

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI BAKTERİYEL VE FUNGAL PİGMENTLERİN UYGUN ÜRETİM
KOŞULLARININ TEST EDİLMESİ VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GÜLSÜM NİDA CAN**

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek ASMA

NİSAN 2026

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI BAKTERİYEL VE FUNGAL PİGMENTLERİN UYGUN ÜRETİM
KOŞULLARININ TEST EDİLMESİ VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Gülsüm Nida CAN
(36223611908)**

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek ASMA

NİSAN 2026

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezim kapsamında hazırladığım bu çalışmada, bilgi ve tecrübesiyle her daim yanımda olan, desteğini esirgemeyip bana yol gösteren tez danışmanım, kıymetli hocam Prof. Dr. Dilek Asma'ya,

Yine bu çalışmada bilgi, deneyim, farklı bakış açıları ve yönlendirmeleriyle katkı sağlayan eş danışman hocam Dr. Öğretim Üyesi Elif Özbey'e

Çalışmama katkılarından dolayı Doç. Dr. Seval Cing Yıldırım'a ve Doç. Dr. Harun Kaya'ya

Sevgi, anlayış ve destekleriyle her zaman yanımda olan değerli eşim Muhammed İsmail Can'a, sevgili kızım Ayşe Pelin Can'a ve başta annem olmak üzere biricik ablam ve canım kardeşime

Tez uygulama aşamasında FYL- 2025-3579 no'lu projeye vermiş olduğu destekten dolayı İnönü Üniversitesi BAP birimine

Teşekkür Ederim.

ONUR SÖZÜ

Yüksek lisans tezim olarak sunduğum “Bazı Bakteriyel ve Fungal Pigmentlerin Uygun Üretim Koşullarının Test Edilmesi ve Antimikrobiyal Özelliklerinin Araştırılması”

başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığına ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Gülsüm Nida CAN



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ	i
ONUR SÖZÜ	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Pigment Nedir?	1
1.2. Pigmentlerin Sınıflandırılması	2
1.2.1. Sentetik Pigmentler	3
1.2.2. Bitki Pigmentleri	5
1.2.3. Hayvan Pigmentleri.....	5
1.2. Mikrobiyal Pigmentler	6
1.3.1. Bakteriyel Pigmentler.....	7
1.3.2. Algal Pigmentler.....	8
1.3.3. Fungal Pigmentler	10
1.4. Mikrobiyal Pigment Üretimini Etkileyen Faktörler.....	11
1.5. Bazı Mikrobiyal Pigment Çeşitleri	12
1.5.1. Karotenoidler.....	13
1.5.2. Melanin.....	14
1.5.3. Viyolasein.....	14
1.5.4. Riboflavin.....	14
1.5.5. Piyosiyanin	15
1.5.6. Prodigiosin	16
1.6. Mikrobiyal Pigmentlerin Kullanım Alanları	18
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	19
2.1. Tekstil Endüstrisinde Pigmentler	19
2.2. Gıda Endüstrisi	20
2.3. İlaç Endüstrisi	21
2.4. Kozmetik Endüstrisi	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
3.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar.....	26
3.2. Mikroorganizmaların Ekim ve Üretim Koşulları.....	26
3.2.1. Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması	26
3.2.2. F. Oxysporum Stoklarının Hazırlanması	26
3.3. Fungal Pigmentlerin Sentezi ve Optimizasyon Çalışmaları	27
3.3.1. Besiyeri Çeşidinin Belirlenmesi.....	27
3.3.2. Fungal Pigmentlerin Sentezine Sıcaklığın Etkisi	27
3.3.3. Fungal Pigmentlerin Sentezine Çalkalama Koşullarının Etkisi	27
3.3.4. Fungal Pigmentlerin Sentezine Başlangıç pH'sının Etkisi	28
3.3.5. Fungal Pigmentlerin Sentezine İnkübasyon Süresinin Etkisi	28

3.3.6. Karanlık Ve Aydınlik İnkübasyon Koşullarının F. Oxysporum' Un Pigment Üretimine Etkisi	28
3.4. Optimum Koşullarda F. oxysporum' un Üreme Potansiyelinin Ölçülmesi	29
3.5. F. oxysporum' un Optimum Koşullarda Pigment Üretiminin Ölçülmesi	29
3.6. Optimum Koşullarda Üretilen Fungal Pigmentlerin Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması	29
3.7. Optimum Koşullarda F. oxysporum'dan Üretilen Fungal Pigmentlerin Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi	29
3.8. Optimum Koşullarda F. oxysporum'dan Üretilen Pigmentlerin Karakterizasyonu..	30
3.8.1. F. oxysporum' dan Üretilen Pigmentlerin UV-Visible Spektrofotometrik Analizi	30
3.8.2. F. oxysporum' dan Üretilen Pigmentlerin FT-IR Analizi	30
3.8.3. F. oxysporum' dan Üretilen Pigmentlerin GC-MS Analizi	30
3.8.4. F. oxysporum' dan Üretilen Pigmentlerin NMR Analizi.....	31
3.9. S. marcescens Stoklarının Hazırlanması.....	31
3.10. Bakteriyel Pigmentlerin Sentezi ve Optimizasyon Çalışmaları.....	31
3.10.1. Besiyeri Çeşidinin Belirlenmesi.....	31
3.10.2. Bakteriyel Pigment Üretimine Sıcaklığın Etkisi	32
3.10.3. Prodigiosin Üretimine Çalkalama Koşullarının Etkisi.....	32
3.10.4. Prodigiosin Üretimine Başlangıç pH' sının Etkisi	32
3.10.5. Pigment Üretimine İnkübasyon Süresinin Etkisi	32
3.11. Optimum Koşullarda S. marcescens'in Üreme Potansiyelinin Ölçülmesi	33
3.12. S. marcescens' in Optimum Koşullarda Pigment Üretiminin Ölçülmesi	33
3.13. Optimum Koşullarda Üretilen Prodigiosin Pigmentinin Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması	33
3.14. Optimum Koşullarda S. marcescens' den Üretilen Prodigiosin Pigmentinin Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi	34
3.15. Optimum Koşullarda S. marcescens'den Üretilen Prodigiosin Pigmentinin Karakterizasyonu	34
3.15.1. S. marcescens'den Üretilen Pigmentlerin UV-visible Spektrofotometrik Analizi	34
3.15.2. S. marcescens'den Üretilen Pigmentlerin FT-IR Analizi	35
3.15.3. S. marcescens' den Üretilen Pigmentlerin GC-MS Analizi	35
3.16. Elde Edilen Prodigiosin Pigmentinin Endüstriyel Uygulamaları	35
3.16.1. Un-tuz Bazlı Model Hamur Matrisinde Renklendirme Denemesi.....	35
3.16.2. Ön Boyama/ Renklendirme Denemesi	35
3.16.3. Ön Formülasyon Denemesi.....	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	37
4.1. F. oxysporum'da Pigment Üretim Koşullarının Optimizasyonu	37
4.1.1. Besiyeri Çeşidinin Pigment Üretimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	37
4.1.2. Fungal Pigment Üretimine Sıcaklığın Etkisi.....	38
4.1.3. Fungal Pigment Üretimine Çalkalamanın Etkisi.....	40
4.1.4. Fungal Pigment Üretimine pH'nın Etkisi	41
4.1.5. Fungal Pigment Üretimine İnkübasyon Süresinin Etkisi	43
4.1.6. Karanlık Ve Aydınlik İnkübasyon Koşullarının F. oxysporum'un Pigment Üretimine Etkisi	46
4.2. Fungal Pigmentlerin Antimikrobiyal Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	47

4.3. <i>F. oxysporum</i> 'un Optimum Koşullarda Üremesinin Ölçülmesi	48
4.4. <i>F. oxysporum</i> 'un Optimum Koşullarda Pigment Üretiminin Ölçülmesi	50
4.5. Optimum Koşullarda Üretilen Fungal Pigmentlerin Karakterizasyonu	51
4.5.1. Optimum Koşullarda Üretilen Fungal Pigmentlerin UV-vis Spektrofotometresi	52
4.5.2. Optimum Koşullarda Üretilen Fungal Pigmentlerin FTIR Sonuçları	53
4.5.3. Optimum Koşullarda Üretilen Fungal Pigmentlerin GC-MS Sonuçları	54
4.5.4. Optimum Koşullarda Üretilen Fungal Pigmentlerin NMR Sonuçları.....	55
4.6. <i>S. marcescens</i> Bakterisinin Üretimi ve Pigment Sentezinin Optimizasyon Çalışmaları.....	57
4.6.1. Besiyeri Çeşidinin Pigment Üretimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	57
4.6.2. Prodigiosin Sentezine Sıcaklığın Etkisi	58
4.6.3. Prodigiosin Sentezine Çalkalama Koşullarının Etkisi	59
4.6.4. Prodigiosin Sentezine pH'nın Etkisi	61
4.6.5. Prodigiosin Üretimine İnkübasyon Süresinin Etkisi	64
4.6.6. Karanlık ve Aydınlik İnkübasyon Koşullarının <i>S. marcescens</i> 'in Pigment Üretimine Etkisi	64
4.7. Prodigiosin Pigmentinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Saptanması	65
4.8. Optimum Koşullarda Üretilen Prodigiosin Pigmentinin Karakterizasyonu	67
4.8.1. Optimum Koşullarda Üretilen Prodigiosin Pigmentinin UV-vis Spektrofotometresi	67
4.8.2. Optimum Koşullarda Üretilen Prodigiosin Pigmentinin FTIR Sonuçları.....	68
4.8.3. Optimum Koşullarda Üretilen Prodigiosin Pigmentinin GC-MS Sonuçları.....	70
4.9. <i>S. marcescens</i> 'in Optimum Koşullarda Üremesinin Ölçülmesi	72
4.10. <i>S. marcescens</i> ' in Optimum Koşullarda Pigment Üretiminin Ölçülmesi	73
4.11. Pigmentlerin Model Uygulama Denemeleri	73
4.11.1. Un-tuz Bazlı Model Hamur Matrisinde Renklendirme Denemesi.....	74
4.11.2. Ön Boyama/ Renklendirme Denemesi	75
4.11.3. Ön Formülasyon Denemesi.....	75
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	77
KAYNAKÇA.....	81
ÖZGEÇMİŞ	91

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Bakteriler tarafından üretilen doğal pigmentler (Venil vd., 2013).	8
Çizelge 1.2. Mikroorganizmalar tarafından üretilen mikrobiyal doğal pigmentler ve metabolik rolleri (Venil vd., 2013).	18
Çizelge 4.1. <i>F. oxysporum</i> 'dan elde edilen pigmentin mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkileri	48
Çizelge 4.2. Prodigiosinin etil alkollü ekstraktının mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkileri	66



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Sentetik pigmentlerin kimyasal yapıları (Chatragadda ve Dufossé, 2021).....	4
Şekil 1.2. Fikobiliprotein kimyasal yapısı.....	9
Şekil 1.3. Önemli mikrobiyal pigmentlerin kimyasal yapıları (Rajendran vd., 2023).....	13
Şekil 1.4. Doğal renklendirici olarak kullanılma potansiyeli yüksek olan bakteriyel pigmentler	15
Şekil 1.5. Prodigininlerin biyosentetik yollarının basitleştirilmiş şematik diyagramı	17
Şekil 4.1. SDA, PDA ve Czapek agar besiyerlerinde üretilen <i>F. oxysporum</i> fungusunun petri görüntüleri	38
Şekil 4.2. Farklı sıcaklıklarda üretilen <i>F. oxysporum</i> 'un pigment sentezi	40
Şekil 4.3. Farklı çalkalama koşullarında üretilen <i>F. oxysporum</i> 'un pigment sentezi.....	40
Şekil 4.4. Farklı pH koşullarında üretilen pigment sentezi	42
Şekil 4.5. <i>F. oxysporum</i> 'un inkübasyon süresine bağlı pigment üretimi ve erlendeki görüntüleri.....	45
Şekil 4.6. Karanlık ve aydınlık inkübasyon koşullarında <i>F. oxysporum</i> 'da pigment üretimi	47
Şekil 4.7. Disk difüzyon yöntemi ile elde edilen inhibisyon zonlarının petri görüntüleri ..	48
Şekil 4.8. Optimum koşullarda üretilen <i>F. oxysporum</i> 'un biyokütle miktarı (yaş ve kuru ağırlık).....	50
Şekil 4.9. Optimum koşullarda <i>F. oxysporum</i> tarafından üretilen pigment miktarının absorbans değerleri	51
Şekil 4.10. Fungal pigmentlerin UV-Vis spektrumu.....	53
Şekil 4.11. <i>F. oxysporum</i> 'un etil asetatlı pigmentlerin FTIR spektrumu.	53
Şekil 4.12. <i>F. oxysporum</i> 'un etil asetatlı ekstraktının GC-MS sonucu.....	55
Şekil 4.13. Optimum koşullarda <i>F. oxysporum</i> 'dan üretilen pigmentlerin NMR analizi....	56
Şekil 4.14. (A) <i>S. marcescens</i> 'in Luria Bertani Agar (LA) ve Nütrient Agar (NA) besiyerinde 24 saat inkübasyonda farklı sıcaklıklarda kolonilerdeki pigmentasyonu X. 28°C ve Y. 37°C.	57
Şekil 4.14. (B) <i>S. marcescens</i> 'in Luria Bertani Broth (LB) ve Luria Bertani Agar (LA) besiyerinde 28°C'de 24 saat inkübasyonda kolonilerdeki pigmentasyonu.	58
Şekil 4.15. <i>S. marcescens</i> 'in LB besiyerinde farklı sıcaklıklardaki pigmentasyonu.....	58
Şekil 4.16. <i>S. marcescens</i> 'in LB besiyerinde farklı çalkalama koşullarındaki pigmentasyonu.	60
Şekil 4.17. (A) <i>S. marcescens</i> 'in 24 saatlik inkübasyon sonrasında farklı pH derecelerindeki pigment üretimi	61
Şekil 4.17. (B) <i>S. marcescens</i> 'in 7 günlük inkübasyon sonrasında farklı pH derecelerindeki pigment üretimi	62
Şekil 4.18. <i>S. marcescens</i> bakterisinin LB besiyerinde 1-7 gün inkübasyon süresince pigment üretim grafiği ve erlendeki görüntüleri	64
Şekil 4.19. Aydınlık ve karanlık inkübasyonda <i>S. marcescens</i> 'in pigment üretimi	65
Şekil 4.20. Prodigiosin pigmentinin etil alkollü ekstraktının disk difüzyon yöntemi ile oluşan inhibisyon zonlarının petri görüntüleri	67

Şekil 4.21. Prodigiosin pigmentinin UV-Vis spektrumu.....	68
Şekil 4.22. Prodigiosin pigmentinin FTIR spektrumu.	69
Şekil 4.23. Prodigiosin pigmentinin GC-MS analizi.....	70
Şekil: 4.24. <i>S. marcescens</i> 'in optimum koşullarda 1-7 günlük OD ₆₀₀ de bakteriyel büyümenin zamana bağlı değişimi.....	72
Şekil 4.25 <i>S. marcescens</i> 'in OD ₅₃₅ pigment üretiminin ölçülmesi.....	73
Şekil 4.26. Elde edilen pigmentlerin endüstriyel uygulamaları için yapılan işlem aşamaları	74
Şekil 4.27. Oyun hamurlarına farklı oranlarda (%100, %75, %50, %25) prodigiosin pigmentinin uygulanması.....	75
Şekil 4.28. Prodigiosin pigmentinin 5cm' lik kumaş parçalarına farklı oranlarda (%100, %75, %50, %25) uygulanması.....	75
Şekil 4.29. Prodigiosin pigmentinin 2 ml olacak şekilde şeffaf dudak renklendiricisine uygulanması	76



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Celsius, Sıcaklık Birimi
DNA	: Deoksiriboz Nükleik Asit
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre
GC-MS	: Gaz Kromatografisi–Kütle Spektrometresi
HCl	: Hidroklorik asit
L	: Litre
LA	: Luria-Bertani Agar
LB	: Luria-Bertani Broth
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
NA	: Nutrient Agar
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NB	: Nutrient Broth
nm	: Nanometre
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
NP	: Nanopartikül
OD	: Optik dansite
PBP	: Fikobiliproteinler
PDA	: Patates Dekstroz Agar
PDB	: Patates Dekstroz Broth
PG	: Prodigiosin
pH	: Su İçerisindeki Hidrojen İyonu Derişiminin Eksi Logaritması
rpm	: Dakikada Dönme Hızı
SDA	: Saboraud Dekstroz Agar
UV	: Ultraviyole
λ_{max}	: Maksimum absorbsiyon dalga boyu

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI BAKTERİYEL VE FUNGAL PİGMENTLERİN UYGUN ÜRETİM KOŞULLARININ TEST EDİLMESİ VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gülsüm Nida CAN
İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

91 + xi sayfa

2026

Günümüzde renk maddeleri gıda, tekstil, kozmetik, oyuncak gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Renk maddelerinin doğal ve sentetik olup olmadığı ve insan sağlığını olumsuz etkilememesi oldukça önemlidir. Bu sebeple hem kolay ve bol miktarda elde edilebilir, hem de iklim koşullarından bağımsız, üretimi ucuz ve daha güvenli bir renk maddesi üretimi için alternatif yollar bulunmak istenmektedir. Bu potansiyellere sahip mikrobiyal pigmentler birçok alanda kullanılmakta olup bu çalışmada da pigment ürettiği bilinen bazı bakteri ve fungusların üretim koşullarını optimize ederek, pigment üretimi yapılması planlanmıştır. Bu amaçla; *Fusarium oxysporum* fungusu ve *Serratia marcescens* bakterisinin en iyi pigment üretme koşulları test edilmiştir. Alternatif üretim ortamı olarak *F. oxysporum* için Sabouraud Dekstroz Agar (SDA), Patates Dekstroz Agar (PDA) ve Czapek Agar besiyerleri kullanılmıştır. *S. marcescens* için de Nutrient Agar (NA) ve Luria–Bertani Agar (LA) besiyerleri kullanılmıştır. Mikrobiyal pigment üretimini artırmak amacıyla inkübasyon süresi, sıcaklık, başlangıç pH'sı ve çalkalama koşulları gibi farklı üretim parametreleri test edilmiştir. Optimum koşullarda elde edilen bakteriyel ve fungal pigmentlerin uygun çözücülerde ekstraksiyonları yapıp kısmi olarak saflaştırılarak UV-Vis spektrofotometre, FT-IR, NMR ve GC-MS analizleri ile karakterizasyonları yapılarak antimikrobiyal özellikleri saptanmıştır. Sonuç olarak *F. oxysporum*'un pigment üretimi için en uygun besiyerinin PDA olduğu belirlenmiş ve maksimum pigment üretiminin aydınlık inkübasyon, 150 rpm çalkalama, 25°C sıcaklık, başlangıç pH değeri 9.0 ve 7 günlük inkübasyon süresinde olduğu saptanmıştır. *S. marcescens*'in pigment üretimi için ise en uygun besiyerinin Luria–Bertani besiyerinde, statik üretim, 20 °C sıcaklık, başlangıç pH değeri 5.0 ve 4 günlük inkübasyon süresinde olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mikrobiyal pigment, *Serratia marcescens*, *Fusarium oxysporum*, prodigiosin, antimikrobiyal aktivite

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF THE OPTIMAL PRODUCTION CONDITIONS OF SOME BACTERIAL AND FUNGAL PIGMENTS AND THEIR ANTIMICROBIAL PROPERTIES

GÜLSÜM NİDA CAN

Inonu University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

91 + xi

2026

Colorants are widely used today in many fields such as food, textile, cosmetics, and toy industries. It is highly important that these colorants are natural rather than synthetic and do not pose harmful effects on human health. Therefore, there is an increasing demand for alternative pigment sources that can be produced easily and in large quantities, are independent of climatic conditions, cost-effective, and safer for human use. Microbial pigments, which possess these advantages, have attracted considerable attention for use in various industries. In this study, it was aimed to optimize the production conditions of certain pigment-producing bacteria and fungi. For this purpose, the optimum pigment production conditions of the fungus *Fusarium oxysporum* and the bacterium *Serratia marcescens* were investigated. As alternative production media, Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Potato Dextrose Agar (PDA), and Czapek Agar were used for *F. oxysporum*, while Nutrient Agar (NA) and Luria–Bertani Agar (LB) were used for *S. marcescens*. Different production parameters, such as incubation time, temperature, initial pH, and agitation conditions, were tested to increase microbial pigment production. Subsequently, the bacterial and fungal pigments obtained under optimum conditions were extracted using appropriate solvents and partially purified. Their characterization was performed by UV–Vis spectrophotometry, FT-IR, NMR, and GC-MS analyses, and their antimicrobial properties were also determined. As a result, PDA was determined to be the most suitable medium for pigment production by *F. oxysporum*. Maximum pigment production was achieved under light incubation conditions, at 150 rpm shaking speed, 25 °C temperature, initial pH 9.0, and 7 days of incubation. For *S. marcescens*, Luria–Bertani (LB) medium was found to be the most suitable medium for pigment production. Optimum pigment production was obtained static cultivation, 20 °C temperature, initial pH 5.0, and 4 days of incubation.

Keywords: Microbial pigment, *Serratia marcescens*, *Fusarium oxysporum*, prodigiosin, antimicrobial activity

1. GİRİŞ

Görünür ışığı emebilen ve yansıtabilen, farklı renkler gösterebilen pigmentler, tekstil boyları, gıda renklendiricileri, boyalar gibi birçok endüstriyel sektörde yaygın olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel sektörlerde kullanılan pigmentlerin çoğu hala kimyasal sentez yoluyla elde edilmektedir; ancak düşük veya hiç biyobozunurluklarının olmaması, toksisite, kanserojen özellikleri ve alerjik reaksiyonları nedeniyle hem çevresel hem de sağlık açısından büyük endişeler dile getirilmiştir.

Bu nedenle birçok sentetik pigment çeşitli ülkelerde ve boya endüstrilerinde yasaklanmış olup, güvenilirlik ve sürdürülebilirlik sağlamak, olumsuz çevresel etkileri en aza indirmek amacıyla bitkiler, mineraller ve mikroorganizmalar gibi doğal kaynaklardan elde edilen doğal boyalara olan ilgi artmaktadır (Spadaro vd., 2024).

Doğal pigmentlerden olan mikrobiyal pigmentler ekosistemin inşasında, hayatta kalmasında ve her tür organizmanın uyum sağlamasında birçok rol oynar. Önemli ölçüde mikrobiyal (bakteri, mantar, maya ve mikroalg) pigmentler geniş bir yelpazede gıda, ilaç, renklendirici, boya ve görüntüleme uygulamaları sunar. Sentetik pigmentlerin insan sağlığı üzerinde yan etkilerinin görülmesi nedeniyle doğal pigmentler, sentetik pigmentlere göre daha fazla talep görmektedir. Pigmentlerin kaynağı, üretim hızı, nakliyesi, fiyatı, sürdürülebilirliği, lezzeti, dayanıklılığı, etkinliği, yasal ve düzenleyici onayı ve tüketicilerin talebi, ticari endüstrilerdeki çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için temel gerekliliklerdir. Bu bağlamda mikrobiyal pigmentler gıda sınıfı, tekstil sınıfı ve ilaç sınıfı doğal pigmentlerin geliştirilmesinde büyük talep görmektedir. Mikrobiyal pigmentlere olan bu yüksek talebin nedenleri; ümit vaat eden sınırsız kaynaklar, gerekli miktarda pigmentin yüksek üretimi, en az maliyetli olması, ekiminin kolay olması ve yıl boyunca hasat edilebilmesi, çeşitli ortamlara uyum sağlayabilmesi, optimizasyonu, stabilitesi, genetik mühendisliği, yan etkileri, çevre dostu, biyolojik olarak parçalanabilen ve ekolojik, evrimsel, biyomedikal, tarım ve endüstriyel çalışmalar gibi multidisipliner alanlarda vazgeçilmez uygulamalardır. Bu nedenle, potansiyel endüstriyel uygulamaları bulmak için mikrobiyal pigmentler üzerine yapılan araştırmaların genişletilmesi, araştırılması ve kullanılması gerekmektedir (Chatragadda ve Dufossé, 2021).

1.1. Pigment Nedir?

Renk, insan faaliyetlerinde büyük öneme sahiptir. Trafik ışıklarından sanata ve giyime kadar, rengin birçok kültürel anlamı vardır. Ayrıca, yenilebilir ürünlerin tüketime uygunluğunun, yani bazı yiyecek veya içeceklerin taze, olgun, güvenli, besleyici veya

çürümüş olup olmadığının (örneğin, kırmızı ve gri sığır eti, yeşil ve sarı muz) yorumlanmasında da merkezi bir rol oynar (Sen vd., 2019).

Bu anlamda, ürünlere (özellikle gıda ürünlerine) renk verebilen moleküller, teknolojik açıdan özellikle ilgi çekicidir. Bu tür moleküller genellikle pigment olarak adlandırılır ve görünür aralıktaki (400-700 nm dalga boyları) ışığı emebilen çeşitli kimyasal yapılar içerir. Kimyasal tanımlara göre, çözünebilen renkli maddelere renklendirici, çözünmeyen renkli maddelere ise pigment denir. Bununla birlikte, biyolojik bir bakış açısıyla, çözünürlüklerinden bağımsız olarak renkli maddelere pigment denir (De Carvalho vd., 2014).

Doğal boyaların kullanımına ilişkin en erken bulgular, MÖ 2600 yılına tarihlenen Çin kaynaklarında ortaya konmuştur. Milattan önceki dönemlere ait Hindistan Yarımadası'nda İndus Vadisi Uygarlığı (M.Ö. 2500) döneminde bulunan renkli kumaş örnekleri (Sancar vd., 2023) ile Mısır'da renkli giysilere sarılmış mumyalar ve Kral Tutankamon'un mezarında kök boyadan izole edilen bir pigment olan Alizarin'in varlığı da doğal boyaların kullanıldığını doğruluyor. Orta ve Kuzey Amerika'nın Aztek ve Maya kültürü dönemi insanları kırmızı boyasını kullanmışlardır. İncil'de safrandan bahsedilirken, kınanın kullanımı M.Ö. 2500'den önceye tarihlenmektedir. (Heer ve Sharma, 2016). Literatürde; safran kalamar mürekkebi kırmızıbiber, zerdeçal, pancar özü ve çeşitli çiçek yapraklarından elde edilen pigmentlerin, doğadan sağlanan ilk doğal renk vericiler arasında yer aldığı bildirilmektedir (Sancar vd., 2023).

Evrimsel açıdan bakıldığında mikrobiyal pigmentlerin kökeni çok az bilinmektedir. Evrimsel perspektifte ve yaşamın kimyasal kökeni hakkındaki kil-mineral teorisine ve son kanıtlara göre, protohücrelerin ekstrem koşullarda hayatta kalmasına yardımcı olan protohücredeki pigmentler de dahil olmak üzere moleküllerin kökeni birbirine bağlanabilir. Protohücrelerin ortaya çıkışından bu yana doğal pigmentler, prokaryot ve ökaryotlarda bulunan pigmentler, floresans ve biyoluminesans gibi çeşitli olaylara dönüşmüştür. Şu anda araştırmacılar, yaşamın 4,5 milyar yıl önce okyanustaki hidrotermal menfezler veya volkanik arazideki veya jeotermal (kaplıca) alanlardaki sıcak su havuzları gibi aşırı ortamlardan kaynaklandığına inanıyorlar (Chatragadda ve Dufossé, 2021).

1.2. Pigmentlerin Sınıflandırılması

Pigmentler, kökensel özellikleri doğrultusunda doğal, sentetik ve inorganik olmak üzere üç temel grupta sınıflandırılmaktadır.

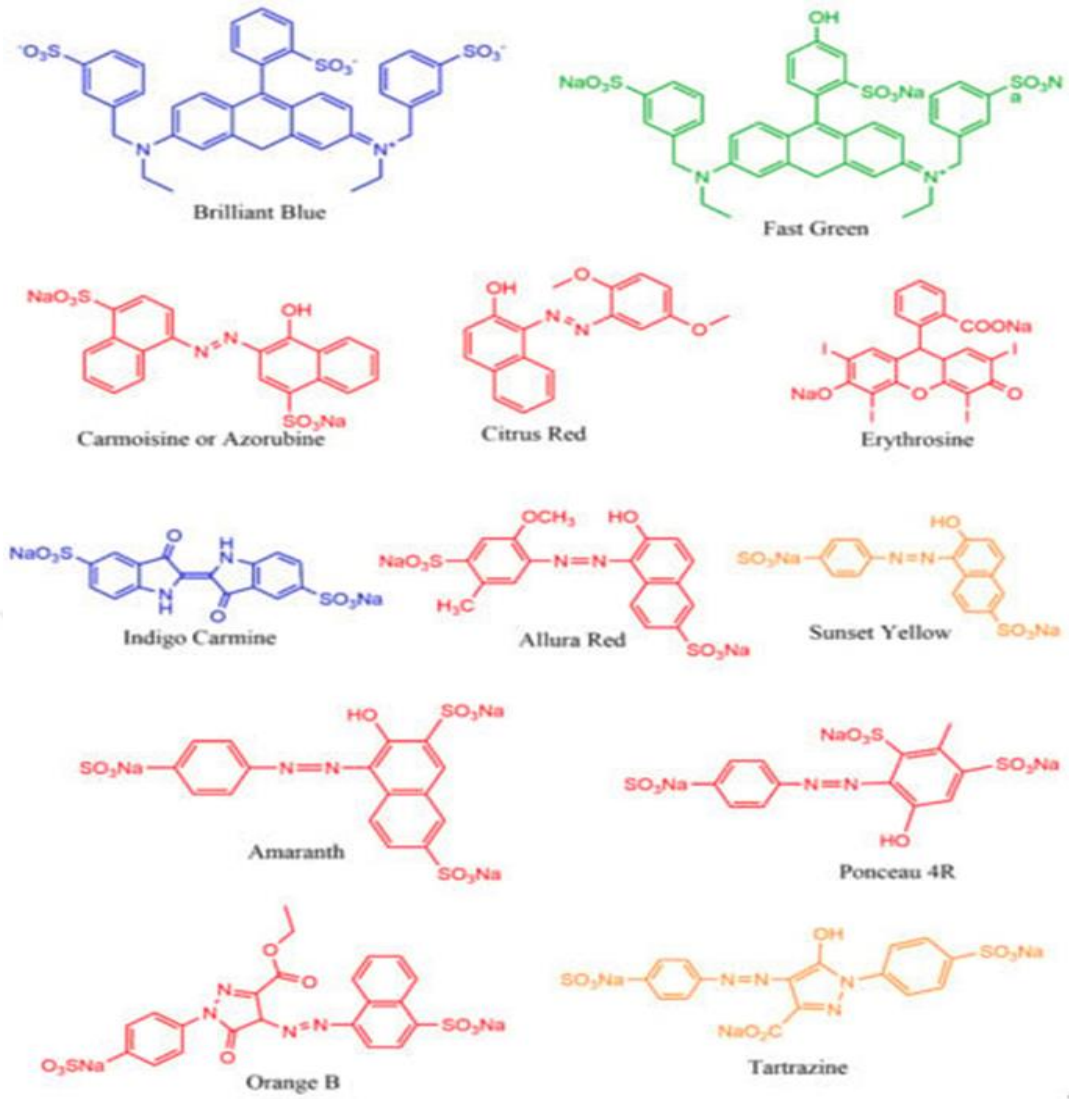
Doğal pigmentler; bitkiler, hayvanlar, mantarlar ve çeşitli mikroorganizmalar gibi canlı organizmalardan biyolojik olarak elde edilen bileşiklerdir. Sentetik pigmentler, laboratuvar koşullarında kimyasal yöntemlerle üretilen pigmentleri ifade eder. İnorganik pigmentler ise doğada doğal biçimde bulunabildiği gibi, endüstriyel süreçlerde yapay olarak da sentezlenebilmektedir (Yıldırım, 2014).

1.2.1. Sentetik Pigmentler

Sentetik pigmentler yapay olarak oluşturulur. Çeşitli renkler sunarlar ve boya, kaplama, plastik ve seramik gibi endüstrilerde yaygın olarak kullanılırlar. Bazı sentetik pigment örnekleri; kadmiyum kırmızısı, demir oksit sarısı, siyah ve bizmut vanadattır. Titanyum dioksit ve krom oksit gibi bazı sentetik inorganik pigmentler mineral bazlıdır. Bu pigmentler stabiliteleri ve dayanıklılıkları ile bilinir. Sentetik pigment, istikrarlı ve iyi bilinen bir sentez prosesi ve düşük maliyetli üretim sunarak ekonomik avantaj sağlar (Barreto vd., 2023).

Biyolojik olarak parçalanabilirliği düşük olan veya hiç olmayan sentetik pigmentler, gezegenin sürdürülemez üretim zincirlerine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca kanserojen özelliklere sahip sentetik pigmentlerin tüketilmesi ve alerjik reaksiyonlarla ilişkili vakaların raporları da bulunmaktadır (Arora vd., 2021; De Souza Mesquita vd., 2021). Gıdaya renk veren çeşitli sentetik pigmentler gıda endüstrisinde toksiktir. Çocuklarda hiperaktivite, alerjenlik, toksikolojik ve kanserojenlik sorunları birçok sentetik gıda pigmentinin dışlanmasıyla yol açmıştır (Sen vd., 2019).

Tartrazin, kırmızı kırmızısı ve gün batımı sarısı gibi boyalar tek başına veya diğer renklendiricilerle kombinasyon halinde alerjiye neden oldukları bildirilmiştir (Şekil 1.2.1.).



Şekil 1.1. Sentetik pigmentlerin kimyasal yapıları (Chatragadda ve Dufossé, 2021).

Bununla birlikte, Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından gıdalarda, farmasötiklerde ve kozmetik preparatlarda kullanılması onaylanan bazı sentetik renklendiricilerin daha sonra kanseri teşvik ettiği bulunmuştur. Bazı sentetik boyalar, görünürdeki tehlikeleri nedeniyle harici kullanımdan bile çekilmiştir. Örneğin, benzidin boyaları bağırsak kanserine neden olurken, karbon siyahının (yaygın olarak matbaa mürekkebi pigmenti olarak kullanılır) potansiyel bir kanserojen olduğu düşünülmektedir (Rao vd., 2017).

Çevre açısından bakıldığında, arıtılmamış endüstriyel boya atıklarının etik olmayan şekilde boşaltılması, çeşitli toksik maddelerin uzun süreli stabilitesine ve varlığına neden olmaktadır (Babitha, 2009). Sentetik renklerin dezavantajları, doğal pigmentlere olan küresel talebi artırmıştır (Manikprabhu ve Lingappa, 2013).

1.2.2. Bitki Pigmentleri

Bitkilerin ürettiği her türlü renkli maddeye “bitki pigmenti” denir. Yaygın bitki pigmentleri arasında klorofiller, karotenoidler ve antosiyaninler bulunur. İkincil metabolitler olarak bitki pigmentleri, bitkilerin farklı bölgelerine dağılır ve fotosentez ve sinyal iletiminde rol oynar (Wang vd., 2023). Bitki bazlı pigmentler, pH'ta bir değişiklik olması durumunda hızla denatüre olmaktadır. Ek olarak, bitki pigmentleri, ürün kaybının kalitesini ve yüzdesini etkileyen diğer çevresel parametrelerin yanı sıra geniş monokültür alanları, haşere kontrolü ve yağışa bağımlılık gerektirir. Bu nedenle, bu olasılık, doğal, organik ve biyolojik olarak parçalanabilir olduğu kadar, büyük miktarda sulama suyuna ihtiyaç duyulması ve bazen haşere kontrolüne yardımcı olmak için pestisitlerin kullanılması nedeniyle çevre üzerinde hala bir dereceye kadar etkiye neden olmaktadır (Barreto vd., 2023).

Bitkisel pigmentlerin kullanımının yıl boyunca bulunamaması, pigmentin stabilitesi ve çözünürlüğü gibi birçok dezavantajı bulunmaktadır. Büyük ölçekli bitki kullanımı değerli türlerin kaybına neden olabilir. Bu nedenlerden dolayı süreç uygulanabilir görülmeyebilir (Downham ve Collins, 2000). Mantarlar ve bakteriler gibi mikroorganizmalar, doğal olarak türetilmiş pigmentlerin kolaylıkla bulunabilen alternatif bir kaynağını sağlar (Arulselvi vd., 2014). Bakteriyel ve fungal pigmentlerin geniş uygulamaları vardır ve düşük maliyetli ortamda kolay ve hızlı büyüme, kolay işlenme ve hava koşullarından bağımsız büyüme dahil olmak üzere bitki pigmentlerine göre çok büyük bir avantaja sahiptirler (Manikprabhu ve Lingappa, 2013).

1.2.3. Hayvan Pigmentleri

Bitkilerin çoğunda klorofil birincil biyolojik pigmenttir ve memelilerde bulunan temel pigment ise melanindir. Bir hayvanın saç ve kürk renginden melanin sorumludur (Heer ve Sharma, 2017).

Kamuflaj ve eş çekme, hayvan kaynaklı pigmentlerin önemli işlevleridir (Wang vd., 2023). Böcekler antrakınonlar, pterinler, tetrapiroller, ommokromlar, melaninler ve papiliokromlar gibi çeşitli pigmentlerin kaynağıdır. İspanya da dikenli armut kaktüsünde yaşayan parazit bir böcek olan koşineal böceğinden kırmızı pigment elde edilmektedir. Koşineal dünya çapında birçok üründe kullanılmaktadır. Yaygın olarak kırmızı rujlarda kullanılır ve göz farında kullanılmasına izin verilen birkaç kırmızı pigmentten biridir. Ayrıca Cherry Cola'da kullanılan renklendirici katkı maddesi de kırmızıdan yapılmaktadır (Heer ve

Sharma, 2017). Ancak üretimin zorluğu ve hayvan sömürüsü nedeniyle yıllar geçtikçe kullanımları azalmıştır. Ayrıca alerjik problemler de rapor edilmiştir (Chatragadda ve Dufossé, 2021).

1.2. Mikrobiyal Pigmentler

Mikroorganizmalardan ekstrakte edilen doğal pigmentlere mikrobiyal pigment denir (Sancar vd., 2023). Mikrobiyal pigmentler ikincil metabolitler olarak sınıflandırılır ve esas olarak stresli koşullar altında bozulmuş metabolizma nedeniyle üretilir (Agarwal vd., 2023).

Mikrobiyal pigmentler gibi ikincil metabolitlerin sentezi, bakteriyel, algal ve fungal kültürlerde genellikle log fazından sonra gerçekleşmeye başlamaktadır. Pigment miktarı ise biyokütle üzerinde gerçekleşen birikim seviyesi ile doğrudan orantılıdır (Erdal ve Ökmen, 2013).

Mikrobiyal pigmentler, hayatta kalma ve çevrelerine uyum sağlama, ultraviyole radyasyona ve reaktif oksijen türlerine karşı koruma, çevrenin ve besinlerin bölgeselliğini sağlamak ve diğer mikrobiyal türlerin ortamlarına yerleşmesini önlemek için antibakteriyel ve fungisidal etkiler dahil olmak üzere çeşitli işlevlerde rol oynar. Bazı pigmentler ayrıca hücrelerdeki enerji üretiminde fotosentetik işlevlere de yardımcı olabilir (Barreto vd., 2023). Sürdürülebilir ve doğal renklendiricilere olan artan talep, bu trendi hızlandırarak çevre bilincine sahip tüketicilere hitap eden benzersiz ürün formülasyonlarına yol açmıştır. Ek olarak, organik kimya, metabolik mühendislik ve sentetik biyolojideki büyük gelişmeler, bu pigmentlerin üretim yöntemlerini dönüştürmüştür. Araştırmacılar artık pigment verimini ve verimliliğini etkili bir şekilde artırmak için mikrobiyal yolları manipüle edebilmektedir. Genomik, proteomik ve metabolomik dahil olmak üzere omik bilimlerinin entegrasyonu, mikrobiyal sistemlere daha derin bir bakış açısı sağlayarak büyük ölçekli üretim süreçlerinin optimize edilmesine yardımcı olmaktadır. Sonuç olarak, mikrobiyal pigmentlerin ticari cazibesi hızla artmakta ve çeşitli uygulamalarda sürdürülebilir malzemelerin yeni bir çağını başlatmaktadır (Tavasolli vd., 2026).

Mikroorganizmalardan elde edilen doğal pigmentler;

Düşük maliyetli üretimleri,

Ekstraksiyon kolaylığı,

Tür iyileştirme yoluyla yüksek verim ve

Mevsimsel değişimlerin olmaması nedeniyle

Gıda renklendirici, tekstil, ilaç, kozmetik ve yem alanında ajanlar olarak önemli bir rol oynamaktadır (Bisht vd., 2020).

Mikrobiyal pigmentlerin bazı özellikleri;

- I. Ultraviyole radyasyona karşı koruma
- II. Oksidan ajanlara karşı koruma
- III. Aşırı sıcak ve soğuktan koruma
- IV. Diğer mikroorganizmalar tarafından üretilen doğal antimikrobiyal bileşiklere karşı koruma
- V. Diğer mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteler gösterme
- VI. Demir gibi besin maddelerinin alınması,
- VII. Fotosentez yoluyla enerji elde edilmesi (örneğin siyanobakteriler) (Liu ve Nizet, 2009).

1.3.1. Bakteriyel Pigmentler

Bakteriyel pigmentler genellikle hücre dışına salınan (piyosiyanın ve melanin) ve hücrelerde tutulan (prodigiosin, violasin, β -karoten, ksantomonadin) pigmentler olarak ikincil metabolit olarak üretilir. Üretilen pigmentler, mikroorganizmayı çeşitli biyolojik ajanlara, stres şartlarına (yüksek doz UV, ağır metal, oksidatif hasar) karşı dirençli hale getirmektedir. Farklı ortamlarda veya coğrafik bölgelerde bulunan mikroorganizmalar, pigment üreterek olumsuz koşullara tolerans göstermektedir (Özdağ, 2019).

Bakteriyel pigmentler aşağıdaki yararları ve avantajları sunar:

- i. Geniş kapsamlı faaliyetler nedeniyle bilim için giderek daha çekici hale geliyor.
- ii. Kolay yayılma ve geniş gerinim seçimi.
- iii. Diğer kaynaklara göre çok yönlü ve üretkendir.
- iv. Fermantasyon, diğer kimyasal işlemlerle karşılaştırıldığında doğası gereği daha hızlı ve daha verimli bir üretimdir.
- v. Genleri manipüle etmek kolaydır.
- vi. Sürekli biyoreaktör çalışmasına izin veren basit ve hızlı kültürleme teknikleri.
- vii. Yapısal karmaşıklık endüstriyel ihtiyaçlara uygundur.
- viii. Operasyon maliyetini en aza indiren basit sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniği kullanılarak ekstrakte edilen bakteriyel pigmentler.
- ix. Toplu üretim için kullanılan ucuz yüzeyler (Venil vd., 2013).

Çizelge 1.1. Bakteriler tarafından üretilen doğal pigmentler (Venil vd., 2013).

Bakteriler	Pigmentler/Molekül	Renk	Uygulamalar
<i>Agrobacterium aurantiacum</i> , <i>Paracoccus carotinifaciens</i> , <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaksantin	Pembe kırmızı	Yem takviyesi
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Beta karoten	Mavimsi-kırmızı	Eritropoietik protoporfiri gibi çeşitli bozuklukların tedavisinde kullanılır, meme kanseri riskini azaltır
<i>Bradyrhizobium</i> sp., <i>Haloferax alexandrinus</i>	Kantaksantin	Koyu Kırmızı	Yiyecek, içecek ve farmasötik preparatlarda renklendirici
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	İndigoidin	Mavi	Oksidatif strese karşı koruma
<i>Rugamonas rubra</i> , <i>Streptoverticillium rubroreticuli</i> , <i>Vibrio gaogenes</i> , <i>Alteromonas rubra</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Serratia rubidaea</i>	Prodigiosin	Kırmızı	Antikanser, immünosupresan, antifungal, yosun öldürücü; boyama (tekstil, mum, kâğıt, mürekkep)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piyosiyenin	Mavi-yeşil	Oksidatif metabolizma, lokal inflamasyonu azaltır
<i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Janthinobacterium lividum</i>	Viyolasein	Mor	Farmasötik (antioksidan, immünomodülatör, antitümoral, antiparazitik aktiviteler); boyama (tekstil), kozmetik (losyon)
<i>Flavobacterium</i> sp., <i>Paracoccus zeaxantinifaciens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Zeaksantin	Sarı	Özellikle gözleri etkileyen farklı bozuklukların tedavisinde kullanılır
<i>Xanthomonas oryzae</i>	Ksantomonadin	Sarı	Kemotaksonomik ve tanısal belirteçler

1.3.2. Algal Pigmentler

Karotenoidler, alglerin kloroplast ve kromoplastlarında bulunan başlıca doğal renklendiriciler arasındadır ve çeşitli endüstriyel uygulamalara sahip sarı, turuncu ve kırmızı pigmentleri içerir. Mikroalg pigmentleri,

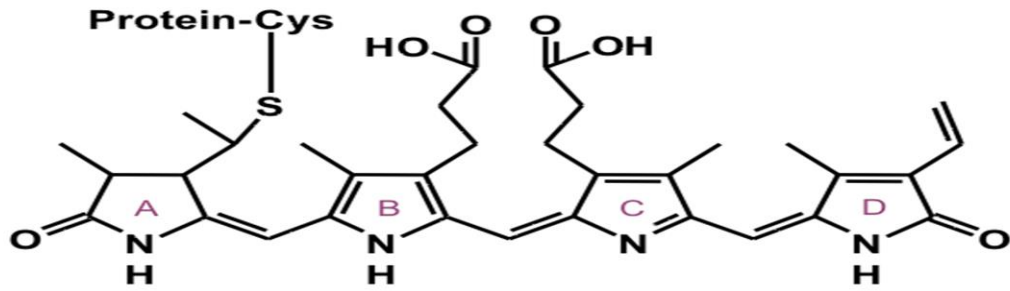
- Nutrasötik, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde doğal renklendiriciler olarak,
- Klinik araştırma ve moleküler biyoloji uygulamalarında,
- Tekstil endüstrilerinde, boya ve renk endüstrilerinde,
- Gıda renklendirici ve yem katkı maddesi olarak yüksek ticari değere sahiptir (Jiménez vd., 2020).

D. salina'nın β -karoten üretme yeteneği tuzluluk, sıcaklık ve ışık yoğunluğundan etkilenir. Yüksek karoten konsantrasyonuna sahip algler, yüksek ışığa ve ozmotik basınca dayanabilirler.

Mikroalglerden elde edilen diğer karotenoidlerle birlikte β -karoten, antioksidan ve gıda takviyesi uygulamalarıyla ticari olarak üretilmektedir. *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Chlamydomonas* ve *Spongiococcum sp.*'den elde edilen lutein (kırmızı-turuncu) tavuk yemi ve yumurta sarısı renklendirici olarak kullanım alanı bulmaktadır.

Canthaxanthin (koyu kırmızı pigment) ve astaksantin (kırmızı terpen), sırasıyla gıda renklendirme maddesi olarak kullanım alanı bulan ve ABD FDA tarafından onaylanan *Dictyococcus cinnabarinus* ve *H. pluvialis* tarafından üretilmektedir (Rather vd., 2023).

Fikobiliproteinler (PBP'ler), fikobilinler olarak bilinen açık zincirli tetrapirel kromoforlara kovalent olarak bağlanan parlak renkli, suda çözünür proteinlerdir.



Şekil 1.2. Fikobiliprotein kimyasal yapısı

PBP'ler siyanobakteriler, kırmızı algler ve diğer alg gruplarındaki ışık toplayan komplekslerin bir parçasıdır. Bunlar, 470-660 nm'den güneş ışığını emen ve enerjiyi klorofil a'ya aktaran fikobilizomlar olarak adlandırılan hücre altı yapılarda düzenlenirler.

Çoğunlukla Rhodophyta (kırmızı alg), Cyanobacteria ve Cryptophyta'da bulunur.

PBP'ler spektral özelliklerine göre üç ana gruba ayrılır: Fikoeritrin (kırmızı), fikosiyanin (mavi) ve allofikosiyanin (mavimsi-yeşil).

Güçlü absorbans ve floresans özelliklerinin yanı sıra antioksidan ve serbest radikal temizleme aktiviteleri nedeniyle PBP'ler gıda, kozmetik, ilaç ve biyomedikal endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Mikroalg pigmentleri, anti-inflamatuar, antianjiyogenik, nöro- ve hepatik koruyucu, antiviral, anti-obezite, antidiyabetik, antikanser ve anti-osteoporotik gibi ek biyolojik işlevlere sahiptir (Jiménez vd., 2020).

1.3.3. Fungal Pigmentler

Ascomycetes, basidiomycetes ve likenler gibi birçok filamentli mantar, melaninler, antrakinonlar, hidroksiantrakinonlar, azafilonlar, karotenoidler, oksopolien, kinonlar, flavinler, fenazinler ve naftokinon gibi farklı kimyasal sınıflara ait, belirli biyolojik özelliklere ve olağanüstü bir renk yelpazesine sahip doğal pigmentler üretir.

Basidiomycetes, eski uygarlıklar tarafından ipek ve yün elyaflarının/kumaşlarının boyanmasında kullanılmıştır. *Monascus sp.*'den Ankaflavin ve kantaksantin ve *P. oxalicum var.*'dan Arpink red™ pigmenti (Natural red™) piyasada ticari olarak mevcuttur. *Ashbya gossypi* tarafından çok iyi verimle üretilen sarı bir gıda renklendiricisi olan Riboflavin (Vitamin B2), birçok ülke tarafından onaylanmıştır ve yenidoğan sarılığı ve migren tedavisinde kullanılmaktadır. *Monascus* cinsinin farklı mantar türleri (*M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. ruberand* ve *M. foridanus*) kırmızı, turuncu ve sarımsı tonlarda endüstriyel açıdan önemli pigmentler üretir. *M. purpureus* 192 F, monascin ve ankaflavin (sarı), rubropunctatin (turuncu) ve monascorubramin (kırmızı) üretir.

Büyüleyici biyolojik aktiviteye sahip iki pigment olan monascin ve ankaflavin'in, Alzheimer hastalığı risk faktörlerini azaltarak intraserebral olarak amiloid proteini enjekte edilen sıçanlarda hafızayı ve öğrenme kapasitesini arttırdığı gösterilmiştir (Rather vd., 2023).

Fusarium türleri, farmasötik ve tıbbi alanlarda olumlu biyolojik aktivitelere sahip olma potansiyeli taşıyan ikincil renkli metabolitlerin (örneğin, mantar pigmentleri) umut vadeden kaynakları olarak da kabul edilmiştir. Yapısal çeşitliliklerine ek olarak, mantar pigmentlerinin, tıbbi, farmasötik ve tarım kimyasalları uygulamaları da dahil olmak üzere çeşitli endüstriyel alanlarda geniş bir uygulama yelpazesine sahip umut vadeden biyoaktif bileşikler olduğu kanıtlanmıştır; bu da gıda ve içeceklerde, hayvan yemlerinde, kozmetiklerde, tekstilde, deride, kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrilerinde renklendirici madde olarak ilk kullanımlarını önemli ölçüde genişletmiştir. Bu nedenle, mantar kökenli pigmentler son on yılda artan bir ilgi görmekte ve günümüzde çeşitli antibiyotiklerin, immünosupresanların, antitümör ve kanser ilaçlarının geliştirilmesinde yeni kullanım alanları bulmaya başlamaktadır. Bazı *Fusarium* türleri, karotenoidler ve naftokinon pigmentleri gibi biyoaktif pigmentler üretir. Bazı *Fusarium* türlerinde naftokinon

pigmentlerinin biyosentezinin, büyüme inhibisyonu veya durması koşulları altında gözlemlenen çevresel streslere karşı ana yanıt olduğu gösterilmiştir. Dahası, yedek pigment sistemlerinin korunması, değiştirilmesi ve geliştirilmesi, pigmentasyonun *Fusarium* cinsinin üyelerinin hayatta kalmasında kilit bir rol oynadığını güçlü bir şekilde göstermektedir. Aurofusarin, fusarubin ve bikaverin gibi birçok *Fusarium* naftokinon pigmenti faydalı biyolojik aktivitelere sahiptir. Bunlar mikotoksin olarak bilinir ve bu durum, özellikle tarım kimyasalları, farmakoloji ve tıp sektörlerindeki olası uygulamaları göz önüne alındığında, güvenlik endişeleri açısından önemlidir. Örneğin, kırmızı bikaverinin, lenfoma, karsinom ve sarkoma gibi tümörlere karşı farmasötik ilaç olarak potansiyel taşıyan antitümör aktivitesine sahip olduğu bilinmektedir. *Fusarium fujikuroi*'den bikaverin sentez yolu için önemli çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, diğer *Fusarium* türlerinde biyoproduksiyonuyla ilgili çok az çalışma mevcuttur. Nitekim, pigment profilleri ve tonlarının bir *Fusarium* türünden diğerine çok yönlü olduğu yaygın olarak kabul edilmiştir, bu da metabolik yolların ve ara ürünlerin muhtemelen farklı olduğunu düşündürmektedir. *F. oxysporum* LCP531 tarafından üretilen iki yeni yabancı tip mor naftokinon pigmenti, bikaverinin sürekli biyosenteziyle birlikte ilk kez gözlemlenmiştir (Lebeau vd., 2019).

Fusarium türlerinin birçoğunun da pigment üretme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir. Çalışmalar, *Fusarium fujikuroi*'den (eskiden *Fusarium moniliforme* olarak biliniyordu) bikaverin, nor-bikaverin, fusarubinler, bazı naftokinonlar (8-O-metilbostrykoidin, 8-O-metilfusarubin, 8-O-metilnektriafuron, 8-O-metil-13-hidroksinorjavanisin, 8-O-metilanhidrofusarubinlaktol ve 13-hidroksinorjavanisin) ve yeni bir izokinolin tipi pigment olan 2-(4-((3E,5E)-14-aminotetradeka-3,5-dieniloksi) butil)-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-4-ol (ATDBTHIQN) gibi pigmentleri rapor etmiştir. Benzer şekilde, *Fusarium oxysporum*'dan farklı renkte naftokinonlar [bostrykoidin, 9-O-metilfusarubin, 5-O-metiljavanicin, 8-O-metilbostrykoidin, 1,4-naftalenedion-3,8-dihidroksi-5,7-dimetoksi-2-(2-oksopropil), 5-O-metilsolaniol ve 9-O-metilanhidrofusarubin], iki antrakınon bileşiği [2-asetil-3,8-dihidroksi-6-metoksi antrakınon ve 2-(1-hidroksietil)-3,8-dihidroksi-6-metoksi antrakınon] ve poliketit pigmenti (bikaverin) rapor edilmiştir (Lagashetti vd., 2019).

1.4. Mikrobiyal Pigment Üretimini Etkileyen Faktörler

Tek hücreli prokaryotlardan çok hücreli ökaryotik organizmalara kadar onlarca yıldır süren araştırma umutları, bunların yaşam döngülerinin, çeşitli metabolitlerin üretimini

düzenleyen veya engelleyen çok çeşitli fizikokimyasal parametrelere bağlı olduğunu doğruladı. Her türlü mikrobiyal metabolitin üretimi için üç ana yol bilinmektedir:

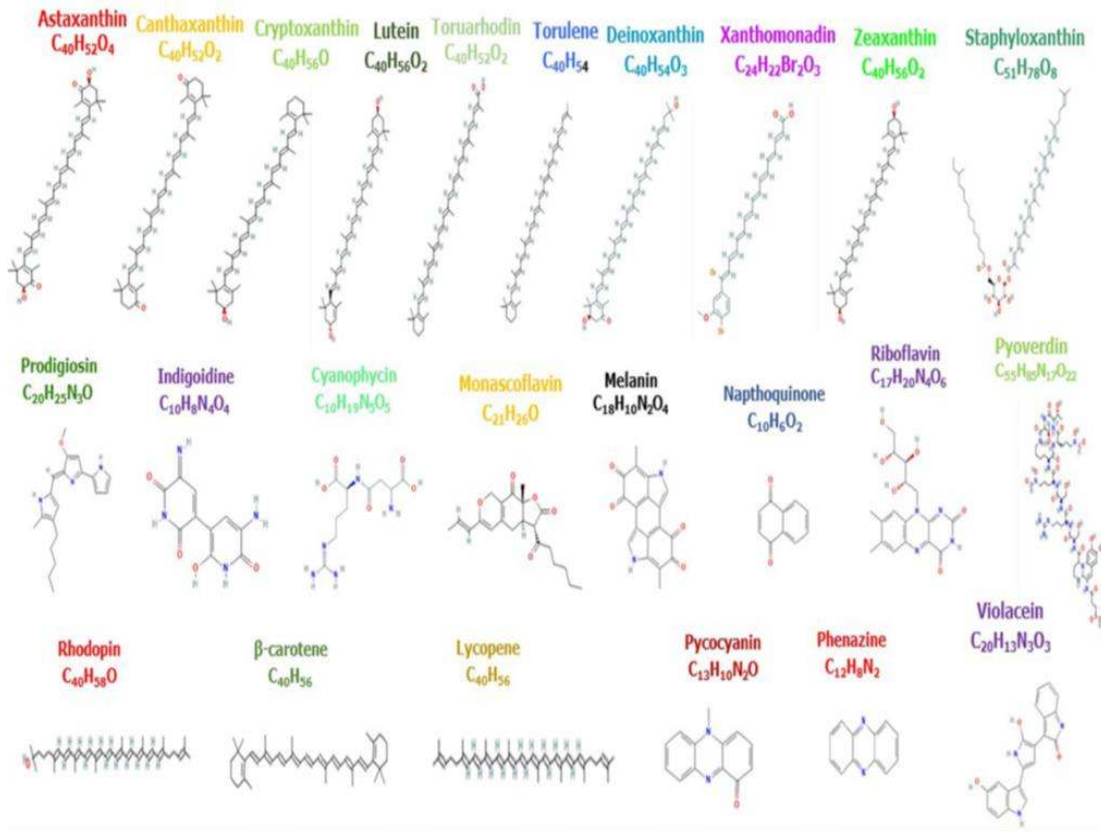
- (1) Doğal olarak üretilen metabolitler;
- (2) elverişsiz/zorlu çevresel koşullar altında üretilen metabolitler; ve
- (3) çeşitli karbon, nitrojen ve ek besin değişiklikleriyle uyarılma üzerine üretilen metabolitler.

Literatür, farklı pigment moleküllerinin üretiminin hücre içi veya hücre dışı (veya her ikisi) olduğunu ve ışığa, pH'a, sıcaklığa ve çeşitli ortam bileşenlerine bağlı olduğunu ve mevsimsel faktörler (alüvyon, nival, pluvial), numune alma alanları ve habitatları ve laboratuvarlardaki farklı yetiştirme koşulları.

Mikrobiyal kültüre çevresel parametreler ve ortam bileşenlerinin optimizasyonu gibi çeşitli faktörler sağlanırsa ilgili pigment daha fazla eldesi mümkün olabilir. Mikrobiyal üreme koşulları (örneğin, besin değişiklikleri) anlaşılır bir şekilde düzenlenmesi daha iyi pigment üretimi araştırmaları için her zaman önemlidir. Besin koşulları (zenginlik/fakirlik), pigment sentezi üzerinde her zaman algılanabilir bir etki gösterir; daha önceki çalışmalarda yüksek fosfat içeriğinin ve yüksek asiditenin floresan pigmentin azalmasına neden olduğu ve eser miktardaki sülfatın pigment sentezini bozabileceği gözlemlenmiştir. Pirinç ve buğday unu (ya bütünleşik ya da kırık artık tahıl) gibi çeşitli substratların eklenmesi ve ışık uyarımı, mantarlarda ve mayalarda yüksek düzeyde karotenoid üretimine neden olmuştur. *Mycobacterium tuberculosis*'in pH 5.0-6.0'da asidik strese karotenoid pigmentler ürettiği ve anaerobik kültür koşullarında uzun süreli büyüme sağladığı bulunmuştur. Glikoz gibi karbon kaynakları ve amonyum sülfat, pepton veya diğer amino asitler gibi inorganik nitrojen kaynakları da pigmentasyonu indükler. Tüberküloz dışı mikobakterilerde pigment sentezi üzerinde fotokromojenik, (fotoindüksiyon) ve skotokromojenik (karanlıkta pigment oluşumu) etkiler bulunmuştur. Endüstriyel üretime yönelik mikrobiyal pigmentleri tasarlamak için, ilgili pigmentli mikroorganizma için çeşitli uygun substratları ve fizikokimyasal parametreleri değerlendirmek, çeşitli uygulamalar için yüksek miktarda pigment elde etmek için her zaman önemli bir adımdır (Ramesh vd., 2019).

1.5. Bazı Mikrobiyal Pigment Çeşitleri

Kimyasal gruplara bağlı olarak, mikrobiyal pigmentler genel olarak antrakinonlar, karotenoidler, indoller, fikobiliproteinler, prodigiosin, rodopsinler, melaninler ve viyolasin şeklinde farklılaşır (Chatragadda ve Dufossé; 2021) (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. Önemli mikrobiyal pigmentlerin kimyasal yapıları (Rajendran vd., 2023).

1.5.1. Karotenoidler

Karotenoidler ilk olarak Heinrich Wilhelm Ferdinand Wackenroder tarafından izole edildi. Tüm karotenoidler tetraterpenoidlerdir (Kocher ve Muller, 2011) ve iki sınıfa ayrılan 600'ün üzerinde bilinen karotenoid vardır: Ksantofiller (oksijen içeren) ve karotenler (tamamen hidrokarbon olan ve oksijen içermeyen). Çeşitli karotenoidler arasında en önemli karotenoidler (Şekil 1) alfa ve beta-karotenler, kriptoksantin, lutein, likopen, violaksantin, neoksantin, zeaksantin ve kanksantindir (Rymbai vd., 2011). Bu karotenoidler klorofili foton hasarından korurlar, vitamin takviyesi olarak kullanılırlar ve oksidatif stresten korunmada önemli rol oynarlar. Bunların alımı foto yaşlanmayı ve güneş yanığını önleyebilir. Epidemiyolojik çalışmalar, yüksek β -karoten alımına sahip kişilerin akciğer kanseri riskinin azaldığını göstermiştir (Rao vd., 2017). Karotenoidler ticari olarak gıda renklendiricileri, hayvan yemi takviyeleri ve obezite tedavisinde kullanılır. Son zamanlarda nutrasötik, kozmetik ve farmasötik amaçlarla kullanılmaya başlanmıştır (Garrido-Fernandez vd, 2010; Jaswir vd., 2011).

1.5.2. Melanin

Melaninler, eumelaninler, feomelaninler ve allomelaninler olarak sınıflandırılan indolik polimerlerdir. Melanin tüm canlı sistemlerde yaygın olarak bulunur. Melanin, geniş bir elektromanyetik spektrum aralığını emerek ve foton kaynaklı hasarı önleyerek UV ışığına direnç kazandırır. Melanin canlılarda taklit için kullanılır ve yüksek sıcaklıklara ve kimyasal strese karşı koruma sağlar. Melanin kozmetikte, foto koruyucu kremlerde, gözlüklerde ve uranyum gibi radyoaktif atıkların hareketsizleştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakteriyel melanin genleri, rekombinant bakteri suşlarını taramak için raportör genler olarak kullanılmıştır. Anti-HIV özelliklere sahiptir ve foto voltaj üretimi ve floresans çalışmaları için faydalıdır. Melanin ayrıca insan metastatik melanomunun tedavisine yönelik monoklonal antikorlar üretmek için de kullanılır (Plonka ve Grabacka, 2006; Surwase ve d., 2013). *Colletotrichum lagenarium*, *Magnaporthe grisea*, *Paracoccidoides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*, *Aspergillus fumigates* ve *Streptomyces* cinsinin birçok türü melanin üretir (Rao vd., 2017).

1.5.3. Viyolasein

Violacein, ilk kez Brezilya'daki Amazon Nehri'nden izole edilen gram-negatif bakteri *Chromobacterium violaceum*'dan tanımlanan mor renkli bir pigmenttir.

Duganella sp., *Janthinobacterium lividum*, *Microbulbifer sp.*, *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, *Pseudoalteromonas tunicata* ve *Pseudoalteromonas ulvae* gibi çeşitli mikroorganizmalardan da viyolasein üretimi rapor edilmiştir.

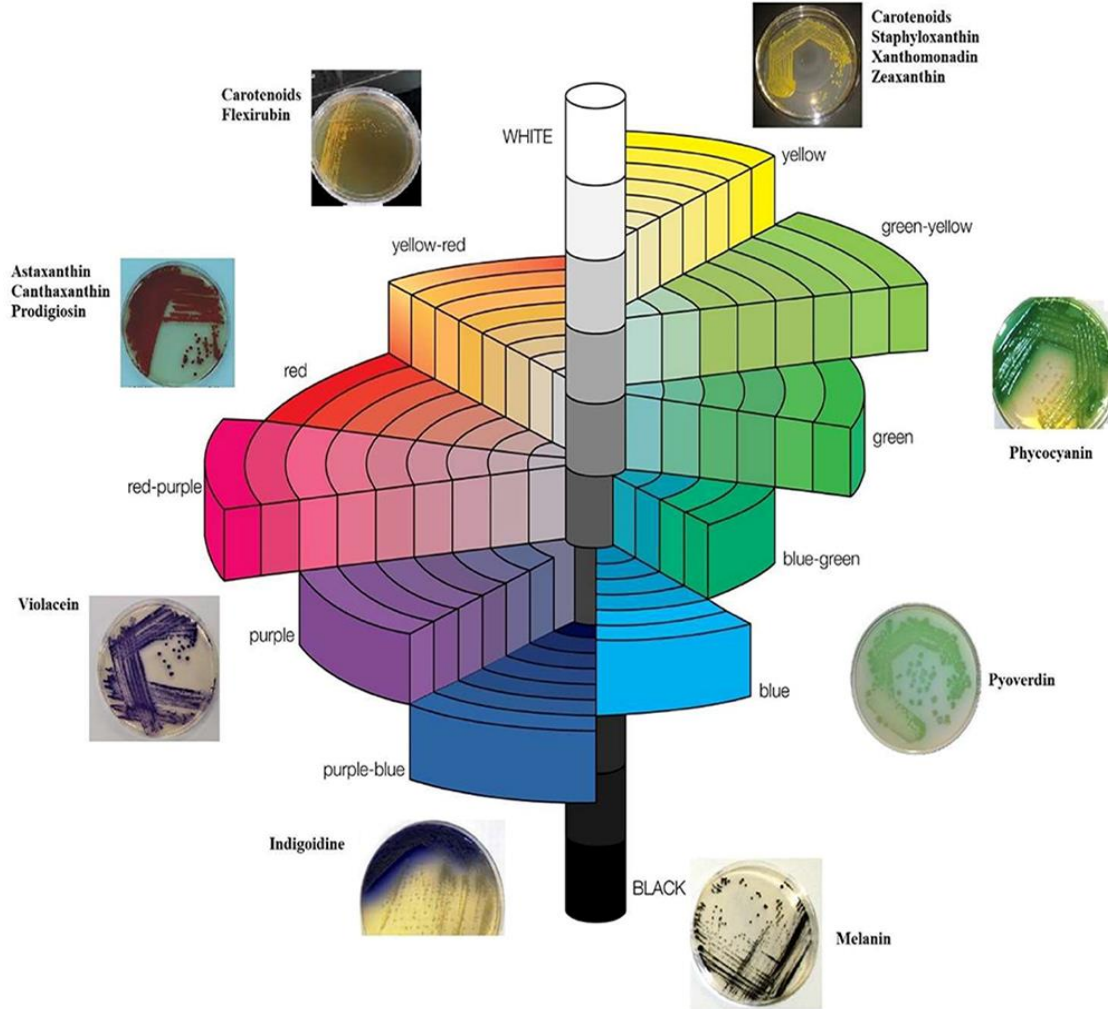
Viyolaseinin antiviral, antibakteriyel, antiülserojenik, anti-leishmanial, antikanser ve enzim modülasyon özellikleri dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteleri olduğu rapor edilmiştir (Rao vd., 2017).

1.5.4. Riboflavin

B2 vitamini olarak da adlandırılan riboflavin güçlü bir sarımsı-yeşil floresans sergileyen, suda çözünebilen bir pigmenttir. Riboflavin, flavin mononükleotid ve flavin adenin dinükleotid koenzimlerinin yapısal bir bileşeni olarak görev yapar. Otuz yılı aşkın süredir riboflavin takviyeleri yenidoğan sarılığının fototerapi tedavisinin bir parçası olarak kullanılmaktadır. Riboflavin'in β blokerlerle birlikte tedavisi migren baş ağrılarına karşı iyileşme gösterdi. Riboflavinin UV ışığıyla kombinasyonunun kan ürünlerinde bulunan zararlı patojenleri azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir (Rao vd., 2017).

1.5.5. Piyosiyanin

Piyosiyanin *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen mavi bir pigmenttir. Piyosiyanin biyo-kontrol ajanı olarak kullanılmış ve anti-bakteriyel ve anti-fungal aktiviteye sahiptir (Jayaseelan vd., 2014).



Şekil 1.4. Doğal renklendirici olarak kullanılma potansiyeli yüksek olan bakteriyel pigmentler

Bakteriler kırmızı (*Serratia marcescens*, *Gordonia jacobaea*), kırmızı-sarı (*Kocuria* sp., *Chryseobacterium artocarpi*), sarı (*Micrococcus*, *Hymenobacter* sp. ve *Chryseobacterium* sp.), yeşil (*Pseudomonas* sp.), mavi (*Corynebacterium insidiosum*, *Erwinia chrysanthemi*, *Vogesella indigofera*), mor (*Chromobacterium* sp.) Munsell renk sisteminde gösterildiği gibi (Venil vd., 2013).

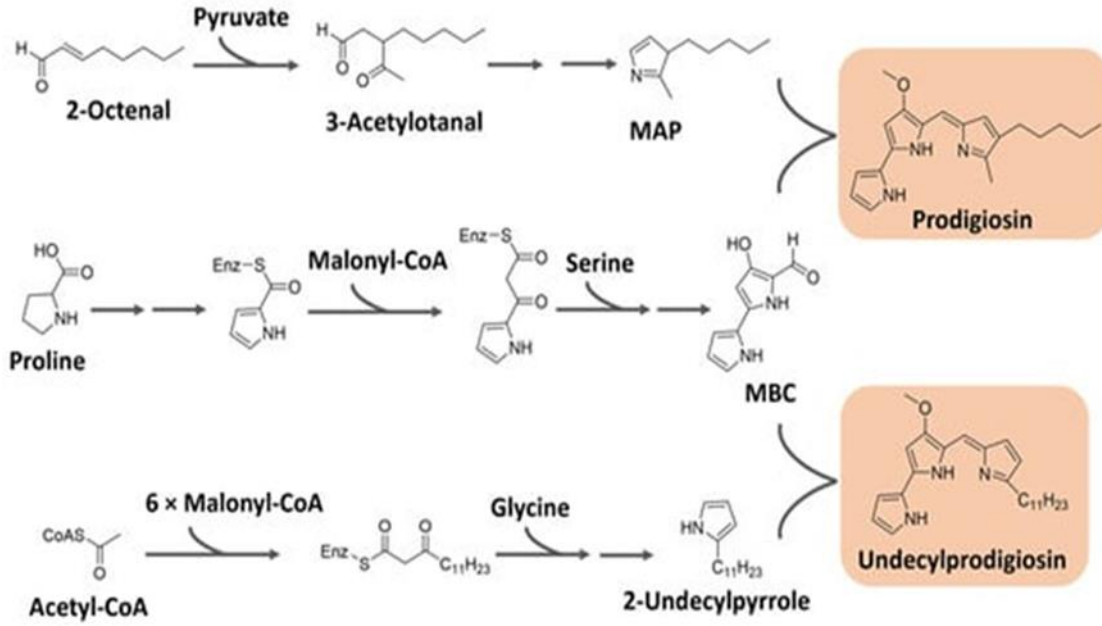
1.5.6. Prodigiosin

Prodigiosin (PG), $C_{20}H_{25}N_3O$ kimyasal formülünü taşıyan prodigiosin, pirol (A halkası), 3-metoksi-pirol (B halkası) ve 2-metil-3-pentilpirolden (C halkası) oluşan bir tripirol kırmızı pigmenttir. Alkaloid prodiginin ailesinin bir üyesine aittir (Han vd., 2021).

Prodigiosin ilk olarak *Serratia marcescens*'te keşfedildi (Han vd., 2021). Prodigiosin üretiminin *S. marcescens* ile sınırlı olmadığı, *S. nematodiphila*, *S. plymuthica*, *S. rubidaea*, *Pseudoalteromonas rubra*, *Vibrio sp.*, *Janthinobacterium*, *Pseudomonas putida*, *Streptomyces coelicolor* ve *Hahella chejuensis* gibi diğer bakterilerde tarafından da üretilmektedir (Venil vd., 2013).

Prodigininler, prodigiosin ve undesil prodigiosin gibi düz bir zincire sahip olabilir veya siklonilprodigiosin ve bütül-meta-sikloheptilprodiginine gibi siklik bir yapıya sahip olabilir.

Prodigininler, bipirol molekülü 4-metoksi-2-2'-bipirol-5-karbaldehitin (MBC) 2-metil-3-pentilpirol olabilen bir monopirol ünitesi ile enzimatik yoğunlaşması ile sonuçlanan çatallı bir yol yoluyla biyosentezlenir. 2-metil-3-n-amil-pirol (MAP) veya 2-undesilpirol olarak da bilinir. MBC, prolin, serin ve malonil-CoA birimlerinden biyosentezlenir. Monopirol kısımları farklı enzimatik aparatlara sahip farklı substratlardan kaynaklanır. MAP, öncül olarak yağ asidi türevi 2-oktenal ve piruvat içerirken, 2-undesilpirol, asetil-CoA/malonil-CoA birimleri ve glisinden biyosentezlenir. Bu pigmentlerin biyosentezi, farklı bakterilerde önemli ölçüde farklılık gösteren gen kümeleri tarafından kontrol edilir. Örneğin, *Serratia sp.*'de Pig gen kümesi prodigiosin biyosentezinden sorumludur, *Streptomyces sp.*'de ise Red gen kümesi süreci düzenler (Han vd., 2021).



Şekil 1.5. Prodigininlerin biyosentetik yollarının basitleştirilmiş şematik diyagramı

Enz = enzim kümesi. MAP = 2-metil-3-n-amil-pirol; MBC = 4-metoksi-2-2'-bipirol-5-karbaldehit.

S. marcescens'in iki farklı suşu vardır: kırmızı pigmentli suşlar ve beyaz pigmentli suşlar. Pigmentli *S. marcescens*'te karakteristik bir ikincil metabolit olan PG, belirgin bir fizyolojik rol oynamaz. Doğal ortamda bulunan engellere karşı konakçı savunması, PG'nin potansiyel rollerinden biridir ve ekolojik bakteri dağılımını kolaylaştırmaktır. PG'nin bir diğer potansiyel fizyolojik işlevi, karşılaştırılabilir koşullarda hayatta kalan çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler arasındaki türler arası rekabeti azaltma yeteneğidir. PG sentezinin biyolojik fonksiyonu hakkında çok az şey bilinmesine rağmen prodigiosinin *S. marcescens*'te enerji yayma süreçlerine aracılık ettiğini öne sürerken, diğer araştırmalar ışık enerjisi depolamayı veya ultraviyole korumayı göstermiştir. Çevresel faktörler, antimikrobiyal kırmızı pigmentin sentezini etkiler; bu, rakip türler üzerinde mikrobiyal ekoloji hakimiyeti elde etmek için daha uygun faktörlerle kontrol edilebilir. PG sentezi için gereken muazzam miktarda enerji göz önüne alındığında bu molekülün özellikle türler arası rekabet sırasında *S. marcescens*'in hayatta kalması için çok önemli olduğu açıktır. PG, bağışıklık baskılayıcı maddeler, antibakteriyel, antioksidan ve antikanser gibi iddia edilen farmakolojik özelliklerinin temeli olduğu düşünülen kendine özgü tripirrol yapısıyla ayırt edilir. Olefinler ve tekstiller için doğal bazlı bir pigment olarak özellikler gösterir. PG'nin güçlü klinik özelliklerinden dolayı bir antitümör olduğu öne sürülmektedir. Bakteriyel DNA bölünmesi, hücre döngüsünün baskılanması ve pH manipülasyonu dahil olmak üzere üç işlemin daha önce PG'nin antibakteriyel etkinliğinden sorumlu olduğu düşünülüyordu.

PG'nin rakip bakterilerin plazma zarını bozabilen hidrofobik bir stres ajanı olduğunu öne sürüyor. Varsayılan süreçler arasında fototoksisite ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu yer alır. Dış zara nüfuz etme kapasitesi nedeniyle PG'nin, DNA giraz ve topoizomera IV gibi hücre büyümesiyle ilişkili enzimleri bloke ederek antibakteriyel özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir. Yapısal omurgası üç pirol halkasından oluşur ve kırmızı floresans yayabilir. PG, a-tokoferol ile karşılaştırıldığında güçlü antioksidan aktiviteler gösterir, bu nedenle PG, cilt ve gıdaların korunması için bir SPF olarak UV savunması için yaygın olarak kullanılabilir (İbrahim vd., 2023).

1.6. Mikrobiyal Pigmentlerin Kullanım Alanları

Şu anda çeşitli tür ve formlardaki pigmentler gıda endüstrisinde, kozmetikte, farmasötiklerde, hayvan yemi ve diğer uygulamalarda katkı maddeleri veya takviyeler olarak kullanılmaktadır. Ancak sentetik pigmentlerin insan vücudunda toksisiteye ve kanserojenliğe neden olan sorunları nedeniyle kullanımları giderek azalmaktadır. Bu nedenle sentetik boyaların yerini alabilecek doğal pigmentlere olan ilgi artmaktadır. Son zamanlarda bu eğilime yanıt olarak, doğal boyama, sağlıklı fonksiyonel gıdalar, insan sağlığı ve güvenliği için kozmetik ürünlerde doğal materyaller olarak doğal pigmentlerin kullanılması eğilimi giderek yaygınlaşmıştır (Venil vd., 2013). Mikroorganizmalardan elde edilen doğal pigmentler, düşük maliyetli üretimleri, ekstraksiyon kolaylığı, tür iyileştirme yoluyla yüksek verim ve mevsimsel değişimlerin olmaması nedeniyle renklendirici ajanlar olarak önemli bir rol oynamaktadır (Rajendran vd., 2023).

Çizelge 1.2. Mikroorganizmalar tarafından üretilen mikrobiyal doğal pigmentler ve metabolik rolleri (Venil vd., 2013).

Mikroorganizma	Pigment	Renk	Metabolik Rolü
<i>Pseudoalteromonas rubra</i> , <i>Hahella chejuensis</i>	Prodigioson	Kırmızı	Antibakteriyel, antikanser, Boyama (tekstil, mürekkep, kağıt)
<i>Collimonas CT</i> <i>Pseudoalteromonas Tunikat</i>	Viyolasein	Mor	Antibiyotik, antiprotozoan, Antikanser
<i>Vibrio cholerae</i> <i>Shewanella colwelliona</i>	Melanin	Siyah, kahverengi	UV koruma
<i>Cryptophyta</i> , <i>Neodilsea yendoava</i>	Fikoeritrin	Kırmızı	Biyokimyada floresans özelliği nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır.
<i>Monascus sp.</i>	Ankaflavin	Sarı	Hipopolimerik ve obezite karşıtı aktivitelere sahip
<i>Penicillium herquei</i> , <i>Penicillium atrovenerum</i>	Atrovetin	Sarı	Antioksidan aktivite, bitkisel yağların stabilizasyonu ve sarı-yeşil floresans göstermesi
<i>R. glutinis</i>	β -karoten	Turuncu	Gıda renklendirici ve ışıktan koruma

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Tekstil Endüstrisinde Pigmentler

Sentetik boyaların giyim eşyalarını renklendirmek için kullanılması yüzyıllardır uygulanan bir uygulamadır. Bu boyalar yaygın olarak bulunabilmesine ve uygun fiyatlarla geniş bir renk yelpazesi sunmasına rağmen, insan vücudunda alerjik reaksiyonlara ve diğer sağlık sorunlarına neden olabilecek zararlı ve toksik maddeler salabilirler (Di Salvo vd., 2023). Tekstil endüstrisi yaklaşık 1,3 milyon ton sentetik boya ve boya öncüsü kullanıyor (Venil ve d., 2013). Boyama ve terbiye işlemleri sırasında her yıl yaklaşık 200.000 ton boya atık olarak kaybolmaktadır. Ne yazık ki bu boyaların çoğu geleneksel atık su arıtma proseslerinden kaçır ve ışığa, sıcaklığa, suya, deterjanlara, kimyasallara, sabuna ve çamaşır suyu ve terleme gibi diğer parametrelere karşı yüksek stabiliteleri nedeniyle çevrede kalırlar (Ogugbue ve Sawidis, 2011). Bu nedenle, tehlikesiz, kanserojen olmayan ve ekolojik olarak sürdürülebilir oldukları için doğal pigmentler tekstil endüstrisinde giderek daha fazla kullanılmaktadır (Di Salvo vd., 2023).

Duran vd., (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, *C. violaceum*'dan elde edilen violacein, viskon, polyester, saf pamuk ve saf ipeği renklendirmek için kullanılmıştır. Dahası, *Pseudoalteromonas sp.*'den elde edilen violacein, çevre dostu türevleri nedeniyle tekstil ve oyuncak endüstrisinde büyük miktarlarda kullanılmaktadır (Durân vd., 2016).

Başaka bir çalışmada *Streptomyces* suşları, substratın bileşimine bağlı olarak farklı sonuçlar veren koyu mavi ve kırmızı pigmentler üretirken, *Vibrio sp.* Prodigininler, boyalı tekstil ürünlerine antibakteriyel özellikler kazandırdı (Kramar vd., 2014).

Sengupta ve Bhowal, biyokimyasal analizler ve 16S rRNA dizilemesi yoluyla tanımlanan, toprak bakterisi *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen mavi-yeşil bir pigmenti araştırdılar. Pigment, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi ile analiz edildi. Antimikrobiyal özellikleri test edildi ve *E. coli*'ye karşı 10 mm, *S. aureus*'a karşı 13 mm, *B. subtilis*'e karşı 9 mm ve *S. typhi*'ye karşı 7 mm'lik inhibisyon bölgeleri ortaya çıktı. Ek olarak, pigmentin çeşitli tekstil ve kâğıt üzerindeki boyama potansiyeli değerlendirildi; haslık özellikleri ve cilt hassasiyeti için yama testleri yapıldı. Sonuçlar, bu bakteriyel pigmentin sentetik boyalar için güvenli, toksik olmayan bir alternatif olabileceğini ve böylece pazar uygulanabilirliğini artırabileceğini göstermektedir (Sengupta ve Bhowal, 2023).

2.2. Gıda Endüstrisi

Çekici görünüme sahip gıdaların geliştirilmesi gıda endüstrisinde önemli bir hedeftir. Yiyecekleri çekici kılmak için sentetik veya doğal renkler eklenir. Son günlerde gıda üreticileri, bazı sentetik renklerin neden olduğu olumsuz sağlık sorunları nedeniyle sentetik renklerden doğal renklere yöneliyor (Venil ve diğerleri, 2013). Mikroorganizmalardan elde edilen doğal renklendiriciler, ucuz üretimi, ekstraksiyonunun kolay olması, yüksek verimi, ham madde eksikliğinin olmaması ve mevsimsel değişiklikler nedeniyle gıda renklendirici ajanlar olarak önemli bir rol oynamaktadır (Rao vd., 2017).

Flavobacterium sp.'den zeaksantin kanatlı hayvan yemlerinde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Sajilata vd. (2008), balıkların ve kabukluların zeaksantini kırmızı renkli pigment astaksantine dönüştürdüğünü ve bunun da kabukların arzu edilen kırmızı rengini arttırdığını bildirmiştir. Bu pigmentler güvenli kabul edilmekte ve FDA tarafından onaylanmaktadır (Venil vd., 2020).

Bradyrhizobium sp. ve *Halobacterium sp.* gibi türlerden elde edilen, yaygın olarak gıda renklendirmesinde kullanılan ve özellikle kümes hayvanları sektöründe yem katkı maddesi olarak çok önemli olan lipit çözünür bir pigment olan kantaksantindir. Avrupa Birliği düzenlemelerine göre, kantaksantin, alabalık ve somon gibi balık yemlerine ve kümes hayvanlarına, sıkı sınırlar dahilinde eklenebilir: Genel yem için 80 mg/kg, yumurta tavukları için 8 mg/kg ve diğer kümes hayvanı türleri için 25 mg/kg (Tavasolli vd., 2025).

Candida guilliermondii, *Debaryomyces subglobosus*, *Eremothecium ashbyii*, *Ashbya gossypii* ve *Clostridium acetobutylicum* dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalar tarafından riboflavin üretilir. Riboflavin hem besin takviyesi hem de süt ürünleri, soslar, bebek mamaları ve enerji içecekleri gibi birçok gıda ürünüde bir bileşen olarak kullanılır. Fonksiyonu ayrıca, makromoleküllerin, karbonhidratların, proteinlerin ve yağların parçalanmasına yardımcı olarak vücudun metabolizmasını desteklemeyi, enerji üretmeyi ve oksijeni verimli bir şekilde kullanmayı içerir (Sen vd., 2019).

Chlorella'dan elde edilen lutein, parlak sarı bir ton sunar ve antioksidan özelliklere sahiptir, bu da onu gıda renklendirme uygulamaları için arzu edilen bir seçenek haline getirir. Şu anda gıda renklendirici olarak araştırılan *Porphyridium cruentum* ve diğer mikroalglerden elde edilen fikoeritrin, antioksidan, antikanser ve immün düzenleyici özellikleri nedeniyle incelenmekte olup, mikrobiyal ve alg renklendiricilerinin gıda sektöründeki çeşitli kullanımlarını ve avantajlarını vurgulamaktadır (Tavasolli vd., 2025).

2.3. İlaç Endüstrisi

Küresel olarak yaklaşık 1,27 milyon ölüme yol açan antimikrobiyal direncin ortaya çıkması, enfeksiyon hastalıklarının ve kronik yaraların tedavisinde önemli zorluklar yaratmakta ve daha iyi alternatif antimikrobiyal ajanlar üzerine araştırmaları teşvik etmektedir (Chin vd., 2024).

Moreira vd., (2018) ve Soni vd., (2023) yaptıkları çalışmada, *Rhodotorula sp.* mayasından üretilen karotenoidler, deniz bakterisi *Bacillus infantis*, *P. aeruginosa*, *Salmonella sp.* ve *S. aureus* dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere bakterilere karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir (Moreira vd., 2018; Soni vd., 2023). Ayrıca, Naisi vd., (2023) yaptıkları başka bir çalışmada *Rhodotorula glutinis* mayasından elde edilen karotenoid pigmenti, *Salmonella typhimurium* ve *S. aureus* tarafından oluşturulan biyofilmlere karşı antibiyofilm aktivitesi göstermiştir (Naisi vd., 2023).

Umadevi ve Krishnaveni, (2013) yaptıkları çalışmada, *M. luteus*'tan elde edilen ham pigmentin antibakteriyel aktivitesi, disk difüzyon tahlili ile değerlendirildi. Gözlemlenen inhibisyon bölgesi, *Escherichia sp.* ile karşılaştırıldığında 50, 100 ul konsantrasyonda *Staphylococcus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.* ile yüksekti. Negatif sonuç *Streptococcus sp.*'de gözlemlendi (Umadevi ve Krishnaveni, 2013).

Nakamura vd., (2003) yaptıkları çalışmada, violaceinin, 10-15 mg/L MIC aralığında Gram-pozitif bakterilerin (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *S. aureus*) ve Gram-negatif bakterilerin (*P. aeruginosa*) büyümesini engellediği, ancak 50 mg/L konsantrasyonda bile Gram-negatif bakteri *E. coli* ve mantar *Trichosporon cutaneum*'u engellemediği bildirilmiştir (Nakamura vd., 2003). Diğer bir çalışmada violacein ayrıca *S. epidermidis*'in planktonik ve olgun biyofilm tabakasını da ortadan kaldırabilir ve vankomisin, sefepim, siprofloksasin ve meropenem gibi klinik ilaçlarla birlikte kullanıldığında biyofilmdeki mikrobiyal canlılığı azaltmada önemli bir sinerjik etki gösterir (Dodou vd., 2020).

Kim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *H. chejuensis*'ten izole edilen prodigiosin, akne vulgaris'e neden olan baskın bir bakteri olan *Cutibacterium acnes*'e ve diğer cilt mikroplarına (*Micrococcus luteus*, *S. epidermidis* ve *Streptococcus mitis*) karşı hem engelleyici hem de bakterisidal aktivite göstermiştir (Kim vd., 2023).

Melanin, biyomedikal uygulamalar, tarım, gıda ambalajlama ve depolama alanlarında güçlü bir antimikrobiyal ve biyolojik kontrol ajanı olarak belirlenmiştir. Kamarudheen vd., (2019) yaptıkları çalışmada deniz actinomycetes'inden, *Nocardia* sp.

dassonvillei'den izole edilen melanin, *Staphylococcus sp.*'ye karşı antibiyofilm aktivitesi, gıda kaynaklı patojenlere (*Listeria monocytogenes* ve *Bacillus cereus*) karşı antibakteriyel aktivite ve *C. violaceum* MTCC 2656'ya karşı anti-quorum sensing (QS) aktivitesi göstermiştir (Kamarudheen vd., 2019).

Saleh ve arkadaşları tarafından 2018 de yapılan bir çalışmada, siyah maya *Hortaea werneckii*'den izole edilen DHN-melanin'in *Staphylococcus sp.*, *S. pyogenes*, streptomisin dirençli *K. pneumonia*, mantar *C. albicans* ve fitopatojen *E. carotovora*'nın büyümesini engellediği gösterilmiştir (Saleh ve ark., 2018).

Shouman vd., (2013) yapılan çalışmada, piyosiyenin, Gram-pozitif, Gram-negatif patojenik ve gıda kaynaklı patojenlere karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Gıda kaynaklı patojenler *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*'ye karşı 20 ila 60 µg/mL arasında nispeten düşük MIC değerleri; patojenik mikroorganizmalar, metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA), çoklu ilaç dirençli *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae* ve *Acinetobacter baumannii*'ye karşı 40-150 µg/mL MIC ve insan patojenik mantarı *C. albicans*'a karşı 250-300 µg/mL MIC değerleri göstermiştir (Shouman vd., 2023)

COVID-19'un ani salgınları nedeniyle, araştırmacılar violacein içeren nanofiber membranlar üreterek etkili bir solunum maskesi filtresi arayışına girmişlerdir (Lee vd., 2022). İnfluenza virüsü için %98,859 ve insan koronavirüsü için %99,893 gibi dikkat çekici bir viral inaktivasyon oranı 1 saat içinde ve yaklaşık %100 inaktivasyon oranı 4 saat sonra göstermiş olup, violacein içeren membranın virüs öldürücü potansiyelini ortaya koymuştur (Lee vd., 2022).

TePLYakova ve Kosogova'nın 2015'te yaptıkları çalışmada, *Basidiomycota cephalon*'un birçok türü arasında, doğal mantar *I. obliquus*'tan (Çaga mantarı) elde edilen melanin, farklı deneylerde 0,4 ila 10 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda HIV-1 virüsünü inhibe etmede daha belirgin sonuçlar göstermiştir. Ayrıca, 0,006 mg/mL'lik sulu melanin ile Vero hücre kültüründe HSV-2 viral replikasyonunun tamamen inhibe edildiği de gösterilmiştir (TePLYakova ve Kosogova, 2015).

Hastalığa neden olan iltihaplanmanın giderek artması ile doğuştan gelen bağışıklık tepkisi arasındaki karmaşık ilişki, daha hedefli ve sürdürülebilir ilaçlara, genellikle doğal ürünlere olan ihtiyacı ortaya çıkarmıştır (Chin vd., 2024).

Prostaglandinler, lökotrienler, histamin ve bradikinin gibi çeşitli kimyasallar iltihaplanmada rol oynar. Piyasada çeşitli sentetik antiinflamatuvar ilaçlar bulunmasına rağmen, *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella ellipsoidea*, *Dunaliella* ve *Arthrospira / Spirulina* gibi mikroalglerden ve siyanobakterilerden elde edilen β-karoten, lutein,

zeaksantin, astaksantin, violaksantin ve fukoksantin gibi karotenoid metabolitlerinin antiinflamatuvar aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Kabir vd., (2022) yapılan çalışmada, astaksantin ve fukoksantin, interselüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1), nükleer faktör- κ B (NF- κ B) ve mitojenle aktive olan protein kinazlar proinflamatuvar sinyal yolu gibi çeşitli yolların inhibisyonu yoluyla retina ve nöronal hücrelerdeki inflamasyonu inhibe ettiği bildirilmiştir (Kabir vd., 2022). Bunun yanı sıra, astaksantin, insan keratinositlerinde NF- κ B aktivasyonunu bloke ederek atopik dermatit hayvan modelinde interlökin-1 β (IL-1 β), interlökin-6 (IL-6), siklooksijenaz-2 (COX-2), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi diğer proinflamatuvar biyobelirteçleri inhibe ettiği gösterilmiştir; bu da cilt hastalıklarının tedavisinde olumlu bir yaklaşım sunmaktadır (Davinelli vd., 2018).

İnsanlarda iki siklooksijenaz formu üretilir: COX1 ve COX2. Bunlardan ilki ağrı, mide koruması ve kan pıhtılaşmasında rol oynarken, ikincisi inflamatuvar hücrelerde ve merkezi sinir sisteminde prostaglandin E2 (PGE2) sentezinde önemli bir rol oynar (Alsharif vd., 2023). Bahsedilen hastalıkların tedavisinde proinflamatuvar inhibitörlerin ticari kullanımı, mütevazı bir etkinlik ile birlikte yan etkilere yol açmış ve araştırmacıları prodigiosin gibi doğal alternatiflere yöneltmiştir. 80 μ g'lık prodigiosin, LPS ile indüklenen RIN-5F hücrelerinde NO, IL-6 ve IL-8 üretimini sırasıyla %57, %67 ve %64 oranında baskılamıştır (Anitha vd., 2023). Prodigiosin ayrıca Wistar albino sıçanlarında alüminyum klorür kaynaklı AD benzeri nörolojik değişikliklerden kaynaklanan TNF- α , IL-1 β , NF- κ B, p65 ve iNOS ekspresyonunu inhibe ederek, AD'de şiddetlenen nöroinflamasyonun tedavisi için umut vadeden bir özüt olduğunu göstermiştir (Alsharif vd., 2023).

Monascus türevlerinin etkileri, kardiyovasküler, yağlı karaciğer ve lipogenez hastalıklarının önlenmesine kadar uzanmaktadır; Lai vd., (2021) yaptıkları çalışmada, düşük dozda monascin ve ankaflavin, Lieber-DeCarli sıvı alkol diyetiyle beslenen C57BL/6J farelerinde TNF- α ekspresyon seviyelerini sırasıyla %45,32 ve %54,02 oranında azaltmıştır. Aynı ortamda diğer proinflamatuvar belirteçlerde de önemli bir azalma gözlemlendi; örneğin IL-1 β 'de sırasıyla %31,04 ve %36,38, IL-6'da %32,83 ve %35,57, NF- κ B'de %15,99 ve %22,6 ve iNOS'ta sırasıyla %23,74 ve %28,04 oranında azalma görüldü (Lai vd., 2021).

Kanser tedavisinin karmaşıklığı ve hastaların kanser ilaçlarına karşı artan direnci, araştırmacıları kanser gelişimini tedavi etmek veya azaltmak için doğal ürünleri araştırmaya yöneltmiştir.

Arthrobacter sp.'den izole edilen kırmızı karotenoid pigmenti ... G20, KYSE30 insan özofagus skuamöz kanser hücrelerinde antitümör aktivite göstermiştir (Afra vd., 2017).

Başka bir çalışmada, prodigiosin, meme kanseri hücreleri MDA-MB-231 ve MDA-MB-468'de sırasıyla 62,52 ve 261,2 nM IC50 değerleriyle antikanser ve antitümör özellikler göstermiş ve farelerde tümörü ortadan kaldırmadan meme tümörü büyümesini engellemiştir (Wang vd., 2016). Ayrıca, prodigiosinin akciğer ve rahim ağzı kanseri hücreleri A549'a (IC50 = 42,2 µM) ve HeLa hücrelerine (IC50 = 36,11 µM) karşı önemli sitotoksositeye sahip olduğu bildirilmiştir (Mukhia vd., 2024).

Curvularia soli AS21 ON076460 mantarının melanin pigmenti ürettiğini ve bu pigmentin insan meme (MCF-7) ve cilt kanseri hücre hatları (A431) üzerinde sırasıyla 84,23 ve 89,96 µg/mL IC50 değerleriyle sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Abd -EL-Aziz vd., 2024).

Marey vd., (2024) yaptıkları çalışmada klinik olarak ekstrakte edilen piyosiyenin, üçlü negatif meme kanseri hücre hattı (MDA- MB- 231), akciğer kanseri hücresi (A549) ve kolorektal adenokarsinom hücrelerine (Caco-2) karşı, hücrelerin koloni oluşumunu ve göç yeteneklerini baskılayarak, sırasıyla 105, 130 ve 187,9 µg/mL IC 50 değerlerinde konsantrasyona bağlı sitotoksik etkiler gösterdiği tespit edilmiştir (Marey vd., 2024).

Antioksidanlar, hücredeki serbest radikalleri ve ROS'u nötralize ederek antiinflamatuvar ve yaşlanma karşıtı rolleri açısından kapsamlı bir şekilde incelenmektedir. Antioksidanlar, yaşlanan cilt fenotiplerinin esas olarak UV radyasyonu tarafından aktive edilen ROS üretimine bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif stresten kaynaklanması nedeniyle erken yaşlanmayı yavaşlatmak için kullanılabilir.

Iwata vd., (2018) yaptıkları çalışmada, *Paracoccus carotinifaciens* bakterisinden elde edilen bir astaksantin türevi olan adonixanthin, hemorajik beyin hasarına karşı korumada astaksantine göre daha yüksek antioksidan ve antiinflamatuvar aktivite göstermiştir (Iwata vd., 2018).

Tao ve arkadaşlarını yaptığı baka bir çalışmada, oksidatif stresin neden olduğu kemik kaybının, oksidatif stres düzenlemesinden sorumlu bir faktör olan sirtuin-1 (SIRT1) sinyal yolunun modülasyonu yoluyla astaksantin tarafından inhibe edildiği ve osteoporoz tedavisinde alternatif bir yöntem sağladığı bildirilmiştir (Tao vd., 2024).

Violacein, UV-C kaynaklı hücresel hasara karşı, hücresel DNA hasarını inhibe ederek ve UV ışınlanması sonrası katalaz aktivitesini azaltarak koruyucu etki gösterir; buda, aksi takdirde DNA'ya zarar verecek ve katalaz aktivitesini artırarak sonuçta hücre ölümüne yol açacak olan ROS'u temizleme yeteneğini göstermektedir (Abboud ve Arment, 2013).

2.4. Kozmetik Endüstrisi

Mikrobiyal pigmentler, özellikle cilt bakım ürünleri olmak üzere kozmetiklerde farklı renk tonları için uygulanır. Örneğin, *Streptomyces bellus*'tan elde edilen ve muhtemelen kozmetik sektöründe en çok kullanılan pigment olan doğal melanin, biyo-dudak üretimi için kullanılır. Melanin pigmentleri ayrıca güneş kremlerinin ve güneş koruyucu içeren güzellik bakım ürünlerinin önemli bir bileşeni olarak kullanılır, çünkü bu pigment emilen UV ışığının yaklaşık %99'unu dağıtabilir *H. pluvialis*'ten elde edilen bir karotenoid olan astaksantin, epidermal hücrelerde melanini %40 oranında azaltarak cildin erken yaşlanmaya karşı korunmasına yardımcı olur. Bu nedenle astaksantin, güneş sonrası losyonların yeni bir temel bileşenidir. Astaksantin, likopen, β -karoten ve kantaksantin dahil olmak üzere karotenoid ailesi, antioksidan katkı özellikleri nedeniyle kozmetiklerle birlikte pazarlanmaktadır. Ayrıca, viyolasin, epidermis hücrelerine zarar vermeme veya hasara neden olmama özelliği nedeniyle, ter önleyiciler, rujlar, göz makyajı ve insan cildiyle uzun süre temas halinde kalması gereken tüm ürünler gibi kozmetik ürünler için önemli bir elementtir (Salvo vd., 2023).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Bu çalışmada kullanılan mikroorganizmalar “*Serratia marcescens*” ve “*Fusarium oxysporum*” olup, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu Laboratuvarı’ndan temin edilmiştir. Mikroorganizmalar deneyler öncesinde uygun besi yerlerinde aktive edilmiş ve kısa süreli olarak +4 °C’ de muhafaza edilmiştir.

3.2. Mikroorganizmaların Ekim ve Üretim Koşulları

3.2.1. Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması

Bu çalışmada stok fungus kültürlerinin üretimi için Patates Dekstroz Agar (PDA) kullanılmıştır. *F. oxysporum*’un oluşturduğu pigmentlerin incelenmesi amacıyla, Sabouraud Dekstroz Agar (SDA), Patates Dekstroz Agar (PDA) ve Czapek Agar besiyerleri kullanıldı. Hazırlanan besiyerleri 121°C’de, 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

S. marcescens bakterisinin üretimi için Nutrient Agar (NA) kullanılmıştır. Pigment üretiminin belirlenmesi amacıyla ise Luria–Bertani Broth (LB), Luria–Bertani Agar (LA), Nutrient Broth (NB) ve Nutrient Agar (NA) besiyerleri kullanılmıştır. Tüm besiyerleri 121 °C’de 15 dakika süreyle otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.2.2. *F. Oxysporum* Stoklarının Hazırlanması

F. oxysporum stok kültürleri PDA içeren petri kaplarında ve yatık agarda üretilmiş, 7 günlük kültürler +4 °C’ de muhafaza edilmiştir. Fungus, steril koşullar altında iğne uçlu öze yardımıyla petri ve yatık PDA yüzeyine inoküle edilmiştir. Kültürler 30 °C’ de 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası yatık agardaki kültürler steril distile su ile kazınarak süspansiyon haline getirilmiş ve 1 mL/50 mL oranında Patates Dekstroz Broth (PDB) besi yerine aktarılmıştır. Bu kültürler 30 °C’ de 150 rpm’ de çalkalamalı inkübatörde 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürler, steril koşullarda homojenizatör kullanılarak homojenize edilmiş ve elde edilen süspansiyon deneysel analizlerde kullanılmak üzere PDB besi yerine inoküle edilmiştir.

3.3. Fungal Pigmentlerin Sentezi ve Optimizasyon Çalışmaları

F. oxysporum'a ait pigment üretimini artırmak amacıyla farklı besiyeri ve üretim parametreleri optimize edilmiştir. Bu kapsamda, inkübasyon süresi (5, 10 ve 15gün), sıcaklık (10, 20, 25, 30 ve 40 °C), başlangıç pH'sı (4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0) ve çalkalama koşulları (statik, 50, 100, 150 ve 200 rpm) ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Her bir parametrenin pigment üretimi üzerindeki etkisi, diğer değişkenler sabit tutularak incelenmiş ve optimum koşullar belirlenmiştir. Tüm deneyler üç paralel olarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.3.1. Besiyeri Çeşidinin Belirlenmesi

Besi yeri tipinin *F. oxysporum*'un pigment üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, bölüm 3.2.2'de hazırlanan stok kültürlerden alınan örnekler Sabouraud Dekstroz Agar (SDA), Patates Dekstroz Agar (PDA) ve Czapek Agar besi yerlerine inoküle edilmiştir. Kültürler 30 °C' de 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan pigment üretimi makroskopik (renk oluşumu) gözlemlerle değerlendirilmiş ve en yüksek pigment üretiminin gözlendiği besiyerleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, sonraki optimizasyon çalışmalarına PDA ve PDB besiyerleri kullanılarak devam edilmiştir.

3.3.2. Fungal Pigmentlerin Sentezine Sıcaklığın Etkisi

Fungal pigment üretimi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla, daha önce optimum olduğu belirlenen uygun besiyerinde farklı sıcaklıklarda (10, 20, 25, 30 ve 40 °C) inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. Kültürler belirlenen sıcaklıklarda uygun süre boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan pigment üretimi makroskopik (renk oluşumu) gözlemlerle değerlendirilmiş ve en yüksek pigment üretiminin gözlendiği besiyerleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek pigment üretiminin 25 °C' de gerçekleştiği belirlenmiştir.

3.3.3. Fungal Pigmentlerin Sentezine Çalkalama Koşullarının Etkisi

Fungal pigment üretimi üzerine çalkalama hızının etkisini belirlemek amacıyla, farklı çalkalama koşullarında (statik, 50, 100, 150 ve 200 rpm) kültürler hazırlanmıştır. Bu amaçla her bir koşul için ayrı erlenlerde *F. oxysporum* kültürleri oluşturulmuştur. Hazırlanan kültürler optimum olduğu belirlenen sıcaklıkta (25 °C) 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerin pigment oluşumu makroskopik olarak (renk yoğunluğu)

değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek pigment üretiminin 150 rpm çalkalama hızında gerçekleştiği belirlenmiştir.

3.3.4. Fungal Pigmentlerin Sentezine Başlangıç pH'sının Etkisi

Fungal pigment üretimi üzerine başlangıç pH'ının etkisini belirlemek amacıyla, bölüm 3.2.2'de hazırlanan stok kültürler kullanılmıştır. Yatık agardaki kültürler steril distile su ile kazınarak süspansiyon haline getirilmiş ve 1 mL/50 mL oranında Patates Dekstroz Broth (PDB) besiyerine inoküle edilmiştir. PDB besiyerlerinin başlangıç pH değerleri 0.1 N HCl ve 0.1 N NaOH kullanılarak pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan kültürler optimum sıcaklık (25 °C) ve optimum çalkalama koşullarında (150 rpm) 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerdeki pigment oluşumu makroskopik olarak (renk yoğunluğu) değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek pigment üretiminin pH 9.0'da gerçekleştiği belirlenmiş ve diğer optimizasyon çalışmalarına bu koşulda devam edilmiştir.

3.3.5. Fungal Pigmentlerin Sentezine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Fungal pigment üretiminde optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi amacıyla kültürler, optimum sıcaklık (25 °C), optimum çalkalama koşulu (150 rpm) ve optimum başlangıç pH'ı (pH 9.0) altında inkübe edilmiştir. Bu kapsamda pigment üretimi 1–15 gün aralığında günlük olarak takip edilmiştir. Pigment oluşumu makroskopik olarak (renk yoğunluğu) değerlendirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda fungal biyokütle miktarı filtrasyon yöntemi ile belirlenmiş ve elde edilen biyokütle 45 °C'de 24 saat kurutularak kuru ağırlık cinsinden ifade edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre optimum pigment üretiminin gerçekleştiği inkübasyon süresi belirlenmiştir.

3.3.6. Karanlık Ve Aydınlik İnkübasyon Koşullarının *F. Oxysporum*' Un Pigment Üretimine Etkisi

Karanlık ve aydınlık inkübasyon koşullarının pigment üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, *F. oxysporum* kültürleri PDB besiyerine inoküle edilmiştir. Aydınlik koşullarda inkübe edilecek kültürler normal ışıık altında, karanlık koşullarda inkübe edilecek kültürler ise alüminyum folyo ile sarılarak ışıık geçirmeyecek şekilde hazırlanmıştır. Tüm kültürler optimum koşullarda (25 °C, 150 rpm) 7 gün süreyle inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda kültürlerdeki pigment oluşumu makroskopik olarak (renk yoğunluğu) değerlendirilmiştir. Fungal üreme miktarı ise biyokütle tayini ile belirlenmiş ve

sonuçlar karşılaştırılarak ışık koşullarının pigment üretimi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

3.4. Optimum Koşullarda *F. oxysporum*' un reme Potansiyelinin llmesi

F. oxysporum kültürleri optimum koşullarda (25 C, 150 rpm) PDB besiyerinde 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda kültürler Whatman No:1 filtre kğıdı kullanılarak vakum altında szlmştir. Elde edilen fungal biyoktle 45 C' de 24 saat süreyle etüvde kurutulmuş ve sabit ağırlığa ulaştıktan sonra hassas terazide tartılmıştır. Fungal reme miktarı, elde edilen kuru biyoktle ağırlığı (g/L) cinsinden ifade edilmiştir.

3.5. *F. oxysporum*' un Optimum Koşullarda Pigment üretiminin llmesi

Optimum koşullarda (25 C, 150 rpm, pH 9.0) inkübe edilen *F. oxysporum* kültürlerinden elde edilen pigment miktarı spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Inkübasyon sonunda kültürler Whatman No:1 filtre kğıdından szlp kalan peletler hassas terazide tartılarak biyoktleye 1:5 (g/MI) oranında etil asetat eklendi. Daha sonra ultrasonik banyoda 40 C' de 15 dakika tutularak sıvı kısmı analizlerde kullanılmıştır. Pigment içeriği uygun dalga boyunda (λ_{max}) spektrofotometrede ölçülmüş ve absorbans değerleri kaydedilmiştir.

3.6. Optimum Koşullarda retilen Fungal Pigmentlerin Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması

Optimum koşullarda üretilen fungal pigmentin besiyerinden ekstraksiyonunda öncelikle *F. oxysporum*'u besiyerinden ayırmak amacıyla vakum altında Whatman No:1 filtre kğıdından szld. Filtrasyon sonrası elde edilen pelet, hassas terazide tartıldı. Tartım sonrası 1:5 (v:v) oranında etil asetat ilave edilmiştir. Bu muameleden sonra ultrasonik banyoda 40 C' de 15 dakika tutularak hücre ve misellerdeki pigmentler sıvı kısma (etil asetat) geçmiştir. Aynı işlemler Whatman No:1 filtre kğıdından szlrek elde edilen funguslar için yapıldı.

3.7. Optimum Koşullarda *F. oxysporum*' dan üretilen Fungal Pigmentlerin Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi

Antimikrobiyal etkinin ölçülmesi için bölüm 3.6' da elde edilen ve etil asetatlı sıvı fungal pigmentler elde edilmiştir. *F. oxysporum* pigment özütünün çeşitli mikroorganizmalara (*Bacillus subtilis*, *Bacillus spizizeni*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*

aureus, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans*) karşı antimikrobiyal etkisini belirlemek için disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Hazırlanan Mueller- Hinton agarlar kuruduktan sonra belirlenen mikroorganizmalardan 100 µl aşılılarak, tüm yüzeye yayılmıştır. Daha sonra 20 µl pigment emdirilmiş diskler belirli aralıklarda petri kabına yerleştirilerek 24 saat 37 °C’ de inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol olarak bakteriler için Gentamisin, maya için ise Amfoterisin B diskleri kullanılmıştır. Negatif kotrol olarak etil asetat kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda disklerin etrafındaki inhibisyon zon çapları dijital kumpas ile mm cinsinden ölçülerek 3 tekrarlı elde edilen bulguların istatistiksel olarak ortalaması alınmıştır.

3.8. Optimum Koşullarda *F. oxysporum*’dan Üretilen Pigmentlerin Karakterizasyonu

Optimum koşullarda elde edilen fungal pigmentlerin karakterizasyonu amacıyla UV-Visible spektrofotometresi, Fourier Transform Infrared (FT-IR) spektroskopisi, Gaz Kromatografisi–Kütle Spektrometresi (GC-MS) ve Nükleer Manyetik Rezonans Spektrofotometresi (NMR) analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.8.1. *F. oxysporum*’dan Üretilen Pigmentlerin UV-Visible Spektrofotometrik Analizi

Bölüm 3.6’ da elde edilen pigment ekstraktlarının absorbans değerleri Shimadzu UV-1800 spektrofotometresi kullanılarak 300–800 nm dalga boyu aralığında ölçülmüştür. Maksimum absorbans değeri (λ_{max}) belirlenerek pigment karakterizasyonunda kullanılmıştır. Analizler etil asetata karşı gerçekleştirilmiştir.

3.8.2. *F. oxysporum*’dan Üretilen Pigmentlerin FT-IR Analizi

Fungal pigmentlerin fonksiyonel gruplarının belirlenmesi amacıyla FT-IR analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizler İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (İBTAM) bünyesinde hizmet alımı yoluyla yapılmıştır. Spektrumlar 4000–400 cm^{-1} dalga sayısı aralığında kaydedilmiş ve elde edilen pikler ilgili fonksiyonel gruplar açısından değerlendirilmiştir.

3.8.3. *F. oxysporum*’dan Üretilen Pigmentlerin GC-MS Analizi

Fungal pigmentlerin bileşenlerinin belirlenmesi amacıyla Gaz Kromatografisi–Kütle Spektrometresi (GC-MS) analizi gerçekleştirilmiştir. Analizler İnönü Üniversitesi Bilimsel

ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (İBTAM) bünyesinde hizmet alımı yoluyla yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlar ve kütle spektrumları, kütüphane veritabanları (NIST) ile karşılaştırılarak bileşenlerin tanımlanması yapılmıştır.

3.8.4. *F. oxysporum*’dan Üretilen Pigmentlerin NMR Analizi

Nükleer manyetik rezonans (NMR) organik moleküllerin yapı ve kimyasal özellikleri hakkında bilgi veren bir spektroskopik bir yöntemdir. Fungal pigmentlerin yapısının belirlenmesi amacıyla İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (İBTAM) bünyesinde hizmet alımı yoluyla yapılmıştır.

3.9. *S. marcescens* Stoklarının Hazırlanması

S. marcescens stok kültürleri Luria–Bertani Agar (LA) içeren petri kaplarına inoküle edilmiş ve 24 saat 28 °C’ de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası elde edilen taze kültürler kısa süreli kullanım için +4 °C’ de muhafaza edilmiştir. Tüm işlemler aseptik koşullar altında gerçekleştirilmiştir.

3.10. Bakteriyel Pigmentlerin Sentezi ve Optimizasyon Çalışmaları

S. marcescens’e ait prodigiosin pigmentinin üretimini artırmak amacıyla farklı üretim parametreleri optimize edilmiştir. Bu kapsamda inkübasyon süresi (24, 48, 72, 96, 120, 144 ve 168 saat), sıcaklık (10, 20, 25, 30 ve 40 °C), başlangıç pH’sı (4.0–9.0 aralığında) ve çalkalama koşulları (statik, 50, 100, 150 ve 200 rpm) ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Her bir parametrenin pigment üretimi üzerindeki etkisi, diğerk değişkenler sabit tutularak incelenmiş ve optimum koşullar belirlenmiştir.

3.10.1. Besiyeri Çeşidinin Belirlenmesi

Farklı besiyerlerinin prodigiosin pigment üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, *S. marcescens* kültürleri Nutrient Agar (NA) ve Luria–Bertani Agar (LA) besiyerlerine inoküle edilmiştir. İnkübe edilen kültürler 28 °C ve 37 °C’ de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda pigment oluşumu makroskopik olarak (renk yoğunluğu) değerlendirilmiş ve en yüksek pigment üretiminin gözleendiğı besiyeri ve sıcaklık koşulları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, 37 °C’ de inkübe edilen kültürlerde pigment oluşumu gözlenmezken, 28 °C’ de her iki besiyerinde de pigment üretimi gerçekleşmiştir. Bununla birlikte, 28 °C’ de Luria–Bertani Agar (LA) besiyerinde elde edilen pigment üretiminin, Nutrient Agar (NA) besiyerine kıyasla daha yüksek olduğı

belirlenmiştir. Bu doğrultuda, sonraki optimizasyon çalışmalarına Luria–Bertani besiyeri ve 28 °C inkübasyon koşulları kullanılarak devam edilmiştir.

3.10.2. Bakteriyel Pigment Üretimine Sıcaklığın Etkisi

Prodigiosin pigment üretimi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla, *S. marcescens* kültürleri en yüksek pigment üretiminin gözlemlendiği LB besiyerine inoküle edilmiştir. Kültürler farklı sıcaklıklarda (10, 20, 25, 30 ve 40 °C) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerde ki pigment oluşumu makroskopik olarak (renk yoğunluğu) değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek pigment üretiminin 20 °C’ de gerçekleştiği belirlenmiştir.

3.10.3. Prodigiosin Üretimine Çalkalama Koşullarının Etkisi

Prodigiosin üretimi üzerine çalkalama koşullarının etkisini belirlemek amacıyla, *S. marcescens* kültürleri farklı çalkalama hızlarında (statik, 50, 100, 150 ve 200 rpm) hazırlanmıştır. Kültürler, optimum olduğu belirlenen sıcaklıkta (20 °C) LB besiyerinde 96 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerde ki pigment oluşumu makroskopik olarak (renk yoğunluğu) değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek pigment üretiminin statik koşullarda gerçekleştiği belirlenmiştir.

3.10.4. Prodigiosin Üretimine Başlangıç pH’ının Etkisi

Başlangıç pH’ının prodigiosin üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla LB besi yerleri pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0 olacak şekilde 0.1 N HCl ve 0.1 N NaOH kullanılarak ayarlanmıştır. Hazırlanan besi yerlerine *S. marcescens* kültürleri inoküle edilmiş ve optimum olduğu belirlenen koşullarda (20 °C, statik) 96 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerde ki pigment oluşumu makroskopik olarak (renk yoğunluğu) değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek pigment üretiminin pH 5.0’te gerçekleştiği belirlenmiş ve sonraki optimizasyon çalışmalarına bu koşulda devam edilmiştir.

3.10.5. Pigment Üretimine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Prodigiosin üretiminde optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi amacıyla *S. marcescens* kültürleri, optimum koşullarda (20 °C, statik) LB besiyerinde inkübe edilmiştir. Bu kapsamda pigment üretimi 24–168 saat (1–7 gün) aralığında, 24 saatlik periyotlarla takip edilmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında alınan örnekler 9000 rpm’ de, +4 °C’de 10 dakika

süreyle santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatantların pigment içeriği spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Ayrıca pigment oluşumu makroskobik olarak (renk yoğunluğu) değerlendirilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca bakteri büyümesi 600 nm’de optik yoğunluk (OD₆₀₀) ölçümleri ile izlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek pigment üretiminin 96. saatte (4. gün) gerçekleştiği belirlenmiştir.

3.11. Optimum Koşullarda *S. marcescens*’in Üreme Potansiyelinin Ölçülmesi

S. marcescens’in üreme potansiyeli, optimum koşullarda (20 °C, statik) LB besiyerinde inkübe edilen kültürlerde belirlenmiştir. Bu amaçla bakteri büyümesi 1–7 gün boyunca günlük olarak takip edilmiştir. Her gün alınan örneklerde bakteri yoğunluğu 600 nm’de optik yoğunluk (OD₆₀₀) ölçümleri ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Elde edilen OD₆₀₀ değerleri bakteriyel büyümenin zamana bağlı değişimini değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır.

3.12. *S. marcescens*’in Optimum Koşullarda Pigment Üretiminin Ölçülmesi

S. marcescens kültürleri, optimum koşullarda (20 °C, statik) LB besiyerinde 1–7 gün süreyle inkübe edilmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında alınan örnekler 9000 rpm’de, +4 °C’ de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen peletler toplanmış ve pigment ekstraksiyonu amacıyla üzerine 1:2 (v/v) oranında %96 etanol ilave edilmiştir. Karışım, pigment tamamen çözünene kadar yaklaşık 10 dakika süreyle ultrasonik su banyosunda tutulmuştur. Elde edilen etanol–pigment çözeltisi tekrar 9000 rpm’ de, +4 °C’ de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve üst faz toplanmıştır. Süpernatant 0.22 µm membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Süpernatanttaki pigment miktarı spektrofotometrik olarak 535 nm dalga boyunda ölçülmüş ve maksimum pigment üretimi belirlenmiştir.

3.13. Optimum Koşullarda Üretilen Prodigiosin Pigmentinin Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması

Optimum koşullarda üretilen prodigiosin pigmentinin ekstraksiyonu amacıyla, *S. marcescens* kültürleri 9000 rpm’ de, +4 °C’ de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek hücre biyokütlesi besiyerinden ayrılmıştır. Elde edilen peletler pigment ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Peletler üzerine 1:2 (v/v) oranında %96 etanol ilave edilmiş ve karışım, pigment tamamen çözünene kadar yaklaşık 10 dakika süreyle ultrasonik su banyosunda sonifiye edilmiştir. Ardından örnekler tekrar 9000 rpm’ de, +4 °C’ de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek süpernatant toplanmıştır. Elde edilen pigment ekstraktlarının absorbans

değerleri spektrofotometrik olarak 300–800 nm dalga boyu aralığında taranmış ve maksimum absorpsiyon dalga boyu (λ_{max}) belirlenmiştir. Daha sonra süpernatantlar 20 mL olacak şekilde petrilere dökülerek 45 °C de pastör fırınında 24 saat kurutuldu. Kurutulan pigmentler oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Elde edilen ekstraktlar analizlere kadar +4 °C’ de muhafaza edilmiştir.

3.14. Optimum Koşullarda *S. marcescens*’den Üretilen Prodigiosin Pigmentinin Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi

Antimikrobiyal etkinin belirlenmesi amacıyla etil alkolle ekstrakte edilen prodigiosin pigment özütü 0.22 µm membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Pigment özütünün çeşitli mikroorganizmalara (*B. subtilis*, *B. spizizeni*, *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *K. aerogenes*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans*) karşı antimikrobiyal etkisini belirlemek için disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Hazırlanan Mueller- Hinton besiyerlerine belirlenen mikroorganizmalardan 100 µL aşlanarak, tüm yüzeye yayılmıştır. Daha sonra 20 µL pigment emdirilmiş diskler belirli aralıklarda petri kabına yerleştirilerek 24 saat 37 °C’ de inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol olarak bakteriler için Gentamisin, maya için ise Amfoterisin B diskleri kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak %96 etanol kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda disklerin etrafındaki inhibisyon zon çapları dijital kumpas ile mm cinsinden ölçülerek 3 tekrarlı elde edilen bulguların ortalaması alınmıştır.

3.15. Optimum Koşullarda *S. marcescens*’den Üretilen Prodigiosin Pigmentinin Karakterizasyonu

Optimum koşullarda elde edilen prodigiosin pigmentlerinin karakterizasyonu amacıyla UV-Visible spektrofotometresi, Fourier Transform Infrared (FT-IR) spektroskopisi ve Gaz Kromatografisi–Kütle Spektrometresi (GC-MS) analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.15.1. *S. marcescens*’den Üretilen Pigmentlerin UV-visible Spektrofotometrik Analizi

Elde edilen pigment ekstraktlarının absorbans değerleri Shimadzu UV-1800 spektrofotometresi kullanılarak 300–800 nm dalga boyu aralığında ölçülmüştür. Analizler, pigmentlerin uygun çözücülerde (etanol ve distile su) hazırlanmış çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Maksimum absorpsiyon dalga boyu (λ_{max}) belirlenmiş ve pigment karakterizasyonunda kullanılmıştır.

3.15.2. *S. marcescens*'den Üretilen Pigmentlerin FT-IR Analizi

Bakteriyel pigmentlerin fonksiyonel gruplarının belirlenmesi amacıyla Fourier Transform Infrared (FT-IR) analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizler, İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (İBTAM) bünyesinde hizmet alımı yoluyla yapılmıştır. Spektrumlar 4000–400 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında kaydedilmiş ve elde edilen pikler ilgili fonksiyonel gruplar açısından değerlendirilmiştir.

3.15.3. *S. marcescens*' den Üretilen Pigmentlerin GC-MS Analizi

Bakteriyel pigmentlerin kimyasal bileşenlerinin belirlenmesi amacıyla Gaz Kromatografisi–Kütle Spektrometresi (GC-MS) analizi gerçekleştirilmiştir. Analizler, İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (İBTAM) bünyesinde hizmet alımı yoluyla yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlar ve kütle spektrumları, kütüphane veritabanları (NIST) ile karşılaştırılarak bileşenlerin tanımlanması yapılmıştır.

3.16. Elde Edilen Prodigiosin Pigmentinin Endüstriyel Uygulamaları

3.16.1. Un-tuz Bazlı Model Hamur Matriksinde Renklendirme Denemesi

Bu amaç doğrultusunda öncelikle 60 g un, 30 g tuz, 5 mL sıvı yağ ve 50 mL su kullanılarak laboratuvar koşullarında model oyun hamuru hazırlanmıştır. Elde edilen hamurlar 5 gramlık örnekler halinde ayrılmış ve bu örneklerle prodigiosin pigmenti %100, %75, %50 ve %25 oranlarında ilave edilmiştir. Bu örnekler homojen bir yapı elde edilinceye kadar karıştırılmıştır. Ardından hazırlanan hamur örnekleri, mikrodalga fırında 100 °C sıcaklıkta 1 dakika süreyle ısıtılma işlemi tabi tutulmuştur. Isıtılma işlemi sonrasında katılaştıran örneklerin renk stabilitesi ve olası renk değişimleri bir hafta boyunca gözlemlenmiştir.

3.16.2. Ön Boyama/ Renklendirme Denemesi

Bu çalışmada, elde edilen ve prodigiosin pigmentlerinin, kumaşa boyar madde olarak kullanımının araştırılması amaçlanmıştır. %100, %75, %50 ve %25 oranlarda prodigiosin pigmentini 5 cm'lik parçalar halinde hazırladığımız tülbent kumaşlara uyguladık. 24 saat beklettikten sonra boyanmış olan kumaşlar 30 saniye kadar %10'luk sirkeli suda kaynatılmış ve boyanın kumaşa tutunması sağlanmıştır. Kaynatma işleminin ardından kumaşlar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

3.16.3. Ön Formülasyon Denemesi

Bu çalışmada, elde edilen prodigiosin pigmentinin kozmetikte kullanımının ortaya konması amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan 2 mL prodigiosin pigmenti şeffaf dudak renklendiricisine uygulanmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *F. oxysporum*'da Pigment Üretim Koşullarının Optimizasyonu

Bu çalışmada, *F. oxysporum*'da pigment üretimini etkileyen çevresel ve kültürel parametrelerin belirlenmesi amacıyla çeşitli optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Fungal pigmentlerin üretimi; besiyeri kompozisyonu, sıcaklık, pH, inkübasyon süresi gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Bu parametrelerin her biri, mikroorganizmanın primer ve sekonder metabolizması üzerinde doğrudan etkili olup pigment sentez verimini belirleyen kritik değişkenlerdir.

Fungal pigmentler çoğunlukla sekonder metabolit grubuna ait bileşikler olup, üretimleri genellikle çevresel stres koşullarında artış göstermektedir. Bu nedenle optimum pigment üretim koşulları, çoğu zaman maksimum biyokütle üretim koşullarından farklılık göstermektedir (Dufossé, 2006; Mapari vd, 2005).

Bu kapsamda çalışmada; besi yeri çeşidi, sıcaklık, çalkalama hızı, pH ve inkübasyon süresinin pigment üretimi üzerine etkileri ayrı ayrı incelenmiş ve elde edilen bulgular literatür verileri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

4.1.1. Besiyeri Çeşidinin Pigment Üretimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Fungal pigment üretiminin besi yeri kompozisyonuna bağlı olarak değişiklik gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışmada, *F. oxysporum*'un pigment üretimi üzerine besi yeri çeşidinin etkisini belirlemek amacıyla SDA, PDA ve Czapek agar besi yerlerinde 30 °C'de 7 gün süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1.).

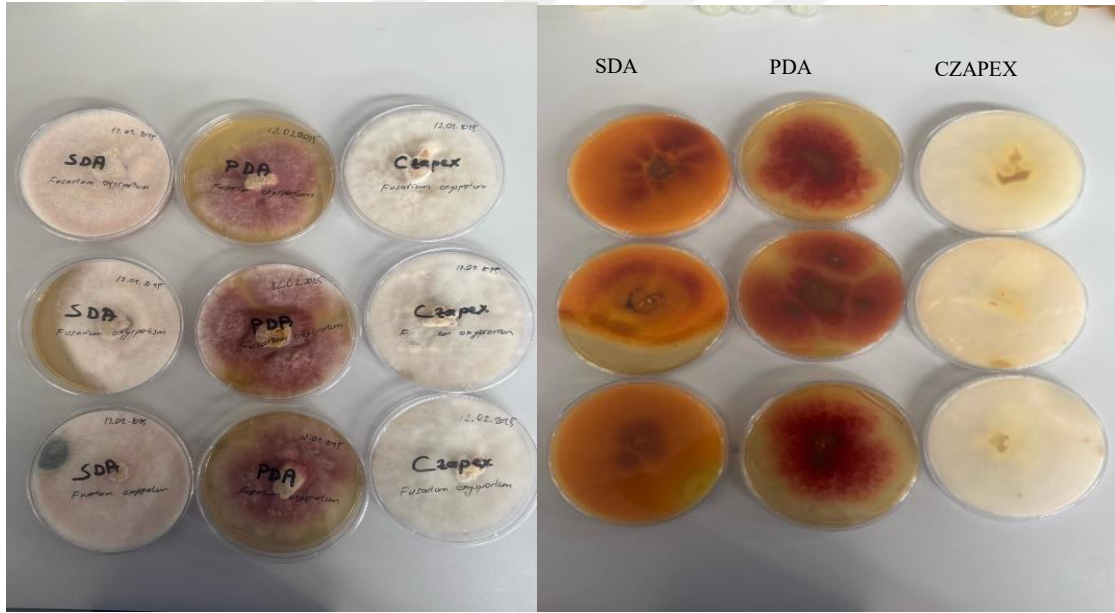
İnkübasyon sonrasında yapılan morfolojik gözlemler, pigment üretiminin besiyeri türüne bağlı olarak belirgin farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. En yoğun pigment oluşumu PDA besi yerinde gözlenirken, SDA ve Czapek agar ortamlarında pigment üretiminin daha sınırlı olduğu belirlenmiştir. PDA besi yerinde gelişen kültürlerde kırmızımsı-mor ve vişne tonlarında belirgin pigmentasyon gözlenmiştir.

Bu farklılıkların besi yeri bileşimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. PDA besiyeri, kompleks karbon kaynakları ve nispeten düşük azot içeriği ile sekonder metabolit üretimini teşvik eden bir ortam sağlamaktadır. Buna karşılık SDA besi yerinin yüksek azot içeriği, mikroorganizmanın metabolizmasını primer büyüme yönünde destekleyerek pigment üretimini baskılamaktadır. Benzer şekilde Czapek agar besi yerinde ise daha tanımlı ve sınırlı besin içeriği, pigment üretiminin düşük düzeyde gerçekleşmesine neden olmuştur.

Fungal pigmentlerin büyük çoğunluğu sekonder metabolit grubuna ait olup, üretimleri karbon/azot oranı (C/N) ile yakından ilişkilidir. Karbonca zengin ve azotça sınırlı ortamlarda sekonder metabolit sentezinin arttığı birçok çalışmada rapor edilmiştir (Dufossé, 2006; Mapari vd., 2005). Bu bağlamda elde edilen bulgular, PDA besiyerinin *F. oxysporum*'da pigment üretimi açısından daha uygun bir ortam sağladığını göstermektedir.

Literatürde de benzer şekilde, filamentöz funguslarda kompleks karbon kaynakları içeren ortamlarda pigment üretiminin arttığı, buna karşılık yüksek azot içeriğine sahip ortamlarda sekonder metabolit üretiminin baskılandığı bildirilmektedir (Velmurugan vd., 2010; Dufossé vd., 2014). Bu durum, pigment üretiminin mikroorganizmanın besin ortamına verdiği metabolik yanıtla doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgular, *F. oxysporum*'da pigment üretiminin besi yeri kompozisyonuna yüksek derecede bağımlı olduğunu ortaya koymuş ve PDA besi yerinin pigment üretimi için en uygun ortam olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.1. SDA, PDA ve Czapek agar besiyerlerinde üretilen *F. oxysporum* fungusunun petri görünümü

4.1.2. Fungal Pigment Üretimine Sıcaklığın Etkisi

Fungal pigment üretimi üzerinde sıcaklık önemli bir çevresel faktör olup hem mikroorganizmanın büyümesini hem de sekonder metabolit sentezini doğrudan etkilemektedir. Bu çalışmada, *F. oxysporum*'da pigment üretimi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla 10 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C ve 40 °C sıcaklıklarda inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre en yüksek pigment üretiminin 25 °C’de gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 4.2). Daha düşük sıcaklıklarda (10–20 °C) pigment üretiminin sınırlı olduğu, yüksek sıcaklıklarda (30–40 °C) ise pigment sentezinin belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir. Bu durum, fungal pigmentlerin çoğunlukla sekonder metabolit olmasından kaynaklanmaktadır. Sekonder metabolit üretimi genellikle optimum büyüme koşullarından farklı olarak, orta düzey stres koşullarında artış göstermektedir. Düşük sıcaklıklarda metabolik aktivitenin yavaşlaması pigment sentezi için yeterli uyarıyı oluşturmazken, yüksek sıcaklıklarda hücrel metabolizma büyüme yönünde yoğunlaşmakta ve sekonder metabolit üretimi baskılanmaktadır. Orta düzey sıcaklıklarda (özellikle 25 °C civarında) gözlenen yüksek pigment üretimi, hücrede oluşan kontrollü oksidatif stres ile ilişkilendirilmektedir. Bu koşullarda mitokondriyal aktiviteye bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) sınırlı düzeyde artması, sekonder metabolit biyosentezinden sorumlu gen kümelerinin aktivasyonunu tetiklemektedir. Bu süreçte özellikle poliketid sentaz (PKS) enzimleri aracılığıyla naftokinon ve poliketid kökenli pigmentlerin sentezi artmaktadır. Sentezlenen bu pigmentler, antioksidan özellikleri sayesinde hücreyi oksidatif hasara karşı koruyarak aynı zamanda hücrel redoks dengesinin sağlanmasında rol oynamaktadır.

Buna karşılık yüksek sıcaklıklarda aşırı ROS oluşumu ve protein denatürasyonu gibi olumsuz etkiler ortaya çıkmakta, hücrel metabolizma hayatta kalma yönünde değişmekte ve pigment üretimi baskılanmaktadır. Düşük sıcaklıklarda ise metabolik hızın azalmasına bağlı olarak hem ROS üretimi hem de sekonder metabolit sentezi sınırlı kalmaktadır.

Literatürde de fungal pigment üretiminin genellikle 20–28 °C aralığında maksimum seviyeye ulaştığı, 30 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda ise pigment sentezinin azaldığı veya baskılandığı bildirilmektedir (Dufossé vd., 2014; Velmurugan vd., 2010). *Fusarium* türleri ile yapılan çalışmalarda da benzer şekilde orta düzey sıcaklıkların poliketid kökenli pigment üretimini teşvik ettiği, yüksek sıcaklıkların ise primer metabolizmayı destekleyerek pigment üretimini sınırladığı rapor edilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgular, *F. oxysporum*’da pigment üretiminin sıcaklığa yüksek derecede bağımlı olduğunu ve optimum pigment üretimi için 25 °C’nin en uygun sıcaklık olduğunu göstermektedir. Bu durum, sekonder metabolit üretiminin çevresel stres faktörleri ile ilişkili olduğunu ortaya koyan literatür bulguları ile uyumludur.

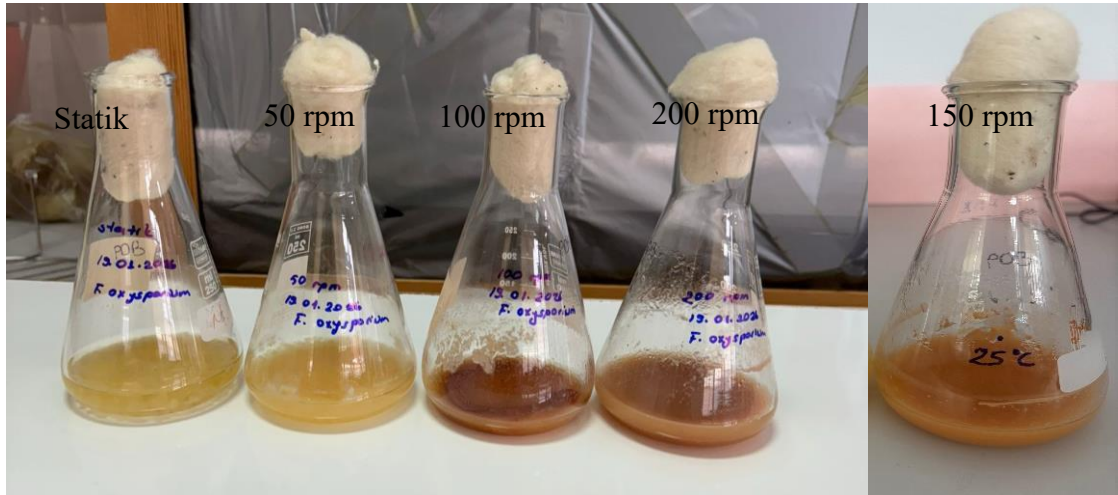


Şekil 4.2. Farklı sıcaklıklarda üretilen *F. oxysporum*'un pigment sentezi

4.1.3. Fungal Pigment Üretimine Çalkalamanın Etkisi

Fungal pigment üretimi üzerinde çalkalama hızı, ortamın aerasyonu, oksijen transferi ve besin maddelerinin homojen dağılımını etkileyen önemli bir parametredir. Bu çalışmada, *F. oxysporum*'da pigment üretimi üzerine çalkalama hızının etkisini belirlemek amacıyla 50 rpm, 100 rpm, 150 rpm, 200 rpm ve statik koşullarda inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre en yüksek pigment üretiminin 150 rpm çalkalama hızında gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 4.3). 100 rpm'de pigment üretiminin arttığı ancak maksimum seviyeye ulaşmadığı, 200 rpm'de ise pigment üretiminin devam etmesine rağmen renk yoğunluğunun ve absorbans değerlerinin azaldığı gözlenmiştir. Statik ve 50 rpm koşullarında ise pigment üretiminin oldukça sınırlı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.3. Farklı çalkalama koşullarında üretilen *F. oxysporum*'un pigment sentezi

Bu durum, çalkalama hızının oksijen transferi üzerindeki etkisi ile açıklanabilmektedir. Statik koşullarda düşük oksijen transferi nedeniyle fungal metabolizma

daha çok primer büyüme yönünde ilerlemekte ve sekonder metabolit üretimi sınırlı kalmaktadır. Düşük çalkalama hızlarında (50 rpm) oksijen transferinde kısmi bir artış sağlansa da bu durum pigment sentezini maksimum düzeyde desteklemek için yeterli olmamaktadır.

Orta düzey çalkalama hızlarında (100–150 rpm) ise ortamda çözünmüş oksijen miktarının artması, sekonder metabolit biyosentezini teşvik etmektedir. Bu koşullarda pigment üretiminin artması, oksijen bağımlı metabolik yolların aktivasyonu ile ilişkilidir. Özellikle poliketid biyosentezinde görev alan enzim sistemlerinin oksijen varlığına duyarlı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle uygun aerasyon koşulları pigment üretimi açısından kritik bir rol oynamaktadır.

Buna karşılık yüksek çalkalama hızlarında (200 rpm) pigment üretiminde gözlenen azalma, artan mekanik stres ve hücresel yapının etkilenmesi ile açıklanabilmektedir. Yüksek çalkalama hızları, filamentöz funguslarda misel yapının parçalanmasına ve morfolojik değişimlere yol açabilmekte, bu durum ise sekonder metabolit üretimini olumsuz etkileyebilmektedir. Ayrıca yüksek aerasyon koşullarında oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı, pigment moleküllerinin oksidatif degradasyonuna neden olabilmektedir.

Literatürde de filamentöz funguslarda pigment üretiminin genellikle orta düzey çalkalama hızlarında (yaklaşık 100–150 rpm) maksimum seviyeye ulaştığı bildirilmektedir (Mapari vd., 2005; Dufossé vd., 2014). Bu durum, uygun oksijen transferinin sağlandığı ancak hücresel hasarın oluşmadığı koşullarda sekonder metabolit üretiminin artmasıyla açıklanmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgular, *F. oxysporum*'da pigment üretiminin çalkalama hızına bağlı olarak değiştiğini ve optimum pigment üretimi için 150 rpm çalkalama hızının en uygun koşul olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, pigment üretiminin oksijen transferi ve hücresel morfoloji ile yakından ilişkili olduğunu bildiren literatür verileri ile uyumludur.

4.1.4. Fungal Pigment Üretimine pH'nın Etkisi

Ortam pH'sı, fungal büyüme ve sekonder metabolit üretimini etkileyen temel çevresel faktörlerden biridir. Bu çalışmada, *F. oxysporum*'da pigment üretimi üzerine pH'nın etkisini belirlemek amacıyla pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 değerlerine ayarlanmış besiyerlerinde inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre pigment üretiminin pH 5.0 ve pH 9.0 koşullarında daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4). pH 5.0 ortamında pigment üretiminin özellikle

inkübasyonun erken dönemlerinde (3–4. günler) arttığı, ancak ilerleyen günlerde sınırlı kaldığı gözlenmiştir. Buna karşılık pH 9.0 ortamında pigment üretiminin daha geç dönemlerde (6–7. günler) artış gösterdiği ve daha yüksek seviyelere ulaştığı belirlenmiştir.



Şekil 4.4. Farklı pH koşullarında üretilen pigment sentezi

Bu durum, pH'nın fungal metabolizma üzerindeki düzenleyici etkisi ile açıklanabilmektedir. Asidik koşullar (pH 5.0), fungal büyüme için uygun bir ortam sağladığından pigment üretimi çoğunlukla biyokütle artışına paralel olarak gerçekleşmektedir. Buna karşılık alkali koşullarda (pH 9.0), hücre büyümesi kısmen sınırlanmakta ve oluşan stres koşulları sekonder metabolit üretimini teşvik etmektedir.

Alkali pH koşullarında gözlenen artmış pigment üretimi, hücrede oluşan metabolik stres ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı ile ilişkilendirilmektedir. Bu koşullar altında sekonder metabolit biyosentez yolları aktive olmakta ve özellikle quinon ve naftokinon türevi pigmentlerin sentezi artmaktadır. Bu pigmentler, antioksidan özellikleri sayesinde

hücreyi oksidatif strese karşı korumakta ve hücrel redoks dengesinin sağlanmasına katkıda bulunmaktadır.

Ayrıca alkali pH koşullarında sentezlenen pigmentlerin zamanla oksidatif değişime uğrayarak daha koyu renk tonlarına dönüştüğü gözlenmiştir. Bu durum, pigmentlerin oksidasyon ve polimerizasyon süreçleri ile ilişkilidir. Buna karşılık asidik pH koşullarında üretilen pigmentlerin daha açık renk tonlarında olması, fenolik ara ürünlerin ve daha az oksitlenmiş pigment yapıların baskın olmasından kaynaklanmaktadır.

Literatürde *F. oxysporum* ve diğer filamentöz funguslarda pigment üretiminin genellikle hafif asidik pH değerlerinde optimum olduğu bildirilmekle birlikte, bazı çalışmalarda alkali pH koşullarının sekonder metabolit üretimini artırdığı da rapor edilmiştir. Bu farklılıkların; kullanılan suş, besiyeri kompozisyonu ve inkübasyon süresi gibi faktörlere bağlı olarak değişebileceği belirtilmektedir (Dufossé vd., 2014; Mapari vd., 2005).

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgular, *F. oxysporum*'da pigment üretiminin pH'ya bağlı olarak değiştiğini ve özellikle alkali koşullarda sekonder metabolit üretiminin daha belirgin hale geldiğini göstermektedir. Bu durum, pigment üretiminin çevresel stres faktörleri ile ilişkili olduğunu ortaya koyan literatür bulguları ile uyumludur.

4.1.5. Fungal Pigment Üretimine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Fungal pigment üretimi, inkübasyon süresine bağlı olarak değişiklik gösteren önemli bir parametredir. Bu çalışmada, *F. oxysporum*'da pigment üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisini belirlemek amacıyla farklı sürelerde yapılan üretimler değerlendirilmiştir.

Elde edilen bulgulara göre pigment üretiminin inkübasyon süresine bağlı olarak belirli bir noktaya kadar arttığı ve daha sonra sabitlendiği veya azalma eğilimi gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4.5.). Özellikle inkübasyon süresinin ilerleyen dönemlerinde pigment üretiminin maksimum seviyeye ulaştığı belirlenmiştir.

Bu durum, fungal pigmentlerin çoğunlukla sekonder metabolit olmasından kaynaklanmaktadır. Sekonder metabolitler genellikle mikroorganizmanın logaritmik büyüme fazından sonra, özellikle durağan fazda sentezlenmektedir. Kültür ortamında besin maddelerinin azalması ve çevresel stres koşullarının oluşması, sekonder metabolizma yollarının aktive olmasına neden olmakta ve bu durum pigment üretiminin artışı ile sonuçlanmaktadır.

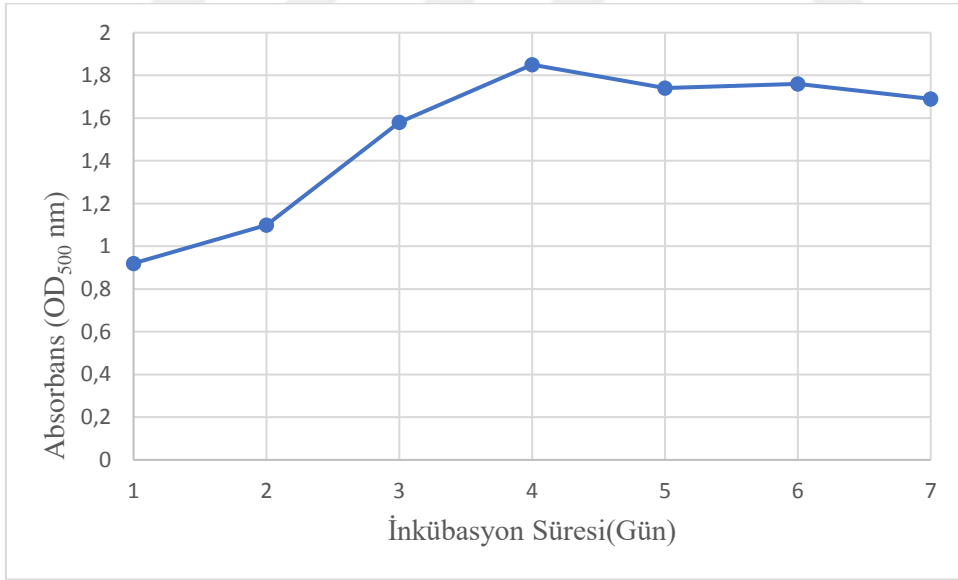
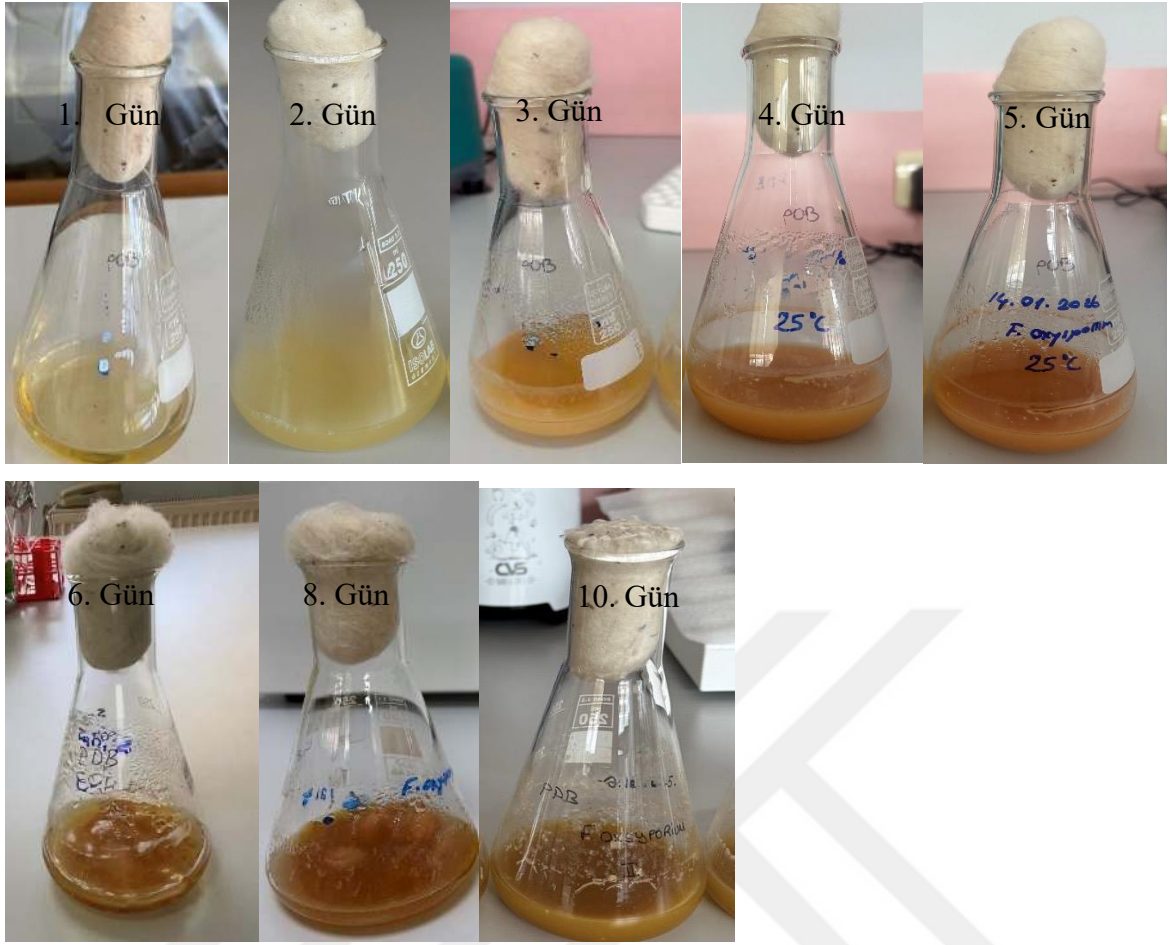
Pigment üretiminin inkübasyon süresi ile birlikte artmasının bir diğer nedeni, fungal gelişim ve sporulasyon süreçleri ile ilişkilidir. Birçok fungus türünde pigmentlerin, özellikle spor oluşturan yapılarda biriktiği ve kültürün gelişimine paralel olarak arttığı

bildirilmektedir. Bu nedenle kültürün ilerleyen fazlarında pigment üretiminde belirgin artış gözlenmektedir.

Bununla birlikte inkübasyon süresinin aşırı uzaması, pigment üretiminde azalmaya yol açabilmektedir. Uzun süreli inkübasyonlarda besin maddelerinin tükenmesi, metabolik aktivitenin azalması ve bazı pigmentlerin oksidatif degradasyonu pigment miktarının düşmesine neden olabilmektedir.

Literatürde fungal pigment üretiminin inkübasyon süresi ile doğrudan ilişkili olduğu ve genellikle belirli bir süreye kadar artış gösterdiği bildirilmektedir. Özellikle pigment üretiminin durağan fazda maksimum seviyeye ulaştığı ve daha uzun inkübasyon sürelerinde azalma eğilimi gösterdiği çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (Arikan vd., 2020; Elattaapy & Selim, 2020). *F. oxysporum* ile yapılan çalışmalarda ise bikaverin gibi pigmentlerin üretiminin belirli bir inkübasyon süresinde maksimum seviyeye ulaştığı ve bu sürenin fermentasyon koşullarına bağlı olarak değişebildiği belirtilmiştir (Mendonça vd., 2021; Al-Sa'ady vd., 2023).

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgular, *F. oxysporum*'da pigment üretiminin inkübasyon süresine bağlı olarak değiştiğini ve pigment üretiminin özellikle kültürün ileri gelişim evrelerinde maksimum seviyeye ulaştığını göstermektedir. Bu durum, pigment üretiminin sekonder metabolizma ile ilişkili olduğunu ortaya koyan literatür bulguları ile uyumludur.



Şekil 4.5. *F. oxysporum* 'un inkübasyon süresine bağlı pigment üretimi ve erlendeki görünümleri

4.1.6. Karanlık Ve Aydınlik İnkübasyon Koşullarının *F. oxysporum*'un Pigment Üretimine Etkisi

Işık, fungal metabolizma üzerinde etkili olan önemli çevresel faktörlerden biri olup, özellikle sekonder metabolit üretimi üzerinde düzenleyici rol oynamaktadır. Bu çalışmada, *F. oxysporum*'un pigment üretimi üzerine karanlık ve aydınlık inkübasyon koşullarının etkisi değerlendirilmiştir. Karanlık ve aydınlık inkübasyon koşullarında *F. oxysporum*'da pigment üretimi karşılaştırıldığında, aydınlık koşullarda belirgin şekilde daha yoğun ve koyu renkli pigment oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.6). Karanlık ortamda ise pigment üretiminin daha sınırlı kaldığı ve ortam renginin daha açık sarı–turuncu tonlarda olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, ışığın *Fusarium* türlerinde pigment biyosentezini uyarıcı bir çevresel faktör olduğunu göstermektedir. Literatürde, *Fusarium* türlerinin karotenoidler ve poliketid yapılı pigmentler (örneğin bikaverin ve fusarubin türevleri) üretebildiği ve bu bileşiklerin sentezinin ışıkla regüle edildiği bildirilmiştir. Özellikle ışığın, fungal hücrelerde sekonder metabolizma ile ilişkili genlerin ekspresyonunu artırarak pigment üretimini teşvik ettiği ifade edilmektedir. Bu durum, ışığa duyarlı fotoreseptör sistemlerinin aktivasyonu ile açıklanmakta olup, aydınlık koşullarda pigment yoğunluğunun artmasıyla uyumludur. Yapılan benzer çalışmalarda da *Fusarium* türlerinde karotenoid biyosentezinin ışık varlığında arttığı, karanlık koşullarda ise bu yolların baskılandığı gösterilmiştir (Avalos & Limón, 2015). Benzer şekilde, bikaverin gibi kırmızı pigmentlerin üretiminin de çevresel faktörlerden, özellikle ışık ve pH'dan önemli ölçüde etkilendiği rapor edilmiştir (Medentsev et al., 2005). Elde edilen bu bulgular, literatürle de paralellik göstermekte olup, aydınlık inkübasyonun *F. oxysporum*'da pigment üretimini artırdığı ve sekonder metabolit sentezini teşvik ettiği sonucunu desteklemektedir.



Şekil 4.6. Karanlık ve aydınlık inkübasyon koşullarında *F. oxysporum*'da pigment üretimi

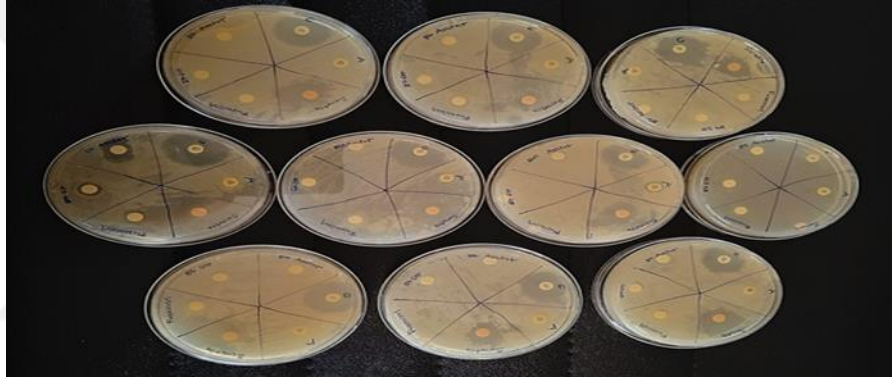
4.2. Fungal Pigmentlerin Antimikrobiyal Aktivitesinin Değerlendirilmesi

F. oxysporum'dan elde edilen pigmentlerin antimikrobiyal aktivitesi değerlendirildiğinde, ekstraktın bazı mikroorganizmalar üzerinde düşük–orta düzeyde ve seçici bir inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. Pigment ekstraktı özellikle *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* ve *K. aerogenes* üzerinde sınırlı inhibisyon zonları oluştururken, *E. coli*, *E. faecalis* ve *K. pneumoniae* üzerinde etkisiz kalmıştır (Çizelge 4.1.; Şekil 4.7.). Bu durum, fungal pigmentlerin mikroorganizmalara karşı seçici etki gösterebildiğini ortaya koymaktadır. Gram pozitif bakterilerde gözlenen etkinliğin Gram negatiflere kıyasla daha yüksek olması, hücre duvarı yapısal farklılıkları ile açıklanabilir. Gram negatif bakterilerde bulunan dış membranın antimikrobiyal bileşiklere karşı bariyer oluşturduğu bilinmektedir (Nikaido, 2003). Benzer şekilde, fungal pigmentlerin Gram pozitif bakterilere karşı daha etkili olduğu birçok çalışmada da rapor edilmiştir (Dufossé, 2006; Venil vd., 2013). Pozitif kontrol olarak kullanılan gentamisin tüm bakteriler üzerinde yüksek inhibisyon zonları oluşturmuş olup, bu durum doğal pigmentlerin sentetik antibiyotiklere kıyasla daha düşük etkinlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, fungal pigmentlerin içerdiği fenolik ve poliketid yapılı bileşiklerin hücre zarını bozma ve oksidatif stres oluşturma yoluyla antimikrobiyal etki gösterdiği bilinmektedir (Mapari vd., 2005; Venil vd., 2013).

Candida albicans üzerinde pigment ekstraktının etkisiz olduğu, buna karşın amfoterisin B'nin inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. Literatürde fungal pigmentlerin genellikle antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu, antifungal etkinliklerinin ise sınırlı kaldığı bildirilmektedir (Dufossé vd., 2014).

Çizelge 4.1. *F. oxysporum*'dan elde edilen pigmentin mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkileri

<u>Microorganizma</u>	<u>Inhibisyon zon çapı (mm)</u>			
	<u>Fusarium</u>	<u>Etil asetat</u>	<u>Gentamisin</u>	<u>Amfoterisin</u>
<u>Escherichia coli</u>	-	-	7,32± 1,08	-
<u>Enterococcus faecalis</u>	-	-	7,40± 1,015	-
<u>Streptococcus pyogenes</u>	2,33± 0,85	1,37±0,011	7,08± 2,09	-
<u>Staphylococcus aureus</u>	2,54± 0,021	1,47± 0,005	7,35± 2,021	-
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	2,86± 0,017	1,50± 0,027	7,37± 1,89	-
<u>Bacillus spizizenii</u>	2,48±0,02	2,03± 0,013	7,05± 2,34	-
<u>Bacillus subtilis</u>	-	-	5,45± 1,21	-
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	-	-	7,30± 2,07	-
<u>Klebsiella aerogenes</u>	3,33± 0,83	2,63± 0,015	9,11± 2,35	-
<u>Candida albicans</u>	-	-	5,46± 1,87	3,44± 0,96



Şekil 4.7. Disk difüzyon yöntemi ile elde edilen inhibisyon zonlarının petri görüntüleri

4.3. *F. oxysporum*'un Optimum Koşullarda Üremesinin Ölçülmesi

Optimum üretim koşulları altında *F. oxysporum*'un büyüme performansının belirlenmesi, pigment üretimi ile biyokütle oluşumu arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi açısından önemli bir parametredir. Bu çalışmada, optimum koşullarda inkübe edilen kültürlerden elde edilen biyokütle miktarı belirlenmiş ve fungusun üreme kapasitesi değerlendirilmiştir.

Elde edilen bulgular, *F. oxysporum*'un optimum koşullar altında belirli bir biyokütle seviyesine ulaştığını göstermektedir (Şekil 4.8.). Biyokütle artışı, fungusun uygun çevresel koşullarda aktif büyüme gösterdiğini ve metabolik olarak yüksek aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

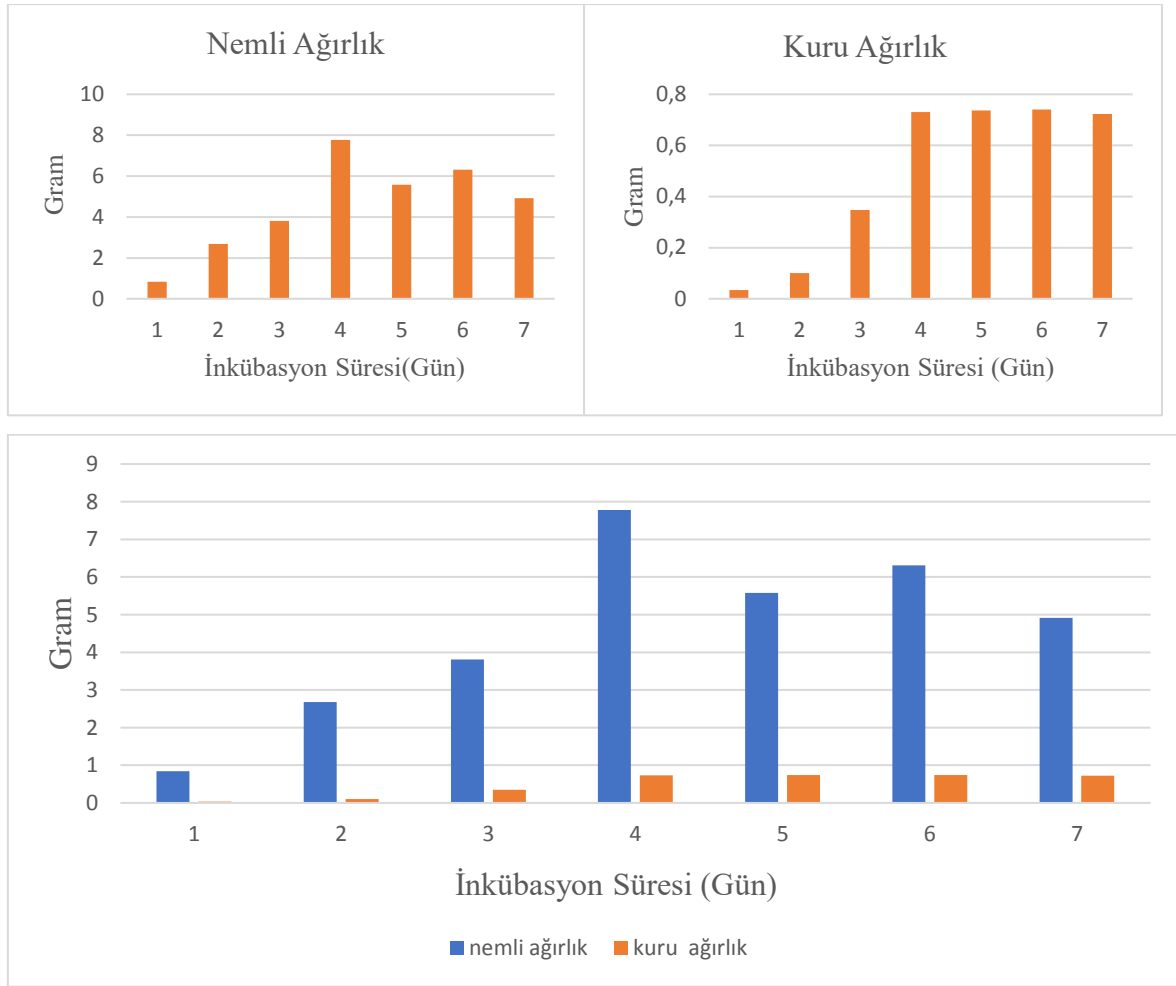
Fungal büyüme ile pigment üretimi arasındaki ilişki incelendiğinde, pigment üretiminin biyokütle artışı ile doğrudan paralel olmadığı dikkat çekmektedir. Pigmentlerin sekonder metabolit olması nedeniyle, üretimlerinin genellikle büyümenin ileri evrelerinde,

özellikle durağan fazda arttığı bilinmektedir. Bu nedenle maksimum biyokütle oluşumu ile maksimum pigment üretimi farklı zaman dilimlerinde gerçekleşebilmektedir.

Bu çalışmada da benzer şekilde, optimum büyüme koşullarında elde edilen biyokütle miktarı ile pigment üretimi arasında dolaylı bir ilişki olduğu değerlendirilmiştir. Fungusun uygun koşullarda yeterli biyokütleyle ulaşması, sekonder metabolit üretimi için gerekli metabolik altyapıyı oluşturmakta, ancak pigment üretiminin maksimum seviyeye ulaşması için ek çevresel uyarılar ve stres koşulları gerekmektedir.

Literatürde filamentöz funguslarda biyokütle üretimi ile sekonder metabolit sentezi arasındaki ilişkinin karmaşık olduğu ve bu iki sürecin farklı düzenleyici mekanizmalar tarafından kontrol edildiği bildirilmektedir (Calvo vd., 2002; Keller, 2019). Bu durum, pigment üretiminin yalnızca büyüme ile açıklanamayacağını ve çevresel faktörlerin belirleyici rol oynadığını göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgular, *F. oxysporum*'un optimum koşullarda etkin bir şekilde büyüdüğünü ve biyokütle oluşumunun pigment üretimi için gerekli bir ön koşul olduğunu, ancak pigment sentezinin sekonder metabolizma ile ilişkili olarak farklı dinamikler altında gerçekleştiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.8. Optimum koşullarda üretilen *F. oxysporum*'un biyokütle miktarı (yaş ve kuru ağırlık)

4.4. *F. oxysporum*'un Optimum Koşullarda Pigment Üretiminin Ölçülmesi

Optimum üretim koşulları altında *F. oxysporum* tarafından sentezlenen pigment miktarının belirlenmesi, elde edilen ürünün verimliliğinin değerlendirilmesi açısından önemli bir parametredir. Bu çalışmada, optimum koşullarda inkübe edilen kültürlerden elde edilen pigment ekstraktlarının absorbans değerleri ölçülerek pigment üretim düzeyi değerlendirilmiştir.

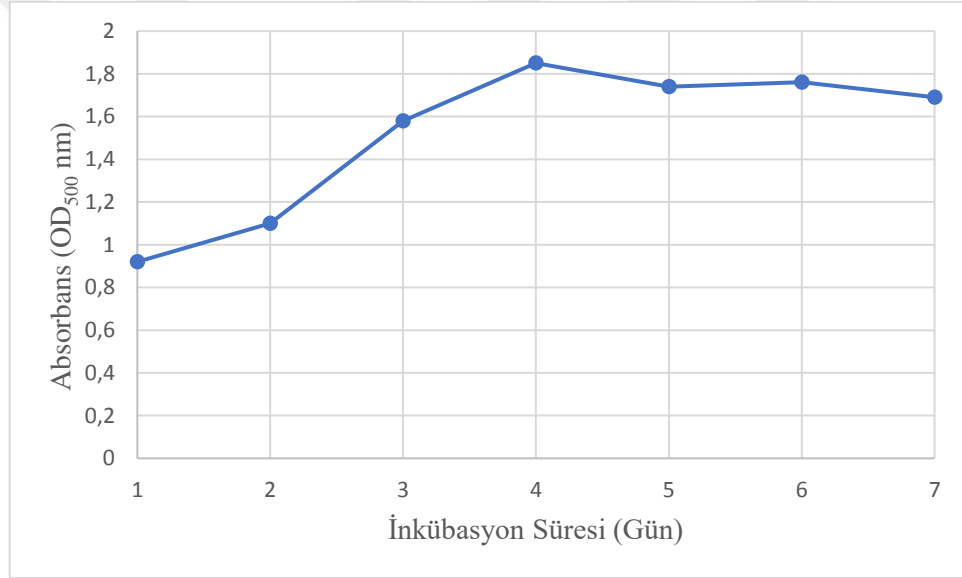
Elde edilen bulgular, optimum koşullarda *F. oxysporum*'un belirgin düzeyde pigment ürettiğini göstermektedir (Şekil 4.9.). Ölçülen absorbans değerleri, pigment üretiminin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini ve seçilen üretim koşullarının pigment sentezi açısından uygun olduğunu ortaya koymaktadır.

Pigment üretiminin, daha önce belirlenen optimum çevresel koşullar (sıcaklık, pH ve çalkalama hızı) altında maksimum seviyeye ulaştığı değerlendirilmektedir. Bu durum, çevresel parametrelerin sekonder metabolit üretimi üzerindeki belirleyici etkisini açıkça

göstermektedir. Özellikle uygun sıcaklık ve aerasyon koşullarının sağlanması, pigment biyosentezinde görev alan enzimatik sistemlerin aktivitesini artırarak üretim verimini yükseltmektedir.

Literatürde *Fusarium* türlerinde pigment üretiminin kültür koşullarına bağlı olarak önemli ölçüde değişebildiği ve uygun fermentasyon parametrelerinin sağlanması ile üretim veriminin artırılabilirdiği bildirilmektedir (Dufossé vd., 2014; Mapari vd., 2005). Bu çalışmada elde edilen bulgular da söz konusu literatür verileri ile uyumlu olup, belirlenen optimum koşulların pigment üretimi açısından etkili olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, *F. oxysporum*'un optimum koşullar altında yüksek düzeyde pigment üretebildiği ve bu koşulların pigment veriminin artırılmasında kritik rol oynadığı belirlenmiştir. Bu durum, fungal pigmentlerin biyoteknolojik üretimi açısından uygun kültür koşullarının belirlenmesinin önemini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.9. Optimum koşullarda *F. oxysporum* tarafından üretilen pigment miktarının absorbans değerleri

4.5. Optimum Koşullarda Üretilen Fungal Pigmentlerin Karakterizasyonu

Optimum üretim koşulları altında elde edilen fungal pigmentlerin kimyasal yapısının ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi, bu bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin ve potansiyel kullanım alanlarının ortaya konulması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle *F. oxysporum*'dan elde edilen pigmentlerin karakterizasyonu çeşitli analitik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu kapsamda pigmentlerin optik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla UV-Vis spektrofotometrik analizler yapılmış, fonksiyonel grupların tespiti için FTIR spektroskopisi

kullanılmış, bileşen profillerinin belirlenmesine yönelik olarak GC-MS ve moleküllerin yapı ve kimyasal özellikleri için NMR analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu teknikler, pigmentlerin yapısal özelliklerinin ortaya konulması ve literatürde bildirilen fungal pigmentlerle karşılaştırılabilmesi açısından tamamlayıcı bilgiler sunmaktadır.

Fungal pigmentler genellikle poliketid veya kinon türevi bileşikler olup, yapılarında aromatik halkalar, konjuge çift bağ sistemleri ve çeşitli fonksiyonel gruplar içermektedir. Bu yapısal özellikler pigmentlerin renk oluşumundan, antioksidan kapasitesine ve antimikrobiyal aktivitelerine kadar birçok biyolojik özelliğini belirlemektedir. Bu nedenle gerçekleştirilen karakterizasyon analizleri, elde edilen pigmentlerin kimyasal doğasının anlaşılmasına katkı sağlamaktadır.

Literatürde *Fusarium* türleri tarafından üretilen pigmentlerin çoğunlukla naftokinon ve poliketid türevleri olduğu ve bu bileşiklerin UV-Vis, FTIR ve kütle spektrometrisi gibi tekniklerle karakterize edilebildiği bildirilmektedir (Dufossé vd., 2014; Mapari vd., 2005). Bu bağlamda elde edilen analiz sonuçları, pigmentlerin yapısal özelliklerinin literatür verileri ile karşılaştırılarak değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır.

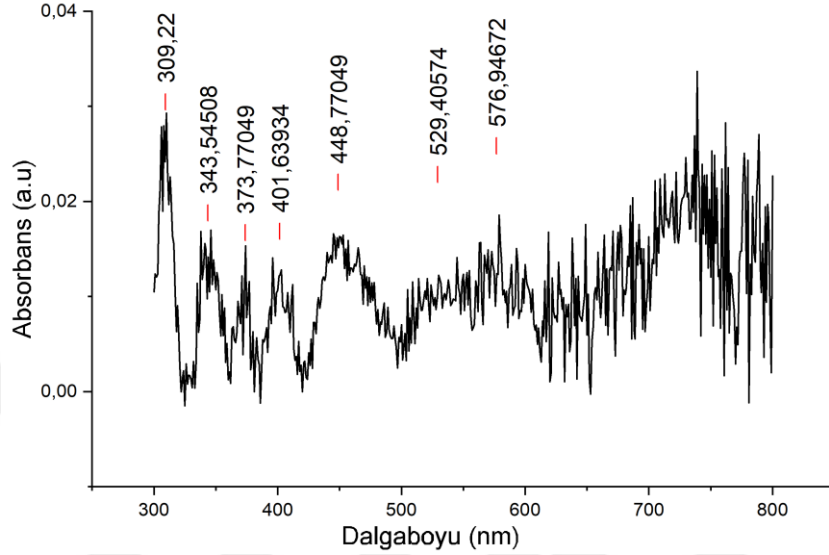
4.5.1. Optimum Koşullarda Üretilen Fungal Pigmentlerin UV-vis Spektrofotometresi

Fungal pigmentlerin karakterizasyonunda UV-Vis spektrofotometrik analiz, pigmentlerin optik özelliklerinin ve konjuge sistem yapılarının belirlenmesi açısından önemli bir yöntemdir. Bu çalışmada elde edilen pigment ekstraktının UV-Vis spektrumu incelendiğinde, belirli dalga boylarında karakteristik absorbans pikleri gözlenmiştir (Şekil 4.10.).

Fusarium türleri tarafından üretilen pigmentlerin UV-Vis spektrumlarında genellikle aromatik yapıların varlığına bağlı olarak 270–280 nm aralığında absorbans pikleri, konjuge çift bağ sistemlerine bağlı olarak 330–350 nm aralığında absorbans değerleri ve pigmentin renginden sorumlu kromofor gruplara bağlı olarak 480–520 nm aralığında maksimum absorbans değerleri gözlenmektedir. Bu dalga boyu aralıkları, özellikle naftokinon ve poliketid türevi pigmentlerin karakteristik özellikleri ile uyumludur.

Elde edilen spektral veriler, çalışmada üretilen pigmentin konjuge çift bağ sistemine sahip, aromatik yapılar içeren bir bileşik olduğunu göstermektedir. Ayrıca geniş absorbans bantlarının varlığı, pigmentin kompleks yapı ve farklı kromofor gruplar içeren bir bileşik olabileceğini düşündürmektedir.

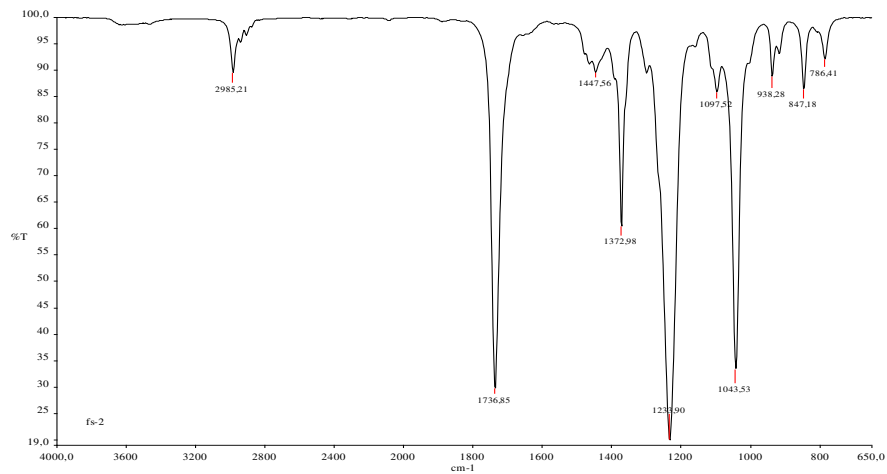
Literatürde *Fusarium* türlerinden elde edilen pigmentlerin benzer UV-Vis absorbans özellikleri gösterdiği ve bu pigmentlerin genellikle bikaverin ve fusarubin gibi naftokinon türevleri ile ilişkilendirildiği bildirilmektedir (Dufossé vd., 2014; Mapari vd., 2005). Bu bağlamda elde edilen bulgular, çalışmada üretilen pigmentin literatürde tanımlanan fungal pigmentlerle benzer özellikler taşıdığını göstermektedir.



Şekil 4.10. Fungal pigmentlerin UV-Vis spektrumu.

4.5.2. Optimum Koşullarda Üretilen Fungal Pigmentlerin FTIR Sonuçları

Fungal pigmentlerin fonksiyonel grup yapılarının belirlenmesinde FTIR spektroskopisi önemli bir analiz yöntemidir. Literatürde *Fusarium* türlerinden elde edilen pigmentlerin FTIR analizlerinde benzer fonksiyonel grupların tespit edildiği ve bu pigmentlerin genellikle poliketid ve kinon türevleri olduğu bildirilmektedir (Dufossé vd., 2014).



Şekil 4.11. *F. oxysporum*'un etil asetatlı pigmentlerin FTIR spektrumu.

F. oxysporum etil asetatlı pigment örneğine ait FTIR spektrumu incelendiğinde, belirgin absorpsiyon bantlarının çeşitli fonksiyonel grupların varlığına işaret ettiği görülmektedir. Yaklaşık 3400 cm^{-1} civarında gözlenen geniş bant, hidroksil (O–H) gerilme titreşimlerine karşılık gelmekte olup fenolik yapıların varlığını düşündürmektedir. $2920\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$ aralığında tespit edilen bantlar alifatik C–H gerilme titreşimlerine atfedilmektedir.

Spektrumda yaklaşık $1700\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde yer alan güçlü pik, karbonil (C=O) gruplarının varlığını açıkça göstermektedir ve bu durum kinon yapıları ile uyumludur. $1600\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ aralığında gözlenen bantlar aromatik C=C gerilme titreşimlerine karşılık gelmekte olup bileşiğin aromatik karakterini desteklemektedir. Ayrıca $1300\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde belirlenen pikler C–O gerilme titreşimlerine işaret etmekte ve fenolik ya da eterik yapıların varlığını düşündürmektedir.

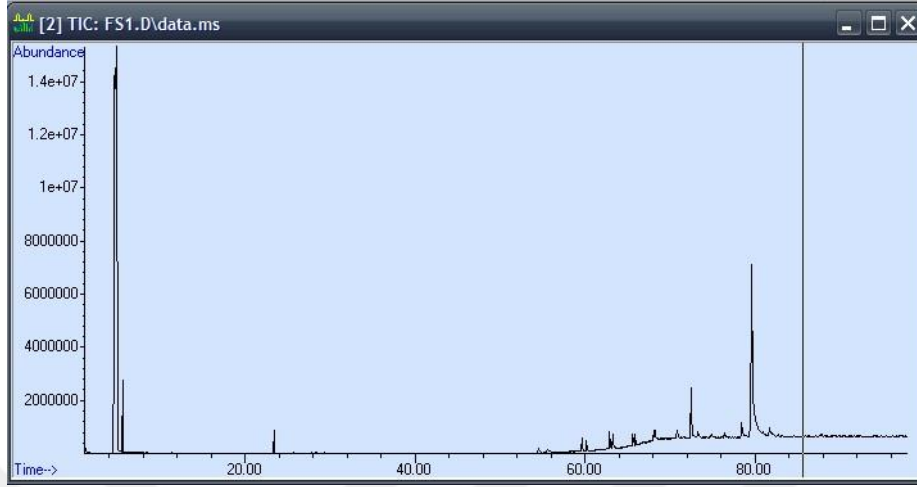
Düşük dalga sayılarında ($900\text{--}700\text{ cm}^{-1}$) gözlenen bantlar ise aromatik halkalara ait düzlem dışı C–H bükülme titreşimleri ile ilişkilendirilmektedir. Tüm bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, analiz edilen fungal pigmentin aromatik yapı içeren, hidroksil ve karbonil fonksiyonel gruplarına sahip, büyük olasılıkla poliketid ve kinon türevlerinden oluşan bir bileşik yapısına sahip olduğu sonucuna varılmaktadır (Dufossé vd., 2014).

4.5.3. Optimum Koşullarda Üretilen Fungal Pigmentlerin GC-MS Sonuçları

GC-MS analizi sonucunda ekstrakt içerisinde başlıca etil asetat, etil oleat ve palmitik asit gibi düşük molekül ağırlıklı ester ve yağ asidi türevleri tespit edilmiştir. Bu bileşikler, fungal hücre metabolizmasının lipid bileşenleri ile uyumlu olup ekstraktın lipofilik karakterini desteklemektedir. Ancak çalışmamızda elde ettiğimiz pigment molekülünün uçucu olmaması ve yüksek sıcaklıkta parçalanabilir özellik göstermesinden dolayı, GC-MS analizinde hedeflenen pigment bileşiğine ait karakteristik bir pik belirgin olarak gözlenmemiştir. Bu nedenle pigmentin karakterizasyonu için GC-MS yerine LC-MS gibi tekniklerin daha uygun olduğu değerlendirilmektedir. Öte yandan, FTIR ve UV-Vis sonuçlarıyla doğrulanması gerekmektedir.

GC-MS kromatogramı incelendiğinde, erken alıkonma zamanlarında özellikle etil asetata ait piklerin yüksek yoğunlukta olması dikkat çekmektedir. Orta alıkonma zamanlarında pik yoğunluğunun düşük olması, bu aralıkta yer alan bileşiklerin sınırlı olduğunu ortaya koymaktadır. Geç alıkonma zamanlarında ise yeniden belirgin piklerin ortaya çıkması, numunenin uzun zincirli ve lipofilik bileşenler içerdiğini göstermektedir. Bu bölgede tespit edilen etil oleat ve palmitik asit gibi bileşikler, fungal hücre lipidleri ile uyumludur.

Bununla birlikte, hedeflenen pigment bileşimine ait spesifik bir pik gözlenmemiştir. Bu durum, pigment molekülünün uçucu olmaması ve GC-MS analiz koşullarında parçalanabilir özellik göstermesi ile açıklanabilir.



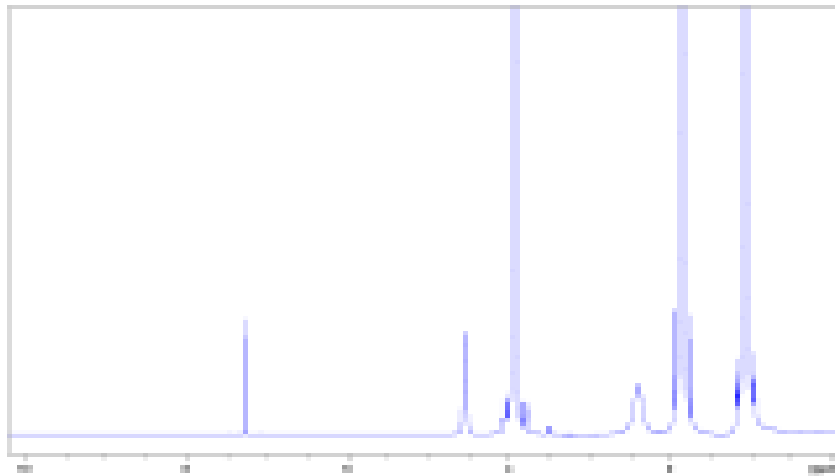
Şekil 4.12. *F. oxysporum*'un etil asetatlı ekstraktının GC-MS sonucu

4.5.4. Optimum Koşullarda Üretilen Fungal Pigmentlerin NMR Sonuçları

Bu bölümde, optimize edilen koşullar altında (25°C, 150 rpm, pH 9 ve 6–7 günlük inkübasyon süresi) üretilen *F. oxysporum*'dan sentezlenen pigmentin, ¹H NMR analizi ile karakterizasyonu yapılmıştır. Elde edilen spektrum incelendiğinde, özellikle 6–8 ppm aralığında yoğunlaşan belirgin sinyallerin, aromatik protonlara karşılık geldiği ve pigment molekülünün yüksek derecede konjuge çift bağ sistemleri içeren bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, literatürde *Fusarium* pigmentlerinden bikaverin için bildirilen NMR verileri ile büyük ölçüde uyumludur. Bikaverin gibi naftokinon türevi pigmentlerin karakteristik olarak bu bölgede sinyal verdiği bilinmektedir. Spektrumun 0–3 ppm aralığında gözlenen daha zayıf sinyaller ise yapıda sınırlı miktarda alifatik proton bulunduğunu ortaya koymaktadır. Bu bulgu, pigmentin yalnızca aromatik bir çekirdekten oluşmadığını, aynı zamanda alkil yan zincirleri içerdiğini göstermektedir. Literatürde de fusarubin ve aurofusarin gibi diğer *Fusarium* pigmentlerinin benzer yapısal özellikler gösterdiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, spektrumda gözlenen pik çeşitliliği ve bazı sinyallerin üst üste gelmesi, analiz edilen örneğin tamamen saf bir bileşikten olmadığını birden fazla pigment bileşiği içerebileceğini düşündürmektedir. *Fusarium* türlerinin aynı anda birden fazla pigment (örneğin bikaverin, fusarubin, aurofusarin ve türevleri) üretebildiği göz önüne alındığında, ekstraksiyon sonrası elde edilen karışımın bu bileşenleri birlikte içermesi beklenen bir durumdur. Bu durum, spektrumun literatürde rapor edilen saf bileşiklere kıyasla daha karmaşık görünmesini de açıklamaktadır. Sonuç olarak, elde edilen NMR spektrumu,

pigmentin aromatik ve konjuge yapısını doğrulamakla birlikte, pik çeşitliliği örneğin tamamen saf olmayabileceğini ve birden fazla pigment bileşiği içerebileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada optimum koşullarda *F. oxysporum*'dan elde edilen pigmentin, FTIR, GC-MS, UV-Vis ve ^1H NMR analizleri ile kapsamlı olarak karakterizasyonu yapılmıştır. UV-Vis spektrumunda gözlenen yaklaşık 480–520 nm aralığındaki maksimum absorbands değeri, pigmentin görünür bölgede ışık absorplayan güçlü bir kromofor yapıya sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Bunun yanı sıra, 270–280 nm ve 330–350 nm civarında gözlenen absorbandslar, sırasıyla aromatik sistemlere ait konjuge çift bağ sistemlerini işaret etmektedir. FTIR spektrumu incelendiğinde ise, geniş bant şeklinde gözlenen $\sim 3200\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ bölgesindeki sinyaller hidroksil ($-\text{OH}$) gruplarını, $\sim 1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki pikler karbonil ($\text{C}=\text{O}$) ve aromatik $\text{C}=\text{C}$ titreşimlerini, $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$ civarındaki bantlar ise alifatik $\text{C}-\text{H}$ gerilmelerini temsil etmektedir. Bu fonksiyonel gruplar, pigment molekülünün hem aromatik/kinon karakterli bir çekirdeğe ve hem de $-\text{OH}$, $-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$ ve $-\text{NH}_2$ gibi birçok fonksiyonel gruplara sahip olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, literatürde tanımlanan bikaverin, fusarubin ve aurofusarin gibi *Fusarium* kaynaklı poliketid pigmentlerin karakteristik özellikleri ile büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. *Fusarium* türlerinin sekonder metabolizma kapsamında aynı anda birden fazla pigment üretebildiği göz önüne alındığında, ekstrakte edilen örneğin bikaverin ve fusarubin türevleri gibi yapısal olarak benzer bileşiklerin bir karışımı olduğu ve çalışmada izole edilen pigmentin muhtemelen *Fusarium* türlerine özgü poliketid kökenli, aromatik ve yüksek derecede konjuge bir bileşik olduğunu desteklemektedir; tam tanımlama için LC-MS/MS ve saf standartla karşılaştırma gereklidir.



Şekil 4.13. Optimum koşullarda *F. oxysporum*'dan üretilen pigmentlerin NMR analizi

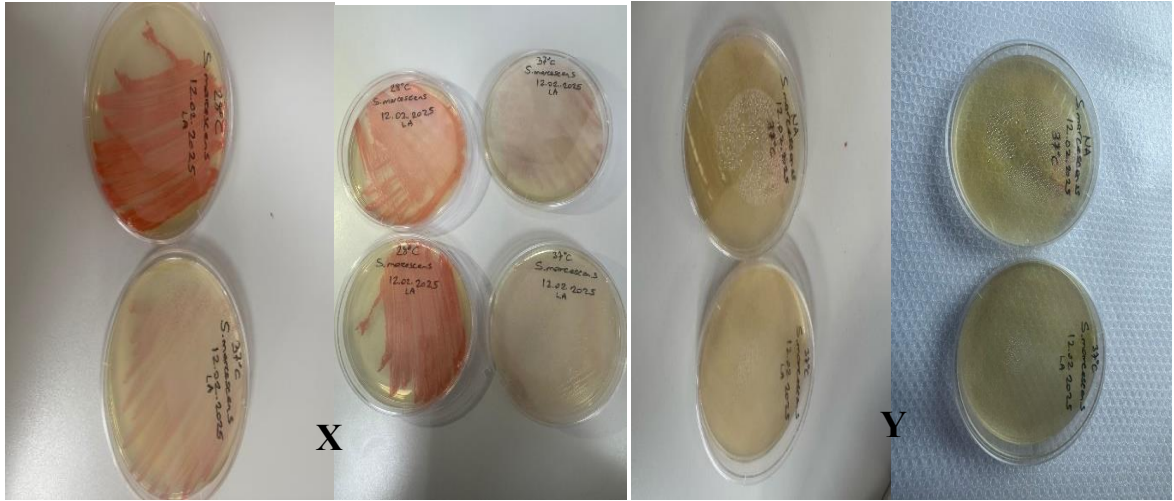
4.6. *S. marcescens* Bakterisinin Üretimi ve Pigment Sentezinin Optimizasyon Çalışmaları

Bu çalışmada kullanılan *S. marcescens* bakterisinin optimum üretim koşulları belirlenerek, optimum koşullarda üretilen pigment saflaştırılıp çeşitli endüstriyel uygulamalarda ve karakterizasyonu için kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda *S. marcescens*'in pigment üretimi hem inkübasyon koşullarına göre ve hem de besiyeri çeşidine bağlı olarak farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir.

4.6.1. Besiyeri Çeşidinin Pigment Üretimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Bakteriyel pigmentlerin üretimi birçok çevresel faktörden ve besiyeri içeriğinden etkilendiği bilinmektedir. Besiyerinin içeriği özellikle inorganik fosfat ve karbon kaynakları pigment üretimini büyük ölçüde etkilemektedir.

Farklı besiyerlerinin prodigiosin pigmentinin sentezi üzerine etkisini saptamak amacıyla Bölüm 3.10.1.'de anlatıldığı gibi hazırlanan NA ve LA besiyerinde 37 °C'de üretilen *S. marcescens* bakterisi pigment oluşturmazken, 28 °C'de pigment oluşumu her iki besiyerinde de gözlenmiştir. Ancak 28°C'de LA besiyerindeki pigment oluşumu NA besiyerindeki pigmentasyondan oldukça fazla olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle çalışmalarımıza LA ve LB besiyerlerinde devam edilmiştir.



Şekil 4.14. (A) *S. marcescens*'in Luria Bertani Agar (LA) ve Nütrient Agar (NA) besiyerinde 24 saat inkübasyonda farklı sıcaklıklarda kolonilerdeki pigmentasyonu X. 28°C ve Y. 37°C.

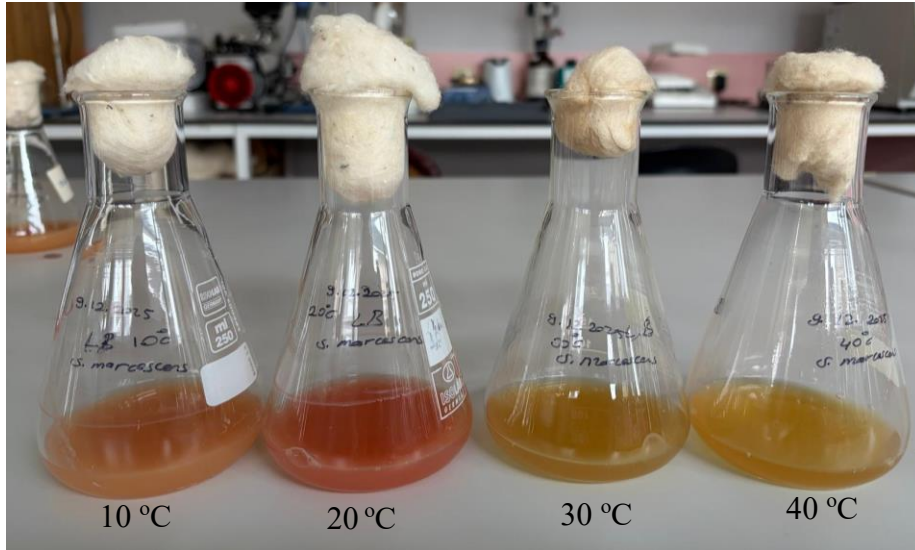


Şekil 4.14. (B) *S. marcescens*'in Luria Bertani Broth (LB) ve Luria Bertani Agar (LA) besiyerinde 28°C'de 24 saat inkübasyonda kolonilerdeki pigmentasyonu.

4.6.2. Prodigiosin Sentezine Sıcaklığın Etkisi

Bu çalışmada *S. marcescens*'in LB sıvı besiyerinde farklı inkübasyon sıcaklıklarında pigment (prodigiosin) üretimi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, sıcaklığın pigment biyosentezi üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğunu ve kültürler arasında gözle görülebilir renk değişimlerinin olduğunu göstermiştir. Düşük- orta sıcaklıklarda inkübe edilen kültürlerde yoğun kırmızı pigment oluşumu gözlenirken, daha yüksek sıcaklıklarda pigmentasyonun belirgin şekilde azaldığı ve kültürlerin sarımsı-açık turuncu renkte kaldığı tespit edilmiştir.

Bu bulgular, *S. marcescens*'te prodigiosin üretiminin sıcaklığa duyarlı olduğunu ve pigment sentezinin belirli bir sıcaklık aralığında maksimum düzeye ulaştığını ortaya koymaktadır.



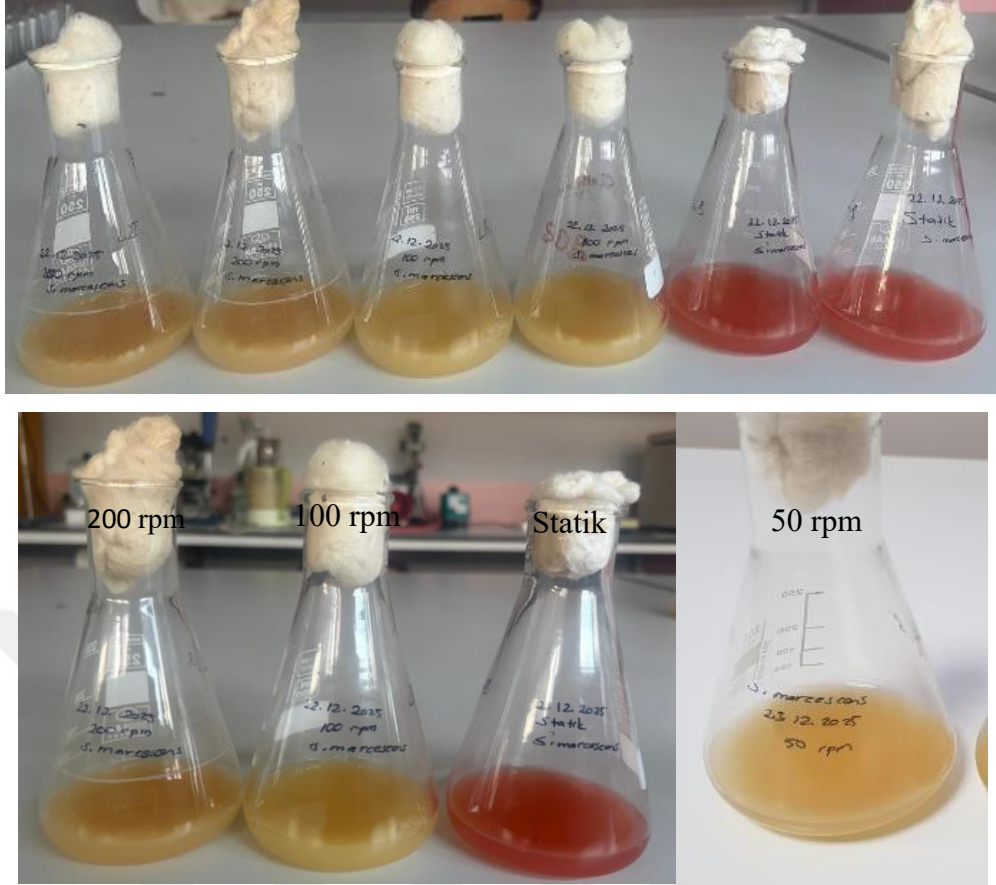
Şekil 4.15. *S. marcescens*'in LB besiyerinde farklı sıcaklıklardaki pigmentasyonu.

S. marcescens bakterisi mezofilik bir bakteridir ve çoğu mezofilik bakteri gibi optimum üreme sıcaklığı 30–37 °C’dir. Laboratuvar koşullarında çoğu çalışmada 35–37 °C civarında en hızlı hücre çoğalması görülür. *S. marcescens* tarafından sentezlenen kırmızı pigment Prodigiosin üretimi çevresel faktörlerden özellikle sıcaklığa oldukça duyarlıdır. Çeşitli çalışmalarda bakterinin hücresel büyümesinin 35–37 °C civarında maksimum düzeye ulaştığı, ancak prodigiosin biyosentezinin daha düşük sıcaklıklarda teşvik edildiği bildirilmiştir. Özellikle 25–30 °C aralığında pigment üretiminin belirgin şekilde arttığı, buna karşılık yüksek sıcaklıklarda prodigiosin sentezinden sorumlu biyosentetik enzimlerin aktivitesinin azalması ve ilgili genlerin ekspresyonunun baskılanması nedeniyle pigment üretiminin önemli ölçüde düştüğü gözlenmiştir (Williams, 1973; Grimont ve Grimont, 1978; Darshan ve Manonmani, 2015).

Literatürde prodigiosin üretimi için optimum sıcaklık aralığının genellikle 20–30 °C olduğu, buna karşın 37 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda hücre büyümesi devam etmesine rağmen pigment biyosentezinin baskılandığı bildirilmektedir (Williams vd., 1971; Giri vd., 2004). Prodigiosinin sekonder metabolit olduğu için orta sıcaklıklarda hücresel büyümenin nispeten yavaşlaması, metabolik dengenin sekonder metabolit üretimine yönelmesine olanak tanımakta ve prodigiosin biyosentezinden sorumlu *pig* gen kümesinin aktivitesini artırmaktadır (Wei & Chu, 2002). Sonuç olarak, hem bizim çalışmamızdan elde edilen bulgular ve hem de literatür bulguları, *S. marcescens*’te prodigiosin üretiminin optimize edilmesine yönelik biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalarda inkübasyon sıcaklığının kritik bir parametre olarak dikkate alınması gerektiğini göstermektedir.

4.6.3. Prodigiosin Sentezine Çalkalama Koşullarının Etkisi

Bu çalışmada *S. marcescens*’in LB sıvı besiyerinde farklı çalkalama koşulları altında pigment (prodigiosin) üretimi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, çalkalama hızına bağlı olarak kültürlerde belirgin renk farklılıklarının oluştuğunu göstermiştir. Düşük çalkalama koşullarında inkübe edilen kültürlerde yoğun kırmızı pigment oluşumu gözlenirken, yüksek çalkalama hızlarında pigmentasyonun belirgin şekilde azaldığı ve kültürlerin sarımsı-turuncu renkte kaldığı tespit edilmiştir. Bu durum, prodigiosin üretiminin besiyerindeki oksijen düzeyine duyarlı olduğunu ve oksijen mevcudiyetinin pigment biyosentezini baskıladığını ortaya koymaktadır.



Şekil 4.16. *S. marcescens*'in LB besiyerinde farklı çalkalama koşullarındaki pigmentasyonu.

Literatürde prodigiosinin *S. marcescens* için bir sekonder metabolit olduğu ve üretiminin genellikle üremenin yavaşladığı, oksijenin sınırlı olduğu koşullarda arttığı bildirilmektedir. Yüksek çalkalama hızlarının çözünmüş oksijen miktarını artırarak hücresel metabolizmayı öncelikle biyokütle artışına yönlendirdiği, buna karşılık pigment üretiminin baskılandığı ifade edilmektedir (Williams vd., 1971; Giri vd., 2004).

Yüksek çalkalama hızları, ortamda çözünmüş oksijen miktarını artırarak hücresel metabolizmanın öncelikle biyokütle üretimine yönelmesine neden olmakta ve bu durum pigment sentezinin baskılanmasıyla sonuçlanmaktadır (Pan vd., 2009). Bu bağlamda, çalışmamızda yüksek aerasyon koşullarında pigment üretiminin azalması, üreme ve sekonder metabolit üretimi arasındaki metabolik denge ile açıklanabilir.

Ayrıca artan oksijen seviyelerinin hücrelerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu artırdığı ve bu durumun prodigiosin biyosentezinden sorumlu *pig* gen kümesinin ekspresyonunu olumsuz yönde etkileyebileceği rapor edilmiştir (Haddix & Shanks, 2018). Prodigiosin üretiminin quorum sensing sistemleri ve çevresel stres yanıtları ile ilişkili olduğu, özellikle düşük aerasyon koşullarında bu düzenleyici mekanizmaların pigment

sentezini teşvik ettiği bilinmektedir (Wei & Chu, 2002; Darshan & Manonmani, 2015). Bu çalışmada düşük çalkalama koşullarında gözlenen yoğun kırmızı pigmentasyon, söz konusu düzenleyici mekanizmalarla uyumlu bir sonuç olarak değerlendirilmektedir.

Sonuç olarak, *S. marcescens*'te prodigiosin üretiminin çalkalama koşullarına bağlı olarak önemli ölçüde değiştiği ve pigment sentezinin hücresel büyümeden ziyade çevresel stres ve sekonder metabolik yanıtlarla ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Bu bulgular, prodigiosin üretiminin optimize edilmesine yönelik biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalarda çalkalama koşullarının kritik bir parametre olduğunu göstermektedir.

4.6.4. Prodigiosin Sentezine pH'nın Etkisi

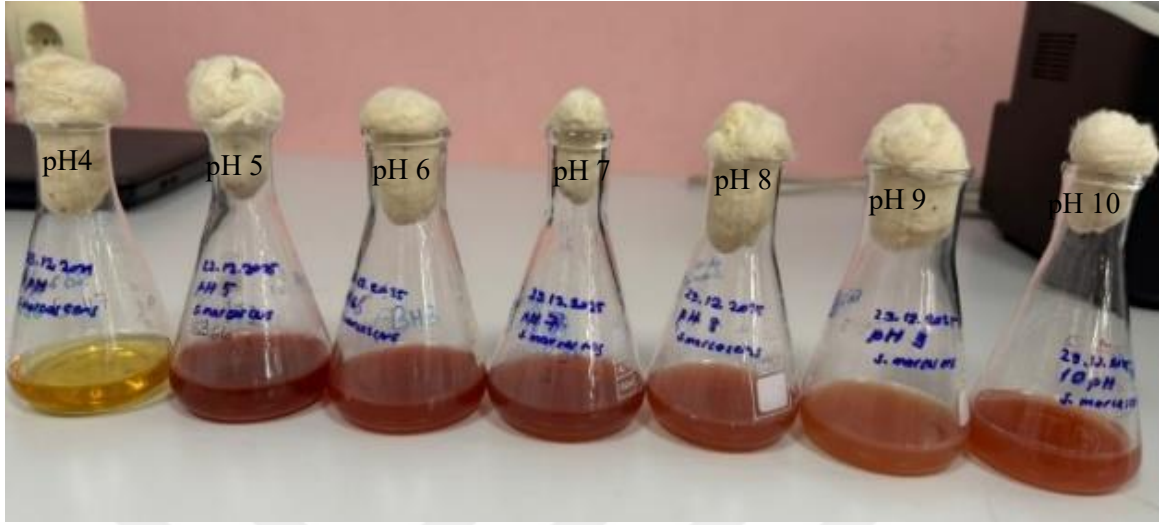
pH 4.0–10.0 aralığında olan besiyerlerinde üretilen *S. marcescens*'te pigment üretiminin hem pH'a bağlı olarak ve hem de üretim süresine bağlı olarak farklı biyolojik mekanizmalarla düzenlendiği gözlenmiştir. Fotoğrafa bakıldığında, *S. marcescens*'in farklı pH değerlerinde ilk 24 saatlik inkübasyonda prodigiosin pigmentasyonunun henüz sınırlı olduğu, ancak pH'a bağlı erken dönem farklılıkların başladığı gözlenmiştir. İlk 24 saatte pH 8.0'de pigment üretimi gözlenmesine rağmen diğer pH'larda henüz pigment üretimi gözlenmemiştir. Çünkü, prodigiosin tipik olarak geç log – erken durağan fazda sentezlenen bir sekonder metabolittir.



Şekil 4.17. (A) *S. marcescens*'in 24 saatlik inkübasyon sonrasında farklı pH derecelerindeki pigment üretimi

İnkübasyonun ilerleyen dönemlerinde ise pH 7.0–8.0 koşullarında üremenin daha yüksek olduğu gözlenirken, pigmentin yoğunluğu ve stabilitesi pH 5.0 koşulunda belirgin şekilde arttığı saptanmıştır. Bu durum, asidik pH'ın hücreler için sub-optimal bir stres ortamı oluşturması ve bunun sonucunda prodigiosin gibi sekonder metabolitlerin hücre başına

üretiminin artması ile açıklanabilir. Ayrıca prodigiosinin asidik koşullarda daha stabil ve daha koyu kırmızı renkte olması, pH 5.0 kültürlerinde gözlenen yoğun pigmentasyonun bir diğer olası nedenidir.



Şekil 4.17. (B) *S. marcescens*'in 7 günlük inkübasyon sonrasında farklı pH derecelerindeki pigment üretimi

Literatürde prodigiosin üretimi için optimum pH genellikle 7.5–8.5 aralığında rapor edilmekle birlikte, bu çalışmaların çoğu toplam pigment miktarını nicel olarak değerlendirmiştir. Bu çalışmada ise pigmentin görsel yoğunluğu ve zaman içindeki stabilitesi esas alındığında, pH 5.0 koşulunun daha avantajlı olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, pigment üretimi için optimum pH'ın değerlendirme kriterine bağlı olarak değişebileceğini ortaya koymaktadır. Bakterinin 7 günlük üretim sürecinde ilk 24 saatte pH'a bağlı olarak prodigiosin üretiminde belirgin farklılıklar gözlenirken, yedinci gün sonunda tüm pH koşullarında pigment üretiminin artması, *S. marcescens*'te prodigiosin sentezinin esas olarak geç büyüme fazı ve durağan faz metabolizması ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Bu nedenle ilk 24 saatte hücreler öncelikli olarak adaptasyon ve çoğalma fazında olduğundan henüz maksimum seviyede pigment üretimi gözlenmemiştir. pH 8.0'de görülen pigment üretimi çoğunlukla primer metabolit kaynaklı başlangıç pigmentasyonudur. pH, prodigiosin üretimini doğrudan değil; üreme fazı ve metabolik geçişler üzerinden etkilemektedir. Bu nedenle ilk 24 saatte, pH'ın etkisi üreme adaptasyonu düzeyindedir yani pigment üretimi henüz temel yanıt değildir. 48–72 saatlik inkübasyonda ise farklı pH derecelerinde çok daha belirgin pigment üretimi olmaktadır. Bu nedenle ilk 24 saatlik inkübasyonda pH 8.0'de görülen pigment üretimi daha sınırlı düzeyde olup, erken faz metabolik yanıtı olarak değerlendirilebilmektedir. 24 saatlik üretim aşamasında asidik ve

aşırı alkali pH'larda pigmentasyon baskılanmış olup, nötr–hafif alkali pH'larda ise pigment sentezi başlangıç seviyesindedir. İlerleyen inkübasyon sürelerinde ise pH etkisi, çok daha net hale gelmiştir. 24 saate kıyasla: renkler çok daha koyu, pH'lar arası farklar azalmış olmakla beraber daha koyu kırmızı bazılarında daha açık kırmızı–turuncu hale gelmiştir.

Bu sonuçlar, *S. marcescens*'te pigment sentezinde inkübasyon süresinin pH'tan daha baskın bir faktör olduğunu göstermektedir. Çünkü, prodigiosin geç faz sekonder metabolitidir, Log fazda üretilmez, geç log – durağan fazda sentezlenmektedir. Prodigiosin üretimi genellikle besin kısıtlanması, metabolik yavaşlama ve hücre yoğunluğunun artması ile tetiklenmektedir. İlk saatlik üretimde hücreler üremeye odaklı olup, pigment sentezi baskılanmıştır. 7 günde ise hücreler yaşlanma fazında olup, sekonder metabolizma baskın olduğu için aşırı bir pigment üretimi olmaktadır. Üretimin ilerleyen günlerinde besiyerinin pH'ı artık başlangıç pH'ı değildir, 7 gün sonunda, *S. marcescens* organik asitler, aminler ve amonyak ürettiğinden dolayı ortam pH'ı değişmektedir. Literatürde de üremenin ilerleyen safhalarında hücre yoğunluğu çok yüksek olduğu için ve quorum sensing baskın hale gelip, *pig* gen kümesini güçlü şekilde aktive ettiği bildirilmiştir. Bu nokta da pH hâlâ önemli olduğunu ancak hücre yoğunluğunun daha baskın bir etkiye sahip olduğu ifade edilmiştir. *S. marcescens*'te pH, pigment üretiminin başlama hızını etkilerken, uzun inkübasyon süresinde pigment üretiminin zaman ve hücre fizyolojisi tarafından regüle edildiği bildirilmiştir.

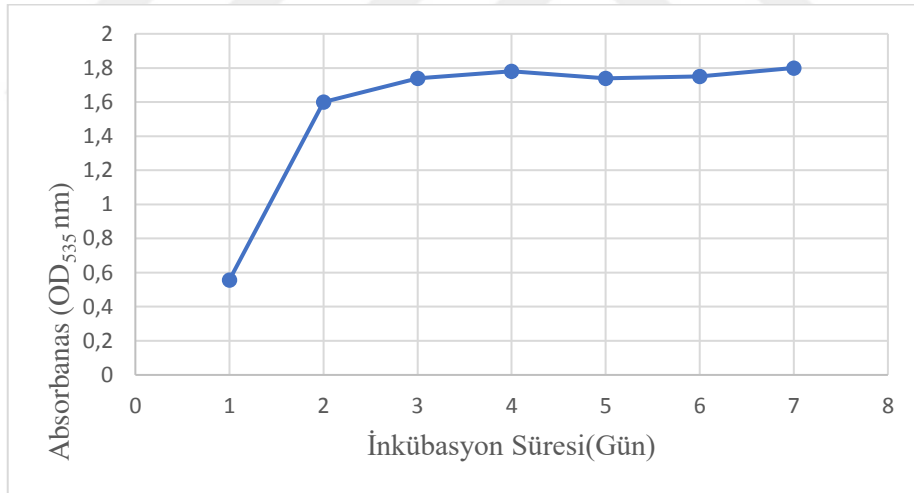
Üretimin ilerleyen günlerinde pH 5.0'te pigmentin daha koyu görünmesi, asidik ortamda daha stabil olmasından dolayı asidik pH'ta daha koyu kırmızı görünür, alkali pH'ta ise renk açılır çünkü pigmentin kısmi degradasyonu yapısal değişime neden olmaktadır. Dolayısıyla aynı miktar pigment pH 5.0'te daha koyu görünebilir. Diğer taraftan pH 5.0 bakterinin optimal büyüme pH'sı olmadığı için asidik strese neden olmakta ve sub-optimal pH'larda sekonder metabolit (prodigiosin) artışı olmaktadır.

Sonuç olarak, literatürde *S. marcescens*'te prodigiosin üretimi için optimum pH genellikle 7.0–8.5 aralığında rapor edilmiştir. Ancak bu çalışmaların büyük kısmı toplam pigment miktarını nicel olarak değerlendirmiştir. Bu çalışmada ise pH 5.0 koşullarında pigmentin daha koyu ve yoğun bir fenotip sergilediği gözlenmiştir. Bu durum, prodigiosinin asidik pH'ta daha stabil ve daha koyu renkli olması ile açıklanabilir. Ayrıca pH 5.0'in hücreler için sub-optimal bir stres koşulu oluşturması, sekonder metabolit olarak prodigiosin sentezinin artmasına yol açmış olabilir. Bu bulgular, pigment üretimi açısından optimum pH'ın yalnızca hücresel büyüme ile değil, stres yanıtı ve pigment stabilitesi ile birlikte değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

4.6.5. Prodigiosin Üretimine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Farklı inkübasyon süreleri, optimal pigment sentez koşullarının ve sentez verimliliğinin belirlenmesinde doğrudan etkili bir parametredir ve oldukça önemlidir.

Pigment üretimi, kültürün inkübasyon süresine bağlı olarak önemli değişimler gösterebilmektedir. Bakterilerde pigmentlerin büyük çoğunluğu sekonder metabolittir ve bu metabolitler genellikle bakteriyel büyümenin logaritmik fazından sonra, özellikle durağan fazda sentezlenmektedir.



Şekil 4.18. *S. marcescens* bakterisinin LB besiyerinde 1-7 gün inkübasyon süresince pigment üretim grafiği ve erlendeki görünüşleri

4.6.6. Karanlık ve Aydınlik İnkübasyon Koşullarının *S. marcescens*'in Pigment Üretimine Etkisi

Bakteriyel pigment üretimi üzerinde etkili olan önemli faktörlerden biridir. Çalışmamızda, *S. marcescens*'in prodigiosin üretimi üzerine karanlık ve aydınlık inkübasyon koşullarının etkisi değerlendirilmiştir. Karanlık ve aydınlık inkübasyon

koşullarında *S. marcescens*'de pigment üretimi karşılaştırıldığında, her iki koşulda da belirgin bir şekilde yoğun ve koyu renkli pigment üretimi olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.19.).



Şekil 4.19. Aydınlik ve karanlık inkübasyonda *S. marcescens* 'in pigment üretimi

Literatür çalışmalarında ise *S. marcescens* suşlarının karanlık ortamda daha fazla pigment üretme eğiliminde olduğu bildirilmiştir. Çünkü ışık, pigment sentezini yöneten gen kümesi olan pig operonunu engelleyerek pigment sentezini azaltmaktadır (Someyra vd., 2004). Diğer taraftan bazı çalışmalarda da UV veya yoğun görünür ışık etkisiyle oluşan oksidatif stresin üstesinden gelebilmek için prodigiosin gibi sekonder metabolitlerin üretiminde artış olduğu da bildirilmiştir. Bu farklı sebep ve koşullardan dolayı pigment üretimi, karanlık ve aydınlık koşullarda çok belirgin bir fark göstermemiştir. Aynı zamanda pig operonu sadece karanlıkta değil, düşük sıcaklıklarda da aktive olduğu ve pigment üretiminin arttığı bilinmektedir. Bizim yaptığımız çalışmalarda bakterilerin 20°C gibi düşük sıcaklıkta üretilmeleri de bir stres faktörü olarak algılanıp hem karanlık hem de aydınlık inkübasyon koşullarında sekonder metabolit olan prodigiosin üretimine neden olmuştur.

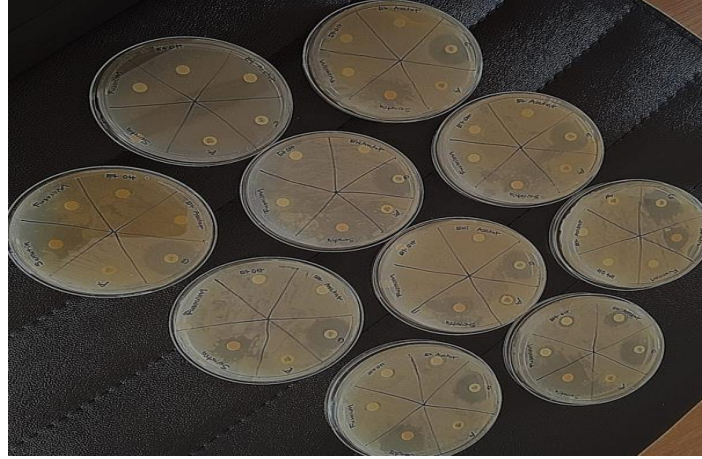
4.7. Prodigiosin Pigmentinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Saptanması

S. marcescens'den elde edilen prodigiosin pigmentinin etil alkollü ekstraktının antimikrobiyal aktivitesi değerlendirildiğinde, ekstraktın test edilen tüm mikroorganizmalar üzerinde belirgin inhibisyon zonları oluşturduğu (4,59–9,86 mm) görülmüştür. En yüksek aktivite *K. aerogenes* üzerinde (9,86 mm) belirlenirken, bunu *B. spizizenii* (6,71 mm) ve *E. coli* (5,72 mm) izlemiştir. Buna karşılık en düşük aktivite *C. albicans* (4,59 mm) üzerinde gözlenmiştir (Çizelge 4.2; Şekil 4.20). Bu sonuçlar, *S. marcescens* ekstraktının geniş spektrumlu bir antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler karşılaştırıldığında, ekstraktın her iki gruba karşı da etkili olduğu, ancak bazı Gram negatif bakterilerde (*K. aerogenes*) daha yüksek inhibisyon zonları oluşturduğu dikkat çekmektedir. Bu durum, *S. marcescens* tarafından üretilen prodigiosin gibi sekonder metabolitlerin geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip olması ile açıklanabilir. Nitekim prodigiosin pigmentinin hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı etkili olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Darshan & Manonmani, 2015; Venil et al., 2013). Etil alkol kontrolü yalnızca bazı mikroorganizmalarda düşük düzeyde inhibisyon (1,04–2,04 mm) oluşturmuş olup, ekstraktın oluşturduğu zonların belirgin şekilde daha yüksek olması, antimikrobiyal etkinin esas olarak bakteriyel metabolitlerden kaynaklandığını göstermektedir. Bu bulgu, çözücü etkisinin sınırlı olduğunu ve aktif bileşenlerin ekstrakta geçtiğini desteklemektedir (Balouiri et al., 2016). Pozitif kontrol olarak kullanılan gentamisin tüm bakteriler üzerinde yüksek inhibisyon zonları (5,45–9,11 mm) oluşturmuş, ancak prodigiosin ekstraktının bazı mikroorganizmalarda (özellikle *K. aerogenes*) antibiyotiğe yakın düzeyde aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum, bakteriyel pigmentlerin doğal antimikrobiyal ajanlar olarak potansiyelini ortaya koymaktadır. *C. albicans* üzerinde prodigiosin ekstraktı, amfoterisine kıyasla belirgin antifungal etki göstermiştir. Bakteriyel pigmentlerin antifungal etkisi antibakteriyel etkiye kıyasla daha düşük olsa da literatürde prodigiosinin antifungal etkisinin değişken olduğu ve çoğunlukla bakterilere karşı daha güçlü aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Darshan & Manonmani, 2015).

Çizelge 4.2. Prodigiosinin etil alkollü ekstraktının mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkileri

<u>Microorganizma</u>	<u>Inhibisyon zon çapı (mm)</u>			
	<u>Prodigiosin</u>	<u>Etil alkol</u>	<u>Gentamisin</u>	<u>Amfoterisin</u>
<i>Escherichia coli</i>	5,72± 1,84	-	7,32± 1,08	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	5,64± 1,09	-	7,40± 1,015	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	5,40± 1,38	1,04±0,002	7,08± 2,09	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	5,50± 1,44	1,09± 0,015	7,35± 2,021	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,98± 1,23	-	7,37± 1,89	-
<i>Bacillus spizizenii</i>	6,71± 2,05	1,58± 0,011	7,05± 2,34	-
<i>Bacillus subtilis</i>	4,86± 1,45	-	5,45± 1,21	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,26± 1,065	-	7,30± 2,07	-
<i>Klebsiella aerogenes</i>	9,86± 2,022	2,04± 0,022	9,11± 2,35	-
<i>Candida albicans</i>	4,59±1,022	-	5,46± 1,87	3,44± 0,96



Şekil 4.20. Prodigiosin pigmentinin etil alkollü ekstraktının disk difüzyon yöntemi ile oluşan inhibisyon zonlarının petri görüntüleri

4.8. Optimum Koşullarda Üretilen Prodigiosin Pigmentinin Karakterizasyonu

S. marcescens'den sentezlenen prodigiosin pigmentinin karakterizasyonu amacı ile UV-Visible spektrofotometresi, FT-IR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) spektroskopisi ve GC-MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi) analizleri yapılmıştır.

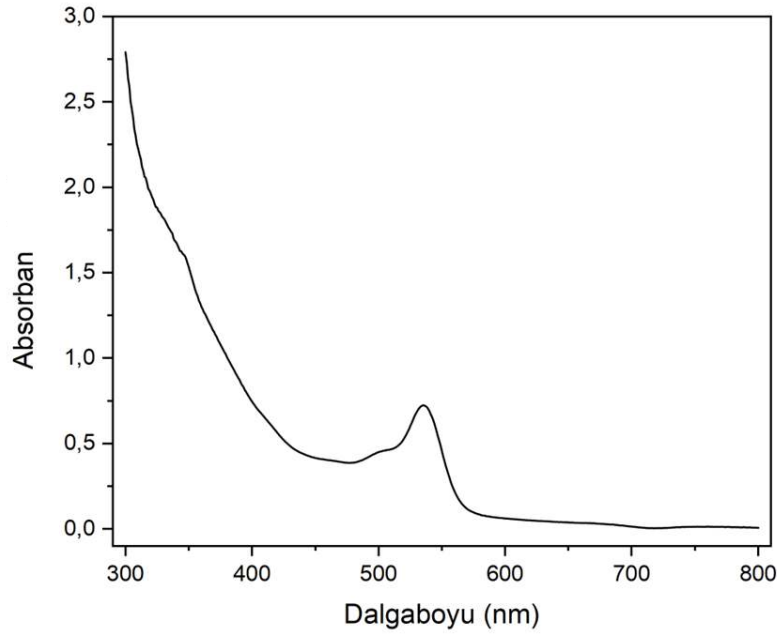
Bu çalışmada elde edilen pigmentin karakterizasyonu amacıyla UV-Vis spektrofotometri, FTIR ve GC-MS analizleri birlikte değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, pigmentin kimyasal yapısı ve bileşimi hakkında tamamlayıcı bilgiler elde edilmiştir.

4.8.1. Optimum Koşullarda Üretilen Prodigiosin Pigmentinin UV-vis Spektrofotometresi

UV-Vis spektrofotometrik analiz sonucunda elde edilen spektrumda yaklaşık 535 nm dalga boyunda belirgin bir absorbans piki gözlenmiştir. Bu değer, literatürde prodigiosin için bildirilen maksimum absorbans aralığı (530–540 nm) ile yüksek derecede uyum göstermektedir. Prodigiosin, konjuge üç pirol halkasından oluşan yapısı nedeniyle görünür bölgede güçlü absorpsiyon gösteren kırmızı renkli bir pigmenttir. Bu nedenle elde edilen UV-Vis sonucu, analiz edilen pigmentin prodigiosin veya prodigiosin-benzeri bir bileşik olduğunu güçlü şekilde desteklemektedir.

Williamson N. R. ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada prodigiosinin maksimum absorbansının yaklaşık 534 nm civarında olduğu rapor edilmiştir. Benzer şekilde farklı çalışmalarda da bu pigmentin görünür bölgede karakteristik olarak 535 nm civarında absorpsiyon gösterdiği belirtilmiştir. Bu bağlamda elde edilen UV-Vis verisi, çalışmada üretilen pigmentin prodigiosin yapısında olduğunu güçlü biçimde desteklemektedir. Azambuja, Feder ve Garcia (2004)'da 272 ve 538 nm'de maksimum piki veren maddenin

prodigiosin olduğunu doğrulamıştır. Lapenda, Silva, Vicalvi, Sena ve Nascimento (2015)'nin çalışmaları da elde edilen bu bulguları desteklemektedir.



Şekil 4.21. Prodigiosin pigmentinin UV-Vis spektrumu.

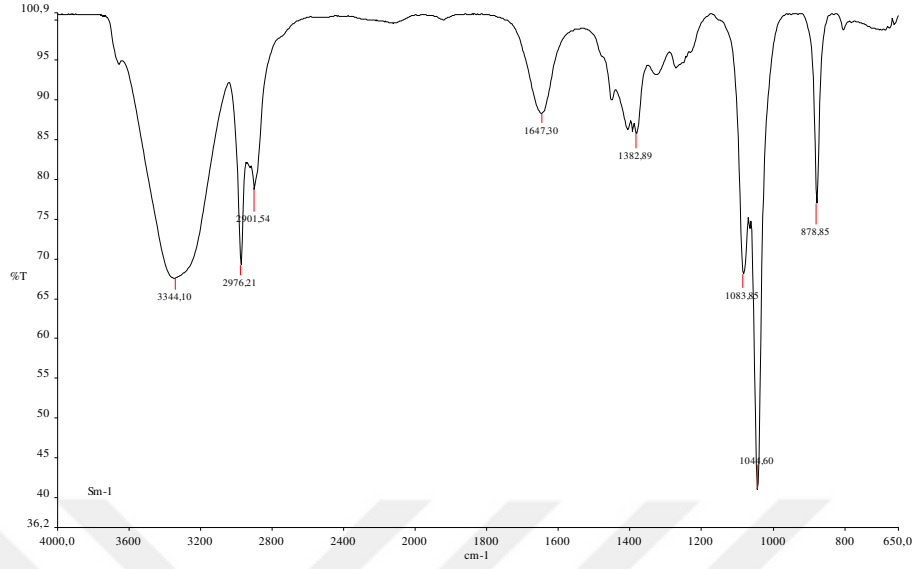
4.8.2. Optimum Koşullarda Üretilen Prodigiosin Pigmentinin FTIR Sonuçları

FTIR analizinde gözlenen bantlar, pigment yapısında aromatik halka sistemleri, C=N ve N-H fonksiyonel gruplarının varlığını işaret etmekte olup, bu bulgular prodigiosin yapısı ile uyumludur. Bununla birlikte FTIR analizi, fonksiyonel gruplar hakkında bilgi sağlamakla birlikte tek başına bileşiğin kesin kimliğini doğrulamak için yeterli olmayıp, UV-Vis ve diğer spektroskopik yöntemlerle desteklenmesi gerekmektedir.

FTIR analizinde gözlenen bantlar, pigment yapısında aromatik ve heterosiklik yapıların varlığını doğrulamaktadır. Özellikle N-H, C=N ve C-N gerilme titreşimlerine karşılık gelen bantlar, prodigiosinin pirol halkaları içeren yapısı ile uyumludur. GC-MS analizinde ise pigment bileşiğine ait doğrudan bir pik tespit edilememiş, bunun yerine yüksek alıkonma zamanlarında yoğun olarak uzun zincirli yağ asitleri (özellikle oleik asit ve palmitik asit) belirlenmiştir. Bu durum, ekstraksiyon sırasında lipofilik bileşenlerin de çözöldüğünü göstermektedir. Prodigiosinin GC-MS analizinde gözlenememesi, bu bileşiğin uçucu olmaması ve yüksek sıcaklıklarda termal olarak parçalanabilen bir yapıya sahip olması ile açıklanabilir.

Tüm analiz sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, elde edilen pigmentin UV-Vis verilerine dayanarak prodigiosin veya prodigiosin-benzeri bir yapıya sahip olduğu sonucuna

varılmıştır. Bununla birlikte, bileşiğin yapısını kesin olarak doğrulanması için LC-MS veya NMR gibi ileri analizleri de yapılmalıdır.



Şekil 4.22. Prodigiosin pigmentinin FTIR spektrumu.

FTIR analizinde 3300 cm^{-1} civarında N–H ve O–H gerilmesi gözlenmiştir. Pigment için özellikle N–H bantı pirol halkasının varlığını doğrulamaktadır. Bu bölgedeki absorpsiyon bantı prodigiosin için çok önemli bir destekleyici bulgudur.

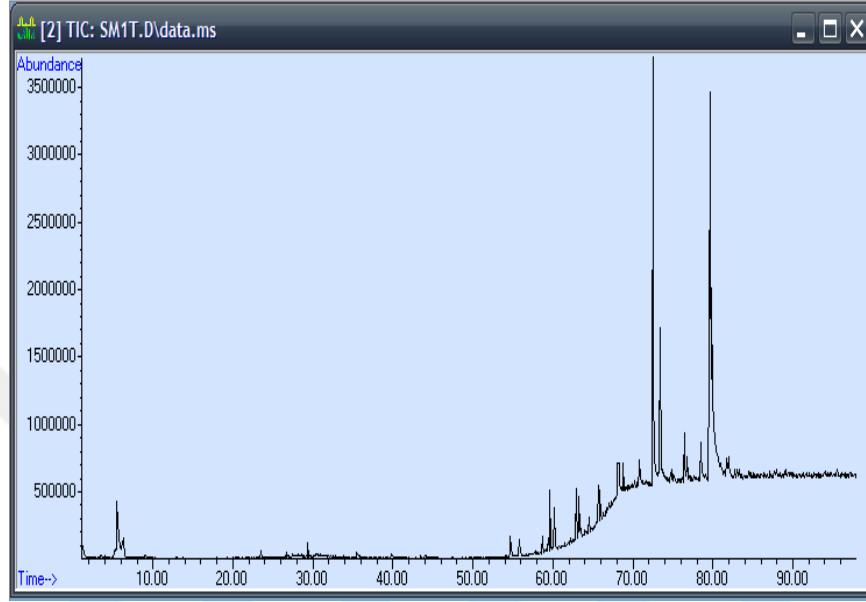
$2920\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$ civarındaki belirgin pikler ise alifatik C–H gerilmesi (CH_2 , CH_3) pigmentin alkil yan zincirine işaret etmektedir. Bu pikler aynı zamanda GC-MS ile uyumlu lipid varlığını da desteklemektedir. $1600\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ spektrumunda bu bölgedeki pikler C=C (aromatik) ve C=N (heterosiklik yapı) bantları prodigiosinin konjuge pirol sisteminin en önemli FTIR kanıtlarından biridir. $1400\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ civarındaki bantlar ise Pigment yapısı ile uyumlu olarak aromatik halka titreşimlerine aittir. $1200\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ civarındaki C–N gerilmesi pigmente ait pirol halkasına aittir.

Sonuç olarak, FTIR spektrumunda yaklaşık 3300 cm^{-1} civarında gözlenen bant, pirol halkasına ait N–H gerilme titreşimlerini işaret etmektedir. $2920\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$ aralığında belirlenen pikler alifatik C–H bağlarına karşılık gelirken, $1600\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ bölgesindeki bantlar aromatik C=C ve C=N titreşimlerini göstermektedir. Ayrıca $1200\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ aralığında gözlenen bantlar C–N gerilme titreşimleri ile ilişkilendirilmektedir. Bu fonksiyonel gruplar, prodigiosin yapısında bulunan konjuge pirol halkaları ile uyumlu olup, elde edilen pigmentin prodigiosin veya prodigiosin-benzeri bir bileşik olduğunu desteklemektedir.

4.8.3. Optimum Koşullarda Üretilen Prodigiosin Pigmentinin GC-MS

Sonuçları

Pigment ekstraktının kimyasal bileşimini belirlemek amacıyla GC-MS analizi yapılmıştır.



Şekil 4.23. Prodigiosin pigmentinin GC-MS analizi

GC-MS kromatogramı incelendiğinde, kromatogram boyunca farklı alıkonma zamanlarında çok sayıda pik olduğu görülmektedir. Erken alıkonma zamanı aralığında nispeten düşük yoğunluklu piklerin bulunduğu, buna karşılık kromatogramın ilerleyen kısımlarında pik yoğunluklarının ve büyüklüklerinin arttığı dikkat çekmektedir. Bu durum ekstrakt içerisinde düşük molekül ağırlıklı ve daha uçucu bileşiklerin yanı sıra daha yüksek molekül ağırlıklı ve hidrofobik karaktere sahip bileşiklerin de bulunduğunu göstermektedir. Yani ileri alıkonma zamanı bölgelerinde gözlenen bu belirgin pikler, ekstraktın nispeten daha az uçucu ve lipofilik özellikteki bileşikleri içerdiğine göstermektedir. Bu özellik, Prodigiosin pigmentinin kimyasal yapısı ile uyumludur. Prodigiosin, konjuge üç pirol halkasından oluşan aromatik bir yapı ve alkil yan zincirleri içeren lipofilik bir bileşik olduğundan gaz kromatografisi analizlerinde genellikle daha yüksek alıkonma zamanlarında elüe olabilmektedir. Diğer taraftan kromatogramda birden fazla pik olması, ekstraktın yalnızca tek bir pigment bileşiğinden oluşmadığını, besiyeri bileşenleri, bakteriyel metabolitler veya ekstraksiyon sürecinde birlikte çözünen diğer bileşiklerin de kromatografik olarak tespit edildiğini göstermektedir. Mikrobiyal pigment ekstraktlarında bu durum oldukça yaygın

olup özellikle *S. marcescens* tarafından üretilen pigmentlerin analizlerinde prodigiosin dışında çeşitli metabolitlerin de kromatogramda yer aldığı bildirilmektedir.

Literatürde yapılan çalışmalarda prodigiosin içeren ekstraktların GC–MS kromatogramlarında genellikle erken alıkonma zamanlarında düşük yoğunluklu piklerin ve daha geç bölgelerde daha belirgin piklerin gözleendiği rapor edilmiştir. Örneğin Ramesh C. Venil ve Palaniswamy Lakshmanaperumalsamy tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda, *S. marcescens*'den elde edilen prodigiosin ekstraktlarının GC–MS analizlerinde de birden fazla metabolit pikinin olduğu ve pigment bileşiminin nispeten geç alıkonma zamanlarında elüe olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde Darshan Singh ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da prodigiosin içeren ekstraktların GC–MS kromatogramlarında farklı metabolitlere ait çok sayıda pik bulunduğu ve pigment bileşiminin hidrofobik karakteri nedeniyle daha ileri alıkonma zamanlarında gözleendiği belirtilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen kromatografik profil de literatürde bildirilen prodigiosin içeren mikrobiyal pigment ekstraktlarının GC–MS kromatogramları ile genel olarak benzerlik göstermektedir. Dolayısıyla elde edilen sonuçlar, ekstraktın *S. marcescens* tarafından sentezlenen prodigiosin pigmentini ve bazı metabolitleri içerdiğini desteklemektedir. Sonuç olarak elde edilen GC–MS kromatogramı, pigment ekstraktının kompleks bir metabolit profiline sahip olduğunu ve pigment bileşiminin hidrofobik özellikte bir yapı sergilediğini göstermektedir. Kromatografik profilin literatürde *S. marcescens* kaynaklı prodigiosin ekstraktları için bildirilen GC–MS kromatogramları ile genel olarak benzer özellikler göstermesi, elde edilen bulguların literatür ile uyumlu olduğunu ortaya koymaktadır.

Kromatogramda ileri alıkonma zamanlarında gözlenen baskın pikler, ekstraktın lipofilik ve düşük uçuculuk özellikteki bileşikleri içerdiğini göstermiştir. Prodigiosin pigmenti de benzer lipofilik özellikler gösterdiği için bu RT aralığı teorik olarak prodigiosin için uygun olabilir. Ancak mevcut kütüphane eşleşmeleri bu pikleri oleik asit ve palmitik asit gibi yağ asitleri olarak tanımladığından, bu yüksek RT (pik 12, 13) piklerinin prodigiosin olduğunu kesin olarak söylemek mümkün değildir. Yani yüksek RT ve lipofilik özellikler prodigiosin ile uyumlu, ama GC-MS tek başına kesin tanımlama için yeterli değildir. Pigment yapısının GC-MS analizinde doğrudan tespit edilememesi, prodigiosin pigmentinin yüksek molekül ağırlıklı olması, uçucu olmaması ve ısıya duyarlı olmasından dolayı termal olarak kararsız olmasıyla ilişkilidir. Bu nedenle pigment karakterizasyonu için UV-Vis, FTIR, NMR ve LC-MS gibi tekniklerin daha uygun olduğu düşünülmektedir. LC-MS analizi, uçucu olmayan ve termal olarak kararsız bileşiklerin analizinde yüksek duyarlılık ve

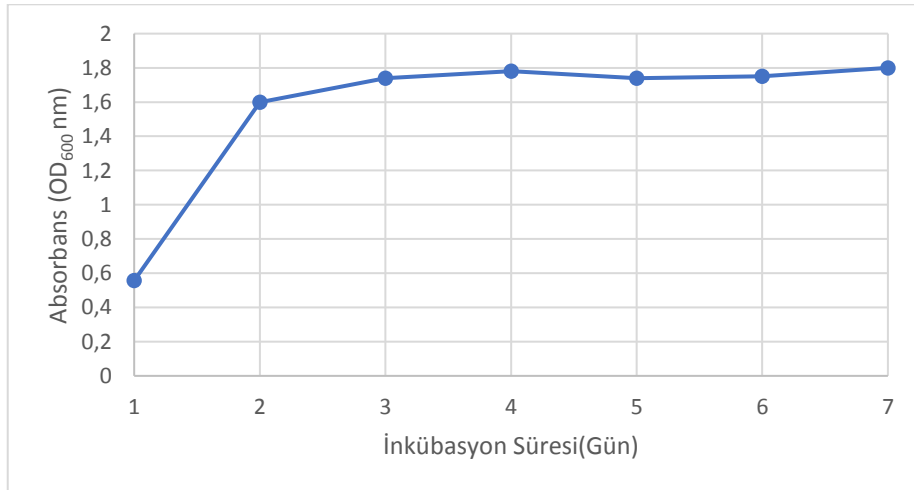
doğruluk sağlayan bir tekniktir. Bu nedenle Prodigiosin gibi kompleks ve uçucu olmayan pigmentlerin karakterizasyonunda GC-MS yerine LC-MS kullanımı daha uygun olup, molekül ağırlığının doğrudan belirlenmesinde daha iyi bir analiz yöntemidir.

NMR spektroskopisi de moleküler yapının doğrudan belirlenmesine olanak sağlayan en güvenilir tekniklerden biridir. Prodigiosin gibi kompleks yapılu pigmentlerin kesin karakterizasyonu için özellikle ^1H ve ^{13}C NMR analizleri kullanılmaktadır. Bu yöntem sayesinde pirol halkalarına ait karakteristik proton ve karbon sinyalleri belirlenebilmekte ve bileşiğin yapısı kesin olarak doğrulanabilmektedir.

Sonuç olarak, elde edilen pigmentin UV-Vis spektrumunda 535 nm civarında karakteristik absorptans piki gözlenmiş, FTIR spektrumunda ise 3300 cm^{-1} civarında N-H, $1600\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ civarında aromatik C=C/C=N ve $1200\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ civarında C-N gerilme titreşimleri belirlenmiştir. Bu verilerin birlikte değerlendirilmesi, elde edilen pigmentin prodigiosin ile uyumlu bulgular prodigiosin-benzeri bir yapıya sahip olduğunu desteklemektedir.

4.9. *S. marcescens*'in Optimum Koşullarda Üremesinin Ölçülmesi

S. marcescens, LB besiyerinde 20°C 'de, statik koşullarda 7 gün boyunca üretilmiştir. Günü gelen örneklerden 1 ml alınarak bakteri üremesini belirlemek amacıyla spektrofotometrede 600 nm 'de optik yoğunlukları ölçülmüştür. Elde edilen OD_{600} değerleri bakteriyel büyümenin zamana bağlı değişimini gösteren grafik şekil 4.25'te verilmiştir.

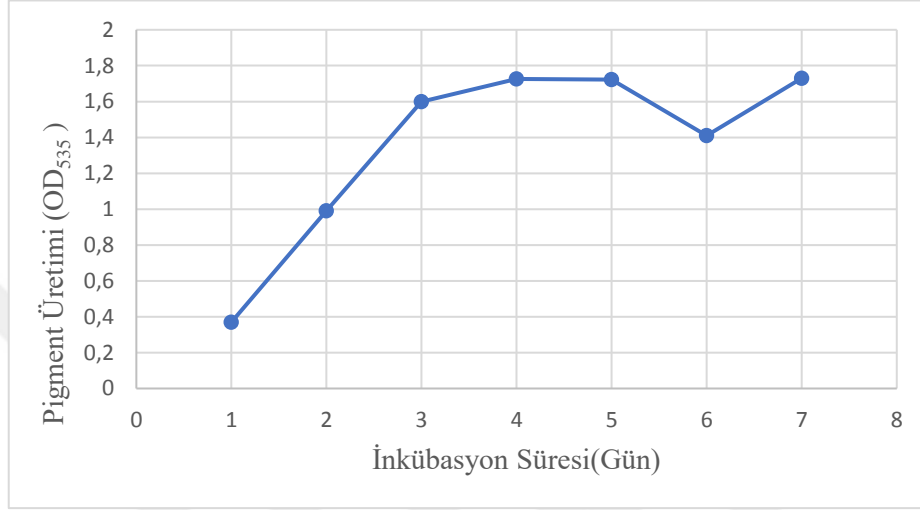


Şekil: 4.24. *S. marcescens*'in optimum koşullarda 1-7 günlük OD_{600} de bakteriyel büyümenin zamana bağlı değişimi

S. marcescens bakterisinin 2. gün çok hızlı bir biyokütle artışı olduğu 4. günde en yüksek düzeye ulaştığı görülmektedir.

4.10. *S. marcescens*'in Optimum Koşullarda Pigment Üretimini Ölçülmesi

S. marcescens, optimum koşullarda (20 °C, statik LB besiyerinde 1–7 gün süreyle inkübe edilmiştir. Belirlenen zaman noktalarından alınan örneklerden bölüm 3.7.6'da anlatıldığı yöntemlerle pigment ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen pigment çözeltisi spektrofotometrede 535 nm dalga boyunda etanole karşı ölçülmüştür. En yüksek pigment üretiminin 4. gün olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.25 *S. marcescens*'in OD₅₃₅ pigment üretiminin ölçülmesi

4.11. Pigmentlerin Model Uygulama Denemeleri

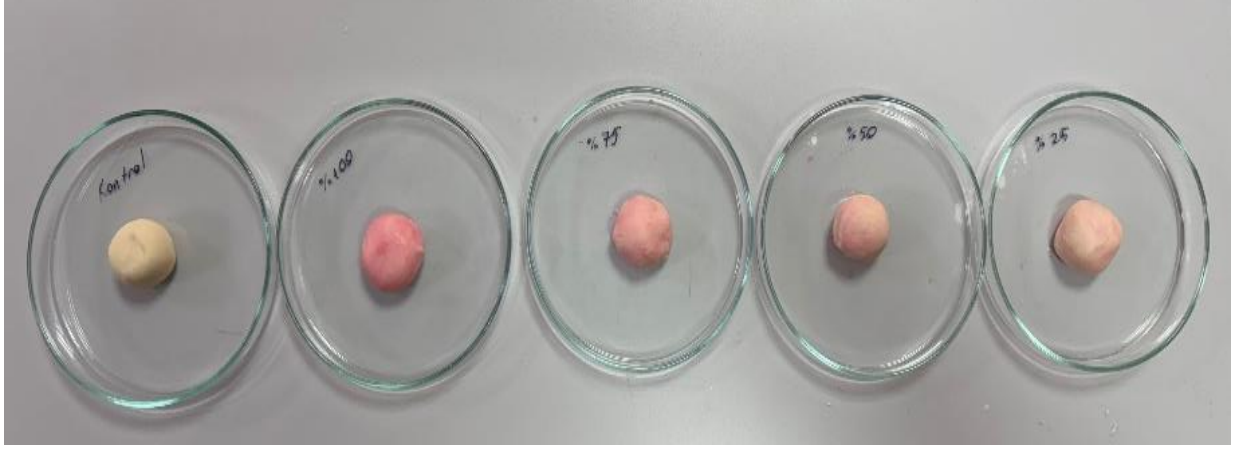
Çalışmamızın bu aşamasında, elde edilen prodigiosin pigmentinin renk stabilitesini koruyup korumadığını ve renklendirici olarak kullanılabilirliğini test etmek amacıyla çeşitli uygulamalar yapılmıştır. Öncelikle optimum koşullarda elde ettiğimiz prodigiosin pigmentini steril etmek amacıyla 0.22 mm çapındaki biyolojik membran filtrelerden geçirilmiştir ve elde ettiğimiz prodigiosin pigmentini çeşitli uygulamalarda kullanılarak performansı değerlendirilmiştir.



Şekil 4.26. Elde edilen pigmentlerin endüstriyel uygulamaları için yapılan işlem aşamaları

4.11.1. Un-tuz Bazlı Model Hamur Matriksinde Renklendirme Denemesi

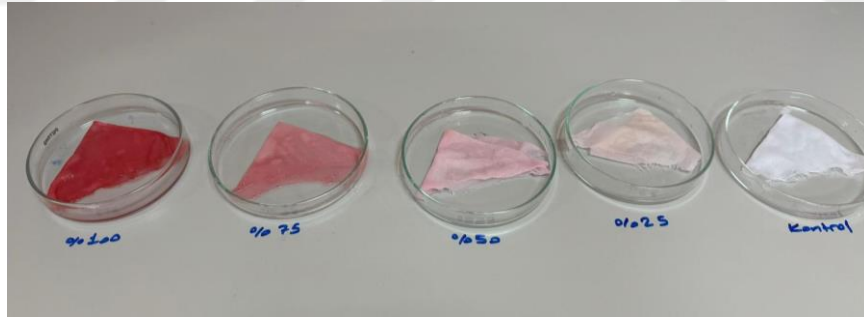
Bu amaç doğrultusunda öncelikle 60 g un, 30 g tuz, 5 mL sıvı yağ ve 50 mL su kullanılarak laboratuvar koşullarında model oyun hamuru hazırlanmıştır. Elde edilen hamurlar 5 gramlık örnekler halinde ayrılmış ve bu örneklerle prodigiosin pigmenti %100, %75, %50 ve %25 oranlarında ilave edilmiştir. Bu örnekler homojen bir yapı elde edilinceye kadar karıştırılmıştır. Ardından hazırlanan hamur örnekleri, mikrodalga fırında 100 °C sıcaklıkta 1 dakika süreyle ısıl işleme tabi tutulmuştur. Isıl işlem sonrasında katılaştan örneklerin renk stabilitesi ve olası renk değişimleri bir hafta boyunca gözlemlenmiştir.



Şekil 4.27. Oyun hamurlarına farklı oranlarda (%100, %75, %50, %25) prodigiosin pigmentinin uygulanması

4.11.2. Ön Boyama/ Renklendirme Denemesi

Bu çalışmada, elde edilen ve prodigiosin pigmentlerinin, kumaşta boyar madde olarak kullanımının araştırılması amaçlanmıştır. Oyun hamura hazırladığımız oranlarda prodigiosin pigmentini 5 cm'lik parçalar halinde hazırladığımız tülbent kumaşlara uyguladık. 24 saat beklettikten sonra boyanmış olan kumaşlar 30 saniye kadar %10'luk sirkeli suda kaynatılmış ve boyanın kumaşa tutunması sağlanmıştır. Kaynatma işleminin ardından kumaşlar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.



Şekil 4.28. Prodigiosin pigmentinin 5cm' lik kumaş parçalarına farklı oranlarda (%100, %75, %50, %25) uygulanması

4.11.3. Ön Formülasyon Denemesi

Bu çalışmada, elde edilen prodigiosin pigmentinin kozmetikte kullanımının ortaya konması amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan 2 mL prodigiosin pigmenti şeffaf dudak renklendiricisine uygulanmıştır. Ancak bu denemede sitotoksosite, irritasyon, stabilite ve mikrobiyal güvenlik testleri yapılmamıştır.



Şekil 4.29. Prodigiosin pigmentinin 2 ml olacak şekilde şeffaf dudak renklendiricisine uygulanması

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, pigment üretme yeteneğine sahip olduğu bilinen *F. oxysporum* ve *S. marcescens* mikroorganizmalarının en uygun pigment üretim koşulları belirlenmiştir. Pigment üretimini artırmak amacıyla inkübasyon süresi, sıcaklık, başlangıç pH değeri, ışık ve karanlık koşullar, çalkalama gibi farklı üretim parametreleri ve alternatif üretim ortamları denenmiştir. *F. oxysporum* için Sabouraud Dekstroz Agar (SDA), Patates Dekstroz Agar (PDA) ve Czapek Agar; *S. marcescens* için ise Nutrient Agar (NA) ve Luria–Bertani Agar (LB) besiyerleri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, *F. oxysporum* için en uygun pigment üretim ortamının PDA besiyeri olduğu belirlenmiştir. Maksimum pigment üretiminin; aydınlık inkübasyon koşullarında, 150 rpm çalkalama hızında, 25 °C sıcaklıkta, başlangıç pH 9.0 değerinde ve 7 günlük inkübasyon süresinde gerçekleştiği saptanmıştır. *S. marcescens* için ise en uygun pigment üretim ortamının Luria–Bertani (LB) besiyeri olduğu belirlenmiş; optimum pigment üretiminin statik üretim koşullarında, 20 °C sıcaklıkta, başlangıç pH 5.0 değerinde ve 4 günlük inkübasyon süresinde elde edildiği tespit edilmiştir. Daha sonra optimum koşullarda elde edilen fungal ve bakteriyel pigmentler uygun çözücülerde ekstrakte edilerek, kısmi saflaştırma işlemlerinin ardından UV-Vis spektrofotometre, FT-IR, NMR ve GC-MS analizleri ile karakterize edilmiştir. Ayrıca elde edilen pigmentlerin antimikrobiyal özellikleri araştırılmıştır. Elde edilen pigmentlerin kozmetik, oyun hamuru ve tekstil materyallerinde ön boyama ve renklendirme denemeleri yapılmıştır. Ancak bu denemelerde sitotoksikite, irritasyon, stabilite ve mikrobiyal güvenlik testleri yapılmamıştır.

S. marcescens bakterisinden elde edilen kısmi olarak saflaştırılmış pigmentin UV-Vis spektrumunda 535 nm civarında karakteristik absorbanans piki gözlenmiş, FTIR spektrumunda ise 3300 cm⁻¹ civarında N–H, 1600–1650 cm⁻¹ civarında aromatik C=C/C=N ve 1200–1300 cm⁻¹ civarında C–N gerilme titreşimleri belirlenmiştir. Bu verilerin birlikte değerlendirilmesi, elde edilen pigmentin prodigiosin ile uyumlu bulgular prodigiosin-benzeri bir yapıya sahip olduğunu desteklemektedir. Ancak bakteriye ait GC–MS kromatogramı, her ne kadar pigment ekstraktının kompleks bir metabolit profiline sahip olduğunu ve pigment bileşiğinin hidrofobik özellikte bir yapı sergilediğini göstermekle beraber, prodigiosin gibi kompleks ve uçucu olmayan pigmentlerin karakterizasyonunda GC-MS yerine LC-MS kullanımı daha kesin ve doğru sonuç verecektir. Çünkü prodigiosin pigmentinin yüksek molekül ağırlıklı olması, uçucu olmaması ve termal olarak kararsız olması nedeniyle GC-MS analizinde doğrudan tespit edilmesi mümkün değildir. LC-MS

analizi, uçucu olmayan ve termal olarak kararsız bileşiklerin analizinde yüksek duyarlılık ve doğruluk sağlayan daha uygun bir tekniktir.

S. marcescens'den elde edilen prodigiosin pigmentinin etil alkollü ekstraktının antimikrobiyal aktivitesi değerlendirildiğinde, hem Gram pozitif ve hem de Gram negatif bakterilere karşı etkili olduğu, özellikle de Gram negatif *K. aerogenes* bakterisinde daha yüksek inhibisyon zonları (9,86 mm) oluşturduğu dikkat çekmektedir. Sonuçlar, *S. marcescens* tarafından üretilen prodigiosin gibi sekonder metabolitlerin, geniş spektrumlu bir antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Optimum koşullarda üretilen *F. oxysporum*'dan elde edilen pigmentin, FTIR, GC-MS, UV-Vis ve ¹H NMR analizleri ile karakterizasyonu yapılmıştır. *Fusarium* türlerinin sekonder metabolizma kapsamında aynı anda birden fazla pigment ürettiği göz önüne alındığında, ekstrakte edilen örneğin bikaverin ve fusarubin türevleri gibi yapısal olarak benzer bileşiklerin bir karışımı olduğu ve çalışmada izole edilen pigmentin muhtemelen *Fusarium* türlerine özgü poliketid kökenli, aromatik ve yüksek derecede konjuge bir bileşik olduğunu desteklemektedir; ancak tam tanımlama için LC-MS ve saf standartla karşılaştırma yapılması gereklidir.

F. oxysporum'dan elde edilen pigmentlerin antimikrobiyal aktivitesi değerlendirildiğinde, ekstraktın bazı mikroorganizmalar üzerinde düşük–orta düzeyde ve seçici bir inhibisyon oluşturduğu belirlenmiştir. Fungal pigmentlerin içerdiği fenolik ve poliketid yapıli bileşiklerin hücre zarını bozma ve oksidatif stres oluşturma yoluyla antimikrobiyal etki gösterdiği bilinmektedir. Pigment ekstraktı özellikle *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* ve *K. aerogenes* üzerinde sınırlı inhibisyon zonları oluştururken, *E. coli*, *E. faecalis* ve *K. pneumoniae* üzerinde etkisiz kalmıştır. Bu durum, fungal pigmentlerin mikroorganizmalara karşı seçici etki gösterebildiğini ortaya koymaktadır.

Son yıllarda sentetik pigmentler hem çevresel ve hem de insan sağlığı üzerindeki tehditlerinden dolayı oldukça endişe verici duruma gelmiştir. Sentetik pigmentlerin bu olumsuz etkilerine yönelik artan farkındalık biyopigmentlere olan ilgiyi önemli ölçüde artırmış ve sentetik pigmentlere alternatif olarak kullanım potansiyeli artmıştır. Bu tez kapsamında, fungal ve bakteriyel pigmentlerinin sentezini arttıracak üretim koşulları test edilmiş ve elde edilen bulgular, pigment üretiminin yalnızca mikroorganizmanın türüne değil, aynı zamanda çevresel ve kültürel parametrelere bağlı olduğunu açıkça göstermiştir. Özellikle pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi gibi faktörlerin pigment biyosentez yollarını doğrudan etkilediği ve belirli eşik değerlerin üzerinde ya da altında pigment üretiminin belirgin şekilde baskılandığı gözlemlenmiştir.

Bitkisel kaynaklı doğal pigmentlerin üretiminde karşılaşılan mevsimsellik, düşük verim ve ekstraksiyon zorlukları gibi sınırlamalar gibi dezavantajlardan dolayı, bakteri, maya ve mantar gibi mikroorganizma kaynaklı pigmentlerin daha uygulanabilir bir alternatif olarak öne çıkmasına neden olmuştur ve doğal pigmentlerin endüstriyel alanda kullanımı giderek önem kazanmıştır. Mikroorganizmaların kontrollü koşullar altında hızlı çoğalabilmesi, üretimin iklimden bağımsız gerçekleştirilebilmesi, üreme ortamlarından pigment ekstraksiyon maliyetinin düşük olması ve düşük maliyetli substratların kullanılabilmesi, bu sistemleri endüstriyel ölçekte daha avantajlı hale getirmiştir.

Mikroorganizmalardan elde edilen ve sekonder metabolit olarak üretilen pigmentler antioksidan, antikanser, antimikrobiyal ve antifungal etki göstermekte ve bu nedenlerle klinik ve farmasötik araştırmalar açısından ilgi çekmektedir. Aynı zamanda mikrobiyal pigmentler, biyolojik olarak parçalanabilir ve çevre dostudur.

Mikrobiyal kaynaklı pigmentler gıda, tekstil ve ilaç endüstrisinde kullanılan önemli bileşiklerdir. Gıda endüstrisinde; katkı maddesi, renk artırıcı ve antioksidan olarak kullanılırlar. Aynı zamanda antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, antiprotozoal, antidiyabet, yara onarımı, yaşlanma karşıtı, parkinson ve migren tedavisinde, katarakt önlenmesinde, antiülserojenik ve daha pek çok biyolojik aktivitelere sahiptir. Özellikle Prodigiosin pigmentinin içerdiği pirol halkasına bağlı olarak gösterdiği antiproliferatif etkiler, bu bileşiğin antikanser araştırmalarında önemli bir aday olabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, mikrobiyal pigmentlerin “çift fonksiyonlu” (renklendirici + biyolojik aktivite) ajanlar olarak değerlendirilmesini mümkün kılmakta ve özellikle gıda ve farmasötik uygulamalar açısından önemli bir avantaj sağlamaktadır. Bu yönüyle değerlendirildiğinde, mikrobiyal pigmentler yalnızca endüstriyel renklendiriciler olarak değil, aynı zamanda önemli biyoteknolojik ürünler olarak da büyük bir potansiyele sahiptir.

Bu nedenle, mikroorganizmalardan daha yüksek oranlarda pigmentlerin sentezlenmesi konusunda ve biyoteknolojik ve farmakolojik uygulamalar için bu pigmentlerin kimyasal yapısı ve fonksiyonları üzerine daha fazla çalışılması gerekmektedir. Tüm dünyada çevreye ve insanlara zarar vermeyen doğal pigmentlerin araştırılması büyük önem kazanmıştır ve farklı parametreler (sıcaklık, pH, nem, çalkalama hızı ve farklı besiyeri kaynakları) kullanılarak yapılan çalışmalar giderek önem kazanmıştır.

Bu çalışmanın sonuçları her ne kadar umut verici olsa da pigment üretiminin endüstriyel ölçekte uygulanabilirliği açısından daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle üretim veriminin daha da artırılması, süreçlerin standardize edilmesi ve pigmentlerin ileri düzey saflaştırılması gerekliliği dikkat çekmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma mikrobiyal pigment retimnin optimize edilebilir ve geliştirilebilir bir süreç olduğunu ortaya koymakta; uygun koşullar sağlandığında sentetik pigmentlere kıyasla evre dostu, doğal, güvenilir, biyolojik olarak parçalanabilir ve fonksiyonel alternatifler olabileceğini güçlü biçimde desteklemektedir.



KAYNAKÇA

- Abd-EL-Aziz, A. S., Abed, N. N., Mahfouz, A. Y., & Fathy, R. M. (2024).** “Production and characterisation of melanin pigment from black fungus *Curvularia soli* AS21 ON076460 assisted gamma rays for promising medical uses.” *Microbial Cell Factories*, 23(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02335-y>.
- Abboud, A. N., & Arment, A. (2013).** “The protective effects of the violacein pigment against UV-C irradiation in *Chromobacterium violaceum*.” *Ohio Journal of Science*, 111(2–5), 28–32.
- Agarwal H.; Bajpai S.; Mishra A.; Kohli I.; Varma A.; Fouillaud M.; Dufosse L.; Joshi N., (2023).** “Bacterial Pigments and Their Multifaceted Roles in Contemporary Biotechnology and Pharmacological Applications,” *Microorganisms*, 10.3390/microorganisms11030614
- Alsharif, K. F., Albrakati, A., Al Omairi, N. E., Almalki, A. S., Alsanie, W., Abd Elmageed, Z. Y., Alharthi, F., Althagafi, H. A., Alghamdi, A. A. A., Hassan, I. E., Habotta, O. A., Lokman, M. S., Kassab, R. B., & El-Hennamy, R. E. (2023).** “Neuroprotective efficacy of the bacterial metabolite, prodigiosin, against aluminium chloride induced neurochemical alternations associated with Alzheimer’s disease murine model: Involvement of Nrf2/HO-1/NF-κB signaling.” *Environmental Toxicology*, 38(2), 266–277. <https://doi.org/10.1002/tox.23718>.
- Al-Sa’ady, A. J., Al-Obaidi, M. J., Hanoon, A. Y., & Hassan, H. A. (2023).** Improvement of crude bikaverin production by *Fusarium oxysporum* and evaluation of antimicrobial effectiveness. *University of Thi-Qar Journal of Science*, 10(1), 55–63. <https://doi.org/10.32792/utq/utjsci/v10i1.926>
- Anitha, J., Muthusankar, A., Viswanathan, S., Murugesan, P., Gayathri, N. C., Selvakumar, R., & Premkumar, T. (2023).** “Molecular targeting of prodigiosin against anti-inflammatory genes cyclooxygenase-1 and-2.” *Process Biochemistry*, 126, 260–271. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.01.015>.
- Arikan, E. B., Canli, O., Caro, Y., Dufossé, L., & Dizge, N. (2020).** Production of bio-based pigments from food processing industry by-products using *Aspergillus carbonarius*. *Journal of Fungi*, 6(4), 240. <https://doi.org/10.3390/jof6040240>
- Arora, K.; Ameer, H.; Polo, A.; Di Cagno, R.; Rizzello, C.G.; (2021).** “Thirty Years of Knowledge on Sourdough Fermentation: A Systematic Review,” *Trends Food Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.008>

- Aruldass, C.A.; Dufossé, L.; Ahmad, W.A. (2018),** “Current Perspective of Yellowish-Orange Pigments from Microorganisms—A Review.” *J. Clean. Prod.*, 180, 168–182.
- Arulselvi, I. P., Umamaheswari, S., Sharma, R. G., Kartik, C., and Jayakrishna, C. (2014).** “Screening of yellow pigment producing bacterial isolates from various eco-climatic areas and analysis of the carotenoid produced by the isolate.” *J. Food. Process Technol.* 5:292. doi:10.4172/2157-7110.1000292
- Avalos, J., & Limón, M. C. (2015).** Biological roles of fungal carotenoids. *Current Genetics*, 61(3), 309–324. <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0454-x>
- Babitha, S. et al. (2007).** Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments.
- Babitha, S. (2009).** “Microbial pigments,” in *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, eds P. Singh-Nee Nigam and A. Pandey (Dordrecht: Springer), 147–162. doi: 10.1007/978-1-4020-9942-7_8
- Barreto, J.V.d.O.; Casanova, L.M.; Junior, A.N.; Reis-Mansur, M.C.P.P. (2023)** “Vermelho, A.B. Microbial Pigments: Major Groups and Industrial Applications,” *Microorganisms*, 11, 2920. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122920>
- Bisht, G.; Srivastava S.; Kulshreshtha R.; Sourirajan A.; Baumler D.; Dev K.; (2020).** “Applications of red pigments from psychrophilic *Rhodospirillum rubrum* GL8 in health, food and antimicrobial finishes on textiles,” *Process Biochemistry*, 10.1016/j.procbio.2020.03.021.
- Chadni, Z., Rahaman, M. H., Jerin, I., Hoque, K. M. F., & Reza, M. A. (2017).** “Extraction and optimisation of red pigment production as secondary metabolites from *Talaromyces verruculosus* and its potential use in textile industries.” *Mycology*, 8(1), 48–57. <https://doi.org/10.1080/21501203.1302013>,
- Chatragadda, R.; Dufossé, L. (2021).** “Ecological and Biotechnological Aspects of Pigmented Microbes,” *A Way Forward in Development of Food and Pharmaceutical Grade Pigments. Microorganisms*, 9, 637. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030637>
- Chin, S. W., Azman, A. S., (2024).** “Microbial Pigments and Therapeutic Potential: Current Status and Opportunities.” *Bioprospecting of Natural Pigments in Human Health*. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-24017-1.00011-7>
- Darshan, N., & Manonmani, H. K. (2015).** *Prodigiosin and its potential applications*. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 5393–5407.

- Davinelli, S., Nielsen, M. E., & Scapagnini, G. (2018).** “Astaxanthin in skin health, repair, and disease: A comprehensive review.” *Nutrients*, 10, 522. <https://doi.org/10.3390/nu10040522>.
- De Carvalho, J. C., Cardoso, L. C., Ghiggi, V., Woiciechowski, A. L., de Souza Vandenberghe, L. P., and Soccol, C. R. (2014).** “Microbial pigments,” in *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*, eds S. K. Brar, G. S. Dhillon, and M. Fernandes (New York, NY: Springer), 73–97. doi: 10.1007/978-1-4614-8005-1_4
- De Carvalho, J.C. (2014).** “Microbial Pigments. In *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*; Brar, S.K., Dhillon, G.S., Soccol, C.R., Eds.”; Springer: New York, NY, USA, 2014; pp. 73–98.
- De Souza Mesquita, L.M.; Martins, M.; Pisani, L.P.; Ventura, S.P.M.; De Rosso, V.V. (2021).** “Insights on the Use of Alternative Solvents and Technologies to Recover Bio-based Food Pigments,” *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 20, 787–818. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12685>
- Di Salvo, E.; Lo Vecchio, G.; De Pasquale, R.; De Maria, L.; Tardugno, R.; Vadalà, R.; Cicero, N. (2023)** “Natural Pigments Production and Their Application in Food, Health and Other Industries.” *Nutrients*, 15, 1923. <https://doi.org/10.3390/nu15081923>
- Dodou, H. V., Batista, A. H. M., Medeiros, S. C., Sales, G. W. P., Rodrigues, M. L., Pereira, P. I. O., Nogueira, P. C. N., Silveira, E. R., Grangeiro, T. B., & Nogueira, N. A. P. (2020).** “Violacein antimicrobial activity on *Staphylococcus epidermidis* biofilm.” *Natural Product Research.*, 34(23), 3414–3417. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1569654>.
- Downham, A., and Collins, P. (2000).** “Coloring our foods in the last and next millennium.” *Int. J. Food Sci. Technol.* 35, 5–22. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00373.x>
- Dufossé, L. (2006).** Microbial production of food grade pigments. *Food Technology and Biotechnology*, 44(3), 313–321.
- Dufossé, L., Fouillaud, M., Caro, Y., Mapari, S. A. S., & Sutthiwong, N. (2014).** Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants. *Fungal Biology Reviews*, 28(2–3), 97–107.
- Duran, N., Justo G. Z., Duran M., Brocchi M., Cordi L., Tasic L., Castro G. R., Nakazato G., (2016)** “Advances in *Cromobacterium violaceum* and properties of

- violacein-its main secondary metabolite: a review.” *Biotechnology advances*. 1030–1045. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.06.003>
- Elattaapy, A. M., & Selim, M. A. E. (2020).** Factors affecting red pigment production by local fungal isolate of *Penicillium* sp. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 11(9), 255–261.
- Garrido-Fernandez, J., Maldonado-Barragan, A., Caballero-Guerrero, B., Hornero-Mendez, D., and Ruiz-Barba, J. L. (2010).** “Carotenoid production in *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Food. Microbiol.* 140, 34–39. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.015
- Giri, A. V., Anandkumar, N., Muthukumaran, G., & Pennathur, G. (2004).** A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 9, 185–190.
- Gmoser, R., Ferreira, J., Taherzadeh, M., & Lennartsson, P. (2019).** Post-treatment of fungal biomass to enhance pigment production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
- Grimont, P. A. D., & Grimont, F. (1978).** The genus *Serratia*. *Annual Review of Microbiology*, 32, 221–248.
- Haddix, P. L., & Shanks, R. M. Q. (2018).** *Probing the role of prodigiosin in Serratia marcescens physiology*. *Microbiology*, 164, 147–155.
- Han, R., Xing, R., Wang, F., Wang, C., (2021).** “High-Level Production of Microbial Prodigiosin: A Review.” *Journal of Basic Microbiology*. 61:506–523. doi: 10.1002/jobm.202100101
- Heer K.; Sharma S.; (2017),** “Microbial Pigments As A Natural Color: A Review,” *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8(5): 1913-1922
- Ibrahim G. S., Abdelhamid A. S., Elmansy A. E., Asker m. M., El Shall N. F., (2023).** “Red Pigment From Isolated *Serratia Marcescens* SEM: Structure, Antimicrobial and Antioxidant Activity.” *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102932>
- Isao Fujii, K. et al. (1998).** Polyketide biosynthesis in filamentous fungi. *Natural Product Reports*.
- Iwata, S., Imai, T., Shimazawa, M., Ishibashi, T., Hayashi, M., Hara, H., & Nakamura, S. (2018).** “Protective effects of the astaxanthin derivative, adonixanthin, on brain hemorrhagic injury.” *Brain Research*, 1698, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.08.009>.

- Jaswir, I., Noviendri, D., Hasrini, R. F., and Octavianti, F. (2011).** “Carotenoids: Sources, Medicinal Properties And Their Application In Food And Nutraceutical Industry.” J. Med. Plants Res. 5, 7119–7131. doi: 10.5897/JMPRx11.011
- Jayaseelan, S., Ramaswamy, D., and Dharmaraj, S. (2014).** “Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights.” World. J. Microbiol. Biotechnol. 30, 1159–1168. doi: 10.1007/s11274-013-1552-5
- Jens Nielsen&Villadsen, J. (2017).** *BioreactionEngineeringPrinciples*. Springer.
- Jeong, S.W.; Yang, J.E.; Choi, Y.J., (2022).** “Isolation and Characterization of a Yellow Xanthophyll Pigment-Producing Marine Bacterium, Erythrobacter Sp. SDW2 Strain, in Coastal Seawater.” Mar. Drugs, 20, 73.
- Jimenez M.; Brebdelli M.; 2020.,** “Natural Pigments of Microbial Origin,” Frontiers in Sustainable Food Systems, 10.3389/fsufs.2020.590439
- Kabir, Md. T., Rahman, Md. H., Shah, M., Jamiruddin, M. R., Basak, D., Al-Harrasi, A., Bhatia, S., Ashraf, G. M., Najda, A., El-kott, A. F., Mohamed, H. R. H., Al-malky, H. S., Germoush, M. O., Altyar, A. E., Alwafai, E. B., Ghaboura, N., & Abdel-Daim, M. M. (2022).** “Therapeutic promise of carotenoids as antioxidants and anti-inflammatory agents in neurodegenerative disorders.” Biomedicine and Pharmacotherapy., 146, 112610. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112610>
- Kim, H. J., Lee, M.-S., Jeong, S. K., & Lee, S. J. (2023).** “Transcriptomic analysis of the antimicrobial activity of prodigiosin against Cutibacterium acnes.” Scientific Reports., 13(1), 17412. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44612-7>.
- Kramar, A., Ilic-Tomic, T., Petkovic, M., Radulović, N., Kostic, M., Jovic, D., & Nikodinovic-Runic, J. (2014).** “Crude bacterial extracts of two new *Streptomyces* sp. isolates as bio-colorants for textile dyeing.” World Journal of Microbiology and Biotechnology, 30(8), 2231–2240. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1644-x>.
- Kocher, S., and Muller, V. (2011).** “The Nature And Function Of Carotenoids In The Moderately Halophilic Bacterium *Halobacillus Halophilus*,” in Halophiles and Hypersaline Environments, eds A. Ventosa, A. Oren, and Y. Ma (Berlin:Springer), 303–317.
- Lagashetti, A. C., Duffosé L., Singh S. K., Singh P. N., (2019).** “Fungal Pigments and Their Prospects in Different Industries.” 7, 604; doi:10.3390/microorganisms7120604
- Lai, J.-R., Hsu, Y.-W., Pan, T.-M., & Lee, C.-L. (2021).** “Monascin and ankaflavin of *Monascus purpureus* prevent alcoholic liver disease through regulating AMPK-

- mediated lipid metabolism and enhancing both anti-inflammatory and anti-oxidative systems.” *Molecules*, 26(20), 6301. <https://doi.org/10.3390/molecules26206301>.
- Lebeau, J., Petit, T., Dufossé, L., Caro, Y. (2019).** “Putative Metabolic Pathway for the Bioproduction of Bikaverin and Intermediates Thereof in The Wild *Fusarium Oxysporum* LCP531 Strain.” *AMB Express*, 9, 186. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0912-4>
- Lee, J., Bae, J., Youn, D.-Y., Ahn, J., Hwang, W.-T., Bae, H., Bae, P. K., & Kim, I.-D. (2022).** “Violacein-embedded nanofiber filters with antiviral and antibacterial activities.” *Chemical Engineering Journal*, 444, 136460. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.136460>.
- Liu G.Y., Nizet, V., (2009).** “Color me Bad: Microbial Pigments as Virulence Factors.” *Trends in Microbiology*, 31;17(9):406–413. doi: 10.1016/j.tim.2009.06.006
- Manikprabhu, D., and Lingappa, K. (2013).** “ γ Actinorhodin a natural and attorney source for synthetic dye to detect acid production of fungi.” *Saudi J. Biol Sci.* 20, 163–168. doi: 10.1016/j.sjbs.2013.01.004
- Mapari, S. A. S., Meyer, A. S., & Thrane, U. (2005).** Colorimetric characterization for comparative analysis of fungal pigments and natural food colorants. *Food Technology and Biotechnology*, 43(4), 297–304.
- Marey, M. A., Abozahra, R., El-Nikhely, N. A., Kamal, M. F., Abdelhamid, S. M., & El-Kholy, M. A. (2024).** “Transforming microbial pigment into therapeutic revelation: Extraction and characterization of pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* and its therapeutic potential as an antibacterial and anticancer agent.” *Microbial Cell Factories*, 23(1), 174. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02438-6>.
- Medentsev, A. G., Arinbasarova, A. Y., & Akimenko, V. K. (2005).** Biosynthesis of naphthoquinone pigments by fungi of the genus *Fusarium*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(5), 503–507. <https://doi.org/10.1007/s10438-005-0093-3>
- Mendonça, M., dos Santos, M. C., Pereira, A. K., Fill, T. P., Forte, M. B. S., & Bicas, J. L. (2021).** Recovery and purification of bikaverin produced by *Fusarium oxysporum*. *Food Chemistry: X*, 10, 100135.
- Moreira, M. D., Melo, M. M., Coimbra, J. M., Reis, K. C. D., Schwan, R. F., & Silva, C. F. (2018).** “Solid coffee waste as alternative to produce carotenoids with antioxidant and antimicrobial activities.” *Waste Management*, 82, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.10.017>.

- Mukhia, S., Kumar, A., & Kumar, R. (2024).** “Red bioactive pigment from Himalayan *Janthinobacterium* sp. ERMR3:09: Optimization, characterization, and potential applications.” *Archives of Microbiology*, 206, 44. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03779-3>.
- Naisi, S., Bayat, M., Salehi, T. Z., Zarif, B. R., & Yahyaraeyat, R. (2023).** “Antimicrobial and anti-biofilm effects of carotenoid pigment extracted from *Rhodotorula glutinis* strain on food-borne bacteria.” *Iranian Journal of Microbiology*, 15(1), 79–88. <https://ijm.tums.ac.ir/index.php/ijm/article/download/4006/1545>.doi:10.18502/ijm.v15i1.11922.
- Nakamura, Y., Asada, C., & Sawada, T. (2003).** “Production of antibacterial violet pigment by psychrotropic bacterium RT102 strain.” *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8, 37–40. <https://doi.org/10.1007/BF02932896>.
- Padmavathi, T., & Prabhudessai, T. (2013).** Optimization of Anthraquinone Pigment Production From *Fusarium Oxysporum* isolated From Soil. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5(2), 430–435.
- Pan, X., Chen, F., Wu, T., Tang, H., & Zhao, Z. (2009).** The Acid, Bile Tolerance And Antimicrobial Property of *Lactobacillus Acidophilus* NIT. *Food Control*, 20, 598–602.
- Philipp Wiemann et al. (2009).** Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(4):931–46. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06695.x.
- Plonka, P. M., and Grabacka, M. (2006).** “Melanin Synthesis in Microorganisms—Biotechnological and Medical Aspects.” *Acta. Biochim. Pol.* 53, 429–443.
- Qin Z.; Wang X.; Gao S.; Li D.; Zhou J.; (2023).** “Production of Natural Pigments Using Microorganisms,” *Agricultural and Food Chemistry*, 10, 1021 <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c02222>
- Rajendran, P., Somasundaram, P., Duffosé L., (2023).** “Microbial Pigments: Eco-Friendly extraction techniques and some industrial applications.” <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.135958>
- Ramesh, C., Vinithkumar, N. V., Kirubakaran, R., Venil, C. K., & Duffosé, L. (2019).** “Multifaceted Applications Of Microbial Pigments: Current Knowledge, Challenges And Future Directions For Public Health Implications.” *Microorganisms*, 7, 186. doi:10.3390/microorganisms7070186

- Rao M. P. N.; Xiao M.; Li W.; (2017).** “Fungal and Bacterial Pigments:Secondary Metabolites with Wide Applications,” *Frontiers in Microbiology*, 10.3389
- Rather, L. J., Mir, S. S., Ganie, S. A., Shahid-ul-Islam, & L.Q. (2023).** “Research progress, challenges, and perspective in microbial pigment production for industrial applications: A review,” *Dyes and Pigments*, 210, 11089. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.110989>
- Rymbai, H., Sharma, R. R., ve Manish, S. (2011).** “Biocolorants and its implications in Health and Food Industry - a review.” *Int. J. PharmTech Res.* 3, 2228–2244.
- Saleh, H., Abdelrazak, A., Elsayed, A. E., & Osman, Y. (2018).** “Exploring antimicrobial potentials of melanin from A black yeast strain. *Journal of Biology and Life Science.*,” 9, 24. <https://doi.org/10.5296/jbls.v9i2.12712>.
- Sancar Ç. B.; Öztürk M.; Akhan M.; Ergün Ö. (2023).** “Mikrobiyal Pigmentlerin Gıdalarda Renklendirici Olarak Kullanılması,” *IGUSABDER*, 21 (2023): 1273-1285.
- Santos-Ebinuma, V. C. et al. (2013).** Production of pigments by filamentous fungi.
- S. A. S. Mapari et al. (2005).** Production of natural food colorants by filamentous fungi. *Food Technology and Biotechnology*.
- Sen, T., Barrow, C. J., ve Deshmukh, S. K. (2019).** “Microbial pigments in the food industry—Challenges and the way forward,” *Front. Nutr.* 6:7. doi: 10.3389/fnut.2019.00007
- Sengupta, S., & Bhowal, J. (2023).** “Characterization of a blue-green pigment extracted from *Pseudomonas aeruginosa* and its application in textile and paper dyeing.” *Environmental Science and Pollution Research*, 30(11), 30343–30357. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24241-9>
- Shouman, H., Said, H. S., Kenawy, H. I., & Hassan, R. (2023).** “Molecular and biological characterization of pyocyanin from clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa*.” *Microbial Cell Factories*, 22, 166. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02169-0>.
- Singh, D., Rathod, V., Ninganagouda, S., Herimath, J., Kulkarni, P., & Mathew, J. (2009).** Biosynthesis of prodigiosin by *Serratia marcescens* and its applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84, 102–107.

- Sinha, S.; Choubey, S.; Kumar, A., (2017).** “Bhosale, P. Identification, Characterization of Pigment Producing Bacteria from Soil and Water and Testing of Antimicrobial Activity of Bacterial Pigments.” *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2017, 42, 119–124.
- Spadaro, D., Tropea, A., Citro, I., Trocino, S., Giuffida, D., Rigano, F., Morales-Oyervides, L., Brinkhoff, T., Tiso, T., Dufossé, L., Calogero, G., ve Mondello, L., (2024)** “Development of innovative dye sensitized solar cells (DSSCs) based on co-sensitization of natural microbial pigment,” *Dyes and Pigment*, 229, 112311. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2024.112311>
- Someyra , N., Nkajima, M., Hamamoto, H., & Yamaguchi, I. (2004).** Effect of light conditions on prodigiosin stability in the biocontrol bacterium *Serratia marcescens* strain B2. *Journal of General Plant Pathology*, 70(6), 367-370. <https://doi.org/10.1007/s10327-0134-7>
- Soni, N., Dhandhukia, P., & Thakker, J. N. (2023).** “Carotenoid from marine *Bacillus infantis*: Production, extraction, partial characterization, and its biological activity.” *Archives of Microbiology.*, 205, 161. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03505-z>.
- Surwase, S. N., Jadhav, S. B., Phugare, S. S., ve Jadhav, J. P. (2013).** “Optimization of Melanin Production by *Brevundimonas* sp. SGJ Using Response Surface Methodology.” *3 Biotech* 3, 187–194. doi: 10.1007/s13205-012-0082-4
- Tao, Z.-S., Wu, X.-J., Yang, M., & Shen, C.-L. (2024).** “Astaxanthin prevents bone loss in osteoporotic rats with palmitic acid through suppressing oxidative stress.” *Redox Report*, 29, 2333096. <https://doi.org/10.1080/13510002.2024.2333096>.
- Tavasolli M., Bangar, P. S., Majlesi, M., Ghaderi S., (2026).** “ Microbial pigments: vibrant colors from microorganism sources.” Chapter 20, Dietary, *Sensory and Gastronomic Applications*. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-33345-3.00025-0>
- Teertstra, W. R., Lugones, L. G., & Wösten, H. A. B. (2004).** In situ hybridisation in filamentous fungi using peptide nucleic acid probes. *Fungal Genetics and Biology*, 41, 1099-1103.
- Teplyakova, T., & Kosogova, T. (2015).** “Fungal bioactive compounds with antiviral effect Tamara Teplyakova.” *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3. <https://doi.org/10.17265/2328-2150/2015.08.001>.
- Umadevi, K., & Krishaneveni, M. (2013).** “Antibacteriel Activity of Pigment Produced From *Micrococcus Luteus* KF532949.” *International Journal of Chemical and Analytical Science* .4. 149-152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcas.2013.08.008>

- Wei, Y. H., & Chu, I. M. (2002).** Enhancement of prodigiosin production by *Serratia marcescens* using statistical experimental designs. *Biotechnology Progress*, 18, 140–146.
- Williams, R. P., Quadri, S. M. H., & Scott, R. H. (1971).** Influence of environmental conditions on prodigiosin production by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 106, 438–443.
- Williams, R. P. (1973).** Biosynthesis of prodigiosin, a secondary metabolite of *Serratia marcescens*. *Applied Microbiology*, 25, 396–402.
- Williamson, N. R., Fineran, P. C., Leeper, F. J., & Salmond, G. P. C. (2006).** The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 887–899.
- Velmurugan, P., et al. (2010).** Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(4), 346–350. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2009.10.003.
- Venil, C.; Zakaria Z.; Ahmed W., (2013),** “Bacterial Pigments and Their Applications, Process Biochemistry,” 10.1016/j.procbio.2013.06.006
- Yıldırım S. (2014).** “Hidrokarbonla Kirlenmiş Topraklardan İzole Edilen Bakterilerden Pigment Üretimi,” Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi.

ÖZGEÇMİŞ

Adı- Soyadı: Gülsüm Nida CAN

Lisans: 2015, Malatya İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Bölümü

2021, Malatya İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Malatya İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
(devam etmekte)

Çalıştığı Kurum: Sağlık Bakanlığı'nda biyolog olarak çalışmaktadır.

