaksantin ve astaksantin gibi gıda katkısı ve yem katkı maddesine yönelik uygulamalarda kullanılanlardır. Gıda katkı maddeleri veya besin takviyeleri olarak kullanımlarına ek olarak, mikrobiyal karotenoidler, hastalıkların tedavisi için insan

yaşam kalitesini arttırmak amacıyla da kullanılmaktadır (Renato vd., 2015, Ligia vd., 2017, Mussagy vd., 2019).

2.1.5.1 Karotenoid pigmentlerin gıda endüstrisinde kullanımı

Diyet olarak kullanılan karotenoidlerin yararlı özellikleri, karotenoid gıda kaynakları, biyoyararlanım ve etki şekli ile fonksiyonel gıda ve nutrasötik ürünlerdeki kullanımlarına yönelik ilgiyi arttırmıştır (Rodriguez-Concepcion vd., 2018). *β*-karoten kaynakları arasında havuç, lahana, şalgam, ıspanak, marul, mango, kavun, biber, balkabağı ve tatlı patates bulunur. *α*-karoten havuç, tatlı patates, balkabağı gibi turuncu sebzelerde ve brokoli, yeşil fasulye ve ıspanak gibi koyu yeşil sebzelerde bulunur. *Likopen* domates, karpuz ve guava meyvesinde bulunur. *β*-kriptoksantin mandalina, portakal, papaya, mısır, bezelye ve yumurta sarısında bulunabilir. *Lutein* ve *zeaksantin* kaynakları, ıspanak, armut ve lahana gibi yapraklı yeşillikler ve mısır, hurma ve brokoli gibi diğer besinlerdir. Karotenoidler hayvanlar aleminde çeşitli şekillerde bulunmasına rağmen karotenoidlerin üretimi bitki ve mikroorganizmalarla sınırlı olup, hayvanlar (insanlar dahil) karotenoidleri sentezleyemezler, bu yüzden yiyecekler hayvanlar ve özellikle insanlar için bu bileşiklerin tek kaynağıdır (Amorim-Carrilho vd., 2014, Shahidi vd., 1998, Tanaka vd., 2012, Boudries vd., 2007, Puiggròs vd., 2011).

Provitamin A öncülü olma, antioksidan aktiviteleri ve diğer tüm yararlı işlevlerinin yanı sıra karotenoidler, ürettikleri pigmentler sebebiyle gıda renklendiricisi olarak da kullanılmaktadır. Renk, gıda ürünlerinin tüketici tarafından kabul edilebilirliğinde önemli bir rol oynar (Shahidi vd., 1998). Doğal kaynaklı pigment alternatifleri besin takviyeleri, gıda renklendiricileri, balık ve kanatlı yemlerinde katkı maddeleri olarak yoğun ilgi görmektedir (Durán vd., 2002, Sasidharan vd., 2013, Saini vd., 2019). Son yıllarda tatlı su kabukluları ve balıkların kırmızı ve turuncu renklenmeleri popüler bir pazarlama faktörü haline gelmiştir (Auerswald vd., 2008). Karotenoidlerden özellikle astaksantin akuatik hayvanlarının derisinin, kabuğunun, etinin veya dış iskeletinin sarı, turuncu ve kırmızı renklerini arttırmak için besin takviyesi olarak tedarik edilir (Saini vd., 2019, Shahidi vd., 1998). Aynı şekilde kanatlı hayvanlarda yumurta sarısının rengi tüketici tarafından talep görmesinde önemli olarak kabul edilir. Bu nedenle kanatlı

yemlerinde renklendirici katkı maddesi olarak da kullanılmaktadırlar (Karadas vd., 2006).

2.1.5.2 Karotenoid pigmentlerin hastalık önleme ve insan sağlığı alanlarında kullanımı

Karotenoidlerin insan sağlığı açısından en çok bilinen işlevi provitamin A aktivitesidir. Oksidatif stres, kronik hastalık oluşması riskine karşı önemli bir koruyuculuk sağlar. Karotenoidler gıdaların farklı renklerinden sorumlu olan bir grup fitokimyasal oldukları için, insan hastalıklarının önlenmesinde ve genel sağlık durumunun kontrol altında tutulmasında önemli rol oynarlar. Karotenoidlerce zengin bir diyet, güçlü antioksidan özellikleri nedeniyle yaşlanma, katarakt, kardiyovasküler ve nörodejeneratif etkiler gibi kronik dejeneratif hastalıkların gelişmesine karşı önemli bir koruma sağlar. Güçlü antioksidan aktiviteleri dışında, karotenoidlerin anti-inflamatuar ve immünomodülatör aktiviteleri oksidatif stresin önlenmesindeki aktif rolleri dikkat çekmektedir (Rao vd., 2007, Kim vd., 2011, Rodriguez-Amaya, 2018, Saini vd., 2019).

Kanser ve felç gibi birçok hastalık serbest radikallerin aracılık ettiği oksidatif süreçleri içerir. Karotenoidlerin, antioksidan etkisiyle, bu tür hastalıklarda da yararlar sağladığı gösterilmiştir (Mussagy vd., 2019). Ayrıca, karotenoidlerin immün tepkisi ve hücreler arası iletişimde dikkate değer bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. A vitamini öncülü olan karotenoid çeşitleri biyoemilim sonrası oksidatif bir yırtılma ile retinaya, retinoik aside ve küçük miktarlardaki parçalanma ürünlerine metabolize edilir. Retinoidlerin hücresel proliferasyon (çoğalma), farklılaşma ve morfogenez gibi birçok biyolojik işlemi etkilediği bilinmektedir. Ayrıca, bazı kanser türlerinin ve bazı dermatolojik faaliyetlerin tedavisinde de yine retinoidler kullanılmaktadır (Delgado-Vargas vd., 2000).

2.2 Karotenoid Üreticisi *Exiguobacterium* Cinsi Bakteriler

Exiguobacterium cinsi ilk olarak Collins ve arkadaşları tarafından 1983 yılında patates işleme atığı olan sulardan izole edilen bazı hafif alkalifilik izolatlarla tanımlanmıştır.

Gram-pozitif, spor üretmeyen, fakültatif aerobik ve alkalifilik bakteriler olan *Exiguobacterium* cinsinin üyeleri, patates işleme atığı, süt endüstrisi atığı, tuzlu su karides kistleri ve buzul eriyik suyu gibi çok çeşitli habitatlardan izole edilmiştir. *Exiguobacterium* cinsi üyelerinin çok az bir kısmı patojenite göstermekte olup, genellikle doğaya zarar vermeyen, patojen olmayan ve hatta sahip oldukları probiyotik özellikleri sayesinde sağlığa faydalı olan bakteriler olarak bilinmektedirler. Örneğin karidesten izole edilen *Exiguobacterium arabatum* W-01 izolatu ile yapılan genom dizilemesi ve anotasyonu çalışmaları neticesinde W-01 izolatının eşsiz potansiyel probiyotik fonksiyonları gösterdiği belirlenmiştir (Cong vd., 2017).

Exiguobacterium cinsi günümüzde *Exiguobacterium arabatum*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Exiguobacterium aestuarii*, *Exiguobacterium marinum* ve *Exiguobacterium profundum* şeklinde isimlendirilen türlerle toplamda 18 türle temsil edilmektedir (Collins vd., 1983; Raichand vd., 2012; Kulshreshtha vd., 2013; Meng vd., 2020).

Exiguobacterium cinsi bakteriler antioksidan aktiviteye bağlı pigment üretimi gibi yaşamsal faaliyetlerini destekleyecek özellikler gösteren ikincil metabolitler üretirler. Bu mikroorganizmaların ürettikleri yoğun pigment gözle dahi seçilebilmektedir. Örneğin; yapılan bir çalışmada toprak örneklerinden izole edilen *E. profundum* BC2-11 izolatının ürettiği turuncu renkli metabolit, klinik patojenlere karşı antimikrobiyal profil ve antioksidan kapasite açısından değerlendirilmiştir. *Salmonella typhi* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi patojenleri inhibe etmesine ek olarak toplam antioksidan kapasitesinin standart askorbik aside (C vitamini) eşdeğer olduğu belirlenmiştir (Mani vd., 2015). Karşılaştırmalı genomik analizleri ile *Exiguobacterium* sp.'nin çıplak gözle görülebilen karakteristik turuncu pigmentasyonundan, karotenoid biyosentezinin sorumlu olduğu ve genom dizisi yayınlanmış *Exiguobacterium* türlerinde karotenoid C30 biyosentezi için tüm biyosentetik yolların mevcut olduğu gösterilmiştir. Bu yolu kodlayan genlerin bir operon olarak düzenlendiği, diaponörosporen-4-oik asit üretiminin turuncu pigmentasyonla sonuçlandığı belirtilmiştir (White vd., 2019).

İkincil metabolitler tipik olarak birincil metabolit sentezlerinin modifikasyonu ile üretilen organik bileşiklerdir. Sekonder metabolitler daha fazla antioksidan içerdiklerinden; kardiyovasküler hastalıklar, hücre ölümü, diyabet ve kanser gibi pek çok sağlık sorununu önleyebilmektedirler. Bunlar, canlı sistemleri için herhangi bir yan etkiye neden olmadan gıda, hayvan yemi ve ilaç endüstrileri için biyoaktif renkli metabolitler olarak kullanılmaktadırlar (Misawa, 2011; Venil vd., 2013; Shatila vd., 2013; Mani vd., 2015). Bu kıymetli doğal metabolitlerin aminoasit eldesi, aşı ve antibiyotik üretimi ve organik sentez için gerekli kimyasalları izole etmek için endüstriyel mikrobiyolojide kullanılma potansiyeli mevcuttur.

Bakteriyel cinsler arasında *Exiguobacterium* sp. özellikle β -karoten, astaksantin ve ksantofillerin üretimi ile tanınır. Örneğin; Lübnan'da havadan izole edilen *E. aurantiacum* FH izolatının turuncu bir karotenoid pigment olan β -karoten ürettiği belirlenmiştir (Shatila vd., 2013). Toprak ve havadan izole edilen *E. aurantiacum* ve *E. profundum*'un sarı renkli pigment ürettiği saptanmıştır (Sasidharan vd., 2013). Hindistan'da topraktan izole edilen *E. profundum* BC2-11 izolatının antimikrobiyal ve antioksidan özelliğe sahip olan turuncu renkli metabolit ürettiği bilinmektedir (Mani vd., 2015). Karotenoid sentezinin, ortam bileşenleri, pH ve sıcaklık tarafından kritik olarak yönlendirildiği gösterilmiştir. Hindistan'daki Sathaiyar nehir havzasından toplanan toprak örneğinden izole edilen *E. acetylicum* S01 izolatının üretim optimizasyonu ve buna bağlı olarak β -karoten üretiminin değişimi incelenmiştir (Jinendiran vd., 2019). Sunulan bu literatür çalışmalarında da belirtildiği üzere, *Exiguobacterium* cinsi bakterilerin gelecekte düşük maliyetle ve çok daha kısa sürelerde gerçekleştirilebilecek endüstriyel süreçlerle üretilebilecek doğal birer turuncu pigment kaynağı olma potansiyellerinin varlığı dikkat çekmektedir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Tez kapsamında kullanılan bakteri kültürleri ve gelişme koşulları

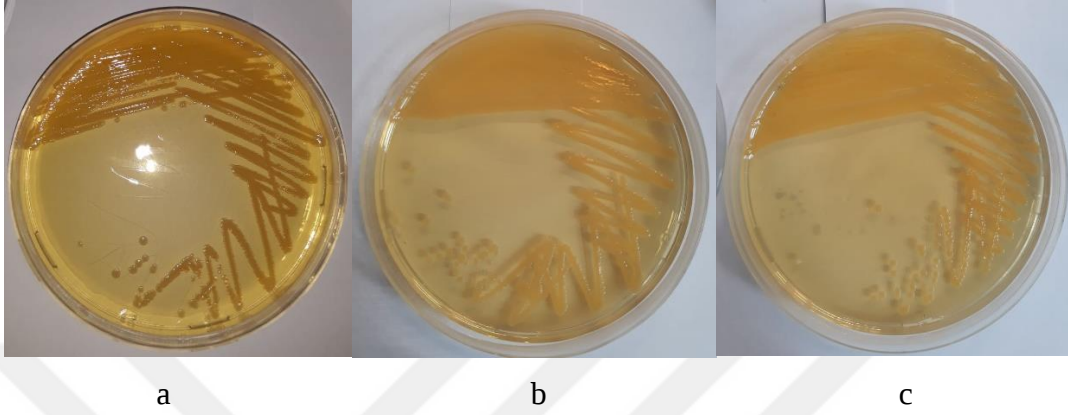
Tez sürecinde yürütülen çalışmalar kapsamında, kullanılan bakteriler Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir. Tez dahilinde yapılması gereken deneylerde kullanılacak olan *Exiguobacterium* cinsi 5 adet izolat, özellikle gözle görülebilen, yoğun turuncu renkte pigment üretebilmeleri sebebiyle çalışmaya dahil edilmişlerdir. Yürütülen çalışmalarda kullanılan izolatların listesi çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Tez çalışmasında kullanılan izolatların listesi

Domain: Bacteria Filum: Firmicutes Sınıf: Bacilli Takım: Bacillales Aile: Bacillaceae Genus : <i>Exiguobacterium</i>					
Koleksiyon Kodu	Cins/ Tür Adı	GenBank Numaraları	İdeal pH Aralığı	İdeal Sıcaklık Aralığı (°C)	İdeal Tuz Aralığı (%)
APT 13a	<i>Exiguobacterium arabatum</i>	KC519397	7.0-12.0	25-70	0-10
APT 14	<i>Exiguobacterium arabatum</i>	KC519398	7.0-12.5	25-70	0-10
APT 20b	<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	KC519399	7.0-12.0	25-60	0-7
APT 34	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	KC519406	8.0-12.5	25-65	0-10
APT 44	<i>Exiguobacterium arabatum</i>	KC519416	7.0-12.5	25-70	0-10

Belirtilen bu beş izolatın 16S rRNA gen dizi analizleri önceki çalışmalarda yapılmış olup, çok sayıdaki fenotipik ve genotipik analizleri de gerçekleştirilmiştir. Bu izolatların toksin genleri içermedikleri, yüksek amilaz ve proteaz ürettikleri, antibiyotiklere duyarlı

oldukları ve endüstriyel kullanıma uygun olacak şekilde patojen özellik içermedikleri halen yürütülmekte olan projeler kapsamında belirlenmiş olup, bu bulguların detayı ilgili tez önerisi kapsamında olmadığından ayrıca sunulmamıştır.



Şekil 3.1 a) APT 13a, b) APT 14, c) APT 44 koloni morfolojileri

3.1.2 Besiyerleri, çözeltiler ve tampon içerikleri

Bu kısımda sunulan besiyeri, çözelti ve tamponların kullanım amaçları Çizelge 3.2 – 3.24 arasında sunulmuştur.

Çizelge 3.2 Triptik Soy Agar besiyeri içeriği

Triptik Soy Agar	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
Kazein pepton	17 g	Merck 1.07213
Soya pepton	3 g	Fluka 70178
(D+) Glukoz monohidrat	2,5 g	Merck 1.08342
Potasyum fosfat dibazik (K_2HPO_4)	2,5 g	Sigma P8281
Sodyum klorür (NaCl)	5 g	Merck 1.06404
Agar	15 g	Scharlau AG0020
Distile su	1000 mL	
pH = 7,3 ± 0,2		
İçerik 121 °C'de 15 dakika süresince otoklavlanarak sterilize edilmiştir.		
Kullanım Amacı: Gliserol stoğundan açılan izolatların aktive edilmesi için besiyeri olarak kullanılmıştır.		

Çizelge 3.3 Serum Fizyolojik içeriği

Serum Fizyolojik	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
NaCl Distile su pH =7,0 ± 0,2	8,5 g 1000 mL	Merck 1.06404
İçerik 121 °C'de 15 dakika süresince otoklavlanarak sterilize edilmiştir.		
Kullanım Amacı: Atık içeren besiyerlerine inoküle edilmeden önce izolataları süspanse etmek ve dilüsyon sayımlarda örnekleri seyreltmek için kullanılmıştır.		

Çizelge 3.4 1 N NaOH çözeltisi içeriği

1 N NaOH çözeltisi	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
NaOH Distile su	40 g 1000 mL	Merck 106469
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		
Kullanım Amacı: Kullanılan besiyerlerinin pH ayarlarını yapmak için kullanılmıştır.		

Çizelge 3.5 1 N HCl çözeltisi içeriği

1 N HCl çözeltisi	mL (w/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
HCl (% 37'lik) Distile su	40 g 1000 mL	Merck 1003172500
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		
Kullanım Amacı: Kullanılan besiyerlerinin pH ayarlarını yapmak için kullanılmıştır.		

Çizelge 3.6 1 M Na₂CO₃ çözeltisi içeriği

1 M Na ₂ CO ₃ çözeltisi	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
Na ₂ CO ₃	105,9 g	Sigma S7795
Distile su	1000 mL	
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		
Kullanım Amacı: Kullanılan besiyerlerinin pH ayarlarını yapmak için kullanılmıştır.		

Çizelge 3.7 Metanol çözeltisi içeriği

Metanol çözeltisi	% 95 (v/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
Metanol	95 mL	Merck 1.01408
Distile su	5 mL	
Kullanım Amacı: Pigment ekstraksiyon aşamasında çözücü olarak kullanılmıştır.		

Çizelge 3.8 % 70'lik etanol çözeltisi içeriği

% 70'lik etanol çözeltisi	100 mL (v/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
Etanol	70 mL	Merck 100983
Distile su	30 mL	
Kullanım Amacı: Tüm çalışmalar boyunca, çalışma ortamını ve çalışılan malzemeleri steril etmek için kullanılmıştır.		

Çizelge 3.9 50 mM KP tamponu içeriği

50 mM KP tamponu	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
KH ₂ PO ₄	0,45 g	Scharlau PO0260
K ₂ HPO ₄	8,15 g	Sigma P8281
Distile su	1000 mL	
pH = 7,0		
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		
Kullanım Amacı: Katalaz (CAT) enzim aktivitesi denemelerinde kullanılmıştır.		

Çizelge 3.10 150 mM KP tamponu içeriği

150 mM KP tamponu	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
KH ₂ PO ₄	1,35 g	Scharlau PO0260
K ₂ HPO ₄	24,45 g	Sigma P8281
Distile su	1000 mL	
pH = 7,0		
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		
Kullanım Amacı: Katalaz (CAT) enzim aktivitesi denemelerinde kullanılmıştır.		

Çizelge 3.11 15 mM NaN₃ çözeltisi içeriği

15 mM NaN ₃	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
NaN ₃	0,973 g	
Distile su	1000 mL	
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		
Kullanım Amacı: Katalaz (CAT) enzim aktivitesi denemelerinde kullanılmıştır.		

Çizelge 3.12 10 mM H₂O₂ çözeltisi içeriği

10 mM H ₂ O ₂	100 mL (v/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
H ₂ O ₂ Distile su	34 mL 100 mL	
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		
Kullanım Amacı: Katalaz (CAT) enzim aktivitesi denemelerinde kullanılmıştır.		

Çizelge 3.13 0,5 mM EDTA içeren 50 mM Tris-HCl tamponu içeriği

50 mM Tris-HCl + 0,5 mM EDTA	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
Trisma Base EDTA Distile su pH = 8,0 ± 0,2	6,1 g 0,2 g 1000 mL	Sigma T6066 Sigma E-5134
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		
Kullanım Amacı: Glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi denemelerinde kullanılmıştır.		

Çizelge 3.14 30 mM t-BOOH çözeltisi içeriği

30 mM t-BOOH	100 mL (v/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
t-BOOH Distile su	0,27 mL 100 mL	
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		
Kullanım Amacı: Glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi denemelerinde kullanılmıştır.		

Çizelge 3.15 20 mM GSH çözeltisi içeriği

20 mM GSH	100 mL (w/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
GSH Distile su	0,615 g 100 mL	
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		
Kullanım Amacı: Glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi denemelerinde kullanılmıştır.		

Çizelge 3.16 10 mM NADPH çözeltisi içeriği

10 mM NADPH	100 mL (v/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
NADPH Distile su	0,65 mL 100 mL	
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		
Kullanım Amacı: Glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi denemelerinde kullanılmıştır.		

Çizelge 3.17 20U/mL glutasyon redüktaz çözeltisi içeriği

20U/mL glutasyon redüktaz	100 mL (v/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
Glutasyon redüktaz Distile su	0,8 mL 100 mL	
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		
Kullanım Amacı: Glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi denemelerinde kullanılmıştır.		

Çizelge 3.18 200 mM KP tamponu içeriği

200 mM KP tamponu	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
KH ₂ PO ₄	1,8 g	Scharlau PO0260
K ₂ HPO ₄	32,6 g	Sigma P8281
Distile su	1000 mL	
pH = 6,5		
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		
Kullanım Amacı: Glutasyon-S-Transferaz (GST) enzim aktivitesi denemelerinde kullanılmıştır.		

Çizelge 3.19 200 mM GSH çözeltisi içeriği

200 mM GSH	100 mL (w/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
GSH	6,15 g	
Distile su	100 mL	
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		
Kullanım Amacı: Glutasyon-S-Transferaz (GST) enzim aktivitesi denemelerinde kullanılmıştır.		

Çizelge 3.20 50 mM CDNB çözeltisi içeriği

50 mM CDNB	100 mL (w/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
CDNB	1,01 g	
Etanol (EtOH)	100 mL	Merck 100983
Kullanım Amacı: Glutasyon-S-Transferaz (GST) enzim aktivitesi denemelerinde kullanılmıştır.		

Çizelge 3.21 0,6 mM EDTA ve 4 mg/mL BSA (Bovine Serum Albumin) içeren 200 mM Na₂CO₃ çözeltisi içeriği

200 mM Na ₂ CO ₃ + 0,6 mM EDTA + 4 mg/mL BSA	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
Na ₂ CO ₃	21,2 g	Sigma S7795
EDTA	0,223 g	Sigma E-5134
BSA	4 g	Sigma A-2153
Distile su	1000 mL	
pH = 10,0		
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		
Kullanım Amacı: Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi denemelerinde kullanılmıştır.		

Çizelge 3.22 0,3 mM Xanthine çözeltisi içeriği

0,3 mM Xanthine	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
Xanthine	0,05 g	
Distile su	1000 mL	
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		
Kullanım Amacı: Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi denemelerinde kullanılmıştır.		

Çizelge 3.23 25 mM NBT çözeltisi içeriği

25 mM NBT	100 mL (w/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
NBT	2,05 g	
Distile su	100 mL	
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		
Kullanım Amacı: Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi denemelerinde kullanılmıştır.		

Çizelge 3.24 0,139 U/mL XOD (Xanthine oksidaz) çözeltisi içeriği

0,139 U/mL XOD	100 mL (w/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
XOD	0,556 mL	
200 mM Na ₂ CO ₃ tamponu	100 mL	Sigma S7795
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		
Kullanım Amacı: Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi denemelerinde kullanılmıştır.		

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakteri kültürlerinin aktifleştirilmesi

% 60'lık gliserol stoklarında -80°C'de bulunan izolatlar öncelikle TSA (Tryptik Soy Agar) besiyerine inoküle edilmiş olup, bakterilerin gelişebildiği uygun sıcaklık olan 37°C'de 18 - 24 saat boyunca inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrası +4°C stokları hazırlanmış, aktif kültürler ilerleyen çalışmalarda kullanılmıştır. İzolatların saflıkları tüm çalışma süresince katı kültürlerdeki koloni morfolojileri ve ayrıca faz-kontrast mikroskopuyla da hücre morfolojileri temel alınarak kontrol edilmiştir.

3.2.2 En ideal mikrobiyal gelişim gözlenen üretim koşullarının seçimi

Bu basamaklarda gerçekleştirilen tüm mikrobiyolojik analizler ve spektrofotometrik ölçümler en az 2 tekrarlı olarak çalışılmıştır.

3.2.2.1 Bakterilerin bazı endüstriyel atıkların varlığında gelişimlerinin optimizasyonu

Tez kapsamında çalışılan 5 farklı *Exiguobacterium* cinsi turuncu pigment üreticisi bakterinin daha ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere öncelikle en iyi mikrobiyal gelişim gösterdikleri besiyeri içerikleri belirlenmiştir. Mikrobiyal gelişimin yüksek olduğu ve pigment üretimini arttıran besiyeri içeriklerinin denenmesi, bu tür çalışmalarda sıklıkla kullanılan iki farklı endüstriyel atık olan melas ve peynir altı suyu

(whey)'nin farklı konsantrasyonlarını ihtiva eden ortamlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *Melas* ve *peynir altı suyunun (whey)* farklı içerikleri *ayrı ayrı* denendikten sonra en yüksek mikrobiyal gelişim gözlenen konsantrasyonlar *ikili kombinasyonlar* şeklinde denenmiştir. Sonrasında besiyeri içeriklerine ek olarak *potasyum* ve *magnezyum* tuzları eklenerek, söz konusu tuzların varlığının mikrobiyal gelişim üzerine etkilerine bakılmıştır. Tüm besiyerleri için hazırlanan tuz çözeltileri filtre ile sterile edildikten sonra otoklavlanan besiyerlerine ayrıca ilave edilmişlerdir (Han vd., 1992, Barroso vd., 2009, Mehmetoglu vd., 2012, Krzywonos vd., 2017, Sanadi vd., 2017, Rochín-Medina vd., 2018).

Hazırlanan besiyerleri 20 mL olacak şekilde erlenlere dağıtılmıştır. Test edilen endüstriyel atık içerikli besiyerlerinin denenen tüm konsantrasyonları Çizelge 3.25'de gösterildiği şekliyle düzenlenmiştir. Besiyeri içeriklerinde kullanılan melas (Ankara Şeker Fabrikası'ndan temin edilmiştir), içerdiği bazı kolloidal bileşikleri ve ağır metalleri (Cu, Fe, Pb vb.) uzaklaştırmak için bazı ön işlemlerden geçirilmiştir. Bu bağlamda; 170 gr melas 300 ml distile su içinde çözündürüldükten sonra üzerine 50 ml distile suda çözünen 0.30 gr potasyum trisiyat çözeltisi ilave edilmiştir. Tüm çözelti distile suyla 500 ml'ye tamamlanmıştır. Bir gece + 4°C'de bekletilen melas çözeltisi bu sürenin sonunda 0.2 µl'lik seluloz nitrat filtre kâğıdından süzölmüştür (Kahyaoğlu vd., 2007). Kullanılan peynir altı suyu tozu (Sütaş) ticari olarak temin edilmiş ve uygun konsantrasyonlarda besiyerlerine ilave edildikten sonra pH ayarı steril NaOH çözeltisi ile sterilizasyon sonrasında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.25 Kullanılan besiyeri konsantrasyonları ve ihtiva ettikleri tuz katkıları

* Sülfürik asitle muamele edilmiş (+H₂SO₄), sülfürik asitle muamele edilmemiş (-H₂SO₄)

Peynir Altı Suyu Tozu
% 0,1 Peynir Altı Suyu Tozu
% 1 Peynir Altı Suyu Tozu
% 10 Peynir Altı Suyu Tozu
% 20 Peynir Altı Suyu Tozu
Melas
% 1 Melas (+H ₂ SO ₄)
% 2 Melas (+H ₂ SO ₄)
% 3 Melas (+H ₂ SO ₄)
% 4 Melas (+H ₂ SO ₄)
% 1 Melas (-H ₂ SO ₄)
% 2 Melas (-H ₂ SO ₄)
% 3 Melas (-H ₂ SO ₄)
% 4 Melas (-H ₂ SO ₄)
Peynir Altı Suyu Tozu + Melas
Peynir Altı Suyu Tozu + Melas + Tuz Çözeltisi
Peynir Altı Suyu Tozu + Melas + % 0,3 K ₂ HPO ₄ + % 0,1 KH ₂ PO ₄
Peynir Altı Suyu Tozu + Melas + % 0,3 K ₂ HPO ₄ + % 0,1 KH ₂ PO ₄ + % 0,02 MgSO ₄ .7H ₂ O
Peynir Altı Suyu Tozu + Melas + % 0,3 K ₂ HPO ₄ + % 0,1 KH ₂ PO ₄ + % 0,5 MgSO ₄ .7H ₂ O

18 – 24 saatlik inkübasyon sonunda petrilere gelişen koloniler toplanarak 0,5 McFarland standardının esas alınmasıyla steril serum fizyolojik içerisinde (% 0,85 NaCl) süspansiyon edilmiştir. Hazırlanan bu aktif kültürlerden 800'er µL 20 mL endüstriyel atıklardan oluşan besiyeri içeren erlenlere % 4 oranında inoküle edilmiştir. İnokülasyon sonrası besiyerleri, izolatlardan uygun gelişme gösterdikleri 37°C sıcaklıkta ve çalkalamalı (120 rpm) koşullarda 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

Her bir bakteri için 24 ve 48 saat sonrasında, bulanıklaşan kültürlerden, bir seri dilüsyon yapılarak, toplam hücre sayısı damla plak ekim yöntemi ile kob/mL cinsinden belirlenmiştir. mL başına düşen koloni oluşturan birim; “[Koloni Sayısı/ Dilüsyon

Faktörü (10^{-x}) / İnoküle Edilen Hacim” formülü esas alınarak hesaplanmıştır. Böylece çalışılan APT 13a, APT 14, APT 20b, APT 34 ve APT 44 kodlu izolatların ideal mikrobiyal gelişim gösterdikleri atık konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri seçilmiştir.

3.2.2.2 Bakterilerin ideal konsantrasyonlardaki endüstriyel atıklar varlığında optimal pH isteklerinin belirlenmesi

Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı şekliyle aktifleştirilen örnekler 18 – 24 saatlik inkübasyon sonunda petrilerden toplanarak 0,5 McFarland standardının esas alınmasıyla steril serum fizyolojik içerisinde süspanse edilmiştir. Hazırlanan bu aktif kültürlerden 800’er μ L alınarak, Bölüm 3.2.1.1’de tespit edilen konsantrasyonlarda 20 mL endüstriyel atık besiyeri içeren erlenlere % 4 oranında aşılanmıştır. İnokülüm sonrası besiyerleri, izolatların uygun gelişme gösterdikleri 37°C sıcaklıkta ve çalkalamalı (120 rpm) koşullarda bakteriye göre değişen 24 veya 48 saat süresince geliştirilmişlerdir. Melas içeren besiyerlerinin pH ayarlamaları HCl ve NaOH ile besiyeri otoklavlanmadan önce ayarlanırken, peynir altı suyu tozu içeren besiyerlerinin pH ayarlamaları HCl ve Na₂CO₃ ile otoklav sonrasında gerçekleştirilmiştir. Her bakteri için seçilen optimum gelişim besiyerleri, bakterilerin pH isteklerinin belirlenmesi amacıyla Çizelge 3.26’da belirtilen pH değerlerine ayarlanmıştır. Bakterilerin gelişimi için gerekli pH istekleri daha önceki çalışmalarda belirlendiğinden Çizelge 3.26’da belirtilen bu pH aralıkları seçilmiştir.

Çizelge 3.26 Test edilen pH değerleri

Bakteri İzolatları	Test edilen pH Değerleri
APT 13a	8,0 – 8,5 – 9,0 – 9,5
APT 14	8,0 – 8,5 – 9,0 – 9,5
APT 20b	8,0 – 8,5 – 9,0 – 9,5
APT 34	8,0 – 8,5 – 9,0 – 9,5
APT 44	7,5 – 8,0 – 8,5 – 9,0

Her bir bakteri için inkübasyon süresi sonrasında, bulanıklaşan kültürlerden, bir seri dilüsyon yapılarak, toplam hücre sayısı damla plak ekim yöntemi ile kob/mL cinsinden

belirlenmiştir. mL başına düşen koloni oluşturan birim; “[Koloni Sayısı/ Dilüsyon Faktörü (10^{-x})] / İnoküle Edilen Hacim” formülü esas alınarak hesaplanmıştır. Bu çalışma sonucunda APT 13a, APT 14, APT 20b, APT 34 ve APT 44 izolatlarının en iyi gelişim gösterdikleri pH değeri seçilebilmiştir.

3.2.2.3 Bakterilerin ideal konsantrasyonlardaki endüstriyel atıklar varlığında optimal sıcaklık isteklerinin belirlenmesi

Önceki bölümlerde anlatıldığı şekliyle aktifleştirilen örnekler 18 – 24 saatlik inkübasyon sonunda petrilerden toplanarak 0,5 McFarland standardının esas alınmasıyla steril serum fizyolojik içerisinde süspanse edilmiştir. Hazırlanan bu aktif kültürlerden 800'er µL 20 mL ideal besiyeri içeren erlenlere % 4 oranında inoküle edilmiştir. İnokülüm sonrası besiyerleri, izolatların uygun gelişme gösterdikleri 37°C sıcaklıkta ve çalkalamalı (120 rpm) koşullarda bakteriye göre değişen 24 veya 48 saat süresince geliştirilmişlerdir. Her bakteri için seçilen konsantrasyonlarda endüstriyel atık içeren ve belirlenen pH değerlerine ayarlanan optimum besiyerleri, bakterilerin sıcaklık isteklerinin belirlenmesi amacıyla Çizelge 3.27’de belirtilen sıcaklık değerlerinde inkübe edilmiştir. İzolatların ideal gelişimleri için gerek duydukları sıcaklık istekleri bilindiğinden bu çalışmada sadece izolata göre değişiklik gösteren farklı sıcaklık değerleri sınanmıştır.

Çizelge 3.27 Test edilen sıcaklık değerleri

Bakteri İzolatları	Test edilen Sıcaklık Değerleri
APT 13a	35°C – 37°C – 40°C – 45°C
APT 14	37°C – 45°C – 50°C – 52°C
APT 20b	35°C – 37°C – 40°C – 45°C
APT 34	35°C – 37°C – 40°C – 42°C – 45°C
APT 44	35°C – 37°C – 40°C – 45°C

Her bir bakteri için inkübasyon süresi sonrasında, bulanıklaşan kültürlerden, bir seri dilüsyon yapılarak, toplam hücre sayısı damla plak ekim yöntemi ile kob/mL cinsinden belirlenmiştir. mL başına düşen koloni oluşturan birim; “[Koloni Sayısı/ Dilüsyon

Faktörü (10^{-x})] / İnoküle Edilen Hacim” formülü esas alınarak hesaplanmıştır. Bu çalışmayla APT 13a, APT 14, APT 20b, APT 34 ve APT 44 izolatlarının en iyi gelişim gösterdikleri sıcaklık değeri belirlenebilmiştir.

3.2.3 Nihai üretim koşulları belirlenen bakterilerde pigment üretiminin optimizasyonu ve bakterilerden karotenoid pigmentlerin ekstraksiyonu

3.2.3.1 Turuncu pigment üreticisi *Exiguobacterium* cinsi bakterilerin pigment üretimlerinin optimizasyonu

Tez çalışmasında kullanılan 5 *Exiguobacterium* cinsi bakteri gözle görünür turuncu pigment üretmektedir. Endüstriyel uygulamalarda kullanılma potansiyeli olan karotenoid pigmentlerin üretim miktarını ve/veya renklenmesini arttırmak amacıyla pigment ekstraksiyonu öncesi, inkübasyon aşamasında farklı parametreler denenmiştir. Yürütülen çalışmalarda hedeflenen turuncu sekonder metabolitin durağan evrede uzun bir inkübasyon süresi sonunda ve mikrobiyal gelişim sonucunda daha yüksek verimle elde edilebildiği tespit edilmiştir. Bu sebeple 3.2.3 başlığı altındaki analizlerde 72 saatlik inkübasyon süresi uygulanmıştır. 72 saat süren inkübasyon süreci aydınlık ve karanlık ortamlarda, statik ve çalkalamalı (120 rpm) koşullarda gerçekleştirilmiştir. Aydınlık koşul için inkübasyon süresince inkübatörün içerisi beyaz led ve floresan ışıkla aydınlatılmıştır. Karanlık koşul ise alüminyum folyo ile sarılan erlenler, ışık almayan karanlık bir inkübatörde tutularak sağlanmıştır.

72 saatlik inkübasyon sonrasında, statik-karanlık, statik-aydınlık, çalkalamalı-karanlık ve çalkalamalı-aydınlık parametreleri denenilen kültürlerden, bir seri dilüsyon yapılarak mikrobiyal gelişim damla plak ekim yöntemi ile kob/mL cinsinden belirlenmiştir. mL başına düşen koloni oluşturan birim; “[Koloni Sayısı/ Dilüsyon Faktörü (10^{-x})] / İnoküle Edilen Hacim” formülü esas alınarak hesaplanmıştır.

3.2.3.2 Bakterilerden karotenoid pigmentlerin ekstraksiyonu

37°C’de 18 - 24 saat süresince petrilere aktifleştirilen kültürlerden koloniler toplanarak, 0,5 McFarland standardının esas alınmasıyla steril serum fizyolojik

içerisinde süspanse edilmişlerdir. Her bir üyenin 0,5 McFarland standardına göre ayarlanmış kültür süspansiyonu, önceki çalışmalarla belirlenen 20 mL hacimdeki endüstriyel atık ihtiva eden ideal besiyerlerine 800'er µL (% 4) inoküle edilmiştir. İnokülasyon yapılan erlenler Bölüm 3.2.3.1'de gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde belirlenen koşullarda 72 saat boyunca inkübe edilmiştir.

72 saatin sonunda gelişen kültürler, besiyerlerini uzaklaştırılmak adına 8000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant ortamdan uzaklaştırılmış ve oluşan pelletler 5 mL steril distile su (dH₂O) ile süspanse edilmiştir. Steril distile su içerisindeki pellet 4000 rpm'de 15 dk tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant atılmış ve kalan renkli pelletler 5 mL metanol ile süspanse edilmiştir. Metanol içerisindeki örnekler, 40 amplitude'de 1 dk sonikasyon + 30 saniye buz üzerinde bekletme döngüsü ile toplam 5 dk boyunca sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Metanol muamelesi ve sonikasyon işlemi sayesinde hücreler patlatılmış ve ürettikleri renkli pigmentler hücre dışına çıkarılmıştır. Sonrasında örnekler 4000 rpm'de 15 dakika boyunca yeniden santrifüj edilmiştir. Santrifüj ardından, renkli süpernatantlar alınmış ve Whatman no.1 filtre kağıtları ile filtre edilmiştir. Pigment ekstraksiyon adımları, pigmentlerin yapılarının bozulmaması adına loş ışıktaki ve tüpler folyoya sarılarak gerçekleştirilmiştir (Sasidharan vd., 2013, Shatila vd., 2013).

Elde edilen renkli pigmentlerin OD₄₀₀₋₄₅₀₋₄₉₀₋₅₀₀₋₅₅₀₋₆₀₀₋₆₆₀ nm dalga boylarındaki absorbansları spektrofotometrik olarak base-line alınarak taranmıştır. Spektrofotometrik ölçümler esnasında blank olarak; örneklerde de çözücü olarak uygulanan metanol kullanılmıştır (Sasidharan vd., 2013, Shatila vd., 2013, Umamaheswari vd., 2013).

3.2.4 Ekstrakte edilen karotenoid pigmentlerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi

Sunulan tez çalışması dahilinde *Exiguobacterium* cinsi izolatlardan ekstrakte edilen karotenoid pigment yapılarının antioksidan aktivitelerine bakılmıştır. Pigment ekstraksiyonu sonrası metanolde çözünmüş olan karotenoid pigment içerikleri 55°C'de

evaporasyona tabi tutularak yoğunlaştırılmış ve toz haline getirilerek bundan sonraki çalışmalarda antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır (Shomali vd., 2019). Antioksidan aktivitelerine bakılmak üzere örnekler hem DMSO (dimetil sülfoksit) hem de metanol ile çözülerek iki farklı çözücünün antioksidan aktivite üzerindeki etkileri de taranmıştır.

3.2.4.1 Ekstrakte edilen pigmentlerin katalaz (CAT) enzim aktivitesine etkilerinin analizi

Ekstraktların katalaz (CAT) enzim aktivitesi, 520 nm'de enzimin hidrojen peroksiti (H_2O_2) suya katalizlediği reaksiyonun spektrofotometrik olarak izlenmesiyle belirlenmiştir. Enzim aktivitesi hidrojen peroksit miktarındaki düşme ile oluşan absorpsiyon azalmasına göre yapılandırılan bir kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır (Aebi, 1984).

Deneyler iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada hidrojen peroksitin düşmesiyle görülen absorpsiyon azalmasına bağlı kalibrasyon eğrisini oluşturmak için, 5 adet ependorfa sırasıyla; 1000 μ L dH_2O , 125 μ L 10 mM'lik H_2O_2 – 875 μ L dH_2O , 250 μ L 10 mM'lik H_2O_2 – 750 μ L dH_2O , 500 μ L 10 mM'lik H_2O_2 – 500 μ L dH_2O ve 750 μ L 10 mM'lik H_2O_2 – 250 μ L dH_2O konulmuştur. Sonra her tüpten 10 μ L çekilip, üzerlerine 1 mL kromojen + HRP karışımı eklenmiştir. Vortekslenen karışım 15 dk karanlık ortamda inkübe edildikten sonra 520 nm dalga boyunda okutulmuş ve okuma sonuçlarına göre H_2O_2 kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Kromojen karışımı aynı gün taze kullanılmak üzere 4-aminoantipirin (4-AP), sodyum 3,5 dikloro-2-hidroksi benzen sülfonat (DHBS) ve 150 mM KP tamponu (pH=7,0), (1 mL:1 mL:3 mL) karışımına horseradish peroksidaz (HRP) enziminden 1 μ L eklenmesi ile hazırlanmıştır.

İkinci aşamada pigment örnekleri 5 μ L alınmış, iki ayrı organik çözücü olan DMSO ve metanol ile 1/2 oranında seri seyreltmelerle 100 mg/mL – 6,25 mg/mL aralığında olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda çözülmüştür. İçerisinde örnek bulunan ependorfların

dışında, kör olarak kullanılmak amacıyla örnek içermeyen ve ayrıca enzim kontrol grubu olarak kullanılmak amacıyla enzim içermeyen ependorflar hazırlanmıştır. Daha sonra, söz konusu konsantrasyonlarda hazırlanan 5 µL örnek bulunduran ependorflara ve diğer ependorflara (kör ve enzim kontrol) sırasıyla; 20 µL 100.1 U/mL'lik katalaz enzimi (enzim kontrol hariç), 55 µL 50 mM'lık potasyum fosfat (pH=7,0) tamponundan ve 100 µL 10 mM'lık H₂O₂ çözeltisinden eklenerek 2 dk süresince oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 2 dk'nın sonunda karışıma 825 µL 15 mM'lık sodyum azit (NaN₃) ilave edilmiş ve oda sıcaklığında, karanlık ortamda 5 dk inkübe edilmiştir. 5 dakikalık ikinci inkübasyondan sonra, her karışımdan 10'ar µL örnek alınıp yeni ependorflara konulmuş ve üzerlerine 1 mL kromojen + HRP karışımı eklenmiştir. İyiçe vortekslenen örnekler karanlık ortamda 40 dk daha inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi dolunca, ortamda kalan H₂O₂ ile kromojen arasında oluşan reaksiyonda ile oluşan pembe renk 520 nm dalga boyunda spektrofotometrede okutulmuştur. Bu işlemler her örneğin, iki ayrı çözücüde süspanse edilmiş tüm konsantrasyonları için ayrı ayrı ve 5 paralel olacak şekilde çalışılmıştır. Enzim aktivitesi aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır.

$$EA \text{ (IU/mL)} = (\Delta H_2O_2/\text{dakika}) \times (\text{seyreltme faktörü}) / \text{deney hacmi}$$

3.2.4.2 Ekstrakte edilen pigmentlerin glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesine etkilerinin analizi

Ekstraktların glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi, 340 nm'de GPx'in etkisiyle glutatyon ve hidrojen peroksitin su ve yükseltgenmiş glutatyona (GSSG) dönüşümü ile ortaya çıkan ürün miktarına bağlı olarak glutatyon redüktazın (GR) NADPH molekülünün ne kadarını NADP'ye oksitlediğinin takip edilmesiyle belirlenmiştir (Paglia vd., 1967).

Pigment örneklerinden 4 µL alınmış, iki ayrı organik çözücü olan DMSO ve metanol ile 1/2 oranında seri seyreltmelerle 100 mg/mL – 6,25 mg/mL aralığında hazırlanmıştır. İçerisinde örnek bulunan ependorflara ilave olarak, kör tüp şeklinde kullanılmak amacıyla örnek içermeyen ve yine enzim kontrol grubu olarak kullanılmak amacıyla da

enzim içermeyen ependorflar hazırlanmıştır. Hazırlanan örneklerden 4 µL bulunan ependorflara ve kör ve enzim kontrolü ependorflarına sırasıyla; 30 µL mix (1100 µL 20 mM'lık GSH + 275 µL 20 U/mL'lik GR + 275 µL 10 mM'lık NADPH çözeltisi ile hazırlanmıştır), 140 µL submix (15180 µL 50 mM 0.5 mM'lık EDTA içeren Tris.HCl (pH=8,0) tamponu + 220 µL 30 mM'lık tert-butyl hidroperoksit (t-BOOH) ile hazırlanmıştır) ve 26 µL 0.25 U/mL'lik GPx enzimi (enzim kontrol grubu hariç) eklenmiştir. Ependorflardaki karışımlar hazırlandıktan hemen sonra 340 nm dalga boyunda optik dansitedeki düşüş 5 dakika süresince spektrofotometrik olarak kaydedilmiştir. Bu işlemler her örneğin, iki ayrı çözücüde süspanse edilmiş tüm konsantrasyonları için ayrı ayrı ve 5 paralel olacak şekilde çalışılmıştır. Enzim aktivitesi aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır.

$$EA \text{ (IU/mL)} = (OD_{340}/\text{dakika}) \times (1/\epsilon_{340}) \times (\text{seyreltme faktörü})$$

NADPH için 340 nm'deki sönmleme katsayısı (ϵ_{340}) = 0,00622 nM⁻¹.cm⁻¹ olarak alınmıştır.

3.2.4.3 Ekstrakte edilen pigmentlerin Glutasyon-S-Transferaz (GST) enzim aktivitesine etkilerinin analizi

GST aktivitesi, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen substratına karşı 340 nm'de tiyoeter oluşumu izlenerek belirlenmiştir. Enzimatik reaksiyonların başlangıç hızı, oluşturulan ve dakikada mililitre başına nanomol olarak rapor edilen glutasyonun konjügasyon ürünü temelinde tanımlanmıştır (Habig vd., 1974).

Pigment örneklerinden 5 µL alınmış, iki ayrı organik çözücü olan DMSO ve metanol ile 1/2 oranında seri seyreltmelerle 100 mg/mL – 6,25 mg/mL aralığında hazırlanmıştır. İçerisinde örnek bulunan ependorfların yanı sıra, kör olarak kullanılmak amacıyla örnek içermeyen ve ayrıca enzim kontrol grubu olarak kullanılmak amacıyla enzim içermeyen ependorflar hazırlanmıştır. Hazırlanan örneklerden 5 µL bulunan ependorflara ve diğer kör ve enzim kontrol ependorflarına sırasıyla; 40 µL 200 mM'lık KP tamponu (pH=6,5), 5 µL sitozol enzimi (enzim kontrol hariç) ve 200 µL mix (10 mL KP

tamponundan 800 µL geri çekilip, 200 µL 200 mM'lık GSH ve 600 µL 50 mM'lık CDNB eklenerek hazırlanmıştır) eklenmiştir. Ependorflardaki karışımlar hazırlandıktan sonra spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda 5 dakika süresince okutulmuştur. Bu işlemler her örneğin, iki ayrı çözücüde süspanse edilmiş tüm konsantrasyonları için ayrı ayrı ve 5 paralel olacak şekilde çalışılmıştır. Enzim aktivitesi aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır.

$$EA \text{ (IU/mL)} = (OD_{340}/\text{dakika}) \times (1/\epsilon_{340}) \times (\text{seyreltme faktörü})$$

NADPH için 340 nm'deki sönümleme katsayısı yine (ϵ_{340}) = 0,00622 nM⁻¹.cm⁻¹ olarak alınmıştır.

3.2.4.4 Ekstrakte edilen pigmentlerin süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesine etkilerinin analizi

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, bazı modifikasyonlarla daha önce tarif edilen bir yöntem kullanılarak ölçülmüştür (Geller vd., 1984).

Ekstrakte edilen pigment örneklerinin SOD enzim aktivitelerinin tayini amacıyla önceki basamaklarda anlatıldığı şekliyle pigment örnekleri 5 µL alınmış, iki ayrı organik çözücü olan DMSO ve metanol ile 1/2 oranında seri seyreltmelerle 100 mg/mL – 6,25 mg/mL aralığında hazırlanmıştır. Kör ve enzim kontrol grupları daha önce anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. 5 µL örnek bulunan ependorflar ile kör ve enzim kontrolü olacak ependorflara sırasıyla; 5 µL sitozol enzimi (enzim kontrol hariç), 150 µL 0,6 mM'lık EDTA ve 4 mg/mL BSA içeren 200 mM sodyum karbonat (Na₂CO₃) tamponu (pH=10,0), 75 µL 0.3 mM'lık ksantin, 10 µL 25 mM'lık nitro blue tetrazolyum (NBT) ve 5 µL 0.139 U/mL'lik ksantin oksidaz ilave edilmiştir. Örnek iyice karıştırıldıktan sonra 550 nm dalga boyunda 5 dakika süresince spektrofotometrede okutulmuştur. Bu işlemler her örneğin, iki ayrı çözücüde süspanse edilmiş tüm konsantrasyonları için ayrı ayrı ve 5 paralel olacak şekilde çalışılmıştır. Enzim aktivitesi aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır.

$$EA(U/mL) = (OD_{k\ddot{o}r} - OD_{test}) / (OD_{k\ddot{o}r}) \times (\text{seyreltme fakt\ddot{o}r\ddot{u}})$$

3.2.5 Ekstrakte edilen karotenoid pigmentlerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi

Tez çalışması dahilinde, *Exiguobacterium* cinsi izolatlardan ekstrakte edilen turuncu karotenoid pigment özütlerinin antimikrobiyal özelliklerine bakılmıştır. İçeriklerin antimikrobiyal özelliklerinin taranması hususunda değerlendirilen çeşitli Gram pozitif ve negatif patojen bakteriler Çizelge 3.28’ de belirtilmiştir.

Çizelge 3.28 Antimikrobiyal aktivite tayininde kullanılan patojen bakteriler

Laboratuvar Kodu	Bakteri Adı
P1*	<i>Escherichia coli</i>
F1*	<i>Escherichia coli</i>
S404*	<i>Salmonella</i> sp.
S340*	<i>Salmonella</i> sp.
ATCC 43300	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)
0157:H7	<i>Escherichia coli</i>
25	<i>Enterococcus faecalis</i>
ATCC 13311	<i>Salmonella enteritidis</i>

* tavuk patojeni izolatlar

Antimikrobiyal aktivitenin taranması için öncelikle; seçilen patojen bakteriler TSA besiyerine çizgi ekim yöntemiyle aşılanarak 37°C’de 18 - 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi dolan aktif haldeki patojen kolonileri petrilere toplanarak steril serum fizyolojik içerisinde 0,5 McFarland standardının esas alınmasıyla süspanse edilmiştir. Uygun bulanıklığa ayarlanan SF içerisindeki patojenler TSA besiyerine yayılmış ve yüzeye yayılımının tamamen kuruması beklenilmiştir.

Takiben Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı şekliyle aktiveleştirilen APT 13a, APT 14, APT 20b, APT 34 ve APT 44 izolatları önceki çalışmalar dahilinde belirlenen 20 mL ideal besiyerlerine 800’er µL oranında inoküle edilerek 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. 72 saat sonunda inkübasyon süreleri dolan bakterilerden Bölüm 3.2.3.2’de anlatılan

yöntemler ile ürettikleri pigmentler ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon esnasında metanol ile çözülmüş durumda olan pigment yapıları, evaporasyon ile yoğunlaştırılarak toz hale getirilmiştir. Antimikrobiyal aktivitelerinin taranabilmesi için toz haldeki karotenoid pigmentler 100 mg/mL olacak şekilde DMSO ve metanol ile ayrı ayrı çözülmüştür. Böylelikle antimikrobiyal aktivitelerine ek olarak iki farklı çözücünün bu özelliklerine olan etkileri değerlendirilebilmiştir.

Organik çözücüler içerisinde hazırlanmış olan örnekler, patojen yayılmış olan petrilere 10'ar µL olacak şekilde damla ekim yöntemi ile spotlanmıştır. Ayrıca çözücülerin etkinliğini test edebilmek amacıyla her iki çözücü de örnek içermeksizin petrilere spotlanarak birer negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Petriler 37°C'de 12 - 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bakterilerin patojenler üzerindeki antagonistik etkileri oluşturdukları şeffaf zonlar üzerinden kontrol edilmiştir (Shatila vd., 2013). Zon çapları mm cinsinden ölçülerek oluşan zonun varlığına, büyüklüğüne (+, ++, +++) ve yokluğuna (-) göre sonuçlar değerlendirilmiştir. Ayrıca, her bir izolat için metanol ve DMSO negatif kontrollerinden elde edilen olası inhibisyon çapları, ölçülen nihai zon çaplarından çıkarılmıştır.

3.2.6 İstatistiksel analizler

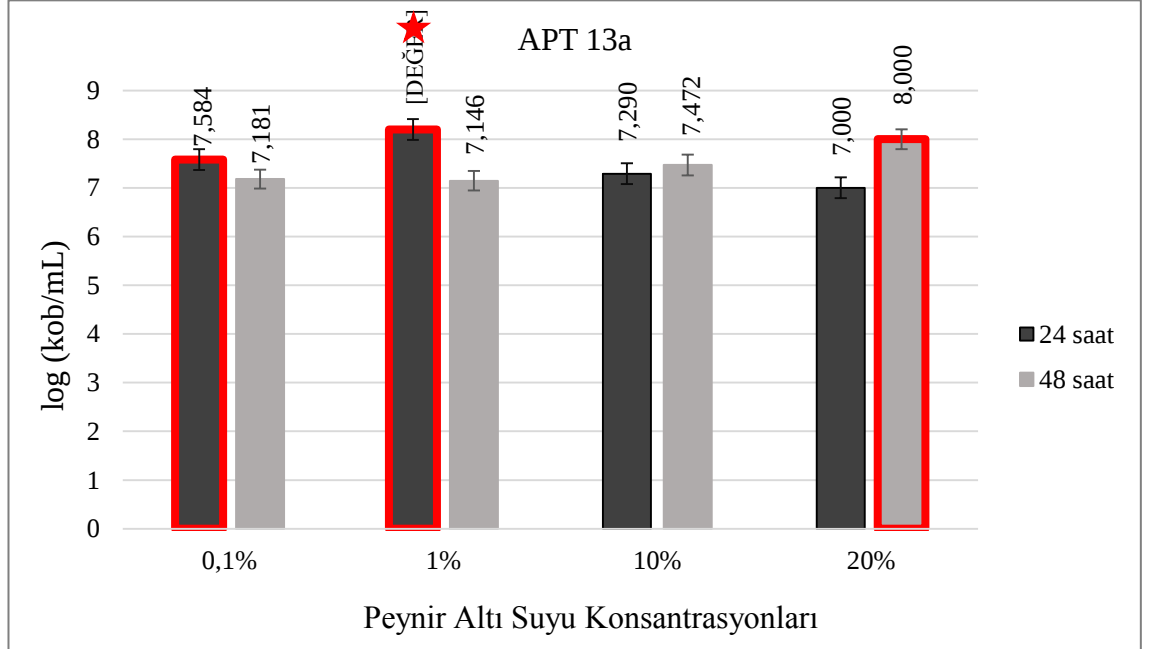
Deney sonuçlarından elde edilen verilerin istatistik analizleri SPSS 22.0 programı ile yapılmış ve optimum gelişim ve pigment üretimi koşullarının seçilmesinde, “Tukey testi, Tek Yönlü Varyans Analizi, Welch Testi ve Games-Howell karşılaştırması” yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 *Exiguobacterium* Cinsi Beş Bakteri İçin En İdeal Mikrobiyal Gelişimin Gözlemlendiği Üretim Koşullarının Seçimi

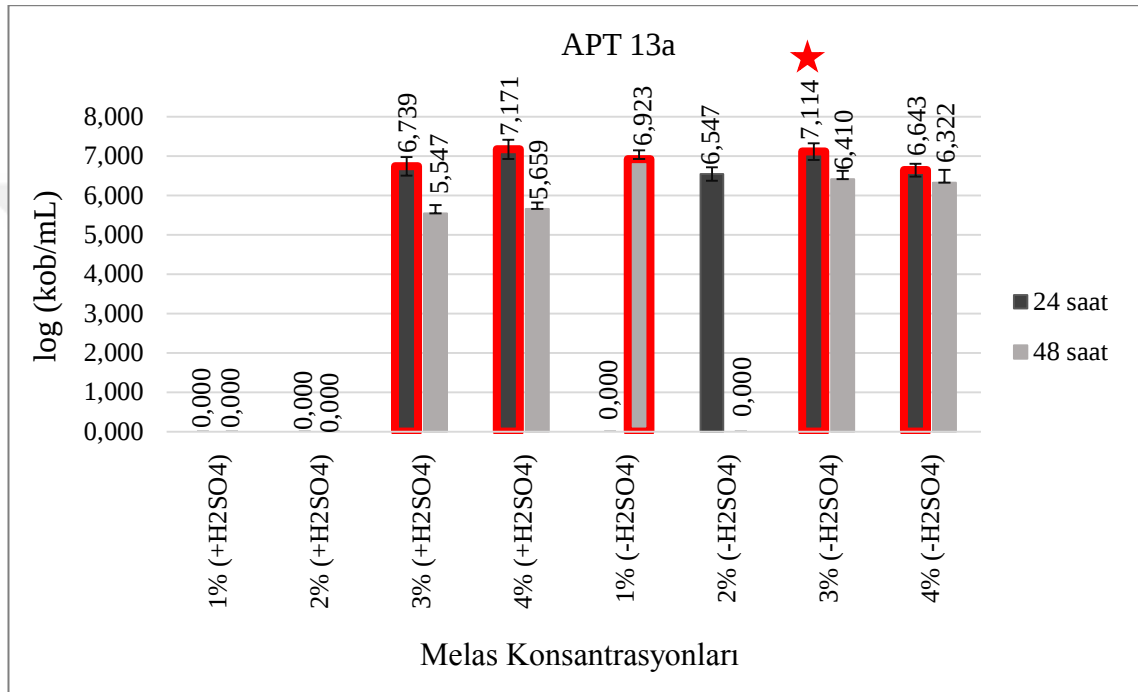
4.1.1 *Exiguobacterium* cinsi bakterilerin peynir altı suyu ve melas gibi endüstriyel atıkların varlığında gelişimlerinin optimizasyonu

Tez kapsamında sınıanan *Exiguobacterium* cinsine dahil oldukları daha önceki çalışmalar dahilinde saptanmış olan beş farklı karotenoid üreticisi bakterinin en iyi mikrobiyal gelişim gösterdiği besiyeri içeriklerini tespit etmek amacıyla yürütülen deneyler Bölüm 3.2.2.1’de açıklandığı şekliyle yapılmıştır. Buna göre APT 13a, APT 14, APT 20b, APT 34 ve APT 44’ün farklı konsantrasyonlarda peynir altı suyu veya melas ihtiva eden besiyerlerinde 24 - 48 saat süresince gerçekleşen inkübasyonlar sonucu yapılan seri dilüsyonlar neticesinde ölçülen mikrobiyal gelişimlerine ait sonuçlar Şekil 4.1 – 4.10 arasındaki grafiklerle sunulmuştur.



Şekil 4.1 APT 13a izolatının farklı konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu içeren besiyerlerindeki 24 - 48 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

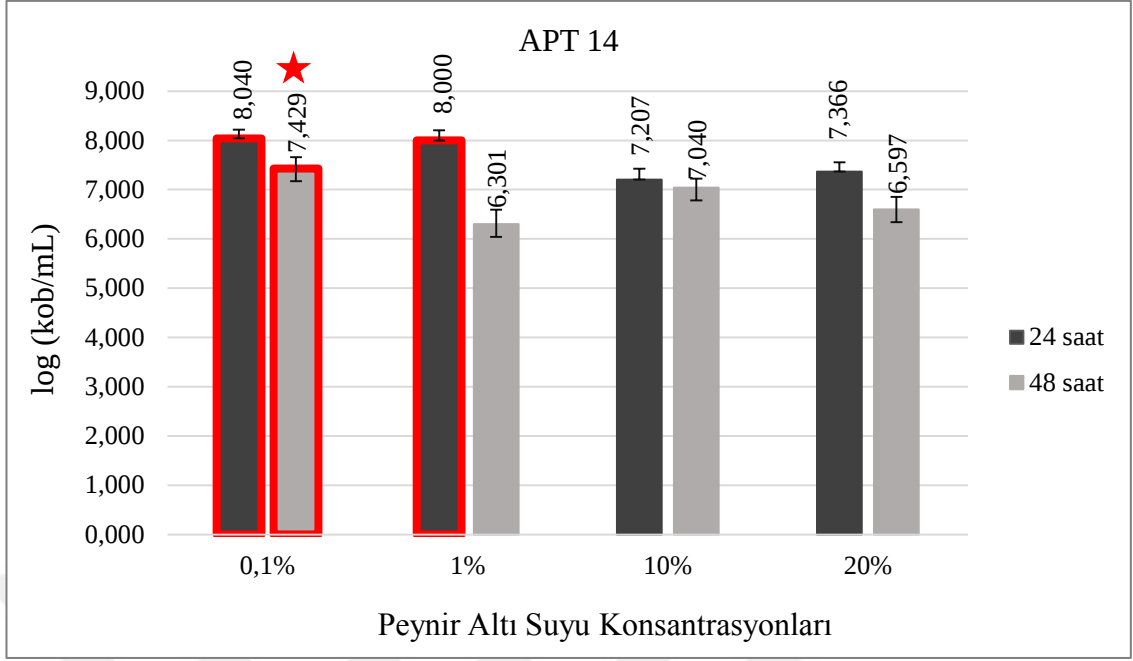
APT 13a'nın 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan peynir altı suyu besiyerleri sırasıyla; % 1 peynir altı suyu ve % 0,1 peynir altı suyu olarak saptanmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda ise gelişimine en çok katkı sağlayan peynir altı suyu besiyeri; % 20 peynir altı suyu olarak saptanmıştır (Şekil 4.1). İşaretli gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır (Tukey Testi, $p < 0,05$).



Şekil 4.2 APT 13a izolatının farklı konsantrasyonlarda melas içeren besiyerlerindeki 24 - 48 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

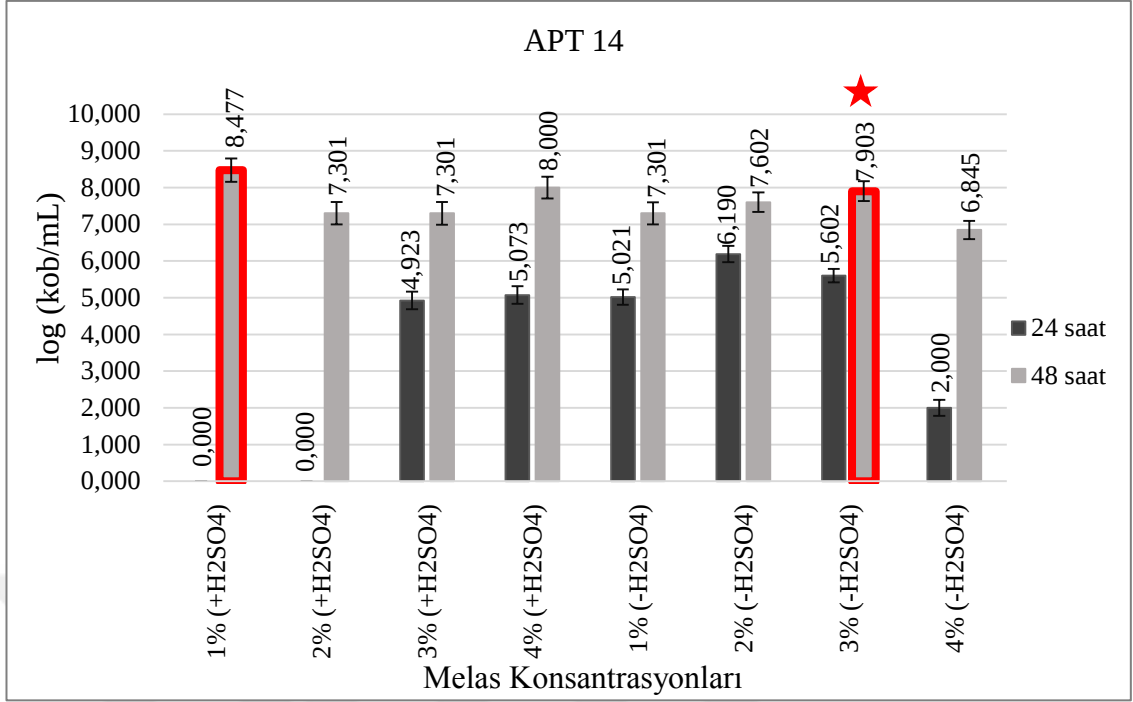
* Sülfürik asitle muamele edilmiş (+H₂SO₄), sülfürik asitle muamele edilmemiş (-H₂SO₄)

APT 13a'nın 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan melas besiyerleri sırasıyla; % 4 melas (+H₂SO₄), % 3 melas (-H₂SO₄), % 3 melas (+H₂SO₄) ve % 4 melas (-H₂SO₄) olarak saptanmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda gelişimine en çok katkı sağlayan melas besiyeri; % 1 melas (-H₂SO₄) olarak saptanmıştır (Şekil 4.2). İşaretli gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır (Tukey Testi, $p < 0,05$).



Şekil 4.3 APT 14 izolatının farklı konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu içeren besiyerlerindeki 24 - 48 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

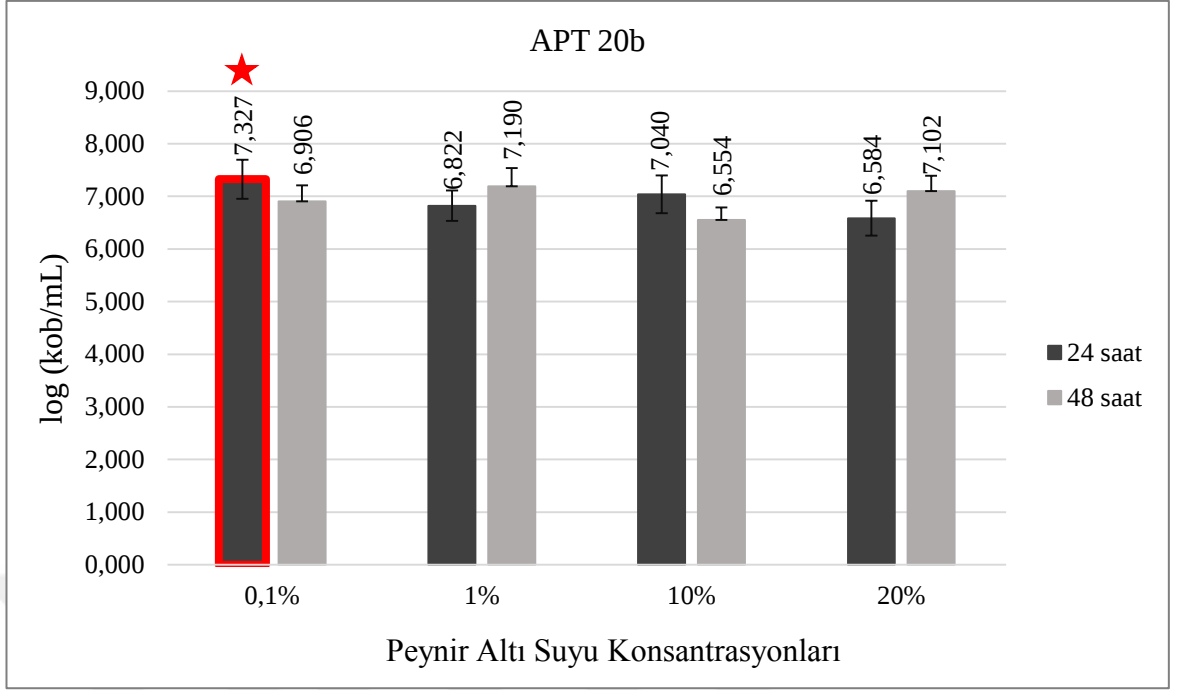
APT 14'ün 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan peynir altı suyu besiyerleri sırasıyla; % 0,1 peynir altı suyu ve % 1 peynir altı suyu olarak saptanmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda gelişimine en çok katkı sağlayan peynir altı suyu besiyeri % 0,1 peynir altı suyu olarak saptanmıştır (Şekil 4.3). İşaretli gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır (Tukey Testi, $p < 0,05$).



Şekil 4.4 APT 14 izolatının farklı konsantrasyonlarda melas içeren besiyerlerindeki 24 - 48 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

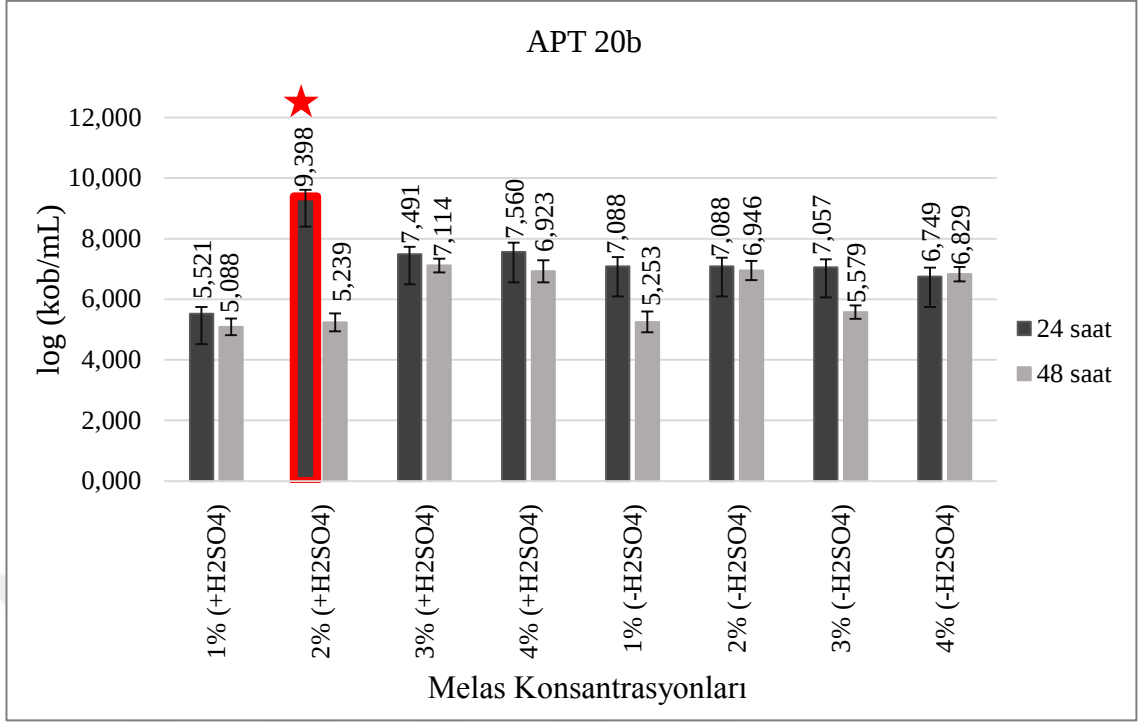
* Sülfürik asitle muamele edilmiş (+H₂SO₄), sülfürik asitle muamele edilmemiş (-H₂SO₄)

APT 14'ün 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan melas besiyeri; % 1 melas (+H₂SO₄) – 48 saat olarak saptanmıştır (Şekil 4.4) (Tukey Testi, $p < 0,05$).



Şekil 4.5 APT 20b izolatının farklı konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu içeren besiyerlerindeki 24 - 48 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

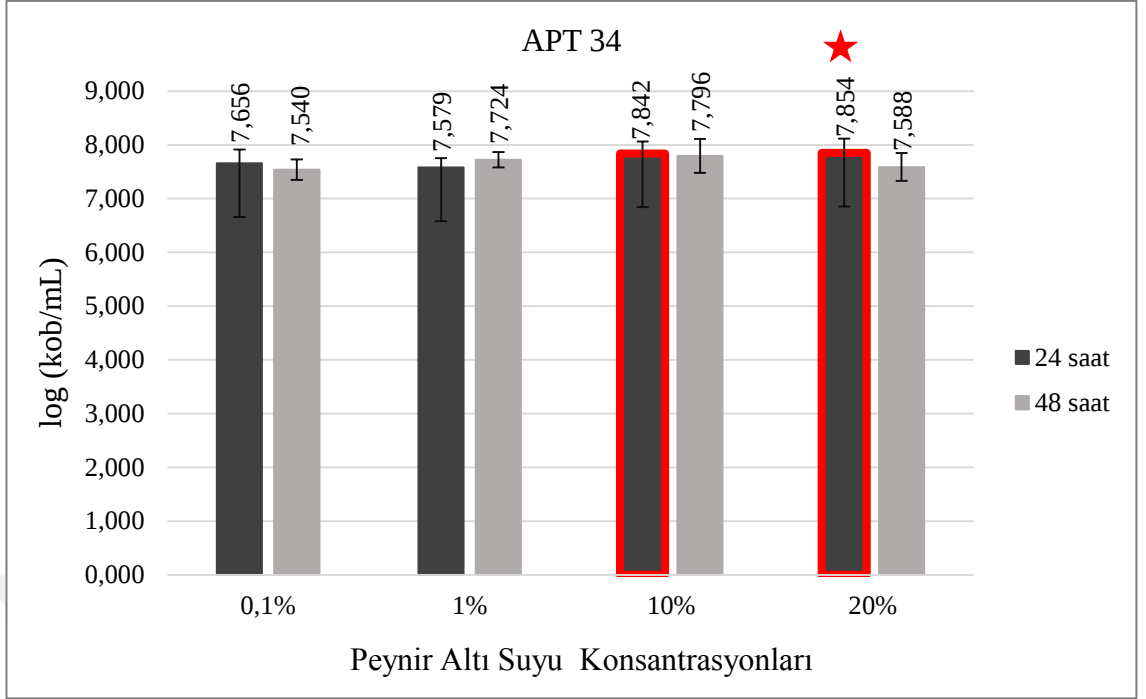
APT 20b'nin 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan peynir altı suyu besiyeri; % 0,1 peynir altı suyu – 24 saat olarak saptanmıştır (Şekil 4.5). Hiçbir grup arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır (Tek Yönlü Varyans Analizi $p= 0,195$).



Şekil 4.6 APT 20b izolatının farklı konsantrasyonlarda melas içeren besiyerlerindeki 24 - 48 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

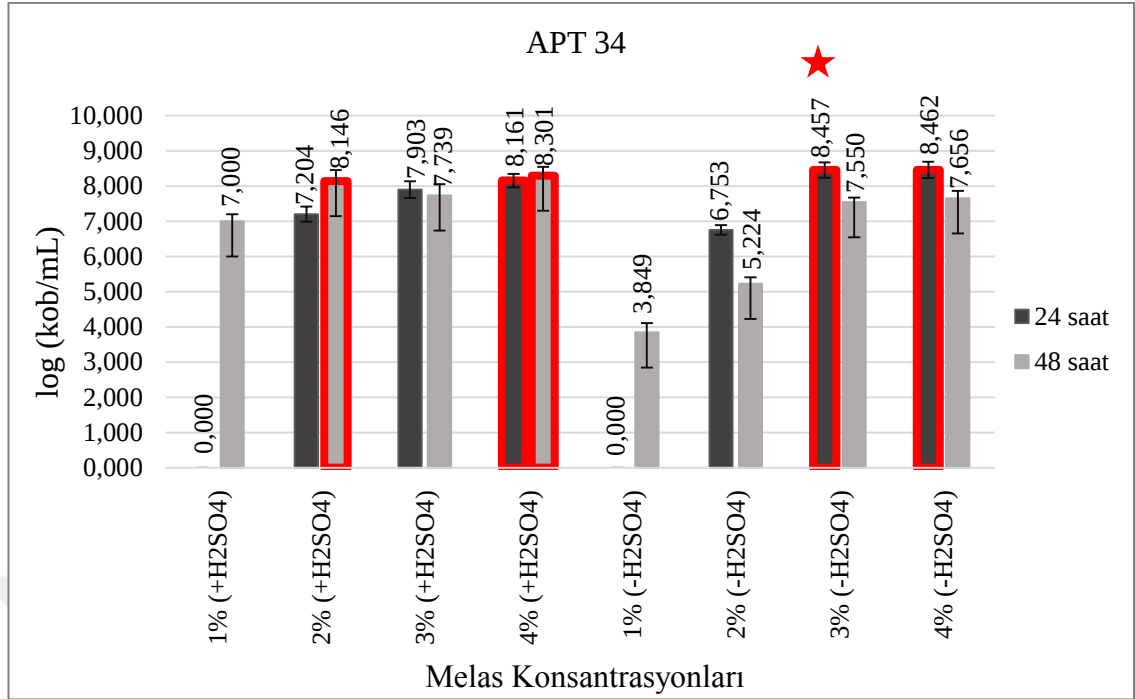
* Sülfürik asitle muamele edilmiş (+H₂SO₄), sülfürik asitle muamele edilmemiş (-H₂SO₄)

APT 20b'nin 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan melas besiyeri; % 2 melas (+H₂SO₄) – 48 saat olarak saptanmıştır (Şekil 4.6) (Tukey Testi, $p < 0,05$).



Şekil 4.7 APT 34 izolatının farklı konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu içeren besiyerlerindeki 24 - 48 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

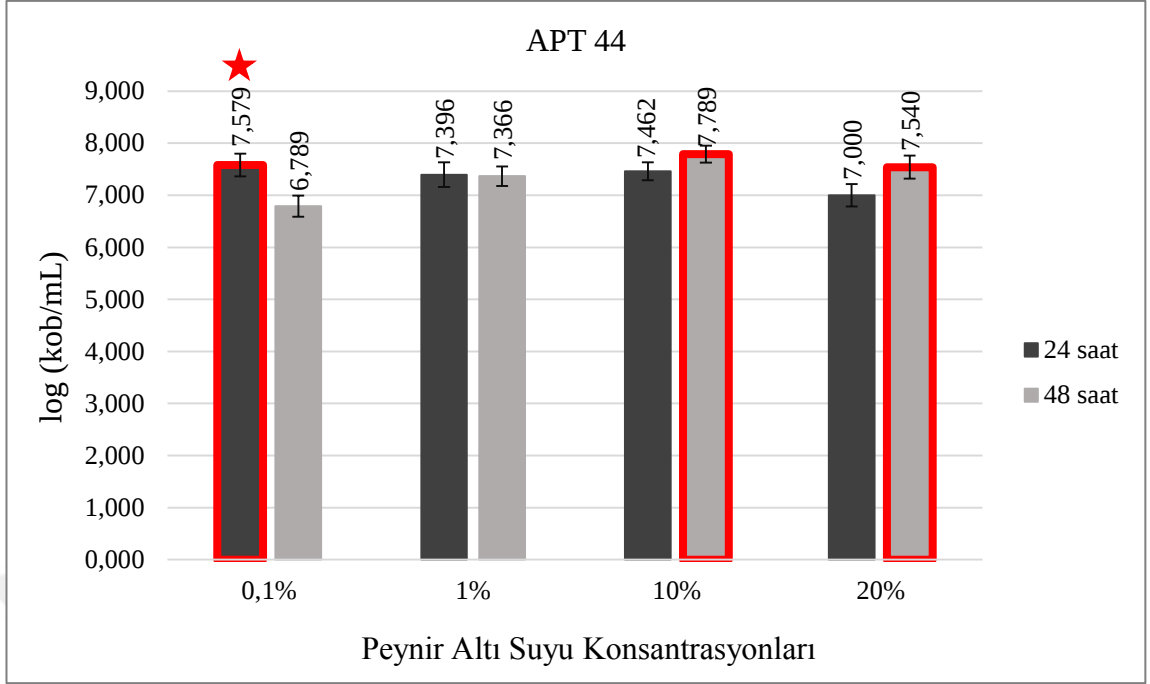
APT 34'ün 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan peynir altı suyu besiyeri; % 10 peynir altı suyu – 24 saat ve % 20 peynir altı suyu – 24 saat olarak saptanmıştır (Şekil 4.7). Hiçbir grup arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır (Tek Yönlü Varyans Analizi $p=0,191$).



Şekil 4.8 APT 34 izolatının farklı konsantrasyonlarda melas içeren besiyerlerindeki 24 - 48 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

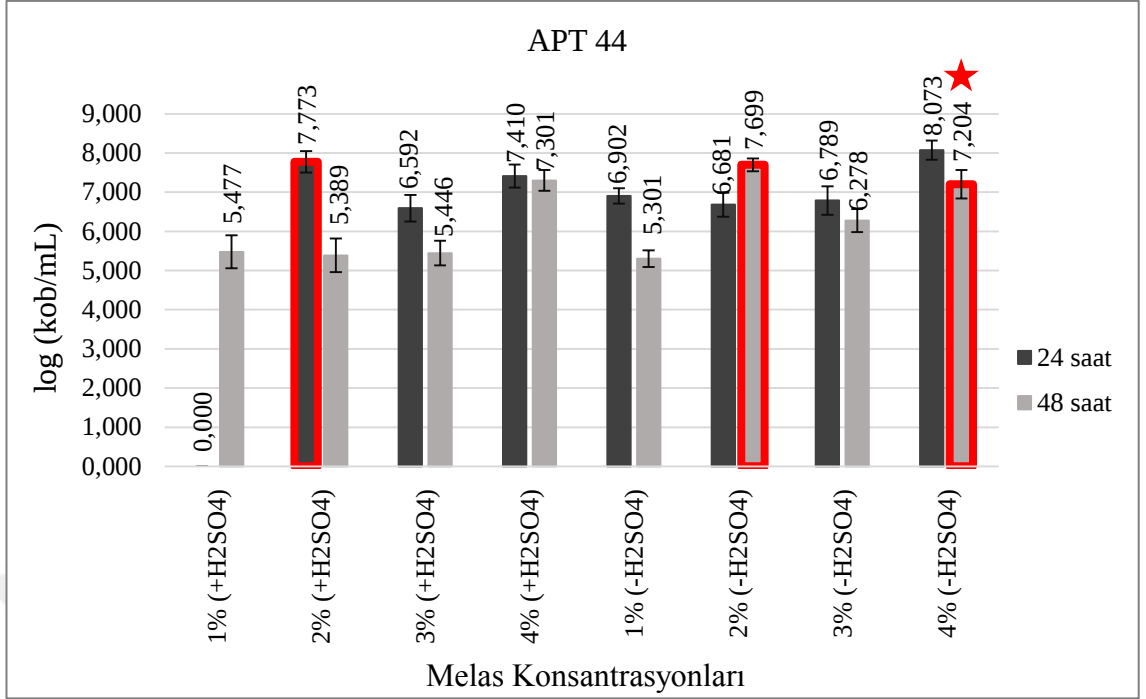
* Sülfürik asitle muamele edilmiş (+H₂SO₄), sülfürik asitle muamele edilmemiş (-H₂SO₄)

APT 34'ün 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan melas besiyerleri sırasıyla; % 4 melas (-H₂SO₄), % 3 melas (-H₂SO₄) ve % 4 melas (+H₂SO₄) olarak saptanmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda gelişimine en çok katkı sağlayan melas besiyerleri ise sırasıyla; % 4 melas (+H₂SO₄) ve % 2 melas (+H₂SO₄) olarak saptanmıştır (Şekil 4.8) (Tukey Testi, $p < 0,05$).



Şekil 4.9 APT 44 izolatının farklı konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu içeren besiyerlerindeki 24 - 48 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

APT 44'ün 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan peynir altı suyu besiyeri; % 0,1 peynir altı suyu olarak saptanmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda gelişimine en çok katkı sağlayan peynir altı suyu besiyerleri sırasıyla; % 10 peynir altı suyu ve % 20 peynir altı suyu olarak saptanmıştır (Şekil 4.9). İşaretli gruplar arasında mikrobiyal gelişim açısından fark bulunamamıştır (Tukey Testi, $p < 0,05$).



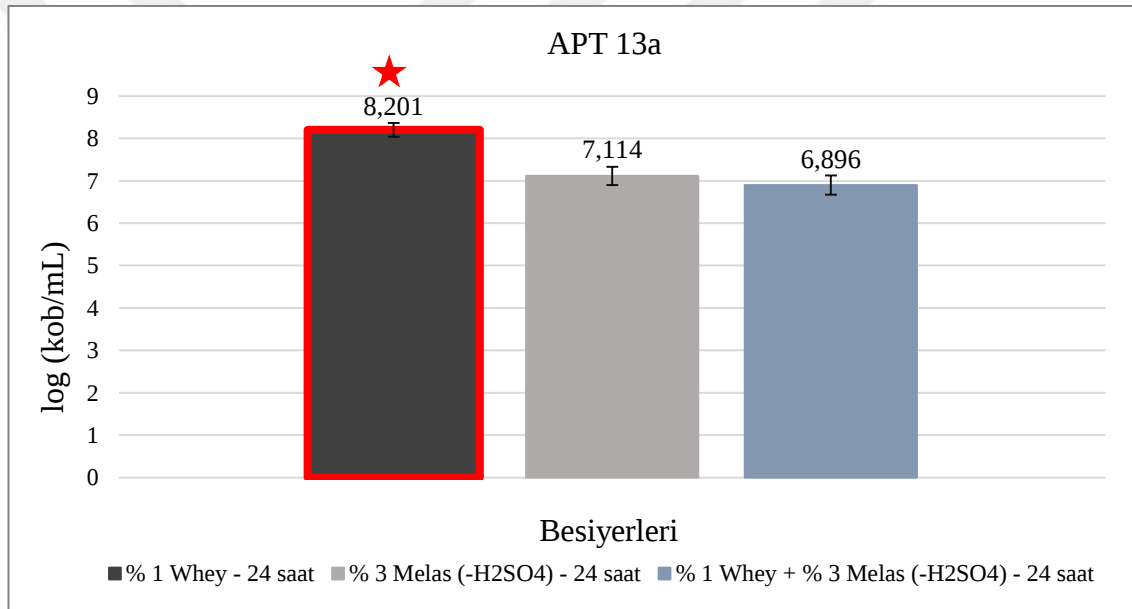
Şekil 4.10 APT 44 izolatının farklı konsantrasyonlarda melas içeren besiyerlerindeki 24 - 48 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

* Sülfürik asitle muamele edilmiş (+H₂SO₄), sülfürik asitle muamele edilmemiş (-H₂SO₄)

APT 44'ün 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan melas besiyeri; % 2 melas (+H₂SO₄) olarak saptanmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda gelişimine en çok katkı sağlayan melas besiyerleri sırasıyla; % 4 melas (-H₂SO₄) ve % 2 melas (-H₂SO₄) olarak saptanmıştır (Şekil 4.10) (Tukey Testi, p < 0,05).

4.1.2 Seçilen en etkili ve ekonomik konsantrasyonlardaki peynir altı suyu ve melasın ikili kombinasyonlarının mikrobiyal gelişime katkıları

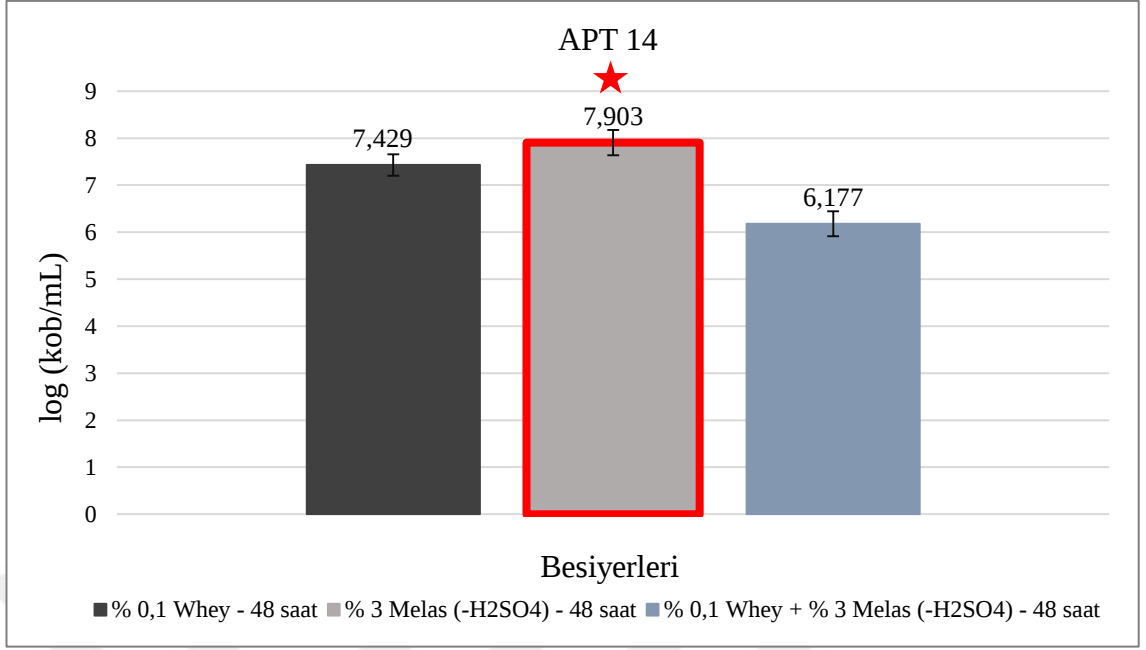
Besiyeri seçimi kapsamında, önceki denemelerde 5 farklı bakterinin en iyi mikrobiyal gelişim gösterdiği belirlenen peynir altı suyu (whey) ve melas içeren besiyerleri bir arada denenmiştir. Buna göre APT 13a, APT 14, APT 20b, APT 34 ve APT 44'ün ideal konsantrasyonlarda peynir altı suyu (whey) ve melas ihtiva eden besiyerlerinde seçilen sürelerde gerçekleşen inkübasyonları neticesinde yapılan seri dilüsyonlar sonucu ölçülen mikrobiyal gelişimlerine ait sonuçlar Şekil 4.11 – 4.15 arasındaki grafiklerle sunulmuştur.



Şekil 4.11 APT 13a izolatı için seçilen konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu ve melas konsantrasyonlarının birlikte denendiği besiyerindeki mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

* Sülfürik asitle muamele edilmiş (+H₂SO₄), sülfürik asitle muamele edilmemiş (-H₂SO₄)

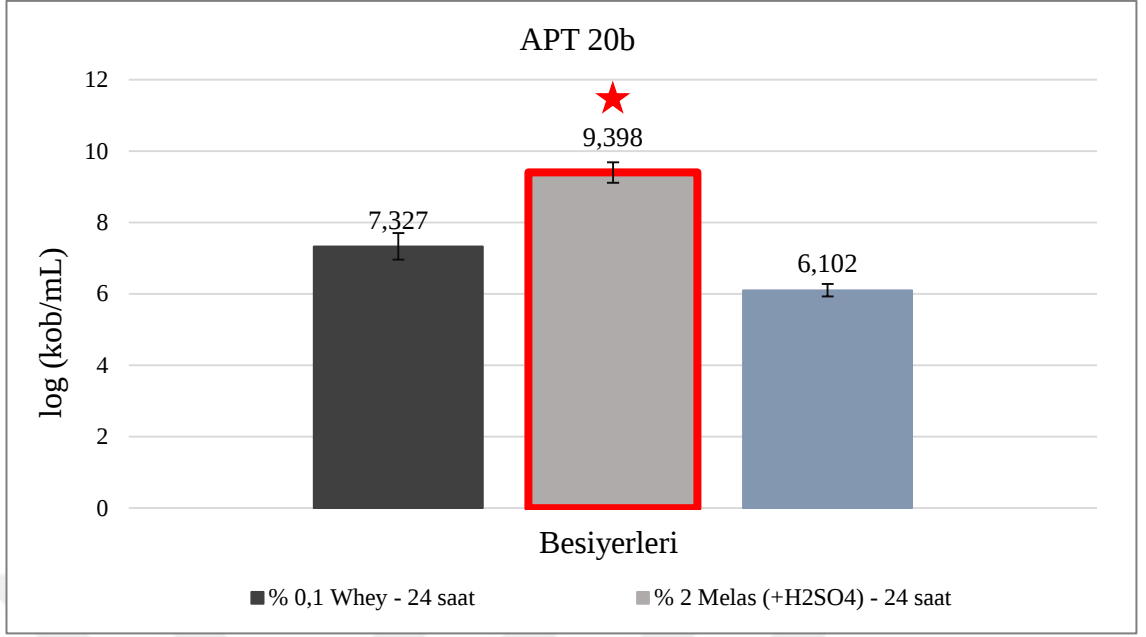
APT 13a için önceki denemelerde belirlendiği üzere % 1 peynir altı suyu ve % 3 melas (-H₂SO₄) içeren besiyerinde 24 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Tüm denenen besiyerleri birbiriyle kıyaslandığında; % 1 peynir altı suyu içeren besiyerinin, bakterinin mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan besiyeri olduğu saptanmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.12 APT 14 izolatı için seçilen konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu ve melas konsantrasyonlarının birlikte denendiği besiyerindeki mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

* Sülfürik asitle muamele edilmiş (+H₂SO₄), sülfürik asitle muamele edilmemiş (-H₂SO₄)

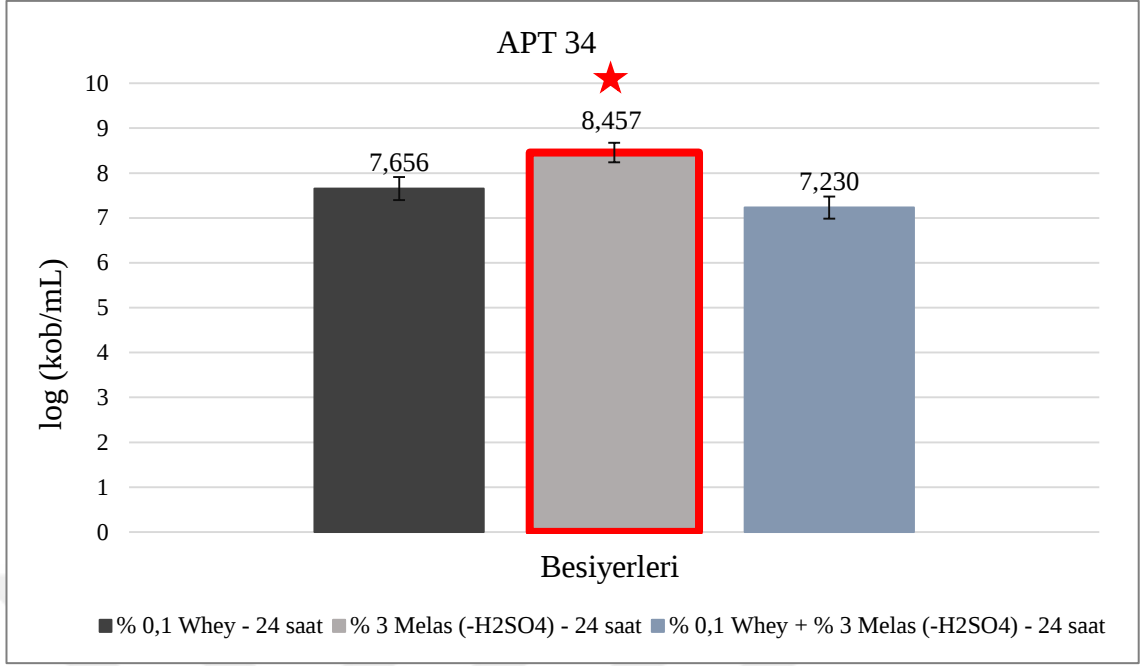
APT 14 için önceki denemelerde belirlendiği üzere % 0,1 peynir altı suyu ve % 3 melas (-H₂SO₄) içeren besiyerinde 48 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Tüm denenen besiyerleri birbiriyle kıyaslandığında; % 3 melas (-H₂SO₄) içeren besiyerinin, bakterinin mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan besiyeri olduğu saptanmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.13 APT 20b izolatu için seçilen konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu ve melas konsantrasyonlarının birlikte denendiği besiyerindeki mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

* Sülfürik asitle muamele edilmiş (+H₂SO₄), sülfürik asitle muamele edilmemiş (-H₂SO₄)

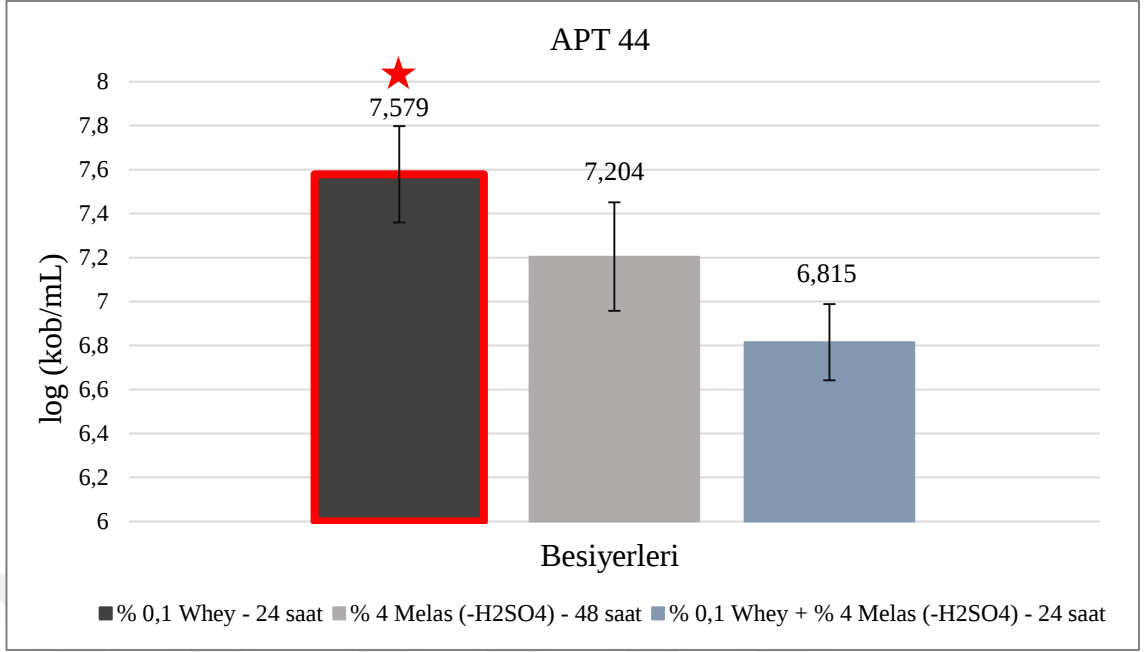
APT 20b için önceki denemelerde belirlendiği üzere % 0,1 peynir altı suyu ve % 2 melas (-H₂SO₄) içeren besiyerinde 24 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Tüm denenen besiyerleri birbiriyle kıyaslandığında; % 2 melas (-H₂SO₄) içeren besiyerinin, bakterinin mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan besiyeri olduğu saptanmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.14 APT 34 izolatı için seçilen konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu ve melas konsantrasyonlarının birlikte denendiği besiyerindeki mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

* Sülfürik asitle muamele edilmiş (+H₂SO₄), sülfürik asitle muamele edilmemiş (-H₂SO₄)

APT 34 için önceki denemelerde belirlendiği üzere % 0,1 peynir altı suyu ve % 3 melas (-H₂SO₄) içeren besiyerinde 24 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Tüm denenen besiyerleri birbiriyle kıyaslandığında; % 3 melas (-H₂SO₄) içeren besiyerinin, bakterinin mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan besiyeri olduğu saptanmıştır (Şekil 4.14).



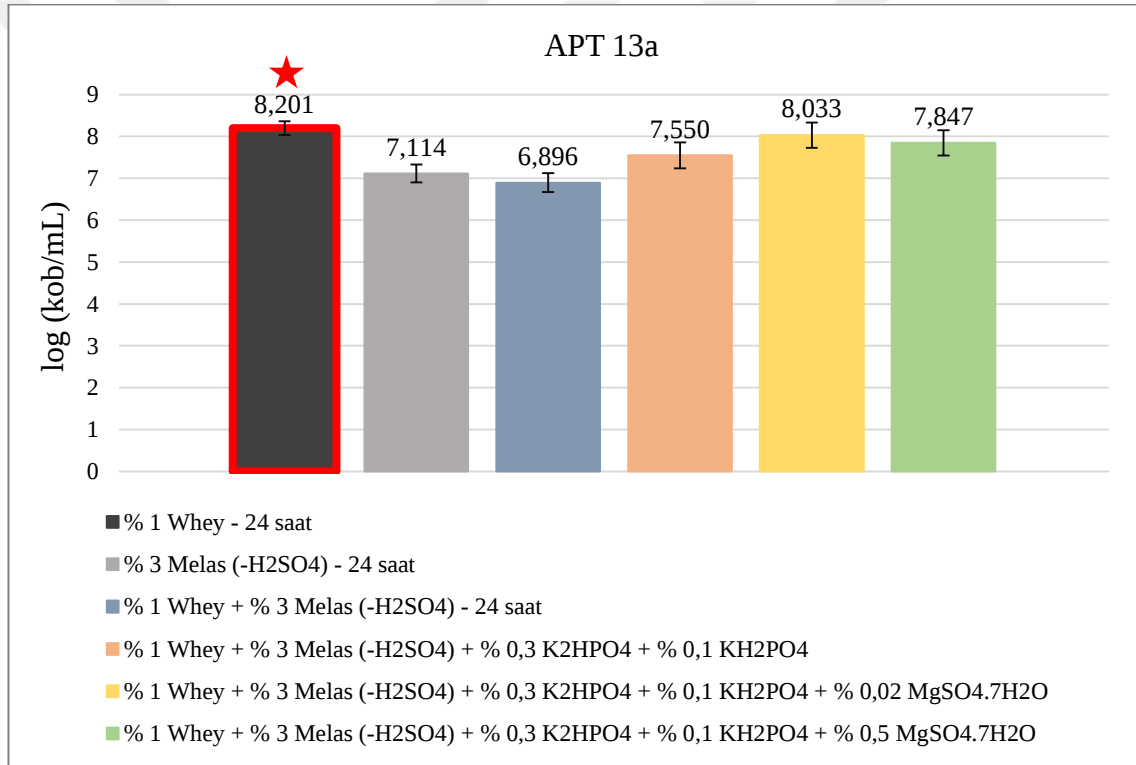
Şekil 4.15 APT 44 izolatı için seçilen konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu ve melas konsantrasyonlarının birlikte denendiği besiyerindeki mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

* Sülfürik asitle muamele edilmiş (+H₂SO₄), sülfürik asitle muamele edilmemiş (-H₂SO₄)

APT 44 için önceki denemelerde belirlendiği üzere % 0,1 peynir altı suyu ve % 4 melas (-H₂SO₄) içeren besiyerinde 24 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Tüm denenen besiyerleri birbiriyle kıyaslandığında; % 0,1 peynir altı suyu içeren besiyerinin, bakterinin mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan besiyeri olduğu saptanmıştır (Şekil 4.15).

4.1.3 İdeal konsantrasyonlardaki endüstriyel atıklar varlığında bakterilerin gelişimleri üzerine çeşitli potasyum ve magnezyum tuzlarının etkisinin belirlenmesi

Besiyeri seçimi kapsamında son olarak, tuz katkılarının 5 farklı bakterinin mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri denenmiştir. Buna göre APT 13a, APT 14, APT 20b, APT 34 ve APT 44'ün ideal konsantrasyonlarda peynir altı suyu (whey) ve melas içeren besiyerlerine potasyum ve magnezyum tuzları eklenerek gerçekleştirilen inkübasyonlar neticesinde yapılan seri dilüsyonlar sonucu ölçülen mikrobiyal gelişimlerine ait sonuçlar Şekil 4.16 – 4.20 arasındaki grafiklerle sunulmuştur.

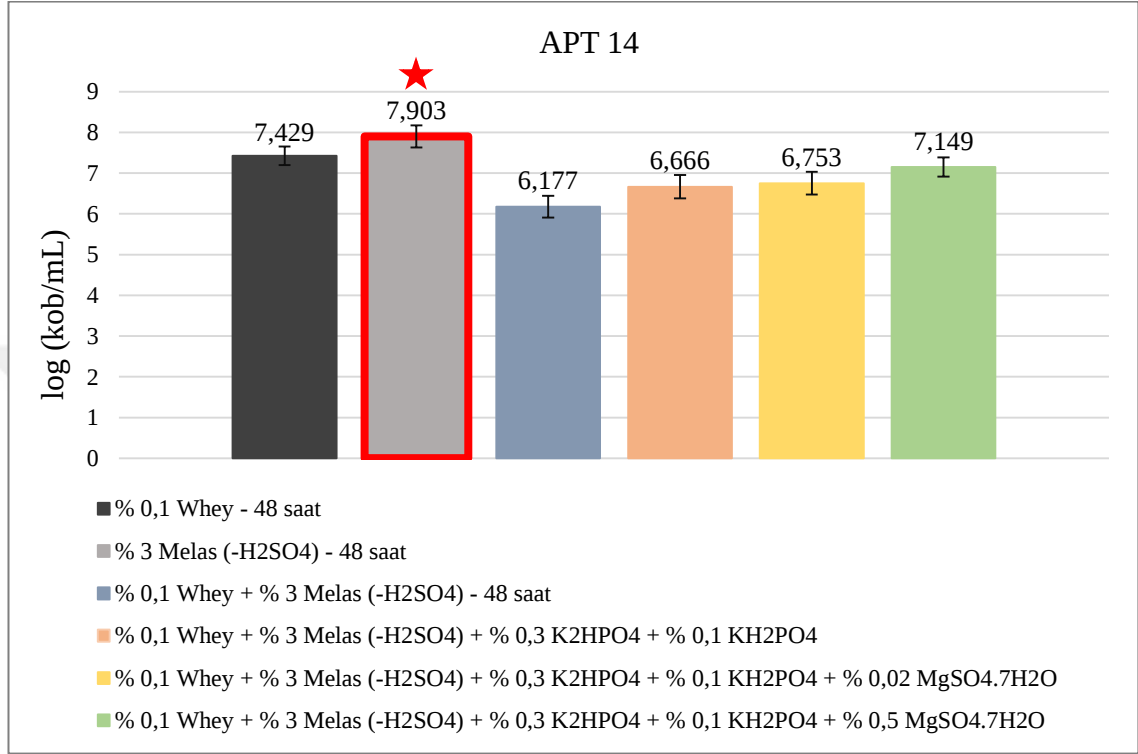


Şekil 4.16 APT 13a'nın seçilen konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu ve melas konsantrasyonlarının çeşitli potasyum ve magnezyum tuzlarıyla birlikte denendiği besiyerlerindeki mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

* Sülfürik asitle muamele edilmiş (+H₂SO₄), sülfürik asitle muamele edilmemiş (-H₂SO₄)

APT 13a için önceki denemelerde belirlendiği üzere % 1 peynir altı suyu ve % 3 melas (-H₂SO₄) içeren besiyerine çeşitli konsantrasyonlarda potasyum ve magnezyum tuzları eklenerek 24 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Tüm denenen besiyerleri birbiriyle

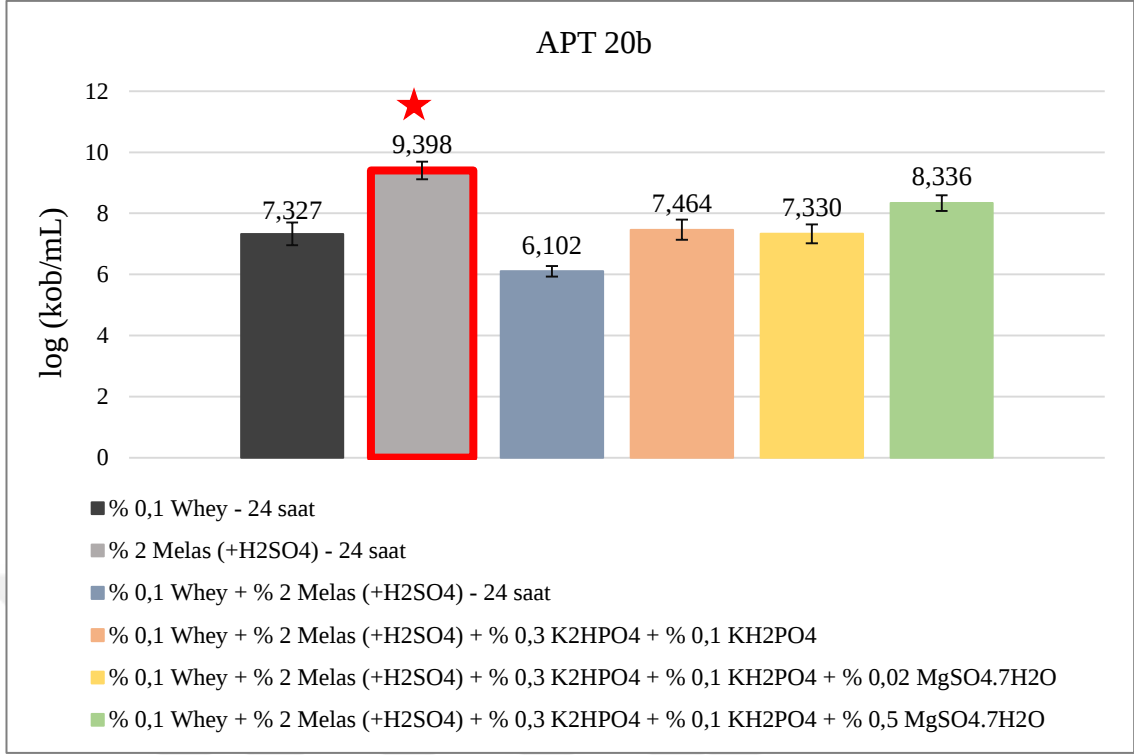
kıyaslandığında; sadece % 1 peynir altı suyu içeren besiyerinin, bakterinin mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan ve en ekonomik besiyeri olduğu saptanmıştır (Şekil 4.16).



Şekil 4.17 APT 14'ün seçilen konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu ve melas konsantrasyonlarının çeşitli potasyum ve magnezyum tuzlarıyla birlikte denendiği besiyerlerindeki mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

* Sülfürik asitle muamele edilmiş (+H₂SO₄), sülfürik asitle muamele edilmemiş (-H₂SO₄)

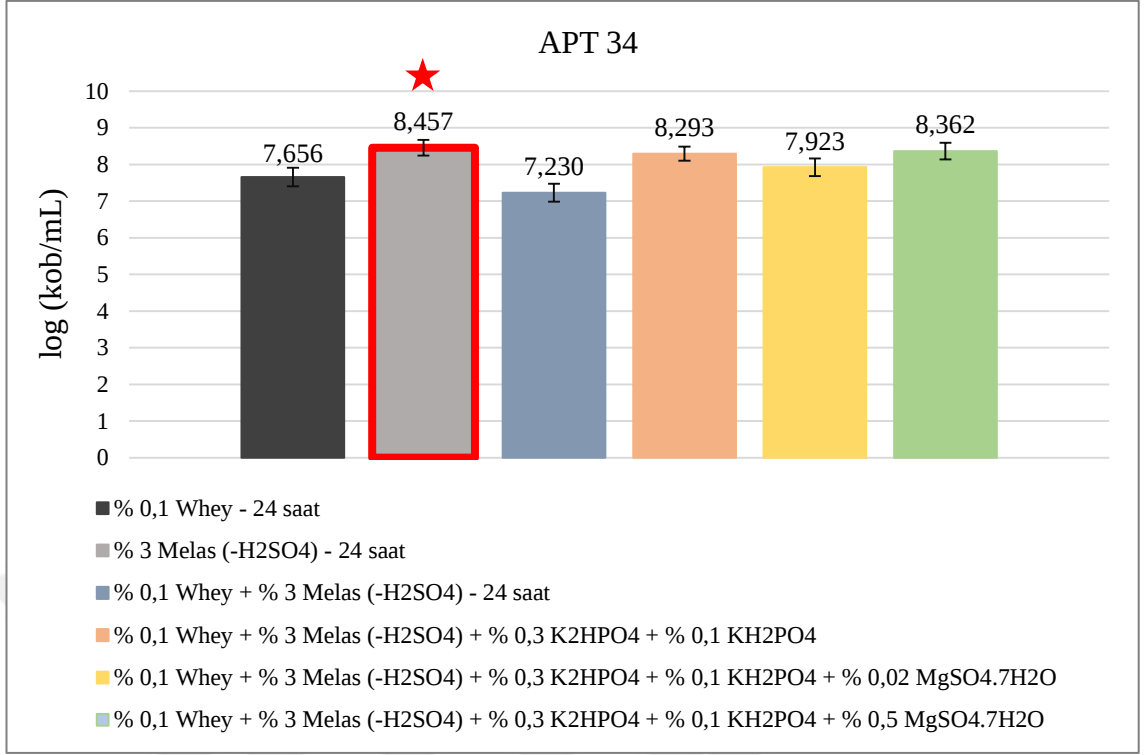
APT 14 için önceki denemelerde belirlendiği üzere % 0,1 peynir altı suyu ve % 3 melas (-H₂SO₄) içeren besiyerine çeşitli konsantrasyonlarda potasyum ve magnezyum tuzları eklenerek 48 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Tüm denenen besiyerleri birbiriyle kıyaslandığında; % 3 melas (-H₂SO₄) içeren besiyerinin, bakterinin mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan ve en ekonomik besiyeri olduğu saptanmıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.18 APT 20b'nin seçilen konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu ve melas konsantrasyonlarının çeşitli potasyum ve magnezyum tuzlarıyla birlikte denendiği besiyerlerindeki mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

* Sülfürik asitle muamele edilmiş (+H₂SO₄), sülfürik asitle muamele edilmemiş (-H₂SO₄)

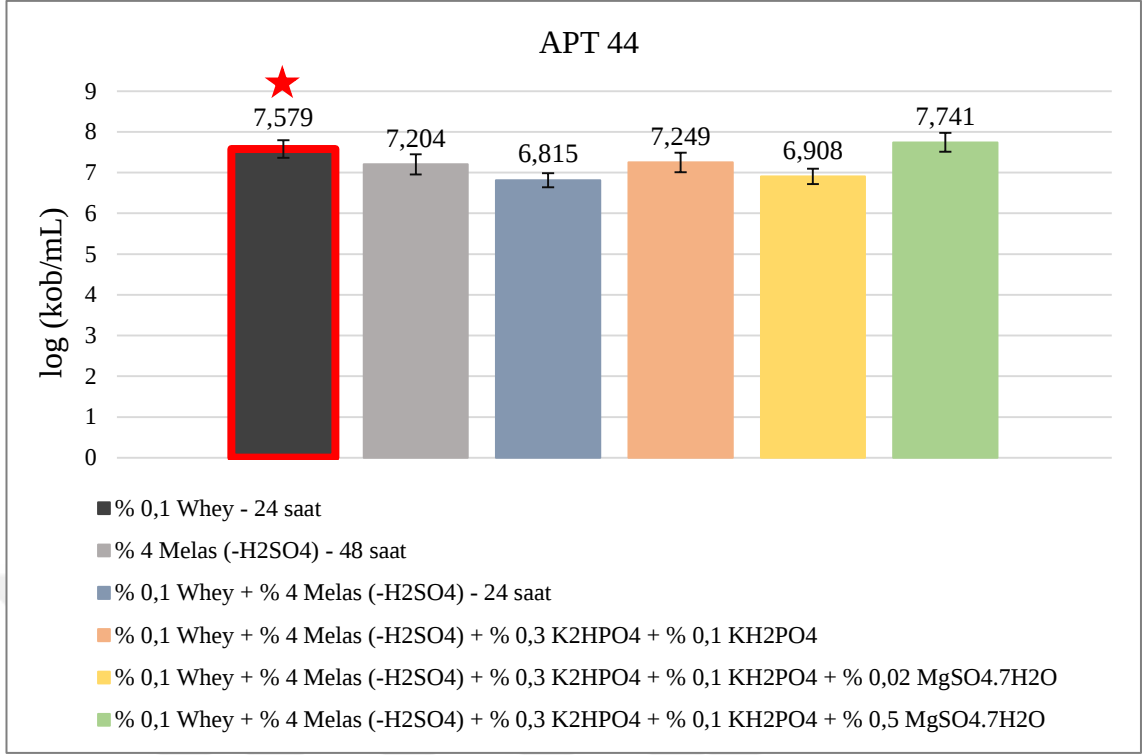
APT 20b için önceki denemelerde belirlendiği üzere % 0,1 peynir altı suyu ve % 2 melas (-H₂SO₄) içeren besiyerine çeşitli konsantrasyonlarda potasyum ve magnezyum tuzları eklenerek 24 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Tüm denenen besiyerleri birbiriyle kıyaslandığında; % 2 melas (-H₂SO₄) içeren besiyerinin, bakterinin mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan ve en ekonomik besiyeri olduğu saptanmıştır (Şekil 4.18).



Şekil 4.19 APT 34'ün seçilen konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu ve melas konsantrasyonlarının çeşitli potasyum ve magnezyum tuzlarıyla birlikte denendiği besiyerlerindeki mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

* Sülfürik asitle muamele edilmiş (+H₂SO₄), sülfürik asitle muamele edilmemiş (-H₂SO₄)

APT 34 için önceki denemelerde belirlendiği üzere % 0,1 peynir altı suyu ve % 3 melas (-H₂SO₄) içeren besiyerine çeşitli konsantrasyonlarda potasyum ve magnezyum tuzları eklenerek 24 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Tüm denenen besiyerleri birbiriyle kıyaslandığında; % 3 melas (-H₂SO₄) içeren besiyerinin, bakterinin mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan ve en ekonomik besiyeri olduğu saptanmıştır (Şekil 4.19).



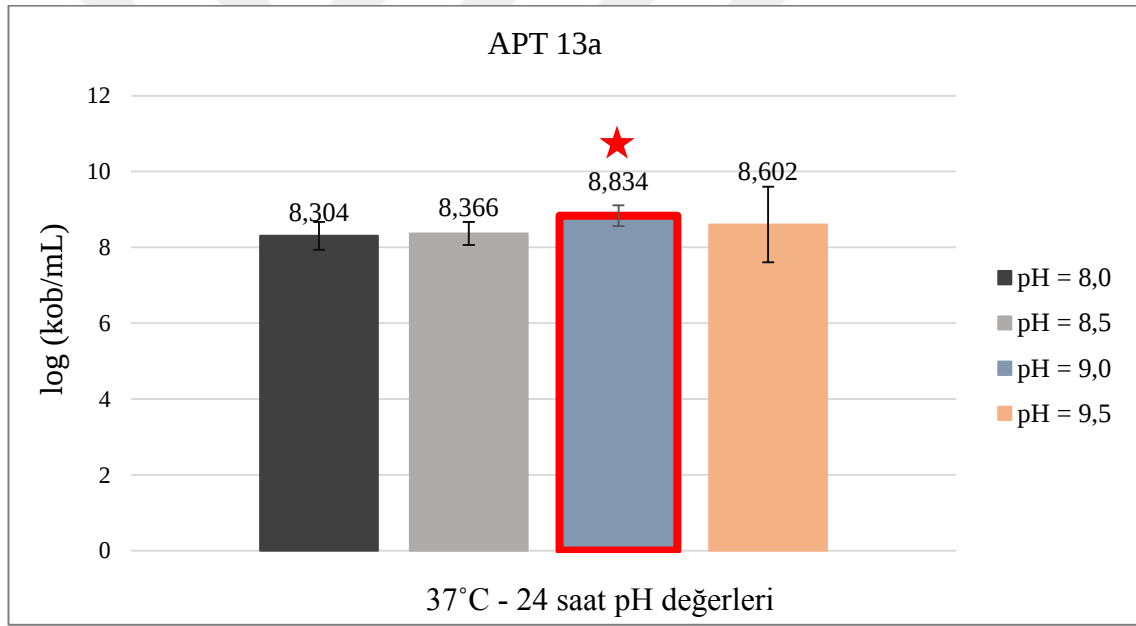
Şekil 4.20 APT 44'ün seçilen konsantrasyonlarda peynir altı suyu tozu ve melas konsantrasyonlarının çeşitli potasyum ve magnezyum tuzlarıyla birlikte denendiği besiyerlerindeki mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

* Sülfürik asitle muamele edilmiş (+H₂SO₄), sülfürik asitle muamele edilmemiş (-H₂SO₄)

APT 44 için önceki denemelerde belirlendiği üzere % 0,1 peynir altı suyu ve % 4 melas (-H₂SO₄) içeren besiyerine çeşitli konsantrasyonlarda potasyum ve magnezyum tuzları eklenerek 24 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Tüm denenen besiyerleri birbiriyle kıyaslandığında; % 0,1 peynir altı suyu içeren besiyerinin, bakterinin mikrobiyal gelişimine katkı sağlayan ve en ekonomik besiyeri olduğu saptanmıştır (Şekil 4.20).

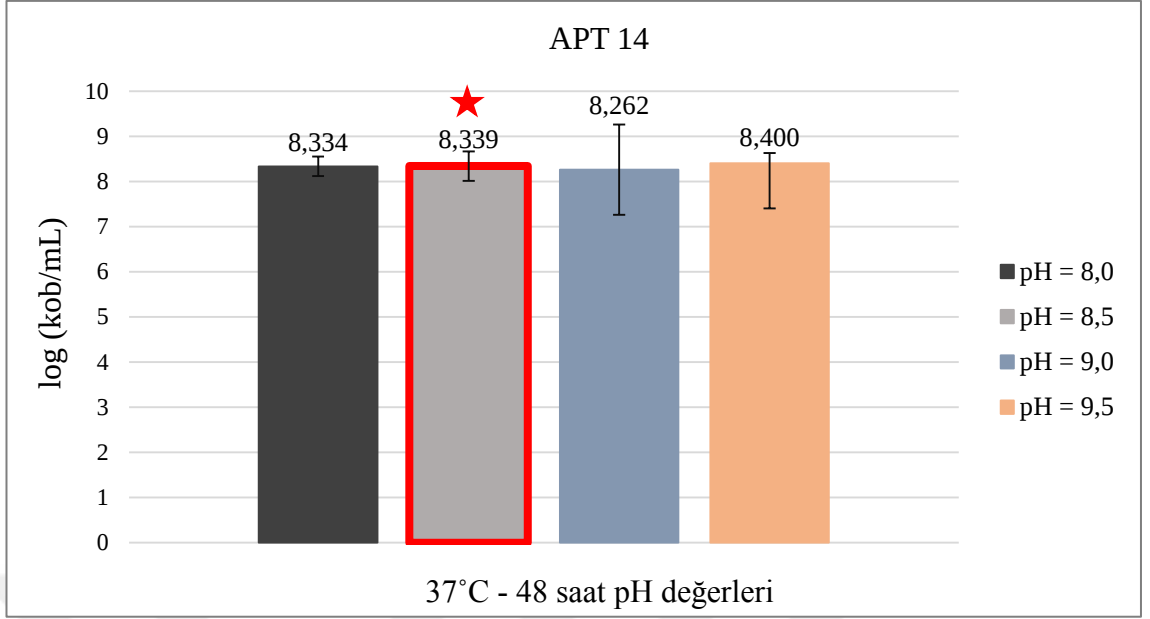
4.1.4 En ideal mikrobiyal gelişim gözlenen pH değerinin belirlenmesi

Tez kapsamında çalışılan 5 farklı karotenoid üreticisi *Exiguobacterium* cinsine dahil bakterinin ideal konsantrasyonlarda endüstriyel atıklar içeren besiyerlerinde, en iyi mikrobiyal gelişim gösterdiği pH değerini tespit etmek amacıyla yürütülen deneyler Bölüm 3.2.2.2’de açıklandığı şekliyle yapılmıştır. Buna göre APT 13a, APT 14, APT 20b, APT 34 ve APT 44’ün belirlenen konsantrasyonlarda peynir altı suyu (whey) ve/veya melas ihtiva eden besiyerlerinde, belirlenen sürelerde ve farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen inkübasyonları sonrası yapılan seri dilüsyonlar sonucu ölçülen mikrobiyal gelişimlerine ait sonuçlar Şekil 4.21 – 4.25 arasındaki grafiklerle sunulmuştur.



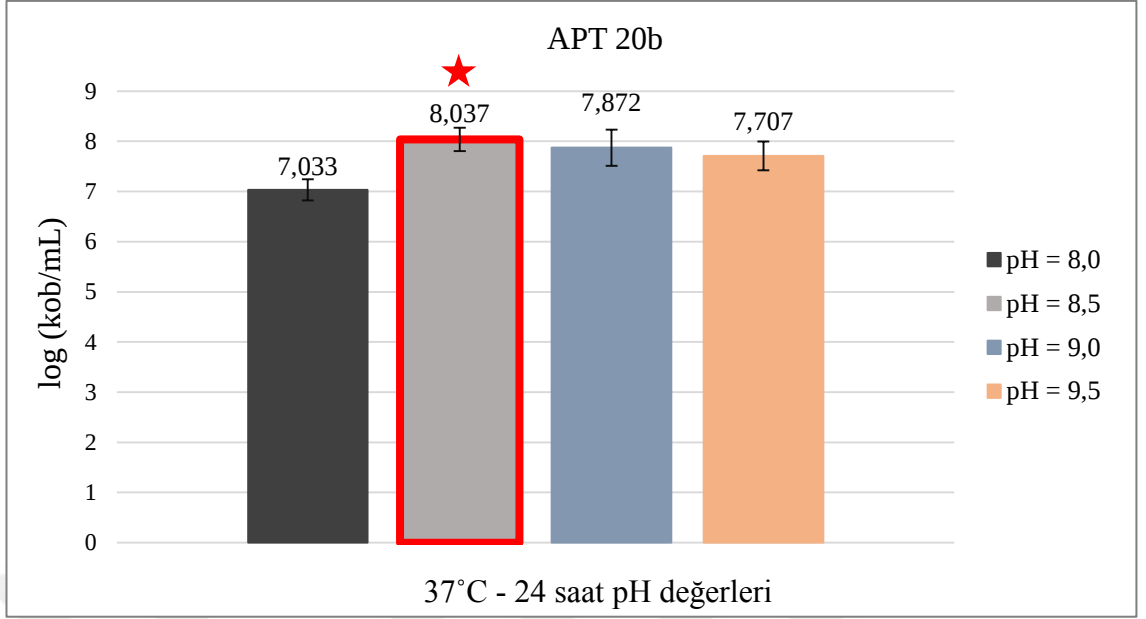
Şekil 4.21 APT 13a izolatının % 1 peynir altı suyu içeren besiyerinde, farklı pH değerlerinde 24 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

APT 13a’nın % 1 peynir altı suyu içeren besiyerinde, farklı pH değerlerinde 24 saatlik inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm denenen pH değerleri birbiriyle kıyaslandığında; pH 9,0 bakterinin mikrobiyal gelişimine katkı sağlayan ve en ekonomik pH değeri olarak saptanmıştır (Şekil 4.21).



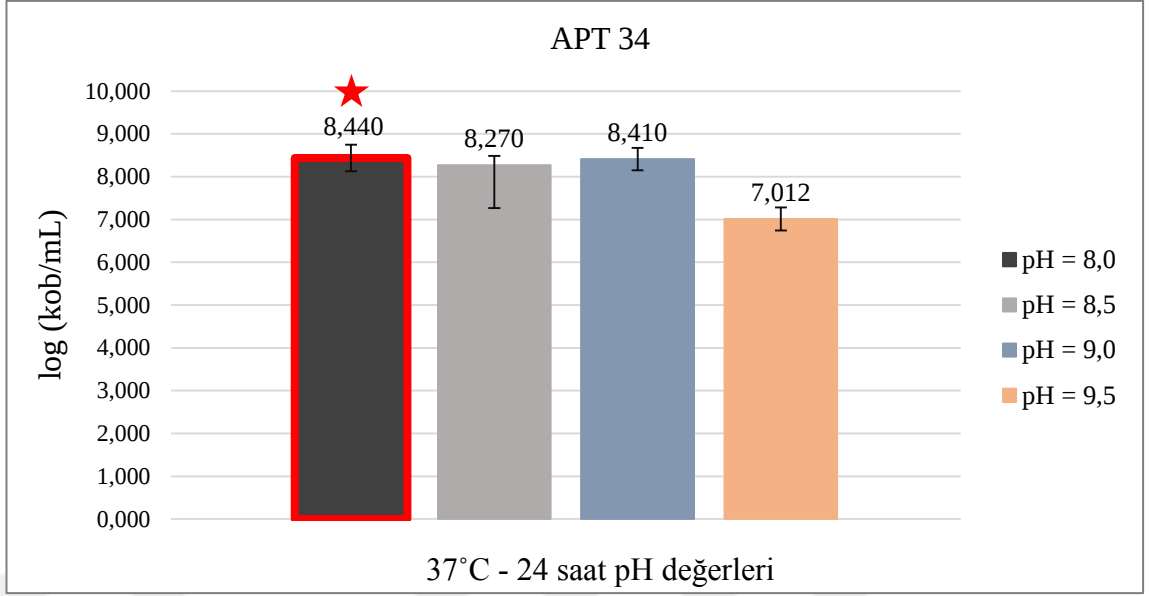
Şekil 4.22 APT 14 izolatının % 3 melas ($\text{-H}_2\text{SO}_4$) içeren besiyerinde, farklı pH değerlerinde 48 saatlik mikrobiyal gelişimi ($\log(\text{kob/mL})$)

APT 14'ün % 3 melas ($\text{-H}_2\text{SO}_4$) içeren besiyerinde, farklı pH değerlerinde 48 saatlik inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm denenen pH değerleri birbiriyle kıyaslandığında; pH 8,5 bakterinin mikrobiyal gelişimine katkı sağlayan ve en ekonomik pH değeri olarak saptanmıştır (Şekil 4.22).



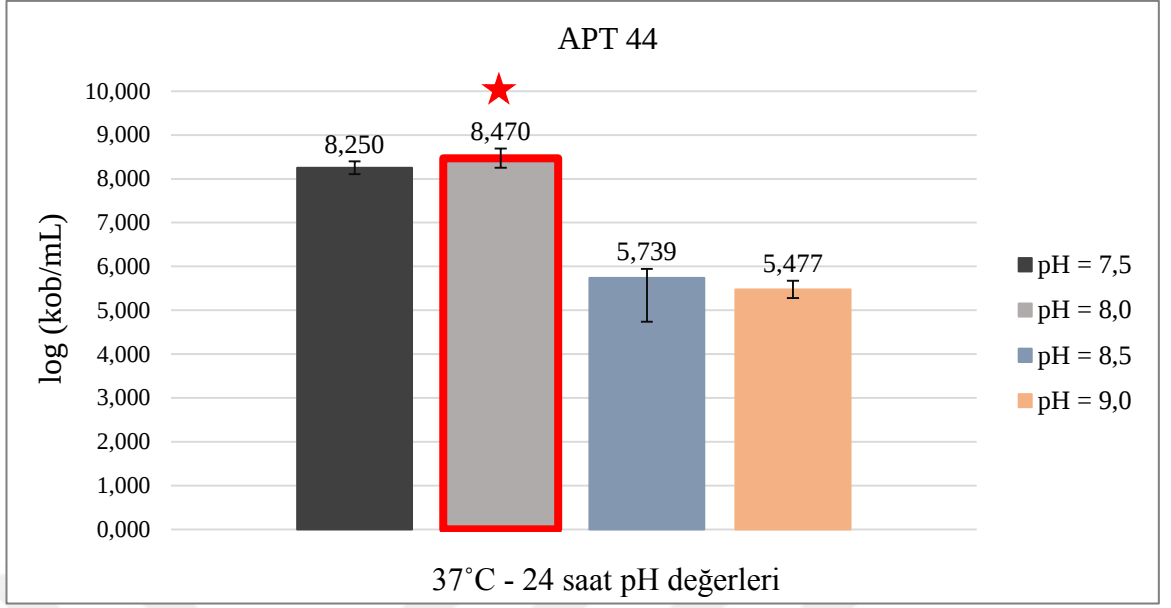
Şekil 4.23 APT 20b izolatının % 2 melas ($\text{-H}_2\text{SO}_4$) içeren besiyerinde, farklı pH değerlerinde 24 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

APT 20b'nin % 2 melas ($\text{-H}_2\text{SO}_4$) içeren besiyerinde, farklı pH değerlerinde 24 saatlik inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm denenen pH değerleri birbiriyle kıyaslandığında; pH 8,5 bakterinin mikrobiyal gelişimine katkı sağlayan ve en ekonomik pH değeri olarak saptanmıştır (Şekil 4.23).



Şekil 4.24 APT 34 izolatının % 3 melas ($\text{-H}_2\text{SO}_4$) içeren besiyerinde, farklı pH değerlerinde 24 saatlik mikrobiyal gelişimi ($\log(\text{kob/mL})$)

APT 34'ün % 3 melas ($\text{-H}_2\text{SO}_4$) içeren besiyerinde, farklı pH değerlerinde 24 saatlik inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm denenen pH değerleri birbiriyle kıyaslandığında; pH 8,0 bakterinin mikrobiyal gelişimine katkı sağlayan ve en ekonomik pH değeri olarak saptanmıştır (Şekil 4.24).

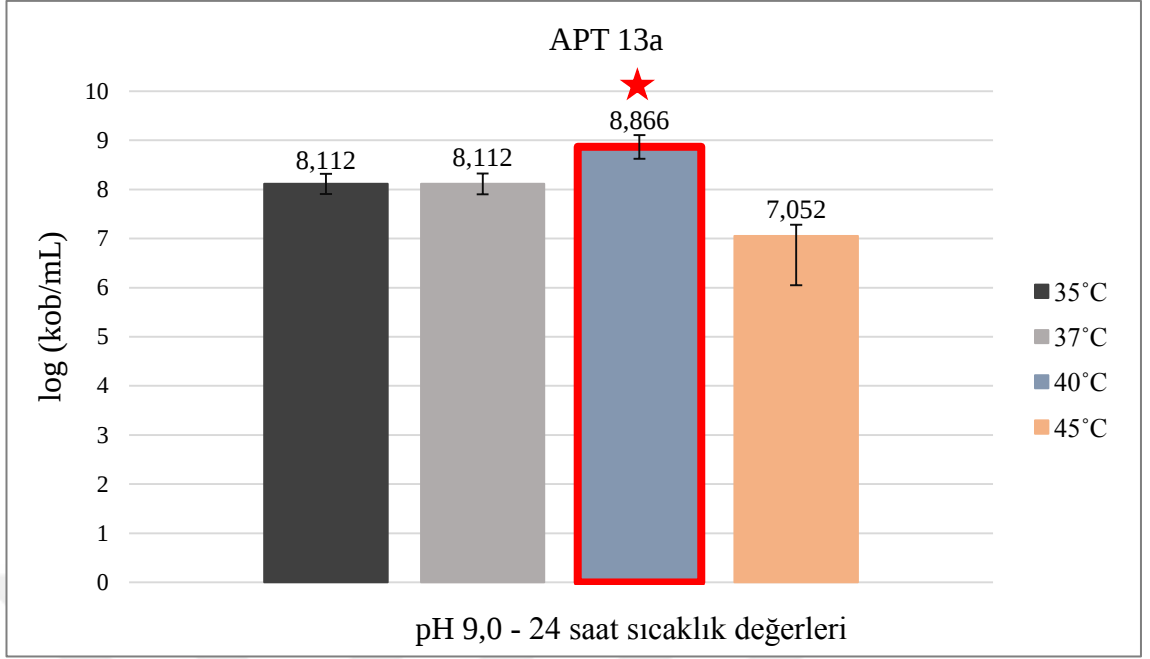


Şekil 4.25 APT 44 izolatının % 0,1 peynir altı suyu içeren besiyerinde, farklı pH değerlerinde 24 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

APT 44'ün % 0,1 peynir altı suyu içeren besiyerinde, farklı pH değerlerinde 24 saatlik inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm denenen pH değerleri birbiriyle kıyaslandığında; pH 8,0 bakterinin mikrobiyal gelişimine katkı sağlayan ve en ekonomik pH değeri olarak saptanmıştır (Şekil 4.25).

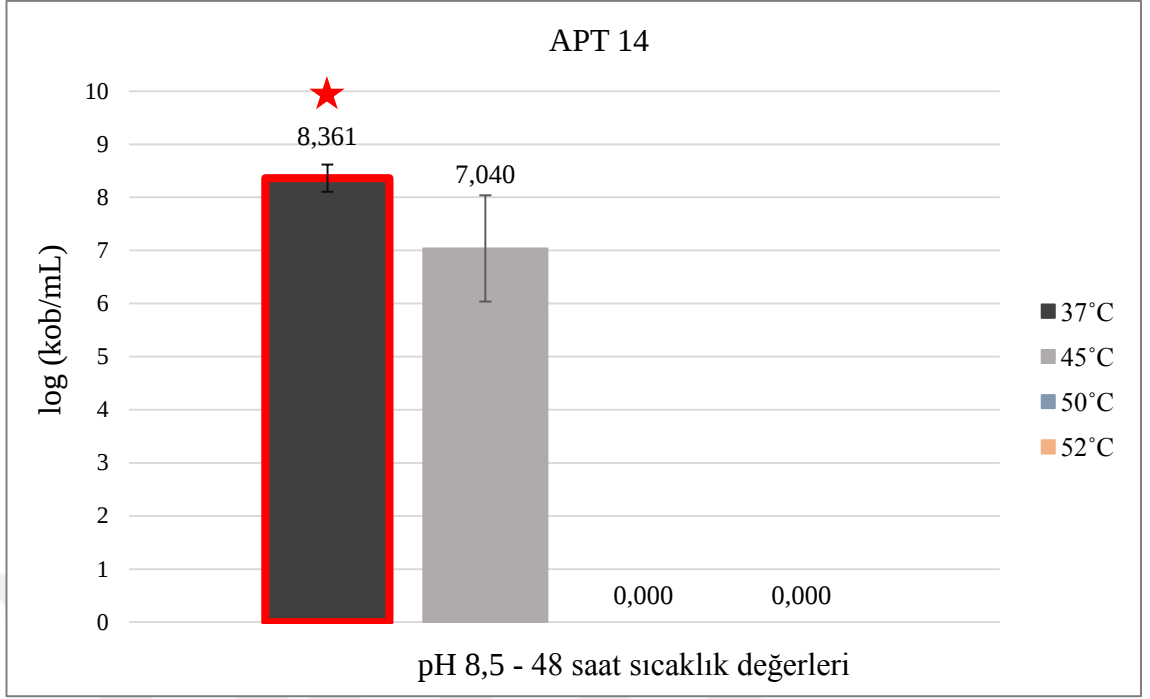
4.1.5 En ideal mikrobiyal gelişim gözlenen sıcaklık değerinin belirlenmesi

Tez kapsamında çalışılan 5 farklı karotenoid üreticisi *Exiguobacterium* cinsine dahil bakterinin ideal konsantrasyonlarda endüstriyel atıklar içeren besiyerinde ve ideal pH değerinde, en iyi mikrobiyal gelişim gösterdiği sıcaklık değerini tespit etmek amacıyla yürütülen deneyler Bölüm 3.2.2.3'de açıklandığı şekliyle yapılmıştır. Buna göre APT 13a, APT 14, APT 20b, APT 34 ve APT 44'ün belirlenen konsantrasyonlarda peynir altı suyu (whey) ve/veya melas ihtiva eden besiyerlerinde, belirlenen sürelerde ve belirlenen pH değerlerinde, farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen inkübasyonları sonrası yapılan seri dilüsyonlar sonucu ölçülen mikrobiyal gelişimlerine ait sonuçlar Şekil 4.26 – 4.30 arasındaki grafiklerle sunulmuştur.



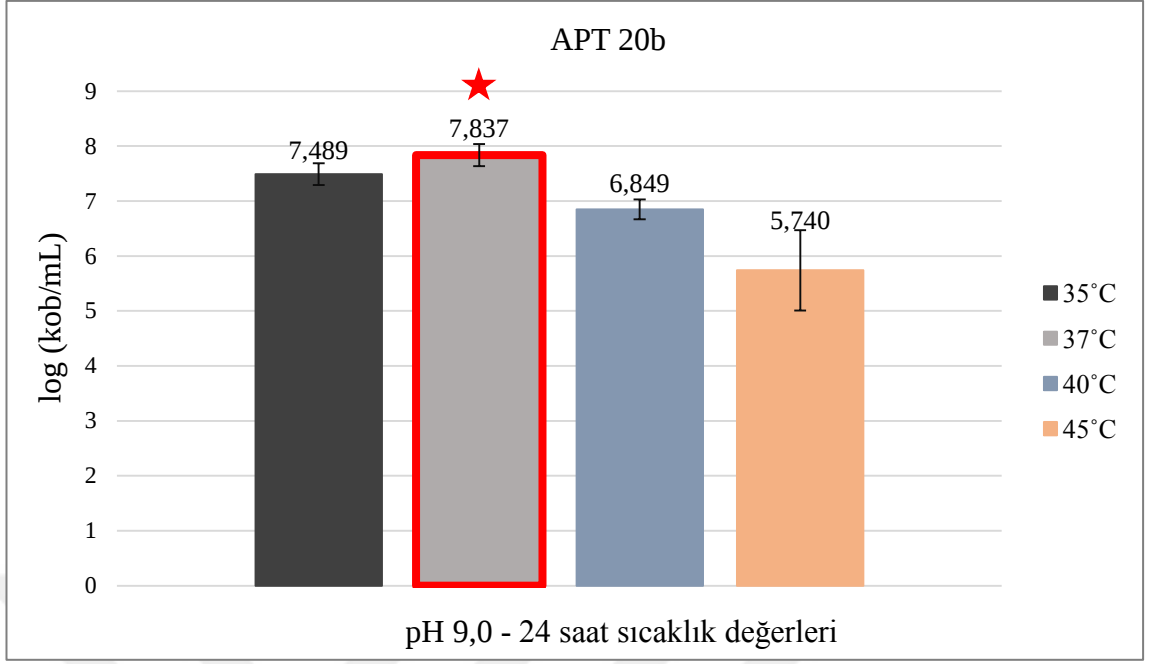
Şekil 4.26 APT 13a izolatının % 1 peynir altı suyu içeren pH 9,0 besiyerinde, farklı sıcaklıklarda 24 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

APT 13a'nın % 1 peynir altı suyu içeren pH 9,0'a ayarlanan besiyerinde, farklı sıcaklıklarda 24 saatlik inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm denenen sıcaklık değerleri birbiriyle kıyaslandığında; 40°C bakterinin mikrobiyal gelişimine katkı sağlayan sıcaklık değeri olarak saptanmıştır (Şekil 4.26).



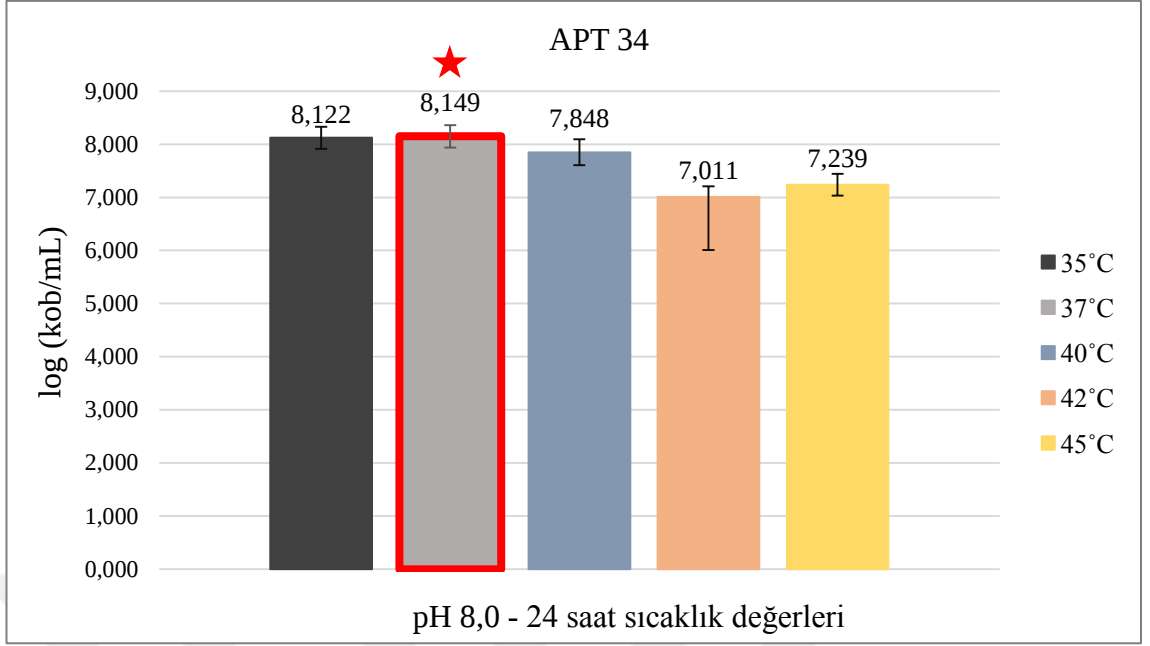
Şekil 4.27 APT 14 izolatının % 3 melas ($\text{-H}_2\text{SO}_4$) içeren pH 8,5 besiyerinde, farklı sıcaklıklarda 48 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

APT 14'ün % 3 melas ($\text{-H}_2\text{SO}_4$) içeren pH 8,5'e ayarlanan besiyerinde, farklı sıcaklıklarda 48 saatlik inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm denenen sıcaklık değerleri birbiriyle kıyaslandığında; 37°C bakterinin mikrobiyal gelişimine katkı sağlayan sıcaklık değeri olarak saptanmıştır (Şekil 4.27).



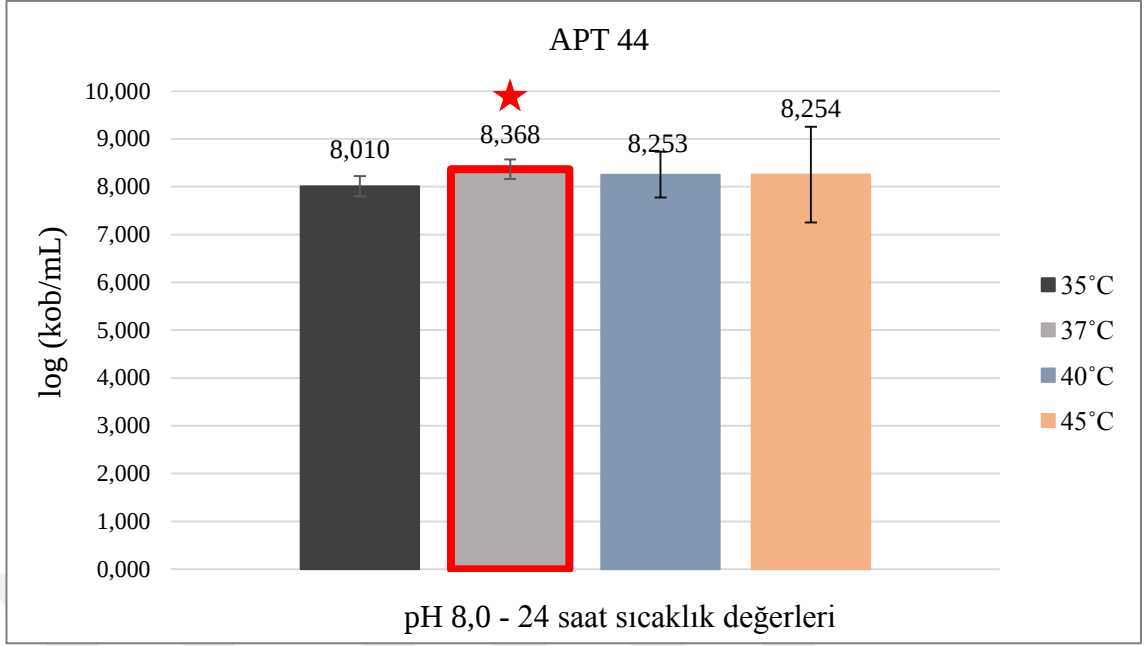
Şekil 4.28 APT 20b izolatının % 2 melas ($\text{-H}_2\text{SO}_4$) içeren pH 9,0 besiyerinde, farklı sıcaklıklarda 24 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

APT 20b'nin % 2 melas ($\text{-H}_2\text{SO}_4$) içeren pH 8,5'e ayarlanan besiyerinde, farklı sıcaklıklarda 24 saatlik inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm denenen sıcaklık değerleri birbiriyle kıyaslandığında; 37°C bakterinin mikrobiyal gelişimine katkı sağlayan sıcaklık değeri olarak saptanmıştır (Şekil 4.28).



Şekil 4.29 APT 34 izolatının % 3 melas ($\text{-H}_2\text{SO}_4$) içeren pH 8,0 besiyerinde, farklı sıcaklıklarda 24 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

APT 34'ün % 3 melas ($\text{-H}_2\text{SO}_4$) içeren pH 8,0'e ayarlanan besiyerinde, farklı sıcaklıklarda 24 saatlik inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm denenen sıcaklık değerleri birbiriyle kıyaslandığında; 37°C bakterinin mikrobiyal gelişimine katkı sağlayan sıcaklık değeri olarak saptanmıştır (Şekil 4.29).



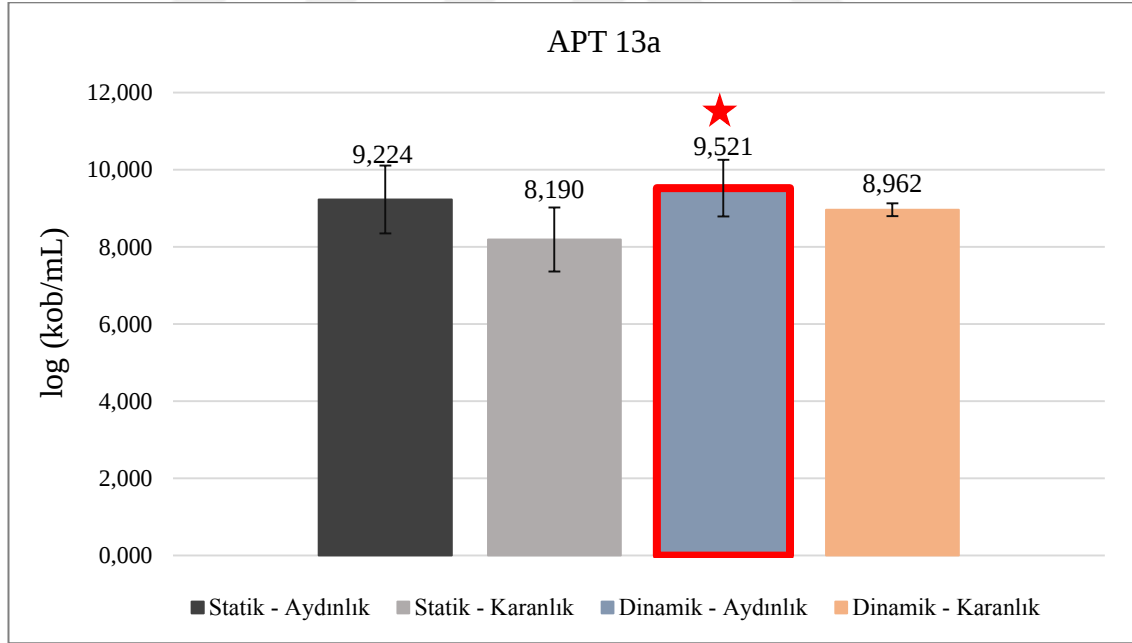
Şekil 4.30 APT 44 izolatının % 0,1 peynir altı suyu içeren pH 8,0 besiyerinde, farklı sıcaklıklarda 24 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

APT 44'ün % 0,1 peynir altı suyu içeren pH 8,0'e ayarlanan besiyerinde, farklı sıcaklıklarda 24 saatlik inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm denenen sıcaklık değerleri birbiriyle kıyaslandığında; 37°C bakterinin mikrobiyal gelişimine katkı sağlayan sıcaklık değeri olarak saptanmıştır (Şekil 4.30).

4.2 *Exiguobacterium* Cinsi 5 Bakterinin Pigment Üretimlerinin Karıştırma ve Işığa Bağlı Optimizasyonu ve Bakterilerden Karotenoid Pigmentlerin Ekstraksiyonu

4.2.1 *Exiguobacterium* cinsi bakterilerin karıştırma ve ışığa bağlı pigment üretimlerinin optimizasyonu

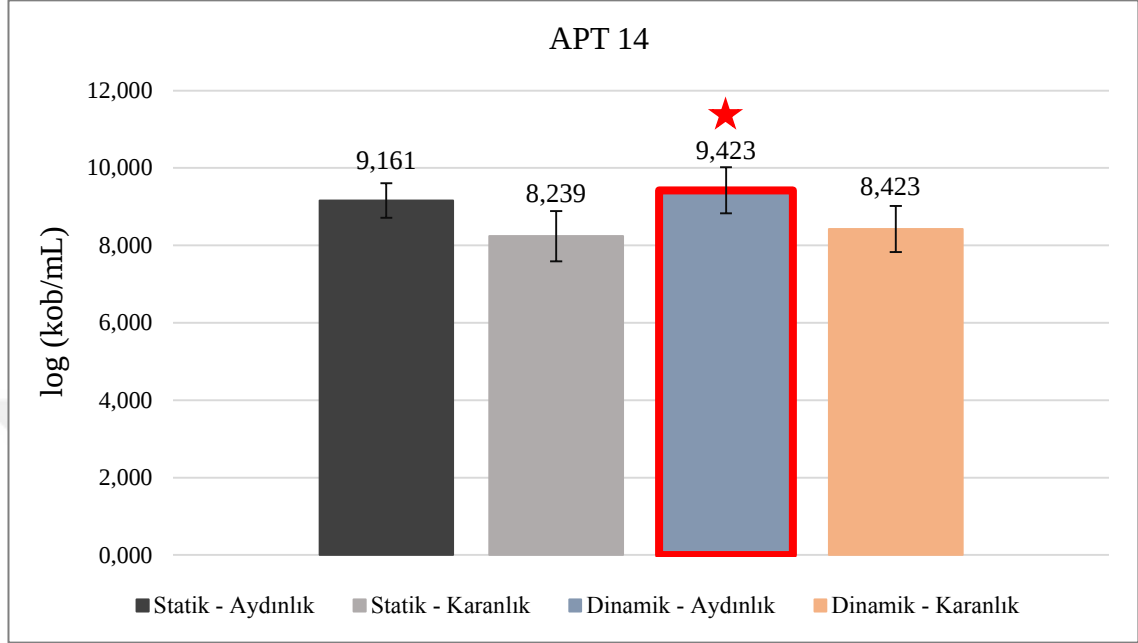
Turuncu karotenoid pigment ürettiği bilinen 5 *Exiguobacterium* cinsi bakterinin pigment üretimi üzerine çalkalama ve ışık koşullarının etkisini belirlemek üzere optimizasyon çalışmaları Bölüm 3.2.3.1’de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Bu bağlamda APT 13a, APT 14, APT 20b, APT 34 ve APT 44’ün statik ve dinamik (120rpm) koşullarda, aydınlık ve karanlık ortamlarda uygulanan pigment ekstraksiyonu yönteminde belirtildiği üzere, 72 saat süresince inkübasyonları sonucu yapılan seri dilüsyonlar neticesinde ölçülen mikrobiyal gelişimlerine ait sonuçlar Şekil 4.31 – 4.35 arasındaki grafiklerle sunulmuştur.



Şekil 4.31 APT 13a izolatının statik ve dinamik koşullarda, aydınlık ve karanlık ortamlarda 72 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

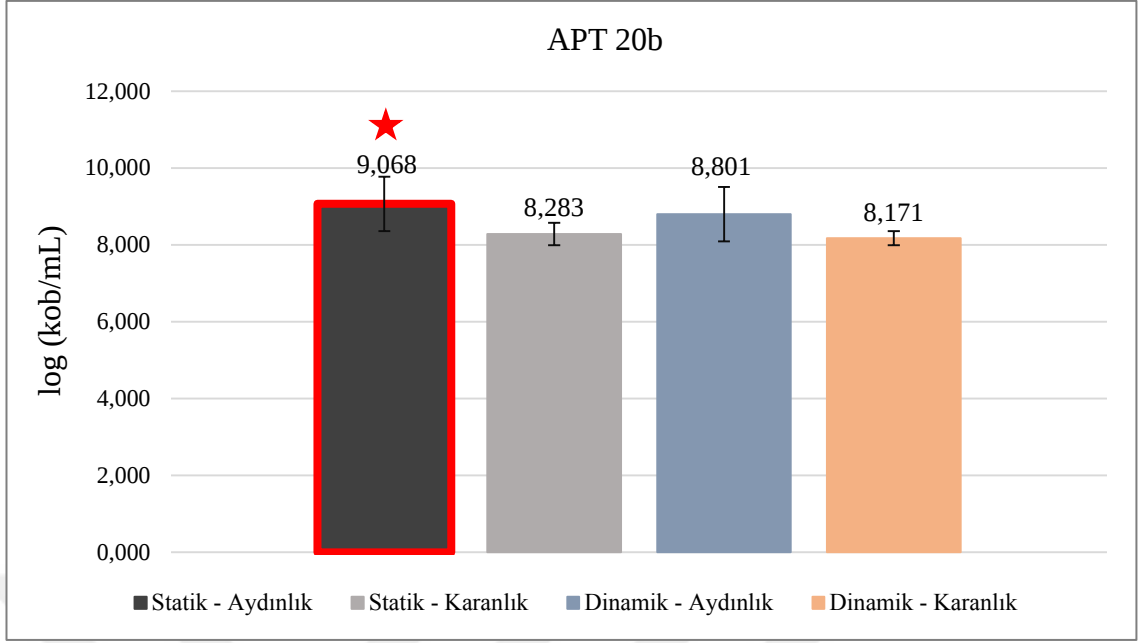
APT 13a izolatının statik - aydınlık, statik - karanlık, dinamik - aydınlık ve dinamik - karanlık koşullarda pigment ekstraksiyonu için 72 saatlik inkübasyonu

gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası tüm koşullar karşılaştırıldığında mikrobiyal gelişimin en yüksek olduğu koşul dinamik ve aydınlık olarak belirlenmiştir (Şekil 4.31).



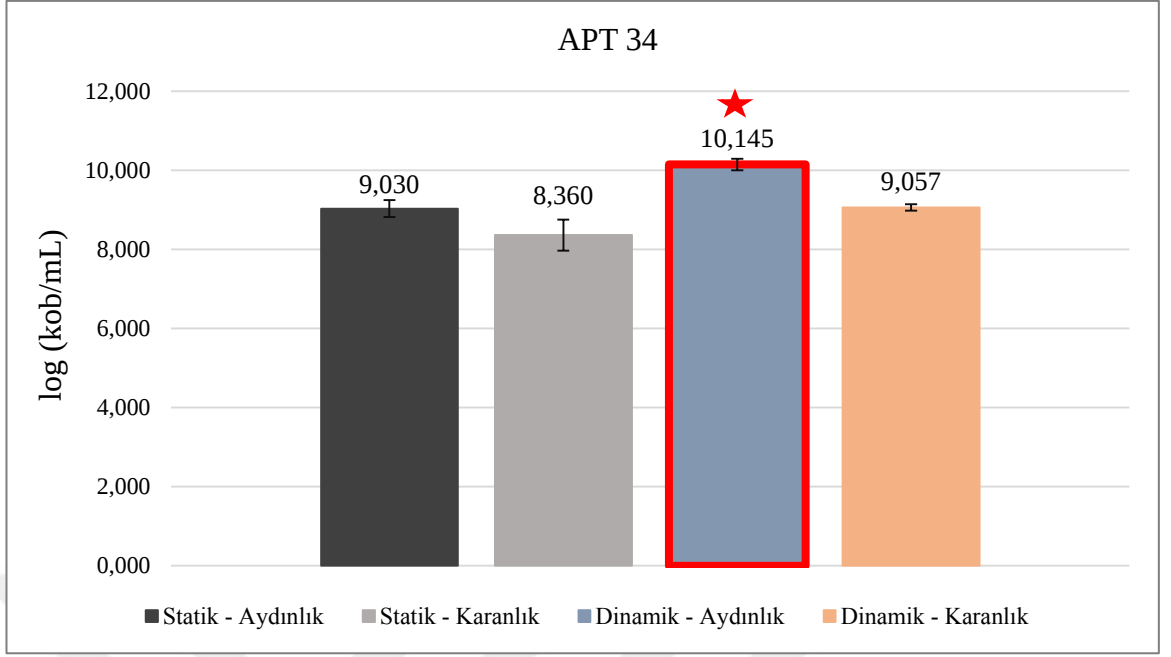
Şekil 4.32 APT 14 izolatının statik ve dinamik koşullarda, aydınlık ve karanlık ortamlarda 72 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

APT 14 izolatının statik - aydınlık, statik - karanlık, dinamik - aydınlık ve dinamik - karanlık koşullarda pigment ekstraksiyonu için 72 saatlik inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası tüm koşullar karşılaştırıldığında mikrobiyal gelişimin en yüksek olduğu koşul dinamik ve aydınlık olarak belirlenmiştir (Şekil 4.32).



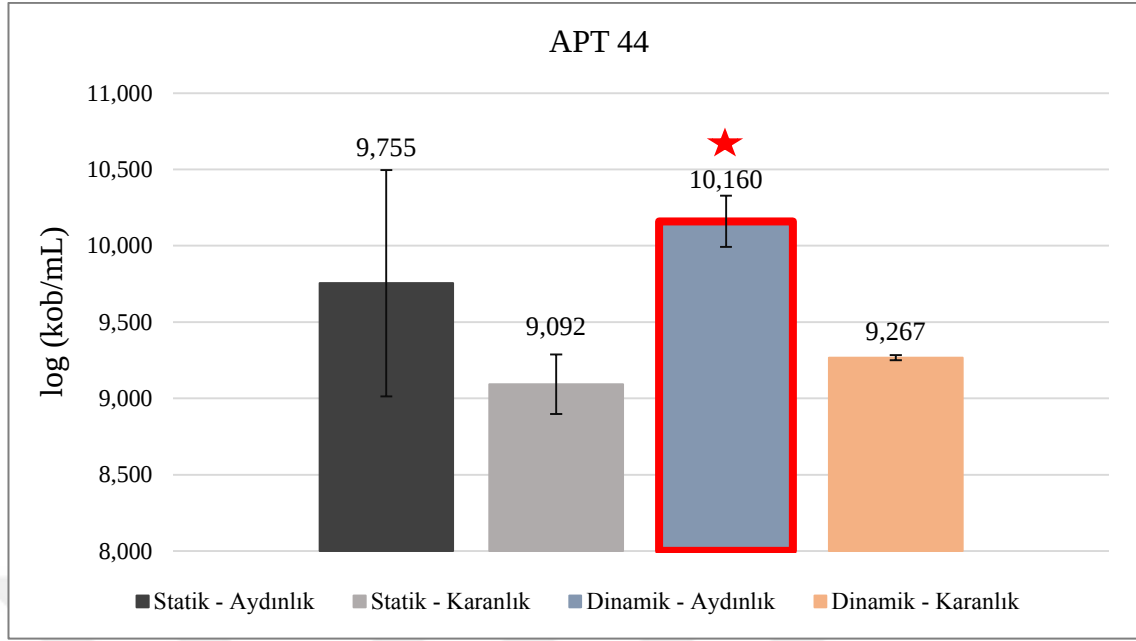
Şekil 4.33 APT 20b izolatının statik ve dinamik koşullarda, aydınlık ve karanlık ortamlarda 72 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

APT 20b izolatının statik - aydınlık, statik - karanlık, dinamik - aydınlık ve dinamik - karanlık koşullarda pigment ekstraksiyonu için 72 saatlik inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası tüm koşullar karşılaştırıldığında mikrobiyal gelişimin en yüksek olduğu koşul statik ve aydınlık olarak belirlenmiştir (Şekil 4.33).



Şekil 4.34 APT 34 izolatının statik ve dinamik koşullarda, aydınlık ve karanlık ortamlarda 72 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

APT 34 izolatının statik - aydınlık, statik - karanlık, dinamik - aydınlık ve dinamik - karanlık koşullarda pigment ekstraksiyonu için 72 saatlik inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası tüm koşullar karşılaştırıldığında mikrobiyal gelişimin en yüksek olduğu koşul dinamik ve aydınlık olarak belirlenmiştir (Şekil 4.34).



Şekil 4.35 APT 44 izolatının statik ve dinamik koşullarda, aydınlık ve karanlık ortamlarda 72 saatlik mikrobiyal gelişimi (log(kob/mL))

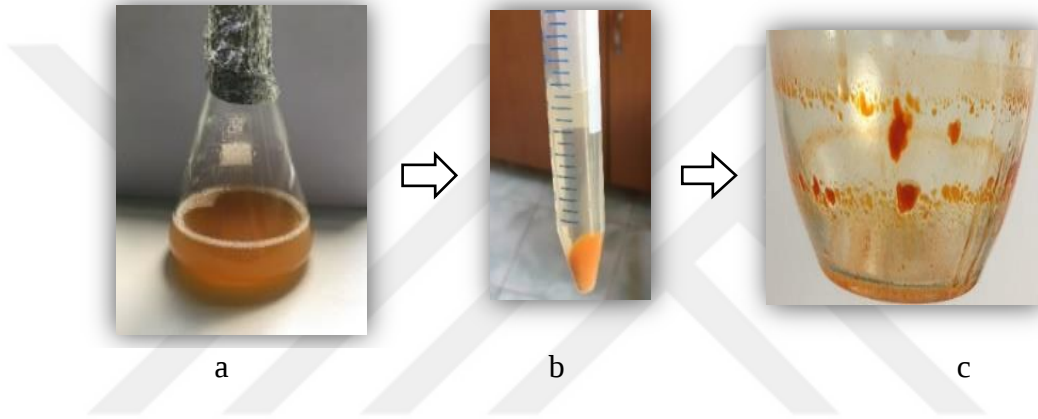
APT 44 izolatının statik - aydınlık, statik - karanlık, dinamik - aydınlık ve dinamik - karanlık koşullarda pigment ekstraksiyonu için 72 saatlik inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası tüm koşullar karşılaştırıldığında mikrobiyal gelişimin en yüksek olduğu koşul dinamik ve aydınlık olarak belirlenmiştir (Şekil 4.35).

Çizelge 4.1 APT 13a, APT 14, APT20b, APT 34 ve APT 44 izolatları için seçilen 72 saat süresince ideal mikrobiyal gelişim ve pigment üretim koşulları

	Gelişim İçin Seçilen İdeal Atık Konsantrasyonu	Gelişim İçin Seçilen İdeal İnkübasyon Süresi	Gelişim İçin Seçilen İdeal pH	Gelişim İçin Seçilen İdeal Sıcaklığı	Pigment Üretimi İçin Seçilen İdeal Koşullar
APT 13a	%1 Peynir Altı Suyu	24 saat	9,0	40°C	Dinamik - Aydınlik
APT 14	%3 Melas	48 saat	8,5	37°C	Dinamik - Aydınlik
APT 20b	%2 Melas	24 saat	8,5	37°C	Statik - Aydınlik
APT 34	%3 Melas	24 saat	8,0	37°C	Dinamik - Aydınlik
APT 44	%0.1 Peynir Altı Suyu	24 saat	8,0	37°C	Dinamik - Aydınlik

4.2.2 *Exiguobacterium* cinsi bakterilerden karotenoid pigmentlerin ekstraksiyonu

Tez kapsamında karotenoid üreticisi oldukları bilinen *Exiguobacterium* cinsi 5 bakteri Bölüm 4.2.1’de belirlendiği üzere izolat gereksinimine bağlı olarak statik, dinamik ve aydınlık koşullarda 72 saat inkübe edilmiştir. APT 13a, APT 14, APT 20b, APT 34 ve APT 44’ün ürettikleri karotenoid pigmentlerin ekstraksiyonu Bölüm 3.2.3.2’de belirtildiği şekilde yapılmıştır (Şekil 4.36). Uygulanan pigment ekstraksiyon yöntemi sonrası yapılan spektrofotometrik ölçümler Çizelge 4.1’de verilmiştir.

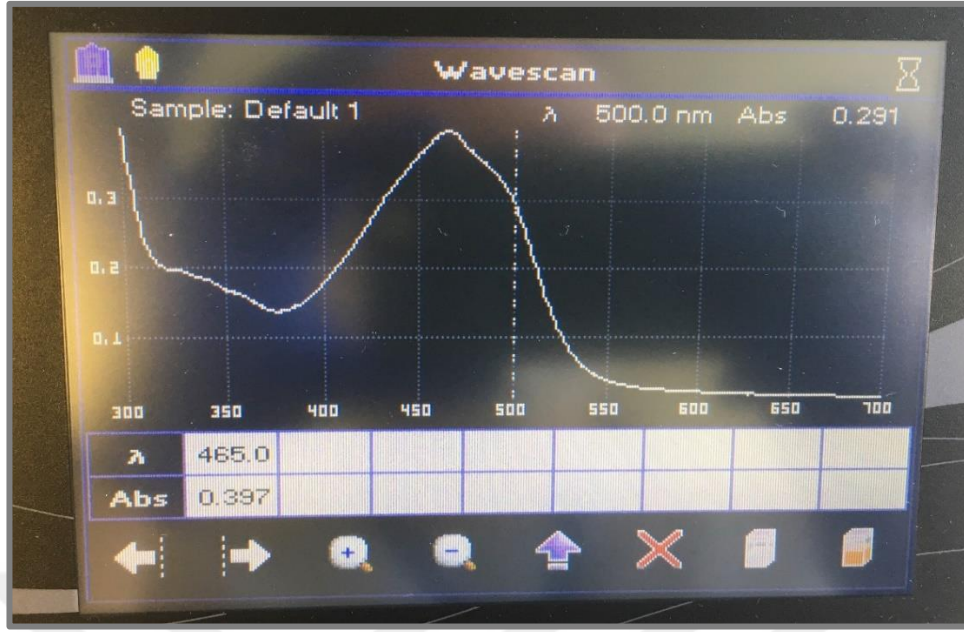


Şekil 4.36 APT 44 izolatının a) whey besiyerinde geliştirilen erlen kültürü, b) santrifüj sonrası renkli peleti, c) ekstrakte edilen toz formdaki turuncu pigment

Çizelge 4.2 Pigment ekstraksiyonu sonrası APT 13a, APT 14, APT20b, APT 34 ve APT 44 özütlerinin spektrofotometrik ölçüm sonuçları

	13a		14		20b		34		44	
	Statik - Aydınlık	Dinamik - Aydınlık	Statik – Aydınlık	Dinamik – Aydınlık	Statik - Aydınlık	Dinamik - Aydınlık	Statik - Aydınlık	Dinamik - Aydınlık	Statik - Aydınlık	Dinamik - Aydınlık
400 nm	0,152	0,227	0,236	0,333	0,087	0,126	0,056	0,304	0,218	0,489
450 nm	0,167	0,378	0,277	0,665	0,088	0,220	0,057	0,527	0,327	0,811
490 nm	0,152	0,346	0,206	0,643	0,062	0,204	0,037	0,514	0,277	0,681
500 nm	0,150	0,314	0,162	0,581	0,054	0,185	0,033	0,466	0,239	0,591
550 nm	0,119	0,033	0,008	0,074	0,014	0,025	0,000	0,037	0,010	0,110
600 nm	0,101	0,020	0,000	0,059	0,010	0,013	0,000	0,021	0,006	0,082
660 nm	0,082	0,018	0,000	0,050	0,007	0,008	0,000	0,009	0,000	0,063

* Analizler 72 saatlik, izolata özgü en ideal koşulda üretim sonrası saflaştırılan pigment içerikleri üzerinden yürütülmüştür.



Şekil 4.37 APT 44 izolatının base-line alınarak yapılan spektrofotometrik tarama, APT 44 izolatının en yüksek pik verdiği dalga boyu 465 nm olarak belirlenmiştir

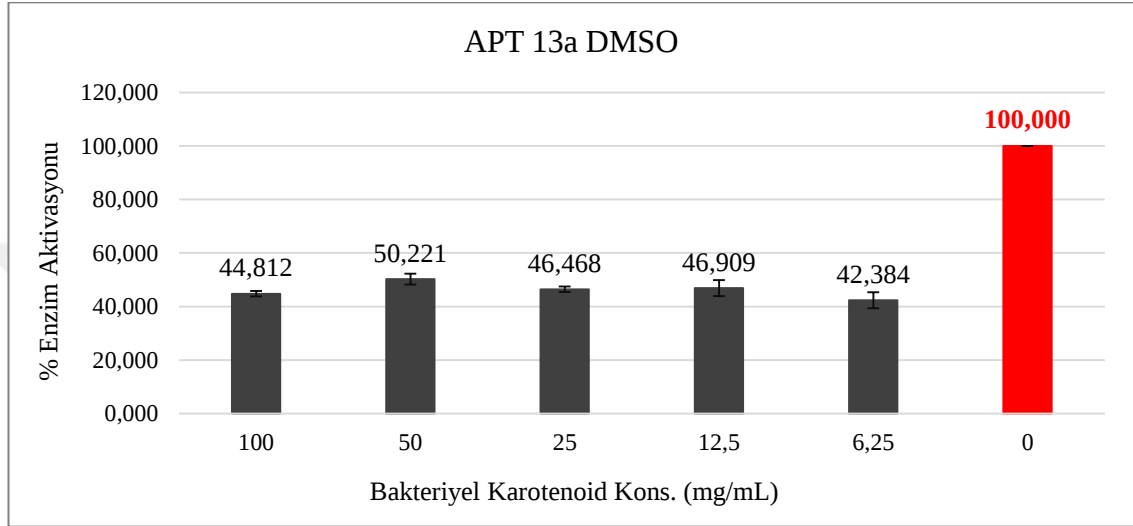
Turuncu renkli pigment ekstraktlarının absorpsiyon spektrumları, spektrofotometre kullanılarak 400-660 nm dalga boyu arasında ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucu; APT 13a, APT 14, APT 20b, APT 34 ve APT 44'ün dinamik (120rpm) ve aydınlık ortamda geliştirilen kültürlerinden elde edilen pigment içeriklerinin λ_{max} (490 nm)'de statik ve aydınlık ortamda geliştirilen kültür ekstrelerinden daha yüksek absorpsiyon verdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Ayrıca 450 – 500 nm dalga boyu aralığında, pigment içeriklerinin yüksek pik verdikleri saptanmıştır.

4.3 Ekstrakte Edilen Karotenoid Pigmentlerin Antioksidan Aktiviteleri

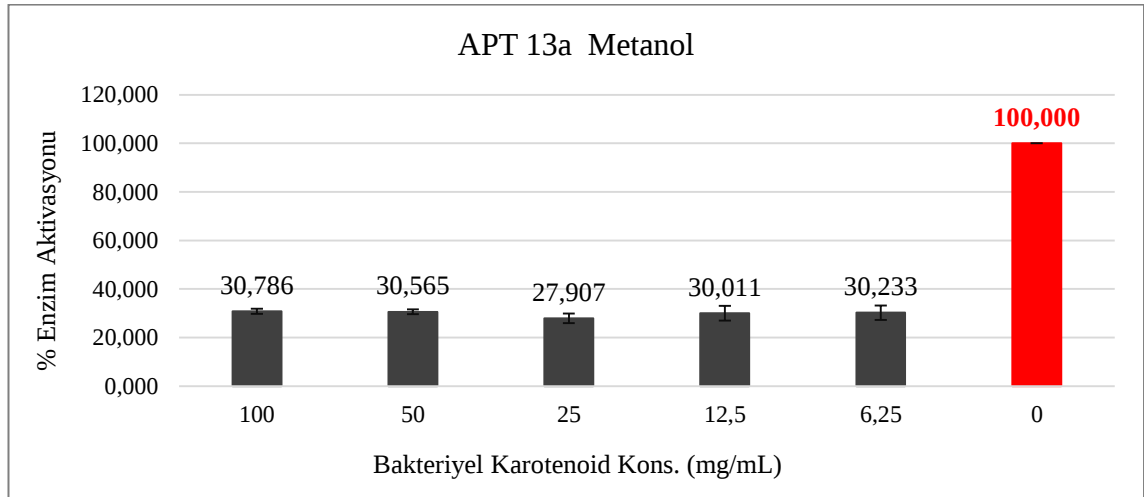
Sunulan tez çalışması dahilinde *Exiguobacterium* cinsi izolatlardan ekstrakte edilen karotenoid pigment içeriklerinin antioksidan aktiviteleri Bölüm 3.2.4'de anlatıldığı şekilde ölçülmüştür. Pigment ekstraksiyonu sonrası karotenoid pigment yapıları evaporasyona tabi tutularak toz haline getirilmiş, DMSO ve metanol olmak üzere iki farklı çözücü ile muamele edilerek antioksidan özelliklerin belirlenmesinde kullanılmıştır. Bu bağlamda katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz ve süperoksit dismutaz aktiviteleri test edilmiş, sonuçlar Şekil 3.38 – 3.77 arasındaki grafiklerle sunulmuştur. Grafiklerde kırmızı ile belirtilen değerler kontrol grubu olup,

yalnızca enzim içermekte karotenoid örnek içermemektedir. Verilen sütun grafiklerinde sadece enzim içeren kontrol grubunun enzim aktivitesi %100 olarak alınmış ve farklı konsantrasyonlardaki karotenoidin enzim aktivite yüzdesi ona göre hesaplanmıştır.

4.3.1 Katalaz (CAT) aktivitesi sonuçlar

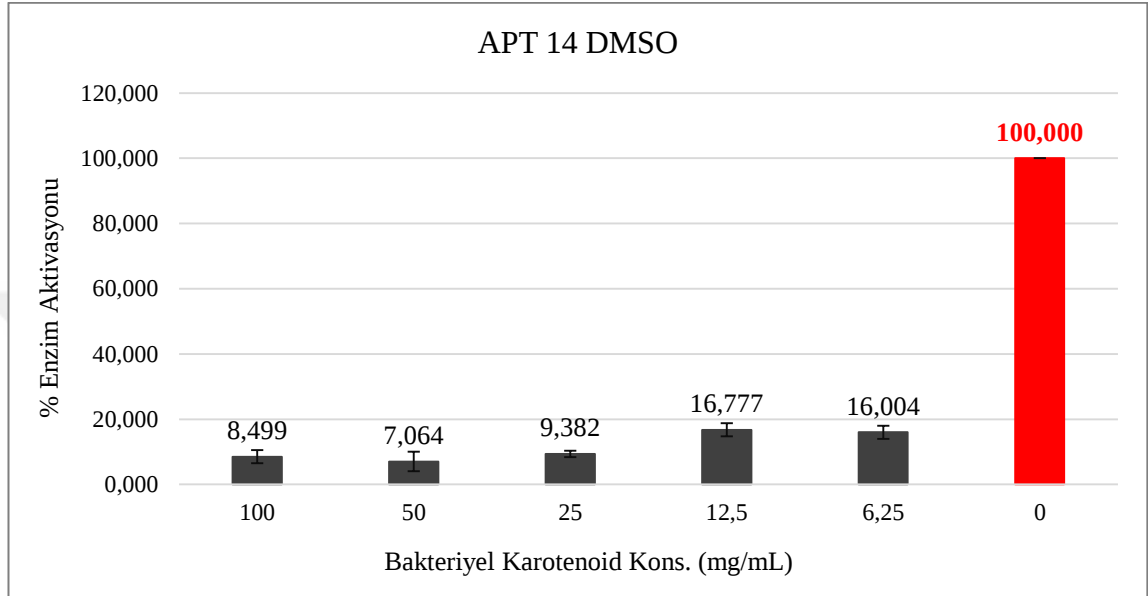


Şekil 4. 38 APT 13a izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

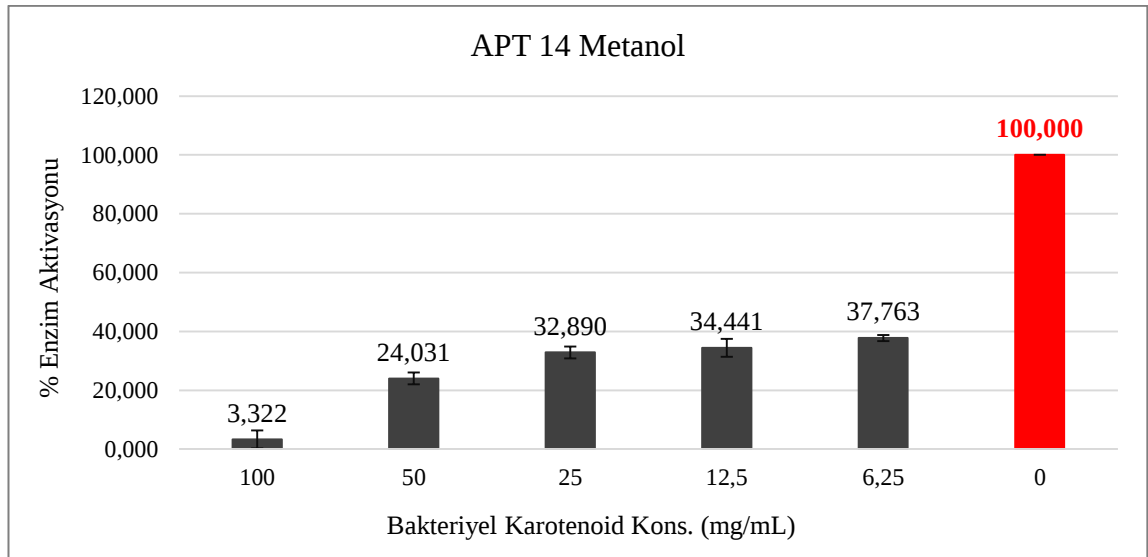


Şekil 4.39 APT 13a izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

APT 13a'nın hem DMSO hem de metanol ile çözülen pigment ekstraktlarında tüm konsantrasyonların ölçümlerinde kontrol ölçümünden daha düşük sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.38 ve Şekil 4.39). Bu sonuçlara bakarak APT 13a izolatının CAT aktivasyonu düşük bulunmuştur.

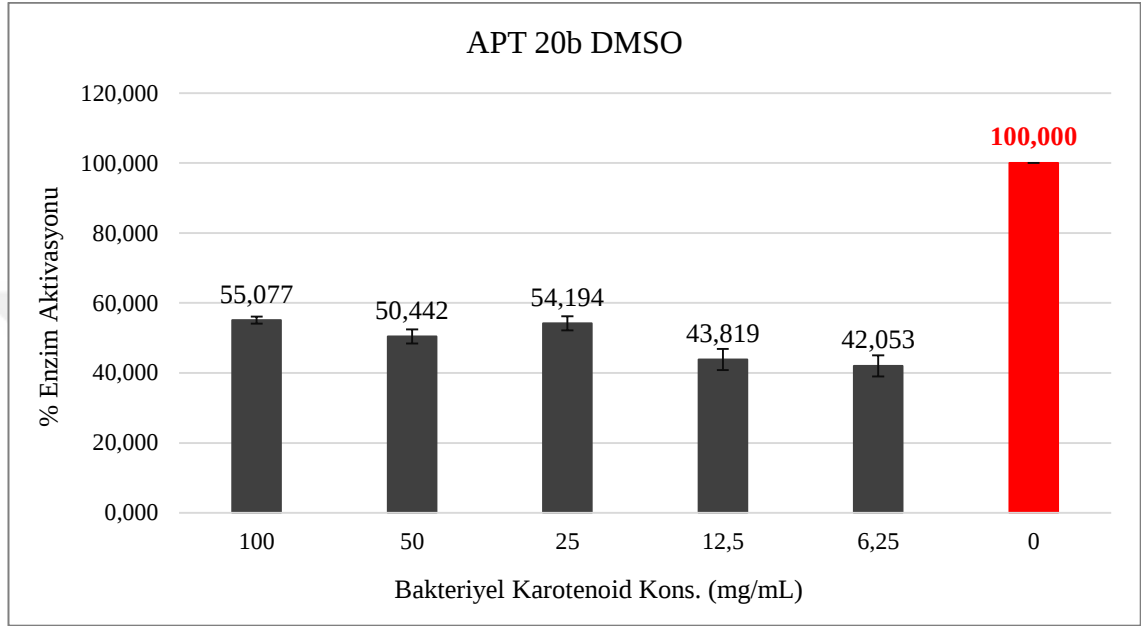


Şekil 4.40 APT 14 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

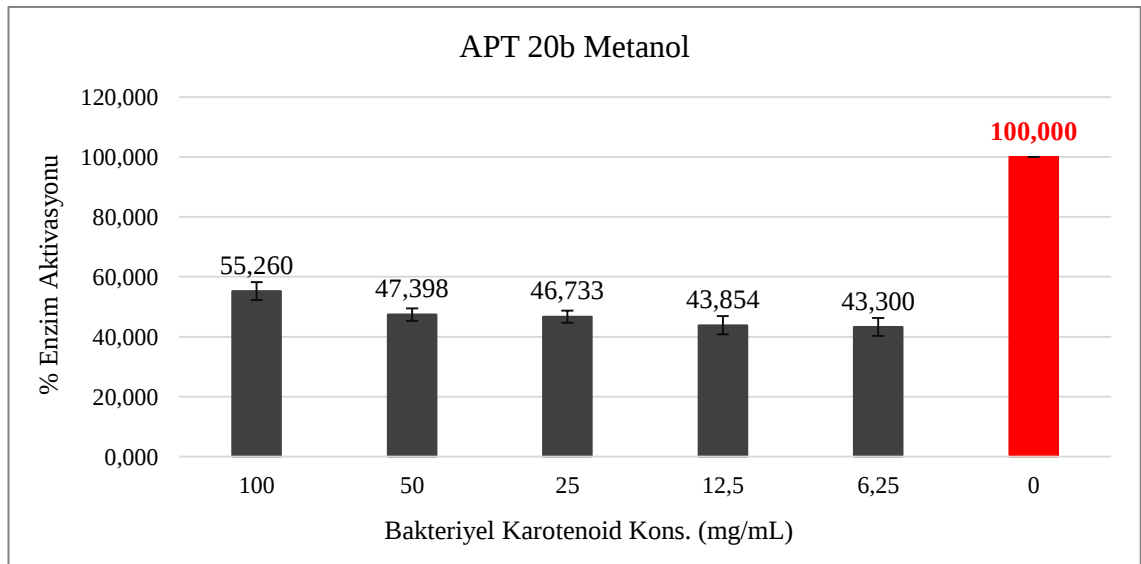


Şekil 4.41 APT 14 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

APT 14'ün hem DMSO hem de metanol ile çözülen pigment ekstraktlarında tüm konsantrasyonların ölçümlerinde kontrol ölçümünden daha düşük sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.40 ve Şekil 4.41). Bu sonuçlara bakarak APT 14 izolatının CAT aktivasyonu düşük bulunmuştur.

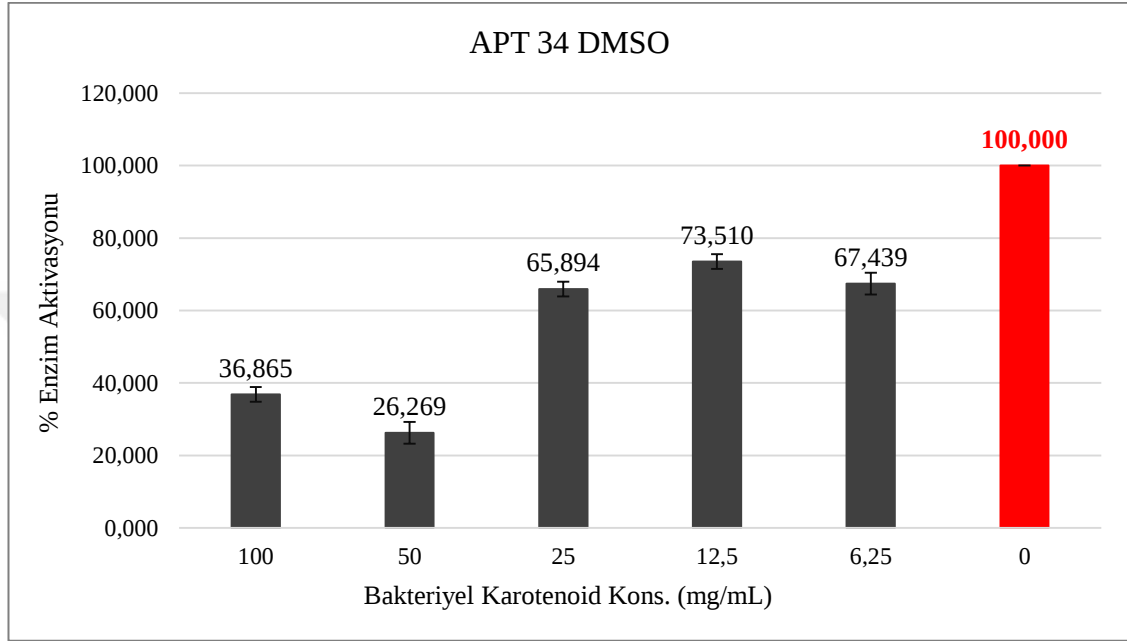


Şekil 4.42 APT 20b izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

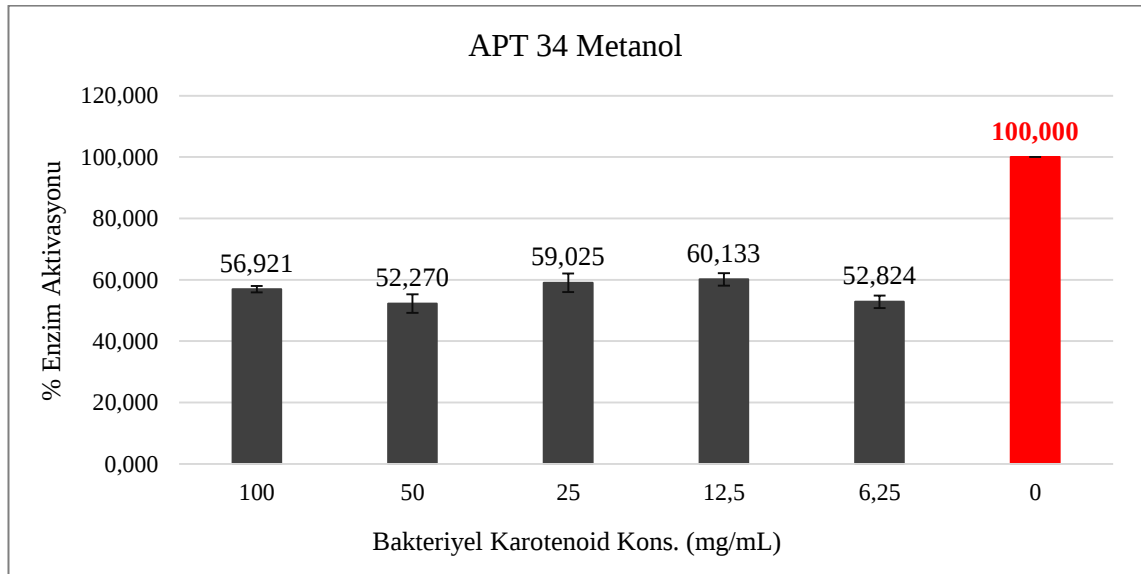


Şekil 4.43 APT 20b izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

APT 20b'nin hem DMSO hem de metanol ile çözülen pigment ekstraktlarında tüm konsantrasyonların ölçümlerinde kontrol ölçümünden daha düşük sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.42 ve Şekil 4.43). Bu sonuçlara bakarak APT 20b izolatının CAT aktivasyonu düşük bulunmuştur.

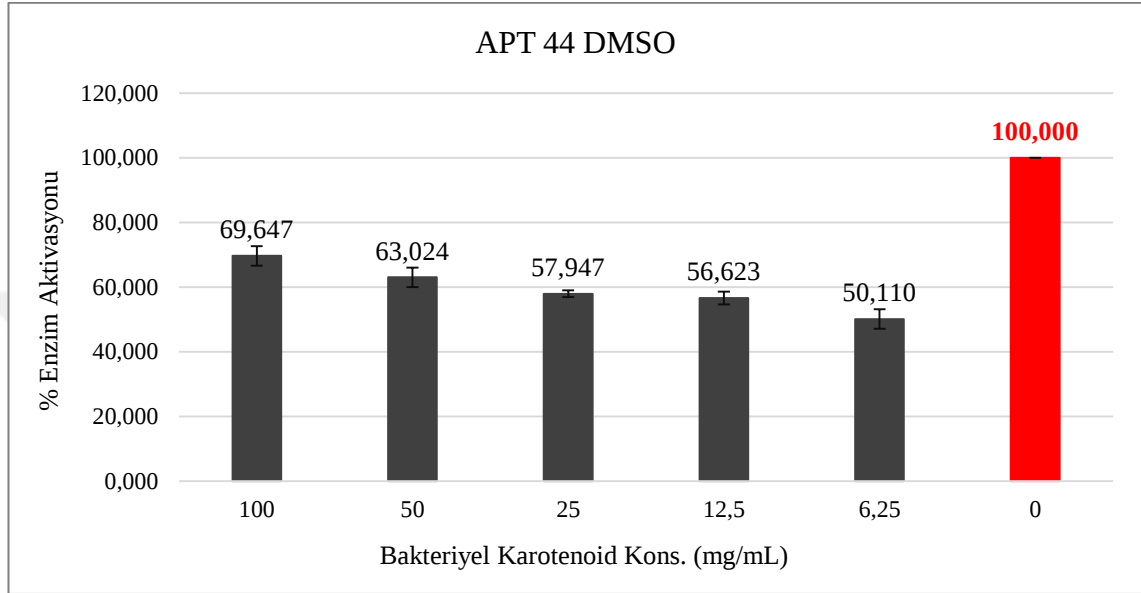


Şekil 4.44 APT 34 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

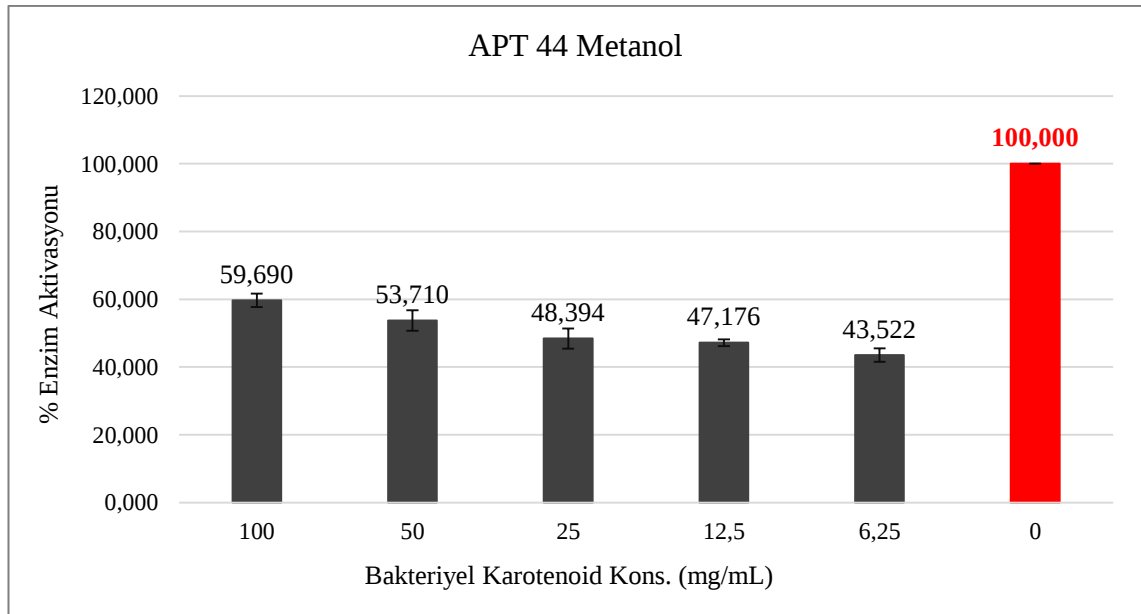


Şekil 4.45 APT 34 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

APT 34'ün hem DMSO hem de metanol ile çözülen pigment ekstraktlarında tüm konsantrasyonların ölçümlerinde kontrol ölçümünden daha düşük sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.44 ve Şekil 4.45). Bu sonuçlara bakarak APT 34 izolatının CAT aktivasyonu düşük bulunmuştur.



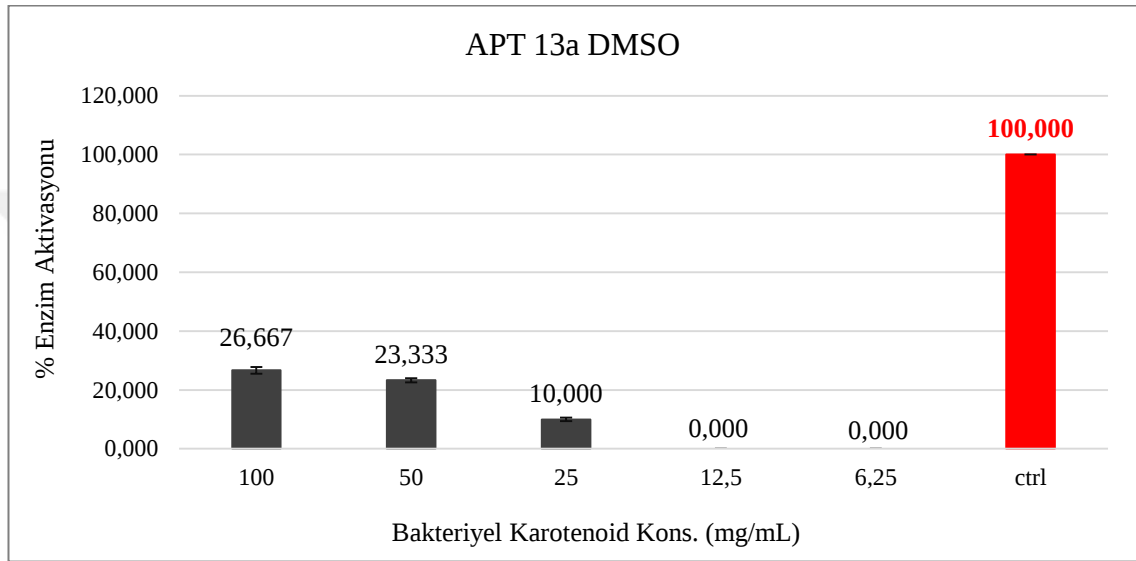
Şekil 4.46 APT 44 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi



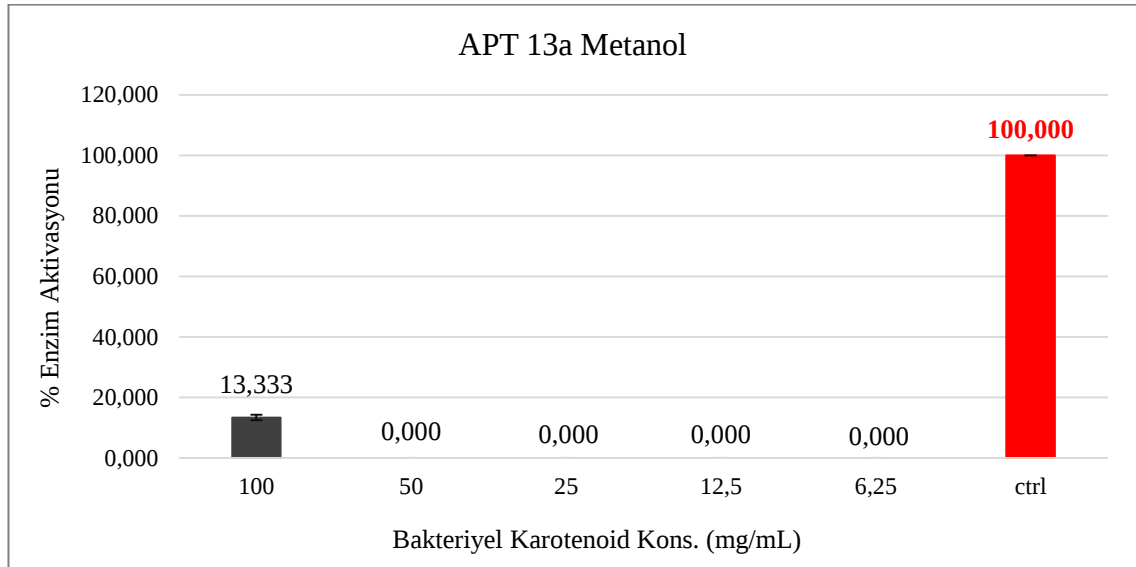
Şekil 4.47 APT 44 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

APT 44'ün hem DMSO hem de metanol ile çözülen pigment ekstraktlarında tüm konsantrasyonların ölçümlerinde kontrol ölçümünden daha düşük sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.46 ve Şekil 4.47). Bu sonuçlara bakarak APT 44 izolatının CAT aktivasyonu düşük bulunmuştur.

4.3.2 Glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesi sonuçlar

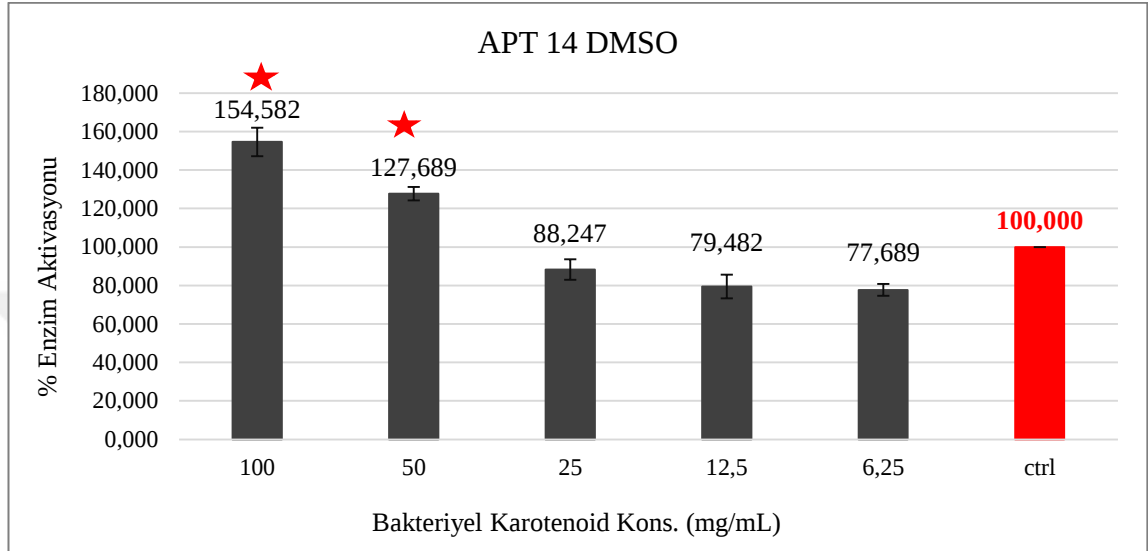


Şekil 4.48 APT 13a izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

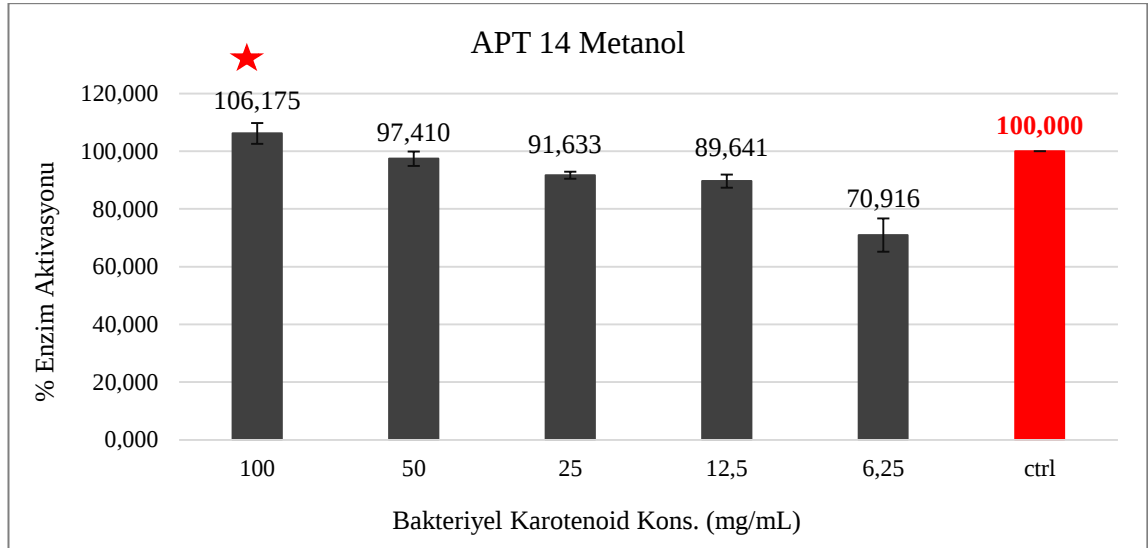


Şekil 4.49 APT 13a izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

APT 13a'nın hem DMSO hem de metanol ile çözülen pigment ekstraktlarında tüm konsantrasyonların ölçümlerinde kontrol ölçümünden daha düşük sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.48 ve Şekil 4.49). Bu sonuçlara bakarak APT 13a izolatının GPx aktivasyonunun oldukça düşük olduğu bulunmuştur.

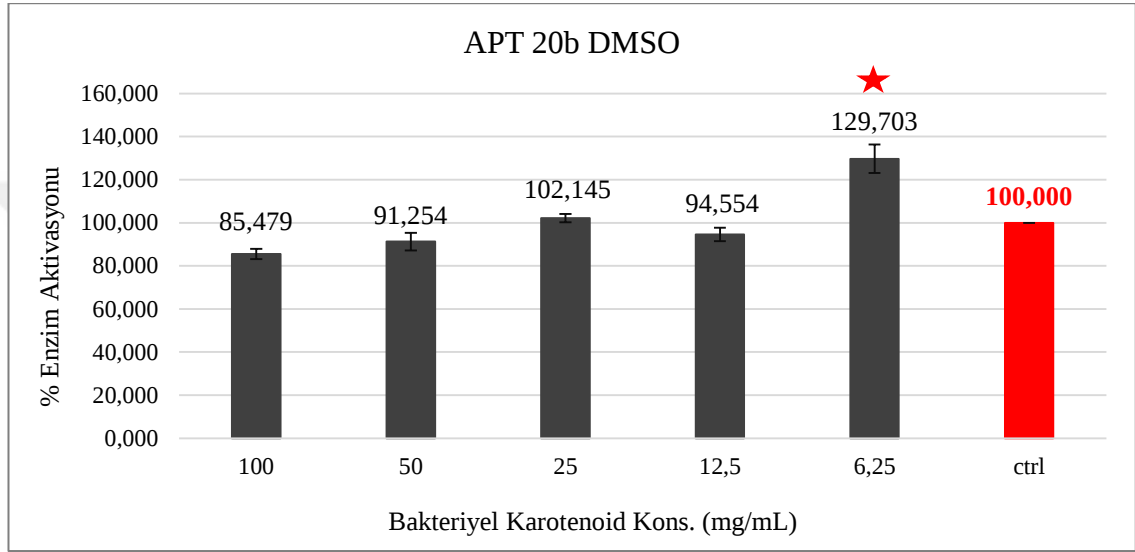


Şekil 4.50 APT 14 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

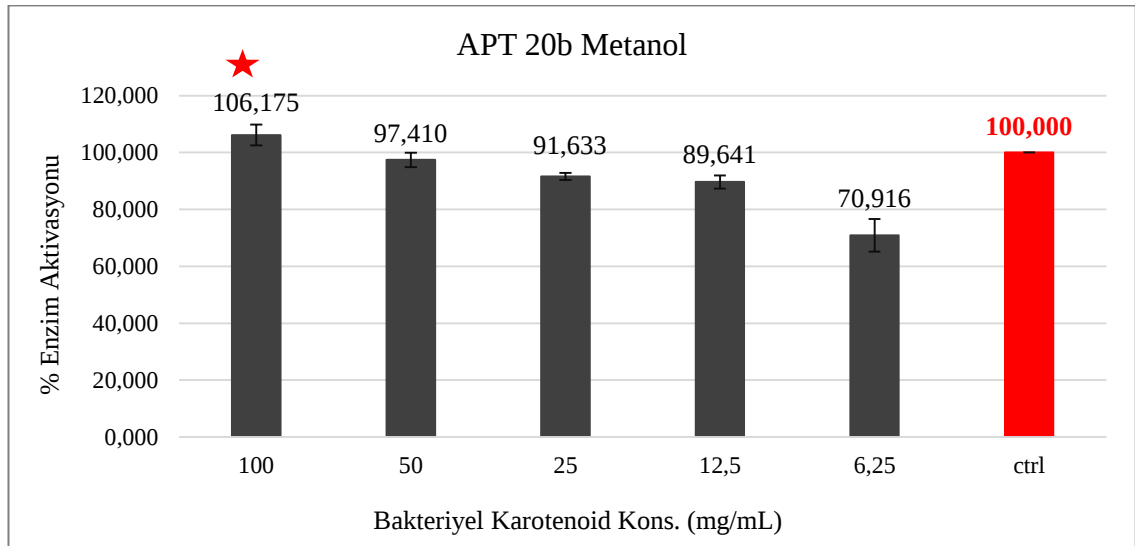


Şekil 4.51 APT 14 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

APT 14'ün DMSO ile çözölen paralelinde 50 ve 100 mg/mL konstantrasyonlardaki bakteriyel karotenoid ölçömlerinde kontrol ölçömlönden daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.50). Metanol ile çözölen paralelinde 100 mg/mL konstantrasyondaki bakteriyel karotenoid ölçömlönde kontrol ölçömlönden daha yüksek bir aktivite gözlenmiştir (Şekil 4.51). Bu sonuçlara bakarak APT 14 izolatının belirtilen konsantrasyonlarda GPx aktivasyonunun olduğu söylenebilir.

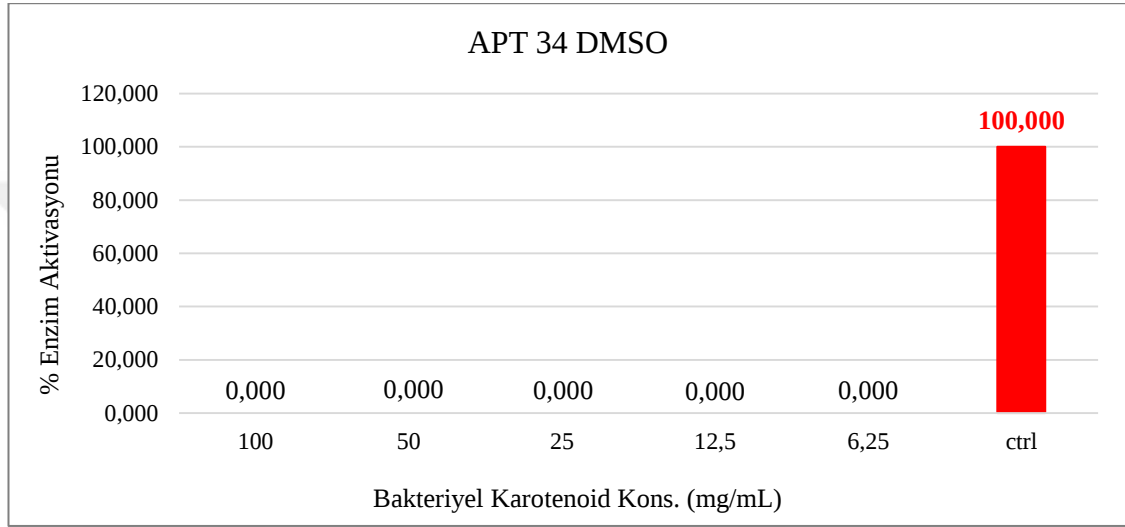


Şekil 4.52 APT 20b izolatından ekstrete edilip, DMSO ile çözölen pigmentin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

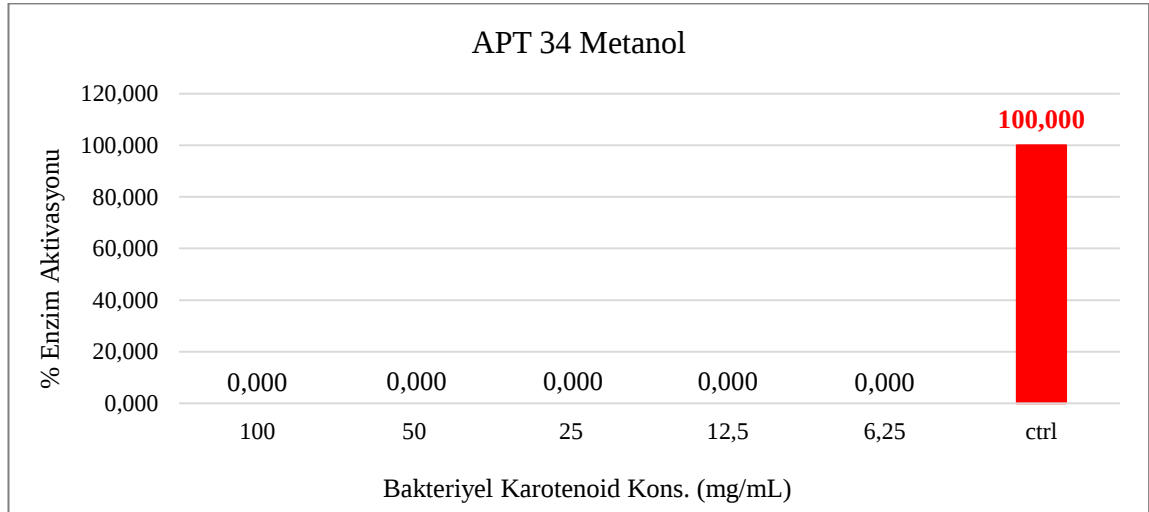


Şekil 4.53 APT 20b izolatından ekstrete edilip, metanol ile çözölen pigmentin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

APT 20b'nin DMSO ile çözölen paralelinde 6,25 ve 25 mg/mL konstantrasyonlardaki bakteriyel karotenoid ölçömlerinde kontrol ölçömlönden daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.52). Metanol ile çözölen paralelinde 100 mg/mL konstantrasyondaki bakteriyel karotenoid ölçömlönde kontrol ölçömlönden daha yüksek sonuçlar ölçölmüştür (Şekil 4.53). Bu sonuçlara bakarak söylenebilir ki APT 20b izolatının belirtilen konsantrasyonlarda GPx aktivasyonu mevcuttur.

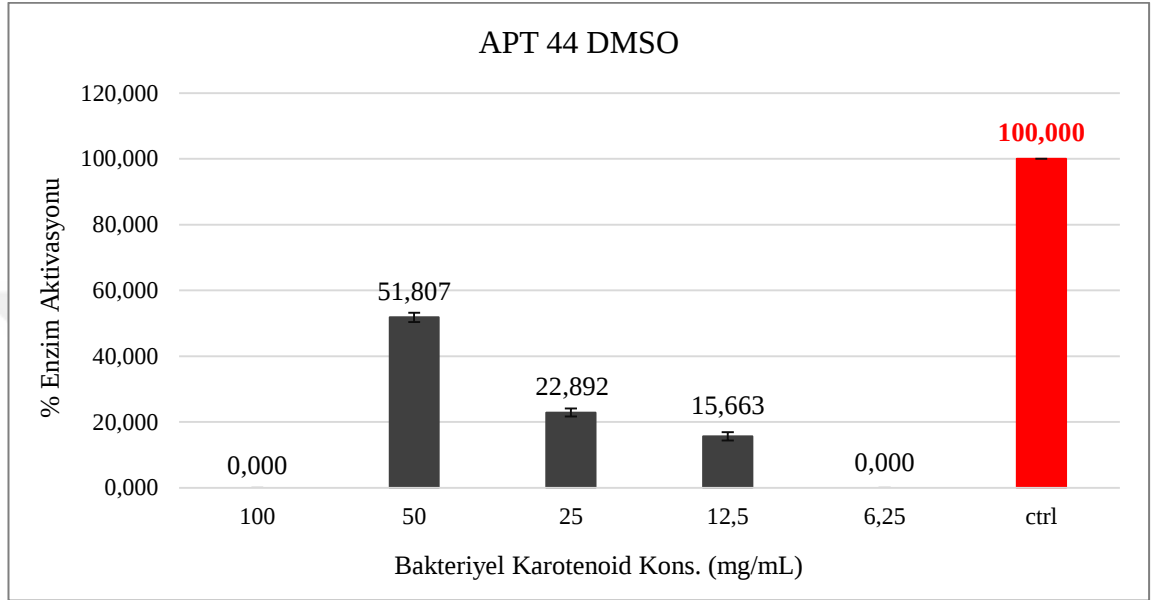


Şekil 4.54 APT 34 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözölen pigmentin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

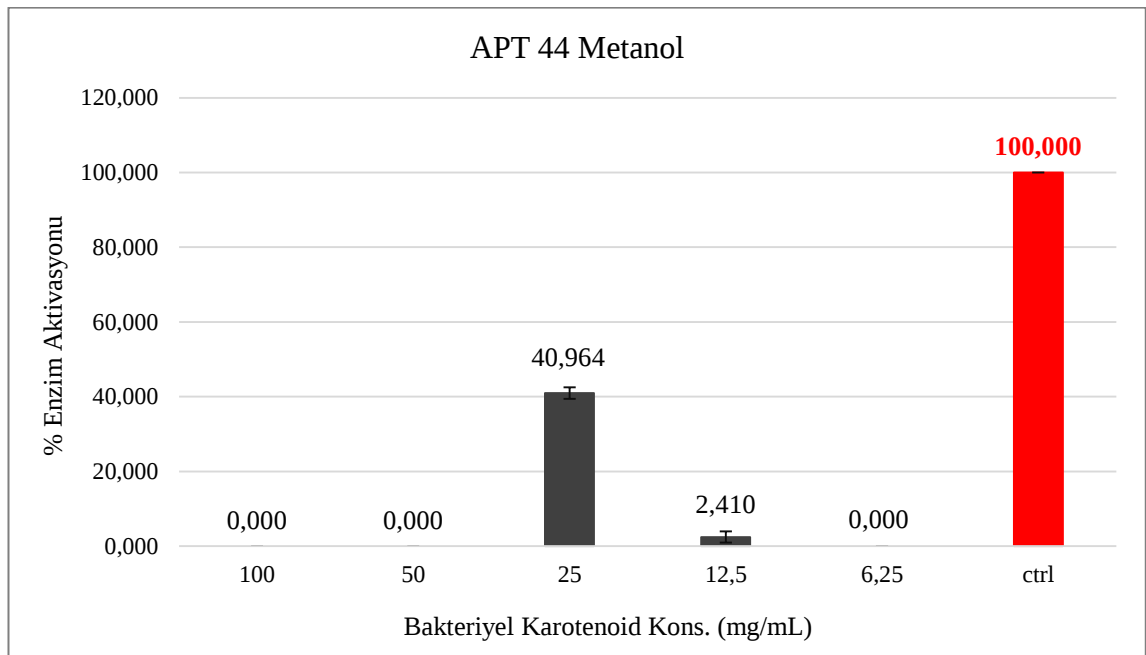


Şekil 4.55 APT 34 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözölen pigmentin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

APT 34'ün hem DMSO hem de metanol ile çözülen pigment ekstraktlarında tüm konsantrasyonların ölçümünde kontrol ölçümünden daha düşük sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.54 ve Şekil 4.55). Bu sonuçlara bakarak APT 20b izolatının GPx aktivasyonunun olmadığı söylenebilir.



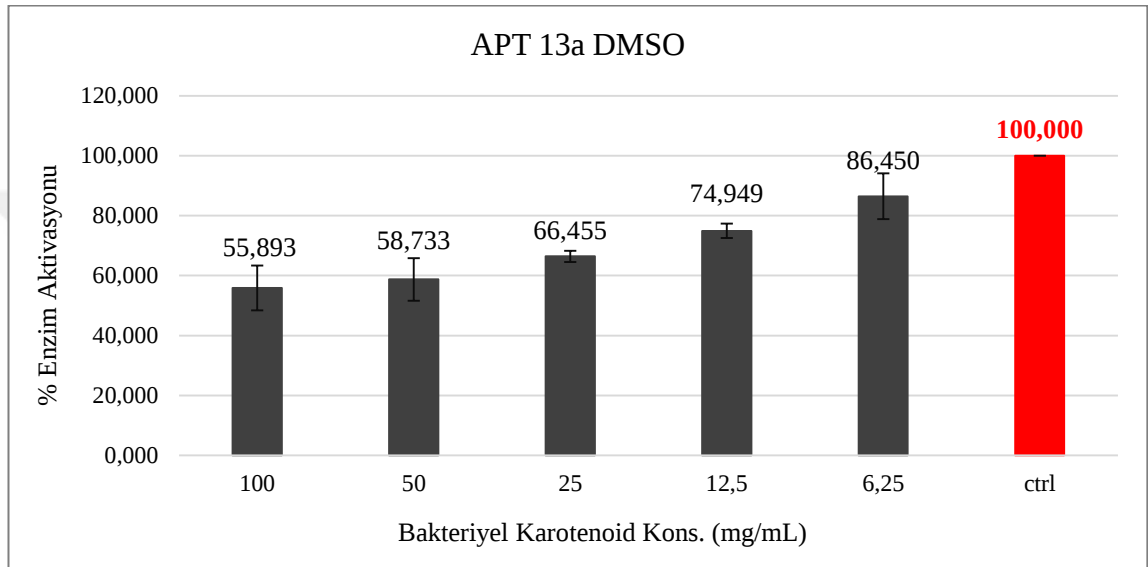
Şekil 4.56 APT 44 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi



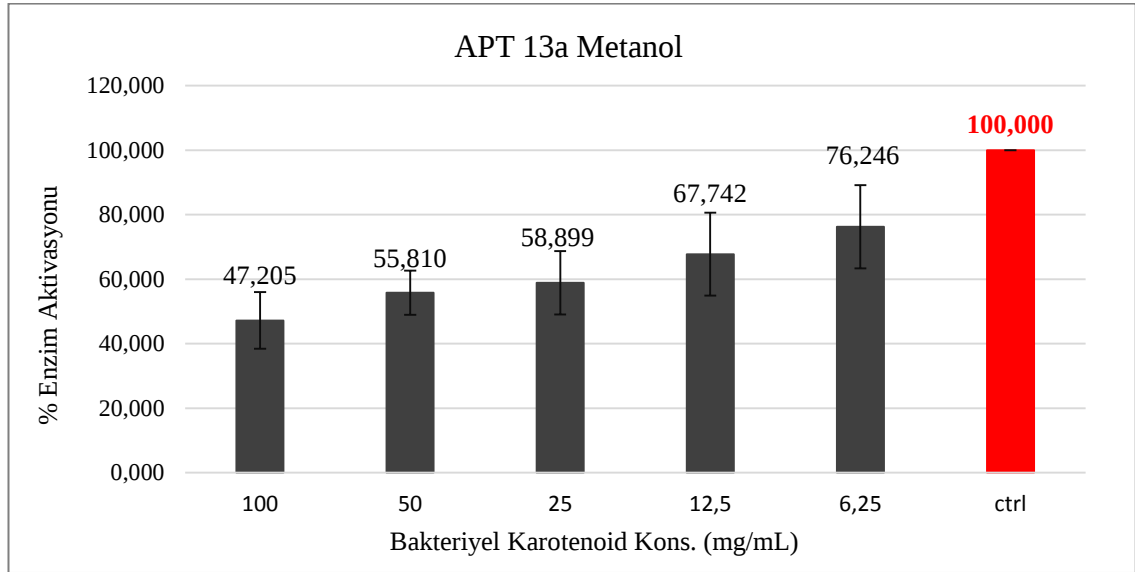
Şekil 4.57 APT 44 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

APT 44'ün hem DMSO hem de metanol ile çözülen pigment ekstraktlarında tüm konsantrasyonların ölçümlerinde kontrol ölçümünden daha düşük sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.56 ve Şekil 4.57). Bu sonuçlara bakarak APT 44 izolatının GPx aktivasyonunun oldukça düşük olduğu gözlenmiştir.

4.3.3 Glutasyon-s-transferaz (GST) aktivitesi sonuçlar

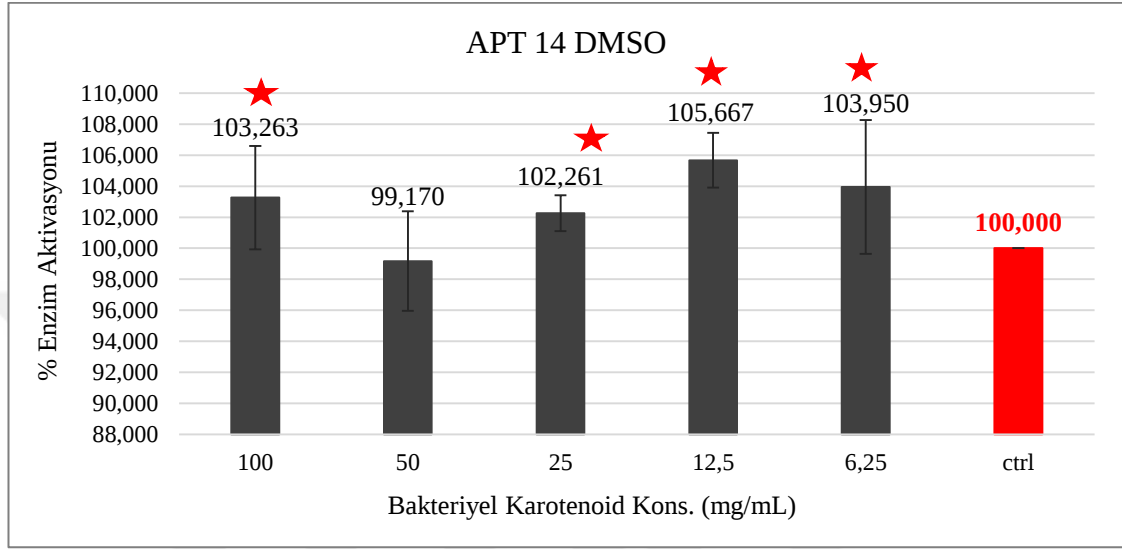


Şekil 4.58 APT 13a izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin glutasyon-s-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

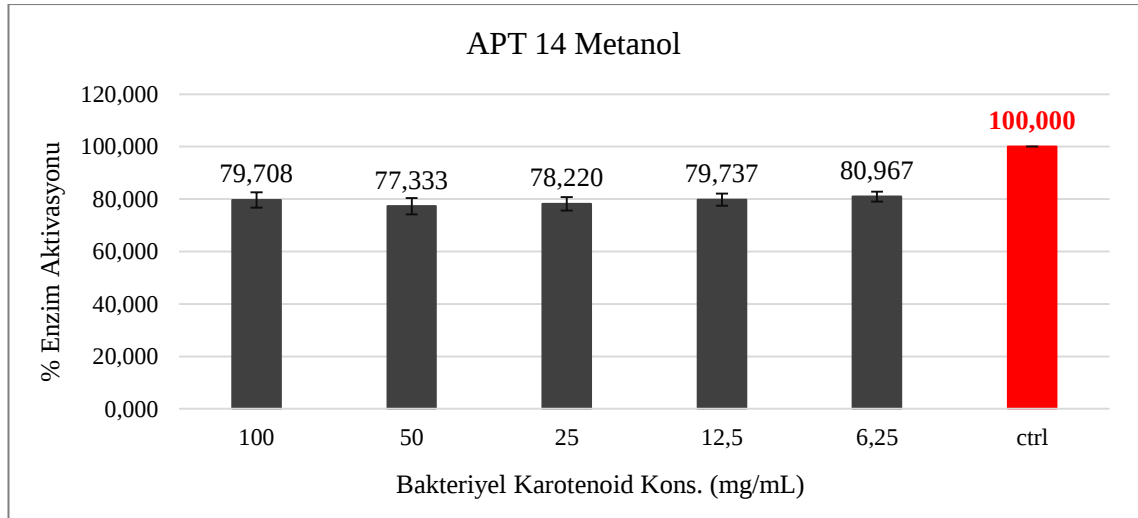


Şekil 4.59 APT 13a izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin glutasyon-s-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

APT 13a'nın hem DMSO hem de metanol ile çözülen pigment ekstraktlarında tüm konsantrasyonların ölçümlerinde kontrol ölçümünden daha düşük sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.58 ve Şekil 4.59). Bu sonuçlara bakarak APT 13a izolatının GST'yi aktive etmediği görülmüştür.



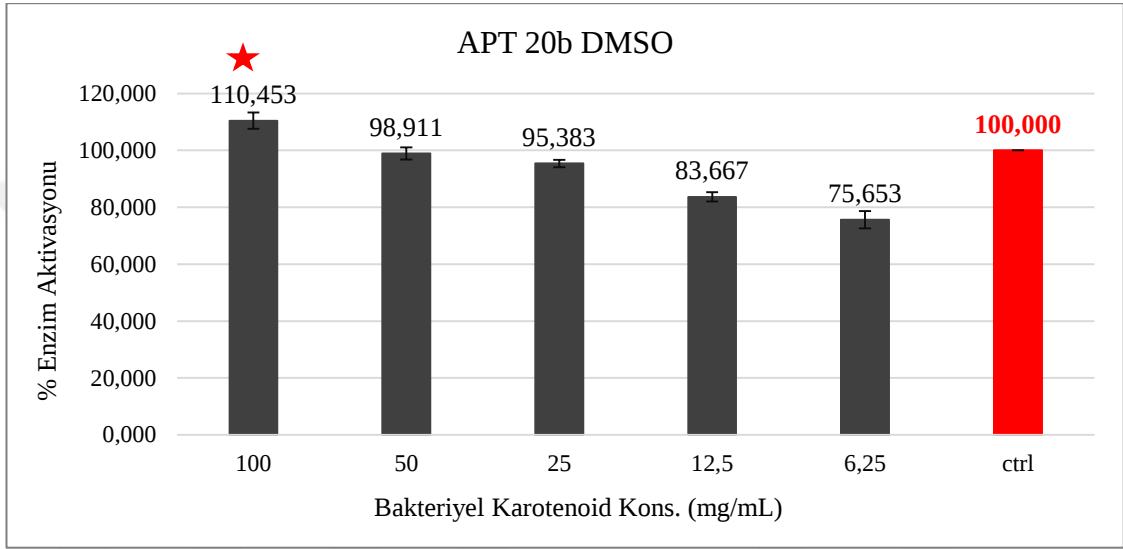
Şekil 4.60 APT 14 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin glutatyon-s-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi



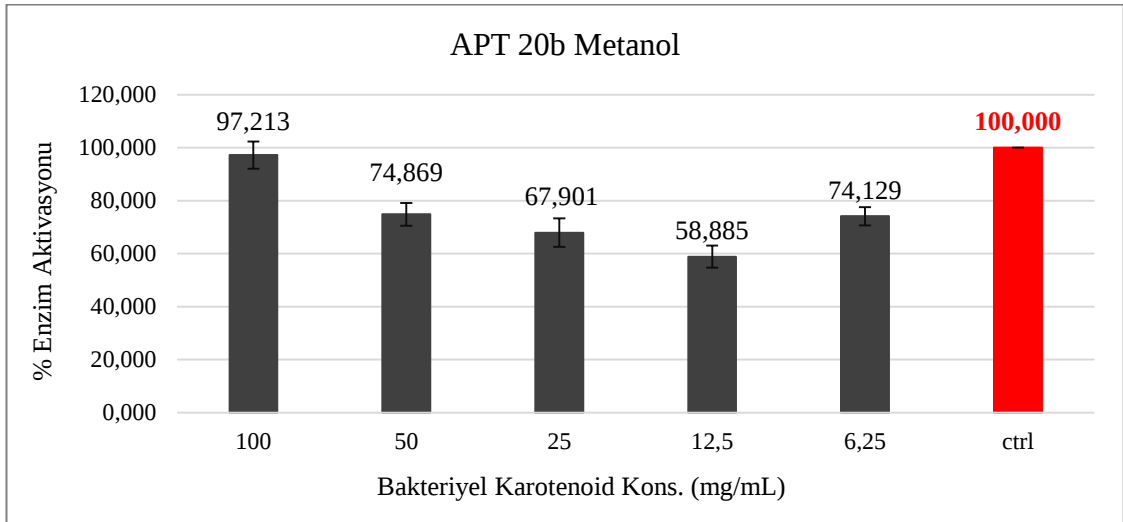
Şekil 4.61 APT 14 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin glutatyon-s-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

APT 14'ün DMSO ile çözülen paralelinde 6,25 - 12,5 - 25 ve 100 mg/mL konsantrasyonlardaki bakteriyel karotenoid ölçümlerinde kontrol ölçümünden daha

yüksek sonuçlar ölçülmüştür (Şekil 4.60). Bu sonuçlara bakarak APT 14 izolatının belirtilen konsantrasyonlarda GST aktivasyonunun olduğu söylenebilir. Metanol ile çözülen paralelinde tüm konsantrasyonların ölçümlerinde kontrol ölçümünden daha düşük sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.61). DMSO ile çözülen örneklerde aktivite olup, metanol ile çözülen örneklerde aktivite olmaması APT 14 izolatında GST aktivasyonunun çözücü cinsine bağlı olarak değiştiğini göstermektedir.

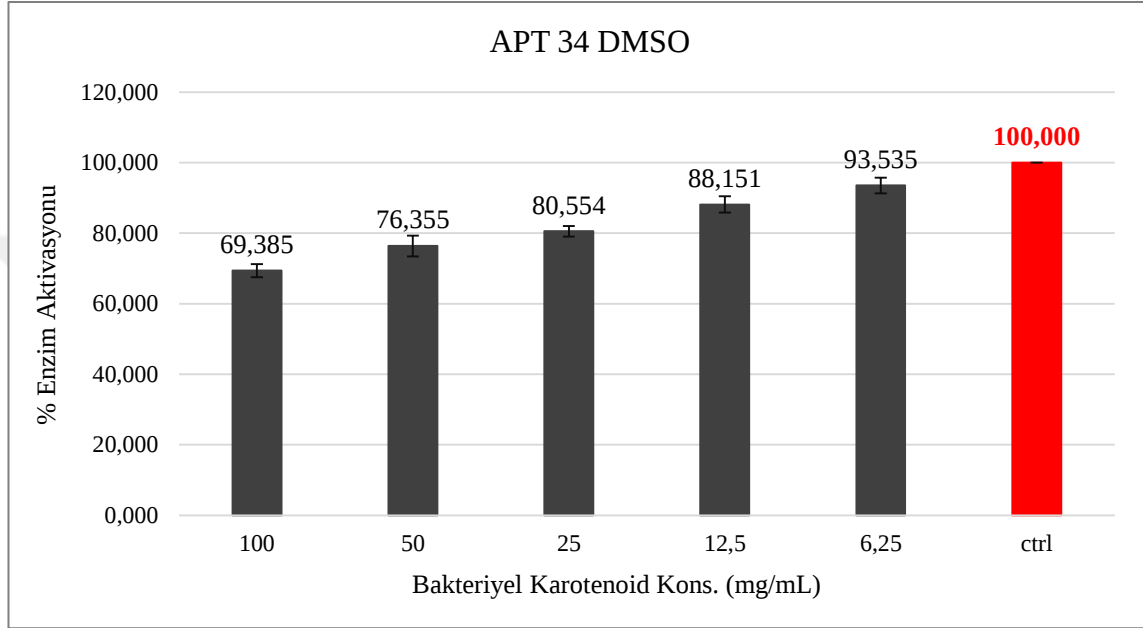


Şekil 4.62 APT 20b izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin glutatyon-s-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

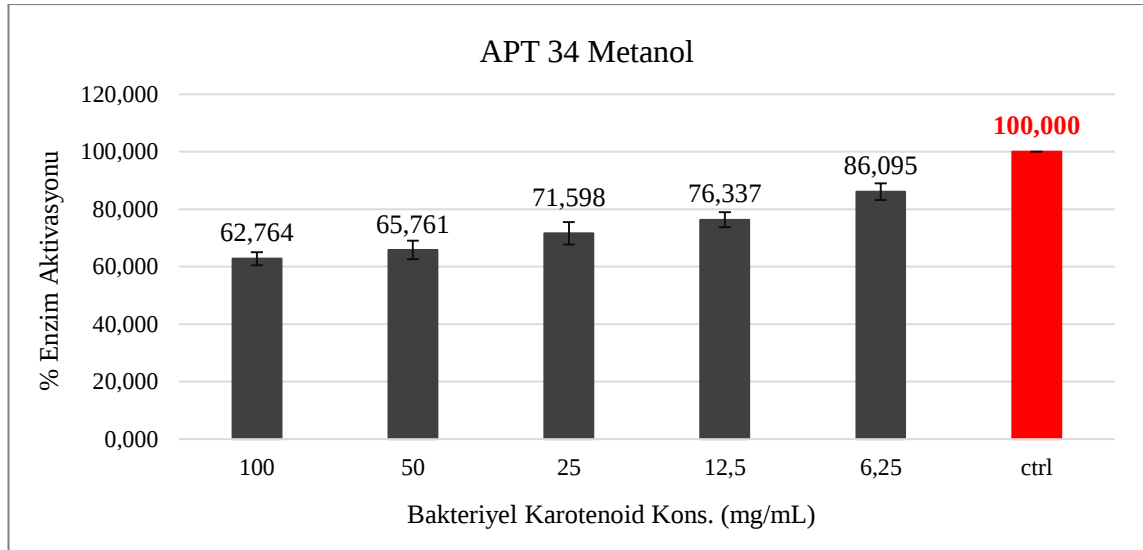


Şekil 4.63 APT 20b izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin glutatyon-s-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

APT 20b'nin DMSO ile çözölen paralelinde 100 mg/mL konstantrasyondaki bakteriyel karotenoid ölçümünde kontrol ölçümünden daha yüksek sonuç elde edilmiştir (Şekil 4.62). Bu sonuçlara bakarak APT 20b izolatının belirtilen konsantrasyonlarda GST'yi aktive ettiği söylenebilir. Metanol ile çözölen paralelinde tüm konsantrasyonların ölçömlerinde kontrol ölçümünden daha düşük sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.63).

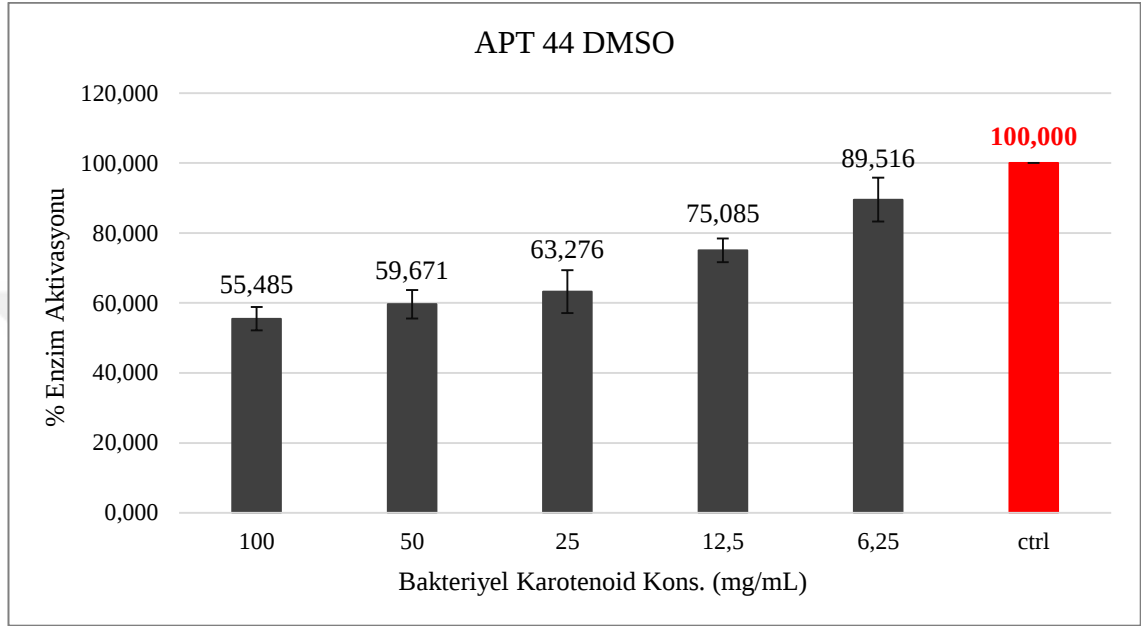


Şekil 4.64 APT 34 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözölen pigmentin glutatyon-s-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

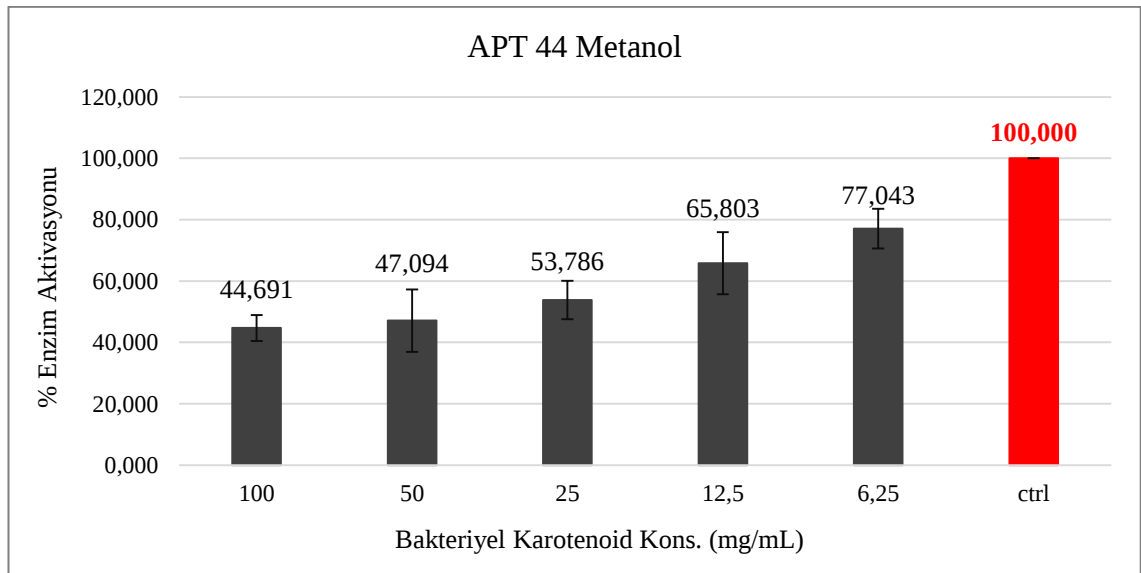


Şekil 4.65 APT 34 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözölen pigmentin glutatyon-s-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

APT 34'ün hem DMSO hem de metanol ile çözülen pigment ekstraktlarında tüm konsantrasyonların ölçümlerinde kontrol ölçümünden daha düşük sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.64 ve Şekil 4.65). Bu sonuçlara bakarak APT 34 izolatının GST aktivasyonunun düşük olduğu görülmüştür.



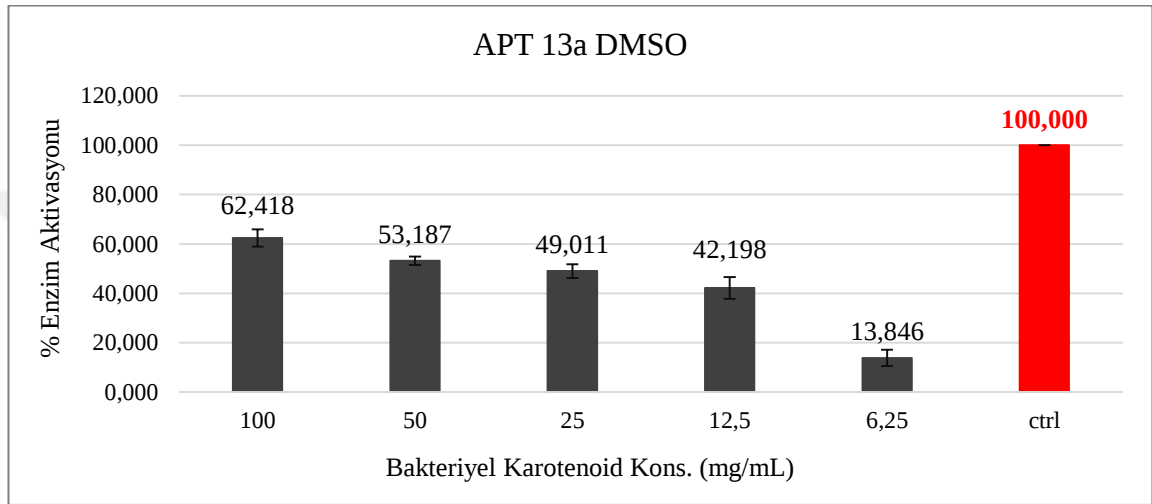
Şekil 4.66 APT 44 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin glutatyon-s-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi



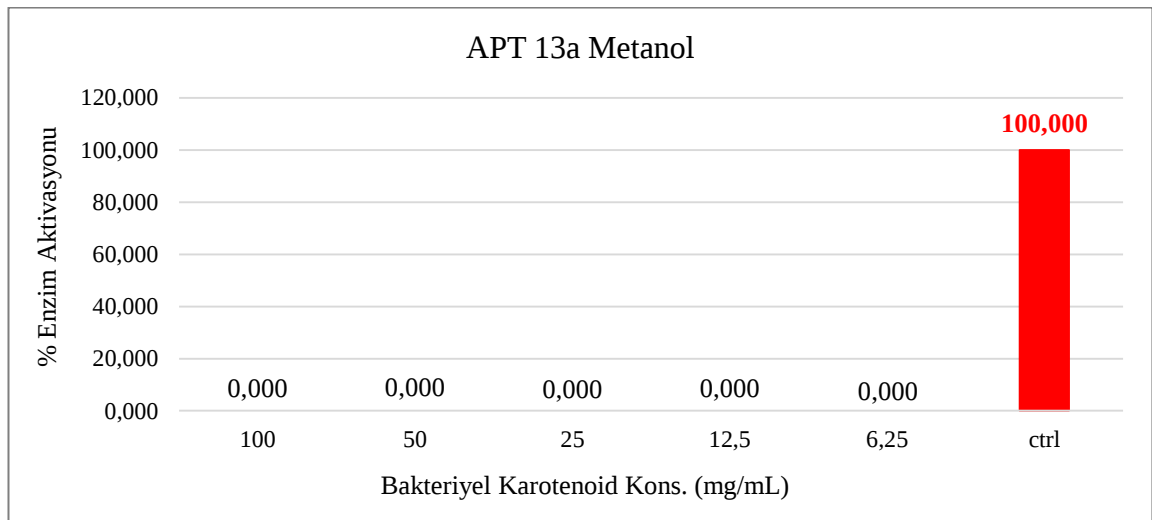
Şekil 4.67 APT 44 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin glutatyon-s-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

APT 44'ün hem DMSO hem de metanol ile çözülen pigment ekstraktlarında tüm konsantrasyonların ölçümlerinde kontrol ölçümünden daha düşük sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.66 ve Şekil 4.67). Bu sonuçlara göre APT 44 izolatının GST'yi aktive etmediği söylenebilir.

4.3.4 Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi sonuçlar

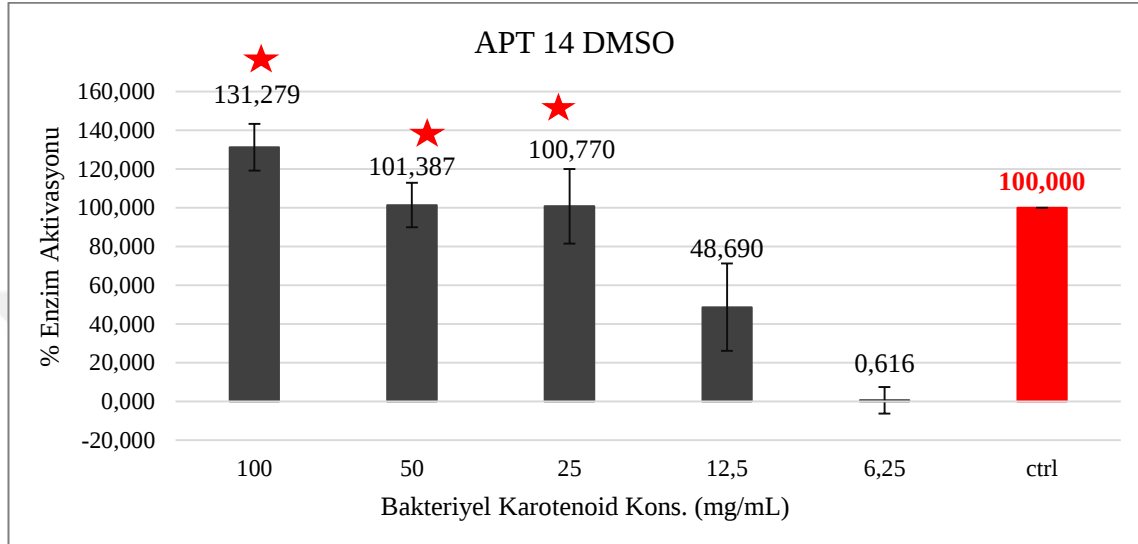


Şekil 4.68 APT 13a izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

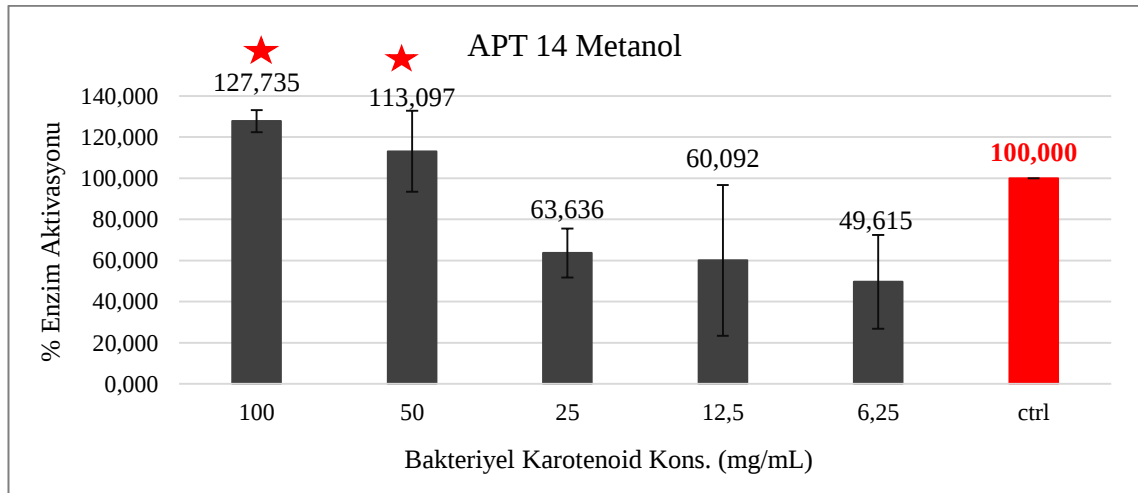


Şekil 4.69 APT 13a izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

APT 13a'nın hem DMSO hem de metanol ile çözülen pigment ekstraktlarında tüm konsantrasyonların ölçümlerinde kontrol ölçümünden daha düşük sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.68 ve Şekil 4.69). Bu sonuçlar, APT 13a izolatının SOD'ı aktive etmediğine işaret etmektedir.



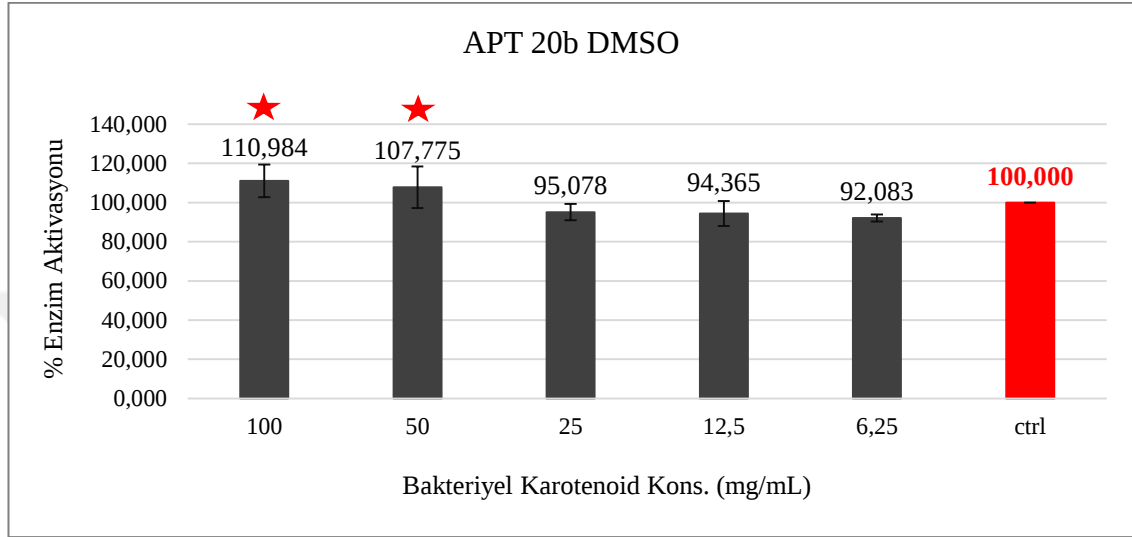
Şekil 4.70 APT 14 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi



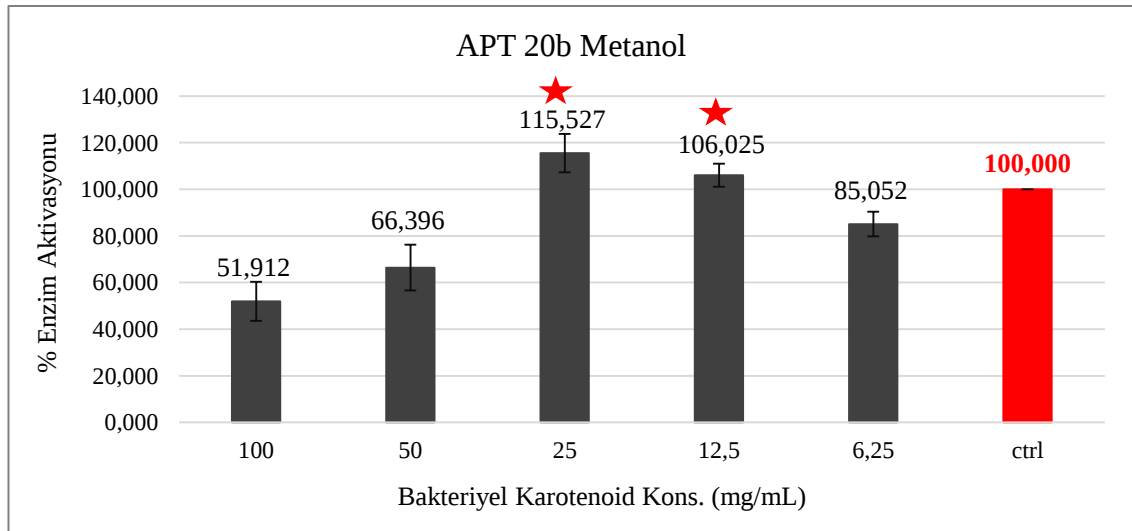
Şekil 4.71 APT 14 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

APT 14'ün DMSO ile çözülen paralelinde 25 - 50 ve 100 mg/mL konsantrasyonlardaki bakteriyel karotenoid ölçümlerinde kontrol ölçümünden daha yüksek sonuçlar elde

edilmiştir (Şekil 4.70). Metanol ile çözülen paralelinde 50 ve 100 mg/mL konantrasyonlardaki bakteriyel karotenoid ölçümleinde kontrol ölçümünden daha yüksek sonuçlar ölçülmüştür (Şekil 4.71). Bu sonuçlara göre APT 14 izolatının belirtilen konsantrasyonlarda SOD aktivasyonunun olduğu söylenebilir.



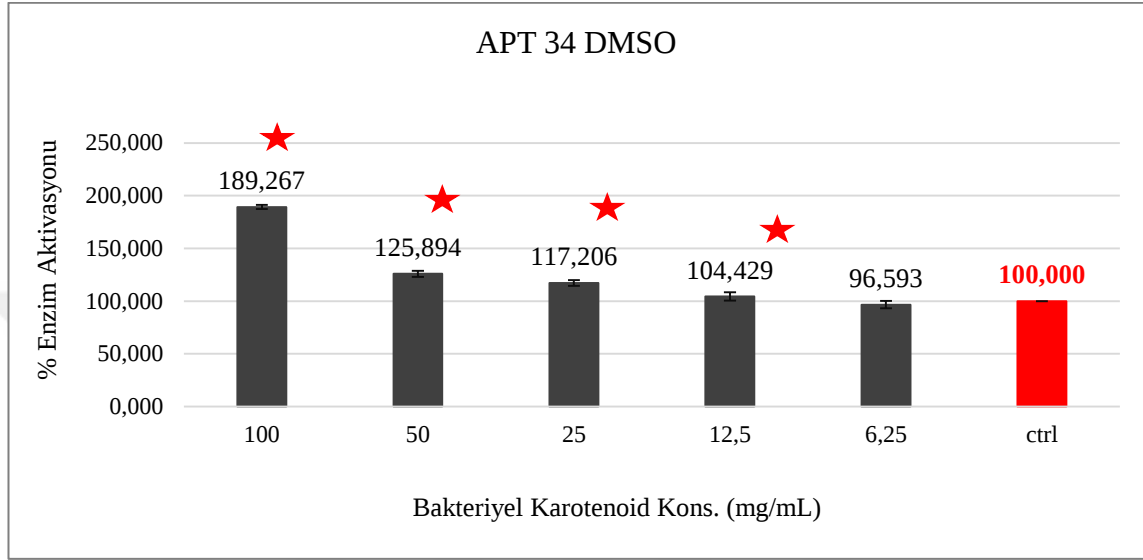
Şekil 4.72 APT 20b izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi



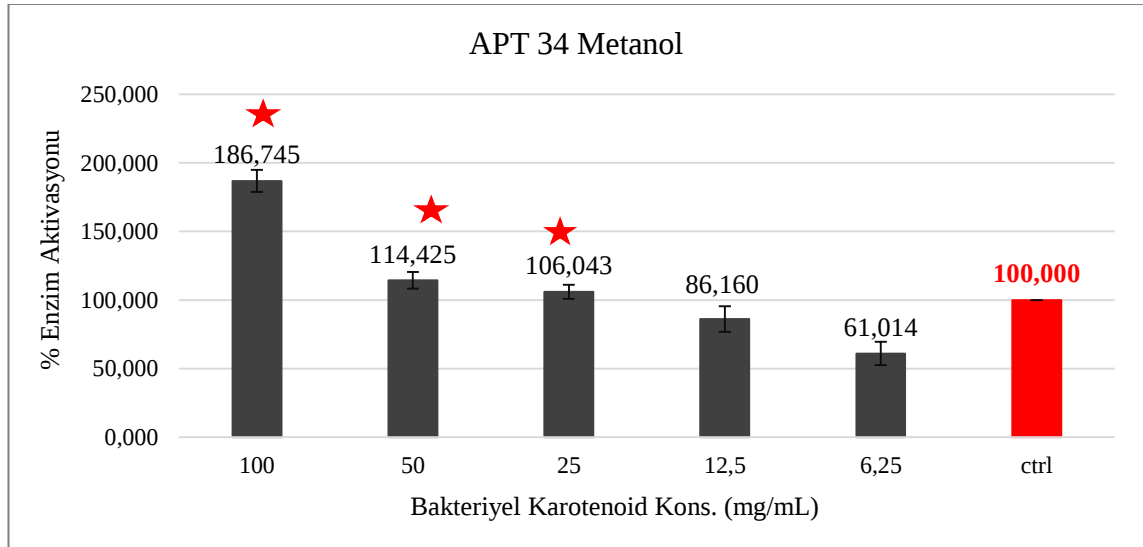
Şekil 4.73 APT 20b izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

APT 20b'nin DMSO ile çözülen paralelinde 50 ve 100 mg/mL konantrasyonlardaki bakteriyel karotenoid ölçümleinde kontrol ölçümünden daha yüksek sonuçlar elde

edilmiştir (Şekil 4.72). Metanol ile çözülen paralelinde ise 12,5 ve 25 mg/mL konsantrasyonlardaki bakteriyel karotenoid ölçümlerinde kontrol ölçümünden daha yüksek sonuçlar bulunmuştur (Şekil 4.73). Bu sonuçlar, APT 20b izolatının belirtilen konsantrasyonlarda SOD aktivasyonunu gerçekleştirmediğini göstermektedir.

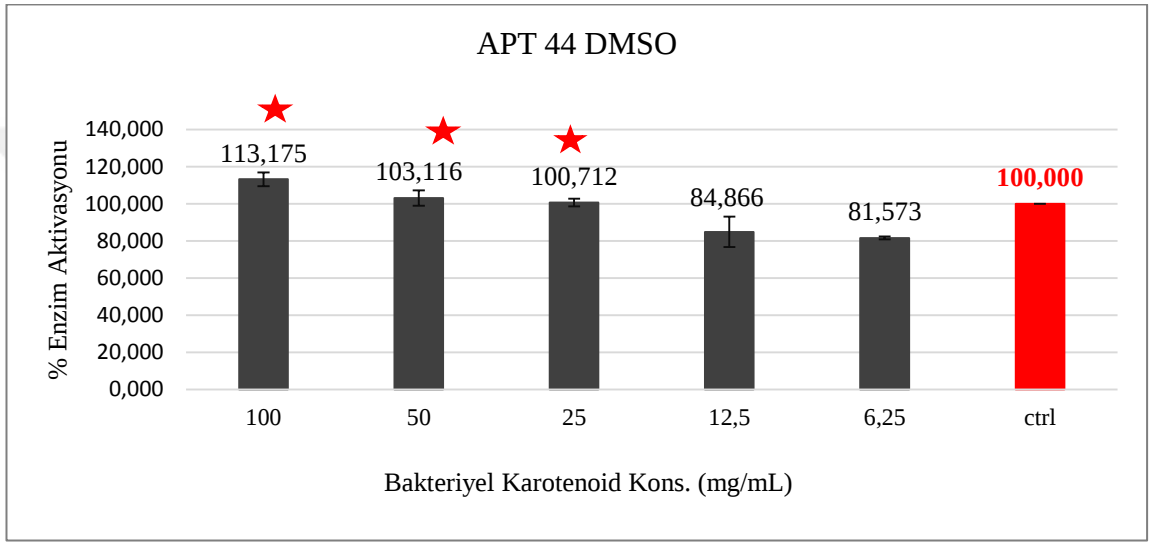


Şekil 4.74 APT 34 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözülen pigmentin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

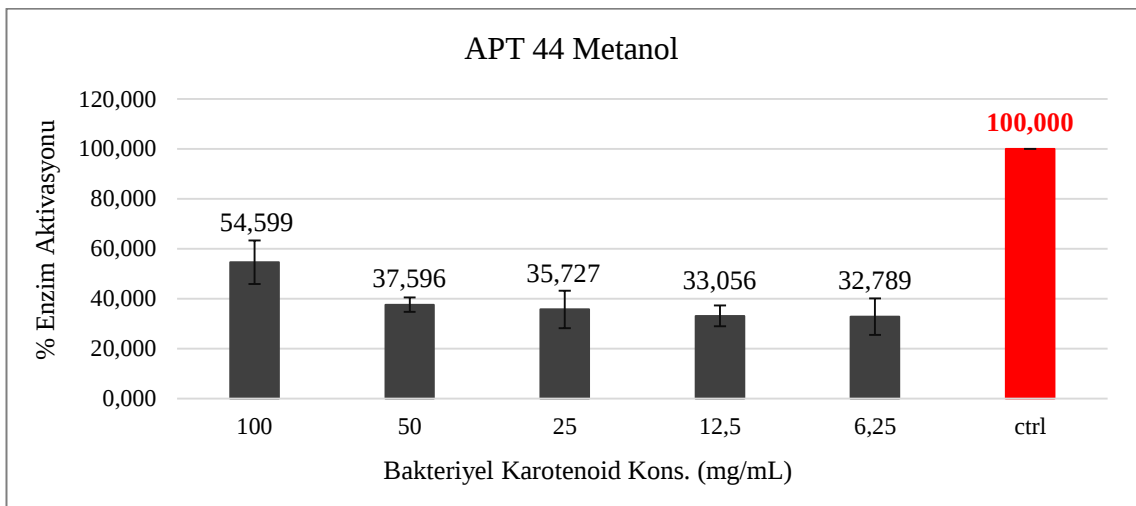


Şekil 4.75 APT 34 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözülen pigmentin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

APT 34'ün DMSO ile çözölen paralelinde 12,5 - 25 - 50 ve 100 mg/mL konstantrasyonlardaki bakteriyel karotenoid ölçömlerinde kontrol ölçömlönden daha yüksek sonuölar elde edilmiştir (Şekil 4.74). Metanol ile çözölen paralelinde 25 - 50 ve 100 mg/mL konstantrasyonlardaki bakteriyel karotenoid ölçömlerinde ise kontrol ölçömlönden oldukça yüksek sonuölar tespit edilmiştir (Şekil 4.75). Sonuö olarak APT 34 izolatının belirtilen konsantrasyonlarda SOD enzimini oldukça aktive ettiöi söylenebilir.



Şekil 4.76 APT 44 izolatından ekstrakte edilip, DMSO ile çözölen pigmentin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi



Şekil 4.77 APT 44 izolatından ekstrakte edilip, metanol ile çözölen pigmentin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

APT 44'ün DMSO ile çözülen paralelinde 25 - 50 ve 100 mg/mL konsantrasyonlardaki bakteriyel karotenoid ölçümlerinde kontrol ölçümünden daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.76). Bu sonuçlara göre APT 44 izolatının belirtilen konsantrasyonlarda SOD aktivasyonunu gerçekleştirdiği söylenebilir. Metanol ile çözülen paralelinde tüm konsantrasyonların ölçümlerinde kontrol ölçümünden daha düşük sonuçlar bulunmuştur (Şekil 4.77). DMSO ile çözülen örneklerde aktivite olup, metanol ile çözülen örneklerde aktivite olmaması APT 44 izolatında SOD aktivasyonunun çözücü cinsine bağlı olarak değiştiğini göstermektedir.



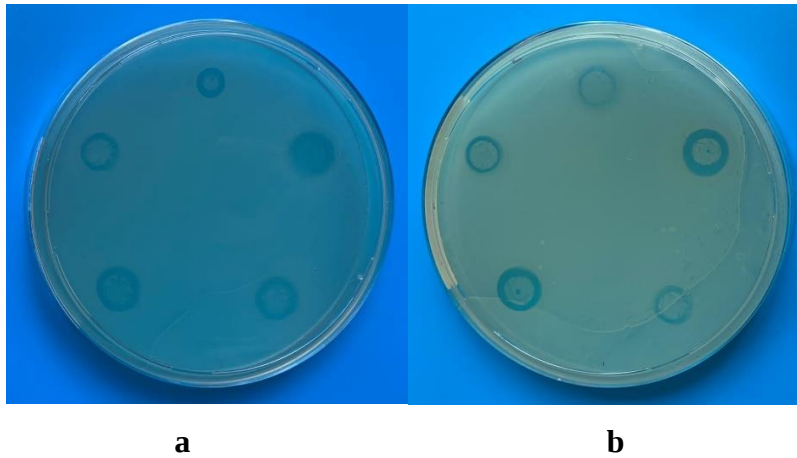
Çizelge 4.3 APT 13a, APT 14, APT20b, APT 34 ve APT 44'ün DMSO ve metanol (Met.) pigment özütlerinin antioksidan enzim aktivitesi etkinlikleri

	CAT Aktivitesi					GPx Aktivitesi					GST Aktivitesi					SOD Aktivitesi				
	100 mg/ mL	50 mg/ mL	25 mg/ mL	12,5 mg/ mL	6,25 mg/ mL	100 mg/ mL	50 mg/ mL	25 mg/ mL	12,5 mg/ mL	6,25 mg/ mL	100 mg/ mL	50 mg/ mL	25 mg/ mL	12,5 mg/ mL	6,25 mg/ mL	100 mg/ mL	50 mg/ mL	25 mg/ mL	12,5 mg/ mL	6,25 mg/ mL
13a DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13a Met.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14 DMSO	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
14 Met.	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
20b DMSO	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
20b Met.	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
34 DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
34 Met.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
44 DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
44 Met.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.3’de tüm enzim aktivite sonuçları verilmiştir. Bu sonuçlara göre, APT 14 ve APT 20b izolatlarının GPx, GST ve SOD enzimlerini aktive ettiği bulunmuştur. APT 14 izolatının DMSO ile çözülen paralelinde, neredeyse tüm konsantrasyonlarda GST aktivitesi görülürken, metanol ile çözülen paralelinde ise GST aktivitesi bulunmamıştır. Benzer şekilde; APT 20b izolatının yine DMSO ile çözülen paralelinde 100 mg/mL konsantrasyonda GST aktivitesi ölçülürken, metanol ile çözülen paralelinde ise GST aktivitesi gözlenmemiştir. APT 44 diğer hiçbir enzimi aktive etmezken, sadece DMSO ile çözülen paralelinin 100 – 50 ve 25 mg/mL konsantrasyonlarında SOD aktivitesi tespit edilmiştir. Fakat metanol ile çözülmüş olan paralelinde SOD aktivitesi ölçülmemiştir. Tüm bu sonuçlar, izolatların ürettikleri pigment içeriklerinin antioksidan aktivitelerinin hangi çözücü ile muamele edildiğine bağlı olarak değiştiğini göstermektedir.

4.4 Ekstrakte Edilen Karotenoid Pigmentlerin Antimikrobiyal Etkinlikleri

Sunulan tez çalışması dahilinde *Exiguobacterium* cinsi izolatlardan ekstrakte edilen karotenoid pigment yapılarının antimikrobiyal özelliklerine Bölüm 3.2.5’de anlatıldığı şekilde bakılmıştır. Pigment ekstraksiyonu sonrası karotenoid pigment yapıları evaporasyona tabi tutularak toz haline getirilmiş, 100 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde DMSO (dimetil sülfoksit) ve metanol olmak üzere iki farklı çözücü ile muamele edilerek antimikrobiyal özelliklerin belirlenmesinde kullanılmıştır. Bu bağlamda 5 bakteriden ekstrakte edilen pigmentlerin, patojen cinslere ait üyeler üzerindeki antagonistik etkilerine bakılmış ve sonuçlar Şekil 4.78 ve Çizelge 4.2’de sunulmuştur.



Şekil 4.78 a) Tavuk patojeni *E.coli* F1 suşu ve b) insan patojeni *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşu üzerine metanolde çözülmüş pigment içeriklerinin antagonistik etkileri

Çizelge 4.4 Antimikrobiyal aktivite sonuçları

*(MET, metanol çözücüsü; -, inhibasyon zonu görülmeyen sonuçlar; + = 1-4 mm zon, ++ = 5-8 mm zon, +++ = 8-12 mm zon)

Patojen Bakteriler	Pigment İçeriklerinin Antimikrobiyal Etkinlikleri									
	APT 13a ME T	APT 13a DMS O	APT 14 ME T	APT 14 DMS O	APT 20b ME T	APT 20b DMS O	APT 34 ME T	APT 34 DMS O	APT 44 ME T	APT 44 DMS O
<i>Escherichia coli</i> P1	+++	-	++	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> F1	+++	+++	++	-	+++	-	++	-	+++	-
<i>Salmonella</i> sp. S404	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+++	+++
<i>Salmonella</i> sp. S340	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	++	+	++	-	+	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ATCC 43300	++	+++	+	-	+++	-	++	++	+++	+++
<i>Enterococcus faecalis</i> 25	++	++	+	-	+	-	-	-	++	++
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13311	+++	+++	++	++	-	+++	-	-	+++	+++

Ölçülen antimikrobiyal aktivite sonuçlarına göre özellikle, APT 13a (metanol ve DMSO), APT 14 (metanol) ve APT 44 (metanol ve DMSO) içeriklerinin test edilen enfekte insan ve tavuk patojenleri üzerinde oldukça yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Diğer 2 izolatın pigmentlerinin de yine farklı türler üzerinde antagonistik etki gösterdikleri belirlenmiştir. Özellikle metisiline dirençli *S. aureus* suşu üzerinde tüm pigment içeriklerinin en az bir çözücü varlığında etkin olduğu tespit edilmiştir. Çözücüler arasındaki farklılıkların antioksidan aktivitede gözlemlendiği üzere, pigment içeriğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Karotenoidler doğada farklı canlılarda ve farklı formlarda bulunabilen, gıda, kozmetik ve farmasötik ürün formülasyonlarında ticari öneme sahip bileşiklerdir. Karotenoidler ve türevleri bitkiler ve çeşitli mikroorganizmalar tarafından doğal olarak sentezlenen bir pigment grubudur. Bitkilerde bu bileşikler fotosentezde rol oynamalarına ek olarak sitokinin ve absisik asit gibi hormonların yapı taşlarını oluşturmaktadır. Hayvanlarda ve insanlarda ise β -karoten başta olmak üzere karotenoid çeşitleri provitamin A öncülü olarak rol oynamaktadır. Çoğunlukla gıda ve kozmetik ürünlerinde renklendirici olarak kullanılırlar. Renklendirici maddeler şeklindeki kullanımlarının yanısıra karotenoidler, sağlık alanında diyet takviyesi olarak UV hasarı, kanser, katarakt, kalp-damar hastalıkları gibi pek çok hastalıkta koruyucu olarak görev alabilmektedirler. Ayrıca karotenoidler, hücreleri bir antioksidan ajan olarak oksidatif hasara karşı da koruyabilir (Matthews vd., 2003, Mussagy vd., 2019).

İnsan ve hayvan sağlığı açısından bu denli yararlı maddeler olmaları doğal kaynaklardan karotenoidlerin üretimine olan rağbeti artırmıştır. Doğal karotenoid kaynağı olarak mikroorganizmalar, üretim sürelerinin kısa olması ve kısa sürede bol miktarda üretilibilmeleri açısından tercih sebebi olmaktadır. Son birkaç yılda mikroorganizmalar tarafından üretilen karotenoidler üzerinde bir dizi araştırma yapılmıştır. Bunlara bakteriyel örnek olarak; *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Corynebacterium* ve *Rhodococcus*, mikroalg olarak; *Haematococcus* ve *Dunaliella*, mantar olarak; *Blakeslea trispora* verilebilir (Jinendiran vd., 2019). Bakteriyel kaynaklar söz konusu olduğunda, ticari besiyerleri yerine çeşitli atıkların kullanıldığı ve böylece üretim maliyetinin düşürülmesinin yanı sıra mikrobiyal gelişimin teşvik edildiği pek çok literatür çalışması bulunmaktadır. Buğday kepeği, ayçiçeği küspesi, pamuk tohumu küspesi, soya fasulyesi küspesi, pirinç kabuğu veya pirinç kepeği gibi farklı tarımsal yan ürünler kullanılarak *Bacillus licheniformis* tarafından alfa amilaz üretiminin (Haq vd., 2003), muz atığı kullanılarak *Bacillus subtilis* tarafından amilaz üretiminin (Unakal vd., 2012), peynir altı suyu tozu kullanılarak *Bacillus subtilis* tarafından polisakkarit ve surfaktin üretiminin (Mehmetoglu vd., 2012), mısır kepeği, mısır koçanı, buğday kepeği, pirinç kepeği, süt atıkları ve melas gibi farklı endüstriyel

ve tarımsal yan ürünler kullanılarak *Bacillus subtilis* tarafından polihidroksibütirat (PHB) üretiminin (Hassan vd., 2019), soya fasulyesi küspesi, hindistan cevizi küspesi ve manyok küspesi gibi farklı tarımsal yan ürünler kullanılarak *Rhodopseudomonas faecalis* tarafından karotenoid üretiminin (Patthawaro vd., 2020), melas, şilempe ve peynir altı suyu tuzu gibi farklı endüstriyel yan ürünler kullanılarak *Phycomyces blakesleeanus*, *Blakesleea trispora*, *Phycomyces nites* ve *Mucor mucedo* tarafından β -karoten üretiminin (Kahyaoğlu, 2007) gerçekleştirildiği çok çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu bağlamda, sunulan literatürler içeriklerinden de anlaşılacağı üzere, bakteriyel kökenli iki farklı pigment üretim patenti (*Flavobacterium* sp.; patent no US20050214898A1 ve *Paracoccus* sp.; patent no CA2299050A1) bulunmasına karşın, önemli avantajlar sağlamasına karşın endüstriyel olarak üretilen hiç bir ticari bakteriyel pigment bulunmamaktadır (Anonymous 1999, Anonymous 2005).

Bu sebeplerle tez kapsamında, görsel olarak da havuç renginde doğal turuncu pigmentler ürettikleri gözlenebilen *Exiguobacterium* izolatları kullanılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan karotenoid üreticisi *Exiguobacterium* cinsi bakterilerin mikrobiyal gelişimlerini teşvik etmek amacı ile şeker ve peynir endüstrisi atık maddeleri olan melas ve peynir altı suyu tozu içeren besiyerleri kullanılmıştır. Kullanılan bu besiyerlerinden melas; şeker pancarının işlenmesi sonucunda ortaya çıkan koyu kahverengi renkli, kolloidal bir bileşiktir. İçeriğinde kompleks polisakkaritler, invert şekerler, karbonhidrat olmayan çeşitli bileşikler, inorganik iyonlar, malik asit, sitrik asit, laktik asit, asetik asit gibi organik asitler bulunmaktadır. Peynir altı suyu tozu ise; süt fabrikalarının atık maddesi olup, sütün peynir mayası veya organik asitlerle pıhtılaştırılmasından ve kazeinin çöktürülmesinden sonra geri kalan sarı renkte bir sıvıdır. İçeriğinde yağ, protein, laktoz ve mineral maddeler bulunmaktadır (Kahyaoğlu, 2007). Sahip oldukları bu içeriklerden dolayı mikrobiyal gelişimi teşvik etmek amaçlı kullanıldıkları bilinmektedir. Mikrobiyal gelişim için kullanılan bu iki endüstriyel atığın zengin içerikleri sayesinde izolatların gelişimine sağladıkları katkı literatürde yapılmış çalışmaları doğrular niteliktedir (Bölüm 4.1.1 Şekil 4.1 – 4.10).

Bir bakteri izolatının mikrobiyal gelişimi ve bu izolat tarafından üretilen mikrobiyal metabolitlerin üretimi, büyük ölçüde büyüme ortamının bileşenlerinden, özellikle

karbon, azot ve mineral kaynaklarından ve büyüme koşullarından, örneğin pH ve sıcaklıktan etkilenir. Çok sayıda çalışma mikrobiyal gelişimin arttırılması söz konusu olduğunda çeşitli tuz katkılarının rolünü de değerlendirmiştir. Karotenoidler ve lipidler gibi metabolitlerin üretimi esnasında, çeşitli mineral katkıları (asparajin, glikoz, KH_2PO_4 , MgSO_4 ya da NH_4NO_3) besiyerlerinin mikrobiyal gelişimi ve karotenoid üretimini arttırdığı belirlenmiştir (Mussagy vd., 2021).

Çalışmada kullanılan turuncu karotenoid pigment üreticisi *Exiguobacterium* cinsi bakterilerin mikrobiyal gelişimlerine çeşitli potasyum ve magnezyum tuzlarının katkılarının sınanması amacıyla, seçilen melas veya peynir altı suyu tozundan oluşan besiyeri içeriklerine % 0,3 K_2HPO_4 , % 0,1 KH_2PO_4 , % 0,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve % 0,02 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tuzlarının farklı konsantrasyonları eklenmiştir. Fakat, Mussagy ve arkadaşlarının (2021) yapmış olduğu çalışmadan farklı olarak, bu çalışma kapsamında kullanılmış olan farklı konsantrasyonlardaki tuz katkılarının eklendiği besiyerleri aksine, 5 izolat için de tuz katkısı olmayan, sadece melas veya peynir altı suyu tozu içeren besiyeri içeriklerinin mikrobiyal gelişimi teşvik ettiği görülmektedir (Bölüm 4.1.3 Şekil 4.16 – 4.20). Bu durum sonraki endüstriyel üretim ve saflaştırma maliyetlerini düşürecek mahiyettedir.

Ayrıca çalışma kapsamında, mikrobiyal gelişim ve mikroorganizmalar tarafından pigment üretimi aşamalarında çeşitli faktörlerin, bakteriyel gelişim ve pigment üretimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu faktörler arasında kültür ortamı, statik ve çalkalamalı koşullar, inkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı ve kültür ortamının pH değeri gibi çeşitli koşullar yer almaktadır (Shatila vd., 2013). *Exiguobacterium* cinsi bakterilerin üretimleri ve bu bakterilerden karotenoid pigmentler dahil çeşitli metabolitlerin elde edilmesi basamaklarının optimize edildiği çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Shatila vd., 2013, Rajaei vd., 2014, Samyuktha vd., 2016, Jinendiran vd., 2019). *Exiguobacterium* cinsi bakteriler için yapılan bir çalışmada; 25, 30 ve 37°C sıcaklıklar ve pH 4,0 - 5,0 - 6,0 - 7,0 - 8,0 - 9,0 ve 10,0 değerleri denenmiş, optimum gelişim ve pigment üretim sıcaklığı olarak 30°C ve optimum pigment üretim pH'sı olarak 8,0, optimum gelişim pH'sı olarak 7,0 seçilmiştir (Shatila vd., 2013). Bir başka çalışmada; 15, 20, 25, 30, 35 ve 40°C sıcaklıklar ve pH 5,5 - 6,5 - 7,5 - 8,5 - 9,5 ve 10,5

değerleri denenmiş, optimum gelişim ve metabolit üretim sıcaklığı olarak 30°C ve optimum gelişim ve metabolit üretim pH'sı olarak 7,5 seçilmiştir (Rajaei vd., 2014). Son olarak bir çalışmada; 25, 35, 40, 45 ve 50°C sıcaklıklar ve pH 6,0 - 7,0 - 8,0 - 9,0 ve 10,0 değerleri denenmiş, optimum gelişim ve karotenoid pigment üretim sıcaklığı olarak 30°C ve optimum gelişim ve karotenoid pigment üretim pH'sı olarak 7,0 seçilmiştir (Jinendiran vd., 2019). Tez çalışmaları kapsamında elde edilen pH koşulları denemeleri sonuçlarına göre; literatür çalışmalarıyla paralel şekilde pH 8,0 – 8,5 – 9,0 değerleri izolatlar için optimum pH gereksinimleri olarak belirlenmiştir. Sıcaklık koşulları denemeleri sonuçlarına göre; 37 ve 40°C sıcaklıklar izolatlar için optimum sıcaklık olarak seçilmiştir. Bunu yanısıra, test edilen farklı pH ve sıcaklık değerlerinde, oldukça değişkenlik gösteren mikrobiyal sayım sonuçları elde edilmiştir. Bu sonuçlar sınanan koşullardaki mikrobiyal gelişimin, ortam koşullarından fazlasıyla etkilendiğini göstermiştir.

Çalışmaların çoğu, kültür ortamının sıcaklık, pH ve besin içeriğinin optimizasyonuna odaklanmış olup, diğer inkübasyon parametrelerinin de karotenoidler gibi ikincil metabolitlerin üretimi için oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Çalkalama koşulları ve ışık bu ilave koşulların başında gelmektedir. Yüksek çalkalama hızlarında gelişen kültürlerin aksine, düşük çalkalama hızlarında veya statik koşullarda, hücre yüzeyindeki besin maddelerinin düşük olması nedeniyle hücre büyümesinin azaldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Mussagy vd., 2019). Tıpkı çalkalama koşullarında olduğu gibi ışık koşullarında hücre büyümesini dolayısıyla karotenoid üretimini teşvik ettiği belirlenmiştir. Karanlık inkübasyon ortamında gelişen kültürlerin aksine ışık varlığında inkübe edilmiş kültürden ekstrakte edilen pigment kuru ağırlığının %10'a kadar daha yüksek olduğu ölçülmüştür (Mapelli-Brahm vd., 2021).

Karotenoid pigment üreticisi beş farklı *Exiguobacterium* cinsi bakterinin pigment üretim koşullarının optimize edilmesi üzerine yürütülen tez çalışmaları değerlendirildiğinde; çalkalamalı ve statik koşullarda geliştirilen kültürlerden ekstrakte edilen pigment içerikleri, spektrofotometrik olarak ölçülmüş olup, çalkalamalı koşulların pigment üretimini teşvik ettiği belirlenmiştir. Benzer şekilde, ışık kaynağı yerleştirilmiş inkübatörlerde geliştirilen kültür ortamından ekstrakte edilen pigment

özütlerinden, alüminyum folyo ile tamamen kaplanarak karanlık koşullarda saklanmış olan erlenlerde geliştirilen kültürlerden ekstrakte edilen pigment içeriklerine kıyasla daha yüksek optik yoğunluk gösteren ölçümler kaydedilebilmiştir.

Karotenoidler, suda neredeyse hiç çözülmeyen oldukça hidrofobik, hücre içi moleküllerdir. Karotenoidlerin çözülebilmesi için aseton, metanol, etanol, petrol eter ve etil eter gibi farklı organik çözücüler kullanılmaktadır. Bu çözücülerin suda çözünmeyen pigmenti ekstre etme yetenekleri farklı çalışmalarda araştırılmıştır. Metanol bu anlamda en güçlü çözücü olarak seçilmiştir (Shatila vd., 2013). Tez çalışmasında pigmentler ekstrakte edilirken literatürde belirlenmiş olan yöntemler test edilmiş ve benzer şekilde metanol ve DMSO'nun etkili çözücüler olduğu ve kullanılacak amaca yönelik olarak biyolojik aktivitenin değişkenlik gösterdiği tespti edilmiştir. (Arulselvi vd., 2013, Sasidharan vd., 2013, Shatila vd., 2013, Sivaganesh vd., 2016). Mevcut literatürden farklı olarak sadece 60°C'de gerçekleştirilen su banyosu basamağı değiştirilmiş, pigmen üçeriğinin sıcaklıktan zarar görmemesi için yerine sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Ekstraksiyon sonrası yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucu, literatürde elde edilen ölçümlerle paralel olarak 450 – 500 nm dalga boyu aralığında en yüksek pikler elde edilmiştir.

Karotenoidler provitamin A öncülü olma ve potansiyel antioksidan aktivite sergileme gibi özelliklere sahiptirler. Karotenoidler sınıflandırılırken; hidrokarbon omurgalarının uç kısımlarında β -iyonon halkası içerenler (provitamin A öncülü karotenoidler) ve β -iyonon halkası içermeyenler (provitamin A öncülü olmayan karotenoidler) olarak gruplandırılırlar. Bunlardan A vitamini öncülü olan karotenoidlerin antioksidan aktiviteleri düşük olup, A vitamini öncülü olmayan karotenoidler yüksek antioksidan aktiviteye sahiptirler (Saini vd., 2019).

Çalışma kapsamında beş *Exiguobacterium* cinsi bakterinin katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-s-transferaz ve süperoksit dismutaz enzim aktivitelerine bakılmıştır. Tüm izolatların katalaz aktivitesi üzerine etkisi düşük bulunurken, APT 14 ve APT 20b izolatlarının hem DMSO hem de metanolde çözülen pigment içeriklerinin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinde artışa sebep oldukları belirlenmiştir. Yine

APT 14 ve APT 20b izolatlarının sadece DMSO ile çözülen pigment içeriklerinin glutatyon-s-transferaz aktivitesinin artışına neden oldukları da saptanmıştır. İzolatların süperoksit dismutaz aktivitesine bakıldığında; APT 14, APT 20b ve APT 34'ün hem DMSO hem de metanolde çözülen pigment içeriklerinin enzim aktivitesini aktive ettiği bulunurken, APT 44 izolatının yalnızca DMSO ile çözülen pigment içeriğinin enzim aktivitesinde artışa sebep olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlardan yola çıkarak APT 14 ve APT 20b izolatlarının daha çok antioksidan aktivite sergilediği söylenebilmektedir. APT 13a, APT 34 ve APT 44 izolatlarının ise düşük antioksidan etkinliklerinden ötürü birer provitamin A öncülü olabileceği düşünülmektedir.

Endüstriyel olarak pek çok kullanım alanı olan karotenoidler başta gıda takviyesi ve hayvan yem katkısı olarak gıda ve tıp alanlarında yaygın olarak uygulama alanı bulmaktadırlar. İnsan ve hayvan sağlığı faydasına yönelik kullanılan bu doğal pigment yapılarının sergiledikleri antimikrobiyal aktivite de oldukça önem arz etmektedir. Daha önceki pek çok çalışmada *Exiguobacterium* cinsine ait üyelerden ve diğer mikrobiyal kaynaklardan ekstrakte edilen pigment içeriklerinin antimikrobiyal aktiviteler gösterdikleri tespit edilmiştir. *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Erwinia* sp. ve *Klebsiella* sp. daha önce taranan ve pigment içerikleri tarafından antagonistik etkiler görülen bakteriyel patojenler arasındadır (Shatila vd., 2013, Samyuktha vd., 2016, Sivaganesh vd., 2016).

.Mevcut tez çalışmasında; APT 13a, APT 14, APT 20b, APT 34 ve APT 44 izolatlarının *E.coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis* gibi gıda ve hayvancılık sektörü için önemli olan insan ve tavuk patojenlerinin gelişimine karşı gösterdikleri inhibe edici antinikrobiyal etkilere bakılmıştır. Özellikle APT 13a, APT 14 ve APT 44 izolatlarının; tavuk izolatı olan 2 *E.coli* (P1 – F1) ve 2 *Salmonella* sp. (S340 – S404), *E.coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Enterococcus faecalis* 25 ve *Salmonella enteritidis* ATCC 13311 patojenleri üzerine antagonistik etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Literatürde yer alan çalışmalara paralel olarak üretilen pigment ekstraktlarının enfeksiyon etmeni çeşitli Gram pozitif ve negatif patojenin gelişmesini önlediği saptanmıştır.

Günümüz bilim dünyasında popüler bir çalışma konusu olan, giderek önem ve rağbet kazanan doğal kaynaklı karotenoid pigment maddeleri elde edebilmek amacı ile bir ön araştırma niteliğinde planlanan bu tez çalışması kapsamında, hem endüstriyel atık maddelerin çevreye zarar vermeden tekrar değerlendirilmesi ve ekonomiye kazandırılması hem de gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılabilecek A vitamini öncülü, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteler gösteren doğal pigment maddelerinin üretimleri amaçlanmıştır. Bu bağlamda, *Exiguobacterium* cinsine ait, gözle görülür şekilde turuncu pigmentler üreten beş bakterinin mikrobiyal gelişim koşullarının optimizasyonu, ürettikleri turuncu pigment içeriklerinin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Tamamlanan bu tez çalışması ile; çalışılan beş bakterinin, endüstriyel atıklardan oluşan besiyerlerinde ideal gelişimleri için ihtiyaç duydukları pH ve sıcaklık koşulları belirlenerek aydınlatılmaya çalışılmıştır. Mevcut çalışma kapsamında yapılmış olan üretim optimizasyonu, ekstraksiyon, antioksidan ve antimikrobiyal aktivite taramaları sonucunda, elde edilen sonuçların yanında *Exiguobacterium* cinsine ait üyeler ile yapılmış olan diğer literatür çalışmaları da göz önüne alındığında bu cinse dahil üyelerin sekonder metabolitler olan karotenoid pigmentler içerdiği görülmektedir.

Dolayısıyla bu karotenoid pigment ekstraktlarının, gıda, yem, kozmetik, farmasötik ve tıp alanlarını kapsayan çeşitli sektörlerde kullanılabilecek potansiyel birer doğal renklendirici kaynağı olabilecekleri tespit edilmiştir. Sonuç olarak, tamamlanmış olan bu çalışma; hem üretim maliyeti hem de süresi açısından oldukça avantajlar sağlayan doğal karotenoid eldesi için endüstriyel üretim aşamalarına ön çalışma niteliğinde bir çözüm önerisi sunmaktadır. Ayrıca elde edilen sonuçlar, daha sonra yürütülmesi planlanan büyük hacimde üretim optimizasyonu ve ölçeklendirilmesi, özütün detaylı saflaştırılması ve pigment içeriklerinin ileri kimyasal karakterizasyonu çalışmalarına da öncülük edecektir.

KAYNAKLAR

- Adam. A., Deimel. S., Pardo-Medina. J., García-Martínez. J., Konte. T., Limón. M. C. and Terpitz. U. 2018. Protein activity of the *Fusarium fujikuroi* rhodopsins CarO and OpsA and their relation to fungus-plant interaction. International Journal of Molecular Sciences, 19(1): 1–20.
- Aebi. H. 1984. Catalase in vitro. Methods Enzymol, 105:121–6
- Agarwal. S. and Rao. A. V. 1998. Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: A human dietary intervention study. Lipids, 33(10): 981–984.
- Amorim-Carrilho. K. T., Cepeda. A., Fente. C. and Regal. P. 2014. Review of methods for analysis of carotenoids. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 56: 49–73.
- Anonymous. 2005. Web Sites: <https://patentimages.storage.googleapis.com/ee/b6/f6/4c9645e70345c3/US20050214898A1.pdf> Erişim Tarihi: 13.06.2021.
- Anonymous. 1999. Web Sites: <https://patentimages.storage.googleapis.com/37/e2/cf/7e7fe5dd87081b/CA2299050A1.pdf> Erişim Tarihi: 13.06.2021.
- Auerswald. L. and Gäde. G. 2008. Simultaneous extraction of chitin and astaxanthin from waste of lobsters *Jasus lalandii*, and use of astaxanthin as an aquacultural feed additive. African Journal of Marine Science, 30(1): 35–44.
- Avalos. J. and Carmen Limón. M. 2015. Biological roles of fungal carotenoids. Current Genetics, 61(3): 309–324.
- Barroso. S. R., Sella. R., Guizelini. B. P., Porto De Souza Vandenberghe. L., Bianchi. A., Medeiros. P. and Soccol. C. R. 2009. BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY Lab-Scale Production of *Bacillus atrophaeus* Spores by Solid State Fermentation in Different Types of Bioreactors. Arch. Biol. Technol. V, 52(52): 159–170.
- Berman. J., Zorrilla-López. U., Farré. G., Zhu. C., Sandmann. G., Twyman. R. M. and Christou. P. 2015. Nutritionally important carotenoids as consumer products. Phytochemistry Reviews, 14(5): 727–743.
- Boudries. H., Kefalas. P. and Hornero-Méndez. D. 2007. Carotenoid composition of Algerian date varieties (*Phoenix dactylifera*) at different edible maturation stages. Food Chemistry, 101(4): 1372–1377.
- Cagri-Mehmetoglu. A., Kusakli. S. and van de Venter. M. 2012. Production of polysaccharide and surfactin by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using rehydrated whey powder as the fermentation medium. Journal of Dairy Science, 95(7): 3643–3649.

- Chen. C. W., Hsu. S. hui., Lin. M. T. and Hsu. Y. hui. 2015. Mass production of C50 carotenoids by *Haloferax mediterranei* in using extruded rice bran and starch under optimal conductivity of brined medium. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(12): 2361–2367.
- Collins. M. D., Lund. B. M., Farrow. J. A. E. and Schleifer. K. H. 1983. Chemotaxonomic Study of an Alkalophilic Bacterium, *Exiguobacterium aurantiacum* gen. nov., sp. nov. *Microbiology*, 129(7): 2037–2042.
- Cong. M., Jiang. Q., Xu. X., Huang. L., Su. Y. and Yan. Q. 2017. The complete genome sequence of *Exiguobacterium arabatum* W-01 reveals potential probiotic functions. *Microbiology Open*, 6(5): 1–7.
- Definition. R. and Economics. O. F. 2005. the First the First. (March), 5.
- Del Campo. J. A., García-González. M. and Guerrero. M. G. 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(6): 1163–1174.
- Delgado-Vargas. F., Jiménez. A. R., Paredes-López. O. and Francis. F. J. 2000. Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 40).
- Durán. N., Teixeira. M. F. S., De Conti. R. and Esposito. E. 2002. Ecological-friendly pigments from fungi. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(1): 53–66.
- Elvira-Torales. L. I., García-Alonso. J. and Periago-Castón. M. J. 2019. Nutritional importance of carotenoids and their effect on liver health: A review. *Antioxidants*, 8(7).
- Fuhrman. B., Elis. A. and Aviram. M. 1997. Hypocholesterolemic effect of lycopene and β -carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 233(3): 658–662.
- Geller. B. L. and Winge. D. R. 1984. Subcellular distribution of superoxide dismutases in rat liver. *Methods Enzymol*, 105:105–14.
- Giovannucci. E. 2002. A Prospective Study of Tomato Products, Lycopene, and Prostate Cancer Risk. *CancerSpectrum Knowledge Environment*, 94(5): 391–398.
- Guedes. A. C., Amaro. H. M. and Malcata. F. X. 2011. Microalgae as sources of carotenoids. *Marine Drugs*, 9(4): 625–644.
- Habig. W. H., Pabst. M. J. and Jakoby. W. B. 1974. Glutathione-S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formaion. *J Biol Chem*, 249:7130–9.

- Hall. T. J., Schaeublin. M., Jeker. H., Fuller. K. and Chambers. T. J. 1995. The role of reactive oxygen intermediates in osteoclastic bone resorption. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 207: pp. 280–287.
- Han. Y. W. and Watson. M. A. 1992. Production of microbial levan from sucrose, sugarcane juice and beet molasses. *Journal of Industrial Microbiology*, 9(3–4): 257–260.
- Haq. I. U., Ashraf. H., Iqbal. J. and Qadeer. M. A. 2003. Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. *Bioresource Technology*, 87(1): 57–61.
- Hassan. M. A., Bakhiet. E. K., Hussein. H. R. and Ali. S. G. 2019. Statistical optimization studies for polyhydroxybutyrate (PHB) production by novel *Bacillus subtilis* using agricultural and industrial wastes. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(7): 3497–3512.
- Higuera-Ciapara. I., Felix-Valenzuela. L., Goycoolea. F. M. and Argüelles-Monal. W. 2004. Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. *Carbohydrate Polymers*, 56(1): 41–45.
- Indra Arulselvi. P., Umamaheswari. S., Ranandkumar Sharma. G. K. C. and J. C. 2013. Screening of Yellow Pigment Producing Bacterial Isolates from Various Eco-climatic Areas and Analysis of the Carotenoid Produced by the Isolate. *Journal of Food Processing & Technology*, 05(01): 1–4.
- Jinendiran. S., Dileep Kumar. B. S., Dahms. H. U., Arulanandam. C. D. and Sivakumar. N. 2019. Optimization of submerged fermentation process for improved production of β -carotene by *Exiguobacterium acetylicum* S01. *Heliyon*, 5(5): e01730.
- Kahyaoglu. M. 2007. Endüstriyel Atık Maddelerden Mikrobiyal Yolla Beta Karoten Üretimi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 17(2): 61–66.
- Karadas. F., Grammenidis. E., Surai. P. F., Acamovic. T. and Sparks. N. H. C. 2006. Effects of carotenoids from lucerne, marigold and tomato on egg yolk pigmentation and carotenoid composition. *British Poultry Science*, 47(5): 561–566.
- Kim. J. Y., Paik. J. K., Kim. O. Y., Park. H. W., Lee. J. H., Jang. Y. and Lee. J. H. 2011. Effects of lycopene supplementation on oxidative stress and markers of endothelial function in healthy men. *Atherosclerosis*, 215(1): 189–195.
- Kim. L., Rao. A. V. and Rao. L. G. 2002. Effect of lycopene on prostate LNCaP cancer cells in culture. *Journal of Medicinal Food*, 5(4): 181–187.
- Kirti. K., Amita. S., Priti. S., Mukesh Kumar. A. and Jyoti S. 2014. Colorful World of Microbes: Carotenoids and Their Applications. *Advances in Biology*, 1–13.
- Krzywonos. M., Chałupniak. A. and Zabochnicka-Świątek. M. 2017. Decolorization of beet molasses vinasse by *Bacillus megaterium* ATCC 14581. *Bioremediation Journal*, 21(2): 81–88.

- Kulshreshtha. N. M., Kumar. R., Begum. Z., Shivaji. S. and Kumar. A. 2013. *Exiguobacterium alkaliphilum* sp. nov. isolated from alkaline wastewater drained sludge of a beverage factory. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63(PART 12): 4374–4379.
- Lafountain. A. M., Prum. R. O. and Frank. H. A. 2015. Diversity, physiology, and evolution of avian plumage carotenoids and the role of carotenoid-protein interactions in plumage color appearance. Archives of Biochemistry and Biophysics, 572: 201–212.
- Ledetzky. N., Osawa. A., Iki. K., Pollmann. H., Gassel. S., Breitenbach. J. and Sandmann. G. 2014. Multiple transformation with the crtYB gene of the limiting enzyme increased carotenoid synthesis and generated novel derivatives in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 545: 141–147.
- Ligia. A. da C. C., Karen. Y. F. K. and Susan. G. K. 2017. Microbial production of carotenoids A review. African Journal of Biotechnology, 16(4): 139–146.
- Mani. M.(2015. Evaluation of Antioxidant Potential of Bioactive Colored Metabolite Isolated From *Exiguobacterium Profundum* Bc2-11 and It ' S Bioactivities Research Article Evaluation of Antioxidant Potential of Bioactive Colored Metabolite Isolated From *Exiguobacterium* . 6(April): 3612–3617.
- Mapelli-Brahm. P. and Meléndez-Martínez. A. J. 2021. The colourless carotenoids phytoene and phytofluene: sources, consumption, bioavailability and health effects. Current Opinion in Food Science, 41: 201–209.
- Martín. J. F., Gudiña. E. and Barredo. J. L. 2008. Conversion of β -carotene into astaxanthin: Two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase-ketolase protein. Microbial Cell Factories, 7: 1–10.
- Matthews. P. D., Luo. R. B. and Wurtzel. E. T. 2003. Maize phytoene desaturase and ζ -carotene desaturase catalyse a poly-Z desaturation pathway: Implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops. Journal of Experimental Botany, 54(391): 2215–2230.
- McNulty. H., Jacob. R. F. and Mason. R. P. 2008. Biologic Activity of Carotenoids Related to Distinct Membrane Physicochemical Interactions. American Journal of Cardiology, 101(10 SUPPL.).
- Meng. X., Chang. Y.-Q., Zhou. L.-Y. and Du. Z.-J. 2020. *Exiguobacterium flavidum* sp. nov., isolated from the Red Maple Lake. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2359–2365.
- Misawa. N. 2011. Pathway engineering for functional isoprenoids. Current Opinion in Biotechnology, 22(5): 627–633.
- Moran. N. A. and Jarvik T. 2010. Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids. Science, 328(5978): 624–627.

- Mussagy. C. U., Guimarães. A. A. C., Rocha. L. V. F., Winterburn. J., Santos-Ebinuma. V. de C. and Pereira. J. F. B. 2021. Improvement of carotenoids production from *Rhodotorula glutinis* CCT-2186. *Biochemical Engineering Journal*, 165(July 2020).
- Mussagy. C. U., Winterburn. J., Santos-Ebinuma. V. C. and Pereira. J. F. B. 2019. Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(3): 1095–1114.
- Naguib. Y. M. A. 2000. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4): 1150–1154.
- Nelis. H. J. and De Leenheer. A. P. 1991. Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *Journal of Applied Bacteriology*, 70(3): 181–191.
- Paglia. D. E. and Valentine. W. N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 70:158–69.
- Patthawaro. S., Lomthaisong. K. and Saejung. C. 2020. Bioconversion of Agro-Industrial Waste to Value-Added Product Lycopene by Photosynthetic Bacterium *Rhodospseudomonas faecalis* and Its Carotenoid Composition. *Waste and Biomass Valorization*, 11(6): 2375–2386.
- Perry. A., Rasmussen. H. and Johnson. E. J. 2009. Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(1): 9–15.
- Pollmann. H., Breitenbach. J. and Sandmann. G. 2017. Engineering of the carotenoid pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous* leading to the synthesis of zeaxanthin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1): 103–111.
- Puiggròs. F., Solà. R., Bladé. C., Salvadó. M. J. and Arola. L. 2011. Nutritional biomarkers and foodomic methodologies for qualitative and quantitative analysis of bioactive ingredients in dietary intervention studies. *Journal of Chromatography A*, 1218(42): 7399–7414.
- Raichand. R., Pareek. S., Singh. N. K. and Mayilraj. S. 2012. *Exiguobacterium aquaticum* sp. nov., a member of the genus *Exiguobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(9): 2150–2155.
- Rajaei. S., Heidari. R., Zahiri. H. S., Sharifzadeh. S., Torktaz. I. and Noghabi. K. A. 2014. A novel cold-adapted pullulanase from *Exiguobacterium* sp. SH3: Production optimization, purification, and characterization. *Starch/Staerke*, 66(3–4): 225–234.
- Ramesh. C., Vinithkumar. N. V., Kirubakaran. R., Venil. C. K. and Dufossé. L. 2019. Multifaceted applications of microbial pigments: Current knowledge, challenges and future directions for public health implications. In *Microorganisms* (Vol. 7).
- Rao. A. V., Fleshe. N. and Agarwal. S. 1999. Serum and tissue lycopene and

- biomarkers of oxidation in prostate cancer patients: A case-control study. *Nutrition and Cancer*, 33(2): 159–164.
- Rao. A. V. and Rao. L. G. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55(3): 207–216.
- Renato. M., Boronat. A. and Azcón-Bieto. J. 2015. Respiratory processes in non-photosynthetic plastids. *Frontiers in Plant Science*, 6(JULY): 1–7.
- Research. N. 1999. Pi1 so271-5317(99)00094-9. *Science*, 19(9): 1371–1381.
- Rochín-Medina. J. J., Ramírez-Medina. H. K., Rangel-Peraza. J. G., Pineda-Hidalgo. K. V. and Iribe-Arellano. P. 2018. Use of whey as a culture medium for *Bacillus clausii* for the production of protein hydrolysates with antimicrobial and antioxidant activity. *Food Science and Technology International*, 24(1): 35–42.
- Rodrigo-Baños. M., Garbayo. I., Vílchez. C., Bonete. M. J. and Martínez-Espinosa. R. M. 2015. Carotenoids from *Haloarchaea* and their potential in biotechnology. *Marine Drugs*, 13(9): 5508–5532.
- Rodriguez-Amaya. D. B. 2018. Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. *Food Research International*, 124(May 2018): 200–205.
- Rodriguez-Concepcion. M., Avalos. J., Bonet. M. L., Boronat. A., Gomez-Gomez. L., Hornero-Mendez. D. and Zhu. C. 2018. A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Progress in Lipid Research*, 70(April): 62–93.
- Saini. R. K. and Keum. Y. S. 2019. Microbial platforms to produce commercially vital carotenoids at industrial scale: an updated review of critical issues. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46(5): 657–674.
- Samyuktha. S. and Mahajan. S. N. 2016. Isolation of pigment producing Bacteria and characterization of extracted pigment. 2(7): 657–664.
- Sanadi. N. F. A., Van Fan. Y., Leow. C. W., Wong. J. H., Koay. Y. S., Lee. C. T. and Sarmidi. M. R. 2017. Growth of *Bacillus coagulans* using molasses as a nutrient source. *Chemical Engineering Transactions*, 56(2008): 511–516.
- Sasidharan. P., Raja. R., Karthik. C., Sharma. R. and P. I. A. 2013. Isolation and characterization of yellow pigment producing *Exiguobacterium* sps. *Journal of Biochemical Technology*, 4(4): 632–635.
- Shahidi. F., Metusalach. and Brown. J. A. 1998. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(1): 1–67.
- Shatila. Fatima., Yusef. Hoda., Holail. H. 2013. Pigment production by *Exiguobacterium aurantiacum* FH, a novel Lebanese strain. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(12): 176–191.

- Shomali. N., Onar. O., Cihan. A. C., Akata. I. ve Yildirim. O. 2019. Antioxidant, anticancer, antimicrobial, and antibiofilm properties of the culinary-medicinal fairy ring mushroom, *marasmius oreades* (*Agaricomycetes*). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 21(6): 571–582.
- Sivaganesh. A. and Packiasamy. R. 2016. Molecular Characterization of Pigment Producing Microbes Associated with Marine Sponges and their Microbial Assay. *International Journal of Bioresource Science*, 3(2): 41.
- Solovchenko. A. E. 2012. Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(2): 167–176.
- Solovchenko. A. and Neverov. K. 2017. Carotenogenic response in photosynthetic organisms: a colorful story. *Photosynthesis Research*, 133(1–3): 31–47.
- Tanaka. T., Shnimizu. M. and Moriwaki. H. 2012. Cancer chemoprevention by carotenoids. *Molecules*, 17(3): 3202–3242.
- Uchiyama. K., Naito. Y., Hasegawa. G., Nakamura. N., Takahashi. J. and Yoshikawa. T. 2002. Astaxanthin protects β -cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. *Redox Report*, 7(5): 290–293.
- Umamaheswari S. I. A. P. 2013. Screening of Yellow Pigment Producing Bacterial Isolates from Various Eco-climatic Areas and Analysis of the Carotenoid Produced by the Isolate. *Journal of Food Processing & Technology*, 05(01): 1–4.
- Unakal. C., Kallur. R. I. and Kaliwal. B. B. 2012. Production of α -amylase using banana waste by *Bacillus subtilis* under solid state fermentation. *European Journal of Experimental Biology*, 2(4): 1044–1052.
- Venil. C. K., Zakaria. Z. A. and Ahmad. W. A. 2013. Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48(7): 1065–1079.
- White. R. A., Soles. S. A., Gavelis. G., Gosselin. E., Slater. G. F., Lim. D. S. S. and Suttle C. A. 2019. The complete genome and physiological analysis of the eurythermal firmicute *Exiguobacterium chiriqhucha* strain RW2 isolated from a freshwater microbialite, widely adaptable to broad thermal, pH, and salinity ranges. *Frontiers in Microbiology*, 10(JAN):1–21.
- Wisniewska. A. and Subczynski. W. K. 1998. Effects of polar carotenoids on the shape of the hydrophobic barrier of phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1368(2): 235–246.