

**T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**FARKLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN
AKTİNOMİSETLERDEN EKSTRASELÜLER
PİGMENT KARAKTERİZASYONU VE BAZI
BİYOFONKSİYONEL ÖZELLİKLERİN
İNCELENMESİ**

Mehmet Onur KARTAL

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Melike BARAN EKİNCİ

BURDUR, 2025

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca **Doktora** Tezi olarak sunduğum “**Farklı Kaynaklardan İzole Edilen Aktinomisetlerden Ekstraselüler Pigment Karakterizasyonu ve Bazı Biyofonksiyonel Özelliklerin İncelenmesi**” başlıklı bu tezin;

- Kendi çalışmam olduğunu,
- Sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi,
- Bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi,
- Kullandığım verilerde değişiklik yapmadığımı,
- Tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı,
- Bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı,

bildirir, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

28/07/2025

(İmza)

Mehmet Onur KARTAL

ÖNSÖZ

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocam **Dr. Öğr. Üyesi Melike BARAN EKİNCİ**'ye teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırma süresince her zaman yanımda olan, bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren değerli jüri üyelerim Prof. Dr. Seyhan ULUSOY'a, Prof. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY'a, Doç. Dr. Büşra AKTAŞ MANSUROĞLU'na ve Doç. Dr. Neslihan KAYA KINAYTÜRK'e teşekkür ederim.

Deneylerimi yapmam için laboratuvarlarını bana açan ve araştırmalarımnda hiçbir yardımı esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Oğuz GÜRSOY'a, Prof. Dr. Yusuf YILMAZ'a, Prof. Dr. Fatih Mehmet EMEN'e ve Dr. Öğr. Üyesi Muzaffer DÜKEL'e teşekkür ederim. Moleküler analizlerde her türlü yardıma açık olan ve öngördüğü muhtemel hataları düzeltmemde yol gösteren Öğr. Gör. Dr. Orhan YAVUZ'a teşekkür ederim. Çalışmamın can alıcı noktası olan LC-MS Q-TOF bölümünde sorunsuz ilerlememde yardımlarını esirgemeyen Dr. Sabriye SEL'e teşekkür ederim.

Araştırmalarım süresince yardımlarını gördüğüm ve moral veren değerli arkadaşlarım Burak Can GÜNEY'e, Yasin AŞIK'a, Hande Özge GÜLER DAL'a, Muhammed Asım Ali'ye, Fatema ZARZOUR'a, Gülser BAYRAK'a, Yeşim ALAGÖZ'e, Kübra Nur BOSTANCI'ya, Şahide YÜKSEL'e, Sema ARAYAN'a, Metin SALTIK'a, Aslı KOŞKOŞ'a, Sena KOŞER'e, Muhlise ASLAN'a, İsmet Can AYIK'a, Abdullah TANTA'ya, Ömer ACAR'a, İmge YURDABAKAN'a, Çağlar GÖKIRMAKLI'ya, Özlem ÇAYIR'a, Ahmet ÇİÇEK'e ve adını sıgıdıramadığım değerli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

0899-DR-23 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, 1240726 No'lu proje koduyla tezimi maddi olarak destekleyen TÜBİTAK 1002-B programına, 47 ay boyunca maddi olarak destekleyen TÜBİTAK BİDEB 2211-A programına, 60 ay boyunca maddi olarak destekleyen YÖK 100/2000 programına teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın her aşamasında beni her anlamda destekleyen değerli aileme ve tanıdığım günden beri destek, umut, güç veren değerli yol arkadaşım Alev ALTAŞ'a sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım. Ayrıca yaşadığım süre boyunca her türlü desteği sağlayan Türkiye Cumhuriyeti'ne minnet ve şükranlarımı sunarım.

Temmuz, 2025

Mehmet Onur KARTAL

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖZET.....	viii
SUMMARY	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Aktinomisetler.....	3
2.1.1. <i>Streptomyces</i>	4
2.2. Pigmentler	7
2.2.1. Mikrobiyal Pigmentlerin Yapısı.....	11
2.2.2. Melaninler	16
2.2.2.1. Melanin Türleri	18
2.2.2.2. Ömelenin, Feomelanin ve Nöromelaninin Sentezlenmesi	22
2.3. Melanin Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler.....	24
2.3.1. UV-Vis (Morötesi ve Görünür Işık) Spektroskopisi	24
2.3.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi.....	25
2.3.3. ¹ H NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) Spektroskopisi.....	26
2.3.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)-Enerji Dağıtıcı X-ışını (EDS) Spektroskopisi	27
2.3.5. LC-MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi) Q-TOF (Kuadrupol-Uçuş Zamanlı)	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM	29
3.1. Materyal	29
3.1.1. Örnek Toplama ve Aktinomiset İzolasyonu	29
3.1.2. Besiyerleri.....	33
3.2. Yöntem	34
3.2.1. Farklı Kültür Ortamlarında Aktinomiset Gelişimi	34
3.2.2. Aktinomisetlerin Mikroskop Görüntülerinin İncelenmesi.....	34
3.2.2.1. Gram Boyama	34
3.2.3. Aktinomiset İzolatının Sıvı Kültürde Günlük Gelişimi.....	34
3.2.4. Moleküler Analiz	35
3.2.4.1. DNA izolasyonu ve 16S rDNA Dizileme	35
3.2.4.2. Filogenetik Analiz.....	36
3.2.5. Pigment Ekstraksiyonu	37
3.2.6. Pigment Karakterizasyonu.....	38
3.2.6.1. UV-Vis (Morötesi ve Görünür Işık) Spektrofotometrik Analizi.....	38
3.2.6.2. FT-IR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) Analizi	38
3.2.6.3. ¹ H NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) Analizi	38
3.2.6.4. SEM-EDS (Taramalı Elektron Mikroskobu-Enerji Dağıtıcı X-ışını Spektroskopisi) Görüntüsünün Alınması	39
3.2.6.5. LC-MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi) Q-TOF (Kuadrupol Uçuş Zamanlı) Analizi	39
3.2.7. Anti-bakteriyel Aktivite Analizi	40

3.2.8. Anti-kanser Aktivite Analizi	40
3.2.9. İstatistiksel Analizler	41
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	43
4.1. Farklı Kültür Ortamlarında Aktinomiset Gelişimi	43
4.2. Aktinomisetlerin Mikroskop Görüntüleri.....	49
4.3. Aktinomisetlerin Gelişimi	50
4.4. Moleküler Tanımlama	53
4.5. Aktinomiset Kültürlerinden Melanin Ekstraksiyonu	57
4.6. Aktinomiset Melanininin Yapısal Analizi.....	60
4.6.1. UV-Vis (Morötesi ve Görünür Işık)	60
4.6.2. FT-IR (Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi).....	63
4.6.3. ¹ H NMR (Nükleer Manyetik Rezonans).....	66
4.6.4. SEM-EDS (Taramalı Elektron Mikroskobu-Enerji Dağıtıcı X-ışını Spektroskopisi) Görüntüsü	69
4.6.5. LC-MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi) Q-TOF (Kuadropol-Uçuş Zamanlı)	73
4.7. Aktinomiset Melanininin Anti-bakteriyel Aktivitesi	87
4.8. Aktinomiset Melanininin Anti-kanser Aktivitesi	91
4.9. Aktinomiset Melaninlerinin Yapısal Analizi ile Anti-bakteriyel ve Anti-kanser Özelliklerinin Genel Değerlendirmesi	95
5. SONUÇ	99
KAYNAKLAR	102

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Mikroorganizmalar tarafından üretilen bazı pigmentlerin yapısı	11
Şekil 2.2. Ömelanin, nöromelanin, feomelanin, piyomelanin ve allomelaninin sentezlendiği monomer yapıları	18
Şekil 2.3. Ömelanin polimerinin temsili yapısı	19
Şekil 2.4. Feomelanin polimerinin temsili yapısı	20
Şekil 2.5. Nöromelanin yapısı.....	21
Şekil 2.6. Allomelanini oluşturan 1,8-DHN monomeri.....	22
Şekil 2.7. Piyomelanini oluşturan benzokinon asetik asit monomeri	22
Şekil 2.8. Ömelanin, feomelanin ve nöromelaninin sentezlenmesi	23
Şekil 3.1. Balıkesir ilinden alınan örneklerin konumları	31
Şekil 3.2. Kütahya ilinden alınan örneklerin konumları	32
Şekil 3.3. Burdur ilinden alınan örneklerin konumları	32
Şekil 3.4. Denizli ilinden alınan örneklerin konumları.....	33
Şekil 4.1. İzolatların stereo mikroskop altında koloni görüntüleri	49
Şekil 4.2. İzolatların ışık mikroskobu görüntüleri	50
Şekil 4.3. K3 izolatının gelişim eğrisi.....	51
Şekil 4.4. B23 izolatının gelişim eğrisi.....	52
Şekil 4.5. B25 izolatının gelişim eğrisi.....	52
Şekil 4.6. <i>S. griseorubens</i> K3, <i>S. variabilis</i> B23 ve <i>S. variabilis</i> B25 suşları ile diğer <i>Streptomyces</i> cinsinin komşu birleştirme (Neighbour-joining) ile 16 S rRNA gen dizilerine dayalı filogenetik ilişkisi	54
Şekil 4.7. K3M'nin UV-Vis absorbans spektrumu	61
Şekil 4.8. B23M'nin UV-Vis absorbans spektrumu	61
Şekil 4.9. B25M'nin UV-Vis absorbans spektrumu	62
Şekil 4.10. K3M'nin FT-IR spektrumu.....	64
Şekil 4.11. B23M'nin FT-IR spektrumu.....	64
Şekil 4.12. B25M'nin FT-IR spektrumu.....	65
Şekil 4.13. K3M'nin ¹ H NMR spektrumu	67
Şekil 4.14. B23M'nin ¹ H NMR spektrumu	67
Şekil 4.15. B25M'nin ¹ H NMR spektrumu	68

Şekil 4.16. K3M'nin taramalı elektron mikroskobu altındaki (SEM) görüntüsü ve enerji dağıtıcı spektroskopi (EDS) ile element analizi sonucu.....	70
Şekil 4.17. B23M'nin taramalı elektron mikroskobu altındaki (SEM) görüntüsü ve enerji dağıtıcı spektroskopi (EDS) ile element analizi sonucu.....	70
Şekil 4.18. B25M'nin taramalı elektron mikroskobu altındaki (SEM) görüntüsü ve enerji dağıtıcı spektroskopi (EDS) ile element analizi sonucu.....	70
Şekil 4.19. K3M ekstrakte melanininde FBF algoritması ile varlığı tespit edilen moleküllerin LC-MS Q-TOF spektrumları	75
Şekil 4.20. K3M ekstrakte melanininde Auto MS/MS algoritması ile varlığı tespit edilen moleküllerin LC-MS Q-TOF spektrumları	77
Şekil 4.21. B23M ekstrakte melanininde FBF algoritması ile varlığı tespit edilen moleküllerin LC-MS Q-TOF spektrumları	79
Şekil 4.22. B23M ekstrakte melanininde Auto MS/MS algoritması ile varlığı tespit edilen moleküllerin LC-MS Q-TOF spektrumları	81
Şekil 4.23. B25M ekstrakte melanininde FBF algoritması ile varlığı tespit edilen moleküllerin LC-MS Q-TOF spektrumları	83
Şekil 4.24. B25M ekstrakte melanininin CCD18Co ve SW620 hücre hatlarına karşı sitotoksik etkisi.....	92

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Mikroorganizmalar tarafından üretilen pigmentlerin uygulama alanları.....	8
Çizelge 2.2. FT-IR spektrumunda frekans aralığına karşılık gelen titreşim türü.....	25
Çizelge 2.3. ¹ H NMR spektrumunda kimyasal kaymaya karşılık gelen proton türü	26
Çizelge 3.1. Alınan toprak örneklerinin GPS konumları, yüksekliği ve yeri	30
Çizelge 3.2. 8F ve 1492R primerlerinin baz dizileri, hedef bölgesi ve ürün boyutu	35
Çizelge 3.3. PCR tüpüne konulan bileşikler ve miktarları.....	36
Çizelge 3.4. Amplifikasyonun sağlandığı PCR protokolü.....	36
Çizelge 3.5. FBF algoritması ile taraması yapılan melanin ile ilişkili moleküller	39
Çizelge 4.1. İzolatların GMEA ve BHIA besiyerlerinde kültür özellikleri	43
Çizelge 4.2. İzolatların ISP4 ve ISP7 besiyerlerinde kültür özellikleri	44
Çizelge 4.3. İzolatların NA ve NA + %10 NaCl besiyerlerinde kültür özellikleri	45
Çizelge 4.4. İzolatların NA + %10 Nişasta ve NA + %10 GME besiyerlerinde kültür özellikleri.....	46
Çizelge 4.5. K3M, B23M ve B25M'nin FT-IR spektrumu analiz sonuçları	65
Çizelge 4.6. K3M, B23M ve B25M'nin ¹ H NMR spektrumu analiz sonuçları.....	68
Çizelge 4.7. K3M, B23M ve B25M ile bakteriyel melaninin element yüzdeleri	71
Çizelge 4.8. K3M, B23M ve B25M ile bakteriyel melaninin element oranları.....	73
Çizelge 4.9. K3M ekstrakte melanininden LC-MS Q-TOF analizi ile elde edilen moleküler iyonlar ve özellikleri	75
Çizelge 4.10. B23M ekstrakte melanininden LC-MS Q-TOF analizi ile elde edilen moleküler iyonlar ve özellikleri	79
Çizelge 4.11. B25M ekstrakte melanininden LC-MS Q-TOF analizi ile elde edilen moleküler iyonlar ve özellikleri	82
Çizelge 4.12. K3M, B23M ve B25M ekstrakte melanin pigmentlerinin Gram-negatif bakterilere etkisi	88
Çizelge 4.13. K3M, B23M ve B25M ekstrakte melanin pigmentlerinin Gram-pozitif bakterilere etkisi	89
Çizelge 4.14. <i>S. griseorubens</i> K3, <i>S. variabilis</i> B23 ve <i>S. variabilis</i> B25 suşlarının genel özellikleri ve biyolojik aktiviteleri	98

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bp	: Base Pair (Baz Çifti)
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
g	: Gram
L	: Litre
m	: Metre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
rpm	: Revolutions Per Minute (Dakika Başına Devir)
sn	: Saniye
°C	: Santigrat Derece
µl	: Mikrolitre

ÖZET

Doktora Tezi

Farklı Kaynaklardan İzole Edilen Aktinomisetlerden Ekstraselüler Pigment Karakterizasyonu ve Bazı Biyofonksiyonel Özelliklerin İncelenmesi

Mehmet Onur Kartal

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Melike Baran Ekinci

Temmuz, 2025

Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinden (Burdur, Denizli, Kütahya, Balıkesir) alınan 49 toprak ve 4 çamur örneğinden izole edilen 130 aktinomiset ile daha önceki projelerden elde edilen 45 aktinomiset olmak üzere toplam 175 izolat, ekstraselüler pigment üretimi açısından değerlendirilmiştir. Pigment üretimi gösteren 71 izolat arasından seçilen *Streptomyces griseorubens* K3, *Streptomyces variabilis* B23 ve *Streptomyces variabilis* B25 suşlarının kültürel ve morfolojik özellikleri incelendikten sonra tür tanımı yapılmıştır. Bu suşların kültür ortamından durağan faz sonunda elde edilen pigment ekstraktları detaylı yapısal analizlere tabi tutulmuştur.

Melanin pigmentlerinin yapısal karakterizasyonu için UV-Vis, FT-IR, ¹H NMR, SEM-EDS ve LC-MS Q-TOF analizleri gerçekleştirilmiştir. Tüm suşlardan elde edilen ekstraktların **ömelanin**, **feomelanin** ve **nöromelanin** bileşenlerini içerdiği belirlenmiştir. *Streptomyces variabilis* B23 suşuna ait ekstrakte melanin, test edilen tüm Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere karşı anti-bakteriyel etki göstermiştir. *Streptomyces variabilis* B25 suşundan elde edilen ekstrakte melanin ise, SW-620 kolon kanseri ve CCD18Co normal kolon hücre hatları üzerinde test edilmiş ve IC₅₀ değerleri 1000 µg/mL'den büyük olarak bulunmuştur.

Çalışma, *S. griseorubens* ve *S. variabilis* türleri tarafından ekstrakte edilen ilk melaninler olmasının yanı sıra *Streptomyces melaninlerinin* yapısal çeşitliliğini, anti-bakteriyel ve anti-kanser özellikleri ile bir arada ortaya koyması açısından literatürde **öncü** olma niteliğini taşımaktadır. Elde edilen veriler, doğal kaynaklı melanin pigmentlerinin biyoteknolojik potansiyelleri ile ilgili önemli ipuçları sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: aktinomiset, ekstraselüler pigment, anti-bakteriyel, anti-kanser, melanin, aktinomiset gelişim eğrisi

Hazırlanan bu Doktora tezi MAKÜ BAP koordinatörlüğü tarafından 0899-DR-23 proje numarası ve TÜBİTAK 1002-B tarafından 124O726 proje numarası ile desteklenmiştir.

SUMMARY

Ph.D. Thesis

Characterization of Extracellular Pigments from Actinomycetes Isolated from Different Sources and Investigation of Some Biofunctional Properties

Mehmet Onur Kartal

**Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering**

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Melike Baran Ekinci

July, 2025

In this study, a total of 175 isolates, including 130 actinomycetes isolated from 49 soil and 4 mud samples collected from different regions of Turkey (Burdur, Denizli, Kütahya, Balıkesir) and 45 actinomycetes obtained from previous projects, were evaluated for extracellular pigment production. Among the 71 isolates showing pigment production, *Streptomyces griseorubens* K3, *Streptomyces variabilis* B23, and *Streptomyces variabilis* B25 strains were selected, and their cultural and morphological characteristics were examined before species identification. Pigment extracts obtained from the culture medium at the end of the stationary phase were subjected to detailed structural analysis.

UV-Vis, FT-IR, ¹H NMR, SEM-EDS, and LC-MS Q-TOF analyses were performed for the structural characterization of melanin pigments. It was determined that the extracts obtained from all strains contained **eumelanin**, **pheomelanin**, and **neuromelanin** components. Melanin extracted from the *Streptomyces variabilis* B23 strain exhibited antibacterial activity against all Gram-negative and Gram-positive bacteria tested. Melanin extracted from the *Streptomyces variabilis* B25 strain was tested on **SW-620** colon cancer and **CCD18Co** normal colon cell lines and found to have IC₅₀ values greater than 1000 µg/mL.

This study is pioneering in the literature in that it is the first to extract melanin from *S. griseorubens* and *S. variabilis* species and to reveal the structural diversity of *Streptomyces* melanins and their antibacterial and anticancer properties. The obtained data provide important insights into the biotechnological potential of naturally derived melanin pigments.

Keywords: actinomycetales, extracellular pigment, anti-bacterial, anti-cancer, melanin, actinomycetales growth curve

The present Ph. D. Thesis was supported by MAKÜ BAP coordination Under the Project number of 0899-DR-23 and TÜBİTAK 1002-B Under the Project number of 124O726.

1. GİRİŞ

Pigmentler, renk algısı oluşturan maddeler veya bileşiklerdir. Endüstride gıda, kozmetik, boya, ilaç, cam, tekstil gibi birçok kullanım alanı mevcuttur. Sentetik ve inorganik pigmentlerin zararlı etkileri sebebiyle organik pigmentlere yönelim artmıştır. Organik pigmentler içerisinde mikroorganizmalar tarafından üretilen pigmentlerin renk yelpazesi geniştir. Mikrobiyal pigmentler biyolojik olarak parçalanabilmektedir ve çevre dostu olması son yıllarda mikrobiyal pigment üretimini önemli bir potansiyel kaynak haline getirmektedir (Baran Ekinci vd., 2021).

Mikroorganizmalar, düşük maliyetli kültür ortamlarında kolay ve hızlı gelişebilen, iklim koşullarından bağımsız olan canlılardır. Endüstriyel açıdan önemli olan pigment, antibiyotik, enzim, vitamin, tekstür ajanları gibi moleküllerin üretimi için uzun süredir kullanılmaktadır. Bu moleküller ilaç, kozmetik ve gıda gibi alanlarda biyoteknolojik uygulamalar için önemlidir (Ata, 2013; Kumar vd., 2015; Dağ, 2017).

Literatürde *Serratia marcescens*'ten üretilen prodigiosin pigmentinin tekstil endüstrisinde uygulanmasının yanı sıra *Fusarium*, *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Agrobacterium*, *Myxococcus* gibi birçok mikroorganizmadan pigment eldesi ile ilgili çalışmalara rastlanmaktadır. Aktinomisetler içinde de *Streptomyces*, *Nocardia* ve *Dietzia* gibi türler biyolojik aktiviteye sahip kırmızı, yeşil, sarı, kahverengi, siyah gibi çeşitli renklerde pigment üretebilmektedir (Sapkota vd., 2020; Elhagassy, 2018; Erfilibeli, 2021).

Aktinomisetler Gram-pozitif, fakültatif anaerob, yüksek guanin-sitozin (>%55) içeriğine sahip misel oluşturan filamentli bakterilerdir. Prokaryot yapıda oldukları için funguslardan ayrılmaktadır. Şekil ve işlev açısından bakteri ve fungus arasında yer almaktadır. Doğada geniş bir alana yayılan aktinomisetler toprak kökenlidir ve bilinen aktinomisetlerin yaklaşık %90'ı topraktan izole edilmiştir (Sapkota vd., 2020; Lee ve Hwang, 2002). Aktinomisetlerin yaşam alanları ile ilgili yapılan çalışmalarda bu mikroorganizmaların dağ ormanları (Hayakawa vd., 2008), denizler (Takizawa vd., 2003), bataklıklar (Suzuki vd., 2014), bitkiler (Wohl ve Mcarthur, 2008), mağaralar (Groth vd., 1999), hayvanlar (Zheng vd., 2000) ve çeltik tarlaları (Lee ve Hwang, 2002) gibi oldukça çeşitli ve farklı ortamlarda bulunduğu görülmektedir. Aktinomisetler, ilaç keşfinde çok önemli bir yere sahip olup özellikle ekstrem koşullarda gelişebilenler bu konuda öne çıkmaktadır (Ibeyaima vd., 2016; Ma vd., 2020; Sapkota vd., 2020). Bu bakteriler, doğal mikrobiyal ürünler içinde biyoaktif bileşiklerin üretiminin %45'ten

fazlasını üretmektedir ve bu bileşiklerin %70-80'i ticari olarak kullanılabilir. Aktinomisetler içerisinde bu payın **%80'inini** *Streptomyces* cinsi bakteriler oluşturmaktadır (Zainal Abidin vd., 2018; Singh Parmar ve Singh, 2018; Ibeyaima vd., 2016). Streptomisetler, çeşitli pigment ve antibiyotik gibi sekonder metabolitleri üretmesi yönünden çok önemli bir cinstir. Bu cins tarafından melanin, aktinordin, indigoidin ve bazı karotenler gibi pigmentlerin üretildiği bilinmektedir (Dağ, 2017; Gençbay, 2019; Ata, 2013).

Bu çalışmada Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden alınmış 49 adet toprak ve 4 adet çamur kaynaklarından izole edilen 130 adet aktinomisetin yanı sıra Erfilibeli (2021) ve Bedel (2021) tarafından izole edilen 45 adet aktinomiset örneği üzerinde çalışma yapılmıştır. Ekstraselüler pigment üretimi yüksek olan 3 aktinomiset, yapılan moleküler tanı testleri neticesinde *Streptomyces griseorubens* K3, *Streptomyces variabilis* B23 ve *Streptomyces variabilis* B25 olarak belirlenmiştir. Bu suşlardan elde edilen kahverengi renkli ekstrakte melanin pigmentlerinde UV-Vis (Morötesi ve Görünür Işık), FT-IR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi), ¹H NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) analizleri yapılarak kimyasal yapısının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen veriler ışığında SEM-EDS (Taramalı Elektron Mikroskopu-Enerji Dağıtıcı X-ışını Spektroskopisi) ve LC-MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi) Q-TOF (Kuadrupol-Uçuş Zamanlı) analizi ile çalışmalara devam edilmiştir. Gerçekleştirilen analizlerden elde edilen sonuçlar, ekstrakte melanin pigmentlerinin L-DOPA bazlı melanin yapısında olabileceğini göstermiş olup bu nedenle LC-MS Q-TOF ile melanin ve melanin pigmentinin yapım ve/veya yıkım aşamasına ait olduğu düşünülen bazı moleküler yapılar ile ilgili pigmentlerin üretim yolları hakkında değerlendirme yapılmıştır. *S. griseorubens* K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarından elde edilen ekstrakte melaninlerin anti-bakteriyel özellikleri ile CCD18Co ve SW-620 hücre hatlarına karşı anti-kanser özellikleri incelenmiştir.

Bakteriyel melanin pigmentinin kimyasal yapısı ile ilgili literatürde çok az çalışma bulunmaktadır. Bu çalışma *Streptomyces* cinsi bakterilerin melanin pigment üretimi ve bakteriyel melanin pigmentinin kimyasal yapısının belirlenmesi üzerinde öncü çalışmalarından biri olması açısından önemlidir. Bu tür çalışmalar, sentetik üretimleri son derece zor hatta imkânsız olan biyoteknolojik olarak önemli yeni metabolitlerin keşfi, ülkemizde biyoteknolojik ürünlere dışa bağımlılığını azaltması ve mevcut anti-bakteriyel ve anti-kanser ajanlara alternatif ürünlerin üretilmesi açısından son derece önem arz etmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Aktinomisetler

Aktinomisetler (*Actinobacteria*), Gram-pozitif ve fakültatif anaerob olma özelliği taşıyan, yüksek guanin-sitozin (>%55) içeriğine sahip misel oluşturan filamentli bakterilerdir. Uygun koşullar altında funguslarda olduğu gibi iplik benzeri filamentler oluşturabilmekle birlikte prokaryot yapıda oldukları için funguslardan ayrılmakta ve kendi başlarına heterojen bir bakteri grubu oluşturmaktadır. Şekil ve işlev açısından bakıldığında bakteri ve fungus arasında yer aldıkları söylenebilmektedir (Sapkota vd., 2020; Elhagrassy, 2018; Erfilibeli, 2021). Aktinomisetler filamentli bakterilerin büyük bir kısmını oluşturmaktadır (Singh Parmar ve Singh, 2018). *Actinomycetaceae* ailesine mensup olup *Actinobacteria* adı verilen ayrı bir sınıf altında toplanmaktadır (Nayaka vd., 2020b). Hemen hemen her yerde bulunup toprak mikroflorasının büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır (de Massaguer ve da Silva, 2014). Varlığı bilinen ikincil metabolitlerin yaklaşık %70-80'inin üretimini sağladıkları için endüstriyel, biyoteknolojik ve ekonomik açıdan büyük önem taşımaktadır (Nayaka vd., 2020a). Mikroorganizmalar tarafından üretildiği bilinen yaklaşık 23.000 biyoaktif ikincil metabolitin 10.000'den fazlasını aktinomisetler üretmektedir (İbrahim vd., 2023).

Aktinomisetler klinik çalışmalarda antibiyotik, anti-tümör, anti-inflamatuar, bağışıklık sistemi baskılayıcı gibi ajanların üretilmesinde kullanılmaktadır (Zainal Abidin vd., 2018; Ibeyaima vd., 2016). Bunun yanı sıra aktinomisetler amilaz, proteaz ve selüloz gibi ekstrasellüler enzimlerin üretiminde büyük öneme sahiptir. Aktinomisetler ile yapılan çalışmalarda özellikle antibiyotik üretimi üzerinde durulmaktadır (Suriya vd., 2016; Sapkota vd., 2020).

Hemen hemen bütün antibiyotiklere karşı çoklu dirence sahip mikroorganizmaların ortaya çıkması, birçok araştırmacıyı yeni kaynaklardan yeni antibiyotiklerin keşfedilmesine yönlendirmiştir (Ahmad vd., 2017). 2050 yılından başlayarak her yıl antimikrobiyal direnç kaynaklı 10 milyon ölümün gerçekleşeceği tahmin edilmektedir. Ayrıca, nüfus artışı ve yaşlılığa bağlı olarak kanser vakalarının iki katına çıkması da olası olarak görülmektedir (Orlandi vd., 2021). Aktinomisetler, çeşitli biyoaktif ikincil metabolit üretimi bakımından benzersiz bir yeteneğe sahip olmaları nedeniyle biyoteknolojik açıdan oldukça önemlidir (Zainal Abidin vd., 2018). Özellikle ekstrem koşullarda yaşayan aktinomisetler ile keşfedilmemiş yeni aktinomiset türleri bu konuda

ön planda yer almaktadır. Ayrıca aktinomisetler birçok biyoaktif bileşiği ekstraselüler (hücre dışı) olarak üretmektedir (Ibeyaima vd., 2016, Ma vd., 2020; Sapkota vd., 2020).

Farklı toprak türlerinde ve bitkilerin rizosfer bölgesinde yaşayan farklı türlerde aktinomisetler mevcuttur. Aktinomisetler pek çok bitkinin yaşamını sürdürebilmesi için önemlidir. Antibiyotik olma özelliği taşıyan maddeler üreten rizosferik streptomisetler, mantar kaynaklı patojenlerin gelişmesini engelleyerek bitki köklerinin korunmasını sağlamaktadır (Selim vd., 2011).

Sonsuz talepler doğrultusunda yeni doğal ürün üretiminde biyoaktif metabolit üreten keşfedilmemiş ya da ekstrem habitatlarda yaşayan aktinomisetler önemli bir kaynak olarak araştırılmaya devam etmektedir (Ma vd., 2020).

2.1.1. *Streptomyces*

Üstalemler: *Bacteria*

Şube: *Actinobacteria*

Sınıf: *Actinobacteria*

Takım: *Streptomycetales*

Aile: *Streptomycetaceae*

Cins: *Streptomyces*

1943 yılında Waksman ve Henrici tarafından önerilen *Streptomyces* cinsinin tanımlanmış tür sayısı 761 (buna ilave olarak 33 tane de alt tür) olarak belirlenmiştir. Cinsin tip türü *S. albus* ATCC 25426T'dir (URL-1; URL-2; Erfilibeli, 2021).

Aktinomisetlerin üyesi olduğu *Actinobacteria* sınıfı içerisinde biyosentetik genlerin varlığı ve oranı oldukça yüksektir. Özellikle *Streptomyces* türü aktinomisetler biyolojik aktiviteye sahip bileşiklerin birçoğunu üretmektedir ve bu sayede dünyada büyük ilgi görmektedir. Bu antimikrobiyal ajanlar birçok metabolik yollar tarafından, genellikle poliketid sentezi (PKS) ve ribozomal olmayan peptid sentezi (NRPS) ile gerçekleşmektedir. Aktinobakterler içinde biyosentetik genlerin varlığı ve oranı oldukça yüksektir (Ahmad vd., 2017).

Poliketidler, 1890'lı yıllarda isimlendirilen, molekülünde genellikle metilen karbonları tarafından ayrılan çok sayıda karbonil ve alkol grubunu barındıran ve yapısal olarak çeşitlilik gösteren doğal bir ürün grubunu temsil etmektedir. Küçük karbolik asit ve malonatların bir dizi poliketid sentaz (PKS) adı verilen enzimler aracılığıyla dekarboksilatif yoğunlaşma tepkimelerine uğramaları sonucu meydana gelmektedir. Pek çok poliketid maddesi antibiyotik, antikanser ve immünosupresan olarak biyolojik

aktivite göstermektedir. Bu bileşikler toprak kaynaklı aktinomisetler, özellikle de *Streptomyces* cinsi olan bakteriler tarafından bolca üretilmektedir (Richardson ve Khosla, 1999).

Aktinomisetler sekonder metabolit üretimi oldukça yüksek mikroorganizmalardır. Aktinomisetlerin 500'ün üzerinde türü tanımlanmıştır. *Streptomyces* cinsi aktinomisetler bilinen antibiyotik üreticileri arasında ilk sıralarda yer almaktadır. *Streptomyces* suşları *Actinobacteria* sınıfının en fazla üyesi olan taksonudur (Madigan vd., 2013; Erfilibeli, 2021). Kurak ortamlara karşı dirençli ve spor oluşturma özelliği bulunmaktadır. *Streptomyces* cinsi bakterilerden elde edilen antibiyotikler, yılda milyarlarca dolar kazandırabilmektedir. *Streptomyces* türü aktinomisetlerin üretebildiği bilinen antibiyotiklere streptomycin, spectinomycin, neomycin, tetracycline, chlortetracycline, erythromycin, clindamycin, nystatin, amphotericin B ve chloramphenicol örnek verilebilmektedir (Madigan vd., 2013).

Aktinomisetler, farklı bölgelerdeki rizosfer, yani bitkilerin kök bölgesindeki mikrobiyotanın bulunduğu dar toprak veya substrat bölgelerinden izole edilebilmektedir (Singh Parmar ve Singh, 2018). *Streptomyces* türü aktinomisetler, en çok aerobik ve suyu süzölmüş toprakta (kumlu, kireçli gibi) bulunmaktadır (Madigan vd., 2013).

Öbakter olmalarına rağmen miseller veya lifler halinde büyür ve bakterilerde tipik olarak görölen basil ve kok formları yoktur. *Streptomyces*, vejetatif yapılara ve üreme yapılarına dönüşebilen, çok çekirdekli, dallanan misellere dayanan karmaşık bir koloni yapısına sahiptir. Bu karmaşık çok çekirdekli yapı, aktinomisetlerin önceki zamanlarda mikrobiyologlarca mantar ya da mantarlar ile bakteriler arasındaki ara bağlar olarak değeriendirmelerine neden olmuştur. Günümüzde ise streptomisetlerin şüphe götürmeyecek şekilde prokaryot oldukları kabul edilmektedir. Hücre duvarı yapıları, genetik malzemeleri ve fajları bakterilere benzerlik göstermektedir. Çoğu *Streptomyces* türü mezofiliktir (Sharma vd., 2014).

500'den fazla antibiyotiğin *Streptomyces* türleri tarafından üretildiği bilinmektedir. Antibiyotik üretenler kendi antibiyotiğine karşı dirençli olmakla beraber, diğeri *Streptomyces*'lerin ürettiği antibiyotiğe karşı dirençsiz olabilmektedir. İnsanların hastalıklarının tedavisinde ve veteriner hekimler tarafından kullanım alanı bulan 60'dan fazla tanımlı *Streptomyces* antibiyotiği bulunmaktadır (Madigan vd., 2013). Üretilen antibiyotiklerin çoğunlukla logaritmik (eksponansiyel) büyüme fazının sonuna doğru üretilen ikincil metabolit maddeler olduğu belirtilmektedir. *Streptomyces*, antibakteriyel ve antifungal maddeler dışında daunorubisin, mitomisin C, aktinomisin gibi anti-tümörük

maddeler de üretebilmektedir. *Streptomyces* cinslerinin ürettiği bazı maddelerin kanser hücre hatlarında apoptosis oluşumuna neden oldukları bildirilmiştir (Sharma vd., 2014).

Streptomyces cinsi mikroorganizmaların izolasyonunda gliserol veya nişasta içeren karbon kaynağı; arjinin, kazein veya nitrat içeren nitrojen kaynağı en iyi izolasyon sonucunu vermektedir. *Streptomyces* cinsi mikroorganizmaların tanımlanması spor büyüklüğüne, morfolojisine, pigmentasyonuna, dizisine, antibiyotik direncine, fizyolojik ve biyokimyasal karakteristiğine göre yapılmaktadır (Siddique vd., 2014).

***Streptomyces* Metabolizması**

Streptomisetler, toprak kökenli saprofitik (çürükçül) mikroorganizmalardır. Bu tür yaşam döngülerinde ortamda bulunan çözünür olmayan polimerler sindirilerek monomer ve oligomerlere dönüştürülmekte ve biyokütle miktarının artırılmasında kullanılmaktadır. Birincil metabolizma adı verilen bu katabolik ve anabolik reaksiyonlar, protein, nükleik asit, lipit ve polisakkaritlerin yapı taşlarının sentezlenmesinde rol almaktadır. Yani tirozin amino asidi gibi ikincil metabolitlerin öncül maddelerinin oluşumu bu aşamada sağlanmaktadır (Hodgson, 2000).

Toprakta bulunan besinler bitkisel kaynaklı olacağı için karbon açısından zengin, azot ve fosfor açısından ise fakir olmaktadır. Bu durumda amino asitlerin ortamda mevcut olmadığı durumlar için sentezlenmelerini *Streptomyces* cinsi mikroorganizmaların kendilerinin sağlaması gerekmekte olup amino asitlerin sentezi için geliştirilen yollar bulunmaktadır (Hodgson, 2000). Aralarında melanin sentezinde öncül madde olan tirozinin de bulunduğu aromatik yapıdaki amino asitlerin bakteriler tarafından biyosentezi, şikimat yolağı adı verilen metabolik süreç ile gerçekleşmektedir. Bu süreçte fosfoenolpruvat (PEP) ve eritroz 4-fosfat (E4P), önce şikimat, ardından ise aromatik amino asitlerin biyosentezinin dallanma noktası olan korismat metabolitine dönüştürülmektedir (Shende vd., 2024). Şikimat yolağında, korismat mutaz enziminin aktivitesi, korismat metabolitinden aromatik amino asitler olan tirozin veya fenilalanin sentezinin gerçekleştirilmesini sağlamaktadır (Knaggs, 2003).

İkincil metabolitlerin sentezi ise, hücre içerisindeki besin durumuna bağlıdır. Yaşamın devamlılığı için gerekli olan O, C, N, P, S ve diğer besinlerin erişilebilirliğinde gerçekleşecek büyük değişiklikler ve sıcaklık, pH, oksijenlenme gibi çevresel faktörler *Streptomyces* türü aktinomisetlerin ikincil metabolizma faaliyetlerine geçişinde etkili olmaktadır (Krysenko ve Wohlleben, 2024). Bakterilerin gelişiminin tamamen durması ve hatta gelişim oranında azalmanın meydana gelmesi bile ikincil metabolizmanın

tetiklenmesini sağlayan önemli bir sinyal görevi görmektedir (Bibb, 2005). Özellikle inorganik fosfatın hücre içerisindeki birincil ve ikincil metabolizma reaksiyonlarını etkilediği bilinmektedir. Fosfatın sınırlanması, farklı *Streptomyces* türlerinde yüzlerce ikincil metabolitin biyosentezini tetiklemektedir (Martín vd., 2011).

2.2. Pigmentler

Pigmentler doğal, sentetik ve inorganik olarak üçe ayrılmaktadır. Kimyasal yollarla sentezlenen sentetik ve inorganik pigmentlerin maliyeti oldukça düşüktür fakat bu pigmentlerin kanserojenik, mutajenik, toksik ve alerjik etkileri bulunmaktadır. Ayrıca endüstride bu işlemler sırasında oluşan atık sular; sentetik pigmentler, yardımcı maddeler ve kimyasallar içermektedir (Samuchiwal vd., 2021). Bu endüstriyel işlemler yeraltı su kaynaklarının ve toprağın kirlenmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla bitki, hayvan ve insanların bağımlı olduğu ekosisteme zarar vermektedir (Chieza ve Ward, 2015). Arıtma prosesleri genellikle sentetik pigmentleri ve ayrımı zor kimyasalları giderememektedir. Ayrıca ters ozmoz sistemi ile çalışan filtreleri kısa sürede tıkamaktadır (Samuchiwal vd., 2021).

21. yüzyılda insanlığın yaşadığı en önemli sorunlarından biri küresel nitelikli, etkileri gelecek kuşaklara da yansıyacak olan ekolojik sorunlardır. Dünyanın sınırlı olan kaynaklarının giderek azalması nedeniyle, çevrenin korunması ve geliştirilmesine yönelik bilimsel çalışmalar son yıllarda büyük önem kazanmıştır (Seesuriyachana vd., 2007).

İnsan sağlığı ve çevre üzerinde zararlı etkilerinin belirlenmesi ile sentetik ve inorganik pigment kullanımı giderek azalmakta ve son yıllarda endüstriyel üretim süreçlerinde yerini alternatif olan doğal pigmentlere bırakmaktadır (Shahid vd., 2013). Doğal pigmentlerin çevre dostu olması ve biyo-çözünürlüklerinin yüksek olması sebebiyle tercih edilmektedir (Dağ, 2017).

Doğal pigmentler bitki, hayvan, böcek ya da mikrobiyal kaynaklardan elde edilebilmektedir. Hayvansal kaynaklardan pigment eldesi yüksek maliyetli ve zordur. Bitkisel kaynaklardan pigment eldesi kolay ve ucuzdur ancak iklim koşullarının değışmesi, her mevsim üretime uygun olmaması gibi dezavantajlara sahiptir. Böcek kaynaklı pigment eldesinin maliyeti düşüktür fakat renk çeşitliliği azdır. Böceklere alerjisi olanlar için çalışma koşulları uygun değildir (Samuchiwal vd., 2021).

Mikrobiyal pigmentler, hiçbir mevsimsel üretim sorunu göstermediğinden ve yüksek verimlilik sağlamaları nedeniyle bitki veya hayvanlardan elde edilen pigmentlere göre daha kolay elde edilebilmektedir (Ata, 2013). Mikroorganizmalardan elde edilen

pigmentler bitkilerden elde edilen pigmentlere göre daha elverişli, daha stabil ve pigment üretim süreci açısından daha avantajlıdır. Mikroorganizmalar tarafından üretilen pigmentler sarı-turuncu renkten pembe-kırmızı renge kadar çeşitlilik göstermektedir (Aruldass vd., 2018).

Bu yüzden günümüzde mikrobiyal kaynaklara olan ilgi giderek artmaktadır ve son 15 yılda mikrobiyal kaynaklı pigmentlere yönelik yapılan çalışmaların arttığı literatürde mevcuttur. Aynı zamanda mikrobiyal kaynaklı pigmentlerin anti-mikrobiyal, anti-oksidan, anti-tümoral, anti-lipit, anti-inflamasyon ve anti-alerjik etkileri vardır (Baran Ekinci vd., 2021; Aruldass vd., 2018). Aşağıda Çizelge 2.1’de mikroorganizmalar tarafından üretilen bazı pigmentlerin kullanım alanları yer almaktadır.

Çizelge 2.1. Mikroorganizmalar tarafından üretilen pigmentlerin uygulama alanları

Pigmenti Üreten Mikroorganizma Adı	Pigment	Pigmentin Verdiği Renk	Kullanım Alanları	Kaynak
Bakteriler				
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Viyolasin	Mor	Anti-kanser	De Carvalho vd., 2006
<i>Janthinobacterium lividum</i>	Viyolasin Deoksiviyolasin	Mavi-mor	Anti-bakteriyel Anti-fungal	Shirata vd., 2000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piyosiyanin	Yeşil-mavi	Anti-bakteriyel Anti-fungal Anti-oksidan Anti-kanser	Abdelaziz vd., 2023
<i>Pontibacter korlensis</i>	Astaksantin	Turuncu	Anti-bakteriyel Anti-oksidan Anti-kanser	Pachaiyappan vd., 2020
<i>Xanthomonas oryzae</i>	Ksantomonadin	Sarı	Anti-oksidan	Rajagopal vd., 1997
Mantarlar				
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Karotenoid	Kırmızı, Sarı	Anti-kanser Anti-enflamatuvar	Rostami vd., 2016
<i>Blakeslea trispora</i>	β -karoten	Turuncu-Kırmızı	Anti-oksidan Anti-diyabet	Martínez-Cámara vd., 2021
<i>Penicillium mallochii</i>	-	Turuncu-kırmızı	Anti-kanser	Bouhri vd., 2019

Çizelge 2.1. Mikroorganizmalar tarafından üretilen pigmentlerin uygulama alanları
(Devam)

Pigmenti Üreten Mikroorganizma Adı	Pigment	Pigmentin Verdiği Renk	Kullanım Alanları	Kaynak
Aktinomisetler				
<i>Micrococcus roseus</i> <i>Micrococcus luteus</i>	Karotenoid	Kırmızı, Sarı	Anti-oksidan Anti-bakteriyel	Mohana vd., 2013
<i>Rhodococcus kroppenstedtii</i>	Karotenoid	Kırmızı	Anti-oksidan Anti-bakteriyel	Madhukar, 2021
<i>Streptomyces murinis</i>	Aclacinomycin A	Sarı	Anti-kanser Anti-oksidan	Sarmiento-Tovar vd., 2024
<i>Streptomyces noursei</i>	Tubermycin	Sarı	Anti-kanser Anti-bakteriyel	Sarmiento-Tovar vd., 2024
<i>Gordonia terrae</i>	-	Turuncu	Anti-bakteriyel Anti-fungal Anti-kanser	Sholekha vd., 2024
<i>Streptoverticillium rubireticuli</i> <i>Streptomyces longisporus</i>	Prodigiosin	Kırmızı	Anti-bakteriyel Anti-sıtma Anti-kanser Anti-diyabet	Khanafari vd., 2006 Malik vd., 2012 Kim vd., 2003
<i>Streptomyces sp.</i>	Undecyl-prodigiosin	Koyu kırmızı	Anti-bakteriyel Anti-oksidan UV radyasyonuna karşı koruma	Stankovic vd., 2012
<i>Brevibacterium sp.</i>	-	Sarı	Anti-bakteriyel Anti-enflamatuvar	Srilekha vd., 2017
<i>Streptomyces iakyrus</i>	Phenazinomycin	Mavi	Anti-kanser	Qin vd., 2014

Günümüzde sentetik pigmentler kâğıt, gıda, tekstil, farmasötik, deri, ahşap gibi birçok sektörde kullanılmaktadır. Sentetik ve inorganik yapıdaki pigmentlerin zararlı etkileri sebebiyle doğal pigment üretimi yeniden gündeme gelmiştir (Baran Ekinci vd., 2021; Gürcüm ve Öneş, 2018). Doğal pigment kaynakları arasında mikrobiyal pigmentler üzerinde en çok durulan konulardan biridir. Bitkiler ve hayvanlar gibi diğer kaynaklara kıyasla daha kolay yetiştirmeleri, mevsimsel değişimlerden etkilenmemeleri ve verimi arttırmaya yönelik ayarlamaların kolayca yapılabilmesi, pek çok sayıda stabil ve güvenli

pigment üretimi mikrobiyal pigmentleri oldukça cazip bir hale getirmektedir (Grewal vd., 2022). Aşırı mikrobiyal pigment üretiminin biyoçeşitliliğe veya çevreye zarar verme ihtimali oldukça düşüktür (Rana vd., 2021).

Endüstride mikroorganizmalar, pigment ve farklı moleküllerin üretilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Mikroorganizmalardan elde edilen pigmentler diğer bileşiklerle kıyaslandığında endüstride ana gelir kaynağını temsil etmektedir (Ding ve Xu, 2014). Mikrobiyal fermentasyon ile üretilen pigmentlerin endüstriyel olarak üretimi daha ucuza gerçekleştirmek mümkündür. Mikroorganizmalardan ekstraksiyon kolaylıkla yapılabilmektedir (Kulkarni vd., 2017; Venil vd., 2013). Uygun seçim, kültürel parametrelerin optimizasyonu, mutasyon ve genetik mühendisliği teknikleriyle suş iyileştirmesi yapılarak pigment üretim verimi önemli ölçüde geliştirilebilecektir (Shahid vd., 2013).

Geniş kullanım alanına sahip olan mikrobiyal pigmentler, renklendirici özellikleri ile endüstriyel açıdan oldukça önemlidir (Dağ, 2017). Gıda endüstrisinde tüketicilerin beğenisini kazanmada gıdanın besleyici ve sağlıklı olması kadar gıdanın çekici renklerde olması da önem taşımaktadır. Bu nedenle gıda endüstrisinde doğal ve güvenli gıda renklendiricilerine her zaman ihtiyaç duyulmaktadır (Grewal vd., 2022).

Gıda endüstrisinde *Phaffia rhodozyma*'tan (*Xanthophyllomyces dendrochous*) ve *Agrobacterium aurantiacum*'dan astaksantin (kırmızı) üretimi, *Bradyrhizobium sp.*'den ve *Halobacterium*'dan kantaksantin (kırmızı-turuncu) üretimi, *Flavobacterium*'dan zeaksantin (sarı) üretimi yapılmaktadır. Bu pigmentler gıda boyalarında ve hayvan yemlerinde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Dufossé, 2006).

Aktinomisetler tarafından üretildiği bilinen prodigiosin, karotenoidler, viyolesin, flavinler, melaninler ve kinonların antimikrobiyal, antikanser, antioksidant, antiviral ve başka pek çok biyoaktif özelliğe sahip olduğu bilinmektedir (Grewal vd., 2022; Singh Parmar ve Singh, 2018). Prodigiosin pigmentinin pamuk ve ipek kumaşları oldukça etkin bir şekilde boyayabildiği ve pigmentle boyanan tekstil iplerinde antimikrobiyal etkinin gözlemlendiği bildirilmiştir (Venil, 2021). Gıda ve tekstil alanında birçok kullanım alanı bulunmakla beraber, mikrobiyal kaynaklı pigmentlerin mumların, sabunların ve forforlu kalem gibi çeşitli eşyaların boyanmasında da kullanılabileceği düşünülmektedir (Lopes ve Ligabue-Braun, 2021).

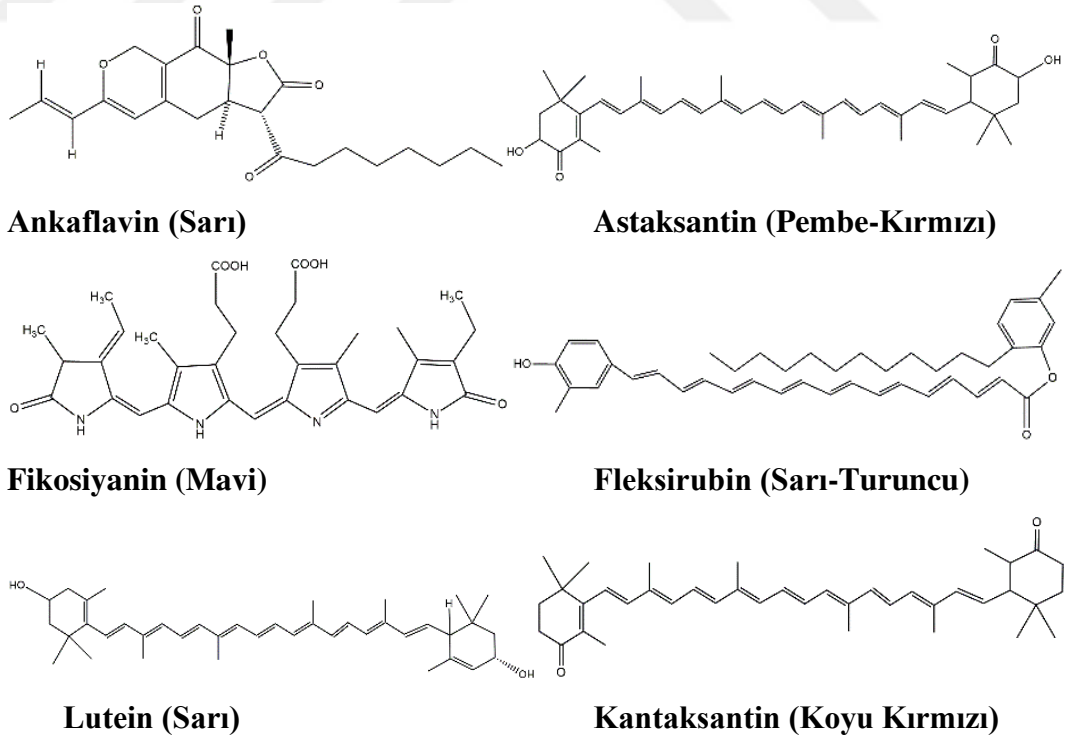
Global Paint and Coatings Industry Market Analysis tarafından hazırlanan rapora göre 2023 yılında küresel pigment pazarı değer olarak 206,56 milyar dolar büyüklüğe ulaşmıştır. Küresel pigment pazarı 2024 yılında 217,36 milyar dolara ulaşarak bir önceki

yıla göre %5,23'lük bir artış görülmüştür. Bu pazarın 2032 yılına kadar 303,97 milyar dolara çıkması beklenmektedir. Pigment üretiminde Asya Pasifik, 2023 yılında %46,39'luk bir pazar payıyla en büyük üretime ev sahipliği yapmıştır (URL-3).

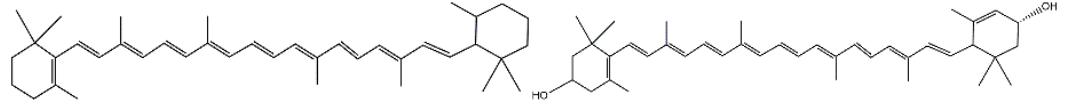
2.2.1. Mikrobiyal Pigmentlerin Yapısı

Doğal pigmentler kimyasal olarak sentezlenmiş muadillerine göre kimyasal saldırılara karşı daha hassastır, bu nedenle işlenme ve depolanma sırasında özelliklerini kolayca yitirebilmektedir. Bu durum bir dezavantaj gibi görünse de tüketildiklerinde vücutta kolayca parçalanmaları ve bünyeye zarar vermemeleri açısından istenilen bir nitelik olarak da değerlendirilmektedir. Pek çok doğal pigment kolayca oksitlenebilmekte (karotenoidler gibi), hidrolize olabilmekte (fikobilin gibi) veya suda çözünür özellikte olduğu için (riboflavin gibi) vücuttan atılabilmektedir. Astaksantin gibi bazı pigmentler sağlık üzerine faydaları ile ön plana çıkarken β -karoten gibi provitamin A aktivitesine sahip olanları ise insan beslenmesinde elzem bir rol oynamaktadır (De Carvalho vd., 2014).

Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen farklı renklerde birçok pigment mevcuttur. Bu pigmentlerin bazıları aşağıda Şekil 2.1'de verilmiştir.

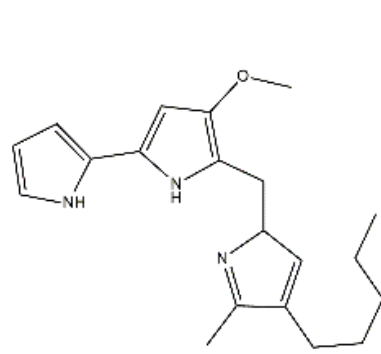


Şekil 2.1. Mikroorganizmalar tarafından üretilen bazı pigmentlerin yapısı

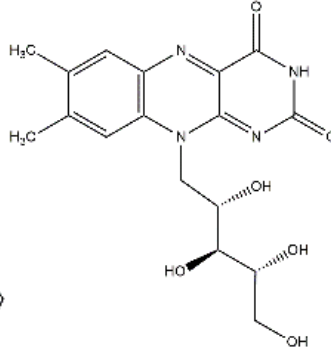


β -Karoten (Sarı-Turuncu)

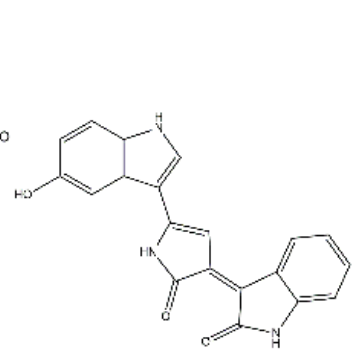
Zeaksantin (Sarı)



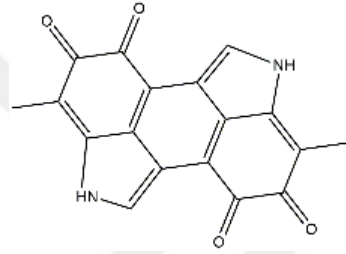
Prodigosin (Kırmızı)



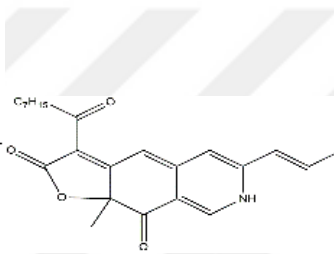
Riboflavin (Sarı)



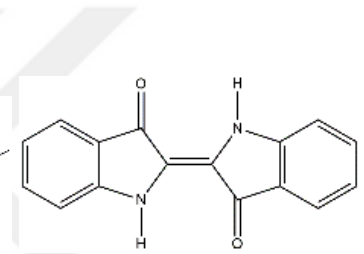
Viyolesin (Mor)



Melanin (Kahverengi-Siyah)



Monaskorubramin (Kırmızı)



İndigoidin (Mavi)

Şekil 2.1. Mikroorganizmalar tarafından üretilen bazı pigmentlerin yapısı (Devam)

Antosiyaninler

Antosiyanin, Yunanca *anto* (çiçek) ve *kyonas* (mavi) kelimelerinin birleşmesi ile oluşmuştur. Kimyasal olarak iki yapıdan meydana gelmektedir. Bu yapılardan biri şeker diğeri ise aglikon (antosiyanidin)'dur. En çok araştırma yapılmış flavonoid grubudur. Antosiyaninlerin aglikon formuna antosiyanidin adı verilmektedir (Zeece, 2020). Antosiyaninler pembe, kırmızı, viyole, mavi ve mor tonlarındaki çeşitli renkleri veren su içinde çözünabilir nitelikteki doğal pigmentlerdir. Antosiyaninler pH, sıcaklık ve oksijene karşı duyarlıdır. Çoğunlukla bitkilerden ve mikroorganizmalardan elde edilmektedir (Gökalp vd., 2002). Doğada yaygın olarak bulunan altı tip antosiyanidin (siyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, petunidin ve peonidin) vardır. *Streptomyces coelicolor* antosiyanin benzeri klmp33 isimli pigment üretmektedir (Saigusa vd., 2014).

Karotenoidler

Karotenoidler, yağda çözünebilir renk maddeleridir. Genel formülü $C_{40}H_{56}$ olup yapılarında çok sayıda çift bağ bulunmaktadır. Karotenoidler genel olarak karotenler,

ksantofiller, karotenoid ketonlar ve karotenoid asitler olarak dört ana grupta toplanmaktadır (Baran Ekinci vd., 2021). Karotenoidler, yapılarını oluşturan karbon sayılarına göre C30, C40, C45 ve C50 sınıflandırmasına göre farklılık gösterebilmektedir. C40 karotenoidleri doğada en çok bulunan ve en fazla çalışılan karotenoid grubunu oluşturmaktadır (Fernandes vd., 2018). Karotenoidler 400-500 nm dalga boyu aralığında soğurma yapabilmekte olup yoğun sarı, turuncu veya kırmızı renkleri oluşturmaktadır (Kirti vd., 2014).

Renkleri karotenoidlerden gelen gıdalara havuç, kara lahana, kabak, ıspanak, balkabağı, tatlı patates, domates ve karpuz örnek verilebilmektedir. Ayrıca, somon, ıstakoz ve karides gibi deniz canlıları, alglerle beslenen organizmaları tüketmeleri sonucu vücutlarında biriken karotenoidlerin rengini taşımaktadır. Yeşil bitkiler de yüksek miktarlarda karotenoid içermektedir fakat klorofilin yeşil rengi sebebiyle baskılanmaktadır (Zeece, 2020). Aktinomisetler pigment oluşumlarında yapısal olarak karotenoidlerin farklı türlerini üretebilmektedir. *Rhodococcus* cinsine ait türler hem aromatik hem de keto karotenoidleri oluşturan mekanizmaya sahip olan tek aktinomiset grubudur (Misawa, 2021). Karotenoidler *Serratia* ve *Streptomyces*'in bazı türleri tarafından üretilmekte ve gıdalarda renklendirici olarak kullanılmaktadır (Dağ, 2017).

Ksantofiller

Ksantofiller, doğal olarak bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilen hidrokarbon yapısında olan karotenoidlerin oksijenize olmuş türevleridir (Bhosale ve Bernstein, 2005). Yapılarında epoksi (violaksantin ve neoksantin), hidroksi (lutein ve zeaksantin), keto (astaksantin ve kantaksantin) ve metoksi fonksiyonel grupları içermektedir (Fernandes vd., 2018).

Genellikle DNA'sında yüksek GC içeriğine sahip olan Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilmektedir. Bu tür karotenojenik bakteriler olan aktinomisetlere *Micrococcus*, *Nocardia*, *Corynebacteria* ve *Mycobacteria* örnek verilebilmektedir (Johnson ve Schroeder, 1996). Astaksantin ($C_{40}H_{52}O_4$), lutein ($C_{40}H_{56}O_2$), zeaksantin ($C_{40}H_{56}O_2$) ve kantaksantin ($C_{40}H_{52}O_2$) öne çıkan ksantofiller arasındadır (Bhosale ve Bernstein, 2005).

Kinonlar

Kinonlar, sarı ve kırmızı renklerde olan aromatik halka yapısına sahip pigmentlerdir. Polisiklik, aromatik monosiklik bileşikten türeyen doymamış bir siklik

ketondan meydana gelen kinonlar yapılarına göre benzokinonlar, antrokinonlar ve naptokinonlar olmak üzere 3 sınıfa ayrılmaktadır. Biyolojik olarak önemli faaliyetlerde bulunan kinonlar özellikle *Streptomyces sp.* türleri tarafından üretilmekte olup antiviral, anti-enfektif, antimikrobiyal, antikanser aktiviteleri olduğu bildirilmiştir (Stafsnes ve Bruheim, 2013; Baran Ekinci vd., 2021).

Azofilononlar

Azofilononlar doğal pigmentler olarak tercih edilmekte olup renklendirici ve katkı maddeleri olarak gıda sektöründe geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Şimdiye kadar 100'den fazlası tanımlanmış olup temsili olarak sarı renkli (sitrinin, monaskin ve ankaflavin), turuncu renkli (rubropunktatin ve monaskorubrin) ve kırmızı renkli (rubropunktatin ve monaskorubramin) pigmentlerden meydana gelmektedir (Huang vd. 2023). *Monascus* pigmentleri, yapıları karmaşık olan azafilon iskeletine sahip pigmentleri üretebilmeleri sebebiyle azofilononlar *Monascus* pigmentleri olarak da anılmaktadır (Chen vd., 2017). Kırmızı pirinç mayası olarak da bilinen *Monascus purpureus*, *Monascus* fermentasyonu ile hazırlanan geleneksel bir Çin yemeği olan kırmızı maya pirincinin üretiminde kullanılmaktadır (Lin vd., 2023).

Fenazinler

Fenazinler, azot içeren heterosiklik bileşiklerin büyük bir kısmını oluşturan kristal yapıda trisiklik maddelerdir. Sarı ve turuncu arasında farklı renkleri vardır. Fenazin sentezi sadece bakteriler tarafından yapılmakta olup günümüzde *Pseudomonas* ve *Streptomyces* türleri tarafından üretildiği bilinen yüzden fazla doğal ve biyolojik olarak aktif fenazin bulunmaktadır (Stafsnes ve Bruheim, 2013).

İndigoidin

İndigoidin ($C_{10}H_8N_4O_4$), *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239 ve *Escherichia coli* tarafından üretilen piridon sınıfına ait ekstraselüler mavi renkli bir pigmenttir. Antioksidan ve antimikrobiyal aktivite gösterebildiği gibi oldukça stabil olduğu ve derin bir mavi renk verebildiği için çevre dostu endüstriyel bir boya olarak da kullanım alanı bulmuştur (Sarmiento-Tovar vd., 2022; Yumusak vd., 2019).

Riboflavin

Riboflavin ($C_{17}H_{20}N_4O_6$), aynı zamanda B₂ vitamini olarak da bilinen suda çözünen sarı renkli bir pigmenttir. Gıda takviyesi olarak ve süt ürünleri, soslar, bebek mamaları, meyveler ve enerji içeceklerinde gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. *Candida guilliermondii*, *Bacillus subtilis*, *Debaryomyces subglobosus*, *Eremothecium ashbyii*, *Ashbya gossypi*, *Clostridium acetobutylicum* gibi mikroorganizmalar tarafından üretildikleri bildirilmiştir (Rana vd., 2021).

Aktinorodin

S. coelicolor tarafından üretilen mavi renkli bir pigment olan aktinorodin ($C_{32}H_{26}O_{14}$), ismi en iyi bilinen ve üzerine en çok çalışma bulunan aromatik poliketid olup tüm aromatik poliketidlerin biyosentezinde kullanılan bir model haline gelmiştir. PKS genleri üzerine yapılan genetik çalışmalar neticesinde antibiyotik etkisi olan birçok yapay poliketid maddesinin sentezi için yeni bir yol inşa edilmesinde rol oynamıştır (Rohr ve Hertweck, 2010).

Prodigiosin

Rugamonas rubra, *Actinomycetes*, *Serratia marcescens*, *Vibrio psychoerythrus*, *Streptovorticillium rubroreticuli* ve eubakteriler gibi çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen kırmızı renkli pigmenttir. Bu pigmentler antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (Dağ, 2017).

Fleksirubin

Fleksirubin ($C_{43}H_{54}O_4$), *Flexibacter*, *Flavobacterium*, *Chryseobacterium* ve *Cytophaga* cinsi bakteriler tarafından üretilen sarı-turuncu renkli bir pigment grubudur. İlk fleksirubinler, *Flexibacter elegans* suşundan elde edilmiştir (Reichenbach vd., 1980). Kaba fleksirubin tipi pigmentler sarı renkli olmakla birlikte potasyum hidroksit gibi alkali çözeltilerle muameleye uğradığında kırmızı, mor ve kahverengi gibi farklı renklere dönüşebilmektedir ve bu özellikleri sebebiyle karotenoidlerden ayrılmaktadır (Aruldass vd., 2018).

Fikosiyanin

Fikosiyanin, *Spirulina* alginin başlıca pigmentlerinden biri olup yüksek protein içeriği nedeniyle gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır. Yapısı bir protein ve

fikosiyanobilin adı verilen protein dışı bir maddeden meydana gelen fikobiliprotein ailesine ait mavi renkli bir proteindir. Suda çözünmektedir. Parlak renkleri vardır ve floresan özellikleri bulunmaktadır. Geniş bir spektrumda (610-655 nm) görünür ışığı absorbe edebilmektedir (Fernández-Rojas vd., 2014; URL-4).

Saf fikosiyanın gıdaya mavi rengini veren nadir doğal bileşiklerden birisidir. Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından 2013 yılında sertifikasyondan muaf olarak onaylanmıştır (Zeece, 2020). Japonya ve Çin’de süt ürünleri, jeller, sakızlar, şekerler, içecekler ve kozmetik ürünlerinin renklendirilmesinde kullanılmaktadır. Işık ve sıcaklığa karşı hassas olmakla birlikte indigo ve gardenya gibi renklendiricilere göre daha ideal bir mavi renklendiricidir (Tripathi vd., 2020).

Viyolasin

Viyolasin ($C_{20}H_{13}N_3O_3$), birçok biyolojik aktiviteye sahip olan çok yönlü mor renkli bir pigmenttir. *Chromobacterium violaceum*, *Pseudoalteromonas*, *Collimonas*, *Janthinobacterium*, *Microbulbifer* gibi farklı bakteriler tarafından üretilmektedir. Kozmetik, gıda, ilaç ve tekstil alanında kullanılmaktadır. Antibakteriyel, antikanser, antiviral, enzim modüle etme, ülser ve leishmaniasis (şark çıbanı) hastalığı karşıtı özellikleri olduğu bildirilmiştir (Rana vd., 2021; Periz vd., 2020).

2.2.2. Melaninler

Melanin ismi Antik Yunancada “koyu” anlamına gelen *melanos* kelimesinden gelmekte olup ilk defa İsveçli kimyager olan Berzelius tarafından 1840 yılında göz membranlarından ekstrakte edilen koyu pigmentleri tanımlamak için kullanıldığı düşünülmektedir (Solano, 2014).

Melanin ($C_{18}H_{10}N_2O_4$), mikroorganizmaların fermentatif oksidasyonu sonucu meydana gelen polimerlerdir (Al-Hulu, 2013). Çok sayıda çapraz bağlı indol ve/veya benzotiyazin türevi tarafından oluşturulan fenolik maddeler veya kinon bazlı maddelerin polimeridir (Futahashi ve Osanai-Futahashi, 2021). Genellikle negatif yüklü olup hidrofobik özellik göstermektedir. Organik veya sulu çözeltilerde çözünmemektedir. Konsantre asitlere karşı dayanıklı ve okside edici ajanlara karşı duyarlıdır (Vasanthabharathi ve Jayalakshmi, 2020). Genellikle protein ve karbonhidratlarla kompleks oluşturmaktadır. Siyah, kahverengi, kırmızı kahverengi ya da kiremit kahverengi renkleri veren makromoleküllerdir. Melaninler ekstrem sıcaklıklara karşı koruma

sağlamaktadır. Buna örnek olarak *Streptomyces galvus* yalnızca yüksek sıcaklıklarda melanin üretmektedir (Tang vd., 2025; Baran Ekinci vd., 2021).

Melanin bitki ve hayvan dokularından ekstrakte edilebildiği gibi kimyasal sentez yoluyla da elde edilebilmektedir. Ancak bu işlemler doğa dostu veya ekonomik olmadığı için melanin üretiminde mikrobiyal kaynaklar tercih edilmektedir. Mikrobiyal yöntemle istenilen miktarda ve yüksek verimle üretim sağlanabilmektedir (Vasanthabharathi ve Jayalakshmi, 2020).

Melanin, *Colletotrichum lagenarium*, *Aspergillus fumigates*, *Vibrio cholerae*, *Shewanella colwelliana*, *Alteromonas nigrifaciens* gibi farklı tür mikroorganizmalar tarafından üretilebildiği gibi aynı zamanda hayvanlarda ve bitkilerde de doğal olarak bulunmaktadır (Rana vd., 2021). Melanin organizmanın büyümesi ve gelişimi için elzem değildir, ancak rekabet edebilme ve yaşamını sürdürebilme konularında önemli rol oynamaktadır (Vasanthabharathi ve Jayalakshmi, 2020). Melanin hücre duvarlarına yapısal sağlamlık vermekte, su ve iyon depolamaya yardımcı olmaktadır (Al-Hulu, 2013).

Melanin pigmentinin antioksidan, antimikrobiyal, antitümör, antiviral, karaciğer koruyucu ve ışığa karşı koruyucu gibi geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Canlıları ekstrem sıcaklıklara ve UV ışınlarına karşı korumaktadır (Vasanthabharathi ve Jayalakshmi, 2020). Güneş gözlükleri, kozmetik kremler, ilaçlar ve gıdalarda kullanılmaktadır (Rana vd., 2021).

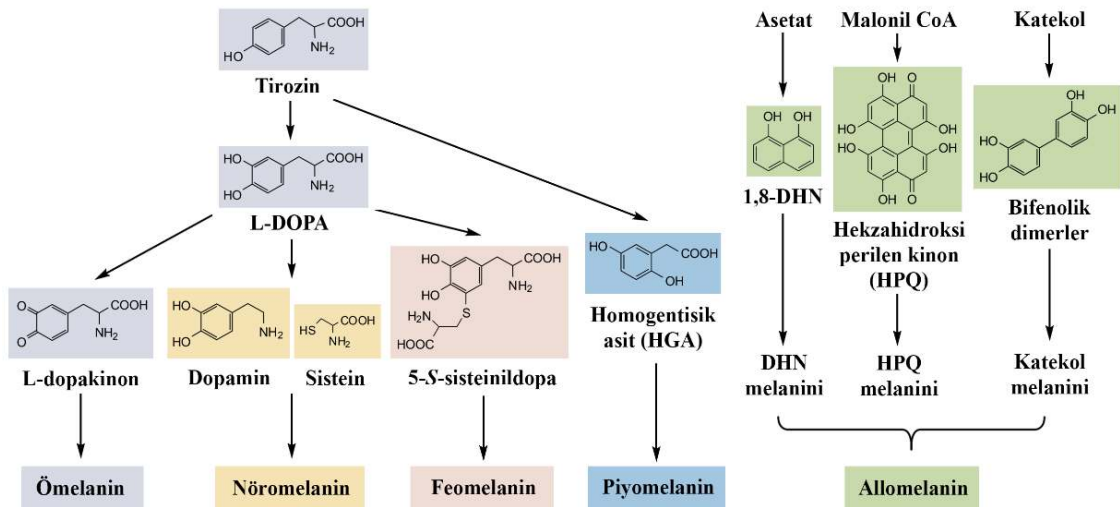
Çeşitli *Streptomyces* türleri tarafından melanin üretilebilmekte olup *S. antibioticus* ve *S. glaucescens* türlerinde melanin pigment üretimi oldukça iyi tanımlanmıştır (Vasanthabharathi ve Jayalakshmi, 2020). *S. cavourensis* RD8 suşunun ürettiği melanin pigmentinin yüksek oranda antioksidan ve antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Dholakiya vd., 2017a). Deniz kaynaklı iki melanojenik aktinomiset olan *Nocardiopsis dassonvillei* ve *Nocardiopsis sp.* bakterilerinin izole edildiği bir çalışmada bu aktinomisetlerin ürettikleri pigmentlerin *Staphylococcus* türlerinin biyofilm oluşumunu engellediği, *Listeria monocytogenes* ve *Bacillus* türlerine karşı antibakteriyel aktivitede bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca indikatör organizma olan *Chromobacterium violaceum* MTCC 2656'ya karşı yüksek oranda çoğalmayı engelleyici etki gösterdiği görülmüştür (Kamarudheen vd., 2019). *S. virginiae* tarafından üretilen koyu kahverengi melanin pigmenti, yün kumaşların boyanmasında kullanılmıştır (Amal vd., 2011).

Melanin pigmentleri, kimyasal öncül maddelerine göre ömelanin, feomelanin, nöromelanin, piyomelanin ve allomelanin olmak üzere Şekil 2.2'de görülen beş kategoriye ayrılmaktadır (Cao vd., 2021). Allomelanin haricindeki diğer melanin

pigmentlerinin tamamı bir amino asit olan tirozin molekülünün oksidasyonu ve polimerizasyonu sonucu elde edilmektedir. Allomelaninler mantarlar ve bitkiler tarafından fenolik maddeler kullanılarak sentezlenmektedir (Matos-Peralta vd., 2023).

2.2.2.1. Melanin Türleri

Melaninler, farklı kaynaklardan farklı biyokimyasal yollar aracılığıyla sentezlenmektedir. Bu nedenle amorf yapıda, farklı bileşenlerden oluşan, suda çözünmeyen ve kristalize olmaya karşı dirençli yapı gösteren pek çok melanin türü bulunmaktadır (Banerjee vd., 2014). Oldukça yaygın bir pigment olan melanin, genel olarak pigmenti oluşturan moleküler öncül maddelere göre sınıflandırılmaktadır. Bakteriler, bitkiler, hayvanlar ve mantarlarda farklı melanin türleri bulunmaktadır. Hayvanlarda bulunan siyah renkli ömelaninler ve kırmızımsı-kahverengi feomelaninler L-tirozinden sentezlenmekteyken mantarlarda ve diğer mikroorganizmalarda bulunan melaninler 3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), γ -glutaminil-3,4-dihidroksibenzen (GDHB) veya kateşol ve 1,8-dihidroksinaftalin (DHN) maddelerinden L-tirozin üzerinden türetilmektedir (Varga vd., 2016).



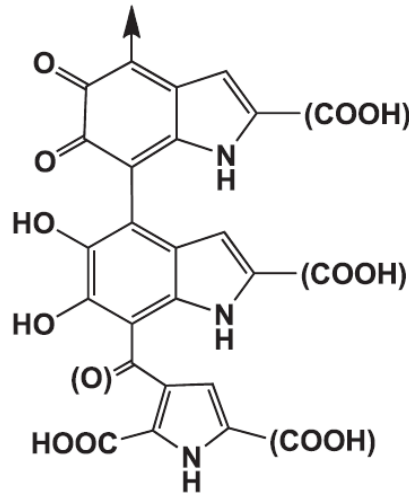
Şekil 2.2. Ömelanin, nöromelanin, feomelanin, piyomelanin ve allomelaninin sentezlendiği monomer yapıları

Ömelanin

Ömelaninler, tirozin ve/veya fenilalaninlerin oksidasyonu sonucu oluşmaktadır (Plonka ve Grabacka, 2006). En çok araştırılan melanin türü olup “eu” kelimesi Yunancada “iyi” anlamına gelmektedir (Cao vd., 2021). Ömelanin, yapısında kinin ve

serbest radikalleri bulundurmaktadır (Al-Hulu, 2013). Siyah-kahverengi renklerinde bir melanin türü olup genellikle 5,6-dihidroksiindol (DHI) ve 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asit (DHICA) oligomerlerinden meydana gelmektedir (Hong ve Simon, 2007). Yapısında karboksi grubu içeren ömelanin kahverengi iken içermeyen ömelanin ise siyah rengindedir (Nappi ve Ottaviani, 2000). Ömelanin polimerinin temsili yapısı Şekil 2.3'te görülmektedir. Şekilde (-COOH) ile verilen noktalara -H veya -COOH grupları bağlanabileceği gibi daha farklı üniteler de bağlanabilmektedir. Şekilde görülen ok, farklı ünitelerin polimer yapısına bağlanabileceği noktayı göstermektedir (Ito ve Wakamatsu, 2008).

İnsanların ve memelilerin derilerinde ömelanin bulunduğu bilinmektedir (Vasanthabharathi ve Jayalakshmi, 2020). Genel olarak, L-DOPA ve L-dopakinon bazlı melaninler ömelanin olarak değerlendirilmektedir (Ahn vd., 2021). Mürekkep balığı (*Sepia officinalis*) tarafından üretilen mürekkep ve insanların siyah saçları neredeyse tamamen ömelaninden oluşmaktadır (Hill, 1992).



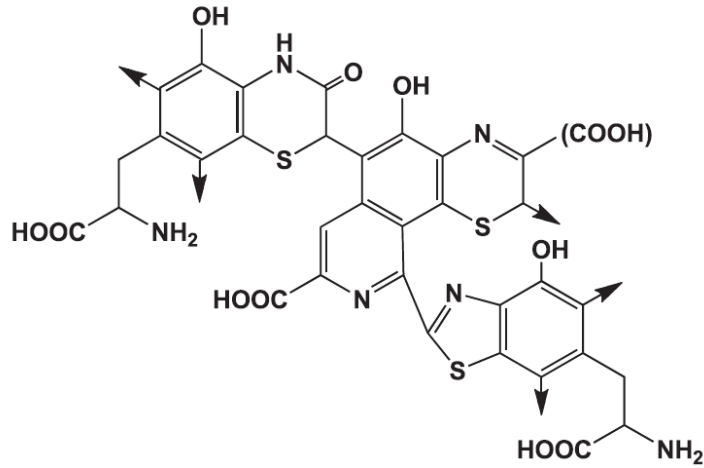
Şekil 2.3. Ömelanin polimerinin temsili yapısı

Ömelaninin yapısında fenolik hidroksi (-OH), karboksi (-COOH) ve amino (NH^+) gruplarının olduğu bilinmektedir (Magarelli vd., 2010). Melaninlerin metal bağlama yeteneklerini yapılarında bu molekülleri barındıran fonksiyonel gruplar belirlemektedir (Hong ve Simon, 2007). Pigment üretimi, Streptomisetler için önemli bir taksonomik kriter olup *S. antibioticus* tarafından ömelanin üretimi yapıldığı bilinmektedir (Plonka ve Grabacka, 2006). *S. glaucescens* isimli aktinomisetin L-DOPA bazlı ömelanin üretebildiği ayrıca bildirilmiştir (El-Naggar ve El-Ewasy, 2017).

Feomelanin

Turuncu-kırmızı renkli bir melanin türü olan feomelanin, tirozin ve sistein amino asitlerinden türemektedir (Al-Hulu, 2013). Başlangıçta ömelanin gibi sentezlenmekle beraber yapılarına sisteinin yerleştiği sisteinleşme reaksiyonuna girmeleri sebebiyle yapılarında kükürt bulunmaktadır (Plonka ve Grabacka, 2006). Feomelaninler benzotiyazin ünitelerinden meydana gelmektedir (Hong ve Simon, 2007). Feomelanin polimerinin temsili yapısı Şekil 2.4'te görülmektedir. Şekilde (-COOH) ile verilen noktalara -H veya -COOH grupları bağlanabileceği gibi daha farklı üniteler de bağlanabilmektedir. Şekilde görülen oklar, farklı ünitelerin polimer yapısına bağlanabileceği noktaları göstermektedir (Ito ve Wakamatsu, 2008).

İnsanların ve memelilerin derilerinde feomelanin bulunduğu bilinmektedir (Vasanthabharathi ve Jayalakshmi, 2020). Feomelanin, çoğunlukla saçta ve tüylerde bulunmakta olup insanlarda kızıl saçlı insanlarla özdeşleştirilen çillerde de bulunduğu düşünülmektedir (Hill, 1992). Ömelaninde olduğu gibi, feomelanin de karbon-karbon bağlarıyla birbirine bağlanan tekrarlı ünitelerden meydana gelmektedir, ancak ömelaninin aksine saf feomelaninin doğadaki örneğinin nadir olması ve toplam melaninin en fazla %25'ini oluşturması sebebiyle yapısı tam olarak anlaşılamamıştır (Cao vd., 2021).

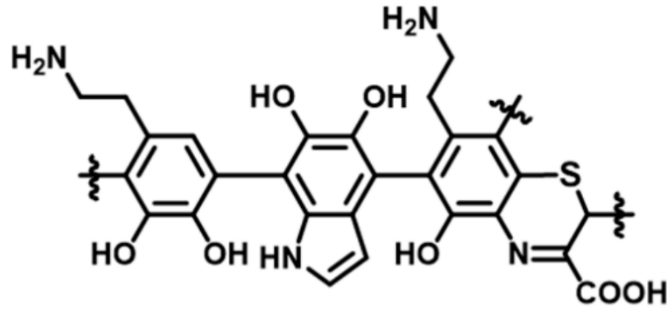


Şekil 2.4. Feomelanin polimerinin temsili yapısı

Nöromelanin

Nöromelanin, ömelanin ve feomelaninden ayrı bir melanin türü olarak değerlendirilmekte olup dihidroksiindol, benzotiyazin ve muhtemel diğer bilinmeyen

gruplardan oluştuğu düşünülmektedir (Hong ve Simon, 2007). Cao ve diğerleri (2021) tarafından öne sürülen nöromelanin yapısı Şekil 2.5’te verilmiştir.



Şekil 2.5. Nöromelanin yapısı

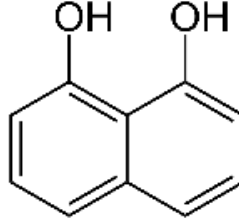
Nöromelanin, ismini deride bulunan melaninlere olan benzerliği ve sinir sistemindeki, özellikle de beyindeki varlığı nedeniyle almıştır. Siyah-kahverengi renklerinde olup beyin *substantia nigra* (SN) bölgesinde bulunmaktadır (Cao vd., 2021). Nöromelaninin görevi tam olarak bilinmemekle birlikte nörotoksik olayların düzenlenmesinde rol aldığı düşünülmektedir. İnsanlarda 3-5 yaşlarında ortaya çıkmaya başlayıp ardından düzenli bir artış göstermektedir. Parkinson hastalığına sahip bireylerde nöromelanin miktarının az olduğu veya hiç olmadığı görülmektedir (Riesz, 2007; Bush, 2006). Beyin içerisinde tirozinaz enzimi bulunmaması nedeniyle nöromelanin sentezinin diğer melaninlerden farklı olarak enzim aktivitesi dahilinde gerçekleşmediği düşünülmektedir (Cao vd., 2021).

Allomelanin

Allomelanin, azotsuz öncül maddelerden sentezlenmektedir (Al-Hulu, 2013). Azot içermeyen melaninler ailesinin bir mensubu olup doğada saf bir bileşik olmaktan ziyade polisakkarit ve proteinlerle kompleks oluşturmuş maddeler olarak bulunmaktadır (McCallum vd., 2021). Allomelaninlerin başlıca temsilcileri 1,8-dihidroksinaftalen monomerlerinden meydana gelen 1,8-DHN-melaninler olup mantarlar tarafından sentezlendikleri bilinmektedir (Pukalski vd., 2025). Allomelanini oluşturan 1,8-DHN monomerinin yapısı Şekil 2.6’da görülmektedir (Lino ve Manini, 2022).

Dihidroksinaftalin, tetrahidroksinaftalin, 4-hidroksifenilasetik asit, γ -glutaminil-4-hidroksibenzen, fotokatekualdehit, kafeik asit ve katekoller, oksidasyonları sonucu allomelaninlerin oluşmasını sağlayan bileşikler arasındadır (Martínez vd., 2023). Kafeik asit ya da piyomelanin gibi kateşol yapısına sahip aromatik monomerlerden oluşmuş

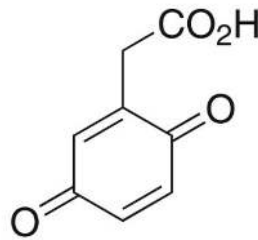
allomelaninlerin olduğu bildirilmiştir. *S. glaucescens* bakterisi kullanılarak tirozinaz oksidasyonu yoluyla kafeik asitten allomelaninin üretilebildiği bildirilmiştir (Ahn vd., 2021).



şekil 2.6. Allomelanini oluşturan 1,8-DHN monomeri

Piyomelanin

Piyomelanin, tirozinin p-hidrofenilpruvat ve homogentisik asit ile katabolizmaya uğraması sonucu meydana gelmektedir (Al-Hulu, 2013). Piyomelaninin mikroorganizmalar tarafından yaşamım devamlılığı amacıyla kullanıldığı düşünölmektedir. Homogentisik asidin hücre dışında benzokinon asetik aside otooksidasyonu sonucu piyomelanin monomerleri oluşmakta ve bu monomerler kendiliğinden piyomelanin polimerlerine dönüşmektedir (Turick vd., 2010). *Streptomyces sp.* MPPS2 suşunun piyomelanin üretebildiği bildirilmiştir (Bayram, 2021). Piyomelanini oluşturan benzokinon asetik asit monomerinin yapısı şekil 2.7’de görölmektedir (Sansinenea ve Ortiz, 2015).

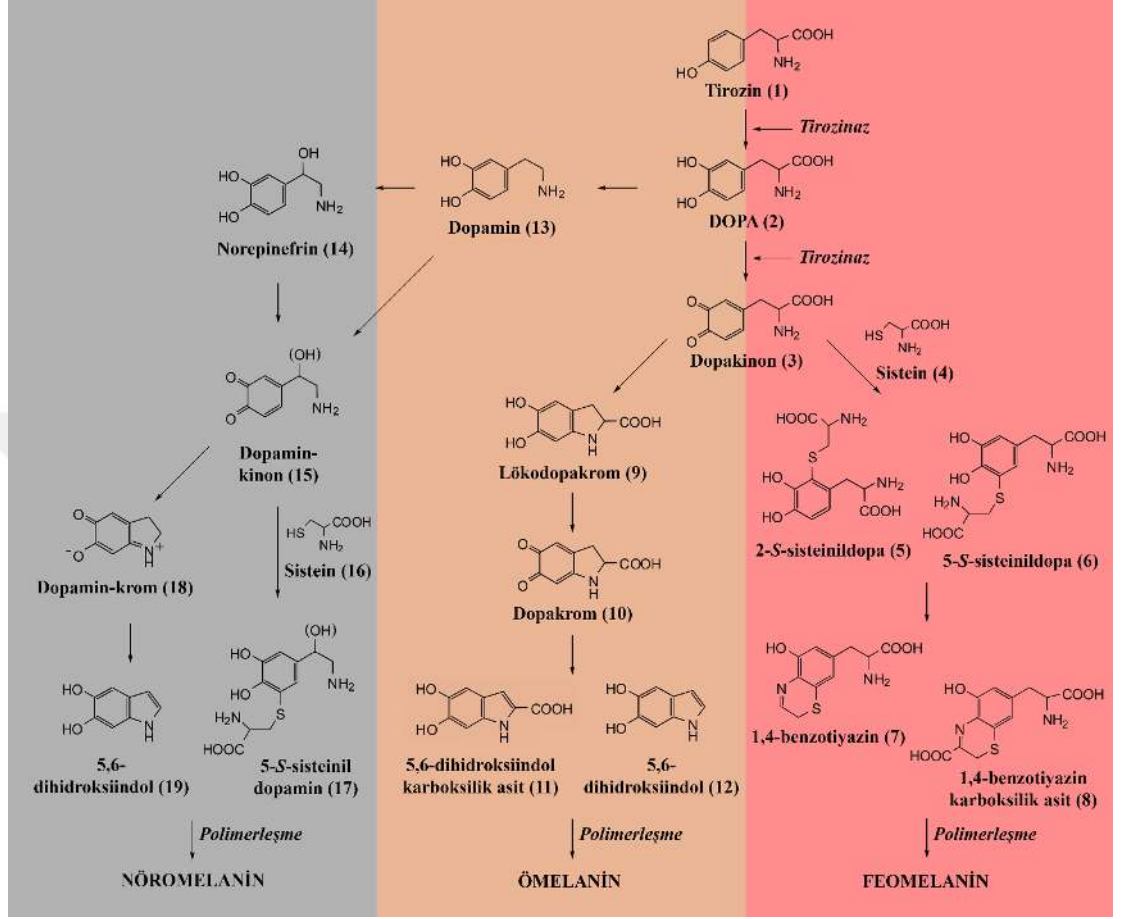


şekil 2.7. Piyomelanini oluşturan benzokinon asetik asit monomeri

2.2.2.2. Ömelanin, Feomelanin ve Nöromelaninin Sentezlenmesi

Melanin pigmentleri, enzimler veya otooksidatif sentez olmak üzere iki farklı şekilde sentezlenebilmektedir. Tirozin (enzim yoluyla) veya L-DOPA (otooksidatif yöntem) öncöl maddeleri aracılığı ile meydana gelmektedir (Pukalski vd., 2025). Tüm *Streptomyces* suşlarının melanin pigmenti sentezinde tirozinaz kullandığı bildirilmiştir (Claus ve Decker, 2006).

Ömelanin, feomelanin ve nöromelanin kökeni aynı olan melanin türleri olup sentezlenme yolları Şekil 2.8’de görülmektedir (Ito ve Wakamatsu, 2008; Micillo vd., 2016; Solano, 2014; Nagatsu vd., 2022; d’Ischia vd., 2013).



Şekil 2.8. Ömelanin, feomelanin ve nöromelaninin sentezlenmesi

Melanin sentezi, L-tirozinin (1) tirozinaz enzimi yoluyla oksidasyonu ile başlamaktadır. Hem L-tirozine (1) oksijen molekülünün eklenerek L-DOPA (2)’nın elde edilmesi hem de L-DOPA (2)’nın dopakinona (3) katalize edilmesi tirozinaz enzimi sayesinde gerçekleşmektedir (Bell ve Wheeler, 1986). Bu noktada ortamdaki sistein (4) varlığı melanin sentezi yolağında kilit rol oynamakta ve elde edilecek melanin türünün ömelanin mi yoksa feomelanin mi olacağını belirlemektedir. Ortamda yeterli miktarlarda sistein (4) bulunması durumunda dopakinon (3) sistein (4) ile birleşerek 2-S-sisteinildopa (5) ve 5-S-sisteinildopa (6) meydana gelmektedir. Sisteinildopa miktarlarının da yeterli seviyeye ulaşması ile birlikte oksidasyon devam etmekte ve benzotiyazin üniteleri (7), (8) ortaya çıkmaktadır. Bu ünitelerin bir araya gelmesi veya farklı benzotiyazin yıkım

ürünleri ile etkileşime girmesi sonucu feomelanin oluşmaktadır (Wakamatsu ve Ito, 2023).

Dopakinon (3), oldukça reaktif bir madde olma özelliği taşımakta olup sistein gibi tiyol bileşikleri ile olağanüstü hızlı bir şekilde reaksiyona girebilmektedir. Ortamda L-sistein bulunduğunda seçici olarak sisteinildopa izomerleri meydana gelmektedir. Sadece sistein ortamda bulunmadığında veya ortamdan tamamen tükendiğinde ömelanin üretimi başlamaktadır. Dopakinon kendi amino grupları ile moleküler halkalaşma reaksiyonu sonucu lökodopakrom (9) ve dopakrom (10) bileşiklerini oluşturmaktadır. Ortaya çıkan dopakrom yavaşça ve rastgele 5,6-dihidroksiindol karboksilik asit (11) ve 5,6-dihidroksiindol (12) ünitelerine dönüşmektedir (Wakamatsu ve Ito, 2023). Ömelaninler de 5,6-dihidroksiindol (DHI) ve 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asit monomerlerin sentezinden meydana gelmektedir (Singla vd., 2021).

Nöromelanin de ömelanin ve feomelanin gibi tirozinden sentezlenmektedir (Xiao ve Li, 2023). Dopamin (13) ve 5-S-sisteinildopamin (17) ünitelerinden türediği bilindiği için feomelanin ve ömelaninin karışımı olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle de polimer yapısı içerisinde benzotiyazin ve indol ünitelerinin her ikisinin de olması beklenmektedir (Solano, 2014). Nöromelanin biyosentezi feomelanine benzer bir şekilde ortamda bulunan sistein (16) konsantrasyonuna bağlıdır (Cao vd., 2021).

2.3. Melanin Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler

Melanin, amorf ve heterojen yapısı nedeniyle klasik karakterizasyon teknikleriyle tam olarak çözülmesi güç bir biyopolimerdir. Bu nedenle, melanin yapısının daha kapsamlı bir şekilde incelenebilmesi amacıyla melanin karakterizasyonunda da yaygın olarak kullanıldığı bilinen morötesi ve görünür ışık (UV-Vis) spektroskopisi, fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi, ¹H NMR (nükleer manyetik rezonans) spektroskopisi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) yöntemlerine ek olarak sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi quadropol-uçuş zamanlı (LC-MS Q-TOF) ile taramalı elektron mikroskobu (SEM)-enerji dağıtıcı X-ışını (EDS) spektroskopisi analizlerinden yararlanılmaktadır.

2.3.1. UV-Vis (Morötesi ve Görünür Işık) Spektroskopisi

Morötesi ve görünür ışık (UV-Vis) spektroskopisi, morötesi-görünür ışık bölgesinde bulunan elektromanyetik radyasyon ile madde arasındaki etkileşimlerin ölçülmesinde kullanılmaktadır. Morötesi bölge (UV), elektromanyetik spektrumda

yaklaşık olarak 10-380 nm arasına tekabül etmekte olup 10-200 nm arası spektrum sadece vakum altında ölçülebilmektedir. Görünür ışık (Vis) bölgesi ise 380-750 nm spektral aralığını oluşturmaktadır (Picollo vd., 2019). UV-Vis spektroskopisi, melanin karakterizasyonunun ilk basamağında, pigmentin varlığını doğrulamak ve temel optik özelliklerini incelemek amacıyla kullanılmaktadır. Melanin, geniş bir dalga boyu aralığında monoton şekilde azalan bir absorpsiyon eğrisi göstermektedir (Li vd., 2018).

2.3.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi, kızılötesi (IR) radyasyonun absorpsiyonu sonucu fonksiyonel grupların kimyasal bağlarında meydana gelen titreşimlerin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (Koenig, 1984). Kimyasal bağların titreşimlerindeki değişim ve absorpsiyon özellikleri kendini absorbans pikleri olarak göstermektedir. Böylece, belirli absorbans aralıkları ile ilişkilendirilen fonksiyonel grupların tanımlanması sağlanmaktadır (Schmitt ve Flemming, 1998).

Absorbans noktaları, dalga boyunun karşılığı olma niteliği taşıyan ve uluslararası olarak kabul görmüş olan dalga sayısı (cm^{-1}) birimi üzerinden belirtilmektedir. Moleküllerde yer alan fonksiyonel gruplar, genel olarak 4000-1500 cm^{-1} aralığında absorbans göstermektedir (Schmitt ve Flemming, 1998). Çizelge 2.2’de absorbansı gerçekleşen frekans aralıkları ve ilişkili titreşim türleri görülmektedir (Socrates, 2001; Pralea vd., 2019).

Çizelge 2.2. FT-IR spektrumunda frekans aralığına karşılık gelen titreşim türü

Frekans Aralığı (cm^{-1})	Titreşim Türü
4000-3200	O-H ve N-H (gerilme)
3000-2800	C-H (gerilme) (alifatik)
2950-2850	C-H (alifatik)
1870-1550	C=O (gerilme)
1650-1600	C=O, C=C (aromatik)
1500-1400	N-H, C-H (sekonder amin)
1250-1180	Fenolik -OH

FT-IR analizi, fonksiyonel grupların tanımlanması ve böylece melaninin kimyasal yapısının temel özelliklerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmektedir. FT-IR analizi ile birlikte melaninlerin yapısında yer aldığı bilinen hidroksil (-OH), amino (-NH), karbonil (C=O) gibi fonksiyonel grupların ve aromatik bileşenlerin varlığı doğrulanmaktadır.

2.3.3. ¹H NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) Spektroskopisi

¹H NMR (nükleer manyetik rezonans) spektroskopisi, yapıda yer alan farklı proton türlerinden yola çıkarak bileşiklerin yapısının belirlenmesinde kullanılan analitik bir metottur. Organik bileşikleri tanımlamak ve analiz etmek için kullanılmaktadır. Bir yapıyı tanımlamak için en ayrıntılı ve gerekli bilgi ¹H NMR spektrumlarından elde edilmektedir. Ancak bu durum yapısal analiz için ¹H NMR spektroskopisinin tek başına yeterli olduğu anlamına gelmemektedir (Singh Parmar ve Singh, 2018; Balcı, 2005).

¹H NMR spektroskopisinde yapıda yer alan her bir hidrojen atomu bulunduğu ortama bağlı olarak farklı bir kimyasal kayma (δ) göstermekte ve her atom rezonans spektrumunda sinyal olarak kendini göstermektedir. Böylece elde edilen piklerin şekli ve bulundukları nokta, atomların bulundukları kimyasal ortamın özellikleri hakkında bir fikir vermektedir (Gunawan ve Nandiyanto, 2021). Çizelge 2.3'te kimyasal kayma ile ilişkili proton türleri görülmektedir (Solomons vd., 2014).

Çizelge 2.3. ¹H NMR spektrumunda kimyasal kaymaya karşılık gelen proton türü

Kimyasal Kayma (δ_H) (ppm)	Proton Türü
0,8-1,2	1° Alkil (RCH ₃)
1,2-1,5	2° Alkil (RCH ₂ R)
1,4-1,8	3° Alkil (R ₃ CH)
1,6-1,9	Allilik (R ₂ C=CRCH ₃)
2,1-2,6	Keton (RCOCH ₃)
2,2-2,5	Benzilik (ArCH ₃)
2,5-3,1	Asetilenik (RC $\equiv$ CH)
3,1-3,3	Alkil İyodür (RCH ₂ I)
3,3-3,9	Eter (ROCH ₂ R)
3,3-4,0	Alkol (HOCH ₂ R)
3,4-3,6	Alkil Bromür (RCH ₂ Br)
3,6-3,8	Alkil Klorür (RCH ₂ Cl)
4,6-5,0	Vinilik (R ₂ C=CH ₂)
5,2-5,7	Vinilik (R ₂ C=CHR)
6,0-8,5	Aromatik (ArH)
9,5-10,5	Aldehit (RCHO)
0,5-6,0	Alkol Hidroksili (ROH)
1,0-5,0	Amino (RNH ₂)
4,5-7,7	Fenolik (ArOH)
10,0-13,0	Karboksilik (RCOOH)

¹H NMR spektroskopisi, melaninlerin yapısının detaylı olarak aydınlatılması amacıyla tercih edilen analiz metotları arasında yer almaktadır. Her ne kadar melaninin polidisperse (homojen olmayan polimerlerde farklı büyüklüklerde bir veya daha fazla

maddenin birbiri içinde dağılmış halde bulunması hali) ve düşük çözünürlüklü (az miktarda çözünen veya tamamen çözünmeyen) doğası bu yöntemin etkinliğini sınırlasa da melaninlerin moleküler yapısı hakkında önemli ipuçları elde edilebilmektedir. Gosset (2023), 7,21 ve 7,29 ppm'de pik veren grupların indol/pirol halkası olduğunu, melanin NH gruplarının yaklaşık 8,00 ppm'de pik verdiğini, metil ya da metilen gruplarına bağlı azot ve oksijenin 3,40-4,40 ppm'de pik verdiğini, 2,20-2,80 ppm'de metilen grubunun pik verdiğini, 0,90-1,00 ppm'de alifatik grupların pik verdiğini belirtmiştir.

2.3.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)-Enerji Dağıtıcı X-ışını (EDS) Spektroskopisi

Temel bir taramalı elektron mikroskobu (SEM), elektron ışınlarını üreten bir elektron tabancasından (alan emisyon tipi veya diğerleri) ve elektromanyetik optiklerden oluşmaktadır. Işını yönlendirebilmekte ve odaklayabilmektedir. Dedektörler, numuneden gelen elektronları (doğrudan saçılma veya numuneden yayılan) toplamaktadır ve tespit edilen elektronun enerjisi, yoğunlukları (sayı yoğunluğu) ve emisyon yeri ile birlikte görüntüyü bir araya getirmek için kullanılmaktadır (Kazmiruk, 2012). Malzeme numunesinin yüzey morfolojisini anlamak için SEM kullanışlı bir araçtır. Optik mikroskobun maksimum büyütmesi sadece yaklaşık 1500 kattır ve taramalı elektron mikroskobu 10.000 kattan daha fazla büyütme yapabilmektedir (Jawaid ve Khan, 2018).

Melanin partiküllerinin yüzey morfolojisini incelemek üzere taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmaktadır. Yüzey yapısındaki amorf ve granüler yapı, melaninin doğal formuna dair görsel kanıtlar sunmaktadır. Ayrıca, partikül boyutları ve topografik özellikler detaylı biçimde değerlendirilebilmektedir.

Günümüzde numune yüzeyini element tespiti ile kapsamlı bir şekilde analiz etmek için x-ışınlarının analizini sağlayan enerji dağılımlı foton dedektörleri içeren X-ışını spektrometresi veya X-ışını enerji spektrometresi kullanılabilir. Bu amaçla EDX (Enerji Dağıtıcı X-ışını Analizi) ya da EDS (Enerji Dağıtıcı X-ışını Spektroskopisi) genellikle SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) veya FESEM (Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu) ile birleştirilmektedir. Numunenin iletkenliği iyiye, yüzeyin herhangi bir işleme ihtiyacı yoktur ve doğrudan gözlemlenebilmektedir. İletken değilse, numunenin elektriği iletmesine yardımcı olmak için bir metal veya karbon film ile kaplanması gerekmektedir. Kaplama malzemesi genellikle altın, paladyum veya karbondur (Kazmiruk, 2012; Jawaid ve Khan, 2018).

SEM cihazına entegre enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDS) ile melaninin elemental kompozisyonu analiz edilebilmektedir. Özellikle karbon (C), azot (N), oksijen (O) ve kükürt (S) gibi temel elementlerin tespiti ve oranları, ömelanin ve feomelanin gibi alt tiplerin ayırımında önemli bir veri kaynağı oluşturmaktadır. Bu yönüyle SEM-EDS, klasik SEM analizine anlamlı bir katkı sunmaktadır.

2.3.5. LC-MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi) Q-TOF (Kuadrupol-Uçuş Zamanlı)

Kütle spektrumunda bilinmeyen örneklerin kör analizi mümkündür. Kütle Spektrometresi (MS) için örnek kompozisyonunun detaylı ön bilgisine ihtiyaç yoktur. MS ile kimyasal tanımlama floresan ya da radyoaktif etiketlemeye dayalı analiz tekniklerinde olduğu gibi analit ön seçimi ile sınırlı değildir. MS araştırılan molekülün fonksiyonel değişikliğe uğramaması gibi avantajlara sahiptir (Manikprabhu ve Lingappa, 2013; Singh Parmar ve Singh, 2018).

Melanin yapısının daha ayrıntılı anlaşılması ve moleküler bileşenlerin belirlenmesi amacıyla yüksek çözünürlüklü sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi quadrupol-uçuş zamanlı (LC-MS Q-TOF) kullanılabilmektedir. Bu teknik ile melaninin yapı taşları, parçalanma ürünleri ve olası monomerik formları hakkında bilgi elde edilebilmektedir (Hanton, 2001). Kütle spektrumları, biyosentetik yollara dair değerlendirmelerin yapılmasına olanak sağlamakta ve melaninin karakterizasyonu için analizlerin desteklenmesini mümkün kılmaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Örnek Toplama ve Aktinomiset İzolasyonu

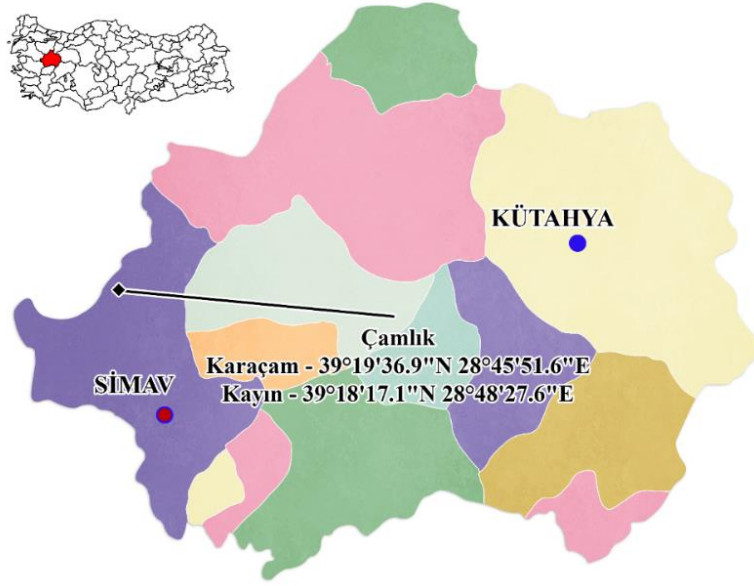
Bu çalışmada çeşitli illerden (Burdur, Denizli, Balıkesir ve Kütahya) toplanan toprak ve çamur örneklerinden toplam 130 adet aktinomiset izolatu elde edilmiştir. Ayrıca Hilal BEDEL' in yüksek lisans tez çalışmasından (Farklı Habitatlardan Toplanan Toprak ve Su Kaynaklarındaki Aktinomisetlerin İzolasyonu, Tanımlanması ve Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi) elde edilen 25 aktinomiset izolatu ve 0611-YL-19 numaralı BAP projesi (Farklı habitatlardan toplanan Aktinomisetlerin moleküler karakterizasyonu) kapsamında çeşitli illerden toplanan toprak ve su kaynaklarından izole edilen 20 aktinomiset izolatu dahil olmak üzere toplam 175 izolat materyal olarak kullanılmıştır. Bunların arasından 71 adet izolatu ekstraselüler pigment üretimi yapabildiği gözlenmiştir. Bu izolatlardan en yüksek ekstraselüler pigment üretimine sahip olduğu görülen K3 (Erfilibeli, 2021), B23, B25, O2, O26 ve Act21 izolatlari ile çalışmaya devam edilmiştir.

Toplanan toprak ve çamur örnekleri Gençbay (2019)'da belirtilen şekilde düzenlenerek GPS konumları, örneğin alındığı yerler ve örneğin alındığı yerin rakımı verilmiştir (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.4 ve Çizelge 3.1). Toprak örnekleri 10-15 cm derinlikten, çamur örnekleri ise su birikintilerinin diplerinden alınarak steril poşetlere aktarılmıştır. Örnekler alındıkları bölgeleri, tarihi ve sayıyı tanımlayacak şekilde isimlendirilmiştir.

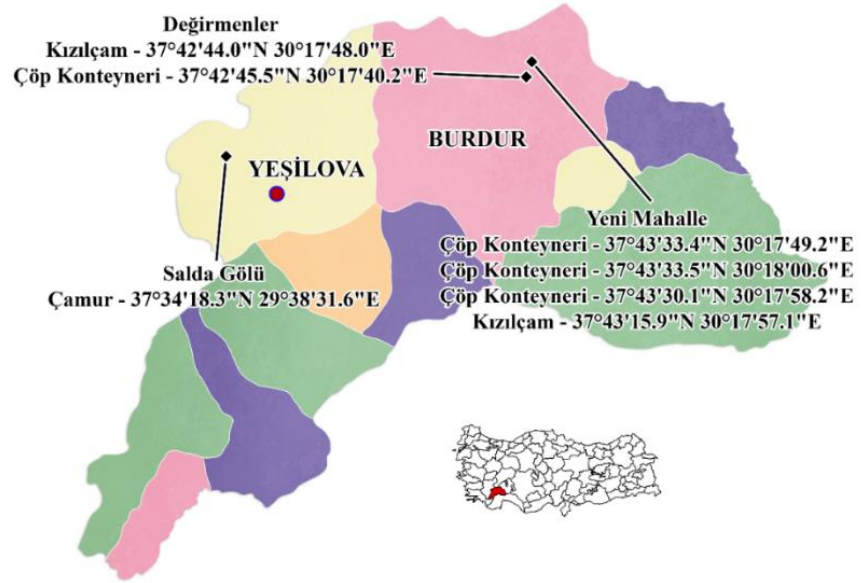
Örnekler hassas terazide (Shimadzu UW1020H, Japonya) 10 g tartıldıktan sonra oda sıcaklığındaki 90 ml FTS'ye ilave edilerek karıştırılmıştır. Hazırlanan 10^{-1} dilüsyondan 9 ml FTS ile 10^{-5} - 10^{-7} 'ye kadar seyreltme yapıldıktan sonra (Özçelik, 1998) steril koşullarda Aktinomiset İzolasyon Agarına (AİA) dökme yöntemiyle ekim sonrasında inkübatörde (Nüve EN500, Almanya) 28 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında oluşan koloniler seçilerek Nutrient Agar (NA) besiyerine çizim ekimi sonrasında 28 °C'de 48 saat inkübasyonu sonrasında tek koloniye düşenler Nutrient Broth (NB) besiyerine aktarılmıştır. Sıvı NB besiyerinde gelişen aktinomisetler 1:1 oranında gliserol ile mikrosantrifüj tüplerine aktararak -20°C de depolanmıştır.

Çizelge 3.1. Alınan toprak örneklerinin GPS konumları, yüksekliği ve yeri

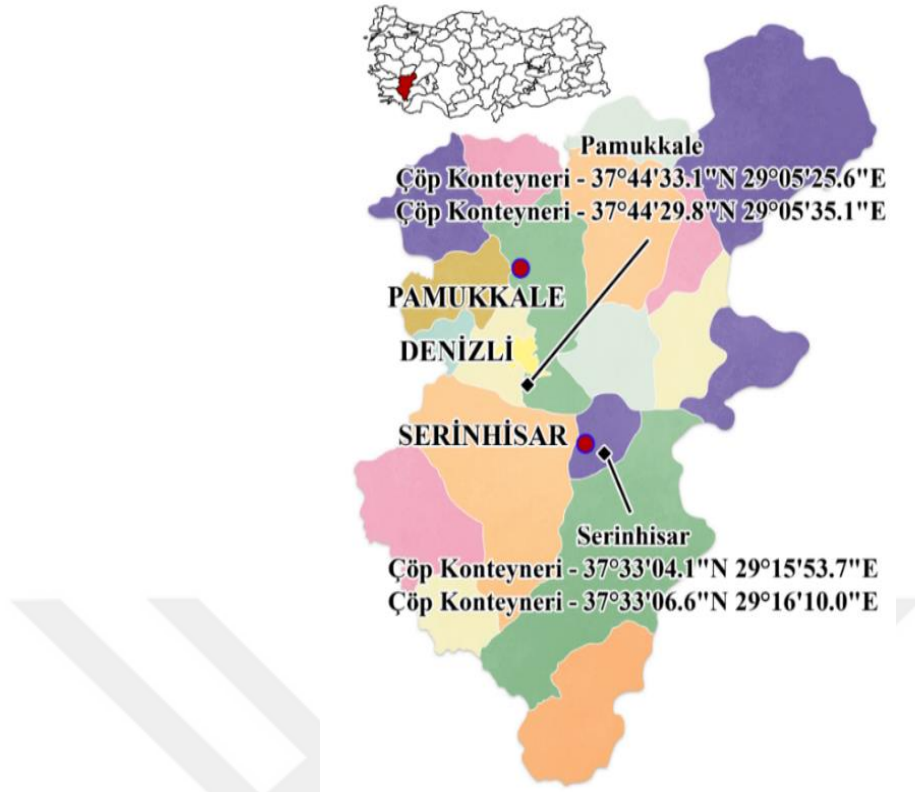
Deneme Alanı No	Evrensel Enlem Merkatörü 35D		Rakım (m)	Alındığı Yer	İl	İlçe/Köy
	x: Doğu	y: Kuzey				
1	658919	4357994	1364	Karaçam	Balıkesir	Çanakçı
2	660335	4357877	1459	Karaçam	Balıkesir	Çanakçı
3	652076	4354540	1448	Karaçam	Kütahya	Çamlık
4	655860	4352154	1537	Kayın	Kütahya	Çamlık
5	641672	4385382	636	Karaçam	Balıkesir	Çiftçi
6	641447	4385372	649	Karaçam	Balıkesir	Çiftçi
7	640343	4382200	660	Kızılçam	Balıkesir	Dursunbey
8	640498	4382164	653	Karaçam	Balıkesir	Dursunbey
9	640907	4381622	560	Halep Çamı	Balıkesir	Dursunbey
10	261958	4178303	991	Kızılçam	Burdur	Yeni Mahalle
11	261999	4178740	977	Çöplük	Burdur	Yeni Mahalle
12	262059	4178843	976	Çöplük	Burdur	Yeni Mahalle
13	261781	4178847	965	Çöplük	Burdur	Yeni Mahalle
14	261519	4177378	1009	Çöplük	Burdur	Değirmenler
15	261707	4177325	1030	Kızılçam	Burdur	Değirmenler
16	733335	4161584	1147	Çamur	Burdur	Salda
17	700072	4158425	1102	Çöplük	Denizli	Serinhisar
18	700471	4158513	1060	Çöplük	Denizli	Serinhisar
19	684186	4179305	493	Çöplük	Denizli	Pamukkale
20	684420	4179209	492	Çöplük	Denizli	Pamukkale
21	643682	4378198	411	Çamur	Balıkesir	Beyel
22	643681	4378198	411	Çamur	Balıkesir	Beyel
23	643678	4378199	411	Çamur	Balıkesir	Beyel
24	643685	4378164	386	Çınar	Balıkesir	Beyel
25	643684	4378163	387	Çınar	Balıkesir	Beyel
26	643684	4378163	387	Çınar	Balıkesir	Beyel
27	644060	4377588	416	Kızılçam	Balıkesir	Saçayak
28	644060	4377589	416	Kızılçam	Balıkesir	Saçayak
29	644059	4377589	416	Kızılçam	Balıkesir	Saçayak
30	654715	4372651	860	Karaçam	Balıkesir	Boyalıca
31	654713	4372650	860	Karaçam	Balıkesir	Boyalıca
32	654717	4372650	860	Karaçam	Balıkesir	Boyalıca
33	653156	4369483	862	Karaçam	Balıkesir	Sakızköy
34	653155	4369482	862	Karaçam	Balıkesir	Sakızköy
35	653156	4369482	862	Karaçam	Balıkesir	Sakızköy
36	653433	4369028	898	Karaçam	Balıkesir	Sakızköy
37	653433	4369029	898	Karaçam	Balıkesir	Sakızköy
38	653433	4369030	899	Karaçam	Balıkesir	Sakızköy



Şekil 3.2. Kütahya ilinden alınan örneklerin konumları



Şekil 3.3. Burdur ilinden alınan örneklerin konumları



Şekil 3.4. Denizli ilinden alınan örneklerin konumları

3.1.2. Besiyerleri

Aktinomisetlerin izolasyonunda: **Aktinomiset izolasyon Agar (AİA)** (2,000 g/L sodyum kazeinat, 0,100 g/L L-asparajin, 4,000 g/L $C_3H_5NaO_2$, 0,500 g/L K_2HPO_4 , 0,100 g/L $MgSO_4$, 0,001 g/L $FeSO_4$, 15 g/L Agar ve 0,015 L gliserol ilavesi/L besiyeri)

Aktinomisetlerin depolanması ve aktifleştirilmesinde: **Nutrient agar (NA)** (3,000 g/L et ekstraktı, 5,000 g/L pepton, 15,000 g/L Agar), **Sabouraud Dextrose Agar (SDA)** (10,000 g/L pepton, 20,000 g/L D (+) glikoz, 15,000 g/L Agar)

Aktinomiset gelişimlerinin incelenmesinde: **Nutrient agar (NA)**, **Beyin-Kalp İnfüzyon Agar (BHIA)** ((beyin ekstraktı, kalp ekstraktı ve peptonlar) 27,500 g/L; D(+) Glucose 2,000 g/L; NaCl 5,000 g/L; Na_2HPO_4 2,500 g/L, Agar 15,000 g/L), **Granüle Maya Ekstrakt Agar (GMEA)** (20,000 g/L granüle maya ekstraktı, 3,000 g/L pepton, 15,000 g/L Agar), **İnorganik tuz nişasta agarı (ISP4)** (10,000 g/L nişasta, 2,000 g/L $CaCO_3$, 2,000 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 1,000 g/L dehidre K_2HPO_4 , 1,000 g/L $MgSO_4 \times 7H_2O$, 1,000 g/L NaCl, 0,100 g/L $FeSO_4 \times 7H_2O$, 0,100 g/L $MnCl_2 \times 4H_2O$, 0,100 g/L $ZnSO_4 \times 7H_2O$, 20,000 g/L Agar), **Tirozin agar (ISP7)** (1,000 g/L L-asparajin, 0,500 g/L L-tirozin, 0,500 g/L K_2HPO_4 , 0,500 g/L $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,500 g/L NaCl, 1,360 mg/L $FeSO_4 \times 7H_2O$, 0,027 mg/L $CuCl_2 \times 2H_2O$, 0,040 mg/L $CoCl_2 \times 6H_2O$, 0,025 mg/L

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,020 mg/L ZnCl_2 , 2,850 mg/L H_3BO_3 , 1,800 mg/L $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 1,770 mg/L $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6$, 20,000 g/L Agar ve 0,015 L gliserol ilavesi/L besiyeri) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Farklı Kültür Ortamlarında Aktinomiset Gelişimi

Aktinomisetlerin gelişimlerini incelemek amacıyla Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde -20 °C'de gliserol-nutrient broth (1:1 v/v) içeren mikrosantrifüj tüplerinde depolanan stok aktinomiset kültürleri kullanılmıştır. Önce stok kültürlerin NA besiyerine yayma plak ekimi yapılmış ve inkübasyondan (28 °C, 24 saat) sonra çeşitli besiyerlerine (ISP4, ISP7, BHIA, GMEA) ve çalışma besiyeri (NA) ile farklı besin ilave edilen NA besiyerine (NA, NA + %10 NaCl, NA + %10 Nişasta, NA + %10 GME) çizim ekimi yapıldıktan sonra inkübasyona (28 °C, 48 saat) bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında misel yapıları, ekstraselüler pigment oluşumları ve pigment difüzyonu incelenmiştir (Darwesh vd., 2020).

3.2.2. Aktinomisetlerin Mikroskop Görüntülerinin İncelenmesi

Ekstraselüler pigment üretimi en yüksek olan K3, B23 ve B25 izolatlarının NA besiyerinde 28 °C'de 48 saat inkübasyonu sonrasında koloni özellikleri (büyüklüğü, rengi, spor oluşumu ve şekli) stereo mikroskop altında (Olympos SZX7, Japonya) (Duman vd., 2022); morfolojik özellikleri ise ışık mikroskobu (Olympos CX23, Japonya) (Madigan vd., 2013) altında incelenmiştir.

3.2.2.1. Gram Boyama

NA besiyerinde gelişen K3, B23 ve B25 izolatlarının havasal miselleri alınarak lam üzerine yayılmıştır. Fiksasyon işleminden sonra hazırlanan preparata sırasıyla kristal viole, iyodür çözeltisi, alkol ve safranin uygulanmıştır. Boyama sonucu hücreler mikroskop altında incelenmiştir (Akmemiş-Korkmaz, 2006).

3.2.3. Aktinomiset İzolatının Sıvı Kültürde Günlük Gelişimi

NA besiyerinde geliştirilen aktinomisetler 10 ml NB (Nutrient Broth) besiyerine aktarılmış ve 30 °C'de 7 gün inkübe edilmiştir. Mikrobiyal popülasyonun üreme döngüsünü belirlemek amacıyla NB ortamında gelişen 10 ml aktinomiset kültürü 90 ml NB besiyerine ekimi yapılmış ve çalkalamalı inkübatörde (IKA KS4000, Çin) 30 °C, 160

rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. Ekimin yapıldığı günden itibaren (0.gün) steril falkonlara günlük 10 ml örnek alınmış ve alınan örnek kadar yerine taze NB besiyeri ilave edilmiştir. Alınan örnekler 15-20 sn vortekste (OVAN Vibra Mix R, İspanya) karıştırıldıktan sonra 100 µl alınarak 96 kuyucuklu plakaya aktarılmış ve mikropilaka okuyucuda (Epoch BIOTEK, ABD) 600 nm’de ölçümleri yapılmıştır. Çalışmada kullanılan izolatlar için tipik gelişim eğrileri elde edilmiştir. Üreme eğrileri lag fazı, logaritmik faz, durağan faz ve ölüm fazını içermektedir (Madigan vd., 2013).

3.2.4. Moleküler Analiz

Çalışmanın devamı için seçilen izolatların 16S rRNA gen bölgesi baz alınarak yapılan moleküler tanımlamaları BMLABOSİS Ltd. Şti.’de gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.1. DNA izolasyonu ve 16S rDNA Dizileme

NB besiyerinde geliştirilen bakteri kültüründen alınan 1 ml örneklerden Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit-(ABD) izolasyon kiti ile üretici protokolü takip edilerek total DNA izole edilmiştir. Lizis çözeltisi Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit-(ABD) izolasyon kitinde yer alan protokole göre 20 mM Tris-HCl, pH 8, 2 mM EDTA, 1,2% Triton X-100 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 20 mg/mL lizozim (Thermo) eklenerek hazırlanmıştır. Lizis çözeltisi 1 ml örnek üzerine ilave edilmiş ve 15-20 saniye vorteks (Velp F202A0173, Çin) ile karıştırıldıktan sonra 30 dakika 37 °C’de beklemeye alınmıştır. Daha sonra DNA izolasyon işlemi hazır kit (Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit-ABD) ile üreticinin protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen total DNA’ların saflığı mikropilaka okuyucuda (Epoch BIOTEK, ABD) DNA’ların 260 nm ve 280 nm’deki absorbansları oranı ($OD_{260}/OD_{280}=1,6-1,8$) hesaplanarak tespit edilmiştir (Yoltaş, 2017).

Çizelge 3.2. 8F ve 1492R primerlerinin baz dizileri, hedef bölgesi ve ürün boyutu

Primer	Baz dizisi (5’-3’)	Bölge	Ürün Boyutu	Kaynak
8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S	1500 bp	Galkiewicz, 2008
1492R	GGTACCTTGTACGACTT	16S	1500 bp	Bayram, 2021

Evrensel 16S rRNA primerleri (Çizelge 3.2) ile, tür tayini için hedeflenen gen bölgeleri çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonu Çizelge 3.3’te verildiği gibi hazırlanmış ve Çizelge 3.4’te verilen koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. PCR tüpüne konulan bileşikler ve miktarları

Bileşik	Miktar
DNA Template	5 µl
KCl	5 µl
dNTP	5 µl
MgCl ₂	3 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
Taq DNA Polimeraz	0,3 µl
Saf Su	30 µl
Toplam Hacim	50,3 µl

Çizelge 3.4. Amplifikasyonun sağlandığı PCR protokolü

İşlem	Döngü	Süre	Sıcaklık (°C)
Başlangıç Denatürasyonu	1	5 dk	95
Denatürasyon	35	60 sn	95
Bağlanma		60 sn	55
Uzama		60 sn	72
Son Uzama	1	10 dk	72

PCR ürünleri 16S rDNA'ları jel yükleme boyası ile birlikte jele yüklenmiş ve 100 voltta 1 saat boyunca yürütülmüştür. Daha sonra jel UV-Transillüminatöre (Spektronics TVD-100R, ABD) aktarılmış ve PCR'da çoğaltılan ilgili DNA dizilerinin bant uzunluklarının ~1500 baza karşılık geldiği jelde görülmüştür.

16S rDNA dizileme analizi için PCR ürünleri BMLABOSİS Ltd. Şti. firmasına gönderilerek hizmet alımı yapılmıştır. Tam dizileme için Sanger sekanslama ile çift yönlü olarak okunmuş ve elde edilen yaklaşık 1000 baz uzunluğundaki 16S rDNA dizileme sonuçları Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı (EMBL)-Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü (EBI) tarafından açık erişim sağlanan Clustal W programı ile karşılıklı hizalanarak diziler birleştirilmiştir. Elde edilen 16S rDNA tam sekans, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) tarafından açık erişim sağlanan Temel Yerel Hizalama Arama Aracı (BLAST) programı kullanılarak en yüksek dizi benzerlikleri incelenmiştir.

3.2.4.2. Filogenetik Analiz

16S rDNA nükleotid baz dizileri uygun programı (MEGA 12) kullanılarak analiz edilmiş ve filogenetik pozisyonlarını belirlemek için çalışmada kullanılan *Streptomyces griseorubens* K3, *Streptomyces variabilis* B23 ve *Streptomyces variabilis* B25 ile NCBI

veri tabanında kayıtlı olan bazı *Streptomyces* türleri ilave edilerek dendogramlar oluşturulmuştur. Elde edilen dendogramlar Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı (EMBL) tarafından açık erişim sağlanan iTOL (Sürüm 7.2.1) programına aktarılarak düzenlenmiştir.

3.2.5. Pigment Ekstraksiyonu

NB besiyerine ekimi yapılan *S. griseorubens* K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşları inkübasyon (30 °C, 14-16 gün, 160 rpm) sonrasında santrifüj (4500 rpm, 5 dk) edilerek pelet atılmış ve süpernatant ekstraksiyonda kullanılmıştır. Süpernatant önce kaba filtreden (Whatman no:1) sonra ince filtreden (0,45 µm'lik şırınga filtre) geçirilmiştir. Süpernatanttan kahverengi renkli pigment ekstraksiyonu için 3 farklı yöntem denenmiştir. Bu yöntemler:

- 1) Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu: Beş farklı solvent ekstraksiyonda kullanılmak amacıyla denenmiştir; metanol, etanol, etil asetat, kloroform. Filtreden geçirilen süpernatanta eşit hacimde (1:1) solvent ilave edildikten sonra 20 sn vortekslenmiş ve 1 gece (16-18 saat) beklemeye alınmıştır. Solventler pipetle başka bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra 55 °C'de etüvde (Nüve FN500, Almanya) kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan ham ekstrakt -20 °C'de depolanmıştır (Mortimer, 2004).
- 2) Katı-Sıvı Ekstraksiyonu: Altı farklı solvent ekstraksiyonda kullanılmak amacıyla denenmiştir; metanol, etanol, etil asetat, aseton,hekzan,su. Süpernatant liyofilize (Bluewawe BW-10B, ABD) edilerek toz haline getirildikten sonra 0,1 g ekstrakt mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve üzerine 1 ml solvent ilave edilmiştir. 15-20 sn vorteks ile karıştırıldıktan sonra 4 saat beklemeye alınmıştır. Solventler pipetle başka bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra 55 °C'de etüvde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan ham ekstrakt -20 °C'de depolanmıştır (Mortimer, 2004).
- 3) Asit ile Çöktürme: Silva vd. (2019)'ne ait melanin ekstraksiyon metodu modifikasyon yapılarak kullanılmıştır. Süpernatanta 6M HCl ilave edilerek pH değeri 2,0'ın altına düşürülmüş ve gece boyu (16-18 saat) karanlıkta beklemeye alınmıştır. Daha sonra santrifüj edilerek üst faz atılmış ve çöken melanin ekstraktı 3 kez distile su ile yıkanıp çöktürülmüş ve dondurulduktan sonra liyofilize edilerek -20 °C'de depolanmıştır. Safsızlık unsurları görülen örnekler için distile su ile ikinci bir yıkama yapılmış ve melanin ekstraktı ikinci defa liyofilize edilerek -20 °C'de depolanmıştır.

3.2.6. Pigment Karakterizasyonu

S. griseorubens K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarından elde edilen ekstrakte melaninlerin biyo-kimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla UV-Vis analizi yapıldıktan sonra FT-IR (Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi BİLTEKMER), ¹H NMR (Mersin Üniversitesi METİAM), SEM-EDS (Yıldız Teknik Üniversitesi merkez laboratuvarı) ve LC-MS Q-TOF (Yıldız Teknik Üniversitesi merkez laboratuvarı) analizleri için hizmet alımı yapılmıştır.

3.2.6.1. UV-Vis (Morötesi ve Görünür Işık) Spektrofotometrik Analizi

S. griseorubens K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarından elde edilen melanin ekstraktları önce 0,5 M NaOH çözeltisi içinde seyreltilmiştir. Ardından 100 µl alınarak 96 kuyucuklu plakaya aktarılmış ve mikroparka okuyucuda (Epoch BIOTEK, ABD) UV, görünür ve yakın kızılötesi dalga boylarında (200-900 nm) taranarak $\lambda_{\max}$ bulunmuştur. 0,5 M NaOH çözeltisi kör olarak kullanılmıştır (El-Naggar ve El-Ewasy, 2017).

3.2.6.2. FT-IR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) Analizi

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, kızıl ötesi (IR) radyasyonun absorpsiyonu sonucu fonksiyonel grupların kimyasal bağlarında meydana gelen titreşimlerin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (Koenig, 1984). *S. griseorubens* K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarından elde edilen melanin ekstraktları ve KBr topakları parçalamak için, iki toz bir agat havanda birleştirilmiş ve kısa bir süre dövülmüştür. Karıştırılan disk FT-IR spektrofotometresi (PERKIN ELMER FRONTIER, ABD) ile 4000-400 cm⁻¹'de taranmıştır (El-Naggar ve El-Ewasy, 2017).

3.2.6.3. ¹H NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) Analizi

¹H NMR (nükleer manyetik rezonans) spektroskopisi, yapıda yer alan farklı proton türlerinden yola çıkarak bileşiklerin yapısının belirlenmesinde kullanılan analitik bir metottur (Singh Parmar ve Singh, 2018; Balcı, 2005). *S. griseorubens* K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarından elde edilen ekstrakte melaninler 5 mm NMR tüplerinde 25 °C'de ¹H NMR spektroskopisi (BRUKER ULTRASHIELD PLUS A VANCE III) ile ¹H NMR spektrumu elde edilmiştir (El-Naggar ve El-Ewasy, 2017). Çözücü olarak su kullanılmıştır.

3.2.6.4. SEM-EDS (Taramalı Elektron Mikroskobu-Enerji Dağıtıcı X-ışını Spektroskopisi) Görüntüsünün Alınması

Malzeme numunesinin yüzey morfolojisini anlamak için SEM kullanışlı bir araçtır (Jawaid ve Khan, 2018). X-ışını enerji spektroskopisi ile numune yüzeyinin element analizi kapsamlı bir şekilde incelenebilmektedir (Kazmiruk, 2012; Jawaid ve Khan, 2018). *S. griseorubens* K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarından elde edilen ekstrakte melaninler dondurularak kurutulduktan sonra 15,0 kV'de çalışan taramalı elektron mikroskobu-enerji dağıtıcı X-ışını spektroskopisi (Zeiss EVO LS 10) ile 3000 kat büyütülerek SEM görüntüsü ve elemental içerikleri elde edilmiştir (Xie vd., 2020).

3.2.6.5. LC-MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi) Q-TOF (Kuadrupol Uçuş Zamanlı) Analizi

Moleküllerin örnek atomik bileşimine göre bileşikleri tanımlayan analitik bir tekniktir. Ardışık kütle spektrometrisi olarak da bilinen MS/MS Q-TOF yöntemi kullanılarak *S. griseorubens* K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarından elde edilen melanin ekstraktlarının kütle spektrumu ve kütüphane taraması (Agilent Technologies, 6530 model) yapılarak parçalanma ürünleri incelenmiştir (Manikprabhu ve Lingappa, 2013). Yapılarında bulunan monomerlerin parçacık iyonları elde edilmiş ve hesaplanan m/z (kütle/iyon) değerleri sayesinde molekül ağırlıkları (M_w) belirlenmiştir.

Çizelge 3.5. FBF algoritması ile taraması yapılan melanin ile ilişkili moleküller

Molekül Adı	Molekül Formülü
L-tirozin	$C_9H_{11}NO_3$
L-DOPA	$C_9H_{11}NO_4$
L-dopakinon	$C_9H_9NO_4$
5,6-dihidroksiindol (DHI)	$C_8H_7NO_2$
5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asit (DHICA)	$C_9H_7NO_4$
L-sistein	$C_3H_7NO_2S$
5-S-sisteinildopa	$C_{12}H_{16}N_2O_6S$
2-2'-bibenzotiyazin	$C_{23}H_{20}N_4O_8S_2$
Nöromelanin türevi	$C_{27}H_{20}N_4O_5S$
1,8-dihidroksinaftalin (DHN)	$C_{10}H_8O_2$
Homogentisik asit	$C_8H_8O_4$

Farklı melanin türlerinden elde edilmesi tahmin edilen parçalanma ürünlerinin tespit edilebilmesi amacıyla Auto MS/MS algoritmasının yanı sıra FBF (Find By Formula) algoritması da kullanılmıştır. FBF algoritması kullanılarak varlığı kontrol

edilen melaninle ilişkilendirilen moleküller ve moleköl formülleri Çizelge 3.5'te görölmektedir.

3.2.7. Anti-bakteriyel Aktivite Analizi

S. griseorubens K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarından elde edilen melanin ekstraktlarının anti-bakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla Agar Kuyucuk Difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Anti-bakteriyel test için Gram-pozitif (*Listeria monocytogenes* ATCC 13932, *Bacillus cereus* ATCC 6051, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) ve Gram-negatif (*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Escherichia coli* ATCC 25922) suşları kullanılmıştır. Bu amaçla sıvı besiyerinde inkübe edilmiş ve bulanıklığı OD600'de 0,1 bulanıklığa ($\sim 1 \times 10^8$ kob/ml) ayarlanmış test kültürlerinden 100 µL alınarak 10 mL soft agar (NB 8 g/L, Agar 5 g/L) içerisine eklenmiştir ve Mueller-Hinton (MH) petrilere ikinci kat olarak dökülmüştür. Soft agar katılaştıktan sonra steril pipet yardımıyla kuyucuklar açılmıştır. Kuyucuklar içerisine 50'er µL melanin ekstraktları (0,1 g/ml) ilave edilerek inkübatörde 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Dimetil sülfoksit (DMSO) çözücü olarak kullanılmıştır. Melanin ekstraktları DMSO içinde pipetle karıştırıldıktan sonra 30 saniye vortekslenmiştir. Çözünen melanin ekstraktı 0,45 µm'lik filtreden geçirilmiş ve analizde kullanılmıştır. İnkübasyon sonrasında kuyucuk çevresinde oluşan inhibisyon zon çapları (mm) cetvel yardımıyla ölçülmüştür. Gentamisin (100 µg/ml) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Oluşan inhibisyon zon çapları antibakteriyel aktivitenin değerlendirilmesi için kullanılmıştır.

3.2.8. Anti-kanser Aktivite Analizi

S. griseorubens K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarından elde edilen melanin ekstraktlarının kolon epiteli hücrelerine (CCD18Co) ve kolon kanser hücrelerine (SW-620) anti-kanser aktivitesi incelenmiştir.

Çalışmada kullanılan hücre hatları Dr. Öğr. Üyesi Muzaffer DÜKEL tarafından temin edilmiştir. SW620 kolon kanseri hücreleri RPMI (Roswell Park Memorial institute 1640) besi yerinde, %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin ilavesi yapılarak kültüre edilmiştir. Normal kolon epiteli hücre hattı CCD18Co ise %5 at serumu (sigma), 20 ng/ml epidermal büyüme faktörü (EGF; sigma) 10 µg/ml insülin (sigma), ve 0,5 µg/ml hidroksiaseton (sigma), %10 FBS ve %1 Penislin/Streptomisin ilave edilmiş DMEM

(cellgro) ortamında kültüre edilmiştir. CCD18Co hücreleri kontrol hücre grubu olarak kullanılmıştır. SW620 hücresi ise metastatik karakterdeki hücre grubudur.

S. griseorubens K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarından elde edilen melanin ekstraktlarının uygulaması aşamasında her hücre hattı için 1 adet melanin ekstraktı uygulanmamış kontrol grubu oluşturularak sitotoksik etkiler incelenmiştir. Melanin ekstraktları 50-500 µg/mL aralığında uygulanmış ve hücrelerin hayatta kalma miktarları analiz edilmiştir. Bu işlem için rezazurin (alfa aesar) kullanılmış ve üretici firma tarafından sağlanan protokole göre işlem yapılmıştır.

Tüm hücre kültürü işlemleri ve etken madde uygulamaları steril kabin (DEMAIR MSC-IIA-120, Türkiye) içinde yapılmıştır. CCD18Co ve SW620 hücre hatları mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve 1500 rpm’de 5 dk santrifüj (Beckman MICROFUGE 16, ABD) edilmiş ve üst faz atılmıştır. Besiyeri 850 µl, santrifüj edilen hücre hattı 50 µl ve %5 Trypan Blue çözeltisi 100 µl olmak üzere toplam hacim 1 ml’ye tamamlanarak karıştırılmıştır. Daha sonra Thoma lamına aktararak mikroskop (Olympus CKX41, Japonya) altında sayımı yapılmıştır. Her kuyucukta toplam 10.000 hücre olacak şekilde test uygulanmış her bir hücre grubu 96’lı plakada toplam hacim 100 µl olacak şekilde kültüre edildikten sonra gece boyunca 37 °C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Devamında hücrelere 50-500 µg/mL aralığında 24 saat boyunca ekstrakte melanin uygulanmıştır. İnkübasyondan sonra 2 kere PBS ile yıkanmış her kuyucuğa 10 µl Rezazurin eklenmiştir (1x). 10 saniye çalkalama işleminden sonra hücreler 3 saat boyunca normal kültür koşullarında inkübe edilmiş ve 595 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır. Her grup için 4 ölçüm alınmış ve bu ölçümlerin ortalaması ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Kalabalık, 2023).

Elde edilen sonuçlarla Graphpad Prism (10.5.0) programı kullanılarak hücre inhibisyonu yüzdesi ile log konsantrasyonu arasında doğrusal olmayan regresyon grafiği üzerinden IC₅₀ değerleri belirlenmiştir (Abraham ve Chauhan, 2018).

3.2.9. İstatistiksel Analizler

Aktinomiset gelişim eğrilerinde K3, B23 ve B25 kodlu *Streptomyces* türlerinin 21 gün boyunca günlük gelişimi, OD600’de absorbans değerleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Her biri için günlük 4 ölçüm sonucu elde edilmiştir. Suşların zaman içerisindeki değişimini istatistiksel olarak değerlendirmek amacıyla Repeated Measures ANOVA kullanılmıştır. Analizde “Zaman” within-subject faktörü, “Tür” ise between-subject faktörü olarak tanımlanmış ve tür × zaman etkileşimi incelenmiştir.

Anti-bakteriyel aktivite analizinde farklı *Streptomyces* türlerinden elde edilen ekstrakte melaninler, üç adet Gram-pozitif ve üç adet Gram-negatif bakteri türüne karşı anti-bakteriyel etkileri kuyucuk difüzyon yöntemiyle değerlendirilmiştir. Her ekstrakte melaninin 6 farklı bakteri grubuna karşı etkisi için dört ölçüm sonucu elde edilmiştir. Her bir bakteri türü için melaninlerin inhibitör zon çapları karşılaştırılmış ve tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) uygulanmıştır. Bağımlı değişken olarak inhibisyon zonu çapı (mm), bağımsız değişken olarak ise melanin türü (n=3) kullanılmıştır. ANOVA sonrası, gruplar arası farkların belirlenmesi için Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Analizlerde varyans homojenliği varsayımları Levene testi ve Q-Q grafikleri ile kontrol edilmiştir. Her bir bakteri türü için analizler ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

Tüm istatistiksel analizler Jamovi (Sürüm 2.6.17, Sydney, Avustralya) istatistik yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiş olup anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Farklı Kültür Ortamlarında Aktinomiset Gelişimi

Ekstraselüler pigment üretimi yüksek olan 6 izolatın (K3, B23, B25, O2, O26 ve Act21) farklı kültür ortamlarında gelişimi (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2, Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4) incelenmiştir. Seçilen tüm aktinomisetler 8 farklı kültür ortamının (ISP4, ISP7, BHIA, GMEA, NA, NA + %10 NaCl, NA + %10 Nişasta, NA + %10 GME) tamamında gelişim göstermiştir. Ekstraselüler pigment, pigmentin difüzyonu ve havasal misel incelenmiştir (Darwesh vd., 2020; Tang vd., 2019).

İzolatlar ekstraselüler pigmenti kendi çevresinde üretmiş ise tek artı işareti (+), petrinin bir bölgesini renklendirdiyse iki artı işareti (++), petrinin tamamı difüzlenmişse üç artı işareti (+++) olarak ifade edilmiştir. Bu değerlendirmeye ilave olarak oluşan renk açık ise tek artı işareti (+), koyu ise iki artı işareti (++) olarak ifade edilmiştir ve difüzyon yoğunluğu toplam beş artı işareti (+++++) üzerinden değerlendirilmiştir. Difüzlenen renk ve havasal misel gözlemlendiği şekilde aktarılmıştır.

Çizelge 4.1. İzolatların GMEA ve BHIA besiyerlerinde kültür özellikleri

Besiyeri	GMEA			BHIA		
Kod	Ekstraselüler Pigment	Difüzyon Yoğunluğu	Havasal Misel Rengi	Ekstraselüler Pigment	Difüzyon Yoğunluğu	Havasal Misel Rengi
K3	Turuncu	++++	Beyaz	Turuncu	++++	Beyaz
B23	Kahverengi	++++	Beyaz	Kahverengi	++++	Beyaz
B25	Kahverengi	++++	Beyaz-Gri	Kahverengi	+++++	Beyaz
O2	Turuncu	++++	Beyaz-Gri	Turuncu	++++	Beyaz
O26	Turuncu	++++	Beyaz	Turuncu	+++	Beyaz
Act21	Turuncu	++++	Beyaz	Turuncu	+++	Beyaz

GMEA ve BHIA besiyerinde (Çizelge 4.1) K3, O2, O26 ve Act21 kodlu izolatlar turuncu renkte ekstraselüler pigment üretimi yaparken B23 ve B25 izolatları kahverengi renkte ekstraselüler pigment oluşturmuştur. GMEA besiyerinde K3, B23, B25, O2, O26 ve Act21 izolatlarının tamamı açık renkte tüm petriyi difüzleyen ekstraselüler pigment üretmiştir. B25 ve O2 izolatları beyaz-gri renkte havasal misel; K3, B23, O26 ve Act21

izolatları beyaz renkte havasal misel oluşturmuştur. BHIA besiyerinde GMEA besiyerine göre B25 izolatının ekstraselüler pigment üretimi artarken, O26 ve Act21 kodlu izolatlarda ekstraselüler pigment üretiminde azalma görülmüştür. K3, B23 ve O2 kodlu izolatların ekstraselüler pigment üretiminde artma ya da azalma gözlenmemiştir. Seçilen tüm aktinomisetler beyaz renkte havasal misel oluşturmuştur. Çalışmada incelenen izolatların ekstraselüler pigment üretiminde azot kaynağı olarak GMEA ve BHIA besiyerlerini oldukça etkin bir şekilde kullanabildiği söylenebilmektedir.

Çizelge 4.2. İzolatların ISP4 ve ISP7 besiyerlerinde kültür özellikleri

Besiyeri	ISP4			ISP7		
Kod	Ekstraselüler Pigment	Difüzyon Yoğunluğu	Havasal Misel Rengi	Ekstraselüler Pigment	Difüzyon Yoğunluğu	Havasal Misel Rengi
K3	-	-	Gri	-	-	Beyaz-Gri
B23	Kahverengi	++	Gri	-	-	Beyaz-Gri
B25	Kahverengi	++	Gri	-	-	Beyaz-Gri
O2	-	-	Gri	-	-	Beyaz-Gri
O26	-	-	Beyaz-Gri	-	-	Gri
Act21	-	-	Beyaz-Gri	-	-	Gri

Bu çalışmada karbon kaynağı olarak kullanılan ISP4 besiyeri %27 oranında nişasta içermektedir. Bu besin ortamında (Çizelge 4.2) B23 ve B25'in kendi çevresinde kahverengi renkli ekstraselüler pigment ürettiği; K3, O2, O26 ve Act21'in ekstraselüler pigment oluşturmadığı gözlenmiştir. O26 ve Act21 beyaz-gri renkte havasal misel; K3, B23, B25 ve O2 izolatları gri renkte havasal misel oluşturmuştur. ISP7 besiyerinde (Çizelge 4.2) ise O26 ve Act21 izolatları gri renkte havasal misel; K3, B23, B25 ve O2 izolatları beyaz-gri renkte havasal misel oluşturmuştur. Hiçbir izolat bu kültür ortamında ekstraselüler pigment üretmemiştir. ISP4 besiyerinin inorganik tuz-nişasta içeriğinin izolatlar tarafından ekstraselüler pigment üretiminde etkin olarak kullanılamadığı görülmüştür. Benzer şekilde, ISP7 içeriğinde amino asit kaynağı olarak yer alan asparajin ve tirozin, çalışma kapsamındaki hiçbir izolat tarafından ekstraselüler pigment üretiminde kullanılamamıştır.

NA besiyerinde (Çizelge 4.3) en yüksek ekstraselüler pigment üretiminin B25 izolatında koyu kahverengi renkte olduğu ve tüm petriyi difüzlediği görülmüştür. B23 izolatında açık kahverengi renkte, K3, O2, O26 ve Act21 izolatlarında açık pembe renkte tüm petriyi difüzleyen ekstraselüler pigment üretimi görülmüştür. NA besiyerinde O2 izolatı beyaz-gri renkte havasal misel; K3, O26 ve Act21 izolatları gri renkte havasal misel; B23 ve B25 izolatları beyaz renkte havasal misel oluşturmuştur. NA besiyerinin GMEA ve BHIA besiyerlerinde olduğu gibi ekstraselüler pigment üretiminde etkin bir şekilde kullanılabilen bir azot kaynağı olarak ön plana çıktığı görülmektedir.

Çizelge 4.3. İzolatların NA ve NA + %10 NaCl besiyerlerinde kültür özellikleri

Besiyeri	NA			Nutrient Agar + %10 NaCl		
Kod	Ekstraselüler Pigment	Difüzyon Yoğunluğu	Havasal Misel Rengi	Ekstraselüler Pigment	Difüzyon Yoğunluğu	Havasal Misel Rengi
K3	Pembe	++++	Gri	Pembe	+++	Beyaz-Gri
B23	Kahverengi	++++	Beyaz	Kahverengi	+++	Beyaz-Gri
B25	Kahverengi	+++++	Beyaz	Kahverengi	+++	Beyaz-Gri
O2	Pembe	++++	Beyaz-Gri	Mor	+++	Beyaz-Gri
O26	Pembe	++++	Gri	Mor	+++	Beyaz-Gri
Act21	Pembe	++++	Gri	Pembe	+++	Gri

Farklı besin stresi içeren kültür ortamlarında ekstraselüler pigment üretimini incelemek amacıyla NA besiyerine tuz (Çizelge 4.3), karbon kaynağı olarak nişasta ve azot kaynağı olarak granüle maya ekstraktı (Çizelge 4.4) ilave edilmiştir.

NA besiyerine ilave edilen %10 tuz içeren kültür ortamında K3, B23, B25, O2 ve O26 izolatları beyaz-gri renkte havasal misel, Act21 izolatı gri renkte havasal misel oluşturmuştur. O2 ve Act21 izolatlarının havasal misel renklerinde değişiklik gözlenmezken, K3 ve O26 izolatlarının havasal miselleri griden beyaz-griye, B23 ve B25 izolatlarının havasal miselleri beyazdan beyaz-griye dönmüştür. NA besiyerine ilave edilen %10 tuz içeren kültür ortamında seçilen tüm aktinomisetlerin ekstraselüler pigment üretiminde azalmaya neden olurken, O2 ve O26 izolatlarında ekstraselüler pigmentin pembeden mora döndüğü görülmüştür. K3, B23, B25 ve Act21 izolatlarının ekstraselüler

pigmentlerinin renginde değişiklik gözlenmemiştir. Bu tuz oranı tüm suş ve izolatların gelişimini ve pigment üretimini baskılamıştır.

Tuz varlığının ortamın su aktivitesini düşürerek mikroorganizmaların gelişimine engel olabildiğı bilinmektedir. Bunun yanı sıra tuz, oksijenin kullanılabilirliğini ve mikroorganizmaların hücresel enzim aktivitesini de olumsuz etkileyebilmektedir (Henney vd. 2010). Tang vd. (2019) MK-45^T kodlu *Streptomyces* suşunun %6 tuz varlığına kadar gelişim gösterdiğini, Venkatachalam vd. (2019) ise kültür ortamında %6'nın üzerinde tuz bulunması durumunda tuz miktarının artışı ile ters orantılı bir şekilde pigment üretiminin azaldığını bildirmiştir. Bu nedenle, ortamda yüksek konsantrasyonda tuz bulunması durumunda izolatların ekstraselüler pigment üretiminde kullandığı enzimlerin üretiminin baskılandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.4. İzolatların NA + %10 Nişasta ve NA + %10 GME besiyerlerinde kültür özellikleri

Besiyeri	Nutrient Agar + %10 Starch			Nutrient Agar + % 10 Granule Yeast Extract		
Kod	Ekstraselüler Pigment	Difüzyon Yoğunluğu	Havasal Misel Rengi	Ekstraselüler Pigment	Difüzyon Yoğunluğu	Havasal Misel Rengi
K3	Pembe	++++	Beyaz-Gri	Pembe	+++	Beyaz
B23	Kahverengi	++++	Beyaz-Gri	Kahverengi	++++	Beyaz-Gri
B25	Kahverengi	++++	Beyaz-Gri	Kahverengi	+++++	Beyaz-Gri
O2	Pembe	+++	Beyaz-Gri	Turuncu	+++	Beyaz
O26	Mor	+++	Beyaz-Gri	Turuncu	+++	Beyaz
Act21	Pembe	++++	Gri	Pembe	++++	Beyaz

NA besiyerine ilave edilen %10 nişasta kültür ortamında (Çizelge 4.4) K3, B23, B25, O2 ve O26 izolatları beyaz-gri renkte havasal misel, Act21 izolatı ise gri renkte havasal misel oluşturmuştur. O2 ve Act21'in havasal misel renklerinde değişiklik gözlenmezken, K3 ve O26'nın havasal miselleri griden beyaz-griye, B23 ve B25'in havasal miselleri beyazdan beyaz-griye dönmüştür. NA besiyerine ilave edilen %10 nişasta kültür ortamında B25, O2 ve O26 izolatlarının ekstraselüler pigment üretiminde azalma görülürken, K3, B23 ve Act21'in ekstraselüler pigment üretiminde değişiklik gözlenmemiştir. NA besiyerinde bulunan azot kaynağına ek olarak karbon kaynağı olarak

ilave edilen %10 nişastanın bir arada kullanımının O26'nın ekstraselüler pigment üretimini pembeden mora dönüştürdüğü görülmüştür. Bu durum, O26 izolatının ekstraselüler pigment üretiminde NA besiyerine ilave edilen %10 nişasta varlığında farklı bir hücre içi mekanizma kullandığına işaret etmektedir. NA besiyerine ilave edilen %10 nişastanın K3, B23, B25, O2 ve Act21 kodlu izolatların ekstraselüler pigment renginde değişikliğe neden olmadığı görülmüştür.

Farklı karbon kaynaklarının aktinomiset gelişimine etkisini inceleyen English vd. (2017), USC-633 kodlu *Streptomyces* izolatının en iyi geliştiği karbon kaynağını rafinoz olarak tespit etmiş ve bu izolatın deniz tuzu eklendiğinde çok çeşitli karbon kaynaklarını kullanabildiğini gözlemlemiştir. Kulkarni vd. (2017) ise aktinomisetlerin şekeri kolayca fermente edebilmesi sebebiyle şeker takviyeli ortamlarda büyük ölçekte pigment elde edilebileceğini bildirmiştir. Bazı farklı karbon kaynaklarının aktinomiset ekstraselüler pigment rengine etkisinin olduğu ayrıca bilinmektedir. Tang vd. (2019) izole ettikleri MK-45^T kodlu *Streptomyces* suşunun iz element ve karboksimetil selüloz içeren katı besiyerinde mavi renkli pigment ürettiğini bildirmiştir. Ayrıca ISP3 kültür ortamında pembe, ISP5 kültür ortamında mavi renkli ekstraselüler pigment üretimi gözlemlemiştir.

NA besiyerine ilave edilen %10 granüle maya ekstraktı kültür ortamında (Çizelge 4.4) K3, O2, O26 ve Act21 beyaz renkte havasal misel, B23 ve B25 beyaz-gri renkte havasal misel oluşturmıştır. O2'nin havasal misel rengi beyaz-griden beyaza, K3, O26 ve Act21'in havasal misel rengi griden beyaza, B23 ve B25'in havasal misel rengi beyazdan beyaz-griye dönmüştür. NA besiyerine ilave edilen %10 granüle maya ekstraktı kültür ortamında O2 ve O26'nın ekstraselüler pigment renkleri pembeden turuncuya dönerken, K3, B23, B25 ve Act21'in ekstraselüler pigmentlerinde değişiklik gözlenmemiştir. NA besiyerine ilave edilen %10 granüle maya ekstraktı varlığında K3, O2 ve O26 kodlu izolatların ekstraselüler pigment üretimi azalırken B23, B25 ve Act21 kodlu izolatların ekstraselüler pigment üretiminde değişiklik olmadığı söylenebilmektedir. NA besiyerine ilave edilen %10 granüle maya ekstraktı kültür ortamında B25 oldukça iyi ekstraselüler pigment üretimi yapmıştır. Yapılan herhangi bir besin ilavesinin O2 ve O26 kodlu izolatların ekstraselüler pigment üretimini azalttığı gözlenmiştir.

Bu çalışmada K3, B23, B25, O2, O26 ve Act21 izolatları azot kaynakları (et suyu, maya ekstraktı, beyin ve kalp ekstraktı) ve karbon kaynakları ile birlikte içeren kültür ortamında gelişimi incelendiğinde tüm izolatların ekstraselüler pigment üretebildiği gözlenmiştir. Ancak, ISP4 besiyerinde bulunan nişasta kaynağı B23 ve B25 izolatları

haricinde, ISP7 besiyerinde bulunan azot kaynağı (asparajin ve tirozin) ise hiçbir izolat tarafından ekstraselüler pigment üretiminde kullanılamamıştır. Bu durum azot ve karbon kaynaklarının ekstraselüler pigment üretimi için gerekli olduğunu fakat her izolatın her karbon ve her azot kaynağını ekstraselüler pigment üretiminde kullanamadığını göstermektedir.

Ekstraselüler pigment üretiminde ortamda bulunan besin maddelerinin azlığı veya çokluğu, ortamın sıcaklığı, ortamın pH değeri, ortamda bulunan tuz miktarı, aynı kültür içindeki izolatların birbiri ile besin ulaşımında yarış içinde olmaları, ortamın aydınlık ya da karanlık olması, ortamda bulunan oksijen miktarı gibi birçok parametre etkilidir (English vd., 2017; Ng vd., 2019). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ve literatürde yer alan çalışmalar göz önünde bulundurularak farklı karbon ve azot kaynağına sahip kültür ortamlarında aktinomisetlerin ekstraselüler pigment üretiminde farklı hücre içi mekanizmaları kullandığı sonucuna varılmıştır.

K3, B23, B25, O2, O26 ve Act21 kodlu izolatların tamamı GMEA ve NA besiyerinde petrinin tamamını difüzleyen ekstraselüler pigment üretimi gerçekleştirmiştir. B25, BHIA ve NA kültür ortamında en yüksek ekstraselüler pigment üreten izolat olmuştur. Bu sebeple Nutrient kültür ortamı çalışma besiyeri olarak seçilmiştir. Çalışma besiyerinde en yüksek ekstraselüler pigment üretimi gözlenen B25 izolatına ilave olarak, ön denemelerde Nutrient sıvı kültür ortamında gelişimi daha iyi olan K3 ve B23 sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

NA kültür ortamında ve farklı besin ilavesi içeren NA kültür ortamlarında K3 izolatının ekstraselüler pigmentinin zamanla önce turuncuya sonra kahverengiye dönüştüğü görülmüştür. GMEA ve BHIA kültür ortamlarında ise turuncu olan ekstraselüler pigment zamanla kahverengiye dönüşmüştür. Majumder vd. (2018) besiyerlerinde pigmentleşme kaynaklı elde edilen kahverengi rengin tirozinaz, pembe rengin ise asparajinaz enzimleri aktivitesi sonucu meydana geldiğini belirtmiştir. Sistein varlığında tirozinaz enziminin aktivitesi ile melaninlerin farklı türleri olan kırmızı renkli feomelanin ve kahverengi-siyah renkli ömelanin sentezinin gerçekleştiği bilinmektedir (Ito, 2003).

Tüm kültür ortamlarında B23 ve B25 izolatlarının kahverengi renkli ekstraselüler pigment ürettiği gözlenmiştir. Literatür incelendiğinde kahverengi ve siyah renkli ekstraselüler pigmentlerin melanin türevleri ile ilişkilendirildiği çalışmaların bulunduğu görülmektedir. Kulkarni vd. (2017) en yaygın bilinen kahverengi rengin melanin olması ve izolatın kültür et suyunda siyah/kahverengi renk üretmesi sebebiyle bu pigmentin

melanin olduğunu bildirmiştir. Zainal Abidin vd. (2018) *Streptomyces sp.* K1-01 ve *Streptomyces sp.* K3-20'nin SCA kültür ortamında kahverengi ekstraselüler pigment ürettiğini, *Streptomyces sp.* K2-11'in ise SYE, ISP4 ve SCA kültür ortamında siyah ekstraselüler pigment ürettiğini gözlemlemiş ve siyah-kahverengi renkli ekstraselüler pigmentin genellikle melanin ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. El-Zawawy vd. (2024) de çalışmalarında kahverengi rengin melanin varlığına işaret olduğuna, Lorquin vd. (2022), kahverengi renginin özellikle L-DOPA kaynaklı melaninler ile ilişkili olduğuna değinmiştir. Ghadge vd. (2021) ve Restaino vd. (2024) ise kıvrıl renklerden başlayarak kahverengi ve koyu kahverengi tonlarına dönüşen renklerdeki pigmentlerin melanin olduğunu belirtmiştir.

Bu nedenle K3, B23 ve B25 izolatları tarafından üretilen ekstraselüler pigmentlerin melanin türevi olabileceği düşünülmekle birlikte, pigmentlerin yapısal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen daha kapsamlı analizlerden elde edilen sonuçlara ileriki bölümlerde yer verilmiştir.

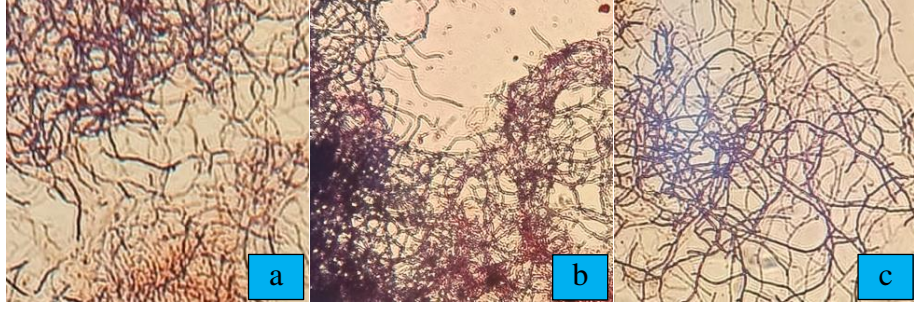
4.2. Aktinomisetlerin Mikroskop Görüntüleri

NA besiyerine ekimi yapılan K3, B23 ve B25 izolatlarının stereomikroskop görüntüleri 0,8-5,6 kat büyütülerek (Şekil 4.1) incelenmiştir. Ayrıca NA kültür ortamında izolatların miselleri steril öze ile lamele aktarıldıktan sonra gram boyama yapılmış ve ışık mikroskobu altında incelenmiştir.



Şekil 4.1. İzolatların stereo mikroskop altında koloni görüntüleri a) K3, b) B23, c) B25

K3, B23 ve B25 izolatlarının ışık mikroskobu altında bakteri hücre duvarı gram (+) ve morfolojik yapısı filament olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. İzolatların ışık mikroskobu görüntüleri a) K3, b) B23, c) B25

Aktinomisetler misel oluşturan filamentli bakterilerdir (Elhagrassy, 2018). Aktinomisetler Gram-pozitiftir ve hücre duvarları peptidoglikanın glikan kısmının muramik asit kalıntısı genellikle N-asetillenmiştir (Ludwig vd., 2012). Naligama vd. (2022) izole ettikleri tüm aktinomiset izolatlarını Gram-pozitif olarak bulmuştur. Ibeyaima vd. (2016) aktinomiset ailesine mensup *Yuhushiella* sp. TD-032, filamentli morfolojiye sahip Gram-pozitif olarak bulmuştur. Kazi vd. (2022) elde ettikleri 25 izolatı gram boyama ile ışık mikroskobu altında incelemiştir. Bu izolatların 22 tanesini Gram-pozitif olarak tespit etmiştir. Tanımladıkları tüm aktinomiset gruplarının Gram-pozitif olduğunu gözlemlemiştir.

K3, B23 ve B25 izolatları toprak kaynaklarından izole edilmiştir. Bu izolatlar stereomikroskop altında 0,8-5,6 kat büyütülerek incelenmiştir. Tüm izolatların NA kültür ortamında aktinomisetlerde olduğu gibi havasal misel oluşturduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.3). K3, B23 ve B25 izolatları gram boyama testine tabi tutulmuş ve ışık mikroskobu altında 1000 kat büyütülerek morfolojisi incelenmiştir. Işık mikroskobu altında Gram-pozitif oldukları ve iç içe geçmiş dallanan filamentlerin kümелendiği görülmüştür. Literatürde bazı aktinomisetlerin kokobasil ya da kokoid olduğu bildirilmektedir ancak bu çalışmada izole edilen hiçbir aktinomiset izolatında bu yapıya rastlanmamıştır.

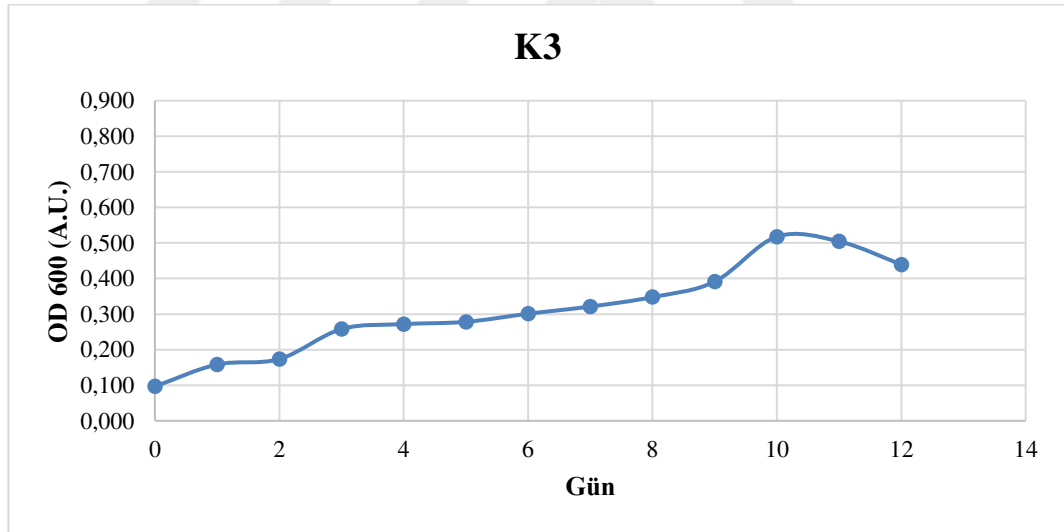
4.3. Aktinomisetlerin Gelişimi

Hücre bölünmesi sırasında tek bir mikrobiyal hücreden iki mikrobiyal hücre oluşmaktadır. Bölünmenin gerçekleştiği süre boyunca mikroorganizma sayısının ikiye katlandığı bu jenerasyon zamanındaki popülasyon artışı logaritmik üreme olarak ifade edilmektedir. Tüp, petri, şişe gibi kapalı bir kap içerisinde üreyen organizma sonsuza kadar logaritmik olarak gelişmemekte ve mikrobiyal popülasyon için tipik bir üreme eğrisi oluşmaktadır. Üreme eğrisi lag fazı, logaritmik (eksponansiyel) faz, durağan faz ve ölüm fazını içeren döngüyü ifade etmektedir (Madigan vd., 2013).

K3, B23 ve B25 izolatlarının bakteri gelişim eğrisi belirlemek amacıyla günlük alınan örneklerin 0. günden 21. güne kadar gelişimi 600 nm’de ölçülmüştür. Elde edilen verilerle bakteri gelişim eğrisi çizilmiştir (Madigan vd., 2013).

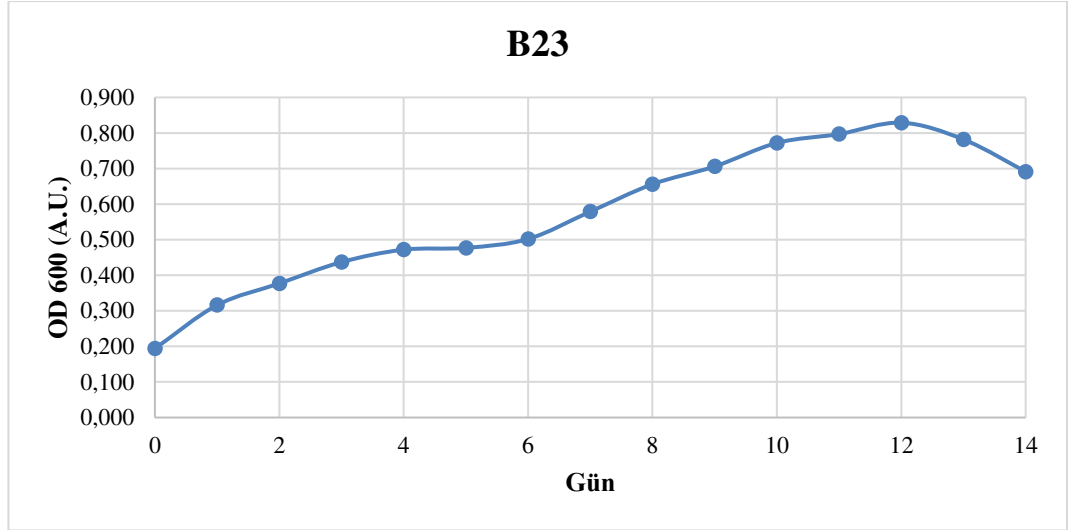
Aktinomisetler, ikincil metabolit olarak sınıflandırılan ve biyoaktif özellikleri olduğu bilinen ekstraselüler pigmentleri logaritmik fazın sonuna doğru üretmektedir (Madigan vd., 2013). Bu sebeple K3, B23 ve B25 izolatlarının gelişim fazları olan ortama uyum sağladığı faz (lag fazı), eksponansiyel olarak çoğaldığı faz (logaritmik faz), ikincil metabolitleri üretmeye başladığı faz (logaritmik fazın sonu) ve durağan faz dahil edilerek bakteri gelişim eğrileri çizilmiş ve sırasıyla Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5’te verilmiştir (Hodgson, 2000).

K3 izolatı 0. gün-1. gün arasında lag fazından (ortama uyum sağlama) logaritmik faza geçtiği, 1. gün-10. gün arasında logaritmik fazda (bakteri popülasyonunun arttığı) olduğu, 10. gün-11. günde durağan fazda (bakteri popülasyonunun artışı ve bakteri ölümü eşit) olduğu, 11. günden sonra ölüm fazına (bakteri ölümü bakteri popülasyonun artışından fazla) geçtiği görülmüştür (Şekil 4.3).



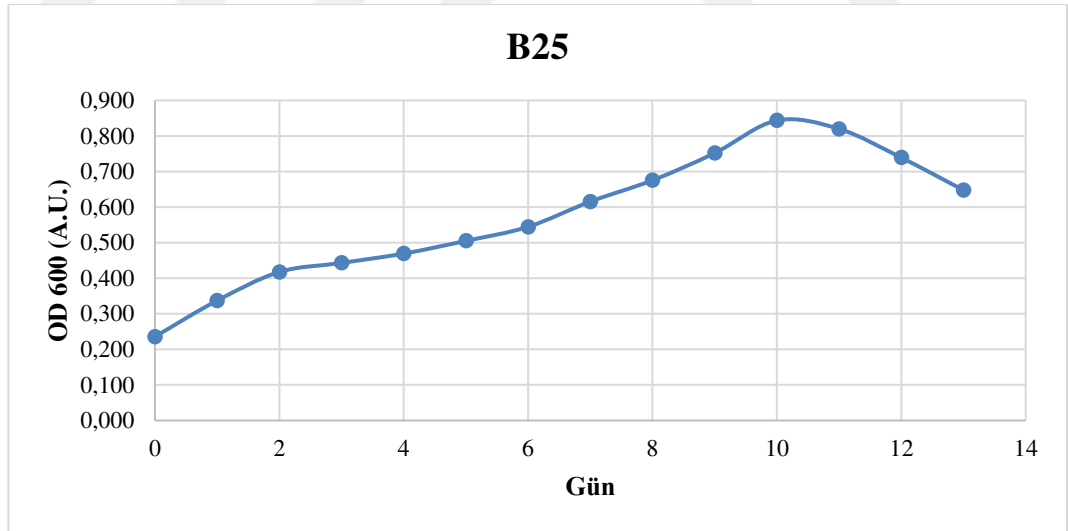
Şekil 4.3. K3 izolatının gelişim eğrisi

B23 izolatı 0. gün-1. gün arasında lag fazından (ortama uyum sağlama) logaritmik faza geçtiği, 1. gün-10. gün arasında logaritmik fazda (bakteri popülasyonunun arttığı) olduğu, 10. gün-13. günde durağan fazda (bakteri popülasyonunun artışı ve bakteri ölümü eşit) olduğu, 13. günden sonra ölüm fazına (bakteri ölümü bakteri popülasyonun artışından fazla) geçtiği görülmüştür (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. B23 izolatının gelişim eğrisi

B25 izolatı 0. gün-1. gün arasında lag fazından (ortama uyum sağlama) logaritmik faza geçtiği, 1. gün-9. gün arasında logaritmik fazda (bakteri popülasyonunun arttığı) olduğu, 9. gün-12. günde durağan fazda (bakteri popülasyonunun artışı ve bakteri ölümü eşit) olduğu, 12. günden sonra ölüm fazına (bakteri ölümü bakteri popülasyonun artışından fazla) geçtiği görülmüştür (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. B25 izolatının gelişim eğrisi

Bu çalışmada K3, B23 ve B25 izolatlarının gelişim eğrileri arasında zamana bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Diğer çalışmalarla kıyaslandığında aktinomiset gelişiminin daha yavaş olmasına rağmen daha uzun süre canlı kaldığı gözlenmiştir. Aktinomisetler tarafından üretilen metabolitlerin anti-biyotik,

anti-fungal, anti-maya, anti-viral gibi özelliklerinin olması aktinomisetlerin diğer mikroorganizmalara karşı hayatta kalmasını sağlamaktadır.

Horiuchi vd. (2009) *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Lactobacillus paracasei* (şimdiki adı *Lacticaseibacillus paracasei*) (Zheng vd., 2020) ve *Actinomyces naeslundii* bakteri suşlarının gelişimlerini incelemiştir. *Actinomyces*'in 10 saat boyunca gelişimini belirli aralıklarla aldığı 5 mL örneği 660 nm'de absorbansını ölçerek gelişim eğrisi oluşturmuştur.

Huang (2013) ise *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 ve *C. perfringens*'in suşlarının gelişimlerini incelemiştir. *E. coli* O157:H7 için 0-2 saat lag fazı, 2-10 saat logaritmik faz, 10-30 saat durağan faz olduğu, *L. monocytogenes* için 0-4 saat lag fazı, 4-18 saat logaritmik faz, 18-30 saat durağan faz olduğu, *C. perfringens* için 0-1 saat lag fazı, 1-4 saat logaritmik faz, 4-8 saat durağan faz olduğu görülmüştür. Tuttle vd. (2021) Laktoz Broth (LB) kültüründe geliştirdikleri 4 farklı *E. coli* suşunun gelişimini incelemiş ve saatte bir aldığı örneklerin 560 nm dalga boyunda ölçümlemleri almıştır. Tüm *E. coli* suşlarında 0-1 saat lag fazı, 1-6 saat logaritmik faz, 6-18 saat durağan faz olarak tespit etmiştir.

K3, B23 ve B25 izolatlarının gelişimlerinin çeşitli bakteri türleri (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Escherichia*, *Clostridium*) ve *Actinomyces naeslundii* (Horiuchi vd., 2009) aktinomisetine göre daha yavaş olduğu fakat daha uzun süre hayatta kaldığı görülmüştür. Literatürde Horiuchi vd. (2009) tarafından yapılan çalışma hariç aktinomisetlerin gelişim eğrilerine rastlanmamıştır. Aktinomisetlerin 10.000'den fazla ikincil metabolitin üreticisi olması (İbrahim vd., 2023) ve aktinomisetlerin ikincil metabolitleri logaritmik fazın sonuna doğru üretmeye başlaması sebebiyle aktinomisetlerden elde edilecek biyoaktif metabolitlerin ekstraksiyonunda aktinomiset gelişim eğrilerine daha fazla ihtiyaç vardır.

4.4. Moleküler Tanımlama

K3, B23 ve B25 izolatlarının toplam hücre DNA'sı hazır kit (Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit-ABD) ile izole edildikten sonra evrensel 8F ve 1492R primerleri (Lane, 1991) kullanılarak 16S rDNA gen bölgesi çoğaltılmıştır.

16S rRNA gen dizilimi, genin bu bölgesindeki evrim hızının yavaş olması nedeniyle filogenilerin oluşturulmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. (Woese ve Fox, 1977). *Actinobacteria*'nın güncel sınıflandırmasında 16S rDNA gen bölgesi analizi geçerliliğini koruyan önemli bir standart olarak kullanılmaktadır.

Bu kapsamda komşu birleştirme yöntemiyle yapılan filogenetik ilişkide *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşları *S. variabilis* referans suşu ile, *S. griseorubens* K3 suşu *S. griseorubens* referans suşu ile filogenetik olarak aynı dal içinde yakın ilişkide oldukları gözlenmiştir. *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarının aynı dalda yer aldığı görülmüştür. *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşları ile en yakın ilişkiyi çalışmada kullanılan *S. griseorubens* K3 suşu göstermiştir. Bu üç suş antikanser aktivitesi olan anthracycline metabolitinin üreticisi *S. xylophagus* (Moghannem vd., 2013) ile aynı dalda en yakın filogenetik ilişkiyi göstermiştir.

S. griseorubens K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşları sarı renkli pigment (Dholakiya vd., 2017b), melanin pigmenti üreticisi ve antimikrobiyal aktivitesi (Singh vd., 2016) olan *S. variabilis*, melanin üreticisi (Abdallah vd., 2022) *S. labedae*, sarı (Ngoc-Tung vd., 2024), turuncu (Nazeen vd., 2024) pigment ve melanin (El-Naggar vd., 2024) üreticisi *S. griseorubens*, melanin üretimi gözlenmeyen fakat lakton grubu antibiyotik üreticisi (Imai vd., 1987; Parte vd., 2012) *S. griseoflavus* ile daha yakın filogenetik ilişki göstermiştir. Melanin (Parte vd., 2012) üreticisi *S. collinus*, melanin (Gao vd., 2022) üreticisi *S. paradoxus*, turuncu renkli pigment üreticisi *S. ambofaciens* (Bunet vd., 2008), melanin (El-Naggar ve El-Ewasy, 2017) üreticisi *S. glaucescens* ile yakın filogenetik ilişki göstermiştir.

S. griseorubens K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşları melanin üreticileri olan *S. variabilis* (Singh vd., 2016), *S. labedae* (Abdallah vd., 2022), *S. griseorubens* (El-Naggar vd., 2024), *S. lienomycini* (Parte vd., 2012), *S. collinus* (Parte vd., 2012), *S. paradoxus* (Gao vd., 2022), *S. glaucescens* (El-Naggar ve El-Ewasy, 2017), *S. rubrogriseus* (Balakrishnan vd., 2024), *S. tritolerans* (Syed vd., 2007), *S. vinaceusdrappus* (Sedeeq vd., 2023), *S. rochei* (Periyasamy vd., 2018), *S. mutabilis* (Abulila vd., 2024), *S. levis* (Sayed vd., 2014) ile aynı dalda yer alırken *S. ossamyceticus* (Schmitz vd., 1965), *S. aureus* (Stapley vd., 1971), *S. neopectinius* (Han vd., 2008) ile farklı dalda yer aldığı görülmüştür. Kahverengi renkli pigmentin melanin olarak belirtildiği ve birçok *Streptomyces* türünün melanin üretebildiğini bildiren çalışmalar literatürde mevcuttur. Bu 3 suşun kahverengi renkli pigment üreten *S. chattanoogensis* (Andriambeloson vd., 2014) ve *S. coelicoflavus* (Rao vd., 2017) ile aynı dalda yer aldığı, *S. aurantiacus* (Parte vd., 2012; Vijayabharathi vd., 2011) ve *S. coelicolor* (Parte vd., 2012) ile farklı dalda yer aldığı görülmüştür.

S. griseorubens K3, daha önce yapılan bir çalışmada Aydın ilinde kestane ağacı toprağından elde edilmiştir (Erfilibeli, 2021). *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşları

ise Burdur ilinden alınan kızılçam toprağından elde edilmiştir. Yapılan inceleme sonucunda *S. griseorubens* ve *S. variabilis* suşlarının oldukça farklı ortamlardan izole edildiğine dair pek çok çalışmanın mevcut olduğu görülmüştür. Literatürde *S. griseorubens* suşlarının Mısır'da Dakahlia ve Damiatta şehirlerindeki domates tarlasından (Abdel-Aziz vd., 2021), Birleşik Arap Emirlikleri'nde Dubai'deki ateş ağacı toprağından (Al-Hamad vd., 2021), Birleşik Arap Emirlikleri'nde Abu Dabi'nin doğu sahillerindeki Mangrov (*Avicennia marina*) sedimentinden (Al Anoud vd., 2024), Suudi Arabistan'da Al Saman bölgesindeki Reda mağaralarından alınan toprak örneklerinden (Aly vd., 2020), Türkiye'de Sivas Gemerek'teki beyaz toprak örneğinden (Çetinkaya vd., 2020), Çin'de Şangay ilinde kompostla işlenen topraktan (Feng vd., 2015), Mısır'da Hurgada kıyısındaki Kızıldeniz'de 30 m derinlikten alınan yumuşak mercandan (Hamed vd., 2017), Güney Kore'de Jeju adasındaki Sehwa plajından alınan deniz sedimentinden (Heo vd., 2024), Hindistan'da Rajasthan bölgesindeki çöl topraklarından (Saritha vd., 2013), Hindistan'da Kovalam deney istasyonu yakınındaki tuz elek alanından alınan deniz börülcesinden (*Salicornia*), Çin'de Heilongjiang eyaletindeki pirinç toprağından (Xu ve Yang, 2010), Çin'de Weihai kıyısında Sarıdeniz'de 8 m derinlikten alınan deniz suyundan (Ye vd., 2009) izole edildikleri görülmüştür. *S. griseorubens* suşlarının Kuzey Afrika'da, Arap Yarımadasında, Türkiye'de, Güney ve Güneydoğu Asya'da izole edilmeleri bu suşun habitatının bu bölgelerdeki tarım alanları, çöl toprakları, deniz sedimentleri, mağaralar ve ağaçların rizosfer bölgeleri olduğu söylenebilmektedir.

S. variabilis suşlarının ise Hindistan'da Kanyakumari'de deniz kenarındaki tuz elek alanından (Bhattacharya vd., 2022), Hindistan'da Khambhat körfezindeki deniz sedimentlerinden (Dholakiya vd., 2017b), Hindistan'da Tamil Nadu eyaletinin Hosur şehrindeki bitki bahçesinden alınan kürek yaprağından (*Cantella asiatica*) (Manoharan vd., 2024), Vietnam'da Phu Tho eyaletinden alınan dağ biberi bitkisinin kökünden (*Litsea cubeba* (Lour.) Pers) (Quach vd., 2021), Hindistan'ın güneydoğu kıyısındaki Mannar körfezinde mercan (*Acropora formosa*) resiflerindeki mukus örneklerinden (Ramalingam ve rajaram, 2016), Hindistan'da Manakudy halicindeki mangrov ekosisteminden (Sanjivkumar vd., 2018), Hindistan'da Gomti nehri havzasından alınan toprak örneğinden (Singh vd., 2019), Mısır'da Nuweiba bölgesindeki halofilik bitkilerin (salatalık (*Cucumis sativus* L.) ve deniz börülcesi (*Salicornia europaea* L.)) rizosfer bölgesinden (Tolba vd., 2019), Çin'de Shennongjia eyaletindeki orman topraklarından (Zhao vd., 2016) izole edildikleri görülmüştür. Yapılan çalışmalarda Hindistan başta olmak üzere Kuzey Afrika'da, Arap Yarımadasında, Türkiye'de ve Güneydoğu Asya'da *S. variabilis*

suşlarının habitatının deniz sedimentleri, bitkilerin rizosfer bölgesi ve orman toprakları olduğu söylenebilmektedir.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde *S. griseorubens* ve *S. variabilis* suşlarının çoğunlukla bitki ve ağaçların rizosfer bölgesi ile deniz sedimentlerinden elde edildiği görülmüştür. Ayrıca *S. griseorubens* ve *S. variabilis* suşlarının yüksek tuz yoğunluğu içeren bölgelerden elde edildiği görülmüştür. Çalışmamızda *S. griseorubens* K3, *S. variabilis* B23 *S. variabilis* B25 suşlarının NA kültür ortamına %10 tuz ilavesinde gelişimine devam ettikleri ve ekstraselüler pigment üretiminin devam ettiği görülmüştür (Çizelge 4.3). *S. griseorubens* ve *S. variabilis* suşlarının Arabistan yarımadası ve Kuzey Afrika'nın çöl toprakları ile Hindistan'ın yüksek tuz yoğunluğu içeren topraklarından izole edilmesi, bu suşların yüksek sıcaklıklara ve yüksek tuz konsantrasyonlarına karşı dirençli olduğunu göstermektedir. *S. griseorubens* ve *S. variabilis* suşlarının direnç gösterdiği en yüksek sıcaklık değeri ve en yüksek tuz konsantrasyonu ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Bu konuda daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Streptomyces cinsi bakteriler, mezofilik bakteriler olmaları sebebiyle çok yüksek optimum gelişim sıcaklıklarına sahip değildir, ancak toprak kökenli olmaları sebebiyle oldukça büyük farklılıklar gösterebilen ortamlarda bulunabilmektedir. Çalışmamızda kullanılan ve tanımlaması yapılan *S. griseorubens* ve *S. variabilis* suşlarının çöl toprağı gibi günlük sıcaklık farkı yüksek olan ortamlar dahil çok çeşitli ortamlardan izole edildiği ile ilgili çalışmalar literatürde mevcuttur. Bu nedenle *S. griseorubens* ve *S. variabilis* suşlarının çeşitli ortamlarda gelişim gösterebilmelerinin ve ekstrem ortamlara uyum sağlayabilmelerinin DNA ve RNA yapılarının stabilitesini arttırdığı bilinen yüksek GC içeriği ile bağlantısı olabileceği düşünülmektedir (Galtier ve Lobry, 1997).

Ülkemizde Çetinkaya vd. (2020) tarafından izole edilen *S. griseorubens* K5 (beyaz toprak); Erfilibeli (2021) tarafından izole edilen *S. griseorubens* K3 (kestane ağacı toprağı), *S. variabilis* O6 (fıstık çamı toprağı), *S. variabilis* O7 (yosunlu toprak), *S. variabilis* O9 (incir ağacı toprağı) suşları ile birlikte bu çalışmada izole edilen *S. variabilis* B23 (kızılçam toprağı) ve *S. variabilis* B25 (kızılçam toprağı) suşları ülkemizde tanımlanan *S. griseorubens* ve *S. variabilis* suşlarıdır ve ülkemizdeki aktinomiset varlığının bilinmesinde öncü olduğu görülmektedir.

4.5. Aktinomiset Kültürlerinden Melanin Ekstraksiyonu

Pigmentlerin kimyasal yapılarına göre farklı yöntemler (asit ile çöktürme, solvent kullanımı, farklı kromatografik yöntemler vs.) kullanılarak ekstrakte edildiği literatürde

bildirilmiştir (El-Zawawy vd., 2024). Bu çalışmada *S. griseorubens* K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarının ürettiği kahverengi renkli ekstraselüler pigmentlerin ekstraksiyonu için ön denemelerde farklı yöntemler (sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı-sıvı ekstraksiyonu, asit ile çöktürme) denenmiş olup en iyi ekstraksiyonun sağlandığı asit ile çöktürme yöntemi (Silva vd., 2019) çalışmada kullanılacak ekstraksiyon yöntemi olarak belirlenmiştir.

Asitle çöktürme yönteminin özellikle melaninin ekstrakte edilmesinde kullanılan bir yöntem olduğu bilinmektedir (Silva vd., 2019). Melaninin çok yüksek bir negatif yüke sahip olması, molekül ağırlığının büyük olması ve hidrofobik bir yapısının olması gibi fizikokimyasal özellikleri, kimyasal yapısının analitik yöntemlerle belirlenip karakterize edilmesine engel teşkil etmektedir. Melanin pek çok çözücüde çözünmemekte ve kimyasal bozunmaya da yüksek direnç göstermektedir. (Tran-Ly vd., 2020). Asitle çöktürme yöntemi, melanin pigmentlerinin ekstraksiyonu için kullanılabilecek sınırlı yöntemler arasında yer almaktadır.

Melanin polimerlerinin oluşum süreci ve boyutları güçlü bir şekilde pH'a bağlıdır. Düşük pH agregatlaşmayı teşvik ederken, yüksek pH daha düşük polimerizasyon derecesine sahip küçük parçacıklara ve oligomerlere ayrılmasına neden olmaktadır. Bu süreç melaninin polielektrolit yapısının bir sonucu olup yapısında bulunan karboksil, indol, fenol, amin gibi grupların iyonlaşma durumunu etkilemektedir (El-Naggar ve El-Ewasy, 2017). Melaninin polielektrolit yapısı sebebiyle düşük pH ortamlarında çökelti oluşturarak kolayca elde edilebilmektedir. Asit ile ekstraksiyonun temel amacı çözeltinin pH değerini 2'nin altına inmesini sağlayarak organik asit ve asit safsızlıklarını gidermektir. Seyreltik hidroklorik asit ya da sülfirik asit kullanarak bu ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Bu ekstraksiyon işleminin gerçekleşmesi için ortamdan ekstrakte edilecek maddenin ekstraksiyon çözeltisi ile tepkime vermesi gerekmektedir. Asit ile ekstraksiyon düşük maliyetli olması, ekstraksiyon işleminin gözle görülebilir olması, santrifüjle kolayca ayrılabilmesi gibi avantajlarının yanında uzun işlem süresi, kimyasal kullanımı gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Mortimer, 2004).

Streptomyces türlerinin iyi birer melanin üreticisi olduğu bilinmektedir (Vasanthabharathi ve Jayalakshmi, 2020). *S. griseorubens* ve *S. variabilis* suşlarının melanin üretebildiği bildirilmiş (Singh vd., 2016; El-Naggar vd., 2024) fakat bu suşlardan melanin ekstraksiyonu hakkında bir bilgiye rastlanmamıştır. Ayrıca kahverengi renkli mikrobiyal pigmentin kromatografik ekstraksiyon ve asit ile ekstraksiyonunun yapıldığı görülmüş olup kahverengi renkli pigmentin melanin olduğu bildirilmiştir (El-Zawawy

vd., 2024). Bu kapsamda *S. griseorubens* K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarının ürettiği ekstraselüler pigmentlerin melanin yapısında olabileceği sonucuna varılmıştır. Melaninlerin süresiz olarak stabil kalan moleküller olmadığı bilinmektedir (d'Ischia vd., 2013). Bu sebeple melanin olduğu düşünülen pigmentlerin ekstraksiyonu izolatların gelişim eğrileri durağan fazı tamamlandıktan sonra ölüm fazına geçtiği noktada gerçekleştirilmiştir.

Literatürde *Streptomyces* türlerinin kültür ortamlarından yapılan melanin ekstraksiyonları kromatografik olarak kolonda saflaştırma ya da asit ile ekstraksiyonda ilave edilen asit (çoğunlukla (6M) HCl, H₂SO₄) ile kültür ortamının pH 2'nin altına inmesi sonrasında çöken melanin ekstraktının toplanması yoluyla yapılmaktadır. Bu konuda Madhusudhan vd. (2014) *S. lusitanus* DMZ-3 suşunun kültür ortamından uzaklaştırılmasından sonra pH 7'lik fosfat tamponuna karşı selüloz membrandan geçirerek 60-120 mesh boyutunda silika jel kolonda melanini saflaştırmıştır. Silva vd. (2019) *S. fildesensis* aktinomiset kültürünü ortamdan uzaklaştırdıktan sonra kültür ortamının pH değerini 2'nin altına düşürüp ekstrakte melanini toplamıştır. Bayram (2021) *Streptomyces* sp. MPPS2 suşunu kültür ortamından uzaklaştırdıktan sonra kültür ortamına 6 M HCl ilave ederek pH 2'nin altına düşürmüş ve çöken melanin ekstraktlarını toplamıştır. Ghadge vd. (2021) *S. hyderabadensis* 7VPT5-5R suşunu kültür ortamından uzaklaştırıp lizofilize ettikten sonra su içinde çözüp pH 2'nin altına düşürerek çöken melanin ekstraktını toplamıştır. Restaino vd. (2024) *S. nashvillensis*'ten melanini 5 M HCl ile kültür ortamının pH değerini 2'nin altına düşürdükten sonra su ile yıkamış ve işlemi ikinci defa tekrarlamıştır. Li vd. (2018) *Streptomyces* sp. kültür ortamından ve Restaino vd. (2022) *S. resoochromonoges* kültür ortamından melanin ekstraktlarını önce asit ile çöktürülerek elde edilmiş ve sonrasında kolondan geçirilerek melaninleri elde etmişlerdir.

Melanin ekstraksiyonu için gerçekleştirilen ön denemeler sırasında *S. griseorubens* K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarından elde edilen süpernatant liyofilize edildikten sonra toz halindeki ekstrakte melanine yapılan alkol ilavesinin (etanol, metanol) beyaz-krem rengine dönmesine neden olduğu gözlenmiştir. Kültür ortamına ilave edilen alkol ise zamanla kahverengi rengin kaybolmasına neden olmuştur. Ekstraksiyon ön denemelerinde kullanılan alkolün melanin yapısını etkilediği görülmüştür. Fakat ekstraksiyonun ilk aşamasında etanol ve metanol gibi alkol bazlı çözücülerin ilavesi sonrası elde edilen pigment ekstraktının beyazlamasına neden olan

problemin sebebine literatürde rastlanmamıştır. Asit ile ekstraksiyonda pigmentlerde renk değişikliği gözlenmemiştir.

Melaninlerin çözünürlüğü, elde edildiği kaynak, saflık oranı ve polimerizasyon durumu gibi faktörlere göre farklılık göstermektedir. Özellikle ortamın pH'sının çözünürlük miktarını etkilediği bilinmektedir. pH değerinin azalması ile birlikte melaninde agregasyon ve çökme meydana gelirken yüksek pH ortamlarında polimerizasyon zayıflamakta ve oligomer adı verilen polimer parçacıkları oluşmaktadır. Bu çalışma kapsamında elde edilen ekstrakte melanin pigmentlerinde gerçekleştirilen Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS) Kuadropol-Uçuş Zamanlı (Q-TOF) analizleri sonucunda ekstrakte melaninlerin içeriğinde varlığı tespit edilen reaktif öncül maddelerin yüksek pH değerlerinde monomerlerine parçalanması nedeniyle melanin sentezi reaksiyonunun devam etmesi ile birlikte ortamda reaktif oksijen türlerinin meydana geldiği (Hachinohe ve Matsumoto, 2005), melaninle ilişkili monomerlerin yapısında yer alan halkaların oksitlenerek açılması sonucu da melaninlerin renginin değişime uğramış olabileceği düşünülmektedir (Guo vd., 2023). Konu hakkında daha detaylı bilgiye ileriki pigment karakterizasyonu ile ilgili bölümlerde yer verilmiştir.

S. griseorubens K3 suşundan elde edilen ekstrakte melanin K3M, *S. variabilis* B23 suşundan elde edilen ekstrakte melanin B23M ve *S. variabilis* B25 suşundan elde edilen ekstrakte melanin B25M olarak isimlendirilmiş ve sonraki çalışmalarda elde edilen ekstrakte melaninler K3M, B23M ve B25M olarak ifade edilmiştir.

Konu hakkında daha detaylı bilgi edinebilmek ve melanin pigmentlerinin biyokimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla Morötesi ve Görünür Işık Spektrofotometrisi (UV-Vis), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) ve Nükleer Manyetik Rezonans (^1H NMR) analizleri ile çalışmaya devam edilmiştir.

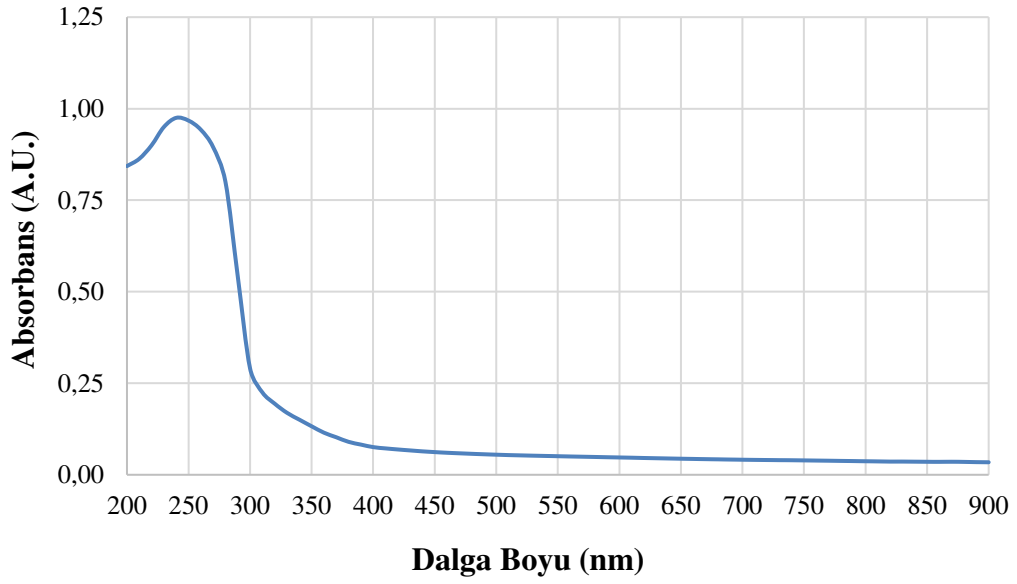
4.6. Aktinomiset Melanininin Yapısal Analizi

4.6.1. UV-Vis (Morötesi ve Görünür Işık)

K3M, B23M ve B25M'nin UV-Vis absorbans spektrumları sırasıyla Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da verilmiştir. Ekstrakte melaninlerin geniş spektrumda absorbans gösterdiği görülmektedir. Özellikle UV ışık spektrumunda (200-300 nm) yüksek absorbans gösteren ekstrakte melaninlerin 230-240 nm bandında azami absorbansa ulaştığı, görünür ışık spektrumuna gelindiğinde ise absorbanslarının dalga boyunun uzaması ile birlikte azalma gösterdiği belirlenmiştir. Üç suşun ekstrakte melanin

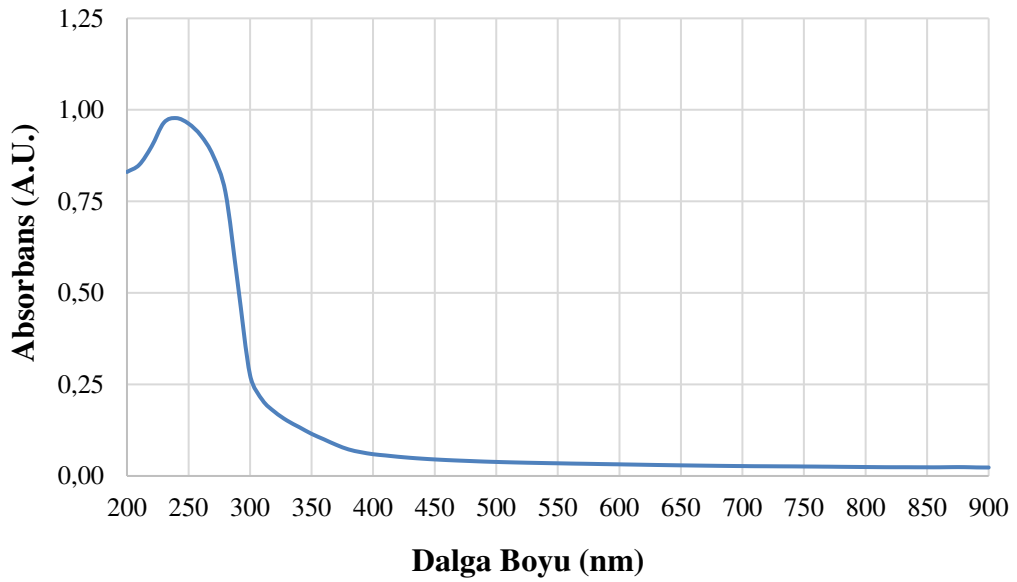
pigmentlerine ait UV-Vis spektrumları birbirleri ile oldukça benzer olarak elde edilmiştir. Bu durum, LC-MS Q-TOF analizleri sonucunda suşların ekstrakte melanin içeriklerinin benzer elde edilmiş olması nedeniyle beklenen bir sonuçtur.

K3M

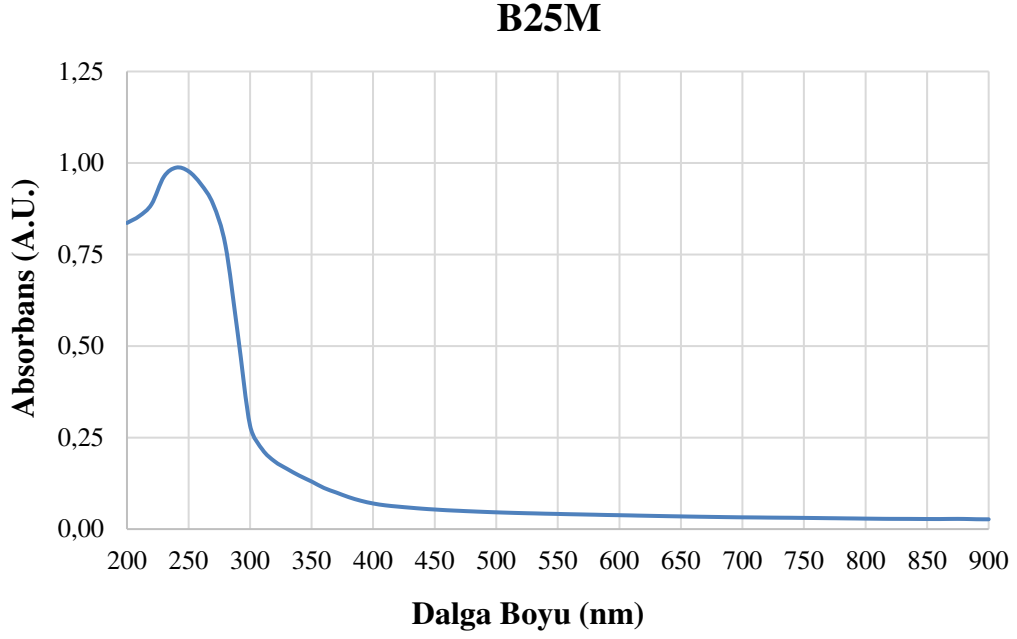


Şekil 4.7. K3M'nin UV-Vis absorbans spektrumu

B23M



Şekil 4.8. B23M'nin UV-Vis absorbans spektrumu



Şekil 4.9. B25M'nin UV-Vis absorbans spektrumu

Streptomyces türlerinden elde edilen melaninlerin UV-Vis absorbanslarının ölçüldüğü pek çok çalışma literatürde mevcuttur. Örnek olarak verilecek olursa;

- *S. djakartensis* NSS-3 suşundan elde edilen saflaştırılmış melanin 255 nm'de (El-Zawawy vd., 2024),
- *Streptomyces* sp. MR28 suşundan elde edilen ekstrate melanin 299 nm'de (Rudrappa vd., 2022),
- *S. lusitanus* DMZ-3 suşundan elde edilen melanin 200-300 nm'de (Madhusudhan vd., 2014),
- *S. glaucescens* NEAE-H suşundan elde edilen saflaştırılmış melanin 250 nm'de (El-Naggar ve El-Ewasy, 2017),
- *S. cyaneus* bakterisinden elde edilen kurutulmuş melanin pigmenti 200-400 nm'de (El-Batal vd., 2017),
- *S. cyaneofuscatus* olarak tanımlanan bakteriden elde edilen melanin pigmenti 274 nm'de (Al Khatib vd., 2018),
- *S. cavourensis* SV 21 suşundan elde edilen melanin 230-400 nm'de (Wibowo vd., 2022),
- *Streptomyces* sp. MPPS2 suşundan elde edilen saflaştırılmış melanin 260 nm'de (Bayram, 2021),

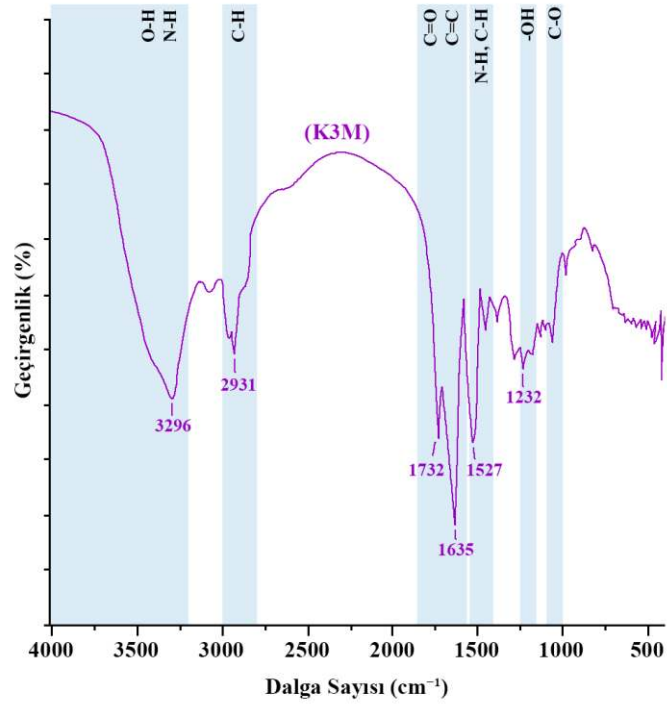
- *Streptomyces sp.* ZL-24 suşundan elde edilen melanin pigmentleri 207 ve 213 nm’de (Wang vd., 2019),
- *S. parvus* BSB49 suşundan elde edilen saflaştırılmış melanin pigmenti 230 nm’de (Bayram vd., 2020),
- *S. cavourensis* RD8 suşundan elde edilen melanin pigmenti ise 310 nm’de (Dholakiya vd., 2017a) azami absorbands göstermiştir.

İlgili tüm çalışmalarda, görünür ışık spektrumunda dalga boyu arttıkça absorbandsın azaldığı bildirilmiştir. Melanin pigmentleri, polimerik moleküllerinde bulunan karmaşık konjuge yapılar nedeniyle kendilerine has bir absorbands profiline sahip olup kısalan dalga boylarında spesifik olmayan bir absorbands artışı göstermektedir (Cockell ve Knowland, 1999). Özellikle UV ışık spektrumunda azami absorbandsın sağlanması ve görünür ışık tayfında dalga boyu uzadıkça absorbandsın düzenli olarak azalma göstermesi melanin pigmentlerinin bilinen karakteristik özelliği olup çalışmamız kapsamında elde edilen UV-Vis absorbands sonuçları literatür ile uyumludur.

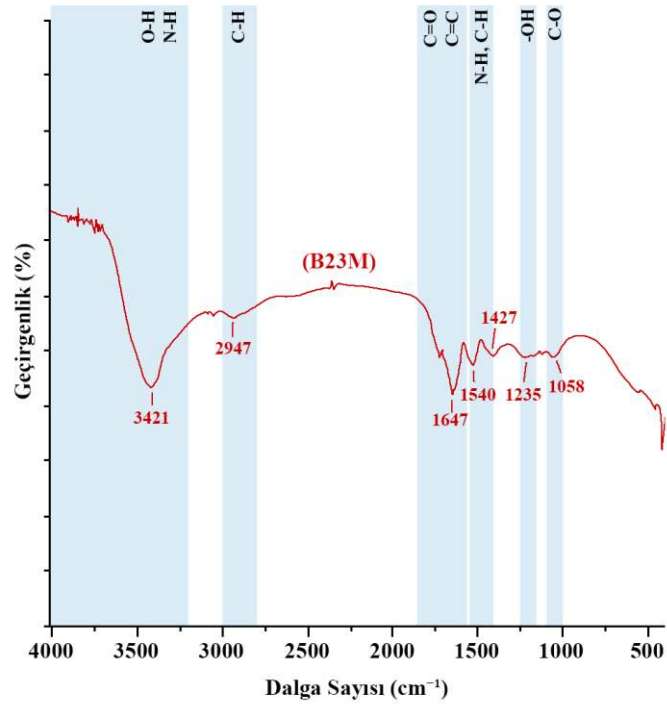
4.6.2. FT-IR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi)

K3M, B23M ve B25M’nin FT-IR spektrumları sırasıyla Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’de verilmiştir. Çizelge 4.5’te de melanin ekstraktlarının FT-IR spektrumları görülmektedir. Çizelge 2.2’de verilen bilgiler ışığında çalışmamız kapsamında elde edilen melanin ekstraktlarının moleküler içeriği tahmini olarak yorumlanabilmiştir.

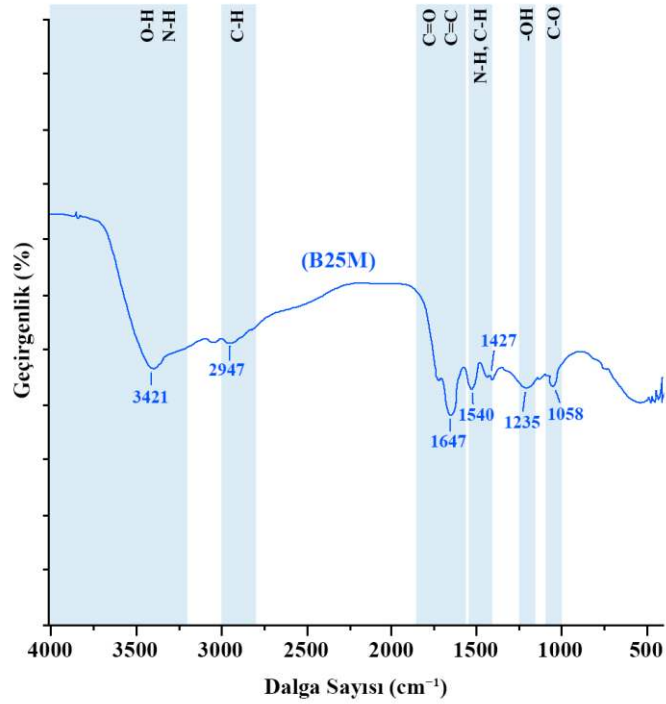
K3M ekstrakte melanininin 3296 cm^{-1} , B23M ve B25M’nin ise 3421 cm^{-1} bandında gerçekleştirdiği güçlü titreşim, yapılarında hidroksi (O-H) veya amin (N-H) gruplarının olabileceğini göstermektedir. Bu yapılar, indolik veya pirolük sistemlerin içeriğinde bulunan amin, amid, karboksi gibi fonksiyonel gruplara aittir. 2931 ve 2947 cm^{-1} bantları, alifatik C-H grubu kaynaklı bir gerilme titreşimi sonucu meydana gelmiştir (El-Naggar ve El-Ewasy, 2017). 1732 cm^{-1} bandı, karbonil grubu (C=O) içeren bir karboksilik asit, keton, kinon veya alifatik ester benzeri bir grup kaynaklı olduğunu göstermektedir. 1647 ve 1635 cm^{-1} bantları, C=C veya C=O üzerinde gerçekleşen gerilme titreşimi kaynaklı olup alken, aromatik halka veya alifatik bir ketonun varlığına işaret etmektedir (Socrates, 2001). 1527 ve 1540 cm^{-1} bantlarında elde edilen titreşim, indol grubu üzerinde bulunan N-H bükülme titreşimi kaynaklı gerçekleşmiş olup 1232 ve 1235 cm^{-1} bantlarında ise fenolik bir hidroksi (-OH) grubuna aittir (Bridelli ve Crippa, 2010; Pralea vd., 2019).



Şekil 4.10. K3M'nin FT-IR spektrumu



Şekil 4.11. B23M'nin FT-IR spektrumu



Şekil 4.12. B25M'nin FT-IR spektrumu

Çizelge 4.5. K3M, B23M ve B25M'nin FT-IR spektrumu analiz sonuçları

Ekstrakte Melanin	Ekstrakte Melaninlere ait Geçirgenlik Pikleri (cm ⁻¹)
K3M	3296, 2931, 1732, 1635, 1527, 1232
B23M	3421, 2947, 1647, 1540, 1427, 1235, 1058
B25M	3421, 2947, 1647, 1540, 1427, 1235, 1058

FT-IR spektrumundan elde edilen kızıl ötesi ışın absorpsiyon pikleri, melanin için karakteristik olan indol gruplarının varlığına işaret etmektedir (El-Naggar ve El-Ewasy, 2017). Sonuçlar (Çizelge 4.5), Singla vd. (2021), Singh Parmar ve Singh (2018) ve Silva vd. (2019) ile benzerlik gösterirken FT-IR absorpsiyon bantlarında B23M ve B25M'nin 3421, 2947, 1647, 1540, 1427, 1235 ve 1058 cm⁻¹'de verdiği FT-IR bantları El-Naggar ve El-Ewasy (2017)'nin *S. glaucescens*'ten elde ettiği melanine ait 3421, 2947, 1647, 1539, 1423, 1240, 1058 ve 864 cm⁻¹'deki FT-IR bantları ile uyumludur.

Singh Parmar ve Singh (2018) aktinomiset izolatından elde ettikleri ekstrakte melaninin karakterizasyonunu yapmıştır. FT-IR spektroskopisinde elde edilen spektrumda, 3422 cm⁻¹'de (Hidroksit grubu veya amin grubu), 2893 ve 2834 cm⁻¹'de (Aromatik veya benzen grubu), 1761 cm⁻¹'de (Lakton grubu) ve 1643 cm⁻¹'de alifatik grup gösteren güçlü bantlar gösterdiği bildirilmiştir. Silva vd. (2019) *Streptomyces fildesensis* türü aktinomisetten elde ettikleri kahverengi renkli pigmentin FTIR

spektrumunda OH grubu varlığına karşılık gelen 3253 cm^{-1} 'de geniş bir bant, 2929 cm^{-1} 'de bulunan bir bant, 1643 cm^{-1} 'de gözlenen titreşim bandı, 1418 cm^{-1} 'de bant, 1337 cm^{-1} ve 998 cm^{-1} 'de gözlenen titreşim bandı olduğunu belirtmiştir.

Nayaka vd. (2020b) *Streptomyces* sp. KAS-1 suşundan metanol ekstraksiyonu ile elde ettikleri kahverengi renkli pigmentin FT-IR spektrumunda 618 cm^{-1} ve 868 cm^{-1} 'deki titreşim bantlarının C-Br alkil gruplarına ve C-Cl alkil halojenürlerine, 1044 cm^{-1} 'de gerilme bandının C-N alifatik aminlere, 1119 cm^{-1} 'de gerilme bandının C-N alifatik aminlere, 1274 cm^{-1} 'de gerilme bandının C-H alkil halojenürlere, 1315 cm^{-1} 'de simetrik gerilme bandının aromatlara, 1384 cm^{-1} 'de gerilme bandının CH_2 / C-H alkanlara, 1415 cm^{-1} 'de gerilme bandının fenazin halkalarına, 1471 cm^{-1} 'de gerilme bandının CH_2 polietilene, 1630 cm^{-1} 'de gerilme bandının N-H aminlerine, 2853 cm^{-1} 'de gerilme bandının C-H alkanlarına, 2924 cm^{-1} 'de gerilme bandının H-C=O: C-H aldehytlere, 2960 cm^{-1} 'de gerilme bandının C-H alkanlarına ve 3441 cm^{-1} 'de gerilme bandının O-H alkollerin farklı fonksiyonel gruplarının varlığına işaret ettiğini belirtmiştir.

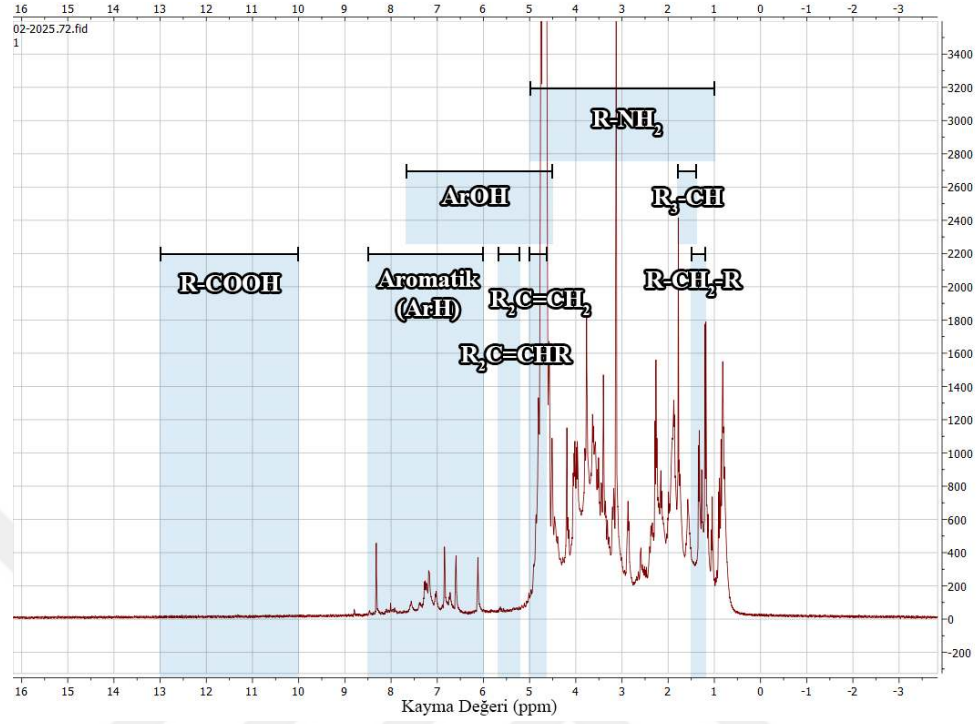
Genel itibarıyla B23M ve B25M kodlu ekstrakte melaninlerinin aynı bantlarda benzer pikler verdiği, K3M kodlu ekstrakte melanininin biraz daha farklı bantlarda daha şiddetli geçirgenlik piklerine sahip olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar, B23M ve B25M'nin yapılarında bulunan fonksiyonel grupların kimyasal özellikleri ve miktarları açısından birbirlerine oldukça benzer olduğunu, K3M'nin ise fonksiyonel grup içeriğinin diğer ikisiyle benzer olmakla birlikte geçirgenlik derinliğini arttıracak şekilde daha yüksek konsantrasyonlarda bulunduğunu göstermektedir (Smith, 2024). Titreşim bantlarında elde edilen farklılıkların, K3M pigmentinin içeriğinde yer alan kimyasal bağların birbirlerine ile olan moleküler etkileşimlerinin doğası (hidrojen bağları, dipol-dipol etkileşimleri gibi) ve konsantrasyon farkından kaynaklandığı düşünülmektedir (Ryu vd., 2011).

4.6.3. ^1H NMR (Nükleer Manyetik Rezonans)

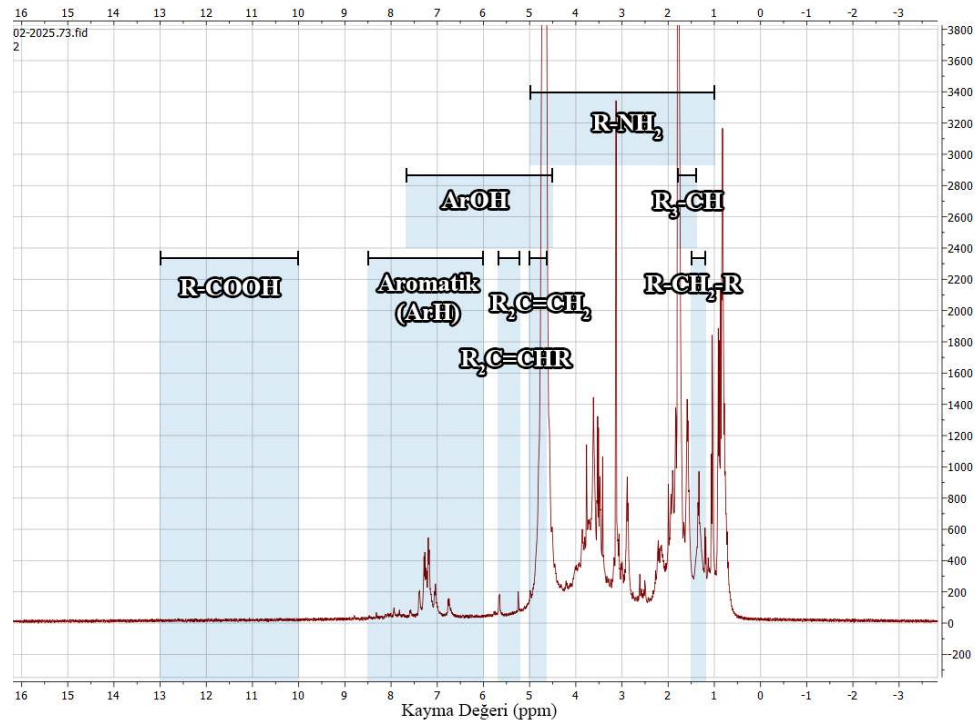
Bu çalışma kapsamında elde edilen K3M (Şekil 4.13), B23M (Şekil 4.14) ve B25M (Şekil 4.15) kodlu ekstrakte melaninlerin ^1H NMR spektroskopisi ile ^1H NMR spektrumları elde edilmiştir.

Ekstrakte pigment ekstraktlarının kayma gerilimi spektrum sonuçları Çizelge 4.6'da verilmiştir. ^1H NMR spektrumunda K3M $8,36, 7,17, 6,84, 6,59, 6,13, 3,40-4,70, 3,12, 0,80-2,90\text{ }\delta_{\text{H}}$ (ppm); B23M $7,38, 7,29, 6,74, 4,69, 2,90-3,80, 1,78, 0,80-1,60\text{ }\delta_{\text{H}}$ (ppm); B25M ise $8,49, 7,25, 6,85, 4,70, 0,80-4,20\text{ }\delta_{\text{H}}$ (ppm) bölgelerinde pik vermiştir.

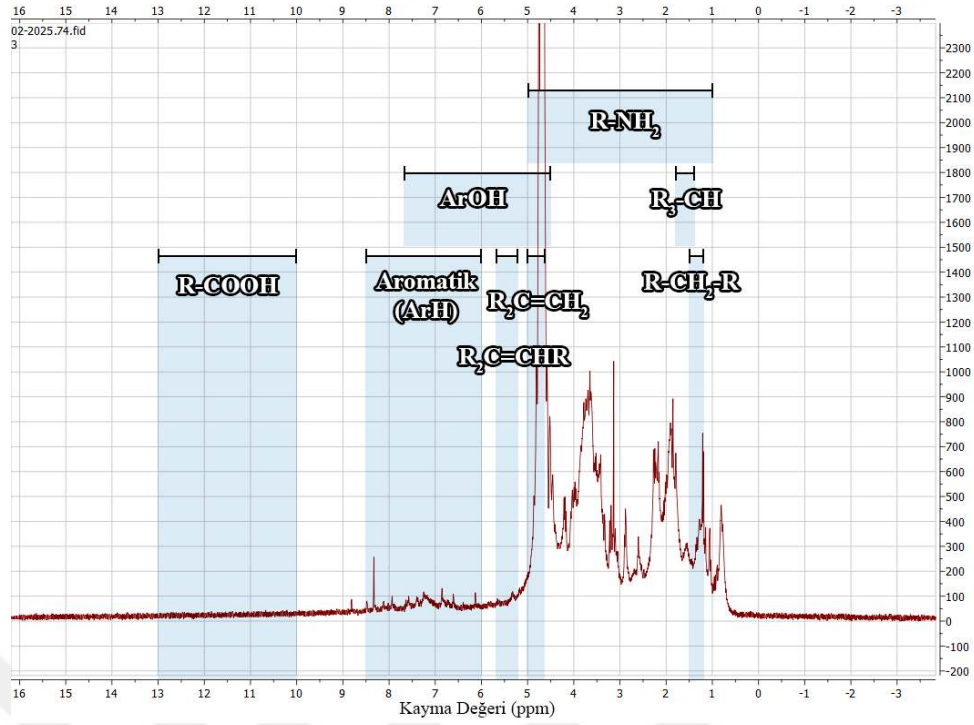
Çizelge 2.3’de verilen bilgilerden yola çıkarak çalışmamızda elde edilen pigment ekstraktlarının moleküler yapıları tahmini olarak yorumlanabilmektedir.



Şekil 4.13. K3M’nin 1H NMR spektrumu



Şekil 4.14. B23M’nin 1H NMR spektrumu



Şekil 4.15. B25M'nin ^1H NMR spektrumu

Çizelge 4.6. K3M, B23M ve B25M'nin ^1H NMR spektrumu analiz sonuçları

Ekstrakte Melanin	Ekstrakte Melaninine ait δ_{H} (ppm)
K3M	8,36; 7,17; 6,84; 6,59; 6,13; 3,40-4,70; 3,12; 0,80-2,90
B23M	7,38; 7,29; 6,74; 4,69; 2,90-3,80; 1,78; 0,80-1,60
B25M	8,49; 7,25; 6,85; 4,70; 0,80-4,20

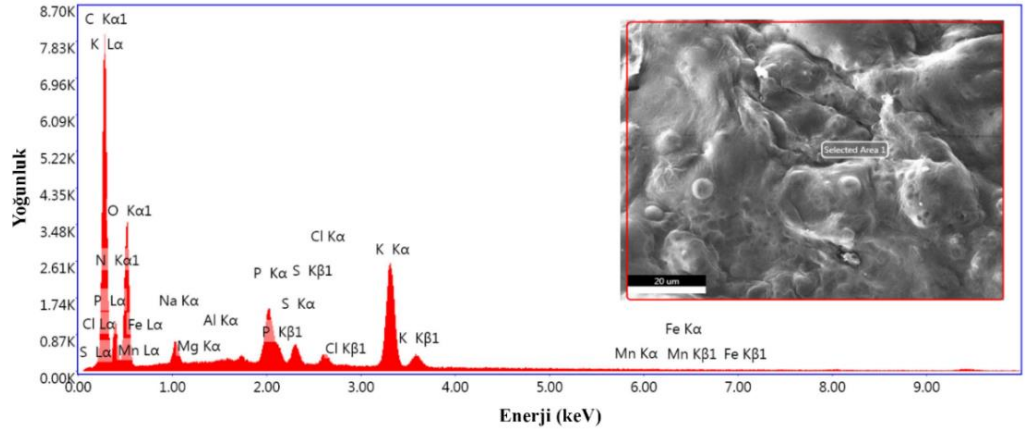
K3M, B23M ve B25M kodlu ekstrakte melaninlerde 0,50-2,50 ppm aralığında verilen sinyaller çeşitli alkil parçacıklarla ilişkilendirilen alifatik bölgeye aittir (Singh vd., 2021a). 0,60-2,40 ppm aralığı sinyallerin melanin yapısı üzerinde bulunan protein kalıntıları nedeniyle olabileceği bildirilmiştir (Bayram, 2021). B23M'de 0,80-1,60 ppm aralığında elde edilen rezonanslar, alkil grupları parçaları nedeniyle; 1,78 ppm noktasında elde edilen şiddetli pik ise, etilen karbon atomuna bağlı $-\text{CH}_3$ grupları nedeniyle meydana gelmiştir (Saini ve Melo, 2015). K3M ve B25M'ye ait 2,00-3,00 ppm arası piklerin, indol grupları üzerinde bulunan NH- bağlarından kaynaklandığı düşünülmektedir (Barretto ve Vootla, 2020). Tüm ekstrakte melaninlerde 3,20-4,20 ppm arasında görülen pikler azot ve/veya oksijen atomlarına bağlı olan metil veya metilen grupları kaynaklıdır (Wakamatsu ve Ito, 2023). Amino asit kalıntıları kaynaklı safsızlıkların da bu bölgede sinyal verdiği bildirilmiştir. Tüm ekstrakte melaninlerde 4,69-4,70 ppm bandında elde edilen şiddetli rezonanslar, analizde kullanılan çözücünden (su) kaynaklandığı için ihmal

edilebilmektedir (Khalil vd., 2016). 6,00-8,00 ppm aralığında yer alan spektrum piklerinin aromatik grupları üzerinde bulunan farklı protonları ifade ettiği düşünülmektedir (Katritzky vd., 2002). Tüm ekstrakte melaninlerde 6,60-7,10 ppm bölgesinde bulunan rezonanslar, vinilik protonların (C=C) varlığını kanıtlamaktadır (Bayram, 2021). Özellikle 7,20 ppm civarında yer alan rezonanslar indol/pirol halkaları üzerinde bulunan aromatik hidrojenlere işaret etmektedir (Barretto ve Vootla, 2020). B23M'nin 6,74 ve 7,04 ppm noktalarında bulunan pikler benzen -CH grupları ile ilişkilendirilebilmektedir. 7,20-8,00 ppm aralığında elde edilen pikler melanin yapısında olduğu bilinen indol gruplarının, 8,20-8,50 ppm aralığında elde edilen sinyaller ise, karboksil grubu içeren indolün pirol halkasındaki -CH varlığını göstermektedir (Singh vd., 2021a). 8,40 ppm noktasına yakın bulunan piklerin, aromatik grubu üzerinde bulunan -N=CH gruplarından kaynaklandığı düşünülmektedir (Saini ve Melo, 2015).

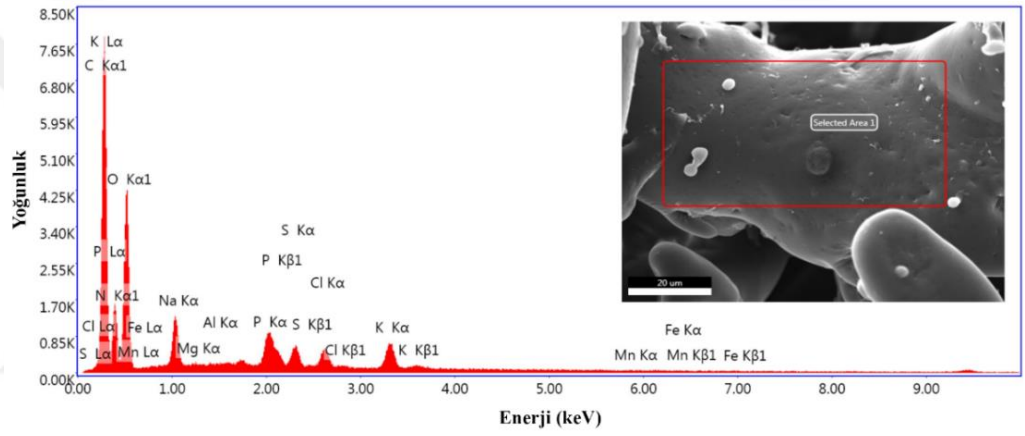
K3M, B23M ve B25M'nin ¹H NMR spektrumları hem aromatik hem de alifatik bölgelerde sinyaller göstermiştir. Melaninlerin aromatik halkalardan meydana gelen pigmentler olduğu bilinmekle birlikte, sentetik veya doğal melaninin yapılarında alifatik parçalanma ürünlerini de bulundurduğu bilinmektedir (Duff vd., 1988). Bu durum, melaninlerin stabilitesini zamanla çeşitli nedenlerden dolayı kaybeden moleküller olmasından kaynaklanmaktadır. Sentezlenmeleri sırasında bile değişikliğe uğrayabilen melaninler, yapılarında bağlı kalan su miktarına bağlı olarak farklı fiziksel özellikler de gösterebilmekte olup özellikle asit-baz ekstraksiyonunun ekstrakte edilen melaninin son morfolojisini etkileyebildiği bilinmektedir (d'Ischia vd., 2013; Singla vd., 2021). Elde edilen ¹H NMR spektrumları, ekstrakte melaninlerin oldukça karmaşık yapılara sahip olduğunu göstermekte olup K3M, B23M ve B25M kodlu ekstrakte melanin pigmentlerinin genel itibarıyla literatürde yer alan melaninlerle uyumlu olduğu görülmektedir. Özellikle aromatik bölgede görülen çizgi genişlemelerinin melanin polimerlerinin düzensiz yapısal doğasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Bayram vd., 2020).

4.6.4. SEM-EDS (Taramalı Elektron Mikroskobu-Enerji Dağıtıcı X-ışını Spektroskopisi) Görüntüsü

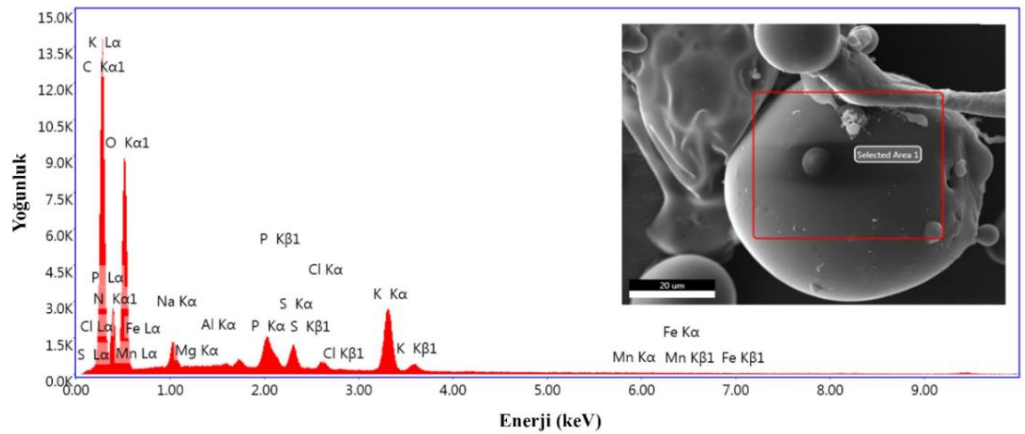
SEM görüntüsü alınan K3M, B23M ve B25M ekstrakte melaninlerinin tamamı El-Naggar ve El-Ewasy (2017) ile Li vd. (2018)'de bildirildiği gibi amorf (düzensiz) bir şekil desenine sahiptir. Bu pigment ekstraktlarından K3M (Şekil 4.16) ve B23M (Şekil 4.17) gözenekli ve pürüzlü bir yapıya sahip olup B25M (Şekil 4.18) pürüzsüz bir yapıdadır.



Şekil 4.16. K3M'nin taramalı elektron mikroskobu altındaki (SEM) görüntüsü ve enerji dağıtıcı spektroskopi (EDS) ile element analizi sonucu



Şekil 4.17. B23M'nin taramalı elektron mikroskobu altındaki (SEM) görüntüsü ve enerji dağıtıcı spektroskopi (EDS) ile element analizi sonucu



Şekil 4.18. B25M'nin taramalı elektron mikroskobu altındaki (SEM) görüntüsü ve enerji dağıtıcı spektroskopi (EDS) ile element analizi sonucu

Melaninlerin SEM görüntülerinin incelendiği çalışmalarda El-Naggar ve El-Ewasy (2017) *S. glaucescens* NEAE-H suşundan elde ettikleri melaninin küçük küreler şeklinde yapısal bir düzene sahip olduğunu fakat *S. bikiniensis*'ten elde edilen melaninin SEM görüntüsünde yapısal düzen olmayan küçük küreler şeklinde olduğunu belirtmiştir. Li vd. (2018) ise melaninin SEM görüntüsünde siyah parçacıklardan oluşan, gözenekli yüzeyi olan, pürüzsüz ve düzensiz bir yapı olduğunu belirtmiştir. Ghadge vd. (2021) saflaştırılmış melaninin SEM görüntüsü bildirilen bakteriyel saflaştırılmış melanine kıyasla amorf (düzensiz) bir şekil deseni gösterdiğini bildirmiştir. İncelenen literatür çalışmalarında düzensiz bir yapıda yuvarlak ve elips şekillerde olduğu ifade edilen melanin görüntüsünün K3M, B23M ve B25M kodlu ekstrakte melanin görüntüleri ile uyumlu olduğu anlaşılmıştır.

S. griseorubens K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarına ait K3M (Şekil 4.16), B23M (Şekil 4.17) ve B25M (Şekil 4.18) kodlu ekstrakte melaninlerin EDS spektrumlarında melaninlerin yapıtaşları olan karbon, oksijen, azot ve kükürt elementlerini baskın miktarlarda içerdikleri görülmektedir (Çizelge 4.7). Tüm pigmentlerde genel olarak Na, P, Cl, K bulunmaktadır. İhmal edilebilir miktarlarda besiyeri ya da spektrofotometri bileşenleri olduğu düşünülen Mg, Al, Mn ve Fe görülmektedir. K3M yüksek miktarda K içermektedir. Çalışmamızda elde edilen pigmentlerin literatürde yer alan *Streptomyces* melanin pigmentlerine benzer içeriğe sahip olduklarını söylemek mümkündür.

Çizelge 4.7. K3M, B23M ve B25M ile bakteriyel melaninin element yüzdeleri

Ekstrakte Melanin	C (%)	O (%)	N (%)	S (%)	Diğer (%)
K3M	39,34	24,39	10,09	1,36	24,82
B23M	42,85	28,13	13,23	1,48	14,29
B25M	34,29	33,06	15,08	1,88	15,68
<i>Streptomyces</i> sp. MR28 melanini (Rudrappa vd., 2022)	43,34	26,43	13,94	1,15	15,14

Ghadge vd. (2021) *S. hyderabadensis* 7VPT5-5R suşundan elde edilen melaninin element analizinde, C, H, N ve S'nin sırasıyla %27,38, %4,50, %5,08 ve %0,88'lik bileşim yüzdesi gösterdiğini bildirmiştir.

Melaninlerin temel özellikleri ve fonksiyonları benzer olmakla birlikte homojen maddeler olmamaları sebebiyle melaninleri oluşturan monomerler birbirlerinden farklılık gösterebilmektedir. Bu farklılık Çizelge 4.7'de görüldüğü üzere özellikle melaninlerin

elemental içeriklerinden anlaşılmaktadır (d'Ischia vd., 2013). Doğal melaninin yapısında nanogranüler yapıda büyük ve heterojen porlar bulunmakta olup su moleküllerinin bu boşluklara moleküler bazda takılıp kalması mümkün olmaktadır (Bridelli ve Crippa, 2010). Bu konuda Pukalski vd. (2025) elde ettikleri pigment örneklerinden su moleküllerinin tamamen ayrılmasının, melanin polimerleri katmanları aralarında tutulmaları ya da melanin -OH gruplarına bağlanmaları sebebiyle pek mümkün olmadığını ve bu durumun oksijen miktarının yükselerek C miktarının daha düşük görünmesine neden olduğunu belirtmiştir. Ayrıca melaninin kimyasal olarak heterojen bir madde olması ve kontrol dışı serbest radikal polimerizasyonuna uğramış reaktif monomerlerden meydana geliyor olması sebebiyle herhangi bir prekürsör (öncül madde) veya parçalanma ürünü ile doğrudan doğruya kıyasını imkânsız hale getirmektedir (Martinez-Gonzalez vd., 2021).

Yaşam için gerekli temel maddeler makrobeseinler (C, H, O, N, P ve S), başlıca katyonlar (K, Mg, Na ve Ca) ve mikrobeseinlerden (metal iyonları) meydana gelmektedir (McCalla, 1940; Krysenko ve Wohlleben, 2024). Çalışmada elde edilen ekstrakte melaninlerin yapılarında melanin yapıtaşlarını ve hücrel faaliyetlerin devamlılığı için gerekli olan bazı katyonları bulundurduğu görülmektedir. Katyon özelliğindeki metal iyonlarının melanin türlerine karşı çekim gösterdiği bilinmektedir. Katyonun çekim gücünün katyonun molekül ağırlığı ile doğru orantılı olarak arttığı bildirilmiştir (Potts ve Au, 1976). Larsson ve Tjälve (1978), K^+ alkali metalinin melanine karşı Na^+ alkali metaline kıyasla daha fazla çekim gösterdiğini belirlemiştir. Çalışmamızda elde edilen ekstrakte melaninlerin K (%4,11-16,20) ve Na (%1,78-4,36) içerikleri incelendiğinde verilen bilgilerle oldukça tutarlı sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Melaninlerin yapılarında yer aldığı bilinen karboksil, amin, fenolik hidroksil, kinon ve semikinon grupları metaller için potansiyel bağlanma noktaları olabilmekte olup özellikle K3M kodlu ekstrakte melanininde görülen nispeten yüksek K miktarının (%16,20), ekstrakte melanin yapısında yer alan bu bağlanma noktalarının diğerlerine göre daha elverişli olması sebebiyle olabileceği düşünülmektedir (Hong ve Simon, 2007).

C/N, C/O ve O/N benzeri elemental oran değerleri, pigmentlerin yapısında yer alan oligomer ünitelerinin içerikleri hakkında bilgi edinilmesini sağlamaktadır (Li vd., 2018). K3M, B23M ve B25M kodlu ekstrakte melaninlerin C/N, C/O, O/N ve O/S oranları Rudrappa vd. (2022) ile benzerlik göstermektedir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. K3M, B23M ve B25M ile bakteriyel melaninin element oranları

Ekstrakte Melanin	C/N	C/O	O/N	O/S
K3M	3,90	1,61	2,42	17,93
B23M	3,24	1,52	2,13	19,01
B25M	2,27	1,04	2,19	17,59
<i>Streptomyces sp.</i> MR28 melanini (Rudrappa vd., 2022)	3,11	1,64	1,90	22,98

Melanin üzerinde elde edilen az miktarda S elementi, melanin sentezinde yer alan sisteinin yapıya katılmış olduğundan kaynaklanmaktadır. Yüksek C/N oranı yapıda alifatik grupların bulunduğunu, yüksek O/N oranı yapı üzerinde daha fazla karboksilik grupların bulunduğunu göstermektedir (Hou vd., 2018). C/N oranının düşük olması ise yapıda amino grupları yer aldığına işaret etmektedir (Li vd., 2018). Bu konuda çalışmada elde edilen B25M'nin C/N oranının K3M ve B23M'ye göre daha düşük çıkması B25M melanininde daha yüksek miktarda düşük C/N oranına sahip amino asit içeriğine sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Büyük oranda C, H, N içeren ve S elementinin yokluğu ise ömelanin olarak sınıflandırılabilceği gibi ömelanindeki az miktarda S elementi, melanin sentezinde yer alan sistein veya melanine bağlı az miktarda sülfür içeren bir protein ile ilişkili de olabilecektir. Ömelanin yapısında bulunan daha yüksek C/N oranı alifatik grup içermesinden kaynaklanırken, daha yüksek O/N oranı ise daha fazla karboksilik grup içermesinden kaynaklanmaktadır (Hou vd., 2018).

L-DOPA üzerinden sentezlenen melaninler yapılarında azot, karbon, hidrojen ve oksijen elementleri barındırmaktadır. Feomelaninler en başta ömelanin ile aynı şekilde sentezlenmekle birlikte yapılarına sonradan katılan sistein nedeniyle yapılarında kükürt de bulundurmaktadır (De Souza vd., 2018). DHI ve DHICA ünitelerinden meydana gelen ömelanin türlerinde yaklaşık %6-9 azot, feomelanin yapısında ise %10 seviyelerine kadar kükürt bulunabileceği belirtilmiştir (Wakamatsu ve Ito, 2023). Yapılan elemental analiz sonucunda elde edilen veriler, ekstrakte melaninlerin L-DOPA bazlı melanin türleri karışımı bir içeriğe sahip olduğunu göstermiştir (Hou vd., 2018).

4.6.5. LC-MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi) Q-TOF (Kuadrupol-Uçuş Zamanlı)

Ekstrakte melanin yapısında bulunan moleküllerin tespiti için Auto MS/MS ve FBF (Find By Formula) olmak üzere 2 farklı algoritma kullanılmıştır. Mevcut ömelanin, feomelanin ve nöromelanin standardının bulunmaması ve LC-MS Q-TOF

kütüphanesinde melanin ve melanin ile ilişkili moleküllerin bulunmaması sebebiyle bu moleküllerin tespiti için FBF algoritması kullanılmıştır. Ayrıca ekstrakte melanin içeriğinde bulunan diğer moleküller Auto MS/MS algoritması kullanılarak LC-MS Q-TOF kütüphanesindeki moleküller ile eşleştirilmiştir.

***S. griseorubens* K3 Ekstrakte Melanini (K3M)**

Elde edilen analiz sonucunda K3M ekstrakte melanin pigmentinde FBF algoritması ile 5 molekül (L-tirozin, L-DOPA, L-dopakinon, 2-2'-bibenzotiyazin ve nöromelanin türevi) ve Auto MS/MS algoritması ile 3 molekül (DL-pipekolik asit, hipoksantin ve fenasilamin) tespit edilmiştir. Ekstrakte melanin yapısında FBF algoritması ile varlığı tespit edilen parçacık iyonlar için elde edilen MS/MS spektrumları Şekil 4.19 ve Auto MS/MS algoritması ile varlığı tespit edilen parçacık iyonlar için elde edilen MS/MS spektrumları Şekil 4.20'de görülmektedir. Kullanılan algoritmalar sonucunda elde edilen kütle/yük (m/z) değerleri ve belirlenen molekül ağırlıkları Çizelge 4.9'da verilmiştir. Elde edilen m/z değerleri ile molekül kütlesi arasındaki farklılık, moleküle bağlı olan H^+ , Na^+ ve K^+ iyonlarından kaynaklanmaktadır.

Çizelgede yer alan 1, 2 ve 3 numaralı bileşiklerin m/z değerleri sırasıyla 182,0808, 220,0576 ve 196,0656 olarak elde edilmiş olup bileşiklerin molekül formüllerinin sırasıyla $C_9H_{11}NO_3$, $C_9H_{11}NO_4$ ve $C_9H_9NO_4$ olduğu belirlenmiştir. Söz konusu üç bileşiğin K3M ekstrakte melanin pigmentinin yapısında olması beklenen ve melanin sentezlenmesinde rol alan ara ürünler olan, sırasıyla L-tirozin (M_w : 181,1 g/mol), L-DOPA (M_w : 197,1 g/mol) ve L-dopakinon (M_w : 195,1 g/mol) maddeleri oldukları tahmin edilmektedir.

Çizelgedeki 4, 5 ve 6 numaralı bileşikler, ekstrakte melanin içeriğinde bulunan fakat melaninle ilişkili olmayan moleküllerdir. Analizde kullanılan cihazın veri tabanında bulunmakta olup sırasıyla DL-pipekolik asit ($C_6H_{11}NO_2$, M_w : 129,1 g/mol), hipoksantin ($C_5H_4N_4O$, M_w : 136,1 g/mol) ve fenasilamin (C_8H_9NO , M_w : 135,1 g/mol) ile eşleşmiştir.

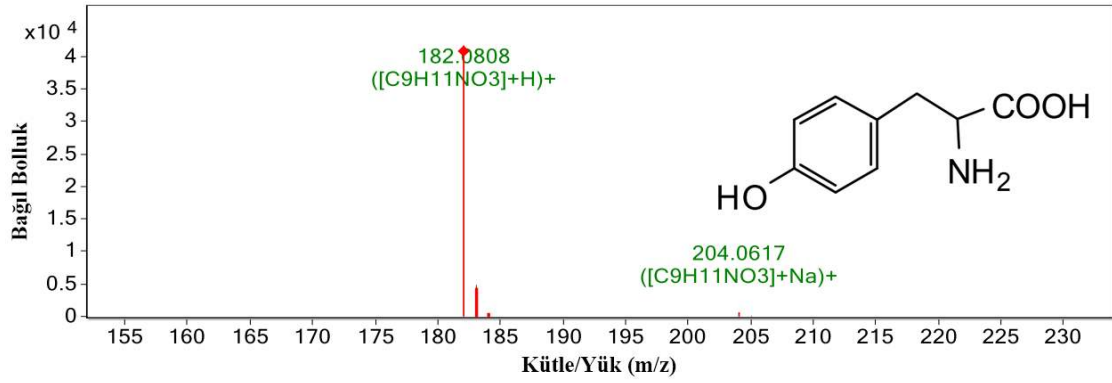
Çizelgede bulunan 7 ve 8 numaralı bileşiklerin m/z değerleri ise sırasıyla 583,0381 ve 513,1246 olarak ölçülmüş olup molekül formülleri $C_{23}H_{20}N_4O_8S_2$ (M_w : 544,6 g/mol) ve $C_{27}H_{20}N_4O_5S$ (M_w : 512,5 g/mol) olarak elde edilmiştir. Söz konusu bileşiklerin yine melanin sentezlenmesi ile ilişkilendirilen, sırasıyla feomelaninin oksidasyon ürünlerinden olan 2-2'-bibenzotiyazin ve nöromelanin türevi bir molekül olduğu tahmin edilmektedir.

Çizelge 4.9. K3M ekstrakte melanininden LC-MS Q-TOF analizi ile elde edilen moleküler iyonlar ve özellikleri

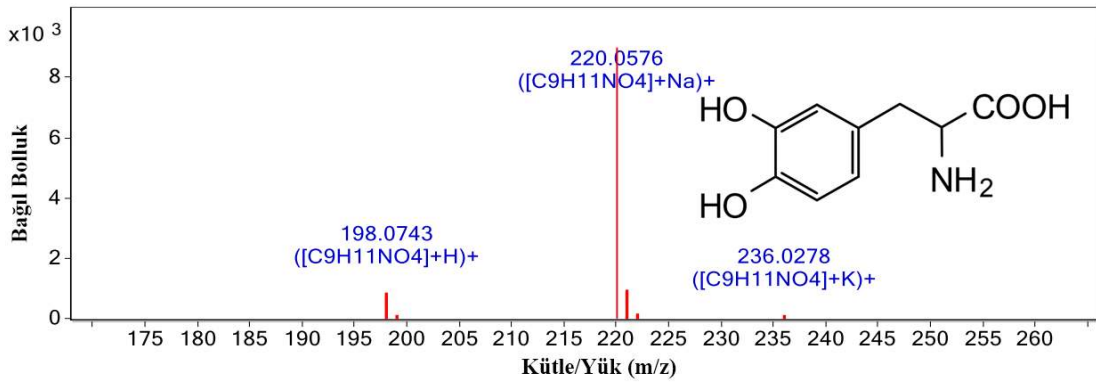
İyon No	Ölçülen m/z Değeri	Hesaplanan Kütle (Da)	Kütlesel Hata (ppm)	Moleküler Tanımlama	İsmi
1	182,0808	181,0735	-1,93	C ₉ H ₁₁ NO ₃	**Tirozin
2	220,0576	197,0684	-2,26	C ₉ H ₁₁ NO ₄	**L-DOPA
3	196,0656	195,0538	3,41	C ₉ H ₉ NO ₄	**L-Dopakinon
4	130,0865	129,0793	-2,28	C ₆ H ₁₁ NO ₂	*DL-pipekolik asit
5	137,0453	136,0381	3,22	C ₅ H ₄ N ₄ O	*Hipoksantin
6	136,0748	135,0675	6,72	C ₈ H ₉ NO	*Fenasilamin
7	583,0381	544,0741	3,43	C ₂₃ H ₂₀ N ₄ O ₈ S ₂	**2-2'-bibenzotiyazin
8	513,1246	512,1174	3,73	C ₂₇ H ₂₀ N ₄ O ₅ S	**Nöromelanin türevi

*: Auto MS/MS algoritması ile LC-MS Q-TOF kütüphanesinde eşleşen molekül,

**: FBF algoritması (molekül formülü üzerinden) ile tespiti sağlanan melanin ile ilişkili molekül.

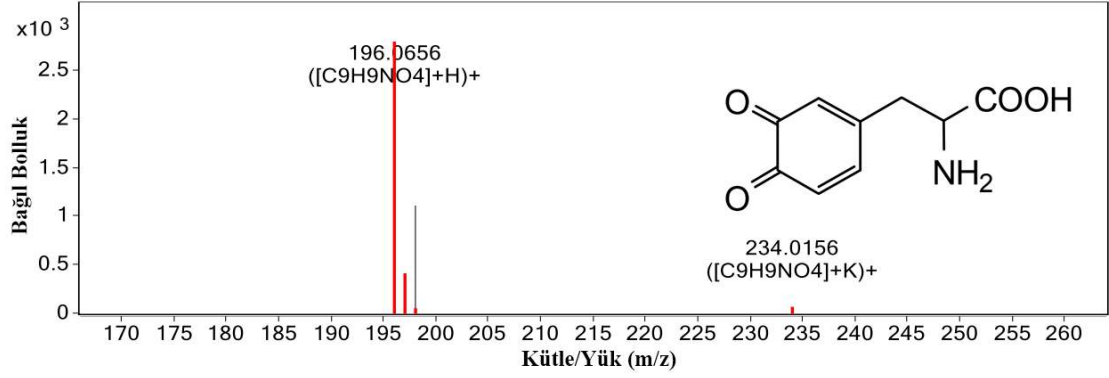


a) Tirozin

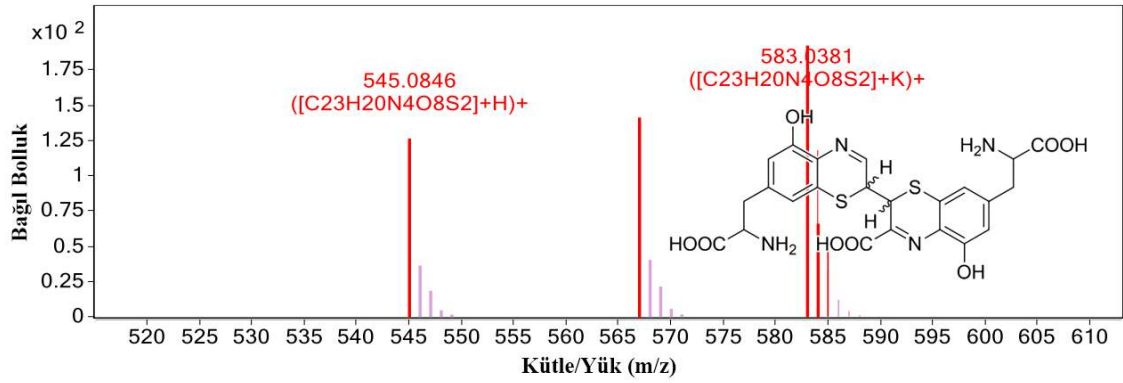


b) L-DOPA

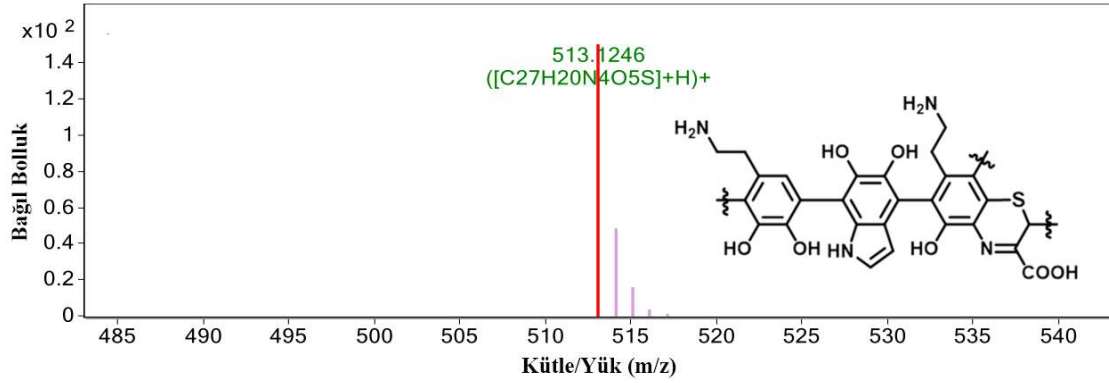
Şekil 4.19. K3M ekstrakte melanininde FBF algoritması ile varlığı tespit edilen moleküllerin LC-MS Q-TOF spektrumları



c) L-dopakinon

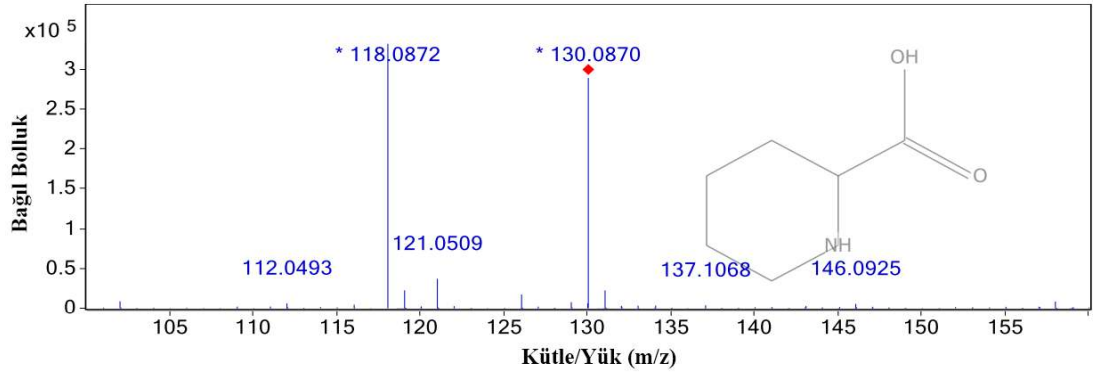


d) 2-2'-bibenzotiyazin

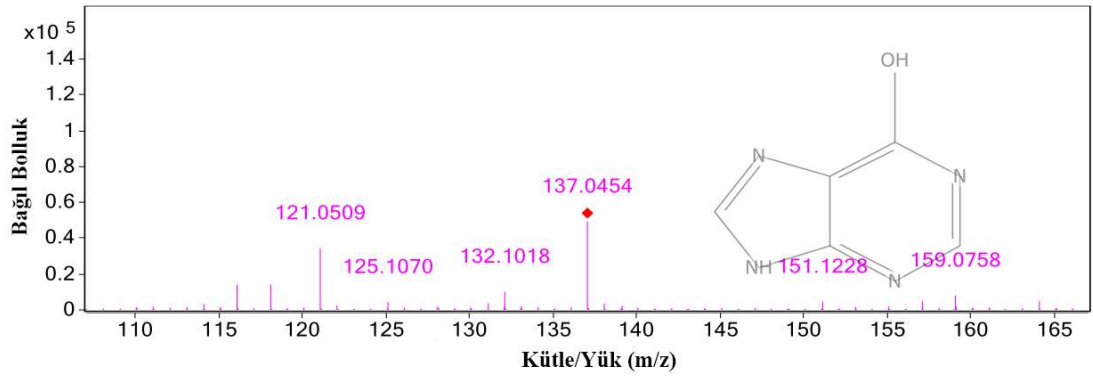


e) Nöromelanin türevi

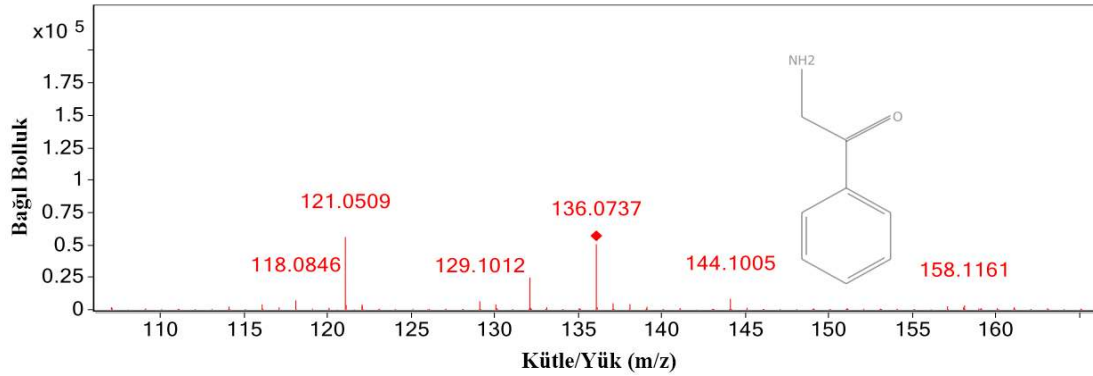
Şekil 4.19. K3M ekstrakte melanininde FBF algoritması ile varlığı tespit edilen moleküllerin LC-MS Q-TOF spektrumları (Devam)



a) DL-pipecolik asit



b) Hipoksantin



c) Fenasilamin

Şekil 4.20. K3M ekstrakte melanininde Auto MS/MS algoritması ile varlığı tespit edilen moleküllerin LC-MS Q-TOF spektrumları

K3M ekstrakte melanin pigmentinin yapısında ömelanin, feomelanin ve nöromelanin sentezlenme yolağında yer alan maddelerin bulunduğu görülmüştür. Pigmentin geliştirilmesi sırasında besiyerindeki difüzyon renginin başta kırmızı olduğu, sonra turuncu ve zaman içerisinde kahverengiye dönüştüğü gözlenmiştir. Tirozinin L-DOPA'ya ve L-DOPA'nın L-dopakroma dönüştürülmesi sırasındaki

enzimatik aktivitenin besiyeri ortam rengini kırmızıya döndürdüğü bildirilmiştir (Subhash vd., 2016). Bu durum, melanin sentezlenmesinde rol alan L-DOPA ve L-dopakromun ortamda bulunduğunu, ardından siyah-kahverengi tonlarda bulunan ömelanin sentezine devam edildiğini göstermektedir. Sistein ile reaksiyona giren dopakinon maddesinin ürünü olan sisteinildopaların polimerizasyonundan elde edilen feomelaninlerin de kırmızı renkler oluşturduğu bilinmektedir (Bell ve Wheeler, 1986). Ayrıca, feomelaninin oksitlenme ürünü olarak bir benzotiyazin türevi olan 2-2'-bibenzotiyazin maddesinin pigmentin yapısında tespit edilmiş olması, K3M ekstrakte melanin pigmentinin ömelanin ve feomelanin melaninlerinin ikisini de içerdiğini göstermektedir. Sonuçlar, gerçekleştirilen FT-IR ve ¹H MNR analizlerinde elde edilen veriler ile de tutarlıdır.

***S. variabilis* B23 Ekstrakte Melanini (B23M)**

Elde edilen analiz sonucunda B23M ekstrakte melanin pigmentinde FBF algoritması ile 5 molekül (L-tirozin, L-DOPA, L-dopakınon, 2-2'-bibenzotiyazin ve nöromelanin türevi) ve Auto MS/MS algoritması ile 3 molekül (DL-pipekolik asit, urokanik asit ve hipoksantin) tespit edilmiştir. Ekstrakte melanin yapısında FBF algoritması ile varlığı tespit edilen parçacık iyonlar için elde edilen MS/MS spektrumları Şekil 4.21 ve Auto MS/MS algoritması ile varlığı tespit edilen parçacık iyonlar için elde edilen MS/MS spektrumları Şekil 4.22'de görülmektedir. Kullanılan algoritmalar sonucunda elde edilen kütle/yük (m/z) değerleri ve belirlenen molekül ağırlıkları Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelgede yer alan 1, 2, 3, 4 ve 5 numaralı bileşiklerin m/z değerleri sırasıyla 218,0419, 198,0767, 182,0805, 551,0829 ve 583,0409 olarak elde edilmiş olup bileşiklerin molekül formüllerinin sırasıyla C₉H₉NO₄, C₉H₁₁NO₄, C₉H₁₁NO₃, C₂₇H₂₀N₄O₅S ve C₂₃H₂₀N₄O₈S₂ olduğu belirlenmiştir. B23M ekstrakte melanin pigmentinin yapısında olması beklenen ve melanin sentezlenmesinde rol alan ara ürünler olan L-tirozin (M_w: 181,1 g/mol), L-DOPA (M_w: 197,1 g/mol) ve L-dopakınon (M_w: 195,1 g/mol) maddeleri, nöromelanin türevi molekül ve feomelanin sentezinde rol alan 2-2'-bibenzotiyazin olduğu tahmin edilmektedir.

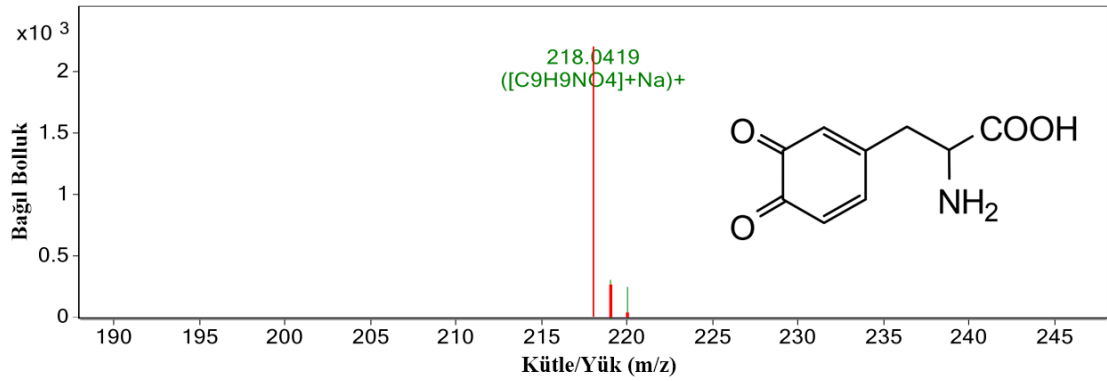
Çizelgedeki 6, 7 ve 8 numaralı bileşikler, ekstrakte melanin içeriğinde bulunan fakat melaninle ilişkili olmayan moleküllerdir. Analizde kullanılan cihazın veri tabanında bulunmakta olup sırasıyla DL-pipekolik asit (C₆H₁₁NO₂, M_w: 129,1 g/mol), urokanik asit (C₆H₆N₂O₂, M_w: 138,1 g/mol) ve hipoksantin (C₅H₄N₄O, M_w: 136,1 g/mol) ile eşleşmiştir.

Çizelge 4.10. B23M ekstrakte melanininden LC-MS Q-TOF analizi ile elde edilen moleküler iyonlar ve özellikleri

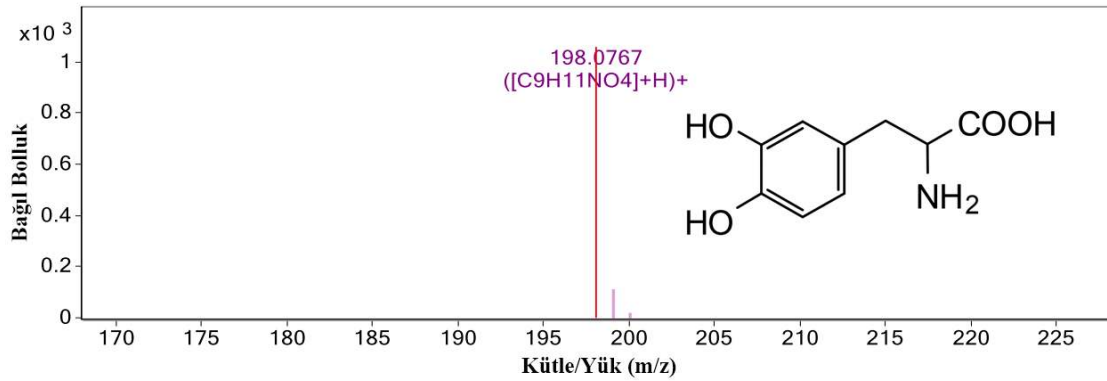
İyon No	Ölçülen m/z Değeri	Hesaplanan Kütle (Da)	Kütlesel Hata (ppm)	Moleküler Tanımlama	İsmi
1	218,0419	195,0518	-7,12	C ₉ H ₉ NO ₄	**L-Dopakinon
2	198,0767	197,0695	3,28	C ₉ H ₁₁ NO ₄	**L-DOPA
3	182,0805	181,0731	-4,63	C ₉ H ₁₁ NO ₃	**Tirozin
4	551,0829	512,1184	5,77	C ₂₇ H ₂₀ N ₄ O ₅ S	**Nöromelanin türevi
5	583,0409	544,0689	-6,21	C ₂₃ H ₂₀ N ₄ O ₈ S ₂	**2-2'-bibenzotiyazin
6	130,0867	129,0794	-3,40	C ₆ H ₁₁ NO ₂	*DL-pipekolik asit
7	139,0522	138,045	-14,75	C ₆ H ₆ N ₂ O ₂	*Urokanik asit
8	137,0444	136,0371	10,18	C ₅ H ₄ N ₄ O	*Hipoksantin

*: Auto MS/MS algoritması ile LC-MS Q-TOF kütüphanesinde eşleşen molekül,

**: FBF algoritması (molekül formülü üzerinden) ile tespiti sağlanan melanin ile ilişkili molekül.

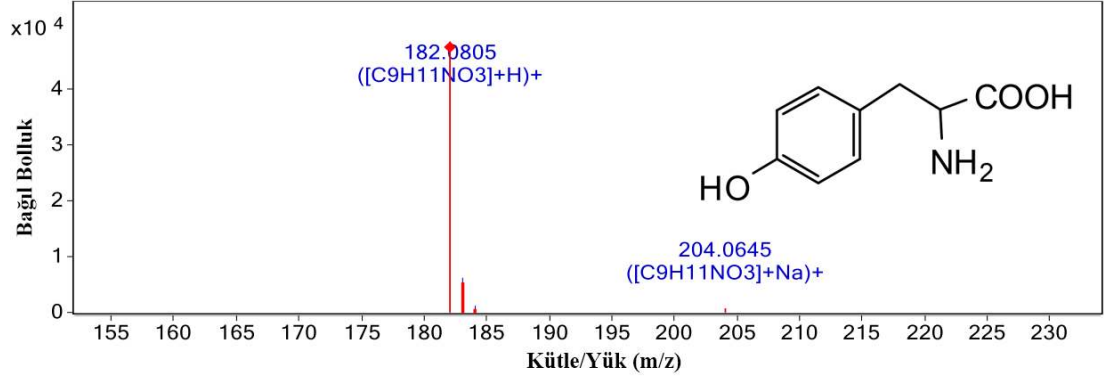


a) L-dopakinon

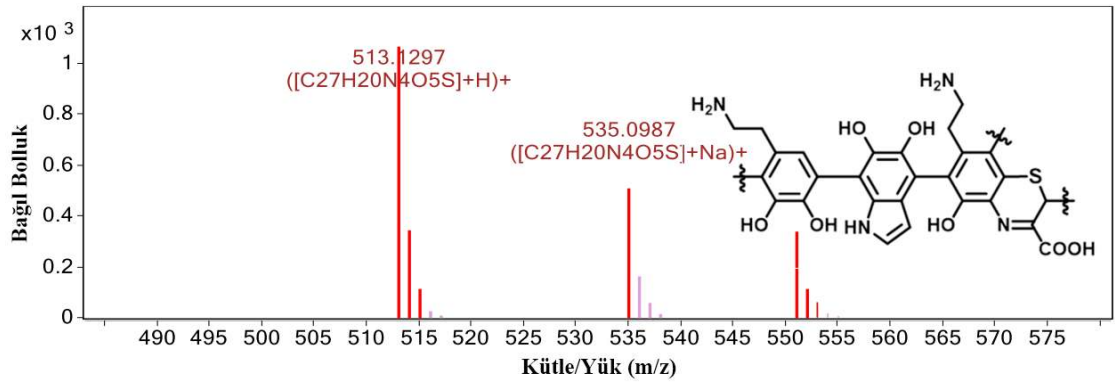


b) L-DOPA

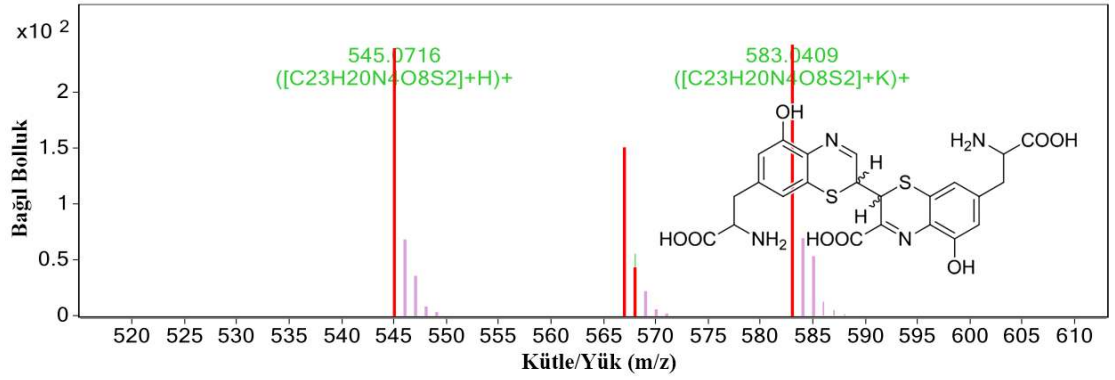
Şekil 4.21. B23M ekstrakte melanininde FBF algoritması ile varlığı tespit edilen moleküllerin LC-MS Q-TOF spektrumları



c) Tirozin

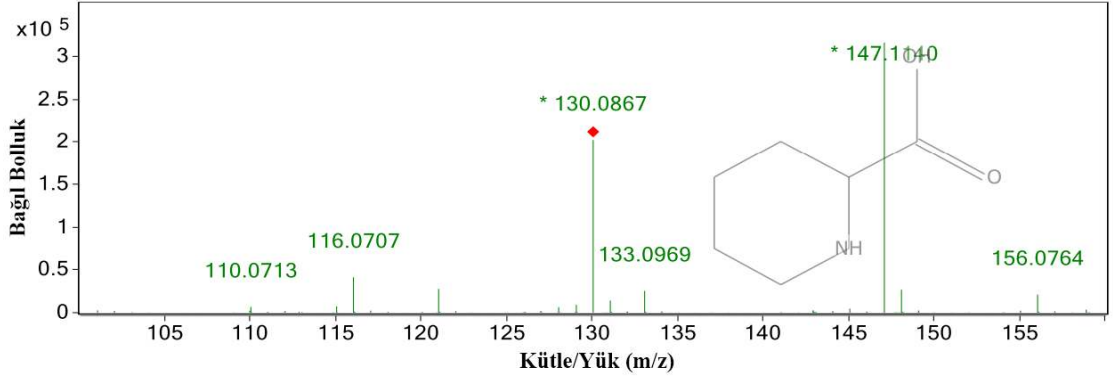


d) Nöromelanin türevi

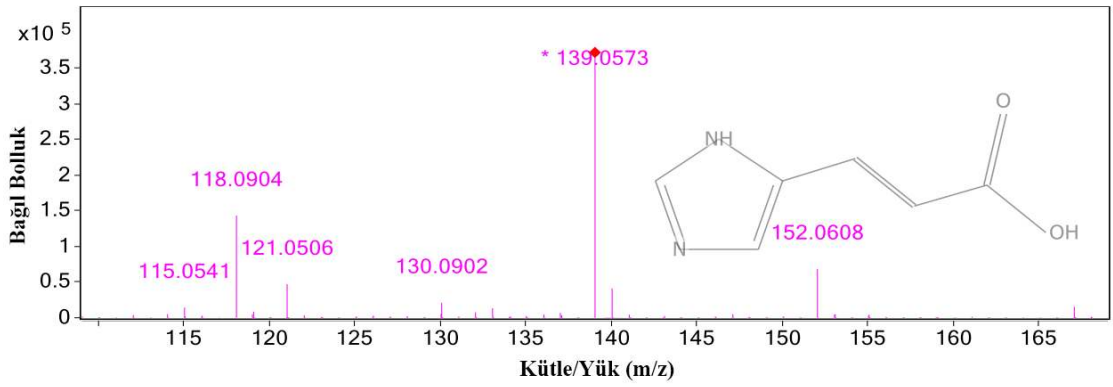


e) 2-2'-bibenzotiyazin

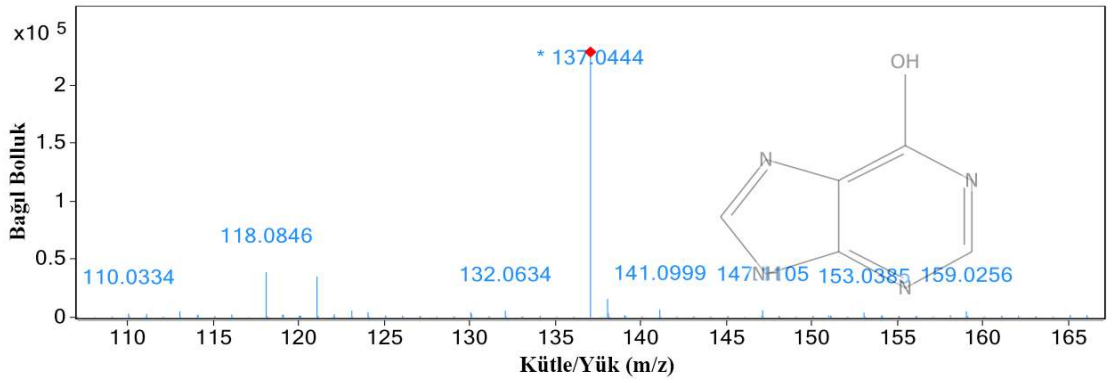
Şekil 4.21. B23M ekstrakte melanininde FBF algoritması ile varlığı tespit edilen moleküllerin LC-MS Q-TOF spektrumları (Devam)



a) DL-pipecolik asit



b) Urokanik asit



c) Hipoksantin

Şekil 4.22. B23M ekstrakte melanininde Auto MS/MS algoritması ile varlığı tespit edilen moleküllerin LC-MS Q-TOF spektrumları

B23M ekstrakte melanin pigmentinin yapısında bulunan tirozin, L-DOPA ve dopakinon maddelerinin melanin sentezlenmesi ile ilişkilendirilen moleküller olduğu bilinmektedir. Yapıda varlığı ayrıca tespit edilen 2-2'-bibenzotiyazin ve nöromelanin türevi moleküllerin varlığı, *S. variabilis* B23 suşunun ömelanin, feomelanin ve

nöromelanin sentezlenmesinde yer alan yolakları kullanabildiğini göstermektedir. K3M ekstrakte melanin pigmenti içeriğinden farklı olarak, 7 numaralı bileşiğin $C_6H_6N_2O_2$ (M_w : 138,1 g/mol) molekül formüllü urokanik asit olduğu görülmüştür. B23M ekstrakte melanin pigmenti içeriğinin K3M ekstrakte melanin pigmentine oldukça benzer olduğu ve yapısında ömelanin, feomelanin ve nöromelanin melaninleri ile bağlantılı bileşikler barındırdığı görülmektedir. Sonuçlar, gerçekleştirilen FT-IR ve 1H MNR analizlerinde elde edilen veriler ile de tutarlıdır.

***S. variabilis* B25 Ekstrakte Melanini (B25M)**

Elde edilen analiz sonucunda B25M ekstrakte melanin pigmentinde FBF algoritması ile 4 molekül (L-tirozin, L-DOPA, L-dopakinon ve nöromelanin türevi) tespit edilmiştir. Ekstrakte melanin yapısında FBF algoritması ile varlığı tespit edilen parçacık iyonlar için elde edilen MS/MS spektrumları Şekil 4.23'te görülmektedir. Kullanılan algoritmalar sonucunda elde edilen kütle/yük (m/z) değerleri ve belirlenen molekül ağırlıkları Çizelge 4.11'de verilmiştir.

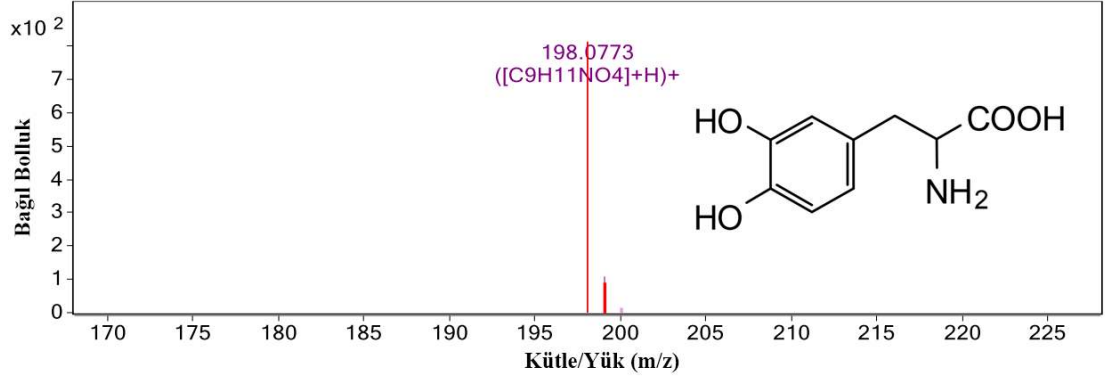
Çizelgede yer alan 1, 2, 3 ve 4 numaralı bileşiklerin m/z değerleri sırasıyla 198,0773, 182,0809, 196,0596 ve 513,1223 olarak elde edilmiş olup molekül formülleri sırasıyla $C_9H_{11}NO_4$, $C_9H_{11}NO_3$, $C_9H_9NO_4$ ve $C_{27}H_{20}N_4O_5S$ olarak belirlenmiştir. B25M ekstrakte melanin pigmentinin yapısında olması beklenen ve melanin sentezlenmesinde rol alan ara ürünler olan L-tirozin (M_w : 181,1 g/mol), L-DOPA (M_w : 197,1 g/mol) ve L-dopakinon (M_w : 195,1 g/mol) maddeleri ile nöromelanin türevi molekül olduğu tahmin edilmektedir.

Çizelge 4.11. B25M ekstrakte melanininden LC-MS Q-TOF analizi ile elde edilen moleküler iyonlar ve özellikleri

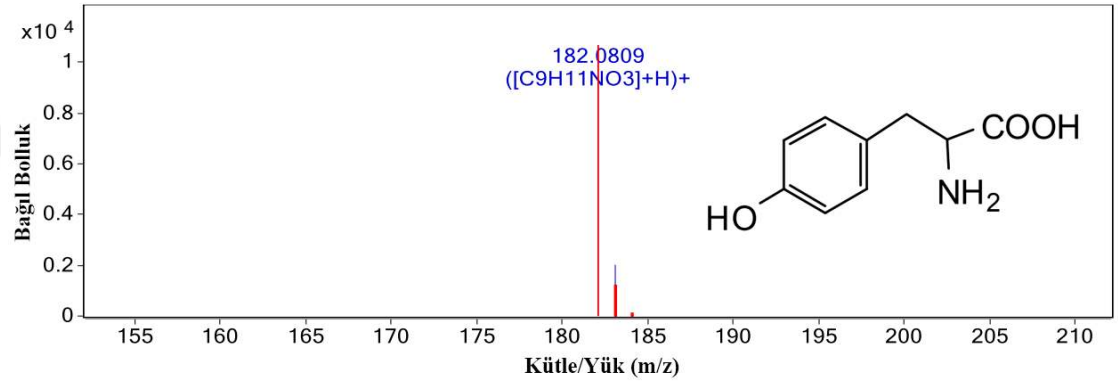
İyon No	Ölçülen m/z Değeri	Hesaplanan Kütle (Da)	Kütlesel Hata (ppm)	Moleküler Tanımlama	İsmi
1	198,0773	197,0694	2,79	$C_9H_{11}NO_4$	**L-DOPA
2	182,0809	181,0732	-3,97	$C_9H_{11}NO_3$	**Tirozin
3	196,0596	195,0517	-7,56	$C_9H_9NO_4$	**L-Dopakinon
4	513,1223	512,1155	0,18	$C_{27}H_{20}N_4O_5S$	**Nöromelanin türevi

*: Auto MS/MS algoritması ile LC-MS Q-TOF kütüphanesinde eşleşen molekül,

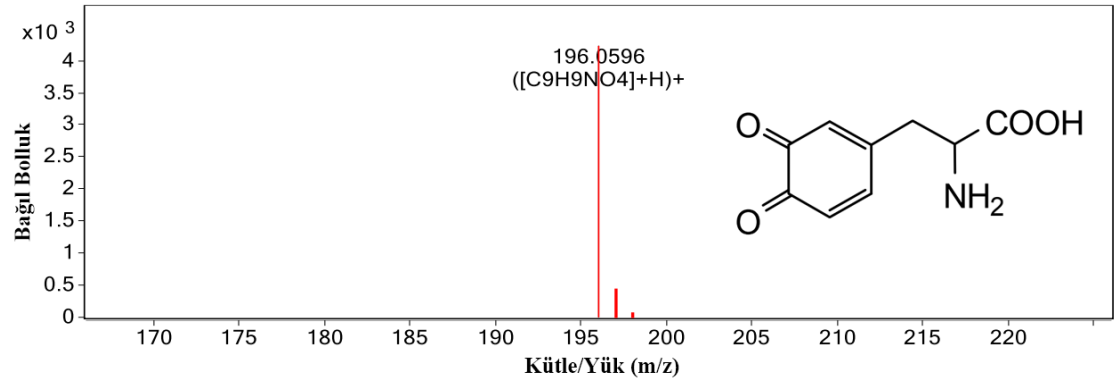
**: FBF algoritması (molekül formülü üzerinden) ile tespiti sağlanan melanin ile ilişkili molekül.



a) L-DOPA

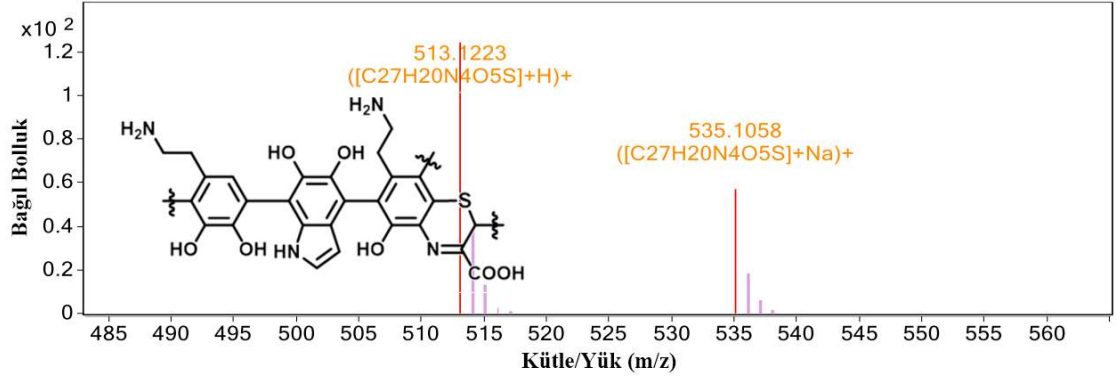


b) Tirozin



c) L-dopakinon

Şekil 4.23. B25M ekstrakte melanininde FBF algoritması ile varlığı tespit edilen moleküllerin LC-MS Q-TOF spektrumları



d) Nöromelanin türevi

Şekil 4.23. B25M ekstrakte melanininde FBF algoritması ile varlığı tespit edilen moleküllerin LC-MS Q-TOF spektrumları (Devam)

B25M ekstrakte melanin pigmentinin içeriğinde de K3M ve B23M kodlu ekstrakte melaninler içeriğinde olduğu gibi ömelanin, feomelanin ve nöromelanin parçalanma ve oksidasyon ürünleri olan L-DOPA, L-tirozin, L-dopakinon ve nöromelanin türevi olduğu görülmüştür. B23M ekstrakte melanini ve K3M ekstrakte melanini içeriğinde görülen feomelaninle bağlantılı parçalanma ürünleri B25M ekstrakte melanin pigmentinde de bulunmakta olup pik şiddetinin düşük olması ve kütleli hata payının yüksek olması sebebiyle anlamlı veri elde edilememiştir.

K3M, B23M ve B25M Ekstrakte Melaninleri

Yapılan LC-MS Q-TOF analizi sonucunda K3M, B23M ve B25M ekstrakte melanin pigmentleri içeriklerinde nöromelanin varlığı görülmüştür. K3M, B23M ve B25M ekstrakte melaninlerinin hiçbirinin yapısında sistein amino asidine rastlanmamıştır. Ayrıca ekstrakte melaninlerin yapısında yer alan ve kükürtlü maddeler olan nöromelanin ve 2-2'-bibenzotiyazin moleküllerine rastlanılmış olup bu durum besiyeri ortamında veya hücre içi yapıda bulunan sisteinin tamamının melanin sentezlenme yolağında tüketildiğini göstermektedir. B25M ekstrakte melanininde K3M ve B23M ekstrakte melaninlerine kıyasla 2-2'-bibenzotiyazin molekülünün tespit edilecek düzeyde bulunmadığı görülmüştür. Bu nedenle B25M ekstrakte melanini için sistein içeriğinin besiyeri ortamında veya hücre içi yapıda diğer suşlara göre daha az miktarlarda olduğu düşünülmektedir.

Feomelaninin zamanla parçalanması ile ortamda bulunan benzotiyazin ve indol gruplarının sentezlenmesi ile son ürün olarak nöromelanin oluşmaktadır (Solano, 2014).

Nöromelanin sentezinin diğer melanin türlerinden farklı olarak enzim aktivitesi ile gerçekleşmediği belirtilmiştir (Cao vd., 2021). K3M, B23M ve B25M suşlarından elde edilen ekstrakte melanin analiz sürecine kadar (2 ay, +4 °C) Yıldız Teknik Üniversitesi (YTÜ) merkez laboratuvarında depolanmıştır. Yapılan hizmet alımında feomelanine rastlanmaması, ömelaninin abundance (bolluk) miktarının düşük olması sebebiyle ifade edilememesi ve son ürün olan nöromelanin varlığının bulunması depolama sürecinde de nöromelanin oluşumunun devam ettiğini göstermiştir.

K3M, B23M ve B25M kodlu ekstrakte melaninlerin içeriğinde oldukça düşük miktarlarda (veya tespit edilemeyen düzeyde) nöromelanin ve 2-2'-bibenzotiyazin bulunduğu, buna karşın söz konusu ekstrakte melaninlerin kayda değer miktarlarda kükürt içeriğine (%1,36-1,88) sahip oldukları görülmektedir. Bu durum, ekstrakte melaninlerin yapısında bulunan ve reaktif karbonil grubu (-C=O) içeren moleküllere sistein dışında tiyol (-SH) gruplarının bağlanmış olabileceğini göstermektedir. Özellikle *o*-kinon yapısında olmaları nedeniyle oldukça reaktif maddeler olan ve tiyol grupları ile kolayca reaksiyona girebilen dopakinon ve (nöromelanin sentezlenmesi yolağında yer alan) dopamin-kinon maddelerinin hücre içinde bulunan ve yapılarında tiyol grubu içeren glutatyon ve sistein kalıntıları içeren başka protein yapıları ile de reaksiyona girmiş olma ihtimali bulunmaktadır (Kishida vd., 2021). Melaninlerin üç boyutlu katmanlar halinde olabilen yapıları sebebiyle monomer yapılarının arasına bağımsız moleküllerin takılıp kalabileceği bilinmekte olup (Pukalski vd., 2025) bağımsız kükürtlü moleküllerin de ekstrakte melaninlerin yapısında yer alabileceği ihtimali göz önünde bulundurulmaktadır.

Ekstrakte Melanin İçeriğinde Tespit Edilen ve Melanin ile İlişkili Olan Moleküller

Tirozin, proteinleri oluşturan fenolik bir amino asit olmasının yanı sıra oksidasyon ve polimerizasyon aşamalarından geçerek melaninlerin sentezlenmesinde de rol oynamaktadır (Recky vd., 2021). Tirozinin tirozinaz enzimi aktivitesi sonucu hidroksilasyon tepkimesine girmesiyle biyolojik olarak aktif olan L-DOPA molekülü elde edilmektedir (Raval vd., 2012).

L-DOPA, diğer adıyla 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin, L-tirozinden elde edilen bir amino asit analogudur (Min vd., 2015). Tirozin amino asidinin aromatik halkasına fazladan bir tane hidroksi grubu eklenmesi ile meydana gelmektedir (Gülçin, 2007). L-DOPA, aynı zamanda beyinde nörotransmitter olarak görev alan dopamin maddesinin de öncül maddesidir. Dopaminin beyin içerisindeki miktarının azalmasıyla ortaya çıkan dejeneratif bir rahatsızlık olan Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. L-

DOPA, dopaminin aksine kan-beyin bariyerini geçebilmekte olup beyinde bulunan dopamin miktarının artırılması ve böylece Parkinson hastalığının tedavi edilmesini sağlamaktadır (Min vd., 2015).

L-dopakinon, L-DOPA'nın tirozinaz enzimi ile katalize edilmesi sonucu oluşmaktadır (Bell ve Wheeler, 1986). Kahverengi-siyah renkli ömelanin ve kırmızı renkli feomelaninlerin sentezlenmesinde rol oynayan ortak öncül madde olması nedeniyle melanin üretiminde merkezi bir öneme sahiptir. Oldukça reaktif *o*-kinon yapısında bir madde olup sistein gibi tiyol bileşikleri ile olağanüstü hızlı bir şekilde reaksiyona girebilmektedir (Wakamatsu ve Ito, 2023).

2-2'-bibenzotiyazin, feomelaninleri oluşturan 1,4-benzotiyazin karboksilik asidin (8) oksidasyonu ile meydana gelen benzotiyazin dimeridir. Oksidasyonun devam etmesi ise trikrokrom türevlerinin oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Micillo vd., 2016).

Nöromelanin, dopamin ve 5-S-sisteinildopa ünitelerinden meydana geldiği için feomelanin ve ömelaninin karışımı olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle polimer yapısı içerisinde benzotiyazin ve indol ünitelerinin olması beklenmektedir (Solano, 2014). Nöromelanin ismi, deride bulunan melaninlere benzerliği ve sinir sistemindeki, özellikle de beyindeki varlığı nedeniyle verilmiştir. Nöromelaninin biyosentezi feomelanine benzer bir şekilde ortamda bulunan sistein konsantrasyonuna bağlıdır (Cao vd., 2021).

Ekstrakte Melanin İçeriğinde Tespit Edilen ve Melanin ile İlişkili Olmayan Moleküller

Pipekolik asit, lisin amino asidinden sentezlenmektedir. *Streptomyces hygroscopicus* tarafından üretilen rapamisin maddesinin öncül maddesidir (Paiva vd., 1993). K3M, B23M ve B25M ekstrakte melanin pigmentlerinin antibakteriyel özellikleri olduğu bilinmekte olup K3M ekstrakte melanininde ve B23M ekstrakte melanininde pipekolik asit tespit edilmiştir. Yapısında pipekolik asit gibi bir metabolitin tespit edilmiş olması, melanin türevleri dışında farklı antibiyotik özelliklere sahip maddeleri üretme yeteneği olduğunu ve antibiyotik üretiminde çok yönlü olduğunu göstermektedir.

Hipoksantin, pürin katabolizması sonucu elde edilen bir üründür (Yüksel vd., 2005). Oksijenin sınırlı olduğu ortamlarda konsantrasyonu artan bir ATP yıkılım ürünüdür. Hipoksantin maddesinin ortamda birikmesi, endojen enzimatik reaksiyonlarla hipoksantin önce ksantine, ardından da ürik aside dönüştürülmesine, böylece oksijen serbest radikallerinin oluşumuna neden olmaktadır (Sánchez-Illana vd., 2020). *Streptomyces* türü bir aktinomisetin ortama azot kaynağı olarak sadece hipoksantin

eklenmesi durumunda yüksek miktarlarda ürat oksidaz ürettiği belirlenmiştir (Watanabe vd., 1976). *Streptomyces cyanogenus* aktinomisetinin C veya N kaynağı bulunmayan ortamda hipoksantini önce ksantine, sonra da ürik asite okside ettiği görülmüştür (Ohe ve Watanabe, 1984). Ortama hipoksantin eklenmesinin *S. griseorubens* NEAE-5 suşunun ürat oksidaz üretimine olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir (El-Naggar vd., 2024).

Fenasilamin, diğer adıyla 2-aminoasetofenon, üzüm benzeri kokuya neden olan ve yapısında bir benzen halkası barındıran uçucu yapıda önemli biyoaktif ikincil metabolittir (Damavandi vd., 2023). *Streptomyces ochraceiscleroticus* NRRL ISP-5594 tarafından da salgılandığı görülmüştür (Citron vd., 2015).

Urokanik asit, UV ışınlarını absorbe edebilen kromofor bir maddedir (Singh vd., 2021b). Histidin metabolizmasında yer almakta olup histidinin parçalanmasındaki ilk dönüşüm maddesidir. *Streptomyces tendae* tarafından üretildiği bilinen nikkomisin X antibiyotiklerinin sentezlenmesi rol aldığı düşünülmektedir (Evans vd., 1995).

Sonuç olarak, K3M, B23M ve B25M ekstrakte melaninlerinin tamamında tirozin, L-DOPA, L-dopakinon ve nöromelanin türevi moleküllerin bulunduğu görülmüştür. K3M ve B23M ekstrakte melaninler pigmentlerinin içeriğinde feomelanin varlığını destekleyen 2-2'-bibenzotiyazin molekülleri belirgin bir şekilde tespit edilmişken B25M ekstrakte melanin pigmentinin içeriğinde de 2-2'-bibenzotiyazin bulunmakla beraber pik şiddetinin düşük olması ve kütleli hata payının yüksek olması sebebiyle anlamlı veri elde edilememiştir, bu nedenle de çalışma içerisine dahil edilmemiştir. Benzer şekilde, K3M, B23M ve B25M ekstrakte melaninlerinin tamamının içeriğinde ömelanin türü melanin ile ilişkilendirilen DHI ve DHICA moleküllerine rastlanmış olmakla birlikte pik şiddetlerinin düşük olması ve kütleli hata payının yüksek olarak belirlenmiş olması nedeniyle bu üç molekül de çalışma kapsamı dışında bırakılmıştır. Elde edilen sonuçlar, çalışılan üç suşun çeşitli melanin sentezi yollarını kullanabildiğini ve suşların biyosentetik çeşitliliğe sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

4.7. Aktinomiset Melanininin Anti-bakteriyel Aktivitesi

Çoklu ilaç direncine sahip patojenlerin artmasıyla birlikte yeni ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır. En önemli biyoaktif madde üreticisi olduğu bilinen aktinomisetler antibiyotik ilaç üretiminde önemli rol oynamakta ve yeni ilaç keşifleri için birçok araştırmacı bu alanda çalışma yapmaktadır (Sapkota vd., 2020; Ibeyaima vd., 2016). Aktinomisetler çeşitli biyoaktif bileşikler (aktinomisin, streptomisin, melanin, prodigiosin gibi) üretebilmektedir ve her biyoaktif bileşiğin farklı etkisi (anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-

viral, anti-kanser, anti-inflamatuvar gibi) ve farklı etki düzeyleri vardır (Mumtaz, 2019; Celedón ve Díaz, 2021; El-Zawawy vd., 2024).

Kuyucuk difüzyon yönteminde test kültürü içeren katı besiyerinde belirli aralıklarla açılan kuyucuklara yerleştirilen örnekler inkübasyon sırasında antimikrobiyal maddenin miktarı, çözünürlüğü, difüzyon katsayısı ve toplam etkisi ile doğru orantılı olarak inhibisyon zon çapı oluşturmaktadır (Madigan vd., 2013).

Bu çalışmada K3M, B23M ve B25M ekstrakte melanin pigmentlerinin Gram-pozitif (*Listeria monocytogenes* ATCC 13932, *Bacillus cereus* ATCC 6051, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) ve Gram-negatif (*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Escherichia coli* ATCC 25922) bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesi incelenmiştir. K3M, B23M ve B25M ekstrakte melaninleri tüm Gram-negatif bakterilere (Çizelge 4.12), B23M ekstrakte melanini ise tüm Gram-pozitif bakterilere karşı etki göstermiştir (Çizelge 4.13). K3M, B23M ve B25M ekstrakte melaninlerinin Gram-negatif (*S. Typhimurium* ATCC 14028, *P. aeruginosa* PA01, *E. coli* ATCC 25922) bakterilere karşı etki düzeyleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$).

Çizelge 4.12. K3M, B23M ve B25M ekstrakte melanin pigmentlerinin Gram-negatif bakterilere etkisi (ortalama±standart sapma)*

Test Mikroorganizmaları	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> PA01	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028
Ekstrakte Melaninler	Zon (mm)		
K3M	12,3±0,5 ^A	11,0±0,8 ^A	12,3±0,5 ^A
B23M	13,0±0,7 ^A	12,0±0,7 ^A	12,0±0,7 ^A
B25M	12,0±2,0 ^A	11,4±0,5 ^A	11,6±1,0 ^A

*Aynı sütun içerisinde farklı harflerle verilen değerler, ortalamalar arasında istatistiki fark olduğu anlamını taşımaktadır ($p<0,05$).

K3M ekstrakte melanini *S. aureus* ATCC 25923 ve *L. monocytogenes* ATCC 13932 suşlarına karşı, B25M ekstrakte melanini ise *L. monocytogenes* ATCC 13932 suşuna karşı etki göstermemiştir. B23M ve B25M ekstrakte melaninlerinin *S. aureus* ATCC 25923 suşuna karşı etki düzeyleri arasında anlamlı bir fark görülmezken ($p>0,05$), K3M ve B23M ekstrakte melaninlerinin *B. cereus* ATCC 6051 suşuna karşı etki düzeyleri arasında anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p<0,05$). B23M ekstrakte melanininin *B. cereus* ATCC 6051 patojeni üzerine K3M ekstrakte melaninine göre daha etkili olduğu anlaşılmaktadır.

L. monocytogenes ATCC 13932 suşuna karşı sadece B23M ekstrakte melanini etki göstermiştir (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. K3M, B23M ve B25M ekstrakte melanin pigmentlerinin Gram-pozitif bakterilere etkisi (ortalama±standart sapma)*

Test Mikroorganizmaları	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 6051	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 13932
Ekstrakte Melaninler	Zon (mm)		
K3M	-	10,7±0,5 ^B	-
B23M	11,4±1,3 ^A	12,8±0,8 ^A	12,3±1,1 ^A
B25M	11,8±0,4 ^A	11,4±1,0 ^{AB}	-

*Aynı sütun içerisinde farklı harflerle verilen değerler, ortalamalar arasında istatistiki fark olduğu anlamını taşımaktadır (p<0,05).

Anti-bakteriyel aktivite çalışmasında kontrol grubu olan Gentamisin (100 µg/mL) Gram-negatif olan bakteri grubunda *E. coli* ATCC 25922 suşunda 23,0 mm, *P. aeruginosa* PA01 suşunda 21,0 mm, *S. Typhimurium* ATCC 14028 suşunda 17,0 mm ve Gram-pozitif olan bakteri grubunda *S. aureus* ATCC 25923 suşunda 23,0 mm, *B. cereus* ATCC 6051 suşunda 22,0 mm, *L. monocytogenes* ATCC 13932 suşunda 22,0 mm zon çapı oluşturmuştur.

Streptomyces pigmentlerinin anti-bakteriyel etkilerinin incelendiği birçok çalışma mevcut olsa da literatürde *S. griseorubens* ile *S. variabilis* suşlarının ve metabolitlerinin anti-bakteriyel aktivitesi ile ilgili çalışma sayısı oldukça azdır. *S. griseorubens* ve *S. variabilis* türü suşlardan elde edilen melaninlere ait çalışmaya ise rastlanmamıştır.

S. griseorubens suşlarının anti-bakteriyel etkilerinin incelendiği çalışmalarda Nguyen vd. (2019) *S. griseorubens* MPT42 suşundan elde edilen hücresiz süpernatantın *S. aureus* ATCC 25923'e karşı 44,0 mm, *B. cereus* ATCC 13061'e karşı 18,0 mm, *E. coli* ATCC 25922'e karşı 32,3 mm, *S. Typhimurium* ATCC 14028'e karşı 24,8 mm, *P. aeruginosa* ATCC 9027'ye karşı 17,2 mm zon çapı oluşturduğunu, Atallah vd. (2023) *S. griseorubens* filtratının *B. subtilis*'e karşı 11,0 mm, *P. aeruginosa*'ya karşı 20,0 mm zon çapı olduğunu, Aly vd. (2020) *S. griseorubens* CL2'nin *S. aureus*'a karşı 10,0 mm zon çapı oluşturduğunu bildirmiştir.

S. variabilis suşlarının anti-bakteriyel etkilerinin incelendiği çalışmalarda ise Shubha vd. (2017) *S. variabilis* VITUMVB03 suşundan elde ettikleri ham ekstraktın 200 µg/ml konsantrasyonda *E. coli*'ye karşı 14,0 mm zon çapı oluşturduğunu bildirmiştir. Slama vd. (2014) *S. variabilis* DSM 40179^T suşunun *B. subtilis* NCIB 3610, *E. coli* ATCC

25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 patojenlere karşı etkili olurken, *L. monocytogenes* CIP 82110^T patojenine karşı etkili olmadığını ifade etmiştir.

Streptomyces melaninin antibakteriyel özelliklerini inceleyen El-Zawawy vd. (2024) *S. djakartensis* NSS-3 suşundan elde ettikleri melaninin çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* (PA-09)'ya karşı 35,3 mm inhibisyon bölgesi oluşturduğunu, Arivarasu vd. (2022) ise *Streptomyces* sp. MVCS13 suşundan elde ettikleri melaninin 100 µg/ml konsantrasyonda *S. aureus*'a karşı 10,0 mm, *Pseudomonas* sp.'ye karşı 12,0 mm zon çapı oluşturduğunu bildirmiştir. Gitari vd. (2023) *S. celluloflavus* P4i suşunun kahverengi renkli kültür ortamından bakteri içermeyen 100 µl süpernatant *S. aureus*'a karşı 10,5 mm, *E. coli*'ye karşı 6,0 mm, *L. monocytogenes*'e karşı 11,5 mm zon çapı, *S. eurocidicus* C10a suşunun kahverengi renkli kültür ortamından bakteri içermeyen 100 µl süpernatant *S. aureus*'a karşı 8,3 mm, *E. coli*'ye karşı 8,0 mm, *L. monocytogenes*'e karşı 7,0 mm zon çapı oluşturduğunu bildirmiştir.

Bu çalışmada ise *B. cereus* ATCC 6051, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* PA01 ve *S. Typhimurium* ATCC 14028 suşuna karşı K3M, B23M ve B25M ekstrakte melaninleri etkiliyken, tüm patojen gruplara karşı B23M ekstrakte melanini etkili olmuştur. Elde edilen sonuçlar Gitari vd. (2023) ile Arivarasu vd. (2022) tarafından yapılan çalışmalar ile benzer, El-Zawawy vd. (2024) tarafından yapılan çalışma ile farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bunun sebebinin melanin içeriklerindeki monomerler oranlarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

K3M, B23M ve B25M ekstrakte melanin pigmentlerinin içeriğinde bulunan L-DOPA'nın yapısında katekol (3,4-dihidroksifenil) adı verilen ve iki tane hidroksi grubu barındıran benzen halkasından meydana gelen bir kimyasal grup bulunmaktadır (Patil vd., 2018). Katekol, aynı zamanda melanin yapısının anahtar unsurlarından birisi olup oksidasyonu sonucu meydana gelen reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu oksidatif stres ile bakteri hücrelerine zarar vererek hücre ölümüne neden olmaktadır (Eliato vd., 2021). L-DOPA'nın melanine oksidasyonu sırasında da reaktif oksijen türlerinin oluştuğu bilinmektedir (Hachinohe ve Matsumoto, 2005). L-DOPA yapısında bulunan katekollerin ve L-DOPA'nın L-dopakinona oksidasyonu sonucu oluşan reaktif oksijen türlerinin çalışmamız kapsamında elde edilen ekstrakte melaninlerin antibakteriyel aktivitesinin temel nedeni olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle çalışmada elde edilen ekstrakte melaninlerin antibakteriyel etkilerinin bulunduğu ve potansiyel antibakteriyel ajan olarak kullanılabileceği değerlendirilmiştir.

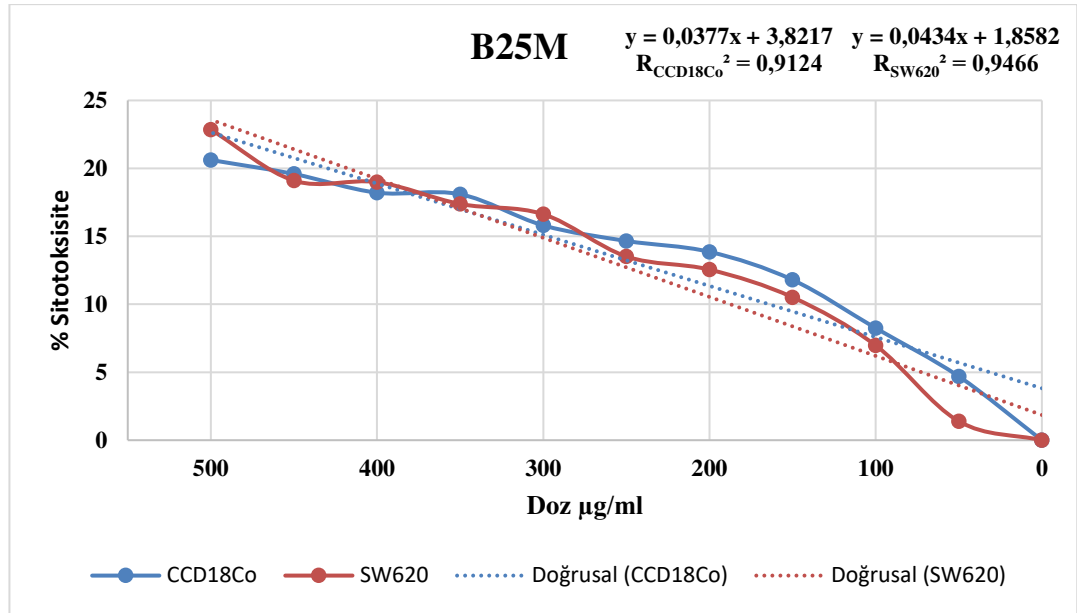
4.8. Aktinomiset Melanininin Anti-kanser Aktivitesi

Hücre canlılığı testleri, kanser araştırmaları ve kansere karşı etkili tedavilerin geliştirilmesinde elzem bir rol oynamaktadır. Kemoterapiye karşı gelişen direnç sonucu geleneksel tedavilerin etkinliğinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu tür testlerde rehber olarak IC₅₀ değeri kullanılmaktadır (Sánchez-Díez vd., 2025). Bir biyolojik sürecin %50'sinin inhibe edildiği konsantrasyon olarak tanımlanan IC₅₀ değeri, bir anti-kanser terapötik maddesinin kanser hücrelerinin canlılığının azaltılmasında ne kadar etkili olduğunun *in vitro* ortamda ölçülmesinde kullanılan önemli bir kavramdır (Punyamurtula vd., 2022). Hücre canlılığı testlerinde hücre canlılığının izlenmesi, aktivasyonu ve hücre çoğalması sırasında canlı hücrelerin sayısının artırılması gibi metabolik aktivitelerin takip edilmesinde faydalanan farklı maddeler bulunmakta olup Alamar Mavisi testinde rezazurin maddesi kullanılmaktadır. Koyu mavi renkteki rezazurin, test sırasında hücresel enzimlerin aktivitesiyle hücre içi olarak indirgenip resorufin maddesine dönüşerek kırmızı floresan rengine bürünmekte, böylece testte yer alan canlı hücrelerin tespit edilmesi sağlanmaktadır (Luo vd., 2011).

S. griseorubens K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarından elde edilen ekstrakte melaninler CCD18Co ve SW620 hücre hatlarına karşı 0-500 µg/ml konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Pozitif kontrol grubu olarak %5 DMSO kullanılmıştır. Rezazurin boyasının kontrolü için ekstrakte melanin uygulanmamış 2 sıra kuyucuktan birine rezazurin ilavesi yapılırken diğer kuyucuğa yapılmamıştır.

K3M, B23M ve B25M ekstrakte melaninlerinin sitotoksik etkisi kolon epitel hücresinde (CCD18Co) ve kolon kanser hücresinde (SW620) incelenmiştir. B25M ekstrakte melanin pigmentinin sitotoksik etkisine ait veriler grafik halinde sunulmuştur (Şekil 4.24). K3M ve B23M ekstrakte melanin pigmentlerinin ise SW620 ve CCD18Co hücre hatlarına karşı anti-kanser aktivite gözlenmemiştir (>2000 µg/ml).

B25M ekstrakte melanininin CCD18Co hücre hattına karşı IC₅₀ değeri 1226,3 µg/ml, SW620 hücre hattına karşı IC₅₀ değeri ise 1109,1 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Ekstrakte melanin dozunun artmasıyla her iki hücre hattında da hücre inhibisyonunun arttığı bulunmuştur. B25M ekstrakte melanininin hücre hatlarına karşı IC₅₀ değeri 1000µg/ml'den büyük çıkmıştır. B25M ekstrakte melanininin SW-620 hücre hattına sitotoksik etkisi CCD18Co hücre hattına sitotoksik etkisinden fazla olduğu görülmüştür.



Şekil 4.24. B25M ekstrakte melanininin CCD18Co ve SW620 hücre hatlarına karşı sitotoksik etkisi

Literatürde *S. griseorubens* ve *S. variabilis* suşlarından elde edilen ekstrakte melaninlerin anti-kanser aktiviteleri ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. *S. griseorubens* ve *S. variabilis* türü suşlardan elde edilen ekstraktlar ve farklı moleküllerin anti-kanser özellikleri incelenmiş fakat SW620 ve CCD18Co hücre hatlarına karşı etkileri incelenmemiştir.

Heo vd. (2024) *S. griseorubens* kültür ortamından elde ettikleri labdan türevi 5 bileşiği (chlorolabdans A-C, epoxylabdans A ve B) farklı tip kan kanser hücrelerine uygulama sonrasında chlorolabdans A'nın Raji hücre hattına karşı IC₅₀ değerinin 15,52 µM; chlorolabdans B'nin Raji hücre hattına karşı IC₅₀ değerinin 3,41 µM, WSU-DLCL2 hücre hattına karşı IC₅₀ değerinin 1,18 µM, NALM6 C. G5 hücre hattına karşı IC₅₀ değerinin 22,46 µM; epoxylabdans A'nın ise Raji hücre hattına karşı IC₅₀ değerinin 17,11 µM, WSU-DLCL2 hücre hattına karşı IC₅₀ değerinin 14,17 µM olduğunu, Elgendy vd. (2024), *S. griseorubens* 506 suşundan elde ettikleri metabolit ekstraktının HepG-2 hücre hattı için IC₅₀ değerinin 307,5 µg/mL olduğunu, Nazeeh vd. (2024) *S. griseorubens* kültür ortamından elde ettikleri ham ekstraktın MCF7 (meme kanser hücresi) hücre hattına karşı IC₅₀ değerinin 343,34 µg/ml olduğunu, Ngoc-Tung vd., (2024), *S. griseorubens* LCQ8 suşunun ham kültür ekstraktının MCF-7 kanser hattı hücresi için IC₅₀ değerlerinin 30 µg/mL'den daha az olduğunu, Yang vd., (2021), *S. griseorubens* f8 suşundan elde ettikleri dört adet halkalı dipeptit yapısındaki metabolitin A549 akciğer kanseri hücre hatlarının hücre canlılığı üzerine yüksek konsantrasyonlarda bile önemli bir etkinin

bulunmadığını, ancak metabolitlerin A549 hücrelerinin istilasını ve migrasyonunu engellemede oldukça başarılı olduğunu bildirmiştir. *S. variabilis* ile ilgili olarak ise Quach vd. (2021) *S. variabilis* LCP18 suşundan elde ettikleri ham ekstrakta karşı 100 µg/ml konsantrasyonda A549 (akciğer kanser hücresi) hücre hattında %24,16 hücre canlılığı, HepB3 (karaciğer kanser hücresi) hücre hattında %31,56 hücre canlılığı, MCF7 (meme kanser hücresi) hücre hattında %41,80 hücre canlılığı görüldüğünü, Abu Zaid vd. (2021), *S. variabilis* MW091521 suşundan elde ettikleri heliomycin sitotoksik maddesinin Caco-2 kolon kanseri hücre hatlarına karşı etkili olduğunu, Ngoc-Tung vd., (2024), *S. variabilis* LCQ43 suşunun ham kültür ekstraktının MCF-7 kanser hattı hücresi için IC₅₀ değerlerinin 30 µg/mL'den daha az olduğunu, Pham vd. (2014), *S. variabilis* HP411 suşundan elde ettikleri ekstraktın Hep-G2 karaciğer hücre hattına karşı IC₅₀ değerinin 13,7 µg/ml, MCF7 göğüs kanseri hücrelerine karşı IC₅₀ değerinin 40 12.6 µg/ml, RD yumuşak doku kanser hücre hattına karşı IC₅₀ değerinin 4,41 µg/ml ve FL hücre hatlarına karşı IC₅₀ değerinin 12,6 µg/ml olduğunu bildirmiştir.

Yeni anti-kanser ajan keşfinde önemli olan *Streptomyces* metabolitleri ile ilgili literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Bu konuda Law vd. (2017) *S. colonosansans sp. nov.* MUSC 93JT suşu ekstraktının 400 µg/ml konsantrasyonunda SW480 kanser hücre hattına sitotoksik etkisi %63,6 oranında canlılık olarak görülürken, normal kalın bağırsak hücre hattı CCD-18Co hücrelerinde önemli bir sitotoksik etkiye rastlanmadığını belirtmiştir. Zhu vd. (2023) *Streptomyces* türlerinden elde edilen resistomisin 48 saatlik bir muamele süresi sonucunda SW480 hücre hattına karşı IC₅₀ değeri 1,05 µmol/L, SW620 hücre hattına karşı IC₅₀ değeri 5,62 µmol/L olduğu, Jiang vd. (2021) *Streptomyces* türlerinden elde edilen Aktinomisin (Act) V'nin 48 saat muamele sonrasında IC₅₀ değeri SW620 için 6,43 nM ve SW480 için 8,65 nM olduğu, Tan vd. (2019b) *Streptomyces sp.* MUM256 suşu ekstraktının 72 saatlik muamele sonrasında CCD-18Co hücre hattı için IC₅₀ değerinin 215,00 µg/ml olduğu, Tan vd. (2019a) SW480 hücre hattının *Streptomyces sp.* MUM265 ekstraktından etkilenmediği, Voitsekhovskaia vd. (2020) *Streptomyces sp.* IB201691-2A suşunun koyu kahverengi kültür ortamından elde ettikleri rabelomisin (1), 5-hidroksi-rabelomisin (2) ve baikalomisin C (5) SW620 hücre hattına karşı IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 7,82 µM, 13,43 µM ve 3,87 µM olduğu bildirilmiştir.

B25 ekstrakte melanininin IC₅₀ değeri, CCD18Co ve SW620 hücre hatlarına karşı sırasıyla 1226,3 µg/ml ve 1109,1 µg/ml olup ekstrakte melaninlerin saflaştırılması ile daha düşük konsantrasyonda IC₅₀ değeri gözlemlenebileceği gibi diğer safsızlık unsurlarının

olumsuz etkileri de ortadan kalkacaktır. *Streptomyces* melaninleri ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır. *S. griseorubens* K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarından elde edilen ekstrakte melaninlerin içeriğinde Nöromelanin, feomelanin, ömelanin, L-Dopakinon, L-DOPA, pipekolik asit, fenasilamin, hipoksantin gibi çeşitli moleküller olduğu görülmüştür. Bu moleküllerin her birinin farklı etki düzeyleri olabileceği gibi bu moleküller birbiri ile sinerjist (birbirinin etkisini artıran) ya da antagonist (birbirinin etkisini azaltan) etki gösterebilme durumu da bulunmaktadır. Ekstrakte melanin içeriğinde bulunan molekül veya moleküller artan kanser riskiyle beraber yeni bir anti-kanser madde keşfinde potansiyel yeni anti-kanser ajan olmaya adaydır. Bu ekstrakte melanin içeriğinde bulunan melaninler (feomelanin, ömelanin, nöromelanin) ile ortamda oluşum sırasında ya da parçalanma sırasında ortaya çıkan moleküllerin (L-DOPA, L-dopakinon, 2-2'-bibenzotiyazin, DL-pipekolik asit, urokanik asit gibi) etki düzeyleri ve etki mekanizmaları hakkında daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bir molekül üzerinde bulunan fonksiyonel grupların o molekülün gösterdiği antikanser aktiviteyi etkilediği bilinmektedir. Genel itibariyle, karbonil ($-C=O$) benzeri elektron çekici gruplar antikanser aktivitenin artmasını sağlarken hidroksi ($-OH$) ve amino ($-NH_2$) gibi elektron verici gruplar ise antikanser aktiviteyi azaltmaktadır (Guo vd., 2018). Hidroksi grubu, oluşturduğu sterik engel nedeniyle kanser hücreleri üzerinde görülen migrasyon karşıtı etkinin azalmasına sebep olmaktadır (Liew vd., 2020).

Çalışmamızda yer alan söz konusu üç ekstrakte melanin arasında en iyi antikanser aktiviteyi B25M ekstrakte melanininin gösterdiği tespit edilmiş olup içeriğine bakıldığında diğer iki ekstrakte melanine göre daha fazla miktarda L-dopakinon (Şekil 4.23c) içerebileceği düşünülmektedir. Tirozinin L-DOPA'ya dönüştürülmesi sırasında tirozin halka yapısı üzerinde bulunan bir adet hidroksi sayısı ikiye çıkmaktadır. L-DOPA'nın L-dopakinona dönüştürülmesi sırasında ise bu hidroksi grupları asillenerek karbonil grupları meydana gelmektedir (Şekil 2.8).

Karbonil grubunun hidroksi grubu yerine ikame edilmesiyle elde edilen moleküllerin daha iyi biyolojik aktivite gösterdiğinin belirlendiği çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar arasında hidroksi grubu yerine eklenen karbonil grubu içeren bir molekülün anti-kanser aktiviteye etkisini inceleyen Gonçaves ve diğerleri (2016), asiyatik asidin A halkası üzerinde bulunan hidroksi yerine karbonil grubu eklenmesi sonucu elde edilen farklı türevlerinin asiyatik aside kıyasla çok daha fazla antikanser aktivitede bulunduğunu belirlemiştir. Bu nedenle *S. variabilis* B25 suşlarından

elde edilen ekstrakte melaninin L-dopakinon içeriğinin ekstrakte melaninin gösterdiği antikanser etki düzeyi üzerinde katkısı olabileceği ihtimali düşünülmekte olup melaninler üzerinde gerçekleştirilecek daha kapsamlı analizler, konu hakkında daha fazla bilgi sahibi olunmasını sağlayacaktır.

K3M, B23M ve B25M ekstrakte melaninlerinin sitotoksik etkilerinin incelendiği çalışmamızda B25M ekstrakte melanininin antikanser ajan olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. Çalışmada elde edilen ekstrakte melaninlerin saflık düzeylerinin artırılmasının antikanser etkilerini iyileştirebileceği gibi farklı kanser hücre hatlarına karşı yapılacak sitotoksikite veya migrasyon inhibisyon testleri ile daha farklı antikanser etkilerinin de keşfedilebileceği düşünülmektedir.

4.9. Aktinomiset Melaninlerinin Yapısal Analizi ile Anti-bakteriyel ve Anti-kanser Özelliklerinin Genel Değerlendirmesi

Bu çalışmada, melaninlerin ekstraksiyonunda kullanılan asitle çöktürme yöntemi ile en iyi ekstraksiyon sonucu elde edilmiştir. *S. griseorubens* K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarının kültür ortamlarından ekstrakte edilen K3M, B23M ve B25M olarak isimlendirilen melaninlerin yapısal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla çok yönlü karakterizasyon teknikleri kullanılmıştır. Elde edilen verilerden yola çıkarak ekstrakte melaninlerin genel değerlendirilmesi maddeler halinde verilmiştir.

- K3M, B23M ve B25M ekstrakte melanin pigmentlerinin tamamında tirozin amino asidinin bulunması, ilgili *Streptomyces* suşlarının üçünün de birincil metabolizma kapsamında tirozinin biyosentezi için gerekli olan şikimat yolağını kullanabildiğini göstermektedir. Tirozin içeriklerinin bolluğunun melanin sentezlenme yolağında yer alan diğer maddelere kıyasla oldukça yüksek olmasından aktinomisetlerin biyokütle birikiminin gerçekleştiği lag ve logaritmik fazlarda tirozin sentezinin sağlandığı metabolik yolların yolunda ilerlediği anlamı çıkarılmaktadır. İçerikte L-DOPA ve L-dopakinon ile feomelanin ve nöromelaninle ilişkilendirilen moleküllerin bulunması ise aktinomisetlerin durağan faza girişinin ardından biyokütlenin artışı artık öncelik olarak görmediğini, hayatta kalmaya devam edebilmeleri için ikincil metabolit ürünlerini üretmeye başladıklarını göstermektedir. Yani ömolanin, feomelanin ve nöromelanin ikincil metabolitlerinin öncül maddesi olan ve birincil metabolizma kapsamında üretilmiş olan tirozin amino asidi, ikincil metabolizmaya geçişin

sağlanması ile DOPA ve L-dopakinon maddelerine dönüştürülmeye başlanmıştır (Hodgson, 2000).

- Doğal kaynaklardan izolasyonlarının zor olması ve çözünürlüklerinin düşük olması nedeniyle melaninlerin yapıları üzerine yapılan çalışmalar ve moleküler yapılarının incelenmesi için kullanılan yöntemler oldukça sınırlıdır (Varga vd., 2016). Çalışma kapsamında elde edilen ekstrakte melaninlerin çözünürlüklerinin beklendiği üzere düşük olması sebebiyle ekstraksiyonları asit ile çöktürme ile gerçekleştirilmiş olup karakterizasyon analizleri sonucunda ekstrakte melanin içeriğinde tanımlanan metabolitlerin yapılarının bilinmesinin hedef moleküle uygun ekstraksiyon yapılmasına imkân sağlayacak yeni ekstraksiyon modellerinin geliştirilmesine fayda sağlayabileceği düşünülmektedir.
- UV-Vis, FT-IR ve ^1H NMR spektrumları, literatürde melaninler için verilen verilerle tutarlı olarak elde edilmiş olup ekstrakte melaninlerin çeşitli fonksiyonel grupların yer aldığı karmaşık yapılara sahip oldukları görülmüştür.
- K3M, B23M ve B25M melaninlerinin içeriklerinde tirozin, L-DOPA ve L-dopakinon olduğu görülmektedir. Melaninler, kimyasal olarak farklı özelliklere sahip düşük molekül ağırlıklı monomerlerin bir araya gelmesi ile oluşmakta olup bu nedenle ekstrakte melaninlerin yapılarında ömelanin ve feomelanin gibi farklı melanin türlerinin yanı sıra melanin sentezi yolağında yer alan molekülleri barındırması ihtimaller dahilindedir (Riesz, 2007; Pukalski vd., 2025). Ayrıca, tirozin, L-DOPA ve L-dopakinon monomerlerinin tamamının yapısında olduğu bilinen karboksilik asit fonksiyonel gruplarının kırmızı spektrum bölgesinde daha çok ışık soğurma özelliğinin bulunması (McGraw, 2006), çalışma kapsamında elde edilen ekstrakte melaninlerin karakteristik kahverengi rengini de açıklamaktadır.
- SEM analizleri, ekstrakte melaninlerin literatürde melanin için belirtildiği gibi amorf ve düzensiz görünüme sahip olduklarını göstermiştir.
- EDS analizleri ile ekstrakte melaninlerin tamamında karbon, oksijen ve azot elementlerinin baskın miktarlarda bulunduğu, yapılarında daha düşük miktarlarda kükürt olduğu görülmüştür. Elemental yüzde ve elemental oran değerleri, literatürde yer alan bakteriyel melanin içerikleri ile uyumlu olarak elde edilmiştir.

- Ekstrakte melaninlerin yapısında görülen az miktardaki kükürt içeriğinin feomelanin ve nöromelanin türevi maddelerin yanı sıra yapıda yer alması muhtemel tiyol içeriği kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.
- K3M ve B23M melaninlerinin içeriğinde yer alan ve yapılarında sadece bir adet azot bulunduran pipekolik asit ve fenasilamin gibi moleküllerin C/N oranını yükselttiği, B25M ekstrakte melanininin yapısında bu moleküllerin bulunmamasının C/N oranını düşürebileceği gibi bu durumun B25M melanininin yapısında K3M melanininden ve B23M melanininden farklı olarak daha yüksek oranda N elementi içeren moleküllerin bulunduğu da işaret edebileceği, B25M melanininin C/O oranının K3M ve B23M melaninlerine göre daha düşük olmasının ise B25M melaninde daha yüksek oranda L-dopakinonun (Şekil 4.23c) bulunması ve L-dopakinonun yapısında fazladan bir oksijen atomu içermesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.
- LC-MS Q-TOF analizleri sonucu ekstrakte melaninlerin tamamının içeriğinde ömelanin, feomelanin ve nöromelanin ile ilişkilendirilen bileşenlerin bulunduğu, *S. griseorubens* K3 ve *S. variabilis* B23 suşlarının pipekolik asit ve urokanik asit gibi biyoaktif özellikleri olduğu bilinen maddeleri ayrıca üretme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Melanin sentezinin ortamda sistein varken benzotiyazin yapısında olan feomelaninlerin ortaya çıkması ile başladığı ve sisteinin ortamdan tükenmesi ile indol yapısına sahip ömelaninlerin sentezine geçilmesi suretiyle gerçekleştiği bilinmektedir (Ito, 2003). İçeriğinde indol ve benzotiyazin yapılarını bulunduran bileşiklerin birlikte polimerleşmesi ise nöromelaninlerin oluşmasını sağlamaktadır (Riesz, 2007; Solano, 2014). Bu nedenle, ekstrakte melaninlerin yapılarında, melanin sentezinin doğası gereği ömelanin, feomelanin ve nöromelanin ile ilişkili bileşiklerin bir arada bulunduğu tespit edilmiştir. Elde edilen analiz sonuçlarının literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.
- Melanin pigmentlerinin rastgele tekrarlanan monomerlerden meydana gelen ve sabit bir formülü olmayan karmaşık yapılar olmaları nedeniyle tek bir melaninin yapısını incelemek neredeyse imkânsız hale gelebilmektedir (Ahn vd., 2021; Pukalski vd., 2025). Bu çalışmada elde edilen veriler, farklı melanin türlerine ait tahmini parçalanma ürünlerinin tespitine dayalı olarak belirlenmiş olup kesin ayrımlarının yapılabilmesi için melaninler üzerinde daha kapsamlı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

- K3M, B23M ve B25M ekstrakte melaninlerinin genel yapısal özellikleri incelendiğinde, anti-bakteriyel ve anti-kanser aktivite ile ilişkilendirilen fonksiyonel gruplara sahip moleküllerin yapıda yer aldığı görülmektedir. Özellikle L-DOPA molekülünde yer aldığı bilinen katekol yapılarının antibakteriyel etkiye sahip olduğu, oldukça reaktif bir madde olan dopakinonun yapısında bulunan karbonil gruplarının varlığının ise maddelerin anti-kanser etkilerini iyileştirdiğini bildiren çalışmalar literatürde mevcuttur. Ekstrakte melaninlerin biyoaktif özellikleri ve etki mekanizmaları üzerine gerçekleştirilecek daha detaylı çalışmalar sayesinde daha kesin sonuçların elde edilmesi mümkün olacaktır.

S. griseorubens K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarının genel özellikleri ve biyolojik aktiviteleri Çizelge 4.14'te özet olarak verilmiştir.

Çizelge 4.14. *S. griseorubens* K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarının genel özellikleri ve biyolojik aktiviteleri

Suş Kodu	Sentezleyebildiği Melanin Türleri	Tespit Edilen Melanin ile İlişkisi Olmayan Moleküller	Etki Gösterdiği Test Bakterileri	Anti-kanser Aktivitesi (IC ₅₀)	Öne Çıkan Özelliği
<i>S. griseorubens</i> K3	Ömelanin, Feomelanin, Nöromelanin	DL-pipekolik asit, hipoksantin, fenasilamin	<i>B. cereus</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>	-	Pigment üretiminde renk çeşitliliği
<i>S. variabilis</i> B23	Ömelanin, Feomelanin, Nöromelanin	DL-pipekolik asit, hipoksantin, urokanik asit	<i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>	-	Geniş spektrumda anti-bakteriyel aktivite
<i>S. variabilis</i> B25	Ömelanin, Feomelanin, Nöromelanin	-	<i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>	CCD18Co (1226,3 µg/ml), SW620 (1109,1 µg/ml)	Anti-kanser ajan potansiyeli

5. SONUÇ

- 1) Burdur, Denizli, Kütahya ve Balıkesir illerinden alınan 49 adet toprak ve 4 adet çamur örneğinden toplam 130 adet aktinomiset izole edilmiş, ayrıca farklı kaynaklardan gelen 45 aktinomisetle birlikte toplam 175 aktinomiset çalışma kapsamında incelenmiştir. Bu aktinomisetlerin 71 adedinin ekstraselüler pigment üretimi yapabildiği belirlenmiş olup ekstraselüler pigment üretimi yüksek olan *S. griseorubens* K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşları çalışmada kullanılmıştır.
- 2) *S. griseorubens* K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarının katı kültür ortamlarında beyaz ve gri renklerde havasal misel oluşturduğu, ışık mikroskobu altında ise filament yapıda olduğu gözlenmiştir. Suşların farklı besin ortamlarında gelişimleri incelendiğinde, pigment üretiminin, tuz ve karbon/azot oranı gibi faktörlerden etkilendiği görülmüştür. Ayrıca bazı aktinomiset izolatlarının farklı besin ortamlarında farklı renklerde ve/veya oranlarda ekstraselüler pigment ürettiği gözlenmiştir.
- 3) *S. griseorubens* K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşları moleküler olarak incelenmiştir. K3 suşunun 16S rRNA dizileri *Streptomyces griseorubens* ile en yüksek benzerliği, B23 ve B25 suşunun 16S rRNA dizileri *Streptomyces variabilis* ile en yüksek benzerliği göstermiştir.
- 4) *S. griseorubens* K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarından elde edilen ekstrakte melaninlerin,
 - UV-Vis spektrumları, özellikle UV bölgede (200-300 nm aralığında) yüksek absorbans ve görünür ışık spektrumunda dalga boyu uzadıkça azalan absorbans göstermiştir.
 - FT-IR spektrumlarından elde edilen güçlü absorpsiyon bölgeleri, aromatik gruplara ait hidroksi (O-H), amin (N-H), C=C ve C=O fonksiyonel gruplarının varlığına işaret etmiştir.
 - ¹H NMR spektrumları, hem alifatik hem de aromatik bölgelerde, özellikle de indolik/pirolik sistemlere ait amin (N-H), hidrojen (H), hidroksi (O-H) ve karboksi (COOH) fonksiyonel gruplarının yer aldığı kimyasal kayma bölgelerinde güçlü sinyaller vermiştir.
 - SEM-EDS analizleri ile literatürde melaninler için belirtildiği üzere amorf ve düzensiz görünüme sahip oldukları ve yarı elemental analizde ölçülen %C, %N,

%O ve %S miktarları ile C/N, C/O, O/N ve O/S oranlarının literatürde yer alan *Streptomyces* melanini ile uyumlu olduğu,

- LC-MS Q-TOF analizinde ömelanin ve feomelanin ile ilişkilendirilen tirozin, L-DOPA, dopakinon ve 2-2'-bibenzotiyazin molekülleri ile nöromelanin türevi olduğu düşünülen bir molekülün varlığı tespit edilmiştir.
- 5) *S. griseorubens* K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarının, melaninlerin farklı türleri olan ömelanin, feomelanin ve nöromelaninlerin üretimi için gerekli olan hücre içi ve/veya hücre dışı yollara sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca bakteri tarafından **nöromelanin** üretiminin yapıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamış olması *S. griseorubens* K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşlarının bu konuda öncü olarak ön plana çıkmasını sağlamaktadır.
 - 6) *S. griseorubens* K3 suşunun melanin türevi maddelerin yanı sıra pipekolik asit gibi farklı biyoaktif maddeleri üretme yeteneğine sahip olduğu görülmüş olup pigment gelişimi sırasında görülen renk değişimi, pigment sentezlenmesinde de çok yönlü olduğunu ayrıca ortaya koymuştur.
 - 7) *S. variabilis* B23 suşu, melanin türevi maddelerin yanı sıra urokanik asit gibi farklı biyoaktif maddeleri de üretme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir.
 - 8) *S. variabilis* B25 suşu, melanin türevi moleküller dışında herhangi bir madde üretmemiş olup en iyi anti-kanser aktivite potansiyeline sahip suş olarak ön plana çıkmıştır.
 - 9) *S. variabilis* B23 suşundan elde edilen ekstrakte melanin, çalışmada yer alan tüm test bakteri gruplarına karşı etkili olmuştur. *S. griseorubens* K3 ve *S. variabilis* B25 suşlarından elde edilen ekstrakte melaninler de oldukça etkin anti-bakteriyel aktivite göstermiştir. *S. variabilis* B25 suşundan elde edilen ekstrakte melaninin SW-620 ve CCD18Co hücre hatlarına karşı sitotoksik etkisi 1000 µg/ml'den büyük çıkmıştır. SW-620 hücre hattına karşı elde edilen sitotoksik etkinin CCD18Co hücre hattına karşı olan sitotoksik etkiden daha fazla olduğu görülmüştür.
 - 10) *Streptomyces* cinsi bakteriler tarafından üretilen melaninlerin içeriklerine yönelik gerçekleştirilmiş LC-MS Q-TOF analizlerine literatürde rastlanmamış olup bu çalışma, melaninlerin ömelanin, feomelanin ve nöromelaninle ilişkilendirilen bileşenlerinin **LC-MS Q-TOF** analizleri ile tespit edilmesinde **öncü** olma özelliğini taşımaktadır. Melanin sentezlenmesi yolağında farklı

noktalarda yer alan ve ömelanin, feomelanin ve nöromelaninle ilişkilendirilen bileşiklerin bir arada tespit edilmiş olması çalışmanın özgünlüğünü ve öncülüğünü pekiştirmektedir.

- 11) Literatürde *Streptomyces* türü bakteriler tarafından üretilen melaninler ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktayken *S. griseorubens* ve *S. variabilis* türü suşlar tarafından üretilen melaninler ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Ülkemizden izole edilen *S. griseorubens* ve *S. variabilis* türlerinin sahip olduğu melanin üretimi yeteneklerinin ortaya konması, anti-bakteriyel ve anti-kanser özelliklerinin de ayrıca incelenmiş olması, ülkemiz literatürüne önemli bir katkıda bulunmuş olup Türkiye kaynaklı izolatların biyoteknolojik potansiyelinin görünürlüğünü sağlamıştır.
- 12) İleriki çalışmalarda, ekstrakte melaninlerin saflık düzeylerinin artırılması, içeriklerinde yer alan moleküllerin etki düzeylerinin ve etki mekanizmalarının daha detaylı olarak incelenmesi, farklı patojen grupları veya kanser hücre hatlarına karşı olan etkilerinin etkinliğinin *in vitro* ve *in vivo* olarak incelenmesi gibi konularda gerçekleştirebilecek çalışmalar ile daha kapsamlı bilgiler elde edilebilecektir.
- 13) *S. griseorubens* K3, *S. variabilis* B23 ve *S. variabilis* B25 suşları tarafından üretilen ekstrakte melaninlerin antibakteriyel ajan olarak, *S. variabilis* B25 suşundan elde edilen ekstrakte melaninin de antikanser ajan olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. Elde edilen verilerin, melaninlerin toksisitesinin ve biyoaktif özelliklerinin kapasitesinin araştırılmasına bir temel oluşturabileceği öngörülmektedir.
- 14) Çalışmada kullanılan çoklu analitik yöntemlerin kombinasyonu, melanin araştırmalarında yeni standartlar geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

- Abdallah, O.M., Tolba, S. T., ve Mohamed, M. R. (2022). Antimicrobial, antioxidant and anticancer potential of *Streptomyces* species isolated from the rhizosphere of *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. *Indian Journal of Experimental Biology (IJEB)*, 60(02), 81-90.
- Abdelaziz, A.A., Kamer, A.M.A., Al-Monofy, K.B., ve Al-Madboly, L.A. (2023). *Pseudomonas aeruginosa*'s greenish-blue pigment pyocyanin: its production and biological activities. *Microbial Cell Factories*, 22(1), 110.
- Abdel-Aziz, M.S., Ghareeb, M.A., Hamed, A.A., Rashad, E.M., El-Sawy, E.R., Saad, I. M., ve Ghoneem, K. M. (2021). Ethyl acetate extract of *Streptomyces* spp. isolated from Egyptian soil for management of *Fusarium oxysporum*: The causing agent of wilt disease of tomato. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 37, 102185.
- Abraham, J., ve Chauhan, R. (2018). Profiling of red pigment produced by *Streptomyces* sp. JAR6 and its bioactivity. *3 Biotech*, 8(1), 22.
- Abu Zaid, A.S., Yassien, M.A., Aboshanab, K.M., ve Elissawy, A.M. (2021). *Streptomyces variabilis* Isolate MW091521: a new microbial source of heliomycin. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 57(5), 564-570.
- Abulila, H. I., Sabry, S. M., ve Abd El-Aziz, Z.K. (2024). Isolation and antimicrobial activity assessment of *Streptomyces mutabilis* Azhd22 recovered from the mediterranean sea: a potential source of promising compounds. *Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69(1), 184-211.
- Ahmad, M.S., El-Gendy, A.O., Ahmed, R.R., Hassan, H.M., El-Kabbany, H.M., ve Merdash, A. G. (2017). Exploring the antimicrobial and antitumor potentials of *Streptomyces* sp. AGM12-1 isolated from Egyptian soil. *Frontiers in microbiology*, 8, 438.
- Ahn, S.Y., Jang, S., Sudheer, P.D., ve Choi, K. Y. (2021). Microbial production of melanin pigments from caffeic acid and L-tyrosine using *Streptomyces glaucescens* and FCS-ECH-expressing *Escherichia coli*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2413.
- Akmemiş Korkmaz, 2006. Ege bölgesi kaplıca kaynakları ve çevresinden izole edilen termofilik aktinomisetlerden yeni antimikrobiyal moleküllerin elde edilmesi. (Yüksek Lisans Tezi). Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir. 32-33-34.
- Al Hamad, B.M., Al Raish, S.M., Ramadan, G.A., Saeed, E.E., Alameri, S.S., Al Senaani, S. S., ... El-Tarabily, K.A. (2021). Effectiveness of augmentative biological control of *Streptomyces griseorubens* UAE2 depends on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity against *Neoscytalidium dimidiatum*. *Journal of Fungi*, 7(11), 885.
- Al Khatib, M., Harir, M., Costa, J., Baratto, M.C., Schiavo, I., Trabalzini, L., ...Pogni, R. (2018). Spectroscopic characterization of natural melanin from a *Streptomyces*

cyaneofuscatus strain and comparison with melanin enzymatically synthesized by tyrosinase and laccase. *Molecules*, 23(8), 1916.

- Al-Hamad, B.M., Al Raish, S.M., Ramadan, G.A., Saeed, E.E., Alameri, S.S., Al Senaani, S.S., ...El-Tarabily, K.A. (2021). Effectiveness of augmentative biological control of *Streptomyces griseorubens* UAE2 depends on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity against *Neoscytalidium dimidiatum*. *Journal of Fungi*, 7(11), 885.
- Al-Hulu, S. M. (2013). Screening and Identification of melanin producing *Actinomycetes*. *Al-Qadisiyah Journal of Pure Science*, 18(4), 42-48.
- Aly, M. M., Ahmed, B. L., Abu Aba, S., Hassan, R. A., Bataweel, N. M., ve Abu-Zeid, M. (2020). Isolation and Molecular Identification of *Streptomyces griseorubens* from Al Saman Region Cave as a Producer of Antibacterial Agent. *Int J Pharm Phytopharmacol Res*, 10(2), 142-8.
- Amal, A.M., Abeer, K.A., Samia, H.M., El-Nasser, A., Nadia, H., A., A.K., ve M., E.H. (2011). Selection of Pigment (Melanin) production in *Streptomyces* and their application in Printing and Dyeing of Wool Fabrics. *Research Journal of Chemical Sciences*, 1(5), 22-28.
- Andriambeloson, O., Rasolomampianina, R., ve Raherimandimby, M. (2014). Selection and characterization of bioactive actinomycetes associated with the medicinal plant Ginger (*Zingiber officinale*). *Journal of International Academic Research for Multidisciplinary*, 2(9), 30-45.
- Arakawa, K., Sugino, F., Kodama, K., Ishii, T., ve Kinashi, H. (2005). Cyclization mechanism for the synthesis of macrocyclic antibiotic lankacidin in *Streptomyces rochei*. *Chemistry & biology*, 12(2), 249-256.
- Arivarasu, L., Arunkumar, P., ve Sivaperumal, P. (2022). Isolation of Melanin Pigment Producing Marine Actinobacterium of *Streptomyces* Isolated From Marine Sediment Samples and Their Antibacterial Activity. *Journal of Research in Medical and Dental Science*, 10 (5), 53-60.
- Aruldass, C. A., Dufossé, L., ve Ahmad, W. A. (2018). Current perspective of yellowish-orange pigments from microorganisms- a review. *Journal of Cleaner Production*, 180, 168–182.
- Ata Y.M., (2013). *Mikroorganizmalarda Pigment Üretimi ve Eczacılıkta Kullanımı. (Bitirme Ödevi)*. Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Kayseri.
- Atallah, B. M., Haroun, S. A., ve El-Mohsnawy, E. (2023). Antibacterial activity of two *actinomycetes* species isolated from black sand in North Egypt. *South African Journal of Science*, 119(11-12).

- Balakrishnan, A., Nevin, K. G., VP, L. M., ve Hariharan, S. (2024). Marine Actinomycete *Streptomyces rubrogriseus* Derived Bioactives are Effective Against Clinical Strains of MRSA, *Ars Pharmaceutica*, 65(4), 283-294.
- Balcı, M. (2005). Basic ^1H -and ^{13}C -NMR spectroscopy. *Elsevier*.
- Bandyopadhyaya, A., Tsurumi, A., Maura, D., Jeffrey, K.L., ve Rahme, L.G. (2016). A quorum-sensing signal promotes host tolerance training through HDAC1-mediated epigenetic reprogramming. *Nature microbiology*, 1(12), 1-9.
- Banerjee, A., Supakar, S., ve Banerjee, R. (2014). Melanin from the nitrogen-fixing bacterium *Azotobacter chroococcum*: a spectroscopic characterization. *PLoS One*. 9(1), e84574.
- Baran Ekinci M., Arayan S., Kartal M.O., Güney B.C., ve Arslan Y., (2021). Mikrobiyal Pigment Üretimi. 2. *Uluslararası Mühendislik Bilimleri ve Multidisipliner Yaklaşımlar Kongresi*.
- Barretto, D.A., ve Vootla, S.K. (2020). Biological activities of melanin pigment extracted from Bombyx mori gut-associated yeast *Cryptococcus rajasthanensis* KY627764. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(10).
- Bayram, S. (2021). Production, purification, and characterization of *Streptomyces* sp. strain MPPS2 extracellular pyomelanin pigment. *Archives of microbiology*, 203(7), 4419-4426.
- Bayram, S., Dengiz, C., Gerçek, Y. C., Cetin, I., ve Topcul, M. R. (2020). Bioproduction, structure elucidation and in vitro antiproliferative effect of eumelanin pigment from *Streptomyces parvus* BSB49. *Archives of Microbiology*, 202, 2401-2409.
- Bedel, H. (2021). *Farklı Habitatlardan Toplanan Toprak ve Su Kaynaklarındaki Aktinomisetlerin İzolasyonu, Tanımlanması ve Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi. (Yüksek Lisans Tezi)*. Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Burdur.
- Bell, A.A., ve Wheeler, M.H. (1986). Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual review of phytopathology*, 24(1), 411-451.
- Bhattacharya, U., Manvi, S., Sreedharan, V., ve Rao, K. V. B. (2022). A comparative study of xylanase producing wild and mutated strains of *Streptomyces variabilis* VITMUVB02 isolated from Kanyakumari salt pan. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences (IJMS)*, 51(10), 822-831.
- Bhosale, P., ve Bernstein, P. S. (2005). Microbial xanthophylls. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(4), 445-455.
- Bibb, M. J. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current opinion in microbiology*, 8(2), 208-215.

- Bouhri, Y., Askun, T., Tunca, B., Deniz, G., Aksoy, S. A., ve Mutlu, M. (2019). The orange-red pigment from *Penicillium mallochii*: Pigment production, optimization, and pigment efficacy against Glioblastoma cell lines. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 101451.
- Bridelli, M.G., ve Crippa, P.R. (2010). Infrared and Water Sorption Studies of the Hydration Structure and Mechanism in Natural and Synthetic Melanin. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(29), 9381–9390.
- Bunet, R., Mendes, M. V., Rouhier, N., Pang, X., Hotel, L., Leblond, P., ve Aigle, B. (2008). Regulation of the synthesis of the angucyclinone antibiotic alpomycin in *Streptomyces ambofaciens* by the autoregulator receptor AlpZ and its specific ligand. *Journal of bacteriology*, 190(9), 3293-3305.
- Bush, W.D., Garguilo, J., Zucca, F.A., Albertini, A., Zecca, L., Edwards, G.S., ve Simon, J.D. (2006). The surface oxidation potential of human neuromelanin reveals a spherical architecture with a pheomelanin core and a eumelanin surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(40), 14785-14789.
- Cao, W., Zhou, X., McCallum, N.C., Hu, Z., Ni, Q.Z., Kapoor, U., ...Gianneschi, N.C. (2021). Unraveling the Structure and Function of Melanin through Synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 143(7), 2622–2637.
- Celedón, R. S., ve Díaz, L. B. (2021). Natural pigments of bacterial origin and their possible biomedical applications. *Microorganisms*, 9(4), 739.
- Chen, W., Chen, R., Liu, Q., He, Y., He, K., Ding, X., ...Chen, F. (2017). Orange, red, yellow: biosynthesis of azaphilone pigments in *Monascus* fungi. *Chemical Science*, 8(7), 4917-4925.
- Chieza, N., ve Ward, J. (2015). Design in the age of living technology. In *Proceedings of the 2nd Biennial Research Through Design Conference* (Vol. 2).
- Citron, C.A., Barra, L., Wink, J., ve Dickschat, J.S. (2015). Volatiles from nineteen recently genome sequenced *actinomycetes*. *Organic & biomolecular chemistry*, 13(9), 2673-2683.
- Claus, H., ve Decker, H. (2006). Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(1), 3-14.
- Cockell, C. S., ve Knowland, J. (1999). *Ultraviolet radiation screening compounds*. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 74(3), 311–345.
- Çetinkaya, S., Yenidünya, A. F., Arslan, K., Arslan, D., Doğan, Ö., ve Daştan, T. (2020). Secondary metabolites of an of *Streptomyces griseorubens* isolate are predominantly pyrrole-and linoleic-acid like compounds. *Journal of Oleo Science*, 69(10), 1273-1280.

- d'Ischia, M., Wakamatsu, K., Napolitano, A., Briganti, S., Garcia-Borron, J.-C., Kovacs, D., ve Ito, S. (2013). Melanins and melanogenesis: methods, standards, protocols. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 26(5), 616–633.
- Dağ, T. (2017). *Fusarium sp. ile Pigment Üretimini Araştırılması. (Yüksek Lisans Tezi)*. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Damavandi, M.S., Shojaei, H., ve Esfahani, B.N. (2023). The anticancer and antibacterial potential of bioactive secondary metabolites derived from bacterial endophytes in association with *Artemisia absinthium*. *Scientific Reports*, 13(1), 18473.
- Darwesh, O. M., Elsehemy, I. A., El-Sayed, M. H., El-Ghamry, A. A., ve El-Hawary, A. S. (2020). *Thermoflavimicrobium dichotomicum* as a novel thermoalkaliphile for production of environmental and industrial enzymes. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 10, 4811-4820.
- De Carvalho, D. D., Costa, F. T., Duran, N., ve Haun, M. (2006). Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells. *Toxicology in vitro*, 20(8), 1514-1521.
- De Carvalho, J.C., Cardoso, L.C., Ghiggi, V., Woiciechowski, A.L., de Souza Vandenberghe, L.P., ve Soccol, C.R. (2014). Microbial Pigments. In: Brar, S., Dhillon, G., Soccol, C. (eds) *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*. Springer, New York, NY.
- de Massaguer, P.R., ve da Silva, A.R. (2014). Fruit and Vegetable Juices. *Encyclopedia of Food Microbiology: Volume 1 (İkinci Basım)*, Academic Press.
- De Souza, R. A., Kamat, N. M., ve Nadkarni, V. S. (2018). Purification and characterisation of a sulphur rich melanin from edible mushroom *Termitomyces albuminosus* Heim. *Mycology*, 9(4), 296-306.
- Dholakiya, R.N., Anil Kumar, M., ve Kalpana, H. (2017a). Mody Production and Characterization of Melanin from *Streptomyces Cavourensis* Strain RD8 Using Response Surface Optimization. *Environmental Pollution and Protection*, 2(4), 168-178.
- Dholakiya, R.N., Kumar, R., Mishra, A., Mody, K.H., ve Jha, B., (2017b). Antibacterial and Antioxidant Activities of Novel *Actinobacteria* Strain Isolated from Gulf of Khambhat, Gujarat. *Frontiers in Microbiology*, 12, 3-5.
- Ding, H., ve Xu, F. (2014). Production of Phytochemicals, Dyes and Pigments as Coproducts in Bioenergy Processes. *Bioenergy Research: Advances and Applications*, Chapter 20.
- Duff, G.A., Roberts, J.E., ve Foster, N. (1988). Analysis of the structure of synthetic and natural melanins by solid-phase NMR. *Biochemistry*, 27(18), 7112–7116.
- Dufossé, L. (2006). Microbial production of food grade pigments, *Food Technology and Biotechnology*, 44(3), 313–321.

- Duman, N., Ekinci, M. B., ve Kart, A. (2022). Hayvancılık İşletmesi ve Termal Kaynak Kökenli Toprak ve Su Örneklerinden Mikrobakteri İzolasyonu ve İzolatların Antibakteriyel Aktivitesi. *Akademik Gıda*, 20(4), 358-364.
- El-Batal, A. I., El-Sayyad, G. S., El-Ghamery, A., ve Gobara, M. (2017). Response surface methodology optimization of melanin production by *Streptomyces cyaneus* and synthesis of copper oxide nanoparticles using gamma radiation. *Journal of Cluster Science*, 28, 1083-1112.
- Elgendy, M., Ahmed, R., Hussein, A., ve Rasmey, A. H. (2024). Antioxidant and Anticancer Activity of Active Secondary Metabolites Produced by *Streptomyces griseorubens*. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences Assiut University*, 47(2), 1447-1458.
- Elhagrassy, A. F. (2018). Isolation and characterization of actinomycetes from Mural paintings of Snu-Sert-Ankh tomb, their antimicrobial activity, and their biodeterioration. *Microbiological research*, 216, 47-55.
- Eliato, T. R., Smith, J. T., Tian, Z., Kim, E. S., Hwang, W., Andam, C. P., ve Kim, Y. J. (2021). Melanin pigments extracted from horsehair as antibacterial agents. *Journal of Materials Chemistry B*, 9(6), 1536-1545.
- El-Naggar, N. E. A., El-Ewasy, S. M., ve El-Shweihy, N. M. (2024). *Streptomyces griseorubens* as a microbial cell factory for extracellular uricase production and bioprocess optimization using statistical approach. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 304.
- El-Naggar, N.A., ve El-Ewasy, S. (2017). Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. *Scientific Reports*, 7, 42129.
- El-Zawawy, N.A., Kenawy, E., Ahmed, S., ve El-Sapag, S. (2024). Bioproduction and optimization of newly characterized melanin pigment from *Streptomyces djakartensis* NSS-3 with its anticancer, antimicrobial, and radioprotective properties. *Microbial Cell Factories*, 23, 23.
- English, A. L., Boufridi, A., Quinn, R. J., ve Kurtböke, D. I. (2017). Evaluation of fermentation conditions triggering increased antibacterial activity from a near-shore marine intertidal environment-associated *Streptomyces* species. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2(1), 28-38.
- Erfilibeli, O. (2021). *Farklı habitatlardan toplanan aktinomisetlerin moleküler karakterizasyonu. (Yüksek Lisans Tez)*. Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Burdur.
- Evans, D.R., Herbert, R.B., Baumberg, S., Cove, J.H., Southey, E.A., Buss, A.D., ve Rudd, B.A. (1995). The biosynthesis of nikkomycin X from histidine in *Streptomyces tendae*. *Tetrahedron letters*, 36(13), 2351-2354.

- Feng, H., Zhang, D., Sun, Y., Zhi, Y., Mao, L., Luo, Y., ...Zhou, P. (2015). Expression and characterization of a recombinant laccase with alkalistable and thermostable properties from *Streptomyces griseorubens* JSD-1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176, 547-562.
- Fernandes, A.S., Nascimento, T.C. do, Jacob-Lopes, E., Rosso, V.V.D., ve Zepka, L.Q. (2018). Introductory Chapter: Carotenoids - A Brief Overview on Its Structure, Biosynthesis, Synthesis, and Applications. *Progress in Carotenoid Research*.
- Fernández-Rojas, B., Hernández-Juárez, J., ve Pedraza-Chaverri, J. (2014). Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of Functional Foods*, 11, 375–392.
- Futahashi, R., ve Osanai-Futahashi, M. (2021). Pigments in insects. *Pigments, pigment cells and pigment patterns*, 3-43.
- Galkiewicz, J. P., ve Kellogg, C. A. (2008). Cross-kingdom amplification using bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology. *Applied and environmental microbiology*, 74(24), 7828-7831.
- Galtier, N., ve Lobry, J. R. (1997). Relationships between genomic G+ C content, RNA secondary structures, and optimal growth temperature in prokaryotes. *Journal of molecular evolution*, 44, 632-636.
- Gao, Y., Han, Y., Li, X., Li, M., Wang, C., Li, Z., ...Wang, W. (2022). A salt-tolerant *Streptomyces paradoxus* D2-8 from rhizosphere soil of *Phragmites communis* augments soybean tolerance to soda saline-alkali stress. *Polish journal of microbiology*, 71(1), 43.
- Gençbay T. (2019). *Kapadokya yöresi topraklarından aktinomiset izolasyonu ve polifazik taksonomisi. (Doktora Tezi)*. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Ghadge, V., Kumar, P., Maity, T. K., Prasad, K., ve Shinde, P. B. (2021). A facile alternative sustainable process for the extraction and purification of microbial melanin. *BioRxiv*, 2021-05.
- Gitari, J.M., Muraya, M.M., Onyango, B.O., ve Maingi, J.M. (2023). Characterization and Antibacterial Activity of Soil *Actinomycetes* from Diverse Land Use Systems in Meru South, Eastern Kenya. *Journal of Advances in Microbiology*, 23(10), 93-108.
- Gonçalves, B. M., Salvador, J. A., Marin, S., ve Cascante, M. (2016). Synthesis and anticancer activity of novel fluorinated asiatic acid derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 114, 101-117.
- Gosset, G. (Ed.). (2023). *Melanins: Functions, biotechnological production, and applications*. Springer.
- Gökalp, H. Y., Nas, S., ve Certel, M. (2002). *Biyokimya-I* (3. Baskı). Denizli, Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Matbaası.

- Grewal, J., Wołacewicz, M., Pyter, W., Joshi, N., Drewniak, L., ve Pranaw, K. (2022). Colorful Treasure from Agro-Industrial Wastes: A Sustainable Chassis for Microbial Pigment Production. *Frontiers in Microbiology*, 13, 832918.
- Groth, I., Vettermann, R., Schuetze, B., Schumann, P., ve Saiz Jimenez, C., (1999). *Actinomycetes* in Karstic caves in northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). *Journal Microbiology Methods*, 36, 115–122.
- Gunawan, R., ve Nandiyanto, A.B.D. (2021). How to read and interpret ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectrums. *Indonesian Journal of Science and Technology*, 6(2), 267-298.
- Guo, L., Li, W., Gu, Z., Wang, L., Guo, L., Ma, S., ...Chang, J. (2023). Recent advances and progress on melanin: from source to application. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4360.
- Guo, L., Zhang, H., Tian, M., Tian, Z., Xu, Y., Yang, Y., ...Liu, Z. (2018). Electronic effects on reactivity and anticancer activity by half-sandwich N, N-chelated iridium (III) complexes. *New Journal of Chemistry*, 42(19), 16183-16192.
- Gülçin, I. (2007). Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino acids*, 32, 431-438.
- Gürcüm, B., ve Öneş, A. (2018). Bakteri ve Mikroalglerin Tekstil Boya-Baskıcılığında Kullanım Olanakları. *Uluslararası Sanatta Yüksek Teknoloji Kullanımı Kongresi Özel ve Tam Metin Bildiriler Kitabı*, İstanbul Gelişim Üniversitesi.
- Hachinohe, M., ve Matsumoto, H. (2005). Involvement of reactive oxygen species generated from melanin synthesis pathway in phytotoxicity of L-DOPA. *Journal of chemical ecology*, 31, 237-246.
- Hamed, A., Abdel-Razek, A. S., Frese, M., Wibberg, D., El-Haddad, A. F., Ibrahim, T. M., ...Shaaban, M. (2017). New oxaphenylene derivative from marine-derived *Streptomyces griseorubens* sp. ASMR4. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 72(1), 53-62.
- Han, J. H., Hwang, I. C., Cho, S. H., Jang, C., Kim, N. G., Yu, S. H., ... Kim, S. B. (2008). Description of *Streptomyces neopeptini* sp. nov., an actinobacterium with broad spectrum antifungal activities. *The Journal of Microbiology*, 46, 295-299.
- Hanton, S. D. (2001). Mass spectrometry of polymers and polymer surfaces. *Chemical reviews*, 101(2), 527-570.
- Hayakawa, M., Ishizawa, K., ve Nonomura, H., (2008). Distribution of rare *actinomycetes* in Japanese soils. *Journal of Fermentation Technology*, 66, 367–373.
- Henney, J. E., Taylor, C. L., Boon, C. S., ve Institute of Medicine (US) Committee on Strategies to Reduce Sodium Intake. (2010). Preservation and physical property

- roles of sodium in foods. In *Strategies to reduce sodium intake in the United States*. National Academies Press (US).
- Heo, C. S., Kang, J. S., Yang, J. W., Lee, M. A., Lee, H. S., ve Shin, H. J. (2024). Labdane-type diterpenoids from *Streptomyces griseorubens* and their antimicrobial and cytotoxic activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(6), 3311.
- Hill, H.Z. (1992). The function of melanin or six blind people examine an elephant. *Bioessays*. 14(1), 49-56.
- Hodgson, D. A. (2000). Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 42, 47-238.
- Hong, L., ve Simon, J.D. (2007). Current understanding of the binding sites, capacity, affinity, and biological significance of metals in melanin. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(28), 7938-7947.
- Horiuchi, M., Washio, J., Mayanagi, H., ve Takahashi, N. (2009). Transient acid-impairment of growth ability of oral *Streptococcus*, *Actinomyces*, and *Lactobacillus*: A possible ecological determinant in dental plaque. *Oral microbiology and immunology*, 24(4), 319-324.
- Hou, R., Liu, X., Xiang, K., Chen, L., Wu, X., Lia, W., ve Fu, J. (2018). Characterization of the physicochemical properties and extraction optimization of natural melanin from *Inonotus hispidus* mushroom. *Food Chemistry*.
- Huang, L. (2013). Optimization of a new mathematical model for bacterial growth. *Food Control*, 32(1), 283-288.
- Huang, Q., Miyaki, N., Li, Z., Takahashi, Y., Ishizuka, S., Hayakawa, T., Wakamatsu, J., ve Kumura, H. (2023). Supplementary effect of whey components on the monascin productivity of *Monascus sp.* *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 103(8), 4234–4241.
- Ibeyaima, A., Rana, J., Dwivedi, A., Gupta, S., Sharma, S. K., Saini, N., ve Sarethy, I. P. (2016). Characterization of *Yuhushiiella sp.* TD-032 from the Thar Desert and its antimicrobial activity. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 7(2), 32.
- Ibrahim, W.M., Olama, Z.A., Abou-elela, G.M., Ramadan, H.S., Hegazy, G.E., ve El Badan, D.E.S. (2023). Exploring the antimicrobial, antiviral, antioxidant, and antitumor potentials of marine *Streptomyces tunisiensis* W4MT573222 pigment isolated from Abu-Qir sediments, Egypt. *Microbial Cell Factories*, 22, 94.
- Imai, H., Suzuki, K. I., Morioka, M., Numasaki, Y., Kadota, S., Nagai, K., ...Saito, T. (1987). Okilactomycin, A Novel Antibiotic Produced By A *Streptomyces* Species I. Taxonomy, Fermentation, Isolation And Characterization. *The Journal Of Antibiotics*, 40(11), 1475-1482.

- Ito, S. (2003). A Chemist's View of Melanogenesis. *Pigment Cell Research*, 16(3), 230–236.
- Ito, S., Wakamatsu, K. (2008). Chemistry of mixed melanogenesis—pivotal roles of dopaquinone. *Photochemistry and photobiology*, 84(3), 582-592.
- Jawaid, M., ve Khan, M. M. (Eds.). (2018). Polymer-based nanocomposites for energy and environmental applications. *Woodhead Publishing*.
- Jiang, S., Zhang, E., Ruan, H., Ma, J., Zhao, X., Zhu, Y., ...Li, X. (2021). Actinomycin V induces apoptosis associated with mitochondrial and PI3K/AKT pathways in human CRC cells. *Marine Drugs*, 19(11), 599.
- Johnson, E.A., ve Schroeder, W.A. (1996). Microbial carotenoids. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 119–178.
- Kalabalık, Z. A. (2023). *Yeni Paladyum Komplekslerinin Kolon Kanseri Hücrelerindeki Anti-Kanser Aktivitesinin Araştırılması. (Yüksek Lisans Tezi)*. Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Burdur.
- Kamarudheen, N., Naushad, T., ve Rao, B.K.V. (2019). Biosynthesis, Characterization and Antagonistic Applications of Extracellular Melanin Pigment from Marine *Nocardiopsis Sp.* *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 53(2), 112-120.
- Katritzky, A.R., Akhmedov, N.G., Denisenko, S.N., ve Denisko, O.V. (2002). ¹H NMR spectroscopic characterization of solutions of *Sepia* melanin, *Sepia* melanin free acid and human hair melanin. *Pigment cell research*, 15(2), 93-97.
- Kazi, Z., Hungund, B. S., Yaradoddi, J. S., Banapurmath, N. R., Yusuf, A. A., Kishore, K. L., ...Buyondo, K. A. (2022). Production, characterization, and antimicrobial activity of pigment from *Streptomyces species*. *Journal of Nanomaterials*, 2022(1), 3962301.
- Kazmiruk, V. (2012). Scanning electron microscopy. *InTech*.
- Khalil, I. R., Irorere, V. U., Radecka, I., Burns, A. T., Kowalczyk, M., Mason, J. L., ve Khechara, M. P. (2016). Poly- γ -glutamic acid: biodegradable polymer for potential protection of beneficial viruses. *Materials*, 9(1), 28.
- Khanafari, A., Assadi, M. M., ve Fakhr, F. A. (2006). Review of prodigiosin, pigmentation in *Serratia marcescens*. *Online Journal of Biological Sciences*, 6(1), 1-13.
- Kim, H., Han, S., Lee, C., Lee, K., Park, S., ve Kim, Y. (2003). Use of prodigiosin for treating diabetes mellitus. *US Patent* US6638968B1
- Kirti, K., Amita, S., Priti, S., Mukesh Kumar, A., ve Jyoti, S. (2014). Colorful World of Microbes: Carotenoids and Their Applications. *Advances in Biology*, 2014, 1–13.

- Kishida, R., Aspera, S. M., ve Kasai, H. (2021). *Melanin chemistry explored by quantum mechanics*. Springer Singapore.
- Knaggs, A. R. (2003). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural product reports*, 20(1), 119-136.
- Koenig, J.L. (1984). Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Polymers. *Advances in Polymer Science 54, Spectroscopy: Fluorescence, FT-IR*, 87-154, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Krysenko, S., ve Wohlleben, W. (2024). Role of Carbon, Nitrogen, Phosphate and Sulfur Metabolism in Secondary Metabolism Precursor Supply in *Streptomyces* spp. *Microorganisms*, 12(8), 1571.
- Kulkarni, A., Desai, S.V., ve Shet, A.R. (2017). Isolation and Characterization of Pigment Producing *Actinomycetes* from Different Sources. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 8(3), 101–109.
- Kumar, A., Vishwakarma, H.S., Singh, J., Dwivedi, S., ve Kumar, M. (2015). Microbial pigments: production and their applications in various industries. *International journal of pharmaceutical chemical and biological sciences*, 5(1), 203-212.
- Lane, D. J., (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115--175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. New York: Wiley.
- Larsson, B., ve Tjälve, H. (1978). Studies on the melanin-affinity of metal ions. *Acta Physiologica Scandinavica*, 104(4), 479-484.
- Law, JW-F., Ser H-L., Duangjai, A., Saokaew, S., Bukhari, S.I., Khan, T.M., ...Lee, L.-H. (2017). *Streptomyces colonosanans* sp. nov., A Novel Actinobacterium Isolated from Malaysia Mangrove Soil Exhibiting Antioxidative Activity and Cytotoxic Potential against Human Colon Cancer Cell Lines. *Frontiers in Microbiology*, 8, 877.
- Lee, J.Y., ve Hwang, B.K. (2002). Diversity of antifungal *actinomycetes* in various vegetative soils of Korea. *Canadian Journal of Microbiology*, 48, 407-417.
- Li, C., Ji, C., ve Tang, B. (2018). Purification, characterisation and biological activity of melanin from *Streptomyces* sp. *FEMS microbiology letters*, 365(19), fny077.
- Liew, S. K., Malagobadan, S., Arshad, N. M., ve Nagoor, N. H. (2020). A review of the structure—activity relationship of natural and synthetic antimetastatic compounds. *Biomolecules*, 10(1), 138.
- Lin, T., Chiu, S., Chen, C., ve Lin, C. (2023). Investigation of monacolin K, yellow pigments, and citrinin production capabilities of *Monascus purpureus* and *Monascus ruber* (*Monascus pilosus*). *Journal of Food and Drug Analysis*, 31(1), 6.

- Lino, V., ve Manini, P. (2022). Dihydroxynaphthalene-based allomelanins: A source of inspiration for innovative technological materials. *ACS omega*, 7(18), 15308-15314.
- Lopes, F.C., ve Ligabue-Braun, R. (2021). Agro-Industrial Residues: Eco-Friendly and Inexpensive Substrates for Microbial Pigments Production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 589414.
- Lorquin, F., Piccerelle, P., Orneto, C., Robin, M., ve Lorquin, J. (2022). New insights and advances on pyomelanin production: from microbial synthesis to applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 49(4), kuac013.
- Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., Kämpfer, P., ve Whitman, W. B. (2012). Road map of the phylum Actinobacteria. In *Bergey's manual® of systematic bacteriology* (pp. 1-28). Springer, New York, NY.
- Luo, Y., Matejic, T., Ng, C. K., Nunnally, B., Porter, T., Raso, S., ...Steckert, J. (2011). Characterization and analysis of biopharmaceutical proteins. *Separation science and technology*, 10, 283-359.
- Ma, A., Zhang, X., Jiang, K., Zhao, C., Liu, J., Wu, M., ...Xu, S. (2020). Phylogenetic and physiological diversity of cultivable *actinomycetes* isolated from alpine habitats on the Qinghai-Tibetan Plateau. *Frontiers in Microbiology*, 11, 555351.
- Madhukar, C.V. (2021). Antimicrobial and antioxidant potentials of carotenoid pigment produced by indigenous novel soil isolate *Rhodococcus kroppenstedtii*. *World Journal of Environmental Biosciences*, 10(1-2021), 29-34.
- Madhusudhan, D. N., Mazhari, B. B. Z., Dastager, S. G., ve Agsar, D. (2014). Production and cytotoxicity of extracellular insoluble and droplets of soluble melanin by *Streptomyces lusitanus* DMZ-3. *BioMed Research International*, 2014(1), 306895.
- Madigan, T. M., Marinko, M. J., Stahl, A. D., ve Clark, P. D. (2013). *Brock Biology of Microorganisms*. publishing as Benjamin Cummings. San Francisco.
- Magarelli, M., Passamonti, P., ve Renieri, C. (2010). Purification, characterization and analysis of *sepia* melanin from commercial sepia ink (*Sepia officinalis*). *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 5, 18-28.
- Majumder, D. R., Lambate, S., Firfire, A., Palekar, R., Shaikh, A., Bhandari, A., ve Sayyed, R. (2018). Pharmaceutically significant enzymes-tyrosinase and asperginase from mesophilic *Streptomyces*-A3DR2S. *World J. Pharmaceut. Res.*, 7, 89-109.
- Malik, K., Tokkas, J., ve Goyal, S. (2012). Microbial pigments: a review. *International Journal of Microbial Resource Technology*, 1(4), 361–365.
- Manikprabhu, D., ve Lingappa, K. (2013). γ Actinorhodin a natural and attorney source for synthetic dye to detect acid production of fungi. *Saudi journal of biological sciences*, 20(2), 163-168.

- Manoharan, G., Kumarasamy, S., ve Ranganathan, M. (2024). Synthesis of Silver Nanoparticles using *Streptomyces variabilis* MGR21: Characterization, Cytotoxicity and Photocatalytic Applications. *Research Journal of Biotechnology*, 19(12), 118-125.
- Martín, J. F., Sola-Landa, A., Santos-Beneit, F., Fernández-Martínez, L. T., Prieto, C., ve Rodríguez-García, A. (2011). Cross-talk of global nutritional regulators in the control of primary and secondary metabolism in *Streptomyces*. *Microbial biotechnology*, 4(2), 165-174.
- Martínez, L.M., Cisneros-Martínez, A.M., Hernández-Chávez, G., Martinez, A., ve Gosset, G. (2023). Biotechnological Production of Melanins with Recombinant Microorganisms. In *Melanins: Functions, biotechnological production, and applications* (pp. 67-90). Cham: Springer International Publishing.
- Martínez-Cámara, S., Ibañez, A., Rubio, S., Barreiro, C., ve Barredo, J.-L. (2021). Main Carotenoids Produced by Microorganisms. *Encyclopedia*, 1, 1223–1245.
- Martinez-Gonzalez, J. A., Cavaye, H., McGettrick, J.D., Meredith, P., Motovilov, K.A., ve Mostert, A.B. (2021). Interfacial water morphology in hydrated melanin. *Soft Matter*, 17(34), 7940-7952.
- Matos-Peralta, Y., Gao, Z., Dar, A. A., ve Santato, C. (2023). Exploiting Melanin-Metal Interactions for Emerging Technologies. *Melanins: Functions, biotechnological production, and applications*, 111-125.
- McCalla, T. M. (1940). Cation adsorption by bacteria. *Journal of Bacteriology*, 40(1), 23-32.
- McCallum, N.C., Son, F.A., Clemons, T.D., Weigand, S.J., Gnanasekaran, K., Battistella, C., ve Gianneschi, N.C. (2021). Allomelanin: A Biopolymer of Intrinsic Microporosity. *Journal of the American Chemical Society*, 143(10), 4005–4016.
- McGraw, K.J. (2006). Mechanisms of melanin-based coloration. *Bird coloration: mechanisms and measurements*, 1, 243-294.
- Micillo, R., Panzella, L., Koike, K., Monfrecola, G., Napolitano, A., ve d'Ischia, M. (2016). “Fifty shades” of black and red or how carboxyl groups fine tune eumelanin and pheomelanin properties. *International journal of molecular sciences*, 17(5), 746.
- Min, K., Park, K., Park, D. H., ve Yoo, Y. J. (2015). Overview on the biotechnological production of L-DOPA. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 575-584.
- Misawa, N. (2021). Carotenoids: Biosynthetic and Biofunctional Approaches. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer, 14, 175-181.
- Moghannem, S. A., Elsheikh, H. H., ve Abd-elwahab, K. S. (2013). Purification of the antitumor active metabolite from *Streptomyces xylophagus* Ha. Ph-7 crude extract

- isolated from Hamam Pharaoh hot spring. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 51(1), 275-284.
- Mohana, D.C., Thippeswamy, S., ve Abhishek, R. U. (2013). Antioxidant, antibacterial, and ultraviolet-protective properties of carotenoids isolated from *Micrococcus* spp. *Radiation Protection and Environment*, 36(4), 168-174.
- Mortimer, R.G. (2004). *Fizikokimya* (Cilt-1). Palme Yayıncılık, Ankara.
- Mumtaz, R., Bashir, S., Numan, M., Shinwari, Z. K., ve Ali, M. (2019). Pigments from soil bacteria and their therapeutic properties: A mini review. *Current Microbiology*, 76, 783-790.
- Nagatsu, T., Nakashima, A., Watanabe, H., Ito, S., ve Wakamatsu, K. (2022). Neuromelanin in Parkinson's disease: tyrosine hydroxylase and tyrosinase. *International journal of molecular sciences*, 23(8), 4176.
- Naligama, K. N., Weerasinghe, K. E., ve Halmillawewa, A. P. (2022). Characterization of bioactive *actinomyces* isolated from Kadolkele mangrove sediments, Sri Lanka. *Polish Journal of Microbiology*, 71(2), 191-204.
- Nappi, A.J., ve Ottaviani, E. (2000). Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays*, 22(5), 469–480.
- Nayaka, S., Nagaraja, S. K., Chakraborty, B., Bhat, M. P., Swamy, P. S., Airodagi, D., ...Pednekar, A. R. (2020b). Antimicrobial and enzymatic potential of *Streptomyces* sp. KAS-1 isolated from the microbiologically unexplored estuary of Kali river ecosystem. *Int J Res Pharm Sci*, 11(2), 1655-66.
- Nayaka, S., R., M., Chakraborty, B., Bhat, M.P., S., P.S., N., S.K., M., H.H., B., D.S., Airodagi, D., ve Haged, K. (2020a). A Potential Bioactive Secondary Metabolites and Antimicrobial Efficacy of *Streptomyces thermocarboxydus* Strain KSA-2, Isolated from Kali River, Karwar. *Current Research in Microbiology and Infection (CRMI)*, 1(1), 5-13.
- Nazeeh, M., Asmaey, M. A., Eladly, A., ve Afifi, M. M. (2024). Metabolomic Profiling of *Streptomyces griseorubens* with the Evaluation of their Antioxidant and Anticancer Potentialities. *Egyptian Journal of Chemistry*, 67(8), 251-268.
- Ng, Z. Y., Fang, B. Z., Li, W. J., ve Tan, G. Y. A. (2019). *Marinitenerispora sediminis* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Nocardiopsaceae* isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(10), 3031-3040.
- Ngoc-Tung, Q., Nguyen, V. T. H., Tien-Phi, Q., ve Huy, N. Q. (2024). Antimicrobial and cytotoxic potential of endophytic actinomyces isolated from. *Cinnamomum cassia*.
- Nguyen, Q. H., Nguyen, H. V., Vu, T. H. N., Chu-Ky, S., Vu, T. T., Hoang, H., ...Phi, Q. T. (2019). Characterization of endophytic *Streptomyces griseorubens* MPT42 and

- assessment of antimicrobial synergistic interactions of its extract and essential oil from host plant *Litsea cubeba*. *Antibiotics*, 8(4), 197.
- Ohe, T., ve Watanabe, Y. (1984). Regulation of hypoxanthine metabolism in *Streptomyces cyanogenus*. *Agricultural and biological chemistry*, 48(6), 1659-1660.
- Orlandi, V.T., Martegani, E., Giaroni, C., Baj, A., ve Bolognese, F. (2022). Bacterial pigments: A colorful palette reservoir for biotechnological applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(3), 981-1001.
- Özçelik, S. (1998). Genel Mikrobiyoloji Uygulama Klavuzu. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, 2, 2-91.
- Pachaiyappan, A., Sadhasivam, G., Kumar, M., ve Muthuvel, A. (2020). Biomedical Potential of Astaxanthin from Novel Endophytic Pigment Producing Bacteria *Pontibacter korlensis* AG6. *Waste and Biomass Valorization*.
- Paiva, N. L., Demain, A.L., ve Roberts, M. F. (1993). The immediate precursor of the nitrogen-containing ring of rapamycin is free pipecolic acid. *Enzyme and microbial technology*, 15(7), 581-585.
- Parte, A., Whitman, W. B., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., ...Suzuki, K. I. (Eds.). (2012). *Bergey's manual of systematic bacteriology: volume 5: the Actinobacteria*. Springer Science & Business Media.
- Patil, N. J., Naranjo, P. G. V., ve Zappone, B. (2018). Wet Adhesive Properties of Asian Green Mussel (*Perna viridis*) Foot Protein Pvfp-5: An Underwater Adhesive Primer. *Novasinerгия*, ISSN 2631-2654, 1(2), 90-99.
- Periyasamy, S., Devi, S. S., ve Kathirvel, P. (2018). Spectroscopic studies, Antioxidant and Anticancer attributes of diffusible eumelanin produced by marine *Streptomyces rochei*. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 12(2), 147-158.
- Periz, Ç. D., Ulusoy, S., Tınaz, G., ve Şekerler, T. (2020). Antibacterial and Anticancer Activities of Violacein Extracted Through Ultrasound-Assisted Extraction Method. *Akademik Gıda*, 18(3), 241-246.
- Pham, H. T., Nguyen, N. P., Phi, T. Q., Dang, P. T., ve Le, H. G. (2014). The antibacterial and anticancer activity of marine Actinomycete strain HP411 isolated in the Northern Coast of Vietnam. *actinomycetes*, 5(9), 15.
- Piccollo, M., Aceto, M., ve Vitorino, T. (2019). UV-Vis spectroscopy. *Physical sciences reviews*, 4(4), 20180008.
- Plonka, P.M., ve Grabacka, M. (2006). Melanin synthesis in microorganisms--biotechnological and medical aspects. *Acta Biochemica Polonica*, 53(3), 429-443.
- Potts, A. M., ve Au, P. C. (1976). The affinity of melanin for inorganic ions. *Experimental eye research*, 22(5), 487-491.

- Pralea, I.E., Moldovan, R.C., Petrache, A.M., Ilieș, M., Hegheș, S.C., Ielciu, I., ...Iuga, C.A. (2019). From Extraction to Advanced Analytical Methods: The Challenges of Melanin Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16), 3943.
- Pukalski, J., Mokrzyński, K., Chyc, M., Potrzebowski, M. J., Makowski, T., Dulski, M., ve Latowski, D. (2025). Synthesis and characterization of allomelanin model from 1,8-dihydroxynaphthalene autooxidation. *Scientific Reports*, 15(1), 567.
- Punyamurtula, U., Zhang, S., Brown, T., De La Cruz, A., Raufi, A., Strandberg, J., ...El-Deiry, W. (2022). IC50-Seeding Density Slope (ISDS)-measurement as a standardized methodology for assessing anti-cancer therapeutic activity in vitro. *Cancer Research*, 82(12_Supplement), 3241-3241.
- Qin, Z., Wang, X., Rateb, M. E., Ass'ad, L. A., Jaspars, M., Deng, Z., Yu, Y., ve Deng, H. (2014). Disruption of a methyltransferase gene in actinomycin G gene cluster in *Streptomyces iakyrus* increases the production of phenazinomycin. *FEMS Microbiology Letters*, 352(1), 62–68.
- Quach, N. T., Nguyen, Q. H., Vu, T. H. N., Le, T. T. H., Ta, T. T. T., Nguyen, T. D., ...Phi, Q. T. (2021). Plant-derived bioactive compounds produced by *Streptomyces variabilis* LCP18 associated with *Litsea cubeba* (Lour.) Pers as potential target to combat human pathogenic bacteria and human cancer cell lines. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(3), 1215-1224.
- Rajagopal, L., Sundari, C.S., Balasubramanian, D., ve Sonti, R.V. (1997). The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage. *FEBS letters*, 415(2), 125-128.
- Ramalingam, V., ve Rajaram, R. (2016). Antioxidant activity of 1-hydroxy-1-norresistomycin derived from *Streptomyces variabilis* KP149559 and evaluation of its toxicity against zebra fish *Danio rerio*. *RSC Advances*, 6(20), 16615-16623.
- Rana, B., Bhattacharyya, M., Patni, B., Arya, M., ve Joshi, G.K. (2021). The Realm of Microbial Pigments in the Food Color Market. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 603892.
- Rao, K. V. R., Mani, P., Satyanarayana, B., ve Rao, T. R. (2017). Purification and structural elucidation of three bioactive compounds isolated from *Streptomyces coelicoflavus* BC 01 and their biological activity. *3 Biotech*, 7(1), 24.
- Raval, K. M., Vaswani, P. S., ve Majumder, D. R. (2012). Biotransformation of a single amino-acid L-tyrosine into a bioactive molecule L-DOPA. *Int J Sci Res*, 2, 2250-3153.
- Recky, J. R. N., Serrano, M. P., Dántola, M. L., ve Lorente, C. (2021). Oxidation of tyrosine: Antioxidant mechanism of l-DOPA disclosed. *Free Radical Biology and Medicine*, 165, 360-367.

- Reichenbach, H., Kohl, W., Böttger-Vetter, A., ve Achenbach, H. (1980). Flexirubin-type pigments in *Flavobacterium*. *Archives of Microbiology*, 126(3), 291–293.
- Restaino, O. F., Manini, P., Kordjazi, T., Alfieri, M. L., Rippa, M., Mariniello, L., ve Porta, R. (2024). Biotechnological production and characterization of extracellular melanin by *Streptomyces nashvillensis*. *Microorganisms*, 12(2), 297.
- Restaino, O. F., Scognamiglio, M., Mirpoor, S. F., Cammarota, M., Ventriglia, R., Giosafatto, C. V. L., ...Schiraldi, C. (2022). Enhanced *Streptomyces roseochromogenes* melanin production by using the marine renewable source *Posidonia oceanica* egagropili. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(21), 7265–7283.
- Richardson, M., ve Khosla, C. (1999). Structure, Function, and Engineering of Bacterial Aromatic Polyketide Synthases. *Comprehensive Natural Products Chemistry*, 473–494.
- Riesz, J. (2007). *The spectroscopic properties of melanin. (Ph.D. thesis)*. University of Queensland Physical Sciences Queensland, Australia.
- Rohr, J., ve Hertweck, C. (2010). Type II PKS. *Comprehensive Natural Products II*, 227–303.
- Rostami, H., Hamed, H., ve Yolmeh, M. (2016). Some biological activities of pigments extracted from *Micrococcus roseus* (PTCC 1411) and *Rhodotorula glutinis* (PTCC 5257). *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 29(4), 684–695.
- Rudrappa, M., Kumar, S., Kumar, R. S., Almansour, A. I., Perumal, K., ve Nayaka, S. (2022). Bioproduction, purification and physicochemical characterization of melanin from *Streptomyces* sp. strain MR28. *Microbiological Research*, 263, 127130.
- Ryu, S. R., Noda, I., ve Jung, Y. M. (2011). Positional fluctuation of IR absorption peaks: Frequency shift of a single band or relative intensity changes of overlapped bands?. *American laboratory*, 43(4), 40–43.
- Saigusa, N., Yamamoto, K., Tsutsui, M., ve Teramoto, Y. (2014). Microbial production of novel pigments from black rice anthocyanin. *Food Science and Technology Research*, 20(5), 1013–1016.
- Saini, A. S., ve Melo, J. S. (2015). One-pot green synthesis of eumelanin: process optimization and its characterization. *RSC Advances*, 5(59), 47671–47680.
- Samuchiwal, S., Gola, D., ve Malik, A. (2021). Decolourization of textile effluent using native microbial consortium enriched from textile industry effluent. *Journal of Hazardous Materials*, 402, 123835.
- Sánchez-Díez, M., Romero-Jiménez, P., Alegría-Aravena, N., Gavira-O'Neill, C. E., Vicente-García, E., Quiroz-Troncoso, J., ...Pastor, J. M. (2025). Assessment of Cell

- Viability in Drug Therapy: IC₅₀ and Other New Time-Independent Indices for Evaluating Chemotherapy Efficacy. *Pharmaceutics*, 17(2), 247.
- Sánchez-Illana, Á., Piñeiro-Ramos, J. D., Ramos-García, V., Ten-Doménech, I., Vento, M., ve Kuligowski, J. (2020). *Oxidative stress biomarkers in the preterm infant. Advances in Clinical Chemistry*.
- Sanjivkumar, M., Silambarasan, T., Balagurunathan, R., ve Immanuel, G. (2018). Biosynthesis, molecular modeling and statistical optimization of xylanase from a mangrove associated actinobacterium *Streptomyces variabilis* (MAB3) using Box-Behnken design with its bioconversion efficacy. *International journal of biological macromolecules*, 118, 195-208.
- Sansinenea, E., ve Ortiz, A. (2015). Melanin: a photoprotection for *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Biotechnology letters*, 37(3), 483-490.
- Sapkota, A., Thapa, A., Budhathoki, A., Sainju, M., Shrestha, P., ve Aryal, S. (2020). Isolation, characterization, and screening of antimicrobial-producing *actinomycetes* from soil samples. *International journal of microbiology*, 2020.
- Saritha, M., Arora, A., Singh, S., ve Nain, L. (2013). *Streptomyces griseorubens* mediated delignification of paddy straw for improved enzymatic saccharification yields. *Bioresource technology*, 135, 12-17.
- Sarmiento-Tovar, A.A., Prada-Rubio, S.J., Gonzalez-Ronseria, J., Coy-Barrera, E., ve Diaz, L. (2024). Exploration of the Bioactivity of Pigmented Extracts from *Streptomyces* Strains Isolated Along the Banks of the Guaviare and Arauca Rivers (Colombia). *Fermentation*, 10, 529.
- Sarmiento-Tovar, A.A., Silva, L., Sánchez-Suárez, J., ve Diaz, L. (2022). *Streptomyces*-Derived Bioactive Pigments: Ecofriendly Source of Bioactive Compounds. *Coatings*, 12, 1858.
- Sayed, M. H. E., Aziz, Z. K. A., ve Abouzaid, A. M. (2014). Efficacy of extracellular metabolite produced by *Streptomyces levis* strain LX-65 as a potential herbicidal agent. *Journal of American Science*, 10(11), 169-180.
- Schmitt, J., ve Flemming, H.C. (1998). FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41(1), 1-11.
- Schmitz, H., IR, H., KE, C., KE, P., ve Lein, J. (1965). Ossamycin, a new cytotoxic agent. *The Journal of Antibiotics, Series A*, 18(2), 82-88.
- Sedeek, A. M., Salah, I., Kamel, H. L., Soltan, M. A., Nour, E., Alshammari, A., ...Elsayed, T. R. (2023). Genome-based analysis of the potential bioactivity of the terrestrial *Streptomyces vinaceusdrappus* strain AC-40. *Biology*, 12(3), 345.
- Seesuriyachana, P., Takenakab, S., Kuntiyaa, A., Klayraungc, S., Murakamib, S., ve Aokib, K. (2007). Metabolism of azo dyes by *Lactobacillus casei* TISTR 1500 and effects of various factors on decolorization. *Water Research*, 41, 985-992.

- Selim, M. S. M., Abdelhamid, S. A., ve Mohamed, S. S. (2021). Secondary metabolites and biodiversity of *actinomycetes*. *Journal of Genetic Engineering and biotechnology*, 19(1), 72.
- Shahid, M., ve Mohammad, F. (2013). Recent advancements in natural dye applications: a review. *Journal of cleaner production*, 53, 310-331.
- Sharma, A., Gautam, S., ve Saxena, S. (2014). *Streptomyces*. Encyclopedia of Food Microbiology: Volume 3 (İkinci Basım), Academic Press.
- Shende, V. V., Bauman, K. D., ve Moore, B. S. (2024). The shikimate pathway: gateway to metabolic diversity. *Natural Product Reports*, 41(4), 604-648.
- Shirata, A., Tsukamoto, T., Yasui, H., Hata, T., Hayasaka, S., ve Kojima, A. (2000). Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 34, 131-140.
- Sholekha, S., Budiarti, S., Hasan, A.E.Z., Krishanti, N.P.R.A., ve Wahyudi, A.T. (2024). Antimicrobial Potential of an Actinomycete *Gordonia terrae* JSN1.9-Derived Orange Pigment Extract. *Hayati Journal of Biosciences*, 31(1), 161-170.
- Shubha, M., Ushashi, B., Veena, S., ve Bhaskara, R., (2017). Antimicrobial activity of *Streptomyces variabilis* strain-VITUMVB03 isolated from Kanyakumari marine sediments. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10, 112-116.
- Siddique, S., Syed, Q., Adnan, A., ve Qureshi, F. A. (2014). Isolation, characterization and selection of avermectin-producing *Streptomyces avermitilis* strains from soil samples. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(6).
- Silva, C., Santos, A., Salazar, R., Lamilla, C., Pavez, B., Meza, P., ...Barrientos, L. (2019). Evaluation of dye sensitized solar cells based on a pigment obtained from Antarctic *Streptomyces fildesensis*. *Solar Energy*, 181, 379-385.
- Singh Parmar, R., ve Singh, C. (2018). A comprehensive study of eco-friendly natural pigment and its applications. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 13, 22-26.
- Singh, R. B., Liu, L., Yung, A., Anchouche, S., Mittal, S. K., Blanco, T., ve Dana, R. (2021b). Ocular redness – II: Progress in development of therapeutics for the management of conjunctival hyperemia. *The Ocular Surface*, 21, 66-77.
- Singh, S., Nimse, S.B., Mathew, D.E., Dhimmar, A., Sahastrabudhe, H., Gajjar, A., ve Shinde, P.B. (2021a). Microbial melanin: Recent advances in biosynthesis, extraction, characterization, and applications. *Biotechnology Advances*, 53, 107773.
- Singh, V., Haque, S., Kumari, V., El-Enshasy, H. A., Mishra, B. N., Somvanshi, P., ve Tripathi, C. K. M. (2019). Isolation, purification, and characterization of heparinase from *Streptomyces variabilis* MTCC 12266. *Scientific reports*, 9(1), 6482.

- Singh, V., Haque, S., Singh, H., Verma, J., Vibha, K., Singh, R., ...Tripathi, C. K. M. (2016). Isolation, screening, and identification of novel isolates of actinomycetes from India for antimicrobial applications. *Frontiers in microbiology*, 7, 1921.
- Singla, S., Htut, K. Z., Zhu, R., Davis, A., Ma, J., Ni, Q. Z., ... Dhinojwala, A. (2021). Isolation and characterization of allomelanin from pathogenic black knot fungus—a sustainable source of melanin. *ACS omega*, 6(51), 35514-35522.
- Slama, N., Mankai, H., Ayed, A., Mezhoud, K., Rauch, C., Lazim, H., ...Limam, F. (2014). *Streptomyces tunisiensis* sp. nov., a novel *Streptomyces* species with antibacterial activity. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105, 377-387.
- Socrates, G. (2001). *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*. John Wiley & Sons.
- Solano, F. (2014). Melanins: Skin Pigments and Much More—Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes. *New Journal of Science*, 2014, 1–28.
- Solomons, T.W.G., Fryhle, C.B., ve Snyder, S.A. (2014). *Organic Chemistry* (11th ed.). John Wiley & Sons.
- Smith, B. (2024). Infrared Spectral Interpretation, In The Beginning I: The Meaning of Peak Positions, Heights, and Widths. *Spectroscopy*, 39(4), 18-24.
- Srilekha, V., Krishna, G., Seshasrinivas, V., ve Charya, M.A.S. (2017). Antibacterial and anti-inflammatory activities of marine *Brevibacterium* sp. *Research in pharmaceutical sciences*, 12(4), 283-289.
- Stafsnes, M.H., ve Bruheim, P. (2013). Pigmented Marine Heterotrophic Bacteria: Occurrence, Diversity, and Characterization of Pigmentation. *Marine Biomaterials Characterization, Isolation and Applications*, CRC Press, 117-147.
- Stankovic, N., Radulovic, V., Petkovic, M., Vuckovic, I., Jadranin, M., Vasiljevic, B., ve Nikodinovic-Runic, J. (2012). *Streptomyces* sp. JS520 produces exceptionally high quantities of undecylprodigiosin with antibacterial, antioxidative, and UV-protective properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(5), 1217–1231.
- Stapley, E. O., Hendlin, D., Jackson, M., Miller, A. K., Hernandez, S., ve Mata, J. M. (1971). Azirinomycin. I Microbial production and biological characteristics. *The Journal of Antibiotics*, 24(1), 42-47.
- Stevens, C. L., Nagarajan, K., ve Haskell, T. H. (1962). The structure of amicetin. *The Journal of Organic Chemistry*, 27(9), 2991-3005.
- Subhash, G.S., Karad, D., ve Kulkarni, S. (2016). Screening of tyrosinase producing soil actinomycetes from Shirala region of Maharashtra, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(3), 345-53.
- Suriya, J., Bharathiraja, S., Manivasagan, P., ve Kim, S.K., (2016). Enzymes from rare actinobacterial strains. *Advances in Food and Nutrition Research*, 79, 67-98.

- Suzuki, K., Nagai, K., Shimizu, Y., ve Suzuki, Y., (2014). Search for *actinomycetes* in screening for new bioactive compounds. *Actinomycetologica*, 8, 122–127.
- Syed, D. G., Agasar, D., Kim, C. J., Li, W. J., Lee, J. C., Park, D. J., ...Jiang, C. L. (2007). *Streptomyces tritolerans* sp. nov., a novel actinomycete isolated from soil in Karnataka, India. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92, 391-397.
- Takizawa, M., Colwell, R.R., Hill, R.T., (2003). Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 997–1002.
- Tan, L. T.-H., Chan, K.-G., Pusparajah, P., Yin, W.-F., Khan, T. M., Lee, L.-H., ve Goh, B.-H. (2019a). Mangrove derived *Streptomyces* sp. MUM265 as a potential source of antioxidant and anticolon-cancer agents. *BMC Microbiology*, 19(1).
- Tan, L.T., Chan, C.K., Chan, K.G., Pusparajah, P., Khan, T.M., Ser, H.L., Lee, L.H., ev Goh, B.H. (2019b). *Streptomyces* sp. MUM256: A Source for Apoptosis Inducing and Cell Cycle-Arresting Bioactive Compounds against Colon Cancer Cells. *Cancers*, 6, 11(11), 1742.
- Tang, Q., Li, Z., Chen, N., Luo, X., ve Zhao, Q. (2025). Natural pigments derived from plants and microorganisms: classification, biosynthesis, and applications. *Plant Biotechnology Journal*, 23(2), 592-614.
- Tang, X., Zhao, J., Li, K., Chen, Z., Sun, Y., ve Gao, J. (2019). *Streptomyces cyaneochromogenes* sp. nov., a blue pigment-producing actinomycete from manganese-contaminated soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 69(8), 2202-2207.
- Tolba, S. T., Ibrahim, M., Amer, E. A., ve Ahmed, D. A. (2019). First insights into salt tolerance improvement of Stevia by plant growth-promoting *Streptomyces* species. *Archives of microbiology*, 201(9), 1295-1306.
- Toumatia, O., Yekkour, A., Goudjal, Y., Riba, A., Coppel, Y., Mathieu, F., ...Zitouni, A. (2015). Antifungal properties of an actinomycin D-producing strain, *Streptomyces* sp. IA1, isolated from a Saharan soil. *Journal of basic microbiology*, 55(2), 221-228.
- Tran-Ly, A.N., Reyes, C., Schwarze, F.W.M.R., ve Ribera, J. (2020). Microbial production of melanin and its various applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36, 170.
- Tripathi, R., Shalini, R., ve Singh, R.K. (2020). Prophyletic origin of algae as potential repository of anticancer compounds. *Evolutionary Diversity as a Source for Anticancer Molecules*, 155-189. Academic Press, Elsevier.
- Turick, C. E., Knox, A. S., Becnel, J. M., Ekechukwu, A. A., ve Milliken, C. E. (2010). Properties and function of pyomelanin. *Biopolymers*, 449(72), 10-5772.

Tuttle, A. R., Trahan, N. D., ve Son, M. S. (2021). Growth and maintenance of *Escherichia coli* laboratory strains. *Current protocols*, 1(1), e20.

URL-1:

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/RefRpt?search_type=source&search_id=source_id&search_id_value=1096 Son erişim tarihi: 23.06.2025

URL-2: <https://lpsn.dsmz.de/genus/streptomyces> Son erişim tarihi: 23.06.2025

URL-3: <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/paints-and-coatings-market-101947> Son erişim tarihi: 18.01.2025

URL-4: <https://www.nsspirulina.com.tr/blue-spirulina-nedir---/-phycocyanine----blue-spirulina----nedir---> Son erişim tarihi: 05.02.2025

Varga, M., Berkesi, O., Darula, Z., May, N. V., ve Palágyi, A. (2016). Structural characterization of allomelanin from black oat. *Phytochemistry*, 130, 313-320.

Vasanthabharathi, ve S. Jayalakshmi. (2020). Review on Melanin from Marine *Actinomycetes*. *Journal of Basic & Applied Sciences*, 16, 39-42.

Venil, C. K., Zakaria, Z. A., ve Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48(7), 1065–1079.

Venil, C.K., Dufossé, L., Velmurugan, P., Malathi, M., ve Lakshmanaperumalsamy, P. (2021). Extraction and Application of Pigment from *Serratia marcescens* SB08, an Insect Enteric Gut Bacterium, for Textile Dyeing. *Textiles*. 1, 21–36.

Venkatachalam, M., Gérard, L., Milhau, C., Vinale, F., Dufossé, L., ve Fouillaud, M. (2019). Salinity and temperature influence growth and pigment production in the marine-derived fungal strain *Talaromyces albobiverticillius* 30548. *Microorganisms*, 7(1), 10.

Vijayabharathi, R., Bruheim, P., Andreassen, T., Raja, D. S., Devi, P. B., Sathyabama, S., ve Priyadarisini, V. B. (2011). Assessment of resistomycin, as an anticancer compound isolated and characterized from *Streptomyces aurantiacus* AAA5. *The Journal of Microbiology*, 49(6), 920–926.

Voitsekhovskaia, I., Paulus, C., Dahlem, C., Rebets, Y., Nadmid, S., Zapp, J., ...Kalinowski, J. (2020). Baikalomycins AC, New Aquayamycin-Type Angucyclines Isolated from Lake Baikal Derived *Streptomyces* sp. IB201691-2A. *Microorganisms*. 8(5), 680.

Wakamatsu, K., ve Ito, S. (2023). Recent advances in characterization of melanin pigments in biological samples. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 8305.

Wang, L., Li, Y., ve Li, Y. (2019). Metal ions driven production, characterization and bioactivity of extracellular melanin from *Streptomyces* sp. ZL-24. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 521-530.

- Watanabe, Y., Ohe, Y., ve Tsujisaka, Y. (1976). Changes in the metabolic pathways of hypoxanthine in *Streptomyces*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 22(1), 13-23.
- Wibowo, J. T., Kellermann, M. Y., Petersen, L. E., Alfiansah, Y. R., Lattyak, C., ve Schupp, P. J. (2022). Characterization of an insoluble and soluble form of melanin produced by *Streptomyces cavourensis* SV 21, a sea cucumber associated bacterium. *Marine Drugs*, 20(1), 54.
- Woese, C., ve Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 74(11):5088–5090.
- Wohl, D.L., ve McArthur, J.V., (2008). *Actinomycete*-flora associated with submerged freshwater macrophytes. *Federation of European Microbiological Societies*, 26, 135–140.
- Xiao, M., ve Li, W. (2023). Fundamentals and Applications of Optically Active Melanin-Based Materials. In *Melanins: Functions, biotechnological production, and applications* (pp. 127-146). Cham: Springer International Publishing.
- Xie, R., Fang, K., Liu, Y., Chen, W., Fan, J., Wang, X., ...Song, Y. (2020). Z-scheme In₂O₃/WO₃ heterogeneous photocatalysts with enhanced visible-light-driven photocatalytic activity toward degradation of organic dyes. *Journal of Materials Science*. 55, 11919-11937.
- Xu, J., ve Yang, Q. (2010). Isolation and characterization of rice straw degrading *Streptomyces griseorubens* C-5. *Biodegradation*, 21, 107-116.
- Yang, W., Liang, G., Sun, Y., ve Gong, Z. (2021). Bioactive secondary metabolites from marine *Streptomyces griseorubens* f8: isolation, identification and biological activity assay. *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(9), 978.
- Ye, L., Zhou, Q., Liu, C., Luo, X., Na, G., ve Xi, T. (2009). Identification and fermentation optimization of a marine-derived *Streptomyces griseorubens* with anti-tumor activity.
- Yoltaş, A (2017). *Çeşitli kaynaklardan izole edilen Aspergillus section Nigri türlerinin fenotipik ve moleküler biyolojik yöntemlerle karakterizasyonu. (Doktora Tezi)*. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Yumusak, C., Prochazkova, A. J., Apaydin, D. H., Seelajaroen, H., Sariciftci, N. S., Weiter, M., ve Kovalenko, A. (2019). Indigoidine – Biosynthesized organic semiconductor. *Dyes and Pigments*, 107768.
- Yüksel, S., Ekim, M., ve Yalçınkaya, F. (2005). Çocukluk Çağında Tümör Lizis Sendromu. *Türk Nefroloji, Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 14(2).

- Zainal Abidin, Z. A., Chowdhury, A. J. K., Malek, N. A., ve Zainuddin, Z. (2018). Diversity, antimicrobial capabilities, and biosynthetic potential of mangrove actinomycetes from coastal waters in Pahang, Malaysia. *Journal of Coastal Research*, (82), 174-179.
- Zeece, M. (2020). Food colorants. *Introduction to the Chemistry of Food*, 313–344.
- Zhao, Z., Shi, T., Xu, M., Brock, N. L., Zhao, Y. L., Wang, Y., ...Tao, M. (2016). Hybrubins: bipyrrrole tetramic acids obtained by crosstalk between a truncated undecylprodigiosin pathway and heterologous tetramic acid biosynthetic genes. *Organic Letters*, 18(3), 572-575.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., ...Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4), 2782-2858.
- Zheng, Z., Zeng, W., Huang, Y., Yang, Z., Li, J., Cai, H., ve Su, W. (2000). Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. *FEMS Microbiology Letters*, 188(1), 87-91.
- Zhu, Y., Zhang, E., Gao, H., Shang, C., Yin, M., Ma, M., Liu, Y., Zhang, X., ve Li, X. (2023). Resistomycin Inhibits Wnt/ β -Catenin Signaling to Induce the Apoptotic Death of Human Colorectal Cancer Cells. *Marine Drugs*, 21(12), 622.