

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI RADİOTROFİK FUNGUSLARDA
MELANİN ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYONU

BERRİN ÜNAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HAZİRAN 2019

Tezin Başlığı Bazı Radiotrofik Funguslarda Melanin Üretimi ve Optimizasyonu

Tezi Hazırlayan: Berrin ÜNAL

Sınav Tarihi: 26/06/2019

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jüri Üyeleri:

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek ASMA

İnönü Üniversitesi

.....

Dr Öğretim Üyesi. Seval CİNG YILDIRIM

İnönü Üniversitesi

.....

Dr. Öğretim Üyesi Miraç UÇKUN

Adıyaman Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Halil İbrahim ADIGÜZEL

Enstitü Müdürü

Onur Sözü

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum " **Bazı Radiotrofik Funguslarda Melanin Üretimi ve Optimizasyonu**" başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakça yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Berrin ÜNAL



Her zaman yanımda olan birtanem anneme;



ÖZET

Yüksek Lisans Tez

BAZI RADİOTROFİK FUNGUSLARDA MELANİN ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYONU

Berrin ÜNAL

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

66 + xii sayfa

2019

Danışman: Prof. Dr. Dilek ASMA

Mikroorganizmalar doğada farklı çevresel koşullara maruz kalmaktadır. Bunlar ısı, basınç, elektrik akımı, ultrasonik dalgalar, ışık/radyasyon ve ozmotik şok gibi fiziksel stresler, asitler, tuzlar ve oksitleyiciler gibi kimyasal stresler mikrobiyal metabolitler ve yarışmacı flora gibi biyolojik streslerdir. Canlılar bu koşullarda ya yaşamlarını yitirebilirler ya da sahip oldukları adaptasyon mekanizmaları ile bu stresli çevrede yaşayabilirler. Uzun yıllardır ekstrem ortamlarda mikroorganizmaların nasıl yaşadıklarını ve aşırı stresli ortamlarda sonradan ortaya çıkan adaptasyon mekanizmalarını merak etmişlerdir.

Radiotrofik fungusların ağır metallere, oksidatif zararlara, ultraviyole radyasyonuna, sıcak ve soğuk stresine ve kuraklığa karşı ekstrem dayanıklılığının olması gibi çok sayıda dikkate değer özellikleri vardır. Bu özelliklerinden dolayı

son yıllarda melaninli funguslar ve bakterilerle ilgili çalışmalar artmıştır. Özellikle de ciddi çevre problemlerine neden olan ağır metallerin ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ile ilgili yoğun araştırmalar yapılmaya başlamıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda radiotrofik fungusların olumsuz çevre koşullarına dirençlilik mekanizmalarının ürettikleri melanin pigmentiyle ilişkili olduğu saptanmıştır. Melaninin en dikkate değer özelliklerinden biri elektromanyetik radyasyonun bütün tiplerini absorblama yeteneğine sahip olmasıdır. Melanin, fungusları litik enzimlerden, ekstrem sıcaklıklardan ve kuraklıktan koruduğu gibi fungusit dirençliliğini de indüklemektedir. Bununla birlikte bitki patojenlerinde melanin üretimini etkileyen faktörler oldukça karmaşıktır. Bu bitki patojeni funguslar tarafından melanin üretimini etkileyen faktörlerin öğrenilmesi, potansiyel biyokontrol ajanı olarak kullanılmasına imkân sağlayacaktır.

Bu amaçla çalışmamızda pH, çalkalama, farklı besiyerleri ve sıcaklık gibi parametrelerin radyotrofik bir fungus olan *Alternaria alternata*'nın melanin üretimine olan etkileri test edilmiştir. Belirlenen optimum pH, çalkalama ve sıcaklık aralığında besiyerlerine farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ eklenerek melanin üretimi üzerine etkisi saptanmıştır.

Çalışmamızın sonunda *A. alternata*'nın optimum melanin üretiminde en uygun besiyeri PDB, en iyi sıcaklık 20 °C, en uygun pH 4 ve çalkalama hızı 200rpm olarak saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELELER *Alternaria*, Radiotrofik Funguslar, Melanin, Stres

ABSTRACT

Master Thesis

SOME RADIOTROFIK FUNGI MELANIN PRODUCTION AND OPTIMIZATION

Inönü University
Institute of Science
Department of Biology

66 + xii pages

2019

Supervisor: Prof. Dr. Dilek ASMA

Microorganisms are exposed to different environmental conditions in nature. These are the physical stresses such as heat, pressure, electrical current, ultrasonic waves, light/radiation, and osmotic shock, the chemical stresses such as acids, salts and oxidizers, and the biological stresses such as microbial metabolites and competitive flora. Living beings can either lose their lives or maintain their lives in these stressful environments with their adaptation mechanisms. For many years, they have wondered how the microorganisms live in the extreme environments and their adaptation mechanisms that subsequently emerge in extremely stressful environments.

Radiotrophic fungi have numerous remarkable features such as extreme endurance against heavy metals, oxidative damages, ultraviolet radiation, hot and cold stress, and drought. Owing to these features, studies on fungal melanin and bacteria have increased in recent years. In particular, intensive research studies have been conducted on the detoxification of heavy metals and xenobiotics that cause serious environmental problems. As a result of these studies, it is determined that the resistance mechanisms of the radiotrophic fungi against adverse environmental conditions are associated with melanin pigmentation that they produce. One of the most remarkable features of the melanin is that it can absorb all types of electromagnetic radiation. Melanin induces fungicide resistance as well as protecting fungi from lytic enzymes, extreme temperatures, and drought. However, the factors affecting the production of melanin in plant pathogens are very complex. Determination of the factors influencing the production of melanin by this plant pathogen fungi will allow it to be used as a potential biocontrol agent.

For this purpose, the impacts of parameters such as initial pH, agitation speed, different mediums and temperature on melanin production of the *Alternaria alternata*, which is a radiotrophic fungus, were tested. The effect of melanin production was determined by adding H₂O₂ in different concentrations to the mediums in the predetermined optimum pH, agitation, and temperature range.

As a result of this study, it was determined that, for the optimum melanin production of *A. alternata*, the most appropriate medium was PDB, the best temperature was 20 °C, the optimal pH was 4, and the most appropriate agitation condition was 200 rpm.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmamda benden her türlü yardım, öneri ve desteğini esirgemedi beni yönlendiren, çalışmamın her aşamasında pratik ve teorik bilgilerinden faydalandığım danışman hocam sayın Prof. Dr. Dilek ASMA'ya;

Çalışmamın her aşamasında bana destek olan Dr. Öğretim Üyesi Seval CİNG YILDIRIM'a;

Bu araştırmanın yürütülmesinde bütün bölüm imkânlarından faydalanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na;

Benim bugünlere gelmemi sağlayan, her kararında yanımda olan rahmetli babam Rahmi ARPACI ve canım annem Behiye ARPACI'ya, her zaman yanımda olup beni destekleyen eşim Ahmet ÜNAL'a;

Canım kızlarım Nisa ÜNAL ve Sena ÜNAL'a

2011-127 no'lu proje ile bu araştırmayı maddi olarak destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne;

EN İÇTEN DİLEKLERİMLE TEŞEKKÜR EDERİM...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Ekstrem Çevre Koşulları ve Mikroorganizma Adaptasyonu	1
1.2. Radyasyon ve UV	3
1.2.1. Radyoaktivite ve Radyasyonun Sınıflandırılması	3
1.3. Pigmentlerin Tanımı ve Sınıflandırılması	5
1.4. Mikroorganizma Kaynaklı Pigmentler	7
1.4.1. Klorofil	8
1.4.2. Fikobilinler.....	8
1.4.3. Karotenoidler	8
1.4.4. Flavınlar	9
1.4.5. Melanin	9
1.4.6. Violacein.....	9
1.4.7. Floresin	10
1.5. Mikrobiyal Pigment Üretimini Etkileyen Faktörler	12
1.5.1. Sıcaklık	12
1.5.2. pH.....	12
1.5.3. İnkübasyon Süresi	12
1.5.4. Karbon Kaynağı	12
1.5.5. Azot Kaynağı	13

1.6.	Mikrobiyal Pigmentlerin Kullanım Alanları	13
1.6.1.	İlaç Endüstrisi	17
1.6.2.	Tekstil Endüstrisi	19
1.6.3.	Gıda Renklendiricileri ve Takviyeleri.	20
1.6.4.	Matbaa Endüstrisi.....	21
1.7.	Melanin ve Melanin Pigmentinin Özellikleri	22
1.7.1.	Melanin Pigmentinin Yapısı	22
1.7.2.	Melaninin Hücrelerdeki Yerleşimi.....	24
1.7.3.	Melanin Tipleri ve Melanin Sentez Yolakları	25
1.8.	Fungusların Genel Özellikleri.....	29
1.8.1.	Radyotrofik Fungusların Habitatı	31
1.8.2.	<i>Alternaria alternata</i>	32
1.8.3.	<i>Alternaria alternata</i> 'da Melanin Sentez Yolağı	34
2.	KAYNAK ÖZETLERİ.....	36
3.	MATERYAL VE YÖNTEM.....	41
3.1.	Araştırmada Kullanılan Besiyerleri.....	41
3.2.	Araştırmada Kullanılan Kimyasallar.....	42
3.3.	Melanin Standartının Hazırlanması.....	42
3.4.	<i>Alternaria alternata</i> Stoklarının Hazırlanması	42
3.5.	Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi.....	43
3.6.	Optimum Çalkalama Hızının Belirlenmesi	44
3.7.	Optimum pH' nın Belirlenmesi.....	46
3.8.	Besiyeri Çeşidinin Belirlenmesi.....	47
3.9.	H ₂ O ₂ Kullanımının Melanin Üretimine Etkisi	48
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	50
4.1.	Melanin Standartının Absorbsiyon Spekturumu	50
4.2.	Optimum Sıcaklığın Melanin Üretimine Etkisi	50

4.3.	Çalkalama Hızının Melanin Üretimine Etkisi.....	51
4.4.	pH'nın Melanin Üretimine Etkisi.....	52
4.5.	Besiyeri Çeşidinin Melanin Üretimine Etkisi.....	53
4.6.	H ₂ O ₂ Kullanımının Melanin Üretimine Etkisi	54
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	55
6.	KAYNAKLAR	61
	ÖZGEÇMİŞ.....	66



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	DHN melaninin kimyasal formülü.....	23
Şekil 1.2.	1,8 DHN melanin üretim basamakları.....	26
Şekil 1.3.	Funguslarda melaninin farklı sentez yolları.....	28
Şekil 1.4.	Dallanmış hif yapısının ışık mikroskopunda görünüşü.....	30
Şekil 1.5.	Sporların ışık mikroskopunda görünüşü.....	31
Şekil 1.6.	<i>A. alternata</i> 'nın petri kabındaki görüntüleri.....	32
Şekil 1.7.	<i>Alternaria alternata</i> 'nın sınıflandırılması.....	33
Şekil 1.8.	1,8 DHN melanin üretim basamakları	35
Şekil 3.1.	10 °C, 20 °C, 30 °C ve 40 °C de 4 gün boyunca inkübe edilen funguslar.....	43
Şekil 3.2.	10 °C, 20 °C, 30 °C ve 40 °C de besiyeri ile birlikte homojenize edilmiş funguslar.....	44
Şekil 3.3.	20 °C de statik, 100 rpm, 200 rpm çalkalama hızında besiyeri ile birlikte homojenize edilmiş funguslar.....	45
Şekil 3.4.	20 °C de statik, 100 rpm, 150 rpm, 200 rpm ve 250 rpm çalkalama hızında besiyeri ile birlikte homojenize edildikten sonra süzülen besiyerleri.....	45
Şekil 3.5.	20 °C de 200 rpm çalkalama hızında pH değeri 4-5-6-7-8-9 olan besiyeri koşullarında 4 gün boyunca inkübe edilen funguslar.....	46
Şekil 3.6.	20 °C de 200 rpm çalkalama hızında pH 4 olan besiyeri koşullarında PDB ve SDB besiyerinde 4 gün boyunca inkübe edilen funguslar.....	47
Şekil 3.7.	20 °C de 200 rpm çalkalama hızında pH 4 olan PDB ve SDB besiyeri koşullarında besiyeri ile birlikte homojenize edilmiş funguslar.....	48
Şekil 3.8.	20 °C sıcaklıkta 200 rpm çalkalama hızında pH değeri 4 olan 1, 10 ⁻¹ , 10 ⁻² , 10 ⁻³ ve 10 ⁻⁴ M H ₂ O ₂ içeren PDB besiyerlerinde 4 gün boyunca inkübe edilen funguslar.....	49
Şekil 3.9.	20 °C sıcaklıkta 200 rpm çalkalama hızında pH değeri 4 olan 1, 10 ⁻¹ , 10 ⁻² , 10 ⁻³ ve 10 ⁻⁴ M H ₂ O ₂ içeren PDB besiyeri ile birlikte homojenize edilmiş funguslar.....	49
Şekil 4.1.	Melaninin UV spektrofotometrede absorpsiyon spektrumu.....	50
Şekil 4.2.	<i>A. alternata</i> 'nın melanin üretimi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi.....	51

Şekil 4.3. <i>A. alternata</i> 'nın melanin üretimi üzerine farklı çalkalama hızlarının etkisi.....	52
Şekil 4.4. <i>A. alternata</i> 'nın melanin üretimi üzerine farklı pH ların etkisi.....	53
Şekil 4.5. <i>A. alternata</i> 'nın melanin üretimi üzerine PDB ve SDB besiyerinin etkisi.....	53
Şekil 4.6. <i>A. alternata</i> 'da H ₂ O ₂ kullanımının melanin üretimine etkisi	54



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Mikrobiyal pigmentlerin potansiyel virulans fonksiyonları.....11

Çizelge 1.2. Mantar ve bakteri pigmentleri ve uygulama alanları.....16



SİMGELER VE KISALTMALAR

M	Molar (Mol/litre)
PDB	Potato Dextrose Broth
PDA	Potato Dextrose Agar
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SDB	Sabouraud Dextrose Broth
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
L-DOPA	3,4-dihidroksi-L-fenilalanin
DHN	dihidroksinaftalen
1,3,6,8-THN	1,3,6,8-tetrahidroksinaftalin
PKS	poliketit sintazı

1. GİRİŞ

1.1. Ekstrem Çevre Koşulları ve Mikroorganizma Adaptasyonu

Çevre; insanların ve diğer canlıların yaşamları boyunca ilişkilerini sürdürdükleri ve karşılıklı olarak etkileşim içinde bulundukları fiziki, biyolojik, sosyal, ekonomik ve kültürel ortamdır. İnsan yaşamı evrende yer alan çeşitli dengeler üzerine kurulmuştur. Bu denge evrenin başlangıcından itibaren çeşitli değişimlerin sonucunda oluşmuştur. İnsanın çevresiyle oluşturduğu doğal dengeyi meydana getiren zincirin halkalarında meydana gelen kopmalar, zincirin tümünü etkileyip, bu dengenin bozulmasına sebep olmakta ve çevre sorunlarını oluşturmaktadır.

İnsanın evrimleşmesi ve yeryüzüne yayılarak çeşitli seviyelerde uygarlıklar kurmaya başlaması ile daha önceleri çevredeki iklim değişiklikleri ve doğal afetler gibi sadece fiziksel açıdan önem taşıyan sorunlara ek olarak insanın oluşturduğu bir takım yapay sorunlar da ortaya çıkmıştır. Roma dönemi kaynaklarından bazılarında maden işleyen atölyelerin yoğun olarak bulunduğu yerlerdeki hava kirliliğinden bahsedilmektedir. Bunun yanı sıra ağaç gibi doğal maddelerin aşırı kullanımı vejetasyonda ve buna bağlı diğer çevresel faktörlerde değişimler oluşturmaya başlamış ve bu sorunlar büyüyerek günümüze kadar gelmiştir (Yığıtbaşıoğlu, 1998).

Son 50 yıl içerisinde nükleer silah denemeleri ve nükleer kazalar sonucu çevre radyoaktivite seviyesinde küresel düzeyde artış meydana gelmiş, insanların yanı sıra flora ve fauna da artan radyoaktivite sebepli ışınlanmaya maruz kalmıştır. Bazı bölgelerde çevre radyoaktivite seviyesindeki yerel artış ekosisteme zarar verecek boyutlara ulaşmıştır.

Uzay ve güneşten gelen kozmik ışınlar, bu ışınların oluşturduğu kozmojenik radyonüklidler, yerkabuğunda bulunan radyoizotoplar ve bunların bozunma ürünlerinden oluşan doğal radyasyon kaynaklarıdır. Nükleer silah denemeleri ve nükleer kazalar sonucu meydana gelen radyoaktif serpintiler, nükleer yakıt çevrimi ve nükleer güç üretiminden çevreye salınan radyonüklidler ise yapay radyasyon kaynaklarıdır. Yaşayan tüm organizmalar bu radyasyon kaynaklarından kaçınılmaz ve sürekli olarak ışınlanmaktadır.

Toprak mikroorganizmalarının önemli gruplarından funguslar, karbon, azot fosfor, kükürt ve birçok eser metaller gibi önemli besin elementlerinin döngüsü, simbiyoz ve patogene bitkiler içinde birincil rolleri ile temel öneme sahiptir (Belozerskaya Vd., 2010).

Doğa olayları herhangi bir yerde normal sürecini yaşarken, bazen bu seyrinin dışına çıkarak o güne kadar görülmeyen ya da çok seyrek görülen olaylar şeklinde gerçekleşmektedir. Doğadaki bu olayların en az ya da en üst seviyelerine ekstrem (uç) değerler denir. Sıra dışı doğa olayları ya da ekstrem olarak ifade edilen bu olaylar, doğal süreçler ve yaşantımız üzerinde çok önemli sonuçlara yol acar. Bu doğal çevreler dışında, insan aktivitesi ile oluşan yapay çevreler de vardır (Dizdar, 2016).

Yüksek sıcaklık, yüksek basınç, aşırı soğuk, aşırı tuzluluk, oksijen miktarının çok az olması, yüksek doz radyasyon, ultraviyole gibi koşullarda yaşayabilen, yani “uç ortamları seven” mikroorganizmalar ekstremofil olarak adlandırılmaktadır. Dünya üzerinde; buzullar, volkan ağızları gibi yaşanması olanaksız görülen yerlerde bile yaşayan canlılar vardır. Ekstrem koşullarda yaşayan bu canlılar, bulundukları koşullara adapte olabilmek için diğer organizmalardan farklı bazı biyolojik özelliklere sahiptir. Hidrotermal volkan ağızları, tektonik plaka hareketlerinin olduğu yerlerdir. Kavurucu sıcaklıkta olan çevreler, şaşırtıcı derecede yüksek mikrobiyal çeşitlilik gösterir. İyonize radyasyon (örneğin, X ışınları ve alfa partikülleri), organizmalardaki DNA zincirini kırabilir (Dizdar, 2016).

Dünyadaki hayat, iyonlaştırıcı radyasyon akışında her zaman var olmuştur. Son yıllardaki veriler Çernobil'deki nükleer reaktörde melanize mantar türlerinin iyonize radyasyona artan büyüme ile cevap verdiğini göstermektedir (Dadachova Vd., 2008).

Araştırmacılar uzun yıllardır ekstrem ortamlarda mikroorganizmaların nasıl yaşadıklarını ve aşırı stresli ortamlarda sonradan ortaya çıkan adaptasyon mekanizmalarını merak etmişlerdir. Melanin pigmenti bu bağlamda araştırmacılar için çok yeni ve dikkat çekici bir çalışma alanıdır. Çünkü doğanın dengesinin bozulmasıyla birlikte dünyamızda oluşan ve tüm canlıların maruz kaldığı ekstrem çevre şartlarına karşı çeşitli organizmaların geliştirdiği direnç mekanizmalarını

inceleyerek belki de insanoğluna bu koşullara karşı hayatta kalma ya da daha sağlıklı bir yaşam sürme imkânı sağlanabilecektir (Shcherba vd., 2000).

1.2. Radyasyon ve UV

Radyasyon kaynakları var olduğu sürece, radyasyon insanoğlunun tüm yaşamında iç içe olacak ve bundan kaçınması da mümkün olmayacaktır. 19. yüzyılın sonlarına doğru X ışınları ve radyoaktivitenin keşfiyle birlikte tıbbi ve endüstriyel alanlardaki kullanımının günümüze kadar artan bir hızla yaygınlaşması radyasyonu yaşantımızın ayrılmaz bir parçası haline getirmiştir. Radyoaktivite 1896 yılında Henri Becquerel ve asistanı Marie Curie tarafından bulunmuştur. Bu buluşta, 1895 yılında keşfedilmiş X ışınının büyük etkisi bulunmaktadır. 1919 yılında Rutherford hava azotunun alfa ışınlarıyla bombardıman edilmesiyle oksijen elde etmiştir. Bu olay insanın atom çekirdeğine ilk müdahalesi olup suni radyoaktivite olarak isimlendirilmiştir. İtalyan fizikçi Enrico Fermi 1934 yılında nötronlarla uranyumu bombalayarak radyoizotopları bulmuştur. Amerika 16 Temmuz 1945 tarihinde Meksika sınırında çölde ilk atom bombasını denemiş, patlama ile 30 metre yüksekliğindeki çelik kule yok olmuştur. Radyasyon teknolojisi yaşamın bazı alanlarında insanlığa faydalı olmasına rağmen, pek çok sorunu da beraberinde getirmiştir (Alkaya Solmaz ve Özatamer, 2012).

1.2.1. Radyoaktivite ve Radyasyonun Sınıflandırılması

Maddenin temel yapısı atomlardan oluşur. Atom, proton ve nötronlardan oluşan bir çekirdek ve çevresinde dönmekte olan elektronlardan oluşmaktadır. Herhangi bir maddenin atom çekirdeğindeki nötronların sayısı proton sayısına göre fazla ise; bu tür maddeler kararsız bir yapı göstermekte ve çekirdeğindeki nötronlar alfa, beta ve gama gibi çeşitli ışınlar yayarak parçalanmaktadır. Çevresine ışın yayarak parçalanan maddelere “radyoaktif madde”, çevreye yayılan ışınlara da “radyasyon” denir. Radyasyon esas olarak parçacık ve dalga tipi radyasyon olma üzere iki kısımda incelenebilir. Parçacık ve dalga tipi radyasyonu da iki gruba ayırmak mümkündür. Bunlar:

1- İyonlaştırıcı olmayan radyasyon: “Elektromanyetik radyasyon; dalga tipi radyasyon” da denir. Isı, ışık, kızıl ve mor ötesi ışınları, ultraviyole, radyo dalgaları, mikrodalga, ses dalgaları gibi.

2-İyonlaştırıcı radyasyon: “Partiküler radyasyon; nükleer radyasyon” da denir. Radyoaktif maddelerin çekirdeklerinin parçalanmasından oluşur. Alfa partikül, beta partikül, gama ışınları, kozmik ışınlar, X ışınları ve nötronlardır (Alkaya Solmaz ve Özatamer, 2012). Radyoaktif cisimlerin, parçalanarak aktivitelerini kaybetmelerine, “radyoaktif parçalanma” denir. Radyoaktif parçalanma; alfa, beta ve gama şeklinde olmaktadır.

İnsan faaliyetlerinden kaynaklanan yüksek radyasyona maruz kalan ortamlar arasında iki örnek dikkat çekmektedir. İlk olarak, yüksek sabit radyasyon alanına sahip olan Çernobil'deki hasar görmüş reaktör duvarlarına kolonize olan melanin üreten fungal türlerdir (Zhong vd., 2008). İkinci olarak da bu fungal türler, reaktör soğutma havuzu suyunda bulunduğu tespit edilmiştir. Bu su, soğutma amacıyla nükleer reaktör göbeği boyunca dolaştığı için aşırı derecede radyoaktiftir. Bu havuzların mikrobiyal özelliği, büyük miktarda mantar, kok ve çubuk bakterilerden oluşmaktadır. Bu reaktörün su mikroflorası analiz edildiğinde, yüksek radyasyon atıklarına dirençli olan mikroorganizmaların yoğun olduğu saptanmıştır. Bu mikroorganizmaların yüksek katalaz ve nükleaz gibi radikal süpürücü enzimlere sahip olduğu belirlenmiştir (Youngchim vd., 2004).

Melaninler, canlı organizmaları UV ve iyonlaştırıcı radyasyona ve aşırı sıcaklıklara karşı koruyan eşsiz biyopolimerlerdir. Organizmaların melanin üretme yeteneği, çevresel koşullarda yaşamlarını sürdürebilme avantajlarıyla ilişkilidir. Birçok fungus yapısal olarak melanin sentezler. Melaninler, geniş bir elektromanyetik spektrumu absorbe edebildikleri için ultraviyole (UV) ışınlarına karşı direnç sağlayarak, ışık ile indüklenen hasarları önlemektedir. Belirli mikroorganizmaların melanin üretme kabiliyeti, hayvan veya bitki hastalıkları için virülans ve patojenite ile bağlantılıdır. Melanin pigmentlerini sentezleyebilen mikroorganizmalar, funguslar, bakteriler ve helmintler üzerinde patojen etkiye sahiptir. Melaninin virülanslık mekanizması fungal patojenler için kapsamlı şekilde incelenmiştir (Nosanchuk vd., 2003).

Melanin pigmentleri, tüm biyolojik alemlerde bulunmaktadır. Melaninler nispeten basit öncülerden enzimatik olarak üretilebilen çeşitli özelliklere sahip olan karmaşık polimerlerdir. Melaninlerin olağanüstü bir özelliği, enerji iletimi ve her türlü elektromanyetik radyasyonu emme yeteneğidir. Yüksek radyasyonun bulunduğu Çernobil'deki hasar gören reaktörlerde, reaktör soğutma suyunda, uzay istasyonlarında ve Antartika dağları gibi ortamlarda radyasyona dirençli mikroorganizmaların bulunduğu tespit edilmiştir. Bu mikroorganizmaların bu ortamlarda yaşayabilmelerinin sebebi klorofile benzeyen melanin pigmentine sahip olmalarıdır (Dadachova vd., 2008).

Melanin üretimi de çevresel streslere karşı en üst düzeyde koruma ile ilişkilendirilmiştir (Nosanchuk vd., 2003). Melanin, ekstrem koşullarda fungusların hayatta kalma kabiliyetine katkıda bulunmaktadır. Ultraviyole (UV) ışık, oksitleyici ajanlar ve iyonize radyasyon gibi çevresel streslere karşı savunma sağlayan çok fonksiyonlu bir pigmenttir (Eisenman ve Casadevall, 2012). Son yıllarda melaninli funguslar ve bakteriler ile çeşitli çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Özellikle genetik mühendislikle ilgili çalışmaların yanı sıra, biyoremediasyonla ilgili çalışmalar ve ciddi çevre problemlerine neden olan ağır metallerin ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ile ilgili yoğun araştırmalar yapılmaktadır.

Melaninin de dahil olduğu mikrobiyal pigmentler, Ultraviyole radyasyona karşı koruma, oksidan maddelere karşı koruma- aşırı sıcak ve soğuğa karşı koruma ve diğer mikroorganizmaların antimikrobiyal aktivitelerine karşı koruma gibi birçok avantaja sahiptir. Mikroorganizmaların melanin üretme yeteneği, çevresel koşullarda yaşamlarını sürdürebilme avantajlarıyla ilişkilidir. Birçok fungus yapısal olarak melanin sentezlemektedir.

1.3. Pigmentlerin Tanımı ve Sınıflandırılması

Pigmentler görünür dalga boyunda ışığı absorbe eden kimyasal bileşiklerdir. Pigmentler kaynaklarına göre doğal, sentetik veya inorganik olarak sınıflandırılabilir. En yaygın olarak kullanılan gıda sınıfı pigmentler nitrit ve nitrat tuzları içeren kimyasal bileşiklerdir. Bu sentetik bileşiklerin karsinogenik ve teratojenik etkileri rapor edilmiştir. Bu durum, bitkiler ve mikroorganizmalar gibi

biyolojik kökenli pigmentlerin üretimine artan ilginin en önemli nedenlerinden biri olmuştur. Doğal pigmentler bitki, hayvan, funguslar ve mikroorganizmalar gibi canlı organizmalar tarafından üretilmektedirler. Sentetik pigmentler ise laboratuvar ortamında elde edilmektedir. Doğal ve sentetik pigmentler organik bileşiklerdir. İnorganik pigmentler doğada bulunabilir veya sentez yoluyla üretilirler. Doğal ve sentetik pigmentler tıpta, gıdalarda, tekstilde, giysilerde, mobilyada, kozmetiklerde ve diğer ürünlerde kullanılmaktadırlar. Renklendirici bileşikler olarak, doğal pigmentler çok önemlidir. Doğal ürünlerdeki pigmentlerin antioksidan, antimikrobiyal ve antitümör aktiviteye sahip olduğu açıkça rapor edilmiştir.

Pigment kelimesi Latince “pigmentum” dan gelmektedir ve aslında renklendirici madde anlamına gelmektedir ancak sonraları renkli dekorasyon anlamında kullanılmaya başlanmıştır. Pigmentler, görünür dalga boyundaki ışığı absorbe eden bileşiklerdir. Bu absorblama, molekülün spesifik yapısını oluşturan kromoforun, radyant kaynağından ışığı yakalamasıyla gerçekleşmektedir. Bazı enerjiler absorblanmadığı zaman yansılır veya kırılır; bu enerjinin uyarılar tarafından beyne iletilmesiyle renk algılanmaktadır (Erdal ve Ökmen, 2013).

İşlenmiş gıdaları renklendirme eğilimleri eski bir gelenektir, ancak pigmentin mikroorganizmalardan izolasyonu yeni bir yaklaşımdır. İnsanoğlu her zaman renklerle ilgilenmiştir. Boyama işlemi, Avrupa'da Bronz Çağı boyunca uygulanan eski bir uygulamadır. İlk kayıtlara göre, yani MÖ 2600, bu doğal boyalar Çin'de ilk defa kullanılmıştır. Hint Yarımadası'nda, Mohenjo-Daro ve Harappa medeniyetlerinin kalıntılarında bulunan renkli kumaşlarda renkli boya izlerinin bulunduğu kanıtlanmış olup, İndus Vadisi Uygarlığı (M.Ö 2500) sırasında doğal boyaların kullanıldığı rapor edilmiştir (MÖ 3500). Mısır'da renkli kıyafetler ile sarılmış mumyalar ve Kral Tutankamon'un mezarı içerisindeki maddelerden izole edilen bir pigment olan Alizarin' in varlığı da doğal boyaların kullanıldığını doğrulamaktadır. Aztek ve Maya kültür döneminde Orta ve Kuzey Amerika'daki insanların “cochineal” isimli boya kullandıkları bildirilmiştir. Hatta Brezilya adını orda bulunan boya yüzünden almıştır. İncil'de safrandan söz edilirken, kına kullanımı M.Ö. 2500 'den önce bile yazılmıştır. Önceki kayıtlarda Japonya'dan 8. Yüzyılda Nara dönemi Shosoin daki metine göre bazı insanlar tarafından renkli işlenmiş gıda tüketildiği de belirtilmiştir (Heer ve Sharma, 2017).

1.4. Mikroorganizma Kaynaklı Pigmentler

Pigmentler; bitkilerden, hayvanlardan, inorganik maddelerden ya da mikroorganizmalardan elde edilen renklendirici maddelerdir. Renklendiriciler, biyolojik kaynaklardan elde edildiği zaman doğal olarak kabul edilmektedir. Doğal pigmentler mikroorganizmalardan elde edildiğinde mikrobiyal pigmentler adını almaktadır. Mikroorganizmalar kullanılarak pigment üretiminde yapılan ilk başarılı çalışma, *Blakesles* küfünden beta-karoten elde edilmesiyle sağlanmıştır.

Mikrobiyal pigment üretimi gerçekleştiren birçok bakteri cinsi vardır. Bunlardan *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Microbispora*, *Brevibacterium*, *Sorangium* ve *Pseudomonas* cinslerine ait üyelerde pigment üretimi belirlenmiştir.

Suda çözünebilen pigmentler sıvı veya katı besi yerinde üretildiklerinde ortama geçebilir ve bulundukları ortamın renkli bir görünüm almasına sebep olurlar. *Pseudomonas aeruginosa* suda çözünebilen pigment üretmektedir. Suda çözünemeyen pigmentler ise koloni içerisinde kalırlar ve kolonilerin renkli görünmelerine yol açarlar. Kolonilerden dışarı çıkmadıkları için ortama yayılamazlar. *Staphylococcus citreus* limon sarısı renginde suda çözünmeyen pigment üretmektedir.

A vitamini öncüsü olan mikrobiyal pigmentler, anti-kanser özelliklerine sahiptir. Mikrobiyal üretim, hava koşullarından bağımsız, kolay ve hızlı elde edilebilmesi nedeniyle çeşitli avantajlara sahiptir. Dolayısıyla, mikrobiyal renklendiricinin üretimi, çok daha kısa bir sürede kontrollü koşullar altında üretilebildiğinden, diğer renklendiricilere göre birçok avantaja sahiptir (Heer ve Sharma, 2017).

Fungusların miselleri arasında da çeşitli renkte pigment üretimi yapanlar vardır. Bu durum fungus kolonilerinin renkli görünümüne neden olmaktadır. Fungus pigmentlerini incelerken besiyerinin hem arkasına hem de üst kısmına bakılır. Pigment üreten funguslar, *Aspergillus niger* (siyah), *Trichophyton violaceum* (mor), *Microsporum canis* (kırmızı) örnek verilebilir (Erdem, 2017).

Bakterilerin yaptıkları pigmentler kırmızı, turuncu, sarı ve bazen de yeşil renkte olmaktadır. Bunların arasında en fazla kırmızı pigmente rastlanmaktadır.

Bazı bakterilerin pigmentleri renksiz lökoplast şeklindedir. Bu pigmentler oksijen ile temasa girdiklerinde renklenirler. Bazı önemli mikrobiyal pigmentler şunlardır:

1.4.1. Klorofil

Yeşil algler ve prokaryotik organizmalarda yaygın olarak bulunan fotosentezde görevli önemli bir pigmenttir. Klorofil-a (mavi-yeşil) ve klorofil-b (yeşil) olmak üzere iki tipi bulunur (Erdem, 2017).

1.4.2. Fikobilinler

Fikobilinler suda çözünen, koyu renkli ve floresan etkili pigment protein kompleksidir. Fikosiyanin, Fikoeritrin ve allofikosiyaninler olmak üzere 3 grupta incelenir. Fikosiyanin mavi renkte, fikoeritrin kırmızı renkte bir pigmenttir. Allofikosiyaninler ise Fikosiyanin ve fikoeritrinler ile çevrilidir.

Fikobilinler, gıda ve kozmetik sektörlerinde kullanılırlar. Bunun dışında bağışıklık sistemini artırıcı, kolesterol düşürücü, antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral ve antikanser özellikler de göstermekte ve sağlık sektöründe de kullanılmaktadır. En çok siyanobakterilerden elde edilmektedirler (Erdem, 2017).

1.4.3. Karotenoidler

Yağda çözünen pigmentlerdir. Beta-karoten, zeaksantin ve astaksantin olmak üzere 3 grupta incelenir.

Beta-karoten; turuncu renkli bir pigmenttir ve ticari olarak alglerden elde edilir. Günümüzde β -Karotenin insan sağlığı üzerinde çok sayıda olumlu etkisi olduğu, toksik etkisinin ise olmadığı tespit edilmiş ve β - karoten dünyada gıda renklendiricisi olarak (margarin, peynir, meyve suları, süt ürünleri gibi) en çok kullanılan pigment olarak tanımlanmıştır.

Zeaksatin; sarı renkli bir pigmenttir, özellikle kümes hayvanlarının yumurtalarının renklendirilmesinde, gıda ve kozmetik sanayisinde kullanılmaktadır.

Astaksantin turuncu-kırmızı bir pigmenttir ve mikroalglerden elde edilir. Mikroorganizmaların stres koşulları altında astaksantin pigmentini ürettiği gözlenmiş ve ticari üretiminde de mikroorganizmalar stres altında bırakılmaktadır. Astaksantin pigmentinin diğer karotenoidlere göre avantajları antioksidan etkisinin

diğerlerine göre daha yüksek olması, kana daha hızlı karışması, Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının tedavisinde kullanılması ve antikanserojenik özelliğe sahip olması ile dikkat çekmektedir (Erdem, 2017).

1.4.4. Flavinler

Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen yaygın bir bileşiktir ve ana maddesi riboflavindir. Daha çok fungus ve mayalarda bulunmaktadır. Gıdalarda sarı renklendirici olarak uygulanan çoğu ülkede kullanımına izin verilen bir renklendiricidir. Uygulama alanları soslar, şerbetler, içecekler, çabuk ve kolay hazırlanabilen tatlılar ve dondurmalarıdır. Riboflavin, gıdalarda renklendirici olarak uygulanmasına izin verilmesine rağmen yine de gıdalarda katkı miktarı sınırlı tutulmaktadır (Erdem, 2017).

1.4.5. Melanin

Çernobil'den sonra radyoaktif maddelerle kirlenmiş topraklarda yapılan araştırma sonucunda mikrobiyal komünitenin, melanin üreten türlere doğru kaydığı belirlenmiştir. Mikroorganizmalar stres koşullarına karşı kendilerini korumak için melanin üretmektedir. Bu pigment gri, kahverengi veya siyah renkte olabilir. Antioksidan özeliğe sahiptir (Erdem, 2017).

1.4.6. Violacein

Çeşitli biyolojik aktiviteler sergileyen *Chromobacterium violaceum* bakterisinden elde edilen çok yönlü mavi-mor renkte bir pigmenttir. Suda çözünmeyen bir pigment olduğundan ortama geçmez renk hücre içinde kalır. Bu nedenle besiyerinde mor renkli koloniler gözlenir. Violaseinin, antikanser ajanı olması ve *Staphylococcus aureus'* a ve diğer Gram-pozitif patojenlere karşı bir antimikrobiyal etkiye sahip olması gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Bu pigment son zamanlarda ilaç, kozmetik, gıda ve tekstil gibi endüstri pazarlarında yükselen bir ivme kazanmaktadır (Erdem, 2017).

1.4.7. Fluoresin

Suda çözünüp, kloroformda çözünmeyen sarımsı renkte bir floresan pigmenttir. Bu pigment UV ışığı ile görülmektedir. Aynı zamanda antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (Erdem, 2017).

Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarlarında pigmentli koloniler tanıda her zaman yardımcı olmuştur. Üretilen pigmentler çoğu zaman konağa karşı virulan etkiler göstermiştir. *Pseudomonas aeruginosa*'nın pigmentlerinin yanısıra; *S. aureus*'un stafiloksantin pigmenti, *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus* türlerinin koyu kahverengi veya siyah pigmentleri ve *Serratia marcescens*'in kırmızı pigmenti diğer önemli pigment türlerindendir.

Mikrobiyal pigmentlerin bazı doğal etkileri şunlardır:

- 1- Ultraviyole radyasyona karşı koruma
- 2- Oksidan maddelere karşı koruma
- 3- Aşırı sıcak ve soğuğa karşı koruma
- 4- Diğer mikroorganizmaların antimikrobiyal aktivitelerine karşı koruma
- 5- Besin eldesi (demir vs.)
- 6- Fotosentezle enerji eldesi

Renkler çoğu zaman belirli mikroorganizmaların tanımlanmasını sağladığından, genellikle türlerin adlarında bulunmaktadır. Örneğin, 1884 yılında Rosenbach, *Staphylococcus alba* (alba = "beyaz", Latince) olarak adlandırdığı pigmentless bakteriyi, doğal cilt mikroflorasındaki stafilokoklardan ayırmak için altın renkli patojen *Staphylococcus aureus* (aureus = "altın", Latin) olarak adlandırmıştır. Aynı şekilde, kistik fibroz hastalarının akciğerlerinde genellikle bulunan mavi-yeşil *Pseudomonas* türlerine, Latince bir kelimeden türeyen bakır pas rengini ifade eden *aeruginosa* adı verilmiştir. *Chromobacterium violaceum* mavi-mor bir pigment içermektedir. Bu özellik fenotipleri sadece mikroorganizmalar için kolay bir adlandırma sağlamakla kalmaz, aynı zamanda günümüzde mikroorganizmaların tanımlanması için klinik laboratuvarlarda önemli teşhis yöntemi olarak da kullanılmaktadır. Pigmentler ayrıca enfeksiyona neden olan

patojenlerin keşfedilmesinde rol oynamıştır. 1870'lerin sonunda, Cezayir'deki bir askeri hastanede Pasteur'ün öğrencisi olan Alphonse Laveron sıtma hastalarından patoloji örnekleri aldığıında, bu hastaların kanlarında ve organlarında kahverengi siyah pigment granülünün ortak bir özellik olduğunu gözlemlemiştir. Bu önemli gözlem enfekte ajan olarak sıtma parazitin keşfine yol açıp, Laveron'a 1907 yılında Nobel Ödülü almasını sağlamıştır.

Biyoteknolojik gelişmeler ile günümüz araştırmacıları, mikrobiyal renklendirme için moleküler genetik ve biyokimyasal temeli incelemektedirler. Saflaştırılmış pigmentler veya değiştirilmiş pigmentasyona sahip izojenik mutantlar kullanılarak araştırmalar yapılmıştır. Bu moleküllerin, konakçı ortamdaki patojen için hayatta kalma avantajını nasıl sağlayabildiğini veya konakçı hücrelerde ve immün yanıt yollarında önemli değişiklikler üretebildiğini ortaya koymuştur (Çizelge 1.1.) (Liu ve Nizet, 2009).

Çizelge 1.1. Mikrobiyal pigmentlerin potansiyel virulans fonksiyonları (Liu ve Nizet, 2009)

Pigment	Kimya	Renk	İnsan patojenleri	Virulans fonksiyonları
Staphloxanthin	Karotenoid	Altın	<i>Staphylococcus aureus</i>	Antioksidan, ROS detoksifiye eder
Piyosyaninin	Fenazin türevi zwitterion	Mavi-yeşil	<i>Pseudomonas spp.</i>	Sitotoksite, Nötrofil apoptozisi, siliyer dismotilite, Proinflamatuvar
Melanin	Poliasetilen veya polipirrin polimerler	Koyu kahverengi, siyah	<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Wangiella dermatitidis</i> , <i>Sporothrix schenckii</i> , <i>Burkholderia cepacia</i>	Antioksidan, anti fagositik Blok antimikrobiyaller
Porfirin	Heteromacrocyclic	Siyah	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Antioksidan, ROS detoksifiye eder
Granadaene	Omitin rhamnopolen	Turuncu kırmızı	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Antioksidan, ROS detoksifiye eder
Violecein	Yeniden düzenlenmiş pirolidon iskelesi	Mor	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Antioksidan, ROS detoksifiye eder
Prodigiozin	Doğrusal tripyrrol	Kırmızı	<i>Serratia marcescens</i>	immunosupresan
Hemozoin	B-hematin agregatları	Kahverengi siyah	<i>Plasmodium spp.</i>	Detoksifikasyon, mikroflora bastırma, Pro-inflamatuvar

1.5. Mikrobiyal Pigment Üretimini Etkileyen Faktörler

1.5.1. Sıcaklık

Mikrobiyal pigmentlerin üretimi büyük ölçüde mikroorganizma türüne bağlıdır ve sıcaklık, mikrobiyal pigment üretimi için ana faktördür. *Monascus* küf mantarının, büyüme ve pigment üretimi için 25-28 °C sıcaklık gerekirken, *Pseudomonas* sp. büyüme ve pigment üretimi için 35-36 °C gerektirir (Heer ve Sharma, 2017).

1.5.2. pH

pH, mikrobiyal pigment üretimi için önemli bir başka faktördür. Ortamın pH'sı, mikroorganizmanın pigment üretim miktarını ve tipini etkilemektedir. pH'daki hafif değişim, mikrobik pigmentin renk tonunu değiştirebilir ve bu durum mikroorganizma türüne göre değişebilir. *Monascus* sp için en uygun pH. 5.5-6.5 iken *Rhodotorula* için pH 4.0-4.5 uygundur. pH nötrden hafif alkaliye geçtiğinde likopen pigmenti sentezlenirken, nötrden asidiğe dönüştüğünde ise β -karoten sentezlenmektedir (Heer ve Sharma, 2017).

1.5.3. İnkübasyon süresi

24 ila 96 saat arasında değişen farklı inkübasyon süreleri, mikroorganizmanın büyümesini ve pigmentasyonunu da etkilemektedir (Heer ve Sharma 2017).

1.5.4. Karbon kaynağı

Mikroorganizmalarda misel üretimi sırasında pigment üretimi, glukoz, fruktoz, laktoz, maltoz, sukroz, glaktoz vb. gibi karbon kaynaklarından etkilenmektedir. Glikoz ve oligosakaritler gibi karbon kaynakları, büyüme ve pigment üretimi için daha avantajlıdır. *Monascus*'un volumetrik pigment oluşumu en iyi nişasta ve dekstrinde gözlemlenirken, glikoz ve maltozda orta, fruktozda ise zayıf bir pigmentasyon gözlenmiştir. Sellobiyoz, *Phaffia rhodozyma* için daha fazla pigmentasyona neden olurken glikoz hem büyümeyi hem de pigmentasyonu

teşvik etmektedir. Pigmentin tonu da pigment üretimi için kullanılan karbon kaynaklarından etkilenmektedir (Heer ve Sharma, 2017).

1.5.5. Azot kaynağı

Azot kaynakları, mikroorganizmaya bağlı olarak pigment üretimi için de önemli bir faktördür. *Monascus*'un pigment üretimi en yüksek amonyum klorür ile daha sonra amonyum nitrat ve ardından glutamat ile sağlanmıştır. Ayrıca, pepton da pigment üretiminde önemli bir rol oynamaktadır (Heer ve Sharma, 2017).

Mikrobiyal pigmentler kimyasal modifikasyonlara uğrayabilirler. Mikroorganizmalardan katı hal fermentasyonu ile elma püresi kullanılarak pembe (*Rhodotorula*), kırmızı (*Chromobacterium*), sarı (*Sarcina*) ve açık sarı (*Micrococcus*) gibi farklı tonlarda mikrobiyal renkler üretildi ve modifiye edildi. Renk üreten mikroorganizmaların çoğunun ürettiği β -karoten, suda çözünür değildir. Bu nedenle, eğer mikroorganizma bu pigmentleri ürettiyse, bu biyolojik renkler suda çözünebilir hale geldiğinde etkin olarak gıda renklendiricileri olarak kullanılabilir. *Rhodotorula*, *Chromobacterium*, *Sarcina*, *Micrococcus* tarafından üretilen modifiye pigmentler, suda çözünür ve çeşitli gıda ürünlerinde kullanılmak üzere doğal renklendirici kaynakları oluşturmaktadır. Wong ve Koehler, 1983 de etanol, amino asetik asit, aminobenzoik asit ve jelatin gibi farklı çözücüler kullanılarak *Monascus purpureus* 'nün sentezlediği pigmenti değiştirdi. Daha sonra Joshi ve Attri, 2014 de, pigmentin modifikasyonu için (*Rhodotorula*, *Chromobacterium*, *Sarcina*, *Micrococcus*) farklı solventleri denemişlerdir (Heer ve Sharma, 2017).

1.6. Mikrobiyal Pigmentlerin Kullanım Alanları

Bazı sentetik boyaların zararlı etkilerinden dolayı doğal renklendiricilere olan talep gün geçtikçe artmaktadır. Bakteriyel ve fungal pigmentler, alternatif bir doğal kökenli pigment kaynağını oluşturmaktadırlar. Mikrobiyal pigmentler, diğer doğal pigmentlerin aksine, hızlı büyüme, kolay işlem ve çevre koşullarının bağımsızlığı gibi çok büyük avantajlara sahiptir. Bakteri ve fungus pigmentleri renklendirici

özellikleri dışında, antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser aktivitesi gibi birçok biyolojik özelliğe sahiptir.

Renk, giydiğimiz kıyafetler, evimizdeki mobilyalar ve yemeğin cazibesi dahil tüm yaşam alanlarını etkilemektedir. Örneğin, bitkilerin klorofil olmadan kendi yiyeceklerini nasıl hazırlayabileceklerini veya hemoglobin olmadan vücutta oksijenin nasıl taşınabileceği düşünüldüğünde yeryüzündeki yaşamın pigmentlere bağlı olduğu söylenebilir (Britton, 1995).

Pigmentlerin renklendirici ajan olarak kullanımı, tarih öncesi zamanlardan beri uygulanmaktadır. Arkeologlar, ilk insanların estetik amaçlı boya kullandığına dair kanıtlar bulmuşlardır. Tarih öncesi zamanlarda pigment kullanımı, 350.000 ile 400.000 yaş arasında olan pigmentler ve öğütme ekipmanlarının, Zambiya yakınlarındaki Lusaka'daki bir mağarada bulunmasıyla kanıtlanmıştır. Pigmentler dünyanın farklı yerlerinde kullanılmıştır. Avrupa'da, Bronz Çağı boyunca uygulanmıştır. Çin'de bitkiler ve böceklerle boyama 5.000 yıldan daha uzun bir süredir izlenmiştir. Hindistan'da boya kullanımı İndus Vadisi döneminde (MÖ 2500) ortaya çıkmıştır (Aberoumand, 2011). Kına, MÖ 2500'den önce kullanılmışken, İncil'de safrandan bahsedilmiştir. Mısır'da alizarin varlığı, mumyaların renkli bir beze sarılmış olarak bulunmasıyla kanıtlanmıştır. Mısır'da yiyeceklerin renklendirilmesi, şeker üreticilerinin şekerlere doğal özler eklemesiyle başlamıştır. Benzer şekilde, Japonya'da Nara döneminde (8. yüzyıl) Shosoin hazine evinde bulunan metinde, soya fasulyesi ve adzuki fasulyesi keklerin doğal olarak renklendirilmesi için kullanıldığı belirtilmiştir (Aberoumand, 2011).

İlk sentetik renk olan “mauvine”, 1856'da Sir William Henry Perkin tarafından geliştirildi ve bu gelişme sentetik renklendirici tarihinde bir devrim başlattı. O zamandan beri, sentetik renk üretimi sanayi devrimi ile hızla ilerlemiştir.

Sentetik renklendiriciler, üretiminin daha kolay ve ucuz olması, gıdada tadı değiştirmemesi, üstün renklendirme özellikleri ve renklendirmek için küçük miktarlara ihtiyaç duyulması nedeniyle geniş bir kullanım alanına sahip olmuştur. O yıllarda üreticiler 80'den fazla yapay renklendirme maddesi geliştirmişlerdir. Ancak o zamanlarda sentetik renklendiricilerin sağlık ve çevre üzerine olumsuz etkilere neden olabilecek kriterleri henüz bilinmediği için değerlendirilmemiştir (Downham ve Collins, 2000). Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından gıdalarda, ilaçlarda ve kozmetik preparatlarda kullanım için onaylanmış bazı sentetik renklendiricilerin daha sonra kanseri teşvik ettiği bulunmuştur. Bazı sentetik

boyalar, belirgin tehlikelerinden dolayı harici kullanımdan bile çekilmiştir. Örneğin, benzidin boyaları bağırsak kanserine neden olurken, karbon siyahının (yaygın olarak mürekkeple pigment baskı olarak kullanılır) potansiyel bir kanserojen olduğu düşünülmektedir. Çevresel açıdan bakıldığında, artırılmamış endüstriyel boya atıklarının etik dışı boşaltılması, uzun süre stabilite nedeniyle toksik etkiye neden olmaktadır. Sentetik renklendiricilerin dezavantajları, doğal pigmentlere olan küresel talebi arttırmıştır (Manikprabhu ve Lingappa, 2013).

Doğal pigmentler için ana kaynaklar bitki veya mikroorganizmalardır. Bitki pigmentlerinin kullanımı, yıl boyunca kullanılamaması, pigment stabilitesi ve çözünürlük gibi birçok dezavantaja sahiptir. Ayrıca büyük ölçekli bitki kullanımı değerli türlerin kaybına da neden olabilir. Bu nedenlerden dolayı, bitkilerin kullanımı tercih edilmemektedir (Downham ve Collins, 2000). Funguslar ve bakteriler gibi mikroorganizmalar hali hazırda alternatif doğal pigment kaynağını oluşturmaktadırlar. Bakteri ve fungal pigmentler geniş uygulama alanları (Çizelge 1.2.), hava koşullarından bağımsız, düşük maliyetli bir ortamda kolay ve hızlı bir üreme, kolay işlenmesi nedeniyle bitki pigmentlerine göre çok büyük avantajlara sahiptir (Manikprabhu ve Lingappa, 2013).

Çizelge 1.2. Mantar ve bakteri pigmentleri ve uygulama alanları (Narsing Rao vd., 2017).

Mantarlar/Bakteriler	Pigment	Uygulama
Bakteriler		
<i>Micromonospora lupin</i>	Anthraquinone	Antitümör ajan
<i>Streptomyces sp.</i>	Karatenoid	Gıda sınıfı pigmenti
<i>Choromobacterium</i>	Violecein	Anti-tümör, anti-mikrobiyal ve anti-paraziter ajan
<i>Choromobacterium sp.</i> NIIST(MTCC 5522)	Violacein	antifungal ajan
<i>Hymenobacter sp.</i> ve <i>Chryseobacterium sp.</i>	Karotenoid	Boya duyarlılaştırılmış güneş pillerinde foto-duyarlılaştırıcılar
<i>Streptomyces glaesensler</i> NEAE-H	Melanin	Anti-kanser ajanı ve antioksidan
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piyosiyininin	Antimikrobiyal ajan
<i>Hahelle chejuensis</i>	Prodiginines	Antibiyotik
<i>Pedobacter</i>	karotenoid	Antioksidan
<i>Vogesella indigofera</i>	Mavi pigment	Ağır metalleri algılar
Mantarlar		
<i>Aspergillus versicolor</i>	Asperversin	Antifungal ajan
<i>Fusarium sp.</i> JN158	Benzoquinon	Antikanser ajanı
<i>Fusarium oxysporum</i>	Anthraquinone	Yünlü kumaşların boyanması
<i>Talaromyces verruculosus</i>	Kırmızı pigment	Antimikrobiyal aktiviteye sahip boya tekstil
<i>Stemphylium lycopersici</i>	Anthraquinone	Antioksidan

Renk pazarının büyüklüğü hakkında güvenilir yayınlanmış istatistik yoktur. Bununla birlikte, küresel endüstri analistlerine göre, organik pigmentlere ve boyalara olan talebin 2017 yılına kadar yaklaşık 10 milyon tona ulaşması bekleniyor. Mevcut çeşitli pigmentler arasında, yalnızca karotenoidlerin pazarı 2018 yılına kadar 1,4 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir (Venil vd., 2014).

β -karoten mikrobiyal üretimi yaklaşık 1000 ABD Doları / kg iken, sentetik yollarla yaklaşık 500 ABD Doları / kg'a mal olmaktadır. Her ne kadar mikrobiyal pigmentler birkaç kat daha pahalı olsalar da doğal ve güvenli olmaları için sentetik boyalarla rekabet etmektedirler (Venil vd., 2013).

Sentetik boyalar önemli çevre ve sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Buna karşılık mikrobiyal pigmentler, çevre dostudur ve tekstil endüstrisinde, gıda renklendiricisi olarak, antioksidanlar, biyo-indikatörler, antimikrobiyal ve

antikanser ajanları olarak kullanılmaktadır. Mikrobiyal pigmentleri boya endüstrisinde daha çok kullanılabilir hale getirmek için kapsamlı araştırmalar yapılmış olmasına rağmen, sentetik boyaların yerine kullanılması halinde bunların üretimi piyasa talebini karşılamamaktadır. Günümüzde toksik sentetik boyaların kullanımını azaltmak için, mikrobiyal kaynaklı pigment üretimini artırmaya yönelik yeni mikrobiyal kaynak bulma, bunların optimizasyonu ve iyileştirilmesi ve genetik mühendislik yoluyla üretim maliyetini azaltmak için çalışmalar yapılmaktadır. Biyolojik renklendiricilerin, gıda, ilaç, tekstil, matbaa endüstrilerinde vb. alanlarda geniş uygulamaları vardır.

1.6.1. İlaç endüstrisi

Çeşitli hastalıkların tedavisinde pigment gibi ikincil metabolitler klinik uygulamalarda potansiyel olarak etkinlik göstermektedir. Bu pigmentler antibiyotik, antikanser ve immün baskılayıcılık gibi birçok özelliğe sahiptir. Bakterilerin ürettiği pigmentlerin birçok tıbbi özellikleri vardır Adonirubin ve astaksantin, aynı zamanda nutrasötikler olarak da işlev gören ksantofillerdir. Ksantofiller, antioksidan, antikanserojen etkiye sahiptir. Kırmızı bir pigment olan astaksantin ise, ticari değeri yüksek olan ve aynı zamanda ilaç olarak kullanılan önemli karotenoidlerdir (Heer ve Sharma, 2017).

Dünyada ilaca dirençli bakterilerin ortaya çıkması ve bu tür patojenlerle savaşmak için antibiyotik eksikliği, toplum için önemli bir endişe olmaya devam etmektedir. Mikrobiyal pigmentler, çok çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal ajanlar olarak hizmet eder. Karotenoidler, melaninler, flavinler, kinonlar, monasinler, violacein ve indigo gibi pigmentlerin iyi antimikrobiyal ajanlar oldukları bildirilmiştir (Malik vd., 2012). *Pseudomonas aeruginosa*'dan elde edilen piyosiyanın ve pyorubin gibi pigmentler, genellikle idrar yolu ve yara enfeksiyonlarıyla ilişkili olan *Citrobacter sp.*'ye karşı belirgin antibakteriyel aktivite göstermektedir. *Micrococcus luteus* KF532949'den üretilen pigmentler *Staphylococcus sp.*, *Klebsiella sp.* ve *Pseudomonas sp.* gibi yara ile ilişkili patojenlere karşı umut verici antimikrobiyal aktivite göstermektedir *Streptomyces hygroscopicus*'tan elde edilen pigmentler, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* ve *Klebsiella spon*'un *Staphylococcus aureus* ve β -laktamaz üreten suşlarının metisilin ve vankomisine dirençli suşları gibi ilaca dirençli patojenlere karşı iyi antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Ayrıca *Monascus ruber*'den sentezlenen

pigment, gıda kaynaklı bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Ayrıca, bir endofitik fungus türü olan *Monodicty castaneae*'den sentezlenen pigment *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Vibrio kolera* gibi insan patojeni olan bakterilerin üremelerini inhibe ettiği saptanmıştır.

Bazı pigmentlerin antibakteriyal aktivite mekanizmasını anlamak için çalışmalar yapılmıştır. *Vibrio sp.* DSM 14379 tarafından üretilen prodigiosinin, *E. coli* üzerindeki antibakteriyel etkileri değerlendirilmiştir. Prodigiosin ile muamele edilmiş *E. coli* hücrelerinde membranın bozulmasına, solunumun azalmasına, protein ve RNA sentezinin inhibisyonuna neden olduğu gözlenmiştir (Danevcic vd, 2016). Yukarıdaki bilgiler ışığında, mikrobiyal pigmentlerin yeni bir ilaç kaynağı olarak kullanılabileceği söylenebilir.

Vücuttaki serbest radikallerin artması, kanser, diyabet, kardiyovasküler ve otoimmün hastalıklar gibi kronik hastalıkların görülme olasılığını arttırmaktadır. Bunu önlemek için antioksidanlar kullanılmaktadır. Antioksidanlar, hücresel hasarı geciktiren veya engelleyen, serbest radikallere elektron vererek ve serbest radikal temizleme özellikleriyle onları nötralleştiren moleküllerdir. Karotenoid ve naftalinon gibi mikrobiyal pigmentlerin antioksidan aktiviteleri gözlenmiştir. Benzer şekilde, endofitik fungus *Stemphylium lycopersici*'den antrakınonlar ve *Streptomyces glaucescens* NEAE-H'den melanin pigmentleri antioksidan olarak bildirilmiştir. Ksanthomonadin benzeri pigment hem antioksidan aktivite ve hem de ışık hasarına karşı koruma göstermektedir. Benzer şekilde, bir antarktik bakteri olan *Pedobacter*'den elde edilen karotenoid pigmentin antioksidan etkinliği tespit edilmiştir. Pigment güçlü antioksidan kapasiteye sahiptir ve bakteriyi oksidatif hasara karşı korumaktadır. Yukarıdaki bilgiler, antioksidan olarak kullanılan mikrobiyal pigmentlerin, kanser ve kalp hastalığı gibi birçok hastalığın görülme sıklığını önleyebileceğini de göstermektedir.

Kanser, insanda bilinen en ölümcül hastalıklardan biridir. Çünkü mevcut tedavilerin çoğu etkili değildir. Antikanser ajanlar olarak mikrobiyal pigmentleri kullanma çabaları başarılı tedavilerin temelini atmıştır. Birçok mikrobiyal pigmentler antikanser aktivitesine sahiptir. *Psödoalteromonas sp* 1020R' den prodigiosin gibi pigmentler U937 lösemi hücrelerine karşı sitotoksositeye sahiptir (Wang vd., 2012). *Streptomyces glaucescens* NEAE-H'den sentezlenen melanin, cilt kanseri hücre hattına karşı antikanser aktivitesi olduğu rapor edilmiştir. Mangrov ormanlarından izole edilen endofitik fungus *Alternaria sp.* ZJ9-6B' den

sentezlenen antrakinonun, insan meme kanseri hücre hatlarına karşı anti-kanser aktivitesi olduğu bildirilmiştir. *Monascus spp.*'den elde edilen pigmentlerin de farklı kanser hücrelerine karşı kayda değer antikanser aktiviteleri saptanmıştır. *Monascus* 'dan sentezlenen *monaskin* pigmenti, farelerde deri kanseri oluşumuna karşı engelleyici aktivite göstermiştir. *Monascus* 'dan sentezlenen *diğer* bir pigment olan *ankaflavin* ise HEP G2 ve A549 insan kanser hücresi türlerine karşı inhibe edici etki göstermektedir. Benzer şekilde, monaphilon A ve monaphilon B pigmentleri de HEP-2 insan larenks karsinomu hücre hatlarına karşı anti-proliferatif etki göstermektedir. Prodigiosin benzeri pigment, 60'tan fazla kanser hücresi soyuna karşı antikanser aktivitesi açısından test edilmiştir ve çoklu hücresel hedeflerin varlığı nedeniyle iyi bir antikanser aktivitesi göstermiştir. Bu bilgiler ışığında, mikrobiyal pigmentlerin kanser tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olabileceği söylenebilir (Narsig Rao vd., 2017).

1.6.2. Tekstil endüstrisi

Tekstil, esas olarak sentetik boyaların neden olduğu büyük miktarda atık oluşturur. Bu sentetik boyalar, kolay ve ucuz sentezlenmeleri, ışığa karşı kararlılıkları, tüm renk spektrumunu kapsayan ileri renklere sahip olmaları nedeniyle endüstrilerde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu sentetik boyalar, cilt kanseri ve alerjiler gibi çeşitli sağlık sorunlarına yol açan toksisite, mutajenite ve kanserojenlik özellikleri gibi birçok dezavantaja sahiptir. Bu nedenle, tüketiciler renklendirici olarak doğal kökenli boyalar talep etmektedir (Heer ve Sharma, 2017).

Tekstil endüstrisi yaklaşık 1,3 milyon ton sentetik boya ve boya öncüsü kullanır (Venil vd., 2013). Boya ve terbiye işlemleri sırasında her yıl yaklaşık 200.000 ton boya atık olarak kaybedilmektedir. Ne yazık ki, bu boyaların çoğu geleneksel arıtma işlemlerine karşı yüksek dayanıklılığa sahip olduğu için etkin olarak kalır. Bu nedenle, çevre dostu boyaların kullanımı konusunda büyük bir talep vardır. Mikrobiyal pigmentler, tekstil kumaşların boyanmasında uygulanabilir çevre dostu renklendiricilerdir. Farklı kumaş türlerini boyamak için birçok mikrobiyal pigment kullanılmaktadır. *Vibrio spp.*den sentezlenen prodigiosan yün, naylon, akrilik ve ipek kumaşları boyayabilir. *Fusarium oxysporum* 'dan sentezlenen antrakinon ise yün kumaşları boyamak için kullanılabilir. *Talaromyces*

verruculosus' tan sentezlenen kırmızı pigmentin ise pamuklu kumaşlarda sitotoksik etkisi olmayan iyi bir renk tonu verdiği gözlenmiştir (Narsing Rao vd., 2017).

Mikrobiyal pigmentler farklı tekstillerde farklı renk tonları oluşturmaktadır. *Janthinobacterium lividum*' den elde edilen pigment naylon ve vinylon kumaşa lacivert renk, ipek, pamuk ve yün üzerinde ise mavimsi mor renk oluşumuna neden olmaktadır. Benzer şekilde, *Thermomyces*'ten elde edilen sarı pigmentin boyama yeteneği pamuk, ipek ve yün kumaşlar için denenmiştir. İpek kumaşın *Thermomyces* pigmentleri için diğer kumaşlarla karşılaştırıldığında yüksek afinite gösterdiği görülmüştür (Poorniammal vd., 2013). *Streptomyces* NP2 ve NP4 soylarından elde edilen koyu mavi ve kırmızı pigmentlerin ise kullanılan malzemeye göre boyama özelliklerinde önemli değişiklikler olduğu gözlenmiştir. Poliamid ve akrilik lifler canlı renkte boyanırken, pamuklu ve selülozik liflerin zayıf boyandığı belirtilmiştir. (Kramar vd., 2014).

Ayrıca mikrobiyal renklendirici kullanılarak elde edilen tekstiller, antimikrobiyal özellikler göstermiştir. *Vibrio sp*'den elde edilen mikrobiyal renklendirici olan prodiginines ile boyanmış tekstil kumaşı *S. aureus* ve *E coli*'ye karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir. Mikrobiyal pigmentlerin yaygın olarak bulunup bulunmadığı, farklı tekstillere olan afiniteleri, maliyet etkinlikleri ve toksik olmayan doğaları göz önüne alındığında, pazar çekiciliğini artırabilir, bu durum insan ve doğa için toksik olan sentetik pigmentlerin yerini almasına neden olmaktadır (Narsing Rao vd., 2017).

1.6.3. Gıda renklendiricileri ve takviyeleri

Gıda endüstrisinin önemli amaçlarından biri, cazip bir görünüme sahip gıda maddeleri üretmektir. Gıda üreticileri doğal gıda renklerini tercih etmektedirler, çünkü yapay renklendiriciler tüketildiğinde sağlık üzerinde birçok olumsuz etki oluşturmaktadır. Doğal gıda renklendiricilerine karşı oluşan talep, gıda endüstrisindeki kullanılabilirliğinden daha fazla olmaktadır. Mikrobiyal renklendiricilerin, üretimi ve elde ediliş yolu kolay olduğu için gıda renklendirme maddesi olarak önemli rol oynadığı ve birçok doğal rengin mevcut olduğu bulunmuştur.

Penicillium oxalicum, kozmetik ve gıda endüstrisinde kullanılan kırmızı renk üreten bir fungustur. Bu renkler bebek mamaları, kahvaltı gevrekleri, makarnalar, soslar, işlenmiş peynirler, meyveli içecekler, probiyotik gıda renklendiricileri, vitamin bakımından zengin süt ürünleri ve bazı enerji içecekleri vb. gibi farklı ürünlerde kullanılmaktadır. Bu nedenle, mikrobiyal kaynaklı doğal pigmentler ve renkler, çevre dostu, sağlıklı ve çekici renklere sahip olmalarından dolayı iyi bir alternatiftir. Gıda ürünlerine sentetik pigmentler yerine, doğal veya mikrobiyal renklerin eklenmesi toplumda renklendiricilere karşı mevcut endişesinin azalmasını sağlamaktadır. Ek olarak, doğal renklendiriciler sadece insan sağlığına yararlı olmayacak, aynı zamanda biyoçeşitliliğin korunmasında da yardımcı olacaktır (Heer ve Sharma, 2017).

Mikrobiyal pigmentler, biyolojik etken maddeleri gıda, ilaç ve kozmetik endüstrisinde önemli ticari değeri olan birçok diğer doğal bileşikler elde etmenin aracıdır. β -karoten Vitamin A'nın öncüsü olduğundan, karotenoidler vitamin takviyesi olarak kullanılabilir. A vitamini eksikliği gece körlüğüne ve ciddi durumlarda kseroftalmi hastalığına neden olabilmektedir. Doğal gıda sınıfı biyorenlendiricilerin bir başka örneği de sütte, bazı yapraklı sebzelerde et ve balıkta bulunan bir vitamin kaynağı olan Riboflavin'dir. Sarı β -ksantinler hem biyolojik renklendiriciler ve hem de temel diyet amino asitlerini, gıda maddelerine eklemek için kullanılabilirler (Heer ve Sharma, 2017).

1.6.4. Matbaa endüstrisi

Orman kaynaklarını korumak ve atıkların azaltılmasını sağlamak için, ofislerde, okullarda vb. yerlerde oluşan atık kağıtları yeniden kullanmak ve geri dönüştürmek önemlidir. Kağıtların yeniden kullanılması önemlidir, ancak baskıların kâğıttan silinmesi de önemlidir. Mürekkep püskürtmeli baskı için kullanılan silinebilir mürekkep *Monascus* pigmentlerini içerir. *Monascus*'un bu pigmentleri ultraviyole veya görünür ışığa maruz kaldığında renk oluşumu gözlenir (Heer ve Sharma, 2017).

1.7. Melanin ve Melanin Pigmentinin Özellikleri

Melaninler, çeşitli patojen bakteri türleri, fungusları ve helmintleri içeren çok çeşitli organizmalar tarafından üretilen gizemli pigmentlerdir. Melanin pigmenti ile çalışmak kolay değildir, çünkü bu pigmentlerin biyokimyasal ve yapısal analizleri zordur. Melanin üreten mikroorganizmalar, konakçı savunma mekanizmalarının duyarlılığını azaltarak virülanslılığa katkıda bulunmaktadır. Bununla birlikte melanin üreten mikroorganizmalar ve konakçının etkileşimi karmaşıktır. Konakçı savunması melanin ile ilgili antijenlere karşı çeşitli bağışık yanıtlar vermektedir. Melanin üretimi miktarı çevresel streslere karşı korunmaya bağlıdır. Melanizasyonla müdahale, antimikrobik ilaç ve böcek ilacı gelişimi için potansiyel bir stratejidir. Melanizasyon işlemi çeşitli patojenlerin hücre işleyişini etkileyerek patojenik güce neden olmaktadır (Nosanchuk ve Casadevall, 2003).

Melaninin biyolojik rolü son zamanlarda dikkat çekmektedir. Melanin, protein ve karbonhidratlar ile kompleks fenolik bileşiklerin oksidatif polimerizasyonu sonucu oluşan, koyu kahverengiden siyaha kadar yüksek molekül ağırlıklı pigmentler için kullanılan ortak bir terimdir. Hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar arasında yaygın olarak bulunurlar. Melanin pigmenti büyüme için gerekli değildir. UV ve elektromanyetik ışınlama, kuruma ve aşırı sıcaklık gibi özel koşullar altında hayatta kalmayı ve rekabet gücünü arttırmak için üretilmektedir (Plonka ve Grabacka, 2006).

1.7.1. Melanin pigmentinin yapısı

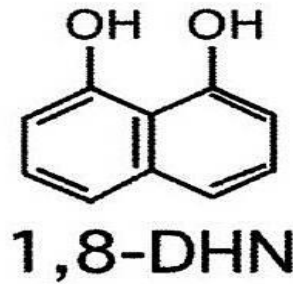
Melanin polimeri mikroorganizmaları çok çeşitli toksik hasarlara karşı koruyabilme kabiliyeti nedeniyle 'fungal zırh' olarak adlandırılmıştır. Son yapılan çalışmalara göre melaninin ekstrem çevre koşullarında ve enfeksiyon esnasında fungusların hayatta kalmasına önemli katkıları olduğunu ortaya çıkarmıştır (Gómez ve Nosanchuk, 2003). Birçok fungus, koyu kahverengi ya da siyah olan melaninleri üretmektedir (Youngchim vd., 2004).

Hem prokaryot canlılarda hem de ökaryot canlılarda melanin üretimi saptanmıştır. Melaninin temel işlevleri hala tartışma konusu olsa da melanin büyük olasılıkla çevresel stres koşullarından korunmak için sentezlenir ve patojen

mikroorganizmalarda artan virölanslıkla bağlantılıdır (Plonka ve Grabacka, 2006). Buna rağmen melaninlerde bulunan çeşitli birimlerin oranını doğru bir şekilde belirlemek için hala kesin bir yöntem bulunmamaktadır. Bu durum büyük olasılıkla, melaninlerin kimyasal özelliklerinden (örneğin geniş bir pH aralığında çözünmezlik), heterojen yapıda olmasından ve ayrıca melanin polimerlerini monomer birimlerine ayıran yöntemlerin bulunmamasından kaynaklanmaktadır (Wakamatsu ve Ito, 2002).

Birçok mantar türü, biyolojik olarak önemli bir pigment olan melanin üretmektedir. Doğada bulunan melanin, çoğu zaman ultraviyole radyasyonuna karşı koruyucu bir rol sağlamaktadır. Öneme ve her yerde bulunmasına rağmen, kimyasal yapısının detayları gibi pigmentle ilgili pek çok temel soru vardır. Bu durum melaninin çözünmez olması ve dolayısıyla standart biyokimyasal tekniklerle çalışılamamasından kaynaklanmaktadır. Funguslar tarafından üretilen melanin, insanlarda ve bitkilerde patojen olan mikroorganizmaların virölanslıklarına katkıda bulunmaktadır. Melanin pigmenti, fungal direnci ve ekstrem koşullarda hayatta kalma oranını artırır. Örneğin, radyasyona dirençli melanize funguslar, Antarktika ve kirlenmiş nükleer reaktörler dahil olmak üzere sert iklimlerde hayatta kalabilir (Eisenman ve Casadevall, 2012).

Çoğu fungal melaninler, (DHN) ve DHN-melaninler olarak bilinen, 1,8-dihidroksinaftalen (Şekil 1. 1.) öncüsü molekülden üretilmektedir.



Şekil 1. 1. DHN melaninin kimyasal formülü (Okamoto vd., 2001)

1.7.2. Melaninin hücrelerdeki yerleşimi

Melaninin hücrelerdeki yerleşimi organizmalar arası farklılık göstermektedir. Mikrobiyal melanin, hücre içinde veya hücre dışında (örneğin hücre dışı membranlar) boşluklarda bulunabilir. Transmisyon elektron mikroskopları, melanize olmayan *C. neoformans* hücrelerinin hücre duvarına göre, melanize olan hücre duvarında elektronca yoğun bir tabakanın varlığını ortaya koymuştur (Wang vd., 1995).

Melanin, mantar türlerine bağlı olarak hücre duvarının iç veya dış tabakalarında bulunmaktadır. Örneğin, *C. neoformans*'da, melanin hücre duvarının en üst tabakasında ve plazma membranında bulunmaktadır. Son yapılan çalışmalar, fungal melaninin, memeli melanozomlarına benzer olarak iç veziküller içerisinde sentezlenebileceğini ve hücre duvarına taşınabileceğini de göstermektedir.

Buna karşılık *Candida albicans*'ta melanin dış tabakada bulunmaktadır ve bitki patojeni *Gaeumannomyces graminis*'de, ise hücre duvarının ortasında bulunmaktadır (Walker vd., 2010). Yakın zamanda yapılan çalışmalar, hücre duvarı bileşenleri ile melanin arasındaki ilişkiyi ve ayrıca hücre duvarı melanininin genel yapısını ortaya çıkarmaktadır.

Melanin, hücre duvarının genel yapısı ve mimarisi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Melanin üreten *A. fumigatus*'un yabancıl tipinin ve albino mutantının konidiaları karşılaştırıldığında, melanin üreten ve melanin üretmeyen fungusların hücre yüzeyleri arasında büyük farklılıklar tespit edilmiştir. SEM ve TEM nun sonuçları, albino mutantlarının hücre duvarının kalın bir dış tabakasından yoksun olduğunu göstermektedir. Daha ileri analizler, hücre duvarındaki melanin varlığının, hücrelerin hem negatif yükünü (Zeta potansiyeli) hem de hidrofobikliğini arttırdığını ortaya koymaktadır (Pihet vd., 2009).

Fungal hücre duvarındaki melaninin katı bir tabakadan ziyade küçük granüllerden oluştuğu izlenimi, melanini yerinde tutmak için bir “iskele” nin varlığına ve ihtiyacına işaret etmektedir. Melaninin hücre duvarı bileşenlerine çapraz bağlanması olası bir mekanizmasıdır. Aslında, yayınlanan raporlar, kitinin mantar hücre duvarlarında melanin için iskele olabileceğini ileri sürmektedir. Kitin diğer hücre duvarı polisakkaritleri ve proteinlerine çapraz bağlanır ve fungal hücre duvarının yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır.

Memeli hücrelerinde melanin, melanositler olarak bilinen özel hücreler tarafından sentezlenir. Melanoz biyosentezi, lizozom ile ilişkili organeller olan melanozomlarda ortaya çıkar. Melanozom oluşumu çeşitli morfolojik aşamalardan geçer. Erken aşamalarda, çizgili bir iskele gibi görülebilir. Melanin yavaş yavaş birikerek melanozomda koyu renkli çizgilerin görünümünü oluşturur. Bu sonuçlar, melaninin hücre duvarından ayrı bir tabaka olmayabileceğini, daha ziyade entegre bir bileşen olduğunu göstermektedir (Eisenman ve Casadevall, 2012).

Genel olarak, mantar hücresi duvarlarında lokalize olan melaninin, UV radyasyonu gibi çevresel streslere toleransa katkıda bulunduğu kabul edilmektedir (Kawamura vd., 1997).

1.7.3. Melanin tipleri ve melanin sentez yolları

Melaninler yüksek moleküler ağırlıklı, negatif yüklü, organik sıvılarda ve suda çözünemeyen, hidrofobik, aside dirençli pigmentlerdir (Nosanchuk ve Casadevall, 2006; Nosanchuk ve Casadevall, 2003).

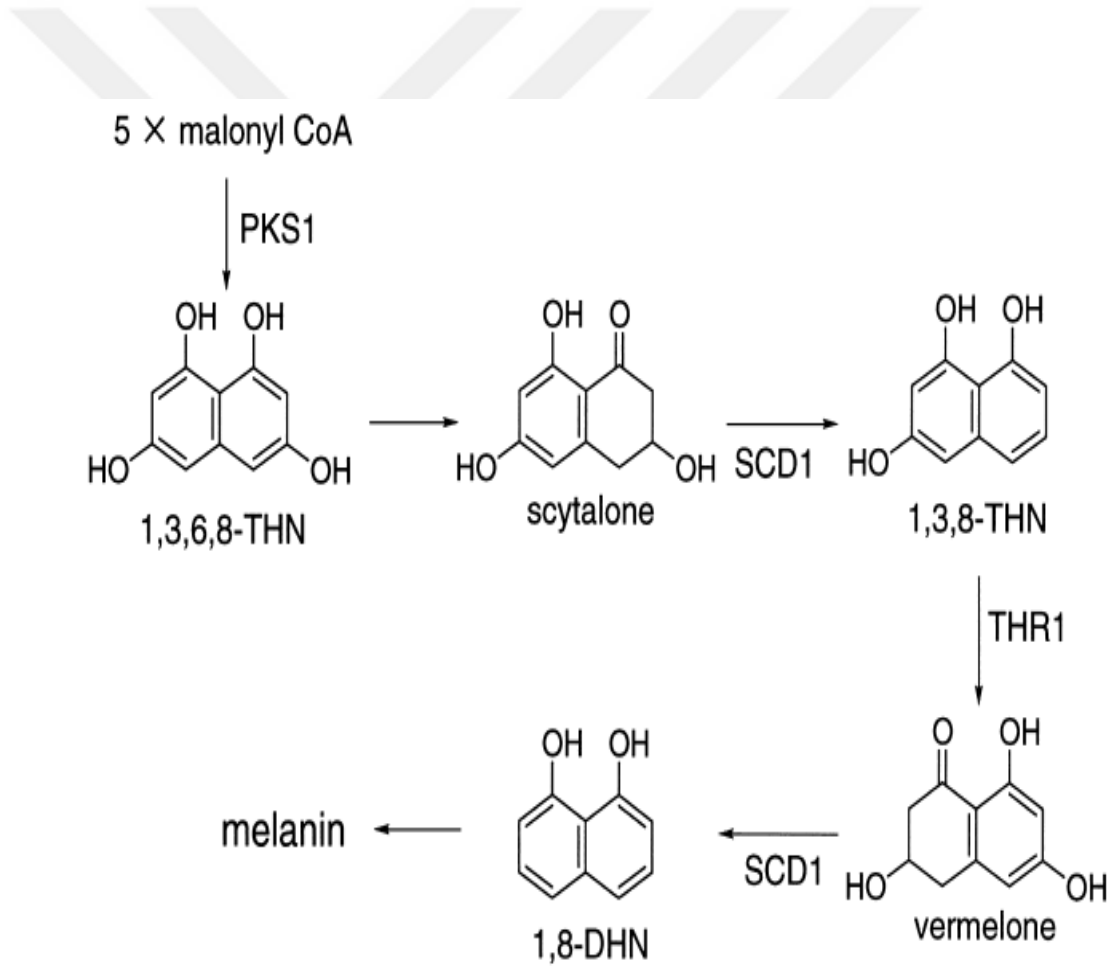
Organizmalarda bulunan melanin, tür ve sentez yolları açısından farklılık göstermektedir. Melanin prokaryotlardan ökaryotlara, bakterilerden insana kadar görülebilen canlılar arasında ortak olarak bulunan bir pigmenttir. Ama organizmalarda bulunan melanin tipleri ve sentez yolları birbirinden farklıdır.

Memelilerde melanin sentezi, tirozinaz tarafından katalize edilmekte ve melanin sentez yolağında tirozin veya dihidroksifenilalanin kullanılmaktadır. Mikroorganizmalarda ise melanin, fenoloksidazlar (tirozinaz, lakkaz veya katekolaz) ve/veya poliketid sentaz yolağıyla sentezlenir. Tirozinazların aksine, lakkazlar tirozini 3,4-dihidroksifenilalanine (L-DOPA) dönüştüremez. Melaninler, genellikle siyah veya kahverengi pigmentler olarak bilinirse de diğer renkler de oluşabilir. L-DOPA'dan köken alan pigmentler siyah veya kahverengidir ve ömelaninler olarak tanımlanırlar. Sarı veya kırmızımsı melaninler, sistein ile L-DOPA içerirler ve feomelaninler olarak adlandırılırlar. Homojentisik asitten tirozinaz aracılığıyla sentezlenen kahverengimsi melaninler piyomelaninler olarak tanımlanırlarken, asetattan poliketid sentaz yolağı aracılığıyla sentezlenen melaninler

ise genellikle siyah veya kahverengidir ve dihidroksinaftalen (DHN) melaninler olarak bilinirler.

Funguslarda melanin sentezinin iki yolu bulunmaktadır.

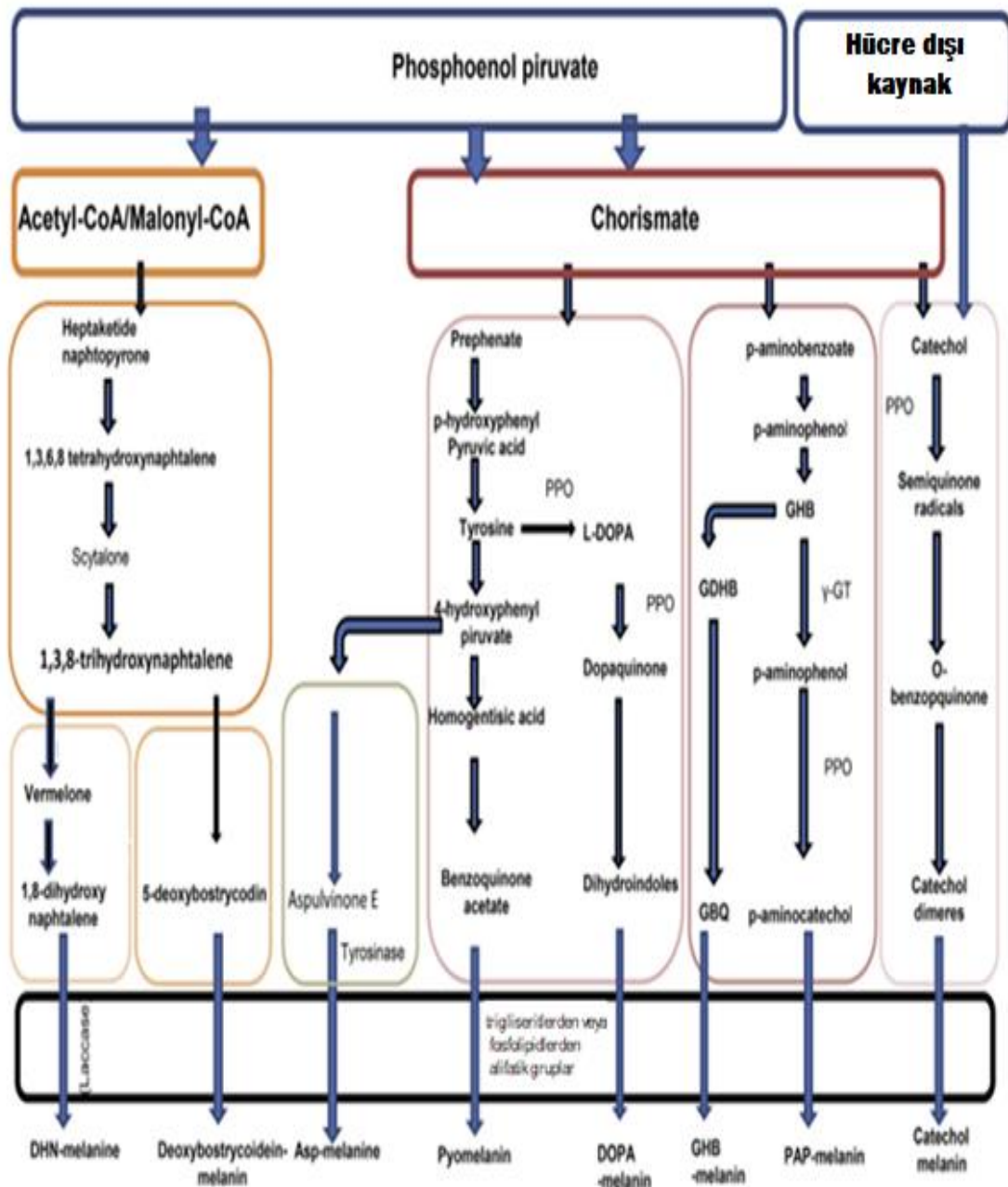
Birçok fungus, DHN yolu ile melanini sentezler. Bu yolda öncü molekül olan asetil coA veya malonil coA, endojen olarak üretilmektedir. İlk adım olan 1,3,6,8-tetrahidroksinaftalin (1,3,6,8-THN) oluşumu, bir poliketit sintazı (PKS) ile katalize edilmektedir. 1,3,6,8-THN üretiminden sonra, bir dizi indirgeme ve dehidrasyon reaksiyonları ile ara ürünler olan scytalon, 1,3,8-trihidroksinaftalin, vermelon ve son olarak 1,8-dihidroksinaftalinden (DHN) üretilmektedir (Şekil 1.2.). DHN'nin polimerizasyonu melanin oluşumuna yol açar (Eisenman ve Casadevall, 2012).



Şekil 1.2. 1,8 DHN melanin üretim basamakları (Okamoto vd., 2001)

Bazı funguslar bir tür melanin sentezlerken, diğerlerinin ise iki veya üç farklı melanin türünü sentezlediği bilinmektedir (Şekil 1.3.). Bu durum farklı melaninlerin farklı biyolojik rol oynadığını ya da organizmaların hayatta kalabilmeleri için alternatif biyosentetik yollar geliştirmek zorunda kaldığını düşündürmektedir (Toledo vd., 2017).





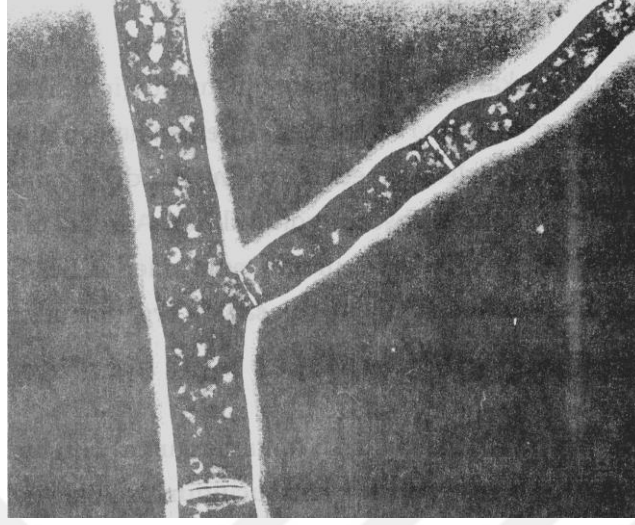
Şekil 1.3. Funguslarda melaninin farklı sentez yolları. PPO, polyphenol oksidaz, GHB, γ -L-glutaminyl-4-hydroxybenzene. GDHB, γ -L-glutaminyl-3,4-dihydroxybenzene. γ -GT, γ -Glutaminyltransferase. GBQ, γ -L-glutaminyl-3,4-benzoquinone. NRPS, ribozomal olmayan peptit sentezi (Toledo vd., 2017).

1.8. Fungusların Genel Özellikleri

Funguslar, eukaryotik, tipik olarak filamentli (ipliksi) yapıda olan canlılardır. Bitkiler gibi hücre duvarına sahiptirler ve hemen hemen tümü hareketsizdir. Fotosentetik pigment içermezler, bu nedenle besinlerini diğer canlıların hazırladığı organik maddelerden genellikle absorpsiyonla alırlar. Aerobik olarak gelişirler ve enerjiyi organik maddelerin oksidasyonundan temin ederler (Carris vd., 2012).

Günümüze kadar seksen bin fungus türü tanımlanmıştır. Fungusların habitatları oldukça büyük farklılıklar göstermektedir. Bir kısmı suculdur, özellikle tatlı sularda yaşar. Denizlerde yaşayan birkaç fungus türü de vardır. Ancak büyük bir çoğunluğu toprakta ve ölü bitkisel atıklar üzerinde yaşamaktadır. Bunun yanında insan, hayvan ve bitkilerde parazit olanları da mevcuttur. Hayvansal ve bitkisel atıkların çürütülmesinde, bu yapılarda bulunan azot, fosfor, potasyum, sülfür, demir ve kalsiyum gibi elementlerin serbest bırakılmasında, bazı peynir tiplerinin (Rokufort, Kamembert) eldesinde, antibiyotik (penisilin) eldesinde, tiamin, biyotin, riboflavin gibi bazı vitaminlerin, amilaz, pektolaz gibi enzimlerin ve gibberellin gibi hormonların eldesinde funguslardan yararlanılmaktadır. Bir fungus grubu olan mayalar ekmekçilikte ve şarap, bira gibi fermente ürünlerin eldesinde kullanılır. Tüm bu yararlarının yanı sıra, fungusların çeşitli zararları da olabilir. Örneğin; insan, hayvan ve bitkilerde çeşitli hastalıklara, yiyecek ve gıdaların bozulmasına ve hatta uçakların benzin depolarında gelişerek uçakların düşmesine dahi neden olabilmektedirler.

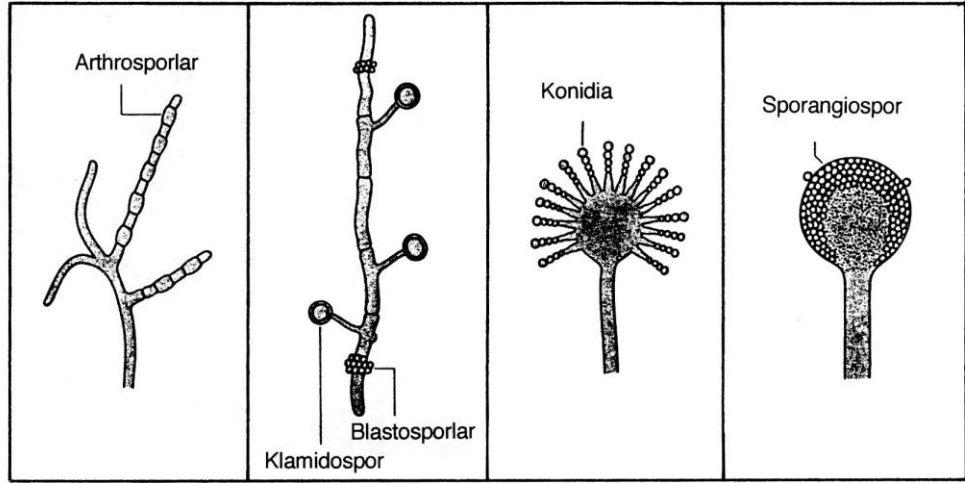
Funguslarda vejetatif yapıyı oluşturan iplikçiklerin her birine hif, bir türe ait hiflerin tümüne ise misel denir. Bazı funguslarda hifi oluşturan uzun, silindirik hücreler genellikle septum denen bölmelerle birbirinden ayrılır (Şekil 1.4.).



Şekil 1.4. Dallanmış hif yapısının ışık mikroskopunda görünüşü (Güven ve Kıvanç, 2009)

Fungus hücreleri etrafında, iyi gelişmiş bir hücre çeperi yer alır. Hücre çeperi ya sellüloz ya kitin veya her ikisini de içerebilir. Funguslarda da diğer eukaryotiklerde olduğu gibi sitoplazmaya dağılmış olarak ribozomlar, kofullar ve bazılarında golgi aygıtı da bulunur. Yedek besinler glikojen ve lipid olarak depo edilir. Yüksek bitki ve hayvanlardaki kadar çok olmasa da endoplazmik retikulum yer alır. Fungus hücreleri bakteri hücrelerinden farklı olarak sitoplazma içinde çekirdek zarına sahip bir nükleus içermektedirler.

Funguslarda çoğalma eşeyli ve eşeysiz olmak üzere iki çeşittir. Bazı funguslar sadece eşeysiz olarak çoğalırken, bazıları her iki yolla da çoğalabilir. Funguslarda eşeysiz üreme çoğunlukla tomurcuklanma, parçalanma (fragmentasyon) veya sporlar ile olur. Spor oluşumu çok yaygın olup, çeşitlilik göstermektedir. Eşeysiz sporlardan sporangium adı verilen bir kese içinde oluşmuşsa sporangiospor adını alır. Eğer bir hifin ucunda oluşmuşsa konidia denir. Klamidosporlar bir hifin ucunda veya ortalarında oluşan, kalın ve çift katlı spor kılıfı ile çevrili dayanıklı eşeysiz sporlardır. Arthrosporlar hifin bölünmesiyle oluşur. Blastosporlar ise maya hücrelerinde görülen tomurcuklanmaya benzer eşeysiz spor oluşumlarıdır (Şekil 1.5) (Güven ve Kıvanç, 2009).



Şekil 1.5. Sporların ışık mikroskobunda görünüşü (Güven ve Kıvanç, 2009)

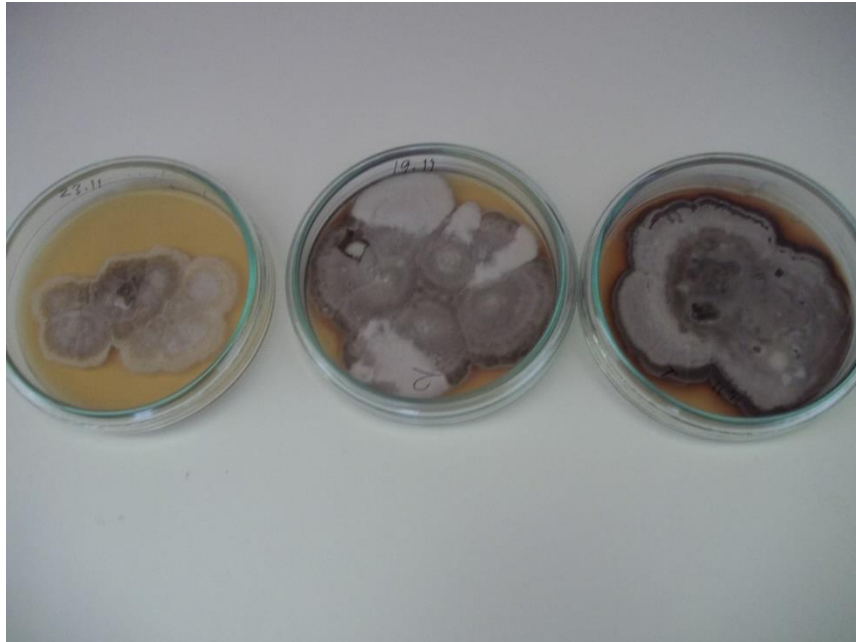
1.8.1. Radyotrofik Fungusların Habitatı

Radyotrofik funguslar, melanin pigmenti kullanarak gama ışınını üremeleri için gerekli kimyasal enerjiye çeviren funguslardır. Bu melanize funguslar, radyonüklidler ile kontamine olan topraklar gibi bazı aşırı ortamlarda çoğu zaman egemen türlerdir. Toprak funguslarının çoğu melanin üretmektedir ve bu pigmentin üretimi organizmaları çeşitli çevresel streslere karşı koruyabilmektedir. Örneğin, *Agaricus bisporus*'un kuru ağırlığının %30' u melanindir. Çernobil nükleer reaktörü kazası alanındaki fungusların bu ortamlarda hayatta kalma yetenekleri melanin üretmeleriyle ilişkilidir. Kazadan sonra, Çernobil'i çevreleyen kirli toprakta siyah fungusların yaygınlığı önemli derecede dikkat çekmiştir. *A. alternata* ve *Cladosporium sphaerospermum*'un radyasyon seviyeleri insan için 10 bin kat öldürücü dozda olan bu reaktör bölgesinde yaşadıkları tesbit edilmiştir. Bu bölgelerden izole edilen *A.alternata* suşlarının genetik analizleri yapılmıştır. Analiz sonucunda kirli bölge dışındaki çevrelerde bulunan suşların genetik açıdan çeşitlilik gösterirken, aynı zamanda önemli bir homoloji de ortaya koymuştur (Nosanchukve Casadevall, 2003).

1.8.2. *Alternaria alternata*

A. alternata, gıda maddeleri de dahil olmak üzere birçok bitki üzerinde bulunmaktadır. Bu fungusun favori habitatları topraklar, mısır silajı, çürümüş ağaç, kompost, kuş yuvaları ve çeşitli orman bitkileri ve sebzelerdir. Örneğin domateste siyah lekeler neden olabilir. *Alternaria* çoğunlukla rutubetli ortamlardan hoşlanan açık hava alerjenleridir. Genellikle pencere çerçevelerinde birikmiş sulu ve nemli ortamlarda lokalize olurlar.

Alternaria kolonileri genelde koyu yeşil veya koyu kahve yapıdadır ve bu yapıyı saran ince beyaz bir halka bulunur (Şekil 1.6.). Mikroskopik olarak incelendiğinde ise koyu renkli ve septalı olan hifleri dikkat çekmektedir. Konidiyoforları septalı, koyu renkli basit ya da demet oluşturmuş yapıdadır. Bir ucu yumru olan sopaya benzer. Genel spor şekli eliptiktir. İnce duvarlı ve bazı türlerde tepe kısmı konik yapıda olup enine ve boyuna septalara sahiptir (Akdağ, 2010). Yaklaşık 50 tür içeren *Alternaria* cinsi üyeleri türler arasında değişiklik göstermektedir. (Frost, 1988; Beyoğlu, 2006).



Şekil 1.6. *A. alternata* 'nın petri kabındaki görüntüleri

Araştırmamıza konu olan *A. alternata*'nın sistematığı Şekil 1.7. 'de gösterildiği gibidir.'



Şekil 1.7. *A. alternata*'nın sınıflandırılması.

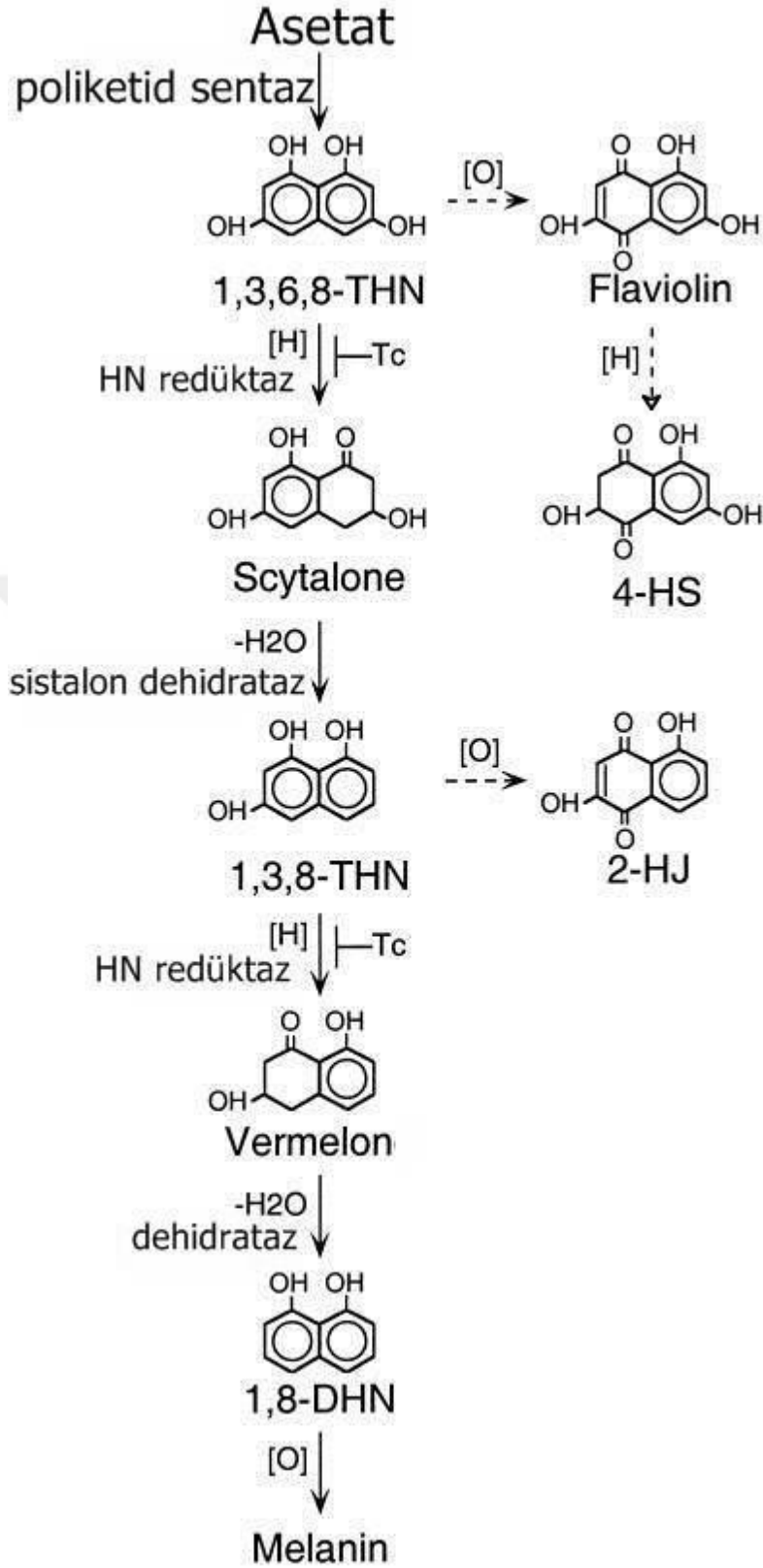
1.8.3. *Alternaria alternata*'da melanin sentez yolağı

A. alternata, genellikle her yerde saprofitik yaşayan fungi imperfecti (yalancı fungus) olan bir fungusdur. *A. alternata*'nın farklı bitkiler üzerinde konakçıya özgü toksinler üreterek ciddi hastalıklara neden olan, patotip olarak adlandırılan yedi adet fitopatojenik varyantı bulunmaktadır. *A. alternata*, conidia ve hiflerinin hücre duvarlarında biriken DHN melanini üretmektedir (Kawamura vd., 1997).

Filamentöz mantar *A. alternata*, 1,8-dihidroksinaftalen ile siyah bir pigment olan melanin üretir (Kimura ve Tsuge, 1993). Fitopatojenik mantar *A. alternata*, poliketid biyosentezi yoluyla melanin üretir ve melanize koloniler oluşturur (Kawamura vd., 1997).

1,8-DHN melanin sentezinde ilk basamakta öncül madde olarak kullanılan asetattan 1,3,6,8-tetrahidroksinaftalen (1,3,6,8-THN) sentezlenmektedir. Ardından sistalon'a (sycalona) indirgenir ve sycalona'nın dehidrasyonu sonucu da 1,3,8-trihydroxynaphthalene (1,3,8-THN) oluşmaktadır. 1,3,8-trihydroxynaphthalene redüksiyon ve dehidrasyon basamakları sonrası 1,8-dihydroxynaphthalene (1,8-DHN) dönüşmektedir. Sonuç olarak da DHN melaninin polimerizasyonu ile 1,8-DHN melanin oluşumu tamamlanmaktadır (Şekil 1.8.) (Tsai vd., 1999).

Bu çalışmamızda melanin pigmentinin avantajlarını göz önüne alarak bir radyotrofik fungus olan *A. alternata*'nın melanin üretimi ve optimizasyon çalışmaları yürütüldü. Mikroorganizmaların stres koşulları altında daha fazla pigment üretmelerinden dolayı, biz de fungusun optimum üretim koşullarını değiştirilerek stres oluşturup melanin üretimini artırmak için farklı koşullarda üretildi. Ticari anlamda melanin üretimi önemlidir. Çünkü son yıllarda melanin üretiminin mekanizmasının anlaşılması ile yeni antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesi, kanser terapisi ve enerji transdüksiyonu gibi birçok alanda melaninin kullanılabileceği açığa çıkmıştır. Melanin üretimini engelleyen çeşitli mekanizmaların fungal patojeniteyi azalttığı da saptanmıştır. Bu verilerden yola çıkarak melanotik mikroorganizmalarda melanin üretimini engelleyen ilaçlar önemli bir potansiyel antimikrobiyal ajan olmuştur. Daha ilginç funguslardaki melaninin yapısı insan derisindeki melaninden kimyasal olarak farklılık göstermemektedir. Fungal ve memeli melaninlerindeki bu benzerlik, melanoma tedavisinde önemli olan monoklonal antibodi üretiminde yol göstericidir. Aynı zamanda melaninin yüksek enerjili iyonize ışınları tutma özelliğinden dolayı, melanotik mikroorganizmalar için büyük avantaj sağlamaktadır.



Şekil 1.8. 1,8 DHN melanin üretim basamakları (Tsai vd., 1999)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Zhdanova ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmada mantar sporlarını ve onların çimlenmekte olan hifleri iyonlaştırıcı radyasyona yönlendiren deneysel protokoller geliştirerek, iyonlaştırıcı radyasyona fungal cevabı ölçmüşlerdir. Hem beta hem de gama radyasyonunun, iyonize radyasyon kaynağına doğru hiflerin büyümesini teşvik ettiğini belirtmişlerdir. Radyoaktif olarak kontamine olmuş bölgelerden izole edilen mantar türlerinin %86'sının iyonlaştırıcı radyasyon kaynağına doğru pozitif yönlü büyüme gösterdiklerini vurgulamışlardır (Zhdanova vd., 2004).

Jacobson ve arkadaşları 1995 yılında yaptıkları çalışmada *Wangiella dermatitidis* ve *A. alternata*'nın yabanıl ve albino suşlarını permanganat, hipoklorit ve H₂O₂'e maruz bırakmışlardır. 1,8-dihidroksinaftalin melanin sentezleyen bu fungusların yabanıl tipleri, bu oksidan ajanları albino suşlarına göre daha fazla nötralize etmişlerdir. Aynı zamanda yabanıl türlerin, yüksek permanganat ve hipoklorit konsantrasyonlarına dayanıklı olduklarını ifade etmişlerdir. Ancak *W. dermatitidis*'in yabanıl tipinde ise melaninin, H₂O₂ oksidan ajanına karşı fungusu koruyamadığını belirtmişlerdir (Jacobson vd., 1995).

Jacobson ve arkadaşlarının 1994 yılında yaptıkları çalışmada ise; *Cryptococcus neoformans*'ın yabanıl tipi ve genetiği değiştirilerek melanin üretimi inhibe edilmiş albino *C.neoformans* mutantı kullanmışlardır. 37 °C ve 25 °C de yabanıl ve albino suşlarının SOD aktiviteleri tespit edilmiştir. Yabanıl türlerde SOD'un 25 °C'de arttığı, 37 °C'de ise herhangi bir aktivite artışına rastlanmadığı belirtilmiştir. Yabanıl türlerde SOD'un sıcaklıkla ters orantılı ve melaninle birbirini tamamlayan bir mekanizma ile fungusu koruduğu saptanmıştır. Albino suşa ise SOD'un sıcaklıkla ilgili bir bağlantısının bulunmadığı ifade etmişlerdir. Böylece melaninin SOD ile karşılaştırılabilecek nitelikte önemli bir antioksidan olduğunu belirtmişlerdir (Jacobson vd., 1994).

Cunha ve arkadaşları 2010 yılında, insan patojeni olan melaninli fungus *Fonsecaea pedrosoi*'nin üretildiği besiyerine DHN melanin inhibitörü olan tricyclazole (Tc) ekleyerek melanin üretimi inhibe edilmiş *F.pedrosoi* ile çalışmışlardır. Melanize *F. pedrosoi* hücrelerinin NO ve H₂O₂' ye karşı Tc ile

muamele edilmiş fungustan daha dirençli olduğunu gözlemişlerdir. Çalışmanın sonucunda melaninin, NO yakalama kapasitesine sahip olduğu ve makrofajların oksidatif patlamadan korunmak için önemli bir mekanizma ve virülans faktör olduğu belirtilmiştir (Cunha vd., 2010).

Sharma ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları çalışmada; *A. alternata*, *Trichoderma virens* ve *Curvularia lunata* funguslarının ürettiği pigmentlerin tekstil boyası olarak kullanımı amaçlanmıştır. Kültürler PDB (patates dektroz broth)'de 28 °C'de statik koşullar altında inkübe edilerek, her üç fungustan da izole edilen pigmentlerin ayrı ayrı ipek ve yün kumaşları boyayabildiği ayrıca bu pigmentlerle boyanmış kumaşların yıkama ve ovalamaya karşı da dirençli olduğu belirlenmiştir. Pigmentten elde edilen bu boyaların, kumaşların esnekliğine karşı hiçbir yan etkisi gözlemlenmemiştir; ayrıca insan patojeni olan *T. virens*'ten elde edilen pigmentin insan derisine toksik olmadığı da saptanmıştır. Yapılan bu çalışmayla melaninin de içinde bulunduğu bu pigmentlerin ucuz ve doğaya zararlı olmayan tekstil boyası olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Sharma vd., 2012).

Schweitzer ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada; radyoimmunoterapi boyunca radyotoksositeye karşı kemik iliğini korumak amacıyla deney farelerine intravenöz yolla melaninle kaplanmış nanopartiküller aktarılmıştır. Farelerin vücudunun tamamına 125 cGy'lik radyasyon verilmiş ve sonuçta melaninle kaplanmış nanopartiküllerin, eksternal radyasyon veya radyo immunoterapi sırasında hematolojik toksiteyi azalttığı, bunun yanı sıra tümör hücrelerinde herhangi bir koruma rolünün olmadığı da gözlenmiştir (Schweitzer vd., 2010).

Singaravelan ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları bu çalışma, İsraildeki (Carmel dağı) çeşitli zorlu mikroklimatik çevre koşulları altındaki adaptasyonların gözlenmesi ve doğal seleksiyon çalışmaları yapmışlardır. Çalışmalarını, ideal bir ortam olan “Evolution Canyon” (EC) mikrokozmosmik bölgede yürütmüşlerdir. “Evolution Canyon” iki farklı bölgeye ayrılmıştır; “African slope” (AS) 200 m'lik uzaklıktaki “European slope” (ES) bölgesine göre %200-800 daha yüksek solar radyasyon miktarına sahiptir. Kuzey ve güney bölgelerde bulunan AS ve ES arasında çevresel koşulların ve yükseklik farkından dolayı oluşan bu UV doz farkı

Aspergillus niger 'de farklı melanin miktarları oluşmasına yol açmıştır. Bu çalışmada AS adı verilen bölgede yüksek UV miktarına bağlı olarak *A. niger*'de daha yüksek melanin üretildiği saptanmıştır (Singaravelan vd., 2008).

Turancı 2013 yılında, radyotrofik bir fungus olan *A. alternata* ile çalışmıştır. Bu fungusu üremesinin farklı dönemlerinde (inokülasyon işleminden hemen sonra ve 9 günlük inkübasyondan sonra) belirli sürelerde UV-C'ye maruz bırakarak enzim aktiviteleri ve glutatyon miktarlarını tesbit etmiştir. Aynı zamanda besiyerine *A. alternata*'nın melanin sentezini inhibe eden trisiklazol (Tc) fungusiti eklendikten sonra da belirli sürelerde UV-C'ye maruz bırakarak enzim aktiviteleri ve glutatyon miktarlarını tesbit etmiştir. Sonuçta melaninin antioksidan enzimler üzerine sinerjistik etkiye sahip olduğunu saptamıştır. Melaninin antioksidan özellikleri sayesinde hücrelerdeki süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon s-transferaz (GST) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimlerle beraber çalışarak antioksidan savunma sistemine katkıda bulunduğunu belirlemiştir (Turancı ,2013).

Belozerskaya ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada Çernobil Nükleer Santralı'ndan (ChNPP) izole edilen *A. alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Mucor hiemalis*, *Paecilomyces lilacinus* gibi radyotrofik fungusları H₂O₂ ve düşük glukoz içeren besiyeri gibi ortamlarda oksidatif strese karşı artan dirençlerini ölçmüşlerdir. Bu amaçla süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz enzim aktivitelerini ölçmüşlerdir. Fungusların, oksidatif stres sonrası üremeye ve melanin biyosentezine devam ettiklerine saptamışlardır. Böylece Çernobil funguslarının oksidatif strese karşı daha dirençli olduğunu gözlemlenmiştir. Fungusların, sentezledikleri melanin sayesinde, şiddetli oksidatif stresle başa çıkabileceklerini bildirmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada fungusların besiyerin 10⁻⁹-10⁻¹M'lık H₂O₂ eklemişler ve artışının fungal hiflerin uzama oranları belirlenmiştir. Daha düşük radyoaktif kontaminasyonuna sahip habitatlardan izole edilen fungusların hif büyümesinin 10⁻⁴ ve 10⁻³ M'lık H₂O₂ ile durdurulmuşken yüksek radyoaktif kontaminasyona sahip habitatlardan izole edilen fungusların hiflerinin büyümesinin yalnızca 10⁻² ve 10⁻¹M'lık H₂O₂ uygulamasından etkilendiği saptanmıştır (Belozerskaya vd, 2010).

Wang ve arkadaşları 1994'de, denatürasyon ajanları ve asit ile muamele edilmiş melanize *C. neoformans* hücrelerinden melaninin izolasyonunu araştırmışlardır. Bu çalışmada melaninin, hücre duvarı bütünlüğüne destek olarak, fungusun hayatta kalmasına katkıda bulunduğunu belirtmişlerdir. Diğer taraftan, melanize hücrelere hipoklorit uygulanarak melanin pigmentinin modifikasyonu ve inhibisyonu test edilmiş ve sonuçta melaninin absorpsiyon spektrumunda bozulmalar olduğunu vurgulamışlardır. Araştırmacılar, yedi farklı melanin üreten *C. neoformans* suşunun ESR spektroskopisini yaparak, bazı suşların sekiz kat daha fazla melanine sahip olduğunu da saptamışlardır (Wang ve Casadevall, 1994).

Geng ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları çalışmada; ultraviyole (UV) radyasyonunun neden olduğu DNA hasarı üzerine, bakteriyel melaninin foto koruyuculuk etkisini değerlendirmişlerdir. Florometrik ölçümler, melaninin, çözeltide UV-A'nın etkisiyle oluşan reaktif oksijen türlerini (ROS) verimli bir şekilde temizleyebileceğini ve temizleme kabiliyetinin pigment konsantrasyonu ile orantılı olduğunu ortaya koymuşlardır. Elde ettikleri bu sonuçlar, bakteriyel melaninin, DNA'yı UV ışıması boyunca hasar görmekten koruduğunu göstermiştir. (Geng vd., 2008).

Nobre ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları çalışmanın amacı, *S. Schenckii* conidialarında ve mutant albino *S. Schenckii* conidialarındaki melanin varlığını analiz etmektir. Mutant albino suşları oluşturmak için fungusların bir kısmı 300 erg / mm² UV radyasyonuna maruz bırakıldı. İnkübasyonun ardından kültürler analiz edilerek, koloni sayımı yapıldı. Elde edilen albino koloniler ve yabancıl melanin üreten funguslar görünür ışığa maruz bırakıldı. Melanize fungusların hayatta kalma ve yaşayabilirlik oranlarının %66 ve %96 olduğu tespit edildi. Melaninin, granüller halinde conidiaların hücre duvarında lokalize olduğu görüldü. Fakat albino conidiaların hücre duvarlarında melanin granüllerine rastlanmadığı saptandı (Nobre vd., 2004).

Dadachova ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada, iyonlaştırıcı radyasyonun melaninin elektron transfer özellikleri ve melanize fungusların büyümesi üzerindeki etkilerini araştırmak için çoklu fiziko-kimyasal testler yapmışlar ve genetik olarak 3 farklı mantar ile in vivo deneyler düzenlemişlerdir. Melaninin kimyasal yapısını farklı funguslardan açığa çıkaran HPLC sonuçları,

melaninin elektronik özelliklerini anlamak için önemlidir. Melanize edilmiş mantar hücreleri, iyonlaştırıcı radyasyona maruz bıraktıktan sonra melanize edilmemiş hücrelere göre artan bir büyüme gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca iyonlaştırıcı radyasyona ve diğer elektromanyetik radyasyon formlarına maruz kalmanın melaninin elektron transfer etme kabiliyetini arttırdığını da tespit etmişlerdir (Dadachova vd., 2007).

Kiran ve arkadaşları *N. alba* MSA10'dan melanin pigmentini başarıyla saflaştırıp, karakterize etmişlerdir. Melaninin verimi için kültürel koşullar ve çevresel faktörler RSM-Box-Behnken tasarımı ile optimize etmişlerdir. Saflaştırılmış melanin, gümüş nanoyapıları in vitro olarak sentezlemek ve stabilize etmek için kullanılmışlardır. *Nocardiosis*'in melaninin antioksidan, antimikrobiyal ve doğal renklendirme potansiyeline sahip olduğunu ve hem yapay hem de sentetik renklendirici olarak gıdalara eklenebileceğini gösterdiler. Özellikle gıda katkı maddesi olarak kullanıldığında gıdalardaki yapay antioksidanların kullanımını önemli ölçüde azaltılabileceğini belirtmişlerdir. *Nocardiosis* melanin'inin UV koruyucu rolleri, daha yüksek sıcaklıklara dayanıklılığı, alkali koşullarda stabilitesi ve suda çözünürlüğü sayesinde, gıda, kozmetik ve biyomedikal endüstrilerinde uygulanabilirliği belirtildi. Böylece, gümüş nano yapıların *Nocardiosis* melanini ile birlikte gıdaların stabilizasyonu, gıda patojenlerine karşı anti bakteriyel özellikleri, gıda işleme ve gıda paketlenme endüstrilerinde uygulanabilirliğini ifade ettiler (Kiran vd., 2014).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada yüksek düzeyde melanin üreten bir fungus olarak bilinen *A. alternata*'nın melanin üretimi ve optimizasyonu tespit edilmiş ve optimum koşullarda besiyerine farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ ilavesinin etkileri çalışılmıştır.

3.1.Araştırmada Kullanılan Besiyerleri

Bu çalışmada kullanılan *A. alternata* yabanıl tipi Ege Üniversitesi Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bölümü, Mikoloji Laboratuvarlarından temin edilmiştir. Mikoloji laboratuvarlarından alınan fungus için besi ortamı olarak Potato Dextrose Agar (PDA), Potato Dextrose Broth (PDB), Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ve Sabouraud Dextrose Broth (SDB) kullanılmıştır.

Potato Dextrose Agar (PDA) besiyeri bileşimi şu şekildedir:

- Patates infüzyonu: 4,0 g/L
- D(+) Glukoz: 20,0 g/L
- Agar-agar: 15,0 g/L
- Saf su: 1000 ml.
- pH: 5,6±0,2

Potato Dextrose Broth (PDB) besiyeri bileşimi şu şekildedir:

- Patates infüzyonu: 4,0 g/L
- D(+) Glukoz: 20,0 g/L
- Saf su: 1000 ml.
- pH: 5,6±0,2

Sabouraud Dextrose 2% Agar (SDA) besiyeri bileşimi şu şekildedir:

- Pepton: 10,0 g/L
- D(+) Glukoz: 20,0 g/L
- Agar-agar: 15,0 g/L
- Saf su: 1000 ml.
- pH: 5,6±0,2

Sabouraud Dextrose 2% Broth (SDB) besiyeri bileşimi şu şekildedir:

- Pepton: 10,0 g/L
- D(+) Glukoz: 20,0 g/L
- Saf su: 1000 ml.
- pH: 5,6±0,2

Bütün besiyerleri inokülasyon işlemi öncesinde 20 dakika 121°C'de 1 atm basınç altında otoklavize edilmiştir. Ayrıca tüm inokülasyon işlemleri aseptik koşullar altında yapılmıştır.

3.2. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan potato dextrose agar (PDA) Lab M firmasından, sabouraud dextrose agar (SDA), potato dextrose broth (PDB) ve sabouraud dextrose broth (SDB) besiyerleri Merck firmasından temin edilmiştir. Sentetik melanin ise Sigma firmasından alınmıştır.

3.3. Melanin Standartının Hazırlanması

1 mg'lık standart melanin çözeltisi hazırlamak için 0.001 mg melanin alınarak 5 ml distile su ve 0.2 ml 1 M'lık KOH içerisinde çözülmüştür. *A. alternata*'da melanin pigmentinin maksimum absorbans yaptığı dalga boyunu (λ max) belirlemek amacıyla olarak hazırladığımız 1 mg'lık standart melanin çözeltisinden 1 ml alınarak UV spektrofotometrede (SHİMADZU UV visible Spectrophotometer UV-1601) 200-800 nm aralığında absorpsiyon spektrumu oluşturulmuştur. Negatif kontrol olarak taze besiyeri kullanılmıştır. Çalışmamızda sadece ekstraselüler pigment dikkate alınmıştır.

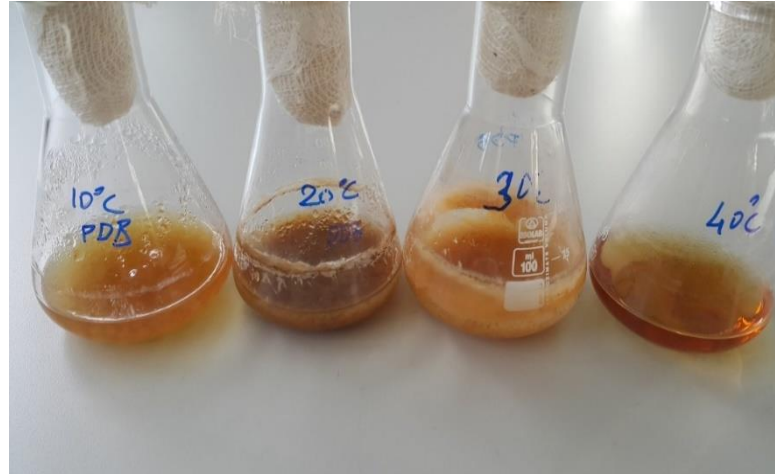
3.4. *Alternaria alternata* Stoklarının Hazırlanması

A. alternata stokları SDA içeren petrilere üretilmiş ve 5 günlük kültürler +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Buzdolabında saklanan fungus steril koşullar altında yatık PDA'ya iğne uçlu öze yardımıyla batırma yöntemiyle ekilmiştir. 28 °C'de etüvde 5 gün boyunca inkübe edilen yatık agardaki kültürler steril distile su ve öze yardımıyla kazınarak pipetle 1ml/50ml olmak üzere PDB

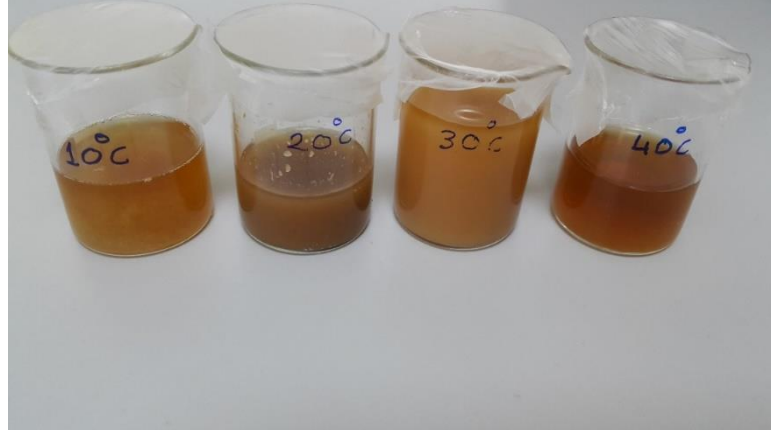
besiyerine ekimleri yapılmıştır. Bu kültürler 28 °C'de 150 rpm'de çalkalanarak 4 gün boyunca inkübe edilmiştir. 4. günün sonunda besiyerleri funguslarla beraber (homojenizatör ucu otoklavize edilmiş) homojenize edilmiş ve PDB içeren besiyerlerine ekim yapılarak deneyde ölçülmek istenen özellikler araştırıldı.

3.5. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Sıcaklığın melanin üretimine etkisini araştırmak için yatık agardaki kültürler steril distile su ve öze yardımıyla kazınarak pipetle 1ml/50ml olmak üzere PDB besiyerine ekimleri yapılmıştır. 4. günün sonunda besiyerindeki funguslar steril homojenizatör ucu ile homojenize edilmiş ve PDB içeren besiyerlerine ekim yapılarak 10 °C, 20 °C, 30 °C ve 40 °C de her bir sıcaklık için 3 tekrar örnek hazırlanmıştır (Şekil 3.1.). Farklı sıcaklıklarda üretimi yapılan erlenler 4 gün sonra etüvden çıkartılarak homojenize edildi (Şekil 3.2.). Elde edilen homojenat vakum altında Whatman No:1 filtre kağıdından süzüldü. Elde edilen süpernatanın spektrofotometrede farklı dalga boylarında (372-422) absorbans değerleri tespit edildi.



Şekil 3.1. 10 °C, 20 °C, 30 °C ve 40 °C'de 4 gün boyunca inkübe edilen funguslar



Şekil 3.2. 10 °C, 20 °C, 30 °C ve 40 °C de besiyeri ile birlikte homojenize edilmiş funguslar

3.6. Optimum Çalkalama Hızının Belirlenmesi

Çalkalama hızının melanin üretimine etkisini araştırmak için yatık agardaki kültürler steril distile su ve öze yardımıyla kazınarak pipetle 1ml/50ml olmak üzere PDB besiyerine ekimleri yapılmıştır. 4. günün sonunda oluşan besiyerleri funguslarla beraber (homojenizatör ucu otoklavize edilmiş) homojenize edilmiş ve PDB içeren besiyerlerine ekim yapılarak optimum sıcaklıkta statik -100rpm- 150 rpm- 200 rpm ve 250 rpm’de çalkalanarak her bir çalkalama hızı için 3 tekrar örnek hazırlanmıştır (Şekil 3.3.). Farklı çalkalama hızlarında üretimi yapılan erlenler 4 gün sonra etüvden çıkartılarak homojenize edildi. Elde edilen homojenat vakum altında Whatman No:1 filitre kağıdından süzüldü (Şekil 3.4.). Elde edilen süpernatanın spektrofotometrede farklı dalga boylarında (372-422) absorbans değerleri tespit edildi.



Şekil 3.3. 20 °C de statik, 100 rpm, 200 rpm çalkalama hızında besiyeri ile birlikte homojenize edilmiş funguslar



Şekil 3.4. 20 °C de statik, 100 rpm, 150 rpm, 200 rpm ve 250 rpm çalkalama hızında besiyeri ile birlikte homojenize edildikten sonra süzülen besiyerleri

3.7. Optimum pH' nın Belirlenmesi

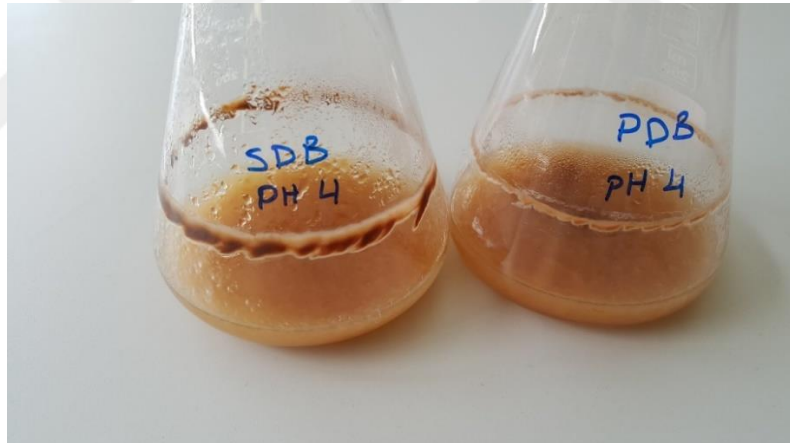
pH değerinin hızının melanin üretimine etkisini araştırmak için yatık agardaki kültürler steril distile su ve öze yardımıyla kazınarak pipetle 1 ml/50ml olmak üzere PDB besiyerine ekimleri yapılmıştır. 4. günün sonunda oluşan besiyerleri funguslarla beraber (homojenizatör ucu otoklavize edilmiş) homojenize edilmiş ve pH değeri 4 -9 olan PDB içeren besiyerlerine ekim yapılarak optimum sıcaklık ve çalkalama değerinde 3 tekrar örnek hazırlanmıştır (Şekil 3.5.). Farklı pH değeri olan besiyerlerinde üretimi yapılan erlenler 4 gün sonra etüvden çıkartılarak homojenize edildi. Elde edilen homojenat vakum altında Whatman No:1 filitre kağıdından süzüldü. Elde edilen süpernatanın spektrofotometrede farklı dalga boylarında (372-422) absorbans değerleri tespit edildi.



Şekil 3.5. 20 °C de 200 rpm çalkalama hızında pH değeri 4-5-6-7-8-9 olan besiyeri koşullarında 4 gün boyunca inkübe edilen funguslar

3.8. Besiyeri Çeşidinin Belirlenmesi

Besiyeri çeşidinin melanin üretimine etkisini araştırmak için yatık agardaki kültürler steril distile su ve öze yardımıyla kazınarak pipetle 1ml/50ml olmak üzere PDB besiyerine ekimleri yapılmıştır. 4. günün sonunda oluşan besiyerleri funguslarla beraber homojenize edilmiş, SDB ve PDB içeren besiyerlerine ekim yapılarak optimum sıcaklık, çalkalama ve pH değerinde 3 tekrar örnek hazırlanmıştır. (Şekil 3.6.) PDB ve SDB besiyerlerinde üretimi yapılan erlenler 4 gün sonra etüvden çıkartılarak homojenize edildi (Şekil 3.7.). Elde edilen homojenat vakum altında Whatman No:1 filitre kağıdından süzüldü. Elde edilen süpernatanın spektrofotometrede farklı dalga boylarında (372-422) absorbans değerleri tespit edildi.



Şekil 3.6. 20 °C de 200 rpm çalkalama hızında pH 4 olan besiyeri koşullarında PDB ve SDB besiyerinde 4 gün boyunca inkübe edilen funguslar



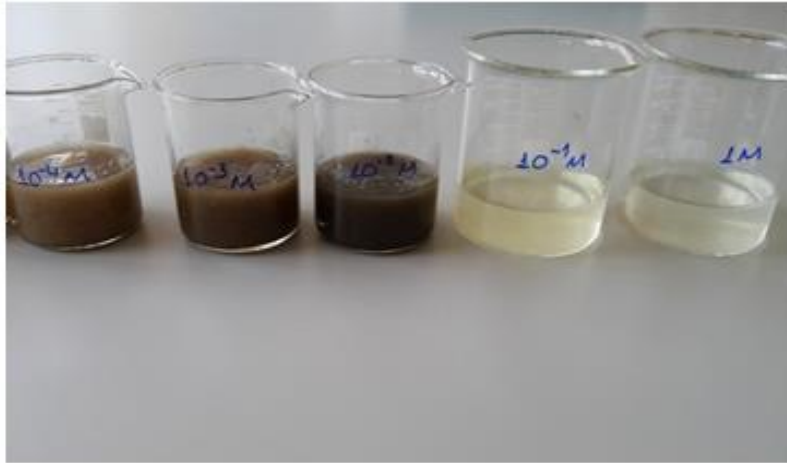
Şekil 3.7. 20 °C de 200 rpm çalkalama hızında pH 4 olan PDB ve SDB besiyeri koşullarında besiyeri ile birlikte homojenize edilmiş funguslar.

3.9. H₂O₂ Kullanımının Melanin Üretimine Etkisi

H₂O₂ kullanımının melanin üretimine etkisini araştırmak için yatık agardaki kültürler steril distile su ve öze yardımıyla kazınarak pipetle 1ml/50ml olmak üzere PDB besiyerine ekimleri yapılmıştır. 4. günün sonunda oluşan besiyerleri funguslarla beraber homojenize edilmiş ve 1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ ve 10⁻⁴ M H₂O₂ içeren PDB besiyerlerine ekim yapılarak optimum sıcaklık, çalkalama ve pH değerinde 3 tekrar örnek hazırlanmıştır (Şekil 3.8.). Farklı H₂O₂ içeren PDB besiyerlerine üretimi yapılan erlenler 4 gün sonra etüvden çıkartılarak homojenize edildi (Şekil 3.9.). Elde edilen homojenat vakum altında Whatman No:1 filitre kağıdından süzüldü. Elde edilen süpernatanın spektrofotometrede farklı dalga boylarında (372-422) absorbans değerleri tespit edildi.



Şekil 3.8. 20 °C sıcaklıkta 200 rpm çalkalama hızında pH değeri 4 olan 1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ ve 10⁻⁴ M H₂O₂ içeren PDB besiyerlerinde 4 gün boyunca inkübe edilen funguslar

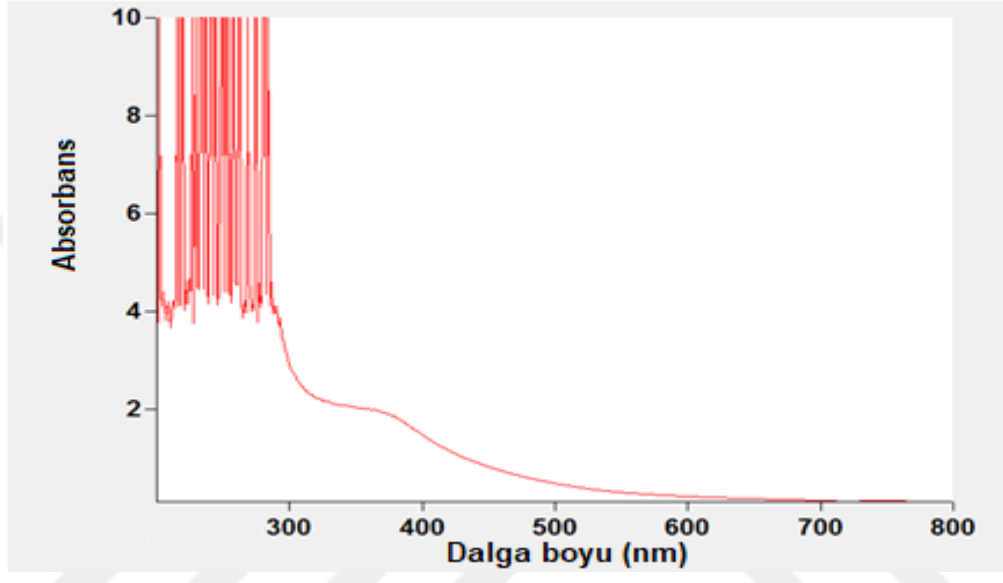


Şekil 3.9. 20 °C sıcaklıkta 200 rpm çalkalama hızında pH değeri 4 olan 1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ ve 10⁻⁴ M H₂O₂ içeren PDB besiyeri ile birlikte homojenize edilmiş funguslar.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Melanin Standartının Absorbsiyon Spekturumu

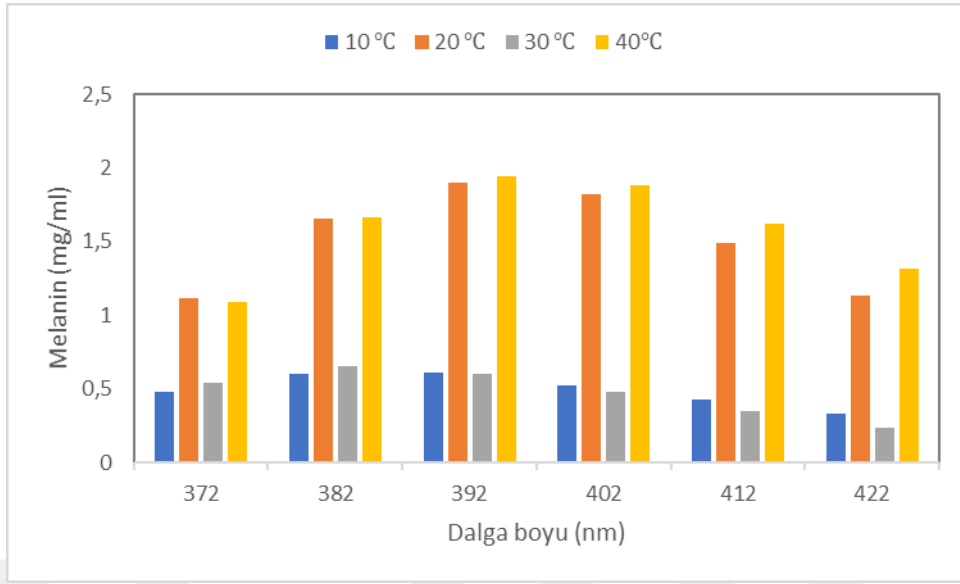
Çalışmamızda saf melanin kullanılarak UV visible spektrofotometrede 200-800 nm dalga boyunda scan yapıldı (Şekil 4.1.). Melaninin ışığı maksimum absorbladığı dalga boyları 372-422 nm dalga boylarında olduğu saptandı.



Şekil 4.1. Melaninin UV spektrofotometrede absorpsiyon spektrumu

4.2. Optimum Sıcaklığın Melanin Üretimine Etkisi

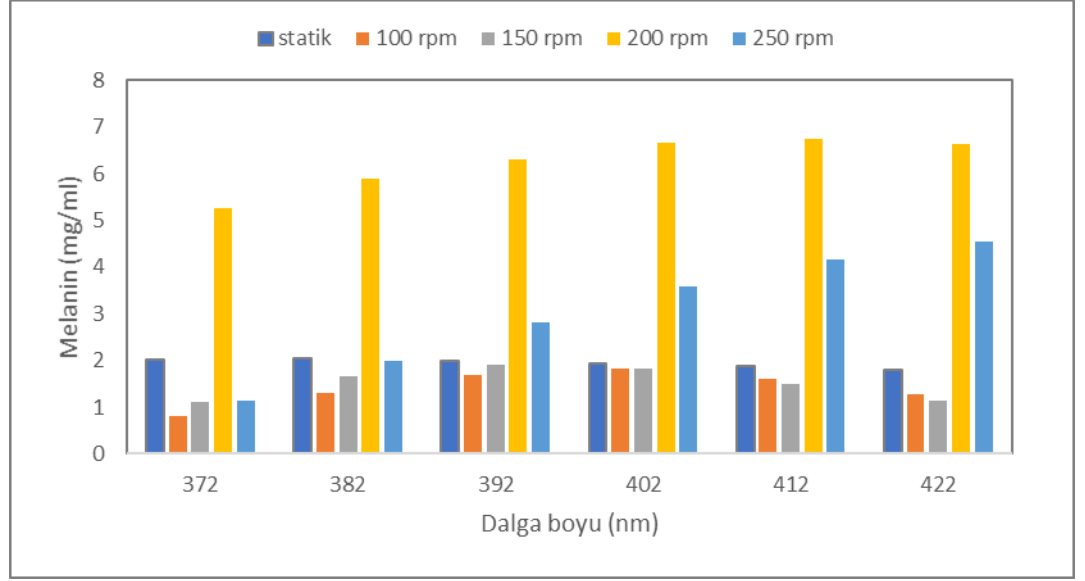
Çalışmamızda ve PDB içeren besiyerlerine ekim yapılarak 10 °C, 20 °C, 30°C ve 40 °C de her bir sıcaklık koşullarında 3 tekrarlı deneyler yapılmıştır. En iyi melanin üretiminin genel olarak 20 °C de olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2.). Şekil 3.1. de görüldüğü üzere 40 °C lik erlende fungus ürememiştir. Okunan absorbans değeri besiyerinin renginin 40 °C de değişimi ile açıklanabileceği gibi ekim sırasında besiyerine eklenen fungusların aşırı melanin üretmesinden de kaynaklanabilir. En düşük melanin üretiminin ise 10 °C de olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.2. *A. alternata*'nın melanin üretimi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi

4.3. Çalkalama Hızının Melanin Üretimine Etkisi

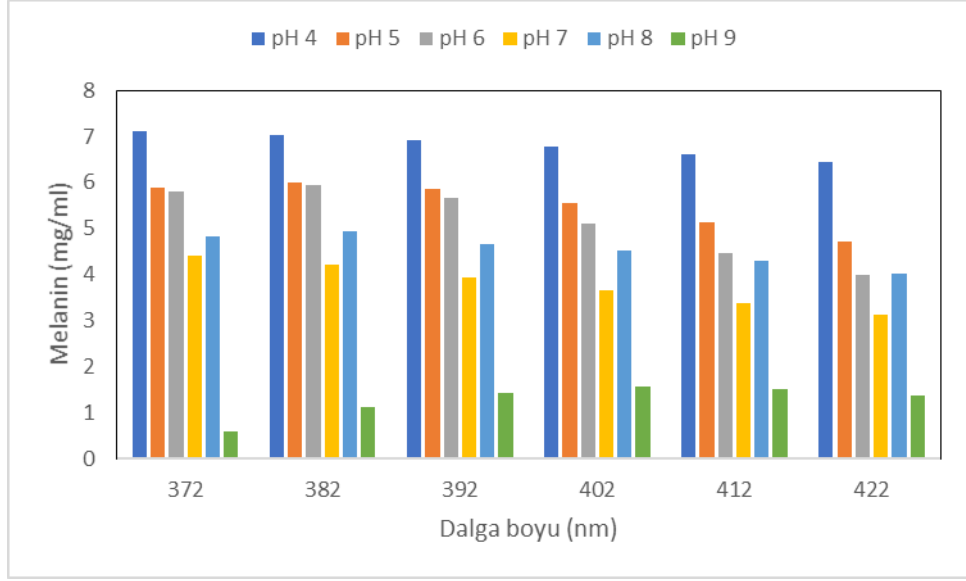
Çalışmamızda PDB içeren besiyerlerine ekim yapılarak 20 °C sıcaklıkta statik -100rpm- 150 rpm- 200 rpm ve 250 rpm'de koşullarında 3 tekrarlı deneyler yapılmıştır. En iyi melanin üretiminin 200 rpm de olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3.). En düşük melanin üretimi ise 150 rpm çalkalama hızında olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.3. *A. alternata*'nın melanin üretimi üzerine farklı çalkalama hızlarının etkisi

4.4. pH'ın Melanin Üretimine Etkisi

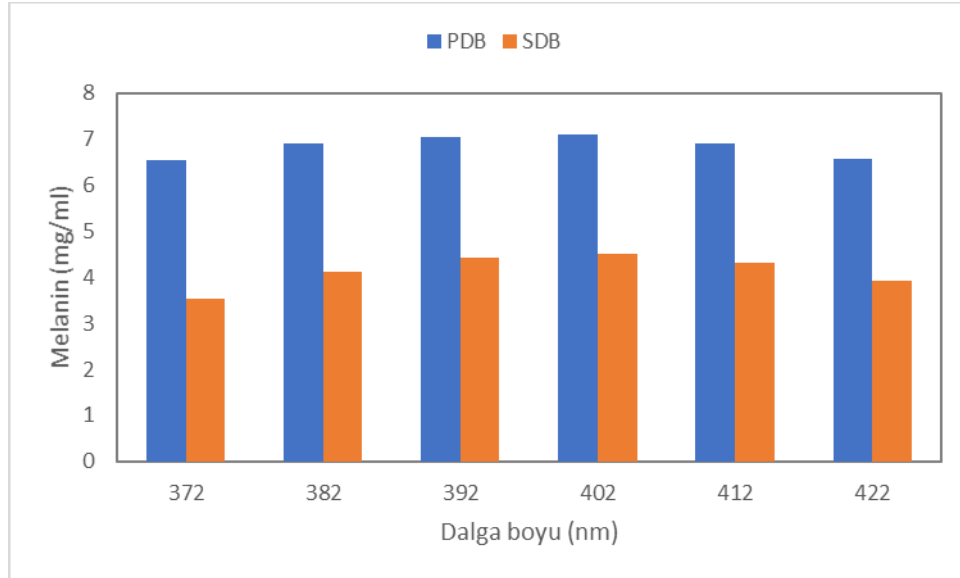
Çalışmamızda PDB içeren besiyerlerine ekim yapılarak 20 °C sıcaklıkta 200 rpm çalkalama hızında pH değeri 4 -5-6-7-8-9 olan besiyeri koşullarında 3 tekrarlı deneyler yapılmıştır. En iyi melanin üretiminin pH 4 olan besiyerinde olduğu tespit edilmiştir. En düşük melanin üretimi pH 9 olan besiyeri koşullarında saptanmıştır (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. *A. alternata*'nın melanin üretimi üzerine farklı pH ların etkisi

4.5. Besiyeri Çeşidinin Melanin Üretimine Etkisi

Çalışmamızda PDB ve SDB içeren besiyerlerine ekim yapılarak 20 °C sıcaklıkta 200 rpm çalkalama hızında pH değeri 4 olan besiyeri koşullarında 3 tekrarlı deneyler yapılmıştır. En iyi melanin üretiminin PDB besiyerinde olduğu tespit edilmiştir. En düşük melanin üretimi ise SDB besiyeri koşullarında saptanmıştır (Şekil 4.5.).

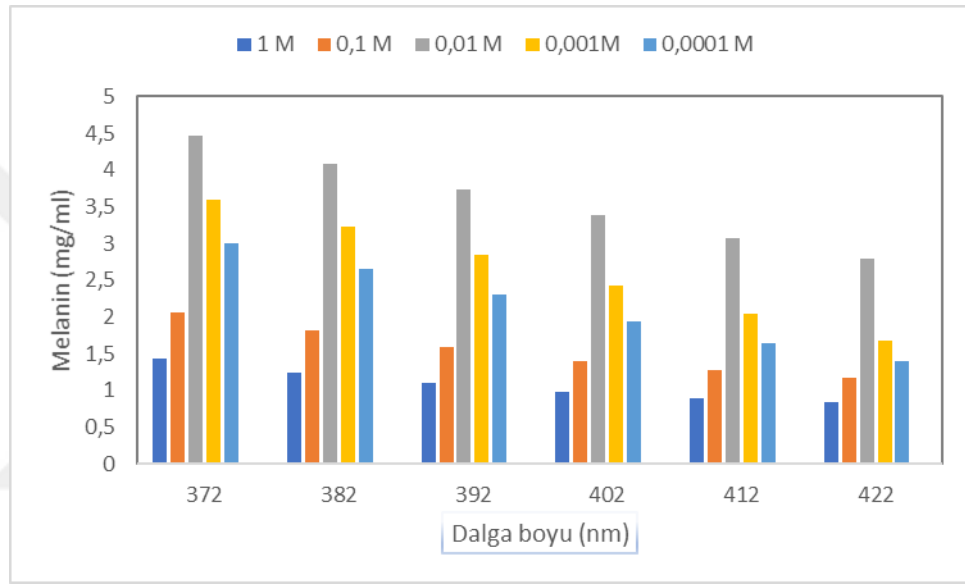


Şekil 4.5. *A. alternata*'nın melanin üretimi üzerine PDB ve SDB besiyerinin etkisi

4.6. H₂O₂ Kullanımının Melanin Üretimine Etkisi

Çalışmamızda 1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ ve 10⁻⁴ M H₂O₂ içeren PDB besiyerine ekim yapılarak 20 °C sıcaklıkta 200 rpm çalkalama hızında pH değeri 4 olan besiyeri koşullarında 3 tekrarlı deneyler yapılmıştır.

En iyi melanin üretiminin 10⁻² M H₂O₂ içeren besiyerinde olduğu tespit edilmiştir. En düşük melanin üretimi ise 1 M H₂O₂ içeren besiyeri koşullarında saptanmıştır (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. *A. alternata*' da H₂O₂ kullanımının melanin üretimine etkisi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Organizmalar, maruz kaldıkları çeşitli stres faktörlerine rağmen canlılığını sürdürebilmek için birçok adaptasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalardan biri de pigment oluşumudur. Melanin pigmenti üretebilen organizmalar karşılaştıkları ekstrem çevre koşullarına karşı direnç sağlayabilmektedirler. Melanin radyoprotektif özelliği sayesinde ROT oluşumunu engelleyerek organizmayı oksidatif hasarın neden olduğu olumsuzluklara karşı korumaktadır (Cox vd., 2003).

A. alternata 'nın melanin üretimini indüklemek için farklı stres koşullarında çalışmalar yapılmıştır. İlk olarak 10 °C, 20 °C, 30 °C ve 40 °C de her bir sıcaklık koşullarında ürettiğimiz fungusların en yüksek melanin üretiminin 20 °C de olduğunu tesbit ettik. Fungusların üremesi için optimum sıcaklık 25-30 °C arasındadır. Bu nedenle 20 °C gibi düşük bir sıcaklıkta fungus strese girerek çevresel faktörlere karşı koruyuculuk özelliği olan melanin pigmentinin sentezini artırmıştır. Jacobson ve arkadaşları 1994 yılında *Cryptococcus neoformans*'ı 37 °C ve 25 °C de üreterek SOD aktivitelerini tesbit etmişlerdir. SOD enzim aktivitesinin 25°C de arttığı ancak 37 °C de hiçbir aktivite artışının olmadığı belirlendi. Funguslar için yüksek bir sıcaklık olan 37 °C de melanin pigmentinin sentezinde artış olduğunu saptamışlardır. Böylece melaninin önemli bir antioksidan etkiye sahip olduğu söylenebilir. Diğer taraftan Kiran ve arkadaşlarının 2014 de *N. alba* MSA10 ile yaptıkları çalışmada melanin üretimi ve fungusun üremesi üzerine sıcaklık gibi çevresel faktörlerin etkisini test etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada 35°C nin üzerindeki sıcaklıklarda hem fungal büyümenin hem de melanin üretiminin azaldığını belirlediler (Kiran vd..2014).

Ahn ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada, *Monascus sp.* J101 kullanılarak sıvı ortam fermentasyonu 25 °C ve 30 °C sıcaklık değerlerinde gerçekleştirilmiştir. Yüksek sıcaklıkta artan mikroorganizma gelişme hızından dolayı fermentasyon ortamında ortaya çıkan yüksek viskozite, pigment verimini düşürmüş ve sonuç olarak 30 °C'de elde edilen pigment verimi 25 °C'de elde edilen verimden 10 kat daha düşük bulunmuştur (Ahn vd., 2006).

Melanin üretimini artırmak için kullandığımız kültürel koşullardan bir tanesi de inkübasyon sırasındaki çalkalama hızıdır. Normalde 150 rpm çalkalama hızında inkübe edilen funguslar stres faktörü oluşturmak için farklı çalkalama koşullarında (statik -100 rpm- 150 rpm- 200 rpm ve 250 rpm) üretilmiştir. Maksimum melanin üretiminin 200 rpm de olduğu saptanmıştır.

Fungusların optimum üreme pH'sı 5.0-6,5 arasındadır. Kiran ve arkadaşları 2014 yılında *N. alba* MSA10 ile yaptıkları çalışmada melanin üretimini artırmak için farklı pH ların etkisini test etmişlerdir. Sonuçta pH' nın artışına paralel olarak melanin sentezinin arttığını fakat fungal üremenin azaldığını saptamışlardır. Çünkü pH, mikrobiyal pigment üretimi için önemli bir faktördür. Ortamın pH'sı, mikroorganizmanın pigment üretim miktarını ve tipini etkilemektedir. PH' daki hafif değişim, mikrobiyal pigmentin renk tonunu değiştirebilir ve bu durum mikroorganizma türüne göre değişebilir. *Monascus sp* için en uygun pH. 5.5-6.5 iken *Rhodotorula* için pH 4.0-4.5. uygundur. pH nötrden hafif alkaliye geçtiğinde likopen pigmenti sentezlenirken nötrden asidiğe dönüştüğünde ise β -karoten sentezlenmektedir (Kiran vd., 2014). Biz de *A. alternata*'nın en fazla melanin ürettiği pH'yı 4 olarak tesbit ettik.

A. alternata 'nın melanin üretimini indüklemek için farklı besiyerlerinde üretimlerini yaptık. Bunun için PDB ve SDB besiyerleri kullandık. En iyi melanin üretiminin PDB besiyerinde sentezlendiğini tespit ettik. PDB besiyerinde bütün dalga boylarında (372-422 nm) melanin üretimi yüksek olmuştur. Anitha ve Murugesan'ın 2008 yılında *A. helianthi* ile yaptıkları çalışmada host extract broth (HEB), potato dekstroze broth (PDB) ve potato carrot broth (PCB) olmak üzere 3 farklı besiyeri kullanmışlardır. Diğer besiyerlerinde de melanin üretiminin olmasına rağmen en yüksek değeri HEB besiyerinde üreyen funguslarda sentezlediğini tesbit etmişlerdir (Anitha ve Murugesan, 2008). Bu farklılıklar besiyerindeki farklı karbon kaynakları ve aynı cinse ait tür çeşitliliğiyle ilişkilidir. Besiyerlerindeki farklı karbon kaynakları farklı fungusların farklı pigmentlerin sentezini indüklemek için kullanılmaktadır. Hatta farklı karbon kaynakları pigmentin tonu üzerinde bile etkili olmaktadır. Örneğin; Glikoz gibi karbon kaynağı, büyüme ve pigment üretimi için daha avantajlıdır. *Monascus*'un pigment oluşumu en iyi nişasta ve dekstrinde saptanırken, glikoz ve maltozda orta, fruktozda ise zayıf bir pigmentasyon gözlenmiştir. Cellobiyoz, *Phaffia rhodozyma* için daha

fazla pigmentasyona neden olurken, glikoz hem büyümeyi hem de pigmentasyonu teşvik etmektedir.

Mikroorganizmalar üredikleri ortamdaki uygun olmayan ve stres yaratan koşulların üstesinden gelebilmek için kromozomlarında kodlanmış mevcut gen sistemlerini devreye sokarlar. Bu stres koşullarında üremelerini devam ettirebilmek için uygun proteini, enzimi veya pigment gibi ürünleri sentezlerler. Biz de *A. alternata*'nın melanin pigmentinin sentezini artırmak için besiyerlerine farklı konsantrasyonlarda H_2O_2 (1 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} M) ekledik. 1 M ve 10^{-1} M eklediğimiz PDB besiyerlerinde fungus üremesi olmamıştır. En yüksek melanin üretiminin ise dalga boylarına göre değişmekle birlikte 10^{-2} M ve 10^{-3} M H_2O_2 eklediğimiz besiyerlerinde olmuştur. Üreme olmayan besiyerlerinde okunan melanin değerleri ekim yaptığımız bir miktar fungusun ürettiği melaninden kaynaklanmaktadır. Ivanova ve arkadaşları 2005'de *A. alternata*, *C. cladosporioides*, *M. hiemalis* ve *Paecilomyces lilacinus*' un misel artışı üzerine 10^{-9} - 10^{-1} M'lık hidrojen peroksit etkisi üzerinde çalışmışlardır. Yüksek radyoaktif kirlenmenin olduğu habitatlarından izole edilen fungusların büyümesinin sadece 10^{-1} M H_2O_2 tarafından durdurulduğunu ifade etmişlerdir. Farklı fungusların hidrojen peroksit tepkisinin ise üç tip olduğunu saptamışlar. Bunlar : (1) 10^{-9} ile 10^{-4} M arasındaki H_2O_2 konsantrasyonlarında fungal hiflerin sabit bir büyüme oranına sahip oldukları ve 10^{-3} M H_2O_2 'de ise, büyümede azalma olacağı, (2) H_2O_2 konsantrasyonu arttıkça büyüme hızında kademeli bir düşüş ve (3) H_2O_2 konsantrasyonu 10^{-6} 'dan 10^{-5} M'a yükseldiğinde büyüme oranında bir artış olabileceğini ifade etmişlerdir. *A. alternata* ve *C. cladosporioides* funguslarının bu üç tür büyüme tepkisini verdiklerini, ancak *M. hiemalis* ve *P. Lilacinus* gibi açık pigmentli türlerin sadece birinci tip büyüme cevabı gösterdikleri saptanmıştır. 10^{-1} M' ye eşit hidrojen peroksit konsantrasyonunun incelenen fungusların hepsine öldürücü olduğu bulunmuştur (Ivanova vd., 2005).

Radiotrofik fungusların ağır metallere, oksidatif zararlara, ultraviyole radyasyonuna, sıcak ve soğuk stresine ve kuraklığa karşı ekstrem dayanıklılığının olması gibi çok sayıda dikkate değer özellikleri vardır. Bu özelliklerinden dolayı son yıllarda melaninli funguslar ve bakteriler ile çeşitli çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Özellikle genetik mühendislikle ilgili çalışmaların yanı sıra, biyoremediasyonla ilgili çalışmalar ve ciddi çevre problemlerine neden olan ağır

metallerin ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ile ilgili yoğun araştırmalar yapılmaya başlanmıştır.

Çoğu bitki patojeni olan fungus da uygun olmayan çevre koşullarına karşı canlı kalmalarını ürettikleri melanin pigmentine borçludurlar. Melanin, fungusları litik enzimlerden, ekstrem sıcaklıklardan ve kuraklıktan koruduğu gibi fungusit dirençliliğini de indüklemektedir. Bu bitki patojeni funguslar tarafından melanin üretimini etkileyen faktörlerin öğrenilmesi, potansiyel biyokontrol ajanı olarak kullanılmasına imkân sağlayacaktır. Melanin, bazı insan patojeni olan funguslar için de antioksidatif, termostabil, antiradyoaktif, paramanyetik ve metal bağlayıcı özelliklerinden dolayı önemli bir virulans faktördür. Fungal melaninler, patojen fungusu konağın immün sistemine karşı korumaktadır.

Melanin pigmenti, mikroorganizmalar, bitkiler, omurgasızlar ve memelileri de içine alan geniş bir tür kompozisyonuna sahip çok fonksiyonlu bir pigmenttir. Melanin pigmenti birçok önemli fonksiyona sahiptir. Melaninler sıcak-soğuk ve kuraklık gibi fiziksel stres faktörlerine karşı, metal iyonları ve birçok toksik kimyasallara karşı canlıları korumaktadır (Castanet ve Ortonne, 1997). Ayrıca UV ve solar radyasyon gibi fiziksel ajanlara karşı fotoprotektör olarak koruyucu rolleri bulunmaktadır. Hem literatür bilgilerine göre hem de çalışmamızın sonuçlarına göre melanin pigmentinin, canlı organizmaları ekstrem çevre koşullarına karşı koruyarak hayatta kalma şanslarını arttırdıklarını söyleyebiliriz.

Çok yüksek radyasyon seviyelerinin olduğu bölgelerde yaşayan melaninli funguslar, birçok bilim adamının dikkatini çekmiştir. Bu ekstrem çevre koşullara dayanıklılığın sebebini ortaya çıkarmak için moleküler ve hücresel boyutta birçok çalışma yapılmıştır. Bu direnç mekanizmasının, fungusların hücre duvarlarında lokalize olan melanin pigmentiyle ilgili olduğu belirlenmiştir.

Radiotrofik funguslar sentezledikleri melanin pigmenti sayesinde ağır metallere, oksidatif zararlara, ultraviyole radyasyonuna, sıcak ve soğuk stresine ve kuraklığa karşı ekstrem dayanıklılık özellikleri kazanmışlardır. Bu özelliklerinden dolayı son yıllarda melaninli funguslar ve bakteriler ile çeşitli çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Özellikle genetik mühendislikle ilgili çalışmaların yanısıra, biyoremediasyonla ilgili çalışmalar ve ciddi çevre problemlerine neden olan ağır

metallerin ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ile ilgili yoğun araştırmalar yapılmaya başlanmıştır.

Çoğu bitki patojeni olan fungusların sahip oldukları melanin fungusları litik enzimlerden, ekstrem sıcaklıklardan ve kuraklıktan koruduğu gibi fungusun dirençliliğine de katkı sağlamaktadır. Bu bitki patojeni fungusları tarafından melanin üretimini etkileyen faktörlerin öğrenilmesi, biyokontrol ajanı olarak kullanılarak bitkileri fungal hastalıklardan korumaya imkân sağlayacaktır.

Melanin, bazı insan patojeni olan funguslar için de antioksidatif, termostabil, antiradyoaktif, paramanyetik ve metal bağlayıcı özelliklerinden dolayı önemli bir virulans faktördür. Fungal melaninler, patojen fungusu konağın immün sistemine karşı korumaktadır.

Melanin üretiminin mekanizmasının anlaşılması ile yeni antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesi, kanser terapisi ve enerji transdüksiyonu gibi birçok alanda önemi giderek artmıştır. Melanin üretimini engelleyen çeşitli mekanizmaların fungal patojeniteyi azalttığı saptanmıştır. Bu verilerden yola çıkarak melanotik mikroorganizmalarda melanin üretimini engelleyen ilaçlar önemli bir potansiyel antimikrobiyal ajan olmuştur. Özellikle funguslardaki melanin yapısı memeli derisindeki melaninden kimyasal olarak çok farklı değildir. Fungal ve memeli melaninlerindeki bu benzerlik, melanoma tedavisinde önemli olan monoklonal antitadi üretiminde yol göstericidir. Aynı zamanda melaninin yüksek enerjili iyonize ışınları tutma özelliğinden dolayı, kanser hastalarında radyoterapi tedavisinde sağlıklı hücrelerin zarar görmemesi açısından da büyük avantaj sağlamaktadır.

Günümüzde doğal gıda katkı maddelerine olan talep artmaktadır. Bu nedenle doğal renklendiriciler ve mikrobiyal pigmentleri konu alan çalışmalar, renklendiriciler alanında yapılan çalışmaların önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Kozmetik ve gıda endüstrisinde kullanılan pigmentler ve renklendiriciler, bebek mamaları, kahvaltı gevrekleri, makarnalar, soslar, işlenmiş peynirler, meyveli içecekler, probiyotik gıda renklendiricileri, vitamin bakımından zengin süt ürünleri ve bazı enerji içecekleri vb. gibi farklı ürünlerde kullanılmaktadır. Bu nedenle, mikrobiyal kaynaklı doğal pigmentler ve renkler, çevre dostu, sağlıklı ve çekici renklere sahip olmalarından dolayı iyi bir alternatiftir. Gıda ürünlerine sentetik pigmentler yerine, doğal veya mikrobiyal renklerin eklenmesi toplumda renklendiricilere karşı mevcut endişesinin azalmasını sağlamaktadır. Çünkü sentetik

boyalar önemli çevre ve sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Buna karşılık mikrobiyal pigmentler, çevre dostudur ve tekstil endüstrisinde, gıda renklendiricisi olarak, antioksidanlar, biyo-indikatörler, antimikrobiyal ve antikanser ajanları olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda mikrobiyal pigmentleri birçok endüstri alanında daha çok kullanılabilir hale getirmek için kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır. Günümüzde toksik sentetik boyaların kullanımını azaltmak için, mikrobiyal kaynaklı pigment üretimini artırmaya yönelik yeni mikrobiyal kaynak bulma, bunların optimizasyonu ve iyileştirilmesi ve genetik mühendislik yoluyla üretim maliyetini azaltmak için çalışmalar yapılmaktadır. Biyolojik renklendiricilerin, gıda, ilaç, tekstil, matbaa endüstrilerinde vb. alanlarda geniş uygulamaları vardır.

Yapılan bu çalışmaların sonuçları ile Mikrobiyoloji, Biyoteknoloji, Ziraat, Gıda Mühendisliği, Tıp ve Eczacılık alanında temel düzeyde yeni bilgiler sunacaktır.

6. KAYNAKLAR

Aberoumand A. (2011). A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. *World Journal of Dairy Food Sciences*. **6**(1), 71–78.

Ahn, J., Jung, J., Hyung, W., Haam, S., Shin, C. (2006). Enhancement of *Monascus* pigment production by the culture of *Monascus* sp. J101 at low temperature. *Biotechnol. Progr.* **22**(1), 338-40.

Akdağ P. (2010). *Adana’da Cladosporium ve Alternaria spor konsantrasyonlarının saptanması ve deri testinde kullanılacak mantar ekstraktlarının hazırlanması*. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana

Alkaya Solmaz, F., ve Özatamer, O. (2012) Radyasyon ve Radyoaktif Madde Toksisitesi. *Turkiye Klinikleri J Anest Reanim.*; **10**(1), 28-34

Anitha, R., Murugesan, K. (2008) Melanin production in *Alternaria helianthi*. *Arch Phytopathology Plant Protect.* **41**(5), 360-364

Belozerskaya, T., Aslanidi, K., Ivanova, A., Gessler, N., Egorova, A., Karpenko, Yu., Olishchanskaya, S. (2010). Characteristics of Extremophylic Fungi from Chernobyl Nuclear Power Plant. *Micro Microbial Biotech.* **1**, 88-94.

Beyoğlu S. (2006) *Cladosporium Link ve Alternaria Nees Ex Wallroth sporlarının Adana atmosferindeki miktarları ve meteorolojik faktörlerin spor miktarı üzerine etkisi*. Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

Britton, G. (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* **9**(15), 1551-8

Carris, L. M., Little, C. R. and Stiles, C. M. (2012) Introduction to Fungi. *The Plant Health Instructor*. DOI:10.1094/PHI-I-2012-0426-01

Castanet, J., Ortonne, J.R. (1997) Pigmentary changes in aged and photoaged skin. *Arch Dermatol.* **133**(10), 1296-1299

Cox, G.M., Harrison, T.S., McDade, H.C., Taborda, C.P., Heinrich, G., Casadevall, A., Perfect, J.R. (2003). Superoxide Dismutase Influences the Virulence of *Cryptococcus neoformans* by Affecting Growth within Macrophages. *Infect Immun.* **71**(1), 173–180.

Cunha, M.L., Franzen, A.J., Seabra, S.H., Herbst, M.H., Vugman, N.V., Borba, L.P., Souza, W., Rozental, S. (2010). Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. *BMC Microbiology.* **10**(1):80

Dadachova, E., Bryan, R.A., Huang, X., Moadel, T., Schweitzer, A. D., Aisen, P., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A. (2007). Ionizing Radiation Changes the Electronic Properties of Melanin and Enhances the Growth of Melanized Fungi. *PLoS One.* **2**(5), e457.

- Dadachova, E., Casadevall, A. (2008). Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. *Curr Opin Microbiol.* **11**(6), 525–531.
- Danevcic T., Boric Vezjak M., Zorec M., Stopar D. (2016). Prodigiosin-a multifaceted *Escherichia coli* antimicrobial agent. *PLoS One.***11**(9), e0162412 10.1371/journal.pone.0162412
- Dizdar, Y. (2016) <http://yavuzdizdar.com/yeryuzundeki-hakim-otorite-mikroorganizmalardir/>(on-line access on 10 Feb, 2016).
- Downham A., Collins P. (2000). Coloring our foods in the last and next millennium. *Int. J. Food Sci. Technol.* **35**(1), 5 – 22
- Eisenman, H. C. ve Casadevall, A. (2012) Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.***93**(3), 931-40
- Erdal, P. ve Ökmen, G. (2013) Gıdalarda Kullanılan Mikrobiyal Kaynaklı Pigmentler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* **6** (2), 58-72
- Erdem, Ş. (2017) <https://prezi.com/jechgm39nw2f/mikrobiyal-pigmentler-ve-kullanim-alanlari/>(on-line access on 4 June, 2017).
- Frost, A. (1988). Frequency of allergy to *Alternaria* and *Cladosporium* in a specialist clinic. *Allergy.* **43**(7), 504-7.
- Geng, J., Yu, S.B., Wan, X., Wang, X.J., Shen, P., Zhou, P., Chen, X.D. (2008). Protective action of bacterial melanin against DNA damage in full UVspectrums by a sensitive plasmid-based noncellular system. *J. Biochem. Bioph. Methods.* **70**(6), 1151-1155.
- Gómez, B. L. and Nosanchuk, J. D. (2003) Melanin and fungi. *Curr Opin Infect Dis.* **16**(2), 91-96
- Güven K. ve Kıvanç M. (2009) Genel Mikrobiyoloji T.C. Anadolu Üniversitesi Yayını No: 1961 Açıköğretim Fakültesi Yayını No: 1041
- Heer, K. ve Sharma, S. (2017) Microbial Pigments As A Natural Color: A Review *IJPSR.* **8**(5), 1913-1922.
- Ivanova A.E., Aslanidi K.B., Karpenko IuV., Belozerskaia T.A. (2005) The effect of hydrogen peroxide on the growth of microscopic mycelial fungi isolated from habitats with different levels of radioactive contamination. *Mikrobiologiya.* **74**(6),756-65.
- Jacobson E.S., Jenkins., N.D, Todd J.M. (1994). Relationship between Superoxide Dismutase and Melanin in a Pathogenic Fungus. *Infect Immun.* **62**(9), 4085-4086.
- Jacobson, E. S., Hove, E. and Emery, H. S. (1995) Antioxidant function of melanin in black fungi. *Infect Immun.* **63**(12), 4944–4945.

Kawamura, C., Moriwaki, J., Kimura, N., Fujita, Y., Fuji, S., Hirano, T., Koizumi, S., Tsuge, T. (1997) The Melanin Biosynthesis Genes of *Alternaria alternata* Can Restore Pathogenicity of the Melanin Deficient Mutants of *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**(4), 446-453. Publication no. M-1997-0324-01R

Kimura, N., Tsuge, T. (1993) Gene cluster involved in melanin biosynthesis of the filamentous fungus *Alternaria alternata*. *J. Bacteriol.* **175**(14), 4427-35.

Kiran G.S., Dhasayan A., Lipton A.N., Selvin J., Arasu M.V., Al-Dhabi N.A. (2014) Melanin-templated rapid synthesis of silver nanostructures. *J. Nanobiotechnol.* **12**(1), 18. doi: 10.1186/1477-3155-12-18.

Kramar, A., Llic Tomic, T., Petkovic, M., Radulovic, N., Kostic, M., Jovic, D., et al. (2014). Crude bacterial extracts of two new *Streptomyces* sp. isolates as bio-colorants for textile dyeing. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **30**(8), 2231-2240

Liu, G.Y., Nizet, N. (2009) Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends Microbiol.* Sep; **17**(9): 406–413.

Malik K., Tokkas J., Goyal S. (2012). Microbial pigments: a review. *IJMR.* **4**(1), 361–365

Manikprabhu D., Lingappa K. (2013). γ Actinorhodin a natural and attorney source for synthetic dye to detect acid production of fungi. *Suudi J Biol Sci.* **20**(2),163-8.

Nobre, M. D., Antunes, T.A., Meireles, M.C.A., Ferreira, L. (2004) Production And Evaluation Of Albino Mutants Of *Sporothrix Schenckii*. *Acta Scientiae Veterinariae.* **32**(2), 119-123,

Narsing Rao, M.P., Xiao, M., Li, W.J. (2017) Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications. *Front. Microbiol.* Jun **22**(8),1113. doi: 10.3389/fmicb.2017.01113. eCollection 2017.

Nosanchuk J.D., Casadevall A. (2003) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell. Microbiol.* **5**(4), 203–223.

Nosanchuk, J.D., Casadevall, A. (2006) Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**(11), 3519-3528.

Okamoto, S., Sakurada, M., Kubo, Y., Tsuji, G., Fujii, I., Ebizuka, Y., Ono, M., Nagasawa, H., Sakuda, S., (2001) Inhibitory effect of aflastatin A on melanin biosynthesis by *Colletotrichum lagenarium*. *Microbiology.* **147**(9), 2623-2628

Pihet, M., Carrere, J., Cimon, B., Chabasse, D., Delhaes, L., Symoens, F., Bouchara, J.P. (2009) Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis--a review. *Med. Mycol.* **47**(4), 387-97. doi: 10.1080/13693780802609604.

Plonka, P.M. and Grabacka M. (2006) Melanin synthesis in microorganisms biotechnological and medical aspects. *Acta Biochim. Pol.* **53**(3), 429-43

Poorniammal, R., Parthiban, M., Gunasekaran, S., Murugesan, R., Thilagavathy, R. (2013). Natural dye production from *Thermomyces* sp. fungi for textile application. *Indian J. Fibre Text. Res.* **38**(3), 276-279

Romero-Martinez, R., Wheeler M., Guerrero-Plata, A., Rico, G., and Torres-Guerrero, H. (2000) Biosynthesis and Functions of Melanin in *Sporothrix schenckii* *Infect. Immun.* **68**(6), 3696–3703.

Schweitzer, A.D., Revskaya, E., Chu, P., Pazo, V., Friedman, M., Nosanchuk, J.D., Cahill, S., Frases, S., Casadevall, A., Dadachova, E. (2010). Melanin-covered nanoparticles for protection of bone marrow during radiation therapy of cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **78**(5), 1494-502

Sharma, D., Gupta, C., Aggarwai, S., (2012) Pigment extraction from fungus for textile dyeing. *Indian J. Fibre Text. Res.* **37**(1):68-73

Shcherba, V.V., Babitskaya, V. G., Kurchenko, V. P., Ikonnikova, N. V., Kukulyanskaya, T. A. (2000). Antioxidant properties of fungal melanin pigments. *Appl. Biochem. Microbiol.* **36**(5), 491-495.

Singaravelan, N., Grishkan, I., Beharav, A., Wakamatsu, K., Ito, S., Nevo, E., (2008) Adaptive Melanin Response of the Soil Fungus *Aspergillus niger* to UV Radiation Stress at “Evolution Canyon”, Mount Carmel, Israel. *PLoS One.* **20**; **3**(8), e2993

Tsai, H.F., Wheeler, M.H., Chang, Y.C., Kwon-Chung, K.J. (1999) A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *J. Bacteriol.* **181**(20), 6469-77.

Toledo, A. V., Franco, M. E. E., López, S. M. Y., Troncozo, M. I., Saparrat, M. C. N., Balatti, P. A. (2017) Melanins in fungi: Types, localization and putative biological roles. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **99**, 2-6

Turancı, H. (2013) *Radiotrofik bir fungus olan Alternaria alternata’da uv-c’nin Biyokimyasal belirteçler üzerine etkileri*. Yüksek lisans tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.

Venil C.K., Aruldass C.A., Dufosse L., Zakaria Z.A., Ahmad W. A. (2014). Current perspective on bacterial pigments: emerging sustainable compounds with coloring and biological properties for the industry-an incisive evaluation. *RSC Advances.* **4**(74), 39523- 39529. 10.1039/c4ra06162d

- Venil, C.K., Zakaria, Z.A., Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochem.* **48**(7), 1065–1079.
- Wakamatsu K., Ito S. (2002) Advanced chemical methods in melanin determination. *Pigment Cell Res.* **15**(3), 174-183
- Walker, L.A., Gow, N.A., Munro, C.A. (2010) Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet. Biol.* **47**(2), 117-126
- Wang, Y., Casadevall, A. (1994). Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to the fungicidal effects of ultraviolet light. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(10), 3864–3866.
- Wang Y., Aisen P., and Casadevall A. (1995) *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infect Immun.* **63**(8), 3131–3136.
- Wang Y., Nakajima A., Hosokawa K., Soliev A. B., Osaka I., Arakawa R., Enomoto, K. (2012). Cytotoxic prodigiosin family pigments from *Pseudoalteromonas* sp. 1020R isolated from the Pacific coast of Japan. *Biosci. Biotechnol., Biochem.* **76**(6), 1229–1232.
- Yiğitbaşoğlu H. (1998) Kentlerin Çevre Sorunları ve Habitat Konferansları (Environmental Problems of Cities and Habitat Conferences) Cilt 38, Sayı 1-2 Syf 13-28, *Ankara Üniversitesi, DTCF Dergisi*
- Youngchim S., Morris-Jones R., Hay R.J., Hamilton A.J. (2004) Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. *J. Med. Microbiol.* **53**(3), 175-181
- Zhdanova, N. N., Tugay, T., Dighton, J., Zheltonozhsky, V., Mcdermott, P., (2004) Ionizing radiation attracts soil fungi. *Mycol. Res.* **108** (9), 1089–1096
- Zhong, J., Frases, S., Wang, H., Casadevall, A., Stark, R.E., (2008), Following fungal melanin biosynthesis with solid-state NMR: biopolymer molecular structures and possible connections to cell-wall polysaccharides. *Biochemistry.* **47**(16), 4701-10

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Berrin ÜNAL

Doğum Yeri ve Tarihi: Malatya, 27.9.1976

E-posta: brnunal44@gmail.com

Lisans: İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü

Görevi: Battalgazi Atatürk Ortaokulu Fen bilimleri Öğretmenliği

