



GİRESUN
ÜNİVERSİTESİ



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**JANTHİNOBACTERIUM LIVIDUM SUŞU TARAFINDAN
ÜRETİLEN PİGMENTİN ANTİMİKROBİYAL VE
ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI
Yüksek Lisans Tezi
Burak KARACA
20122102008
Haziran 2019**

GİRESUN

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**JANTHINOBACTERIUM LIVIDUM SUŞU TARAFINDAN
ÜRETİLEN PİGMENTİN ANTİMİKROBİYAL VE
ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Burak KARACA

Enstitü Anabilim Dalı	:	Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı	:	Prof. Dr. Hatice KATI

Haziran 2019

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**JANTHINOBACTERIUM LIVIDUM SUŞU TARAFINDAN
ÜRETİLEN PİGMENTİN ANTİMİKROBİYAL VE
ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Burak KARACA

Enstitü Anabilim Dalı

:

Biyoloji Anabilim Dalı

Bu tez 24/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.


**Prof. Dr.
Sabriye ÇANAKÇI
Jüri Başkanı**


**Prof. Dr.
Hatice KATI
Üye**


**Doç. Dr.
Tamer AKKAN
Üye**

**Doç. Dr.
Bahadır KOZ
Enstitü Müdürü**

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.



Burak KARACA

24/06/2019

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, bilgisini ve desteğini benden esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Hatice KATI'ya,

Tez çalışmam süresince laboratuvar çalışmalarında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr. Tamer AKKAN'a,

Bitki patojenlerinin temin edilmesini sağlayan Sayın Prof. Dr. Berna TUNALI'ya

Lisans ve Yüksek Lisans hayatım boyunca maddi ve manevi anlamda benden yardımını, ilgisini ve desteğini asla eksik etmeyen değerli eşim Sibel ALTÜRK KARACA'ya

Bugünlere gelmeme vesile olan, benden maddi ve manevi hiçbir desteklerini esirgemeyen canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	VIII
ÖZET.....	IX
SUMMARY.....	X
BÖLÜM 1. GİRİŞ.....	1
1.1. Mikroorganizmalardan Sentezlenen Pigmentler	3
1.1.1. Bakteriyel Pigmentler.....	4
1.1.1.1. Bakteriyel Pigmentlerin Avantajları	7
1.1.1.2. Gıda Endüstrisindeki Rolü	7
1.1.1.3. Boyama Endüstrisindeki Rolü.....	8
1.1.1.4. İlaç Endüstrisindeki Rolü.....	9
1.1.1.5. Bakteriyel Pigmentlerin Antimikrobiyal Özellikleri	11
1.1.1.6. Antioksidan Özellikleri	12
1.2. Viyolasin Pigmenti.....	13
1.2.1. Viyolasinin Keşfi	16
1.2.2. Viyolasinin Biyosentezi	16
1.2.3. Viyolasinin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitesi	20
BÖLÜM 2. LİTERATÜR ÖZETİ	22
BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Test Mikroorganizmaları	25

3.1.2. Kullanılan Besiyerler ve Kimyasallar	26
3.2. Yöntem.....	29
3.2.1. Viyolasin Miktarının Belirlenmesi.....	29
3.3. Viyolasin Üretiminin Karakterizasyonu	30
3.3.1. Viyolasin Üretimi Üzerine Farklı Besiyerlerinin Etkileri.....	30
3.3.2. Viyolasin Üretimi Üzerine Farklı Sıcaklıkların Etkisi.....	30
3.3.3. Viyolasin Üretimi Üzerine pH'nın Etkisi	30
3.3.4. Viyolasin Üretimi Üzerine Çalkalama Hızının Etkisi.....	30
3.3.5. Viyolasin Üretimi Üzerine İnokülüm Miktarının Etkisi	31
3.3.6. Viyolasin Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi	31
3.3.7. Viyolasin Üretimi Üzerine Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi	31
3.3.8. Viyolasin Üretimi Üzerine NaCl'nin Etkisi	31
3.4. Viyolasin Üretimi ve Ekstraksiyonu	32
3.5. Viyolasinin Antibakteriyel ve Antifungal Aktivitelerinin Belirlenmesi	32
3.6. Viyolasinin Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi	33
3.6.1. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayini	33
3.6.2. ABTS Radikal Süpürücü Aktivite Tayini	34
 BÖLÜM 4. BULGULAR	 35
4.1. Viyolasin Üretimi Üzerine Farklı Besiyerlerinin Etkileri.....	35
4.2. Viyolasin Üretimi Üzerine Farklı Sıcaklıkların Etkisi.....	36
4.3. Viyolasin Üretimi Üzerine pH'nın Etkisi	38
4.4. Viyolasin Üretimi Üzerine Çalkalama Hızının Etkisi.....	39
4.5 Viyolasin Üretimi Üzerine İnokülüm Miktarının Etkisi	40
4.6. Viyolasin Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi	41
4.7. Viyolasin Üretimi Üzerine Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi	42
4.8. Viyolasin Üretimi Üzerine NaCl'nin Etkisi	43
4.9. Viyolasinin Antibakteriyel ve Antifungal Aktiviteleri	45
4.10. Viyolasinin Antioksidan Özellikleri.....	46
 BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ	 47

KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	66

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

°C	: Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
ABTS	: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
BHI	: Brain Heart Infusion Broth
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
GK	: Giresun Kümbet
IC ₅₀	: % 50 inhibisyon konsantrasyonu
kg	: Kilogram
LB	: Luria-Bertaini Broth
mg	: Miligram
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NB	: Nütrient Broth
nm	: Nanometre
OD	: Optik Dansite
PDA	: Potato Dextrose Agar
PDB	: Potato Dextrose Broth
rDNA	: Ribozomal Deoksiribonükleik asit
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
SDA	: Sabouraud %4 Dextrose Agar
SDB	: Sabouraud %4 Dextrose Broth

SEM :Taramalı elektron mikroskobu
sn : Saniye
TSB : Triptik Soy Broth

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. 1. Viyolasin ve deoksiviyolasinin kimyasal yapısı.	14
Şekil 1. 2. Viyolasinin biyosentetik yolu	18
Şekil 4.1. <i>Janthinobacterium lividum</i> GK suşunun farklı sıcaklıklardaki petri görüntüleri.....	35
Şekil 4. 2. Viyolasin üretimi üzerinde farklı besiyerilerin etkisi.	36
Şekil 4. 3. Viyolasin üretimi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi.....	37
Şekil 4. 4. Viyolasin üretimi üzerine pH'nın etkisi.....	38
Şekil 4. 5. Viyolasin üretimi üzerine çalkalama hızının etkisi.....	39
Şekil 4. 6. Viyolasin üretimi üzerine inokülüm miktarının etkisi.....	40
Şekil 4. 7. Viyolasin üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi	41
Şekil 4. 8. Karbon kaynaklarının viyolasin üretimine etkisi.....	42
Şekil 4. 9. Azot kaynaklarının viyolasin üretimine etkisi	43
Şekil 4. 10. Viyolasin üretimine NaCl'nin etkisi.....	44
Şekil 4.11. Viyolasinin damla difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktiviteleri.	45
Şekil 4. 12. Viyolasinin farklı çözülerdeki ABTS radikalini süpürücü aktivitesi.....	46
Şekil 4. 13. Viyolasinin farklı çözülerdeki DPPH radikalini süpürücü aktivitesi.....	46

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. 1. Pigment üreten bakteriler	6
Tablo 1. 2. Viyolasin üreten kültüre edilmiş bazı suşlar	15
Tablo 1. 3. Vio operonunun genleri	17
Tablo 3. 1. Antimikrobiyal çalışmalarda kullanılan mikroorganizmalar.....	25
Tablo 4. 1. Viyolasinin antimikrobiyal aktiviteleri.....	45

JANTHİNOBACTERİUM LİVİDUM SUŞU TARAFINDAN ÜRETİLEN PİGMENTİN ANTİMİKROBİYAL VE ANTIÖKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Günümüzde sentetik boyaların birçoğunun toksik ve kanserojen olmasından dolayı doğal boyalar gittikçe önem kazanmaktadır. Bakterilerden elde edilen pigmentlerin, doğal boyalara alternatif olarak kullanılabildiği görülmektedir.

Bu çalışmada viyolasin üreten *Janthinobacterium lividum* GK suşu kullanılmıştır. *Janthinobacterium lividum* GK suşundan viyolasin üretimi üzerine farklı besiyerlerinin, sıcaklığın, pH'nın, çalkalama hızının, inokülüm miktarının, inkübasyon süresinin, farklı karbon ve azot kaynakları ile NaCl'in etkisi araştırılmıştır. Optimum şartlarda elde edilen viyolasinden metanol ve etanol ekstraktı elde edilerek antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri incelenmiştir.

Janthinobacterium lividum GK suşunun pH 6,4 ayarlı NB besiyerinde, 22 °C'de, statik ortamda, %8 inokülüm miktarında, %1 glikoz ve pepton kaynağı ilavesiyle optimum viyolasin üretimi gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Viyolasinin *S. aureus*, *S.epidermidis*, *B. cereus* ve *E. faecalis* bakterilerine karşı yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Antioksidan çalışmalarında viyolasin ekstraktlarının antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Antioksidan çalışmalarında metanol ekstraktı metanol çözücüsünde en düşük IC₅₀ konsantrasyonu 261 µg/ml olarak bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: *Janthinobacterium lividum*, viyolasin, antimikrobiyal, antioksidan

INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF PIGMENT PRODUCED BY JANTHINOBACTERIUM LIVIDUM STRAIN

SUMMARY

Today, natural dye are becoming increasingly important because many of the synthetic dyes are toxic and carcinogenic. Pigments from bacteria can be used as an alternative to natural dyes.

In this study, Violacein-producing *Janthinobacterium lividum* GK strain was used. The effect of different media, temperature, pH, agitation rate, inoculum amount, incubation time, different carbon and nitrogen sources and NaCl on the production of violacein produced from *Janthinobacterium lividum* GK strain was investigated. Methanol and ethanol extracts were obtained from violacein under optimum conditions and their antimicrobial and antioxidant activities were investigated.

It was determined that *Janthinobacterium lividum* GK strain produced the optimum violacein in NB medium, at 22 °C and at pH 6,4. Also it was produced in static and 8% inoculum by adding 1% glucose and peptone source. Violacein showed high antibacterial activity against *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus* and *E. faecalis*. Antioxidant studies showed that the violacein extracts have antioxidant activity In the antioxidant studies, the lowest IC₅₀ concentration in methanol solvent of the methanol extract was found to be 261 µg/ml.

Keywords: *Janthinobacterium lividum*, violacein, antimicrobial, antioxidant

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Günümüzde koruma ve tedavi amaçlı çeşitli kimyasallar kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde, gıda güvenliğini sağlamak ve artırmak için kimyasalların kullanımı oldukça yaygındır (Türkkan ve Erginkaya, 2008).

Ticari ürünlerin rengi tüketicileri çekmek için hayati bir rol oynar ve ayrıca ürünlerin kalitesini temsil eder (Yadav ve ark., 2014). Gıdalara; işlem sırasında rengi kaybolan yiyeceğin renginin değiştirilmesi, hali hazırda mevcut yiyeceğin renginin artırılması, renksiz yiyeceğin renklendirilmesi ve besin takviye edilmesi gibi nedenlerden dolayı renk eklenmektedir (Rymbai ve ark., 2011).

Sentetik gıda renklendiricileri yerine doğal renklendiricilerin kullanımının artırılması ve doğal içerik maddelerine yönelik tüketici talebinin artması söz konusudur (Türkkan ve Erginkaya, 2008). Doğal renklendiriciler bitkisel ve hayvansal ürünlerden elde edilebilir. Bununla birlikte, mikroorganizmalardan da sentezlenebilirler (Sözübatmaz, 2005; Rymbai ve ark., 2011). Bugün hem Avrupa hem de ABD'de, renk materyallerinin çoğu, tüketicilerin doğal renklendiricilere olan ilgilerinin bir sonucu olarak kaliteli ve sağlıklı olduğu için doğal kaynaklardan elde edilmektedir (Rymbai ve ark., 2011).

Gıda endüstrisinde, gıda renklendiricilerinin katkı maddesi olarak kullanımı, işlenmiş gıdaların gıda üreticileri ve tüketiciler tarafından kabul edilebilirliğinin belirlenmesinde önemli bir faktördür. Dünyada, kullanımına izin verilen gıda renklendiricileri, sentetik olarak veya doğal kaynaklardan fiziksel, kimyasal özütleme yoluyla elde edilir. Sınırlı stoklama ve pigment ekstraksiyonunun karmaşıklığı nedeniyle bilinen birçok gıda renklendiricisinin üretimi problemlidir. Doğal gıda renklendirici üretimi için alternatif bir yöntem mikroorganizmalardan biyoteknolojik üretimdir. Doğada mikroorganizmalar ve mikro alglerden pigment üretimi yaygındır (Tokatlı ve Özçelik, 2008).

Günümüzde pigmentler tıp, gıda, mürekkep, kağıt, tekstil, su ürünleri ve hayvan yemi gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Wissgott ve Bortlik, 1996; Parajó ve ark., 1998; Fuhrmann ve ark., 2007; Erdal ve Ökmen, 2013). Önemli bir pigment olan karotenoid, bitkilerden uzun yıllar özü çıkarılarak elde edildi. Bitkiler zengin karotenoid kaynakları olmasına rağmen, ticari olarak karotenoid üretimi için çeşitli mikrobiyolojik işlemler kullanılmaktadır (Fuhrmann ve ark., 2007). Asıl sorun, bitkisel renklendiricilerde mevsimsel ve coğrafi faktörlerin etkili olmasıdır. Düşük maliyetli karbon kaynaklarının kullanımı nedeniyle mikrobiyal karotenoid üretimi tercih edilmektedir (Simova ve ark., 2004; Aguilar ve ark., 2014; Yadav ve ark., 2014). Pigment üreten mikroorganizmalar doğada oldukça yaygındır ve renk bakımından zengindir. Farklı kimyasal bileşimleri ve spesifik kromoforların varlığı pigmentlerdeki çeşitliliğin nedenidir (Bridle ve Timberlake, 1997). *Streptomyces chrestomyceticus*, *Blakeslea trispora*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Flavobacterium* sp., *Phaffia* sp. ve *Rhodotorula* sp. karotenoid üreten mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (Choudhari ve ark., 2008; Yurkov ve ark. 2008; Marchal ve ark., 2013).

Gıda renklendiricileri olarak kullanılan doğal pigmentlerin antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri hakkında birçok araştırma yapılmıştır. Mikrobiyal pigmentlerin bazı gıda patojenleri ve gıdalarda bozulmaya sebep olan mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkisi olduğu gösterilmiştir (Türkkan, 2007).

Viyolasin, çeşitli biyolojik aktiviteler sergileyen ve günümüzde tıp, kozmetik ve tekstil gibi endüstriyel pazarlarda önem kazanmış bir bakteri olan *Chromobacterium violaceum*'un çok yönlü bir pigmentidir. Psikrotrofik bakteri RT102, *Janthinobacterium lividum* ve *Alteromonas luteoviolacea* (Duran ve ark., 2012) gibi diğer bakteriyel kaynaklardan bildirilen değişken verim ve üretim koşullarına rağmen, *Chromobacterium violaceum* viyolasin üretim alanında en çok incelenen bakterilerden biridir.

Viyolasin, *Chromobacterium* ve *Janthinobacterium*'un, karbon takviyesi olarak hayvan kılı parçalanma ürünleri içeren ortamlarda kültürlenmesi ile üretildi ve elyaf materyallerinin ve naylon kumaşın boyanmasında kullanıldı. Benzer şekilde, ipek,

pamuk ve yün gibi doğal elyafların yanı sıra naylon ve vinylon gibi kimyasal elyaflarda da kullanılması da mümkündür (Duran ve ark., 2012).

1.1. Mikroorganizmalardan Sentezlenen Pigmentler

Renkleri nedeniyle pigmentler genellikle yüzey kaplamalarında kullanılan suda çözünmeyen inorganik ve organik malzemelerdir (Kavak, 2006). Karotenoidler, bitkiler, mantarlar ve fotosentetik bakteriler dahil olmak üzere çeşitli organizmalar tarafından doğal olarak üretilen bir tetraterpenoid pigmentli bileşik sınıfının yağda çözünen doğal pigmentlerdir. Karotenoidler birçok gıdada istenen rengi sağlayabilir ve önemli biyolojik aktivitelere sahiptir (Ungureanu ve ark., 2011; El-Banna ve ark., 2012; Yadav ve ark., 2014; Zoz ve ark., 2015). Mikrobiyal karotenoidlerin, biyolojik önemi olduğu anlaşılmıştır (Sakaki ve ark., 2002). Karotenoidlerin, antioksidan ve/veya provitamin A özelliklerinden dolayı, çeşitli kanser türlerine ve diğer hastalıklara karşı tedavi edici ajanlar olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Ungureanu ve ark., 2011).

β -karoten, astaksantin ve son zamanlarda torularhodin gibi endüstriyel karotenoid pigmentler, doğal gıda renklendiricileri veya gıda katkı maddeleri olarak kullanılır. Karotenoidlerin artan ekonomik önemi karşısında, bu pigment sınıfının yeni arzlarına büyük ilgi gösterilmiştir (Ungureanu ve ark., 2011).

Mikrobiyal sentez, karotenoidlerin üretimi için umut verici bir yöntem sunar. Bu, sentetik gıda renklendiricilerine alternatif olarak üretilen mikrobiyal karotenoidlere artan ilgiyi açıklamaktadır (El-Rhman ve ark., 2012). Birkaç yosun (*Dunaliella*, *Dictyococcus* ve *Haematococcus*), bakteri (arkebakterilerde halobakterilere ek olarak birçok eubakteri türü), bazı filamentli mantarlar (ilkel mantarlar ve Ascomycetes) ve mayaların (*Cryptococcus*, *Phaffia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*, ve *Sporobolomyces*) karotenoid ürettiği bildirilmektedir (Türkkan ve Erginkaya, 2008; Ungureanu ve ark., 2011; El-Rhman ve ark., 2012). Biyoteknolojik yöntemlerle elde edilen başlıca karotenoid pigmentler, *Phaffia rhodozyma* veya yeşil alg *Haematococcus pluvialis*'ten astaksantin, *Rhodotorula* mayaları tarafından çeşitli

konsantrasyonlarda üretilen torularhodin, β -karoten ve torulendir (Ungureanu ve ark., 2011).

Karotenoidler fotosentetik işlemlerde önemli bir rol oynar. Ayrıca fotosentetik olmayan bakterilerde, maya ve mantarlarda bulunurlar ve bu organizmaları ışık ve oksijen kaynaklı zararlardan korurlar (Zoz ve ark., 2015). Bu moleküller, rengi sarıdan turuncuya ve kırmızıya kadar (Ungureanu ve ark., 2011; Zoz ve ark., 2015) değişen tetraterpenlerdir. Karotenoidler doğada yaygındır ve geniş bir çeşitliliğe sahiptir. Ancak bazıları daha yaygındır (β -karoten, likopen, lutein, vb.) çeşitli sebzelerde ve hayvansal dokularda bulunurlar (Zoz ve ark., 2015).

Birkaç renkli maya türü tarafından farklı karotenoidlerin sentezi, bu mikroorganizmaların potansiyel bir pigment kaynağı olduğunu ortaya çıkarmış ve bu organizmaları biyoteknolojik çalışmalar için ilgi çekici hale getirmiştir (Libkind ve ark., 2004).

Karotenoid biyosentezi, *Rhodotorula* türlerinin ve *Phaffia* cinsinin (Ungureanu ve ark., 2013) kendine özgü bir özelliğidir. *Rhodotorula* cinsi ile karotenoidlerin üretimi türlerden, ortam bileşenlerinden ve çevresel koşullardan etkilenir (El-Rhman ve ark., 2012).

Torulen ve torularhodin, *Rhodotorula glutinis* ve *Sporobolomyces ruberrimus* gibi birkaç kırmızı mayada bulunan karotenoid biyopigmentlerdir. Bu mikroorganizmalar az miktarda olmasına rağmen β karoten de üretirler (Zoz ve ark., 2015). Öte yandan, torularhodin, γ -karotenden torulen yoluyla biyosentezlenir (Sakaki ve ark., 2002).

Bir başka kırmızı maya olan *Phaffia rhodozyma*, büyük ölçüde karotenoid pigment olan astaksantini üretir, ancak bu maya ayrıca metabolik yolunda torulen üretme kabiliyetine de sahiptir (Zoz ve ark., 2015).

1.1.1. Bakteriyel Pigmentler

Pigmentler, bir kısmı suda çözünebilen, çok çeşitli renklerde olan, endüstrilerde yaygın olarak kullanılan bileşiklerdir. Bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen pigmentin toksik olmayan doğası, onları boya, gıda maddesi, eczane, kozmetik ve

diğer endüstriyel amaçlarla kullanım için çevre dostu yapar. Ayrıca, biyolojik kökenli üretilen doğal pigmentler, antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser olarak kullanılmasından dolayı tıbbi öneme sahiptir. Farklı renk çeşitleriyle pigment üretebilen bakterilerin bazıları *Agrobacterium aurantiacum*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium violaceum*, *Serratia marcescens*, *Bacillus sp*, *Flavobacterium sp*, vb. sırasıyla pembe-kırmızı, altın sarısı, mor, kırmızı, krem ve sarı renkte pigment üretirler. Mikrobiyal fermentasyon yoluyla doğal gıda renklendiricilerinin endüstriyel üretimi, daha ucuz ve daha kolaydır. Ayrıca suşlardan iyileştirme yoluyla daha yüksek verim elde edilebilir ve hammadde eksikliği ve mevsimsel değişikliklerden etkilenmeme gibi çeşitli avantajlara sahiptir.

Pigmentler birçok endüstri için önemli özelliklere sahip bileşiklerdir. Gıda endüstrisinde katkı maddeleri, renk yoğunlaştırıcıları, antioksidanlar vb. olarak kullanılırlar (Tibor ve ark., 2006). Gıda ve tekstil için biyolojik ajanlardan elde edilen renklendirici maddeler, son yıllarda giderek artmıştır. Doğa, şu anda kullanılan sentetik boyalara ve pigmentlere alternatif olan bitkiler ve mikroorganizmalar dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan birçok biyorenlendirici üretmektedir (Mapari ve ark., 2005). İnsan güvenliği ve çevre koruma konusundaki son farkındalık, doğal renk kaynakları için heyecan vericidir. Flora ve faunadan elde edilen doğal renklendiricilerin veya boyaların, doğada toksik olmayan, kanserojen olmayan ve biyolojik olarak çözünebilir olması nedeniyle güvenli olduğuna inanılmaktadır (Cristea ve Vilarem, 2006). Dünyadaki mevcut eğilim çevre dostu ve biyolojik olarak parçalanabilen ürünlerin kullanımına doğru yöneldiğinden, doğal renklendiricilere olan talep her geçen gün artmaktadır.

Doğal pigmentler madenlerden, böceklerden, bitkilerden ve mikroorganizmalardan elde edilir. Mikroorganizmalardan üretilen biyopigmentler, kararlılıkları nedeniyle bitkilerden daha fazla tercih edilirler (Raisanen ve ark., 2002) ve yıl boyunca yetiştirilmeye elverişlidirler (Parekh ve ark., 2000). Mikroorganizmalar arasında bakteriler, çeşitli biyolojik ürünler üretmek için muazzam bir potansiyele sahiptirler ve bu tür bir biyolojik ürünlerden biri de pigmentlerdir. Bakteriyel pigmentlerin doğal renklendiriciler olarak üretimi ve uygulamaları çeşitli araştırmacılar tarafından araştırılmıştır (Joshi ve ark., 2003; Ahmad ve ark., 2012). Bakteriyel pigment üretimi, şimdilerde çeşitli endüstriyel uygulamaların potansiyelini göstermek için

ortaya çıkan araştırma alanlarından biridir (Venil ve Lakshmanaperumalsamy, 2009). Doğal olarak elde edilen renklerdeki önemli büyüme, istikrarlarına ve tüketici algılarına bağlanmıştır. Dahası, doğal olarak elde edilen renklerin yıllık büyüme hızının, yüzde 3-5'lik düşük bir büyüme hızına sahip olan sentetik renklere kıyasla yüzde 5 ila 10 olduğu tahmin edilmektedir (Parmar ve ark., 2015). Doğal özellikleri ve kullanım güvenliği, tıbbi özellikleri, vitaminler gibi besin maddeleri, mevsim ve coğrafi şartlardan bağımsız üretim, kontrol edilebilir ve öngörülebilir verim nedeniyle mikrobiyal pigmentlere ilgi artmaktadır (Nakashima ve ark., 2005). Yine bakteriyel pigmentler atık maddeden üretilebilir, böylece çevre kirliliği azaltılabilir (Joshi ve ark., 2003; Kamla ve ark., 2012) (Tablo 1.1).

Tablo 1. 1. Pigment üreten bakteriler (Kamla ve ark., 2012)

Mikroorganizma (Bakteri)	Pigment/Molekül	Renk/Görünüm
<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	Astaksantin	Pembe-Kırmızı
<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	Astaksantin	Pembe-Kırmızı
<i>Bradyrhizobium specie</i>	Kantaksantin	Koyu Kırmızı
<i>Flavobacterium specie, Paracoccus zeaxanthinifaciens</i>	Zeaksantin	Sarı
<i>Achromobacter</i>	Zeaksantin	Krem
<i>Bacillus</i>	Zeaksantin	Kahverengi
<i>Brevibacterium specie</i>	Zeaksantin	Turuncu-Sarı
<i>Corynebacterium michigannise</i>	Zeaksantin	Grimsi Kremi
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	İndigoidin	Mavi
<i>Rhodococcus maris</i>	Prodigiosin	Mavimsi Kırmızı
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaksantin	Pembe-Kırmızı
<i>Haloferax alexandrinus</i>	Kantaksantin	Koyu Kırmızı
<i>Staphylococcus aureus</i>	Stafiloksantin/Zeaksantin	Altın Sarısı
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Viyolasin	Mor
<i>Serratia marcescens, Serratia rubidaea</i>	Prodigiosin	Kırmızı
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pyosiyenin	Mavi-Yeşil
<i>Xanthomonas oryzae</i>	Ksantomonadin	Sarı
<i>Janthinobacterium lividum</i>	Viyolasin	Mor

1.1.1.1. Bakteriyel Pigmentlerin Avantajları

Bakteriler tarafından üretilen pigmentler, doğu ülkelerinde geleneksel kullanım alanına sahiptir ve uygulama potansiyeli nedeniyle, son yıllarda yoğun bir araştırma konusu olmuştur. Bakteriyel pigmentler aşağıdaki avantajlara sahiptir (Hizbullahi ve ark., 2017).

- a. Geniş kapsamlı faaliyetleri nedeniyle bilimde giderek daha cazip olmaktadır.
- b. Kolay büyüme ve geniş suş seçimine sahiptir.
- c. Fermantasyon, diğer kimyasal işlemlerle karşılaştırıldığında doğal olarak daha hızlı ve daha üretkendir.
- d. Genleri değiştirmek kolaydır.
- e. Sürekli biyoreaktör çalışmasına izin veren basit ve hızlı kültür teknikleri kullanılmaktadır.
- f. Yapısal karmaşıklık endüstriyel ihtiyaçlara uygundur.
- g. Bakteriyel pigmentler, işletme maliyetini en aza indiren basit sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniği kullanılarak ekstre edilmektedir.
- h. Üretim için ucuz substratlar kullanılmaktadır.

1.1.1.2. Gıda Endüstrisindeki Rolü

Gıda endüstrisi, çeşitli çekici renklerde gıda geliştirmeyi amaçlamaktadır. Endüstriler doğal renklendirme ajanlarına yönelmektedir çünkü sentetik renklendirici ajanların ve katkı maddelerinin toksik etkilerinin olduğu bulunmuştur. Doğal gıda renklendiricilerine gıda endüstrisinde talep çok fazladır. Bu talep, yiyeceklerin daha doğal ve sağlıklı bir şekilde renklendirilmesini ve temiz bir etiket beyanı sağlamak için yapılan araştırmalarla desteklenebilir (Aberoumand, 2011). Bu nedenle, çeşitli doğal gıda sınıfı renklendirici kaynaklarını ve potansiyellerini araştırmak çok önemlidir. Pek çok doğal renk mevcut olmasına rağmen, bakteriyel renklendiriciler, üretim ve kolay saflaştırma süreci nedeniyle gıda renklendirme maddesi olarak önemli bir rol oynamaktadır. Mikrobiyal fermantasyon yoluyla doğal gıda renklendiricilerinin endüstriyel üretimi, daha ucuz üretim, daha kolay ekstraksiyon, suş iyileştirme yoluyla daha yüksek verim, hammadde eksikliği ve mevsimsel değişiklikliliğin olmaması gibi çeşitli avantajlara sahiptir (Kamla ve ark., 2012).

Bakteriler, doğal olarak bakteri tarafından üretilmeyen renklendiricileri içermese bile, renklendiriciler için kodlama yapan genler eklenerek genetik olarak modifiye edilebilirler. Bu pigmentler, doğal gıda renklendiricileri olarak güvenli kullanımları için araştırılmaktadır. Ayrıca bu pigmentler yalnızca insan sağlığına fayda sağlamakla kalmayacak, aynı zamanda sentetik renklendirici üretirken çevreye salınan zararlı kimyasal maddeleri engelleyeceğinden, biyolojik çeşitlilikte korunacaktır (Bener ve ark., 2010). Bilim adamları, bakterilerden gıda sınıfı pigmentleri ve kültürlenmiş toprak bakterilerinden mavi pigmenti izole etmiş ve gıdalar için mükemmel bir stabilite ve toksikoloji profili ile doğal bir renk sunabilmişlerdir. Doğu Çin Bilim ve Teknoloji Üniversitesi'nden araştırmacılar, mavi pigmentin yenilebilir doğal pigmentler eğilimine girdiğini bildirmiştir (Jensen ve ark., 2011). Bakteriyel renkler, balık endüstrisinde, somon yetiştiriciliğinde pembe rengini geliştirmek için zaten kullanılmaktadır. Ayrıca, bazı doğal gıda renklendiricileri antioksidan olarak kullanım için ticari potansiyele sahiptir (Dufosse, 2009). Böylece, çevre dostu olmasının yanı sıra bakteri renklendiricileri, gıda ürünlerinde görsel olarak çekici renkler oluşturmakta ve probiyotik yararları sayesinde ikili ihtiyaca da hizmet edebilirler (Venkatasubramanian, 2011). Bakteriyel pigmentler FDA tarafından güvenli ve onaylanmış olarak kabul edilirler. Hem gıda rengi hem de besin takviyesi olarak bakterilerden elde edilen pigmentlerin başarılı bir şekilde pazarlanması, tüketicilerin güvenliğine ve ürünlerin tazeliğine bağlıdır.

1.1.1.3. Boyama Endüstrisindeki Rolü

Tekstil endüstrisi, neredeyse tamamı sentetik olarak üretilen yaklaşık 23 milyar ABD Doları değerinde yaklaşık 1,3 milyon ton boya, pigment ve boya öncüsü üretir ve kullanır. Bununla birlikte, sentetik boyaların bazı kısıtlamaları vardır, öncelikle üretim süreçleri tehlikeli kimyasallar gerektirir, işçi güvenliği endişeleri yaratır, tehlikeli atıklar oluşturabilirler ve bu boyalar çevre dostu değildir (Chidambaram ve ark., 2013). Tekstil uygulamaları için renklendiricilerin (doğal boyalar) biyosentezi giderek artan bir ilgi görmüştür (Mapari ve ark., 2005). Tekstil endüstrisinde boya olarak kullanılmak üzere denizden izole elde edilen *Serratia* sp.'den prodigiosin adı verilen pigmentleri değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonuçları, pigmentin çeşitli tekstil

malzemelerine kırmızı renk vermek için doğal boya olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Krishnamurthy ve ark., 2002). Yıkama performansı çalışmalarından sonra rengin stabil olduğu gözlenmiştir. Alihosseini ve arkadaşları (2008), *Vibrio* spp.'den elde edilen parlak kırmızı pigment prodigiosini karakterize etmiş ve yün, naylon ve ipek gibi birçok elyafı boyamak için kullanılabileceğini önermiştir. Yusof (2008), mordant olarak demirhindi kullanan akrilik, polyester mikrofiber, polyester, ipek ve pamuk olmak üzere beş kumaş türünü renklendirmek için *Serratia marcescens*'ten pigment kullanma kabiliyetini bildirmiştir. *Janthinobacterium lividum* için Shirata ve diğerleri (2000) tarafından benzer bir tekstil boyama kabiliyeti rapor edilmiştir ve ipek, pamuk, yün, naylon ve vinylona uygulandığında iyi bir renk tonu verdiği bildirilmiştir.

Ahmad ve arkadaşları (2012), *Serratia marcescens*'ten kırmızı pigment prodigiosini ve *Chromobacterium violaceum*'dan elde edilen mor pigment viyolasini menekşe pigmenti olarak nitelendirdiler ve boyama etkinliğini farklı kumaşlarda, örneğin saf pamuk, saf ipek, ipek saten ve polyesterde test ettiler. Elde edilen sonuçlar prodigiosinin akrilik boyama için kullanılabileceğini ve saf rayon ve ipek satenlerde viyolasin için yoğun renklenmelerin olduğunu göstermiştir. Ahmad ve arkadaşları (2012), batık yapımında prodigiosin ve viyolasinin kullanılma potansiyelini gözlemlemişlerdir. Kumar ve arkadaşları (2015), *Vibrio* sp. ve *Serratia* sp.'den prodigiosin, *Chromobacterium violaceum*'dan mor pigment, *Dermocybe sanguine*'den antraknon, *Trichoderma* sp., *Alternaria* sp., *Roseomonas fauriae* ve *Fusarium oxysporum*'dan pembe pigmentlerin, pamuk endüstrisinde pamuk, yün, ipek, naylon ve akrilik içeren tüm elyafların boyanması için uygun olduğunu rapor ettiler.

1.1.1.4. İlaç Endüstrisindeki Rolü

Çalışmaların çoğu, bakterilerin klinik uygulamalardaki etkililiğini ve potansiyelini gösterdiğini ve bunların pigmentinin çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığını ve ayrıca antibiyotik, antikanser ve immünosupresif bileşikler gibi bazı özelliklere sahip olduğunu gösterdi. Bu alanda önemli ilerleme kaydedilmiştir ve bu bakteriler tarafından üretilen biyoaktif bileşiklerin araştırmaları hızla artmaktadır. Dolayısıyla

bakteri kaynaklı izole edilen bileşiklerin sayısı yapay muadili ile karşılaştırıldığında daha hızlı artmaktadır (Soliev ve ark., 2011). Antosiyaninler çok çeşitli biyolojik aktivitelere katılmaktadır (Kong ve ark., 2003). Kanseri riskini azaltırlar (Kim ve ark., 2012). İnflamatuar hasarı azaltır (Yuodim ve ark., 2002) ve bağışıklık tepkisini hafifletirler (Wang ve Mazza G, 2002). *Serratia* cinsi, prodigiosin adı verilen kırmızı bir madde üretebilir ki bu maddelerin antibiyotik ve antimalarial etki ve immün baskılayıcı aktivite gösterdiği bilinmektedir (Kim ve ark., 2003). Prodigiosinin immünoşüpresif aktivitesi ilk olarak 1989'da Nakamura ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bu araştırmacılar, *Serratia*'nın kültür sıvısında, prodigiosin ve metasikloprodigiosin varlığını ve B hücrelerinin poliklonal proliferasyonunun T hücrelerinin selektif olarak inhibe edildiğini gözlemlemişlerdir. Bunun yanı sıra prodigiosinin sitotoksik potansiyeli, akciğer, kolon, böbrek, yumurtalık, beyin kanserleri, melanom ve lösemiden türetilmiş insan tümör hücrelerinin standart 60 hücre hattında araştırılmıştır. Bu hücre hatlarında hücre proliferasyonunun inhibisyonu ile hücre ölümünün indüklenmesi gözlenmiştir. Prodigiosin analogları ve prodigiosinin sentetik türevi için *in vitro* antikanser aktivitesi de rapor edilmiştir. Prodigiosinin anti-proliferatif ve sitotoksik etkileri sadece kültürlenmiş tümör hücre hatlarında değil aynı zamanda B hücreli kronik lenfositik lösemi hastalarından insan birincil kanser hücrelerinde de gözlenmiştir (Campàs ve ark., 2003). Diabetes mellitus tedavisi için prodigiosin kullanımı, Kim ve arkadaşları (2003) tarafından da bildirilmiştir. Burada prodigiosin, diabetes mellitusun önlenmesi ve tedavisi için aktif bir bileşen olarak bulunmuştur. Viyolasin, Gram-negatif *Chromobacterium violaceum*, *Janthinobacterium lividum* ve *Pseudoalteromonas luteoviolacea* gibi çeşitli bakteri türleri tarafından üretilir (Yada ve ark., 2007). Viyolasinin antiprotozoan (Matz ve ark., 2004), antikanser (Ferreira ve ark., 2004; Kodach ve ark., 2006), antiviral (Sánchez ve ark., 2006), antibakteriyel (Nakamura ve ark., 2002) ve antioksidan (Konzen ve ark., 2006) aktiviteleri olduğu bildirilmiştir. Mojib ve arkadaşları (2010), *Janthinobacterium* sp.'den viyolasin ve *Flavobacterium* sp.'den flexirubin pigmentlerinin, tüberkülozun kemoterapisi için değerli bileşikler olduğunu ifade etmişlerdir. Bu özellikler, terapötik amaçlar için viyolasine uygulama olanağı sağlar (Richard, 1993).

1.1.1.5. Bakteriyel Pigmentlerin Antimikrobiyal Özellikleri

Bakteriyel pigmentlerin, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir. *H. alkaliphilus* MSRDI tarafından üretilen kırmızı pigmentin, *S. aureus*, *S. typhi*, *K. pneumonia*, *E. coli* ve *Salmonella paratyphi*'ye karşı güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Suresh ve ark., 2015).

Rashid ve arkadaşları (2014), on beş farklı bakteriden izole edilen pigmentlerin antibakteriyel aktivitesini belirlemiştir. Yaptıkları çalışmada, farklı izolatların pigmentlerinin dokuz farklı Gram pozitif ve Gram negatif insan patojenik bakteri suşlarına karşı antibakteriyel etkilerini bildirmişlerdir. Rashid ve arkadaşları (2014) tarafından bildirilen önceki literatürlerden farklı bakterilerden izole edilen pigmentlerin antibakteriyel aktivitesinin Gram-negatif patojenik suşlara karşı Gram-pozitiften daha etkili olduğunu göstermiştir (Rashid ve ark. 2014).

Genellikle sarı, turuncu ve kırmızı renkli olan *Monascus* pigmentlerinin zayıf antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir (Kim ve ark. 2006). Chen ve Tseng (1989) tarafından yapılan bir başka çalışma, *Monascus purpureus* pigmentlerinin *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini göstermiştir. Umadevi ve Krishnaveni (2013) ayrıca, *Klebsiella* sp., *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp. ve *Escherichia* sp. gibi farklı insan patojenik bakteri suşlarına karşı pigmentlerin pozitif antibakteriyel aktivitesini de gözlemlemişlerdir. Ayrıca *Streptococcus* sp'e karşı örneklerin negatif olduğunu tespit etmişlerdir (Umadevi ve Krishnaveni, 2013). Radjasa ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan çalışma, bir bakteri suşundan izole edilen pigmentin antibakteriyel potansiyelini göstermiştir. Pigmentin insan patojenik suşu olan *Staphylococcus aureus*'a karşı önemli derecede aktif olduğunu göstermişlerdir. Mohana ve arkadaşları (2013), birçok bakteriyel pigmentin, insan patojenik bakteri suşu olan *S. faecalis* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel aktivitesini çalışmışlardır. Banerjee ve arkadaşları (2011), izole ettikleri pigmentin, *S. aureus*, *M. lutea*, *K. pneumonia*, *B. cereus* ve *B. subtilis*'e karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu ileri sürmüştür. Ayrıca izole pigmentlerin *S. cerevisiae*, *A. niger*, *P. aeruginosa*, *S. typhi* ve *E. coli*'ye karşı etkisiz olduğunu da bildirmişlerdir (Banerjee ve ark. 2011). Bu çalışmalar, bakterilerden ekstrakte edilen

pigmentlerin, çeşitli insan patojenik suşlarına karşı potansiyel bakteri öldürücü aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

1.1.1.6. Antioksidan Özellikleri

Doğal kökenli pigmentlerden biri olan karotenoidler antioksidan, provitamin veya tümör inhibisyon özellikleri nedeniyle insan diyetinde hayati bir rol oynar (Koes ve ark., 1994; Joshi ve ark., 2003; Kim ve ark., 2003). Doğal boyaların hayvan ve insan sağlığındaki yararlarını vurgulayan bilimsel kanıtlar nedeniyle son birkaç yıl içinde doğal kaynaklara yönelik bir artış olmuştur (Nakamura ve ark., 2002). Karotenoid bakımından zengin diyetin kullanımı, epidemiyolojik olarak düşük hastalık riski ile ilişkilendirilmiştir (Kodach ve ark., 2006). Bu nedenle, karotenoidler, kimyasal, farmasötik yem ve gıda endüstrilerinde ticari uygulamalar için en değerli bileşik sınıflarından biri olarak kabul edilir (Koes ve ark., 1994).

Membranları stres koşullarında stabilize eden torularhodin (Ungureanu ve Ferdes 2012) önemli antioksidan aktivite göstermektedir. Hormon ve A vitamini öncüsü olan bu karotenoidler, antioksidan ve yaşlanma karşıtı aktivite göstermektedirler. Aynı zamanda bağışıklık sisteminin güçlendirilmesinde ve belirli kanser türlerinin önlenmesinde rol oynamaktadırlar (Matz ve ark., 2004). Torularhodin kayda değer miktarda antioksidan aktivite göstermektedir ve karboksilik asit ile eşsiz bir karotenoiddir (Lichstein ve Van De Sand, 1946). Provitamin A benzeri aktiviteye sahip karotenoidler karboksilik grup tarafından farklılaştırılmakta ve kozmetik ve yiyecek için renk katkıları olarak kullanılmaktadırlar. Yapılan çalışmalar torularhodin'in oksidatif strese karşı koruduğunu ortaya koymuştur (Matz ve ark., 2004). Bu torulen ve torularhodin karotenoidlerini biyoteknolojide araştırma yapmak için önemli bir konu haline getirmektedir.

Araştırmacılar tarafından belirtildiği gibi, oksijen yüklemesi sırasında, *R. glutinis* karoten'den daha fazla torularhodin üretmektedir. Bu nedenle, maya hücrelerinde torularhodin'in aktif oksijen türlerine karşı koruma gösterdiği varsayılabilir (Lichstein ve Van De Sand, 1946; Matz ve ark., 2004). Torulen ve torularhodin'in gıda maddelerinde bulunmadıkları için insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkileri

bilinmemektedir. Buna rağmen, bu karotenoidlerin yapısal karakterizasyonu ve bunların antikanser ve diğer aktivitelerin dikkate alınması, kozmetik, gıda ve yemlerde kullanılmasını desteklemektedir. Nitekim, bu karotenoidlere sahip bazı maya türleri hayvanlar tarafından tüketilmekte, örneğin *Rhodotorula*, tavuk yemi olarak (kas/yağ oranı arttırılır, görünümü iyileştirir ve etin besleyici değerini oluşturur) kullanılmaktadır. Torulen, diğer hidrokarbon karotenoidleri, örneğin likopen veya β karotene benzer şekilde katkı maddesi olarak kullanılabilir. Diğer yandan, asidik bir pigment olan torularhodin, annatto ekstraktının başlıca karotenoidleri, norbiksin ve biksin ile benzer şekilde kullanılabilir ve örneğin et ürünlerinde bunların yerini alabilmektedir.

Torularhodin ve torulen, likopen ve astaksantin gibi karotenoidler antioksidan olarak işlev görebilirler. Uçtaki karboksil grubunun varlığından dolayı sulu formülasyonda çözünürlüğü arttığı için özel formülasyonlarda torularhodin kullanılabilir. Her durumda, formülasyon teknolojisi tüm karotenoidler için aynıdır. Örneğin; yemeklik yağların özüt çözeltisi, pigment yağı su emülsiyonları, dağılıbilir tozlar (Matz ve ark., 2004).

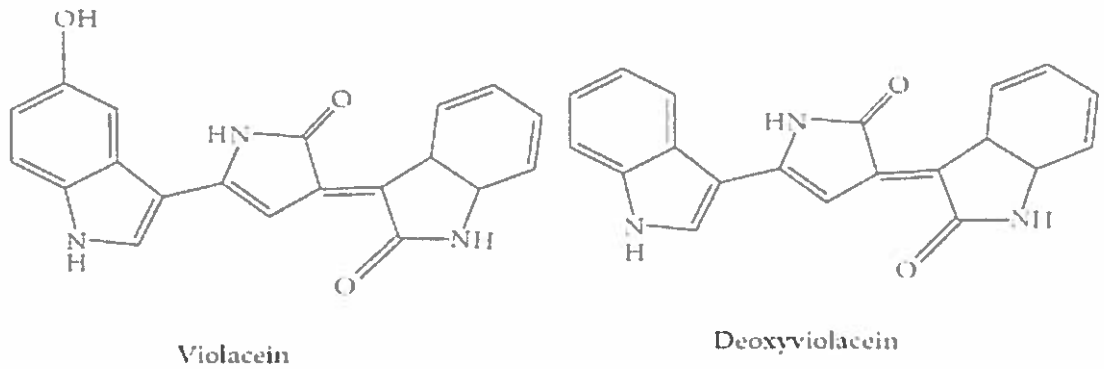
Farklı biyolojik ortamlarda viyolasin çalışma kapasitesi ve toksikolojik verilerle birlikte tıp alanındaki uygulamaları, gelecekteki potansiyel faydalarını göstermektedir. Benzer şekilde, viyolasin tarımsal sanayinin yanı sıra tekstil ve kozmetik ürünlerinde de kullanılmaktadır (Duran ve ark., 2012). *Monascus* cinsinin az sayıdaki türü, Doğu Asya'da kırmızı soya fasulyesi peynirleri, kırmızı pirinç şarapları ve balık ve et ürünleri için doğal bir gıda renklendirici olarak doğal gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Kim ve ark., 2006). Karotenoidlerin singlet oksijen veya serbest radikal temizleyiciler, antikanser ajanlar, immün tepki uyarıcılar olarak ve alkolsüz içecekler, unlu mamuller için pişirilmiş ürünler ve kozmetik katkı maddeleri için renklendirici etkinliği bilinmektedir (El-Banna ve ark., 2012).

1.2. Viyolasin Pigmenti

Bir bisindol olarak, viyolasin (Şekil 1.1), *Collimonas* (Hakvag ve ark., 2009), *Duganella* (Wang ve ark., 2009), *Janthinobacterium* (Pantanella ve ark., 2007; Lu ve

ark., 2009; Jude ve ark., 2012), *Microbulbifer* sp. (Matz ve ark., 2008) ve *Pseudoalteromonas* (Mccarthy ve ark., 1985; Yang ve ark., 2007; Zhang ve Enomoto, 2011) dahil olmak üzere çeşitli bakteri suşları tarafından üretilir. Bu viyolasin üreticileri filogenetik olarak çeşitlilik gösterir ve bu nedenle izole edilmiş oldukları yerler de farklıdır. Tablo 1.2'de gösterildiği gibi, bu bakteriler deniz süngerlerinin yüzeylerinden (Yang ve ark., 2007) ve zeytin bahçelerinin rizosferinden (Aranda ve ark., 2011) ve hatta buzullardan (Lu ve ark., 2009; Kim ve ark., 2012; Avgustin ve ark., 2013) oldukça fazla sayıda farklı çevreden izole edilmişlerdir. Bununla birlikte, belki de en iyi bilinen *C. violaceum* suşunu (Duran ve Menck, 2001) içeren *Chromobacterium* (Moss ve ark., 1978; Hoshino ve ark., 2011) cinsidir.

Bir bisindol olan viyolasin, biyofilm üretimiyle ilişkili ikincil bir metabolittir. Viyolasin birkaç bakteri türü tarafından üretilir ancak en fazla çalışılan tür *Chromobacterium* sp.'dir (Hoshino ve ark., 2011; Venil ve ark., 2015; Sasidharan ve ark., 2015). Viyolasin, adının kaynağı olan karakteristik bir mor renge sahiptir. *Janthinobacterium lividum*, yalnızca viyolasin değil, deoksiviyolasin bileşiğini de üretir. Viyolasin ile kıyaslandığında bu oranın % 85 viyolasin % 15 deoksiviyolasin'dir (Choi ve ark., 2015). Deoksiviyolasin, viyolasinin biyosentetik yolu tarafından üretilen en iyi bilinen türevidir. Aradaki fark, Şekil 1.1'de gösterildiği gibi deoksiviyolasinin bir hidroksil grubundan yoksun olmasıdır.



Şekil 1. 1. Viyolasin ve deoksiviyolasinin kimyasal yapısı. (Choi ve ark., 2015).

Literatürde, *Chromobacterium violaceum* (Moss ve ark., 1978, Ahmad ve ark., 2012), *Collimonas* sp. (Hakvag ve ark., 2009), *Duganella* sp. (Aranda ve ark., 2011), *D. violaceinigr*a (Li ve ark., 2004), *Janthinobacterium lividum* (Lu ve ark., 2009), *J.*

svalbardensis (Avgustin ve ark., 2013), *Pseudoalteromonas* sp. (Yada ve ark., 2008) ve *P. luteoviolacea* (Yang ve ark., 2007) dahil olmak üzere birçok mikroorganizma tarafından viyolasin üretimi hakkında pekçok araştırma bulunmaktadır. Bazı örnekler Tablo 1.2’de gösterilmiştir.

Tablo 1. 2. Viyolasin üreten kültüre edilmiş bazı suşlar (Duran ve ark., 2012)

Tür	Yorumlar	Referanslar
Psikotropik bakteri RT102	<i>J. lividum</i> ’a yakın	Nakamura ve ark. (2002, 2003)
<i>J. lividum</i> türü DSM1522		Pantanella ve ark. (2007)
<i>J. lividum</i> S9601		Shirata ve ark. (1998)
Deniz sediment bakterisi <i>pseudoalteromonas</i>		Tan ve ark. (2002)
Psychrotrophic bacterium XT1	<i>J. lividum</i> ’a yakın	Lu ve ark. (2009)
<i>C. violaceum</i>	<i>Bacillus violaceum</i>	Tobie (1934)
<i>Alteromonas luteoviolacea</i>	Denizel bakterisi	Laatsch ve Thomson (1984)
<i>C. violaceum</i> CCT 3496	Amazon Nehri’nden, Manaus, Brezilya	Riveros ve ark. (1989)
<i>C. violaceum</i> B78		De Moos ve Happel (1959)
<i>C. violaceum</i> ATCC 553		
<i>Pseudoalteromonas letuviolacea</i>	<i>A. cavemosa</i> süngerinden	Yada ve ark. (2008)
<i>Dunagella</i> sp. B2	Çinden	Wang ve ark. (2009)

Viyolasinin, mikroorganizmanın maruz kaldığı strese karşı savunma mekanizmasının bir ürünü olduğuna ya da diğer bakterilere karşı bir avantaj sağlamak üzere üretildiğine inanılmaktadır (Choi ve ark., 2015).

Genellikle viyolasin üretimi, VioABCDE olarak bilinen bir grup gen tarafından başlamakta, mikroorganizmanın maruz kaldığı koşullara bağlı olarak üretimi tetiklemekte ve maddenin özelliklerini vermektedir (August ve ark., 2000).

Viyolasin biyosentetik yolu, maddenin triptofan metabolizması sonrası ortaya çıktığını göstermektedir. Viyolasin molekülünün kendisi iki triptofan molekülü tarafından oluşmaktadır. Moleküllerin düzenlenme şekline ve hidroksil grubunun

varlığına veya yokluğuna bağlı olarak, spesifik olarak deoksiviyolasin (hidroksil grubunun yokluğu) ve oksiviyolasin (iki hidroksil grubunun varlığı) olmak üzere farklı türevler üretir (Hoshino, 2011). Viyolasin üretimi, spesifik olarak N-heksanoil homoserin lakton tarafından indüklenmektedir (Blosser ve Gray, 2000). De Moss ve Evans, (1960) viyolasin sentezi için moleküler oksijen ve triptofanın gerekli olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca oksijenin yokluğunda triptofandan viyolasin sentezi başlamadığını ortaya koymuşlardır.

1.2.1. Viyolasinin Keşfi

İtalyan araştırmacı Bergonzini 1880 yılında Modena Üniversitesi'nde çalışmaları esnasında kazayla bir keşif yapmıştır. “Bozunmayı geciktirici eylem mekanizmaları”nı çalışmak için ovalbumin solüsyonları hazırladıktan sonra kontrol solüsyonlarını ortadan kaldırmayı unutmuştur. Bu örnekler üzerinde beklenmedik bir durum gözlemlemiştir. Bu durumu fantastik olarak tanımlamıştır. Buharlaştırma işleminden sonra çok yoğun mor renkli ince bir film tabakasıyla kaplı solüsyon elde etmiş ve bu renklendirmeyi sergileyen *Cromococcus violaceus* bakterisinden şüphelenmiştir. Yapılan testler sonucunda *Cromobacterium violaceum* adı verilen yeni bir bakteri türünün bu renklendirmeyi sağladığı sonucuna varılmıştır (Bergonzini, 1881). Görünen spektrum absorpsanlarına dayanarak bu organizmanın *Cromobacterium violaceum*, bileşiğin ise viyolasin olduğunu De mos Boisbaudran rapor etmiştir (De Moss, 1967). Zimmerman tarafından daha sonra bu bakterinin adı *Chromobacterium violaceum* olarak değiştirilmiştir (Zimmerman, 1881).

1.2.2. Viyolasinin Biyosentezi

C. violaceum çok yönlü mavi-mor renkli, suda çözünmeyen pigment olan viyolasin üretir. Viyolasin üretimi, bir yönde kopyalanan beş enzim kodlama geninden (vioA, vioB, vioC, vioD ve vioE) oluşan vio operonun ifadesini içermektedir. Bu enzimler, 7.3 kb uzunluğunda bir DNA parçası tarafından kodlanmaktadır (Duran ve ark., 2016). *C. violaceum*'un QS sistemi, iki bitişik gen, *cvrI*, bir oto indükleyici sentaz ve

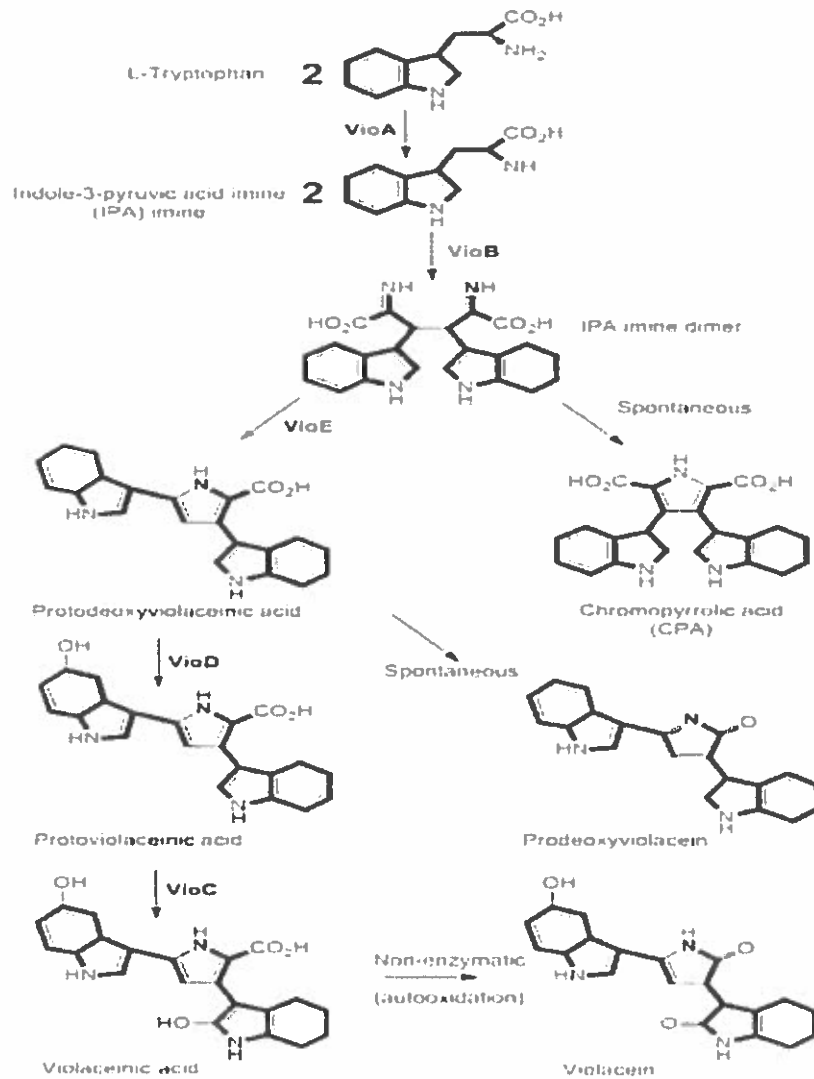
cviR, *C. violaceum*'daki viyolasin ve diğer fenotiplerin üretimini düzenleyen bir reseptör (Vasconcelos ve ark., 2003) içeren evrimsel olarak korunmuş bir transkripsiyonel regülatörden oluşmaktadır. *CviI* ve *cviR* genleri *Vibrio fischeri*'nin sırasıyla *LuxI* ve *LuxR*'sine homologtur. *cviI*, oto-indükleyici C6-homoserin laktonunu (HSL'ler) ve DNA-bağlayıcı sitoplazmik transkripsiyon faktörü için *cviR* kodlarını sentezlemektedir. Bu bitişik genler zıt DNA ipliklerinden kopyalanmakta ve 73 bp'lik (Vasconcelos ve ark., 2003) ortak bölgeleri ifade etmektedir.

Tablo 1. 3. Vio operonunun genleri (Kothari ve ark., 2017)

Gen	Gen sembolü	Enzimatik etki (Duran ve ark.,2016)	Moleküler ağırlık (Duran ve ark.,2016)	Uzunluk	PDB Kimliği
vioA	CV_RS16140	Flavin bağımlı triptofan 2-mono-oksijenaz	48	1257	5G3S
vioB	CV_RS16135	heme proteini ihtiva eden bir poliketit sentaz olarak kabul edilir	111	2997	Mevcut değil
vioC	CV_RS16130	FAD'a bağımlı monooksijenaz	48	1290	2WBO
vioD	CV_RS16125	Flavin bağımlı monooksijenaz	42	1122	3C4A
vioE	CV_RS16120	Flavanonun izoflavona dönüşümünden sorumlu	22	576	2ZF3

Viyolasin biyosentezi (Şekil 1.2), iki L-triptofan molekülünün enzimatik oksidasyonunu içermektedir (Mizuno ve ark., 1961). Moleküler seviyede *CviI* sentaz, yağ asitlerinin veya S-adenosil metioninin AHL'lere dönüşümünü katalize etmektedir. Bu AHL, vio operonun (vioABCDE) tek yönlü olarak ifadesini tetiklemek için *CviR* ile bir kompleks oluşturmaktadır. İlk enzim ürünü olan VioA (Flavin'e bağlı triptofan 2-monooksijenaz), triptofanın indol-3-piruvik asit imine (IPA) oksidasyonunu FAD kofaktörünün indirgenmesi ile katalize etmektedir (Duran ve ark., 2016). Ayrıca IPA, VioB'nin aktivitesi ile dimerizasyon işlemi yoluyla kısa ömürlü imin dimerine dönüştürülmektedir. Kısa ömürlü dimer, ya kendiliğinden bir şekilde indolokarbazol biyosentezinde yer alan kromopirrolük aside dönüştürülmekte

ya da VioE, dimer'i hızlı bir şekilde, protoanil biyosentezine yol açan protodeoksilveninik aside (PVA) değiştirmektedir. Bunun VioE'nin, viyolasinin moleküler iskelet yapısında önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Hirano ve ark., 2008). Ayrıca VioD, bir PVA indol halkasının beşinci pozisyonunda (Ran ve ark., 2015) hidroksilasyonu ve NADPH'nin NADP'ye oksidasyonunu katalize ederek proviyolaseine vermektedir. Proviyolasin daha sonra VioC'nin kontrolü altında su ve CO₂ oluşumu ile birlikte NADPH'nin NADP⁺ 'ya oksidasyonu ile viyolasin'e dönüştürülmektedir.



Şekil 1. 2. Viyolasin'in biyosentetik yolu (Dantas ve ark., 2013)

Farklı raporlar, farklı viyolasin biyosentezi yolunun enzimlerine farklı önem vermektedir. Hirano ve arkadaşları VioE'nin, kısa ömürlü dimeri (IPA) hızlı bir şekilde sürekli viyolasin biyosentezine izin veren PVA'ya dönüştürebildiği için anahtar enzim olarak gösterilmiş olmasına rağmen (Hirano ve ark., 2008); diğer raporlar (Antonio ve ark., 2004; Xu ve ark., 2016) VioB'yi hız sınırlayıcı enzim olarak göstermiştir. Sonik uyarılmış *C. violaceum* tarafından viyolasinin aşırı üretimi konusundaki araştırmada vioB'nin 3.92 kat daha regüle olduğu tespit edilmiştir (Joshi ve ark., 2017). Bu durumda, artan viyolasin üretimi, glikoz metabolizmasına katılan genlerin pentoz fosfat yolu aracılığıyla daha yüksek ekspresyonundan kaynaklanmış gibi görünmektedir, bu da, viyolasin sentezi için öncü olan triptofan biyosentezi için kullanılacak olan daha fazla eritroz-4-fosfat mevcudiyeti ile sonuçlanmaktadır. Metabolik mühendisliği için istatistiksel bir yaklaşım kullanan VioA ve VioE'nin, viyolasin üretimi sırasında VioB, VioC ve VioD'den daha az önemli olduğu gösterilmiştir (Xu ve ark., 2016). Viyolasin biyosentezi sırasında, yan ürünler oksiviyolasin (ekstra hidroksil grubuna sahip) ve deoksiviyolasin (eksik hidroksil grubu) da üretilmektedir. Şimdiye kadar, bu yan ürünler hakkında çok fazla çalışma yapılmamıştır. Deoksiviyolasinin alkali/aside ve UV'ye direnç gösterdiği ve hepatoselüler karsinomun proliferasyonunu inhibe edebileceği gösterilmiştir (Jiang ve ark., 2012). VioD vio operondan çıkarıldığında yüksek deoksiviyolasin üretimi gözlemlenmiştir (Choi ve ark., 2015). Deoksiviyolasinin emilim absorbanı 560 nm'dedir (Jiang ve ark., 2012), viyolasin ölçümü için kullanılan dalga boyları 575/580/585 nm'dir. Viyolasin ekstrakt edilirken ve ölçülürken, deoksiviyolasin gibi ürünlerden oluşabilecek olası girişimlerin önüne geçmek önemlidir. Her ne kadar quorum sensing araştırmalarında *C. violaceum*'un yoğun olarak kullanılması ve quorum sensing regüle edilen marker özelliği olarak viyolasin üretimine azami ölçüde dikkat edilmesine rağmen, fotometrik olarak bakteriyel büyümeyi ölçerken, her zaman viyolasin ile karışmayı önlemek için yeterince dikkat gösterilmemektedir. Renkli bir molekül olan viyolasin, diğer pigmentler gibi, bakteri kültürlerinin OD'sini ölçmek için geleneksel olarak kullanılan dalga boylarında önemli ölçüde absorbe etmektedir. Yapılan bir çalışmada *C. violaceum* da dahil olmak üzere pigmentli bakterilerin fotometrik miktar tayini yapılırken ölçülen en iyi dalga boyunun 764 nm olduğu bildirilmiştir (Joshi ve ark., 2017). Gallardo ve ark, *C. violaceum* pigmentinin

580 nm ve 764 nm'de karakterizasyonu için hiperspektral görüntüleme kullandıklarını bildirmişlerdir (Gallardo ve ark., 2014).

1.2.3. Viyolasinin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitesi

Viyolasin antifungal, antiparaziter, antitümoral, antiprotozoal, antiviral, antioksidan ve antibakteriyel aktivite gibi biyolojik özelliklere sahiptir (Mendes ve ark., 2001; Duran ve ark., 2007).

Viyolasinin antibakteriyel etkilerinin olduğu bilinmektedir (Carvalho ve ark., 2006; Duran ve ark., 2007). Özellikle in vitro çalışmalarla viyolasinin, Gram-pozitif bakterilerin büyümesinde inhibe edici bir antibiyotik etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Gram-negatif bakterilerin büyümesinde ise yüksek konsantrasyonlarda viyolasinin hafif bir inhibisyon sergilediği belirlenmiştir (Duran ve ark., 2012). Viyolasinin *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir (Duran ve ark., 1983; Nakamura ve ark., 2002, 2003; Martins ve ark., 2011; Duran ve ark., 2012; Periz, 2016). Ayrıca viyolasinin insanlarda diş çürümesine neden olan *Streptococcus mutans*'ın büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Patel ve ark., 2015).

Viyolasinin, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* (Lee ve ark., 2016), *Colletotrichum dematium*, *Fusarium solani* f. spp. *mori*, ve *Bipolaris leersiae*'ye karşı antifungal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Shirata ve ark., 2000; Nakamura ve ark., 2003; Cazoto ve ark., 2011; Martins ve ark., 2011). Panama'daki amfibi türlerinin ve kominitelerin azalmasına neden olan *Batrachochytrium dendrobatidis* mantarına karşı da viyolasinin inhibe edici etkisi olduğu bildirilmiştir (Brucker ve ark., 2008). Ayrıca araştırmacılar viyolasinin meyvelerde beyaz kök çürüklüğü hastalığına ve çeşitli bitki ve insan patojeni olan mantar türlerine karşı da antifungal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir (Nakata ve ark., 1979; Sasidharan ve ark., 2015). Viyolasinin *Spumella* sp. ve *Ochromonas* sp. gibi silli protozoa türlerine karşı antiprotozoal, *Trypanosoma cruzi* ve *Leishmania amazonensi*'e karşı

antiparaziter, *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı antimikobakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Souza ve ark., 1999; Duran ve Menck, 2001; Lopes ve ark., 2009 ; Mehta, 2012).

Viyolasin, yoğunluk fonksiyonel teorisi yöntemine dayanan antioksidan özelliklere sahiptir (Cao ve ark., 2007). Kısaca, belirli bir N-H viyolasin yapısının, DPPH-H'deki N-H'ninkinden biraz daha düşük bir bağ ayrışma enerjisine (BDE) sahip olduğu hesaplanmıştır. Bu nedenle viyolasin DPPH radikallerini temizleyebilmektedir. Aynı zamanda, viyolasinin antioksidan özellikleri, DPPH, nitrik oksit, süperoksit radikalleri ile reaksiyona sokulması ve hidroksil radikal elektron paramanyetik rezonans (EPR) sinyalinin azaltılmasıyla daha önce doğrulanmıştır (Konzen ve ark., 2006). DPPH süpürme, bileşiğin in vitro antioksidan kapasitesini analiz etmek için hızlı, uygun maliyetli ve doğru bir testtir (Koleva ve ark., 2002; Suresh ve ark., 2008). Vishnu ve Palaniswamy (2018), yaptıkları çalışmada *C. vaciini* CV5'ten izole ettikleri viyolasinin antioksidan aktivitesini ortaya çıkarmışlar ve DPPH'deki IC₅₀ değerini 297,88 µg/mL olduğunu bulmuşlardır. Başka bir çalışmada ise viyolasinin antioksidan aktivitesinin askorbik asitle kıyaslandığında % 20 olduğu belirtilmiştir (Suryawanshi ve ark., 2014).

Bakteriyel pigmentlerin sentetik pigmentlere kıyasla toksik olmayan, kansere neden olmayan, biyolojik olarak çözünür ve çevre dostu olması sebebiyle optimum üretim koşullarının belirlenmesi, antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin araştırılması büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada *Janthinobacterium lividum* GK suşunun optimum viyolasin üretim koşullarının belirlenmesi ve viyolasinin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin tespiti amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğundan dolayı bilim dünyasında büyük ilgi gören viyolasinin, herpes simpleks virüsü, poliovirus, hepatit-A virüsü, adenovirüs ve rotavirüse karşı antiviral aktivite gösterdiği bildirilmiştir (May ve ark., 1991; Rettori 1996; Duran ve Menck, 2001; Duran ve ark., 2007; Masuelli ve ark., 2015).

Shirata ve arkadaşları (2000), bir mantar öldürücü olarak da kullanılan viyolasinin, dut ağaçlarında beyaz kök çürüklüğüne neden olan *Rosellinia necatrix* gibi fitopatojenik mantarlara karşı aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Sasidharan ve arkadaşları (2015), bitki ve insan patojeni olan *Trichophyton rubrum*, *Cryptococcus gastricus*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum*, ve *Candida albicans* gibi patojenik mantar ve maya türlerine karşı etkili olduğunu tespit etmişlerdir.

Anju ve arkadaşları (2015), en iyi etkinin insanda ayak mantarı enfeksiyonuna neden olan *Trichophyton rubrum* üzerinde görüldüğünü ve viyolasinin azol grubu ilaçlarla birlikte kombine edilip uygulandığında *T. rubrum* üzerinde oldukça etkili olduğunu saptamışlardır.

Sasidharan ve arkadaşları (2015), viyolasinin; bavistin ve amfoterisin B gibi yaygın antifungal maddeler ile karşılaştırıldığında, daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Bununla birlikte viyolasinin, bitkiler ve amfibilerde bulunan patojenik mantarlara karşı biyolojik kontrol potansiyelinin olduğunu bildirilmişlerdir.

Lopes ve arkadaşları (2009), klorokin duyarlı ve dirençli suşlardan *Plasmodium falciparum* suşlarını (in vitro) mikromolar konsantrasyonlarda etkin bir şekilde öldürdüğü ve parazit tespit edildikten sonra (in vivo) *Plasmodium chabaudi* ile enfekte olan fareleri bu parazitten koruduğu belirlemiştir.

Duran ve arkadaşları (2007), viyolasinin, *Spumella* sp. ve *Ochromonas* sp. gibi silli protozoa kültürlerine karşı yüksek toksisite gösterdiğini bununla birlikte *Trypanosoma cruzi* üzerinde de anti-tripanosidal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Aynı zamanda viyolasinin *Leishmania amazonensis* promastigotlarına karşı da etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Carvalho ve arkadaşları (2006), antiviral ve antifungal etki gösteren viyolasinin antibakteriyel aktivite de gösterdiğini bildirilmişlerdir.

Duran ve arkadaşları (2012), özellikle in vitro çalışmalarla Gram-pozitif bakterilerin büyümesinde inhibe edici bir antibiyotik etkisi gösteren viyolasinin Gram-negatif bakterilerin büyümesinde ise hafif bir inhibisyon sergilediğini tespit etmişlerdir.

Souza ve arkadaşları (1999), viyolasinin minimum inhibitör konsantrasyonlarda *Mycobacterium tuberculosis*'a (H37Ra) karşı in vitro antimikobakteriyel aktivite sergilediğini tespit etmişlerdir.

Choi ve arkadaşları (2015), viyolasinin, biyolojik aktivitesinin prokaryotlarla sınırlı olmadığını *C. elegans* gibi bakteriovorus, protozoa ve metazoa üyelerinde de olumsuz etkilere sahip olduğunu bildirilmişlerdir.

Carvalho ve arkadaşları (2006), ile Duran ve arkadaşları (2007), viyolasinin antikanser aktivitesinin de olduğunu saptamışlardır. Lösemi, akciğer kanseri, meme kanseri, serviks kanseri, baş ve boyun kanseri ve kolon kanseri hücre hatlarında viyolasinin antikanser etkileri tespit edilmiştir (Melo ve ark., 2000,2003; Kocdach ve ark., 2006; Mehta, 2012; Masuelli, 2015).

Duran ve Haun (1997), ile Melo ve arkadaşları (2000), yaptıkları çalışmalarda viyolasinin lösemi hücreleri, lenfoma, akciğer ve kolon kanseri hücrelerinin kültürlerinde ve AIDS ile ilgili lenfomalarda tedavi edici özelliklerinin olduğunda belirlemişlerdir.

HT29, SW480, HCT116, ve DLD1 gibi insan kolon kanser hücrelerinin viyolasine karşı oldukça duyarlı olduğu Kodach (2006) tarafından yapılan çalışmada bildirilmiştir.

Bromberg ve arkadaşları (2010), viyolasinin farelerde bulunan tümör hücrelerinin hacminde azalmaya neden olduğunu ve tümörlü farelerin ömürlerini uzatmayı başardığını belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmanın önemi ise viyolasinin ilk in vivo anti-tümör aktivitesi olarak tanımlanmış olmasından ileri gelmektedir.

Ferreira ve arkadaşları (2004), viyolasinin çeşitli kanser hücrelerinde apoptosize neden olduğu halde normal insan lenfositleri ve monositlerine karşı etkisiz olduğunu tespit etmişlerdir.

Vishnu ve Palaniswamy (2018), yaptıkları çalışmada *Chromobacterium vaciini* CV5'ten izole ettikleri viyolasinin antioksidan aktivitesini ortaya çıkarmışlar ve DPPH'deki IC₅₀ değerini 297,88 µg/mL olduğunu bulmuşlardır.

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında 2015 yılında Giresun ilinin Kümbet Yaylasındaki bir kaplıca suyunun etrafında bulunan çamur örneğinden izole edilen ve 16S rDNA analizi sonuçlarına göre *Janthinobacterium lividum*'a benzediği belirlenen GK suşu kullanıldı.

3.1.1. Test Mikroorganizmaları

Janthinobacterium lividum GK suşundan ekstrakte edilen viyolasinin antimikrobiyal özelliklerini araştırmak için Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarından ve Giresun Gıda Kontrol Laboratuvarından temin edilen bakteriler ve mayalar, ile Sayın Prof. Dr. Berna TUNALI (Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü)'dan temin edilen bitki patojeni funguslar kullanıldı (Tablo 3.1).

Tablo 3. 1. Antimikrobiyal çalışmalarda kullanılan organizmalar

Patojen Bakteriler	Patojen Funguslar
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579T (6A5 ⁺)	<i>Fusarium culmorum</i>
<i>Bacillus cereus</i> 6A2	<i>Fusarium graminearum</i>
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Fusarium subglutinans</i>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Trichoderma</i> sp.
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 43864	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Candida albicans</i> FMC1
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13893	

3.1.2. Kullanılan Besiyerler ve Kimyasallar

Nütrient Agar Besiyeri (NA)

Toz halindeki besiyerinden 20 g tartılmış, üzerine distile su ilave edilerek çözdürüldükten sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve 1,1 atmosfer basınç altında 121° C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Bu besiyeri bakteri kültürlerinin hazırlanması için kullanıldı.

Nütrient Broth Besiyeri (NB)

Toz halindeki besiyerinden 8 g tartılmış, üzerine distile su ilave edilerek çözdürüldükten sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve 1,1 atmosfer basınç altında 121° C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Bu besiyeri bakteri kültürlerinin hazırlanması için kullanıldı.

Triptik Soy Broth Besiyeri (TSB)

Toz halindeki besiyerinden 30 g tartılmış, üzerine distile su ilave edilerek çözdürüldükten sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve 1,1 atmosfer basınç altında 121° C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Bu besiyeri bakteri kültürlerinin hazırlanması için kullanıldı.

Luria Bertaini Broth Besiyeri (LB)

Toz halindeki besiyerinden 25 g tartılmış, üzerine distile su ilave edilerek çözdürüldükten sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve 1,1 atmosfer basınç altında 121° C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Bu besiyeri bakteri kültürlerinin hazırlanması için kullanıldı.

Mueller-Hinton Broth Besiyeri (MHB)

Toz halindeki besiyerinden 21 g tartılmış, üzerine distile su ilave edilerek çözdürüldükten sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve 1,1 atmosfer basınç altında 121° C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Bu besiyeri bakteri kültürlerinin hazırlanması için kullanıldı.

Mueller-Hinton Agar Besiyeri (MHA)

Toz halindeki besiyerinden 34 g tartılmış, üzerine distile su ilave edilerek çözdürüldükten sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve 1,1 atmosfer basınç altında 121° C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Bu besiyeri antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi çalışmalarında kullanıldı.

Brain Heart Infusion Broth Besiyeri (BHI)

Toz halindeki besiyerinden 37 g tartılmış, üzerine distile su ilave edilerek çözdürüldükten sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve 1,1 atmosfer basınç altında 121° C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Bu besiyeri bakteri kültürlerinin hazırlanması için kullanıldı.

Potato Dekstroz Agar Besiyeri (PDA)

Toz halindeki besiyerinden 39 g tartılmış, üzerine distile su ilave edilerek çözdürüldükten sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve 1,1 atmosfer basınç altında 121° C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Bu besiyeri fungus kültürlerinin hazırlanması ve antifungal aktivitenin belirlenmesi çalışmalarında kullanıldı.

Sabouraud %4 Dextrose Agar (SDA)

Toz halindeki besiyerinden 65 g tartılmış, üzerine distile su ilave edilerek çözdürülükden sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve 1,1 atmosfer basınç altında 121° C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Bu besiyeri maya kültürlerinin hazırlanması ve antifungal aktivitelerin belirlenmesi çalışmalarında kullanıldı.

Sodyum Dodesil Sülfat Çözeltisi (SDS) (% 10)

10 g sodyum dodesil sülfat 60 ml distile su ile çözdürülüp, 100 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti üretilen viyolasinin OD'sini ölçmek için kullanıldı.

Suya Doyurulmuş Butanol

Cam şişede 1'e 1 oranında distile su ile n-butanol karıştırıldı ve iyice çalkalandı. Çözelti berraklaştıktan sonra üretilen viyolasinin OD'sini ölçmek için üst fazı kullanıldı.

ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)]

7,4 mM ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)] ve 2,6 mM potasyum persülfatın 10 ml distile su içinde çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti karıştırılarak 12-16 saat karanlıkta bekletildi. Sonrasında bu karışıma metanol ilave edilerek bu çözeltinin absorbansı 734 nm'de okunarak ABTS+ katyonunun absorbansı 0,700±0,02 ayarlandı. Bu radikal, viyolasinin toplam radikal süpürme kapasitesini ölçmek için kullanıldı.

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

Metanolde çözdürülerek hazırlanan 0,75 mM DPPH radikali, viyolasinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi çalışmalarında kullanıldı.

3.2. Yöntem

Deneylerde NA besiyerinde büyütülen *Janthinobacterium lividum* GK suşundan bir öze dolusu alınarak 250 ml'lik erlen içinde bulunan 50 ml NB besiyerine inoküle edildi ve 25 °C'de 150 rpm'de yaklaşık 16-18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültürün OD₆₀₀ nm'de absorbansı ölçülerek hücre yoğunluğu belirlendi, 250 ml erlen içinde bulunan 50 ml NB besiyerine OD₆₀₀ nm'de absorbansı 0,1 olacak şekilde inoküle edildi ve 25 °C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Yaklaşık 5-6 saat inkübasyon sonrası OD₆₀₀ nm'de absorbansı 1 olacak şekilde elde edilen kültürden 4 ml NB besiyeri bulunan tüplere OD₆₀₀ nm'de absorbansı 0,05 olacak şekilde inoküle edilerek deneyler yapıldı.

3.2.1. Viyolasin Miktarının Belirlenmesi

Janthinobacterium lividum GK suşundan viyolasin ekstraksiyonu Blosser ve Gray (2000)'e göre yapıldı. Bu yöntemde GK suşundan elde edilen kültürlerden 200 µl alındı ve üzerine %10'luk SDS'den 200 µl bırakıldı. 5 sn vortekslenerek oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. Bu karışımın üzerine su ile doyurulmuş n butanolden 900 µl ilave edildi ve 5 sn vortekslendi. 13000 rpm de 5 dk santrifüj edilerek üstteki sıvıda bulunan viyolasin spektrofotometrede (OD₅₈₅ nm) ölçüldü. Viyolasin ekstinksiyon (0,05601 ml µg⁻¹ cm⁻¹) katsayısı kantitatif hesaplamalarda kullanıldı (Mendes ve ark., 2001). Viyolasin ünite miktarı (Blosser ve Gray, 2000) formül 3.1 kullanılarak hesaplandı :

$$\text{Unite} = (\text{OD}_{585 \text{ nm}} / \text{OD}_{600 \text{ nm}}) \times 1000 \quad (3.1)$$

3.3. Viyolasin Üretiminin Karakterizasyonu

3.3.1. Viyolasin Üretimi Üzerine Farklı Besiyerlerinin Etkileri

Janthinobacterium lividum GK suşunun viyolasin üretiminin en iyi olduğu besiyerini belirlemek için nutrient broth (NB), luria bertani broth (LB), triptik soy broth (TSB), brain heart infusion broth (BHI) ve müller hinton broth (MHB) besiyerleri kullanıldı. Kültürler 25 °C'de 72 saat inkübe edildi. Bakteri yoğunluğu OD₆₀₀ nm'de ve viyolasin ekstraksiyonu OD₅₈₅ nm'de spektrofotometrede ölçüldü.

3.3.2. Viyolasin Üretimi Üzerine Farklı Sıcaklıkların Etkisi

Janthinobacterium lividum GK suşunun viyolasini üretimi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için 15, 20, 22, 25 ve 28 °C'de 72 saat inkübasyona bırakıldı. Bakteri yoğunluğu OD₆₀₀ nm'de ve pigment ekstraksiyonu OD₅₈₅ nm'de spektrofotometrede ölçüldü.

3.3.3. Viyolasin Üretimi Üzerine pH'nın Etkisi

Janthinobacterium lividum GK suşunun viyolasini üretimi üzerine pH'nın etkisini belirlemek için besiyeri 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 pH derecelerine ayarlandı. Bakteri yoğunluğu OD₆₀₀ nm'de ve viyolasin ekstraksiyonu OD₅₈₅ nm'de spektrofotometrede ölçüldü.

3.3.4. Viyolasin Üretimi Üzerine Çalkalama Hızının Etkisi

Janthinobacterium lividum GK suşunun viyolasini üretimi üzerine çalkalama hızının etkisini belirlemek için statik, 50 rpm, 100 rpm, 150 rpm ve 200 rpm hızları kullanıldı. Kültürler bu çalkalama hızlarında 72 saat inkübe edildi. Bakteri yoğunluğu OD₆₀₀ nm'de ve viyolasin ekstraksiyonu OD₅₈₅ nm'de spektrofotometrede ölçüldü.

3.3.5. Viyolasin Üretimi Üzerine İnokülüm Miktarının Etkisi

Janthinobacterium lividum GK suşunun viyolasin üretimi üzerine inokülüm miktarının etkisini belirlemek için kültürden %1, 3, 5, 8, 10, 12 ve 15 olacak şekilde besiyerine ekilmiştir. Bakteri yoğunluğu OD₆₀₀ nm’de ve viyolasin ekstraksiyonu OD₅₈₅ nm’de spektrofotometrede ölçülmüştür.

3.3.6. Viyolasin Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Janthinobacterium lividum GK suşunun viyolasini üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisini belirlemek için 10 gün inkübasyona bırakıldı. Günlük alınan kültürün bakteri yoğunluğu OD₆₀₀ nm’de ve viyolasin ekstraksiyonu OD₅₈₅ nm’de spektrofotometrede ölçüldü.

3.3.7. Viyolasin Üretimi Üzerine Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi

Janthinobacterium lividum GK suşunun viyolasini üretimi üzerine sukroz, glikoz, gliserol ve dekstroz karbon kaynakları ile maya ekstraktı, amonyum sülfat, amonyum klorid ve pepton azot kaynakları %1 oranında kullanıldı. OD₆₀₀ nm bakteri yoğunluğu ve pigment ekstraksiyonu spektrofotometrede OD₅₈₅ nm ölçüldü. Ölçümler sonucu en fazla viyolasin üretimi gerçekleştiren karbon ve azot kaynakları kullanılarak viyolasin üretimi gerçekleştirildi. Bakteri yoğunluğu OD₆₀₀ nm’de ve viyolasin ekstraksiyonu OD₅₈₅ nm’de spektrofotometrede ölçüldü.

3.3.8. Viyolasin Üretimi Üzerine NaCl’nin Etkisi

Janthinobacterium lividum GK suşunun viyolasini üretimi üzerine NaCl’nin etkisini belirlemek için besiyeri %1, 2, 4 ve 6 oranında NaCl ilave edildi. Bakteri yoğunluğu OD₆₀₀ nm’de ve viyolasin ekstraksiyonu OD₅₈₅ nm’de spektrofotometrede ölçüldü.

3.4. Viyolasin Üretimi ve Ekstraksiyonu

Janthinobacterium lividum GK suşundan viyolasin üretimi ve ekstraksiyonu işlemi gerçekleştirmek için ekstraksiyon işleminde kullanılacak çözücü adedince 2000 ml erlen içinde 500 ml besiyerinde bakteri kültürü hazırlandı.

Pigment ekstraksiyonu için Yada ve arkadaşlarının (2008) geliştirdiği metot modifiye edilerek kullanıldı. Buna göre kültür sıvısı 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pellet distile su ile yıkandıktan sonra tekrar 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemine tabi tutuldu. Yıkama işleminden sonra pellet pigmentin ekstrakt edilmesi için etanol (kültür sıvısının % 10 hacmi) veya metanol (kültür sıvısının % 10 hacmi) ile yeniden süspanse edildi. Elde edilen karışım sallayıcıda 1 saat karıştırıldı. Daha sonra tekrar 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar erlenlerde toplandı. Pellet mor renginden gri-beyaz renge dönünceye kadar çözücü ekleme basamağından itibaren işlemler tekrarlandı. Toplanan süpernatantlar evaporatör ile içerisinde bir miktar çözücü kalacak şekilde buharlaştırıldı. Kalan çözücünün uçması için 40°C'de 1 gece bekletildi. Elde edilen viyolasin antimikrobiyal ve antioksidan çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.

3.5. Viyolasinin Antibakteriyel ve Antifungal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Ekstrakte edilen viyolasin örneklerinin antimikrobiyal özellikleri damla difüzyon yöntemi kullanılarak incelendi. Bu çalışma için Tablo 3.1'de belirtilen test bakterileri ve fungusları kullanıldı.

Antimikrobiyal aktivitelerde kullanılmak üzere elde edilen viyolasinin etanol ekstraktından 5 mg/ml olacak şekilde etanol ve DMSO çözücüsünde, metanol ekstraktından 5 mg/ml olacak şekilde metanol ve DMSO çözücüsünde çözülerek stok ekstraktlar hazırlandı.

Antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla patojen bakteriler NB besiyerine ekilerek gece kültürü elde edildi. İnkübasyon sonunda bu bakteri kültürleri OD₆₀₀ nm'de ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre gece kültürlerden 1,5x10⁸

hücre/ml olacak şekilde MHA besiyerine yayma ekim yapıldı. Sonrasında besiyerlerine damla difüzyon yönteminde stok ekstraktlarında 10 µl olacak şekilde MHA besiyerine viyolasin damla olarak bırakıldı.

Antifungal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla patojen maya SDB besiyerine ekilerek gece kültürü elde edildi. İnkübasyon sonunda bu maya kültürleri OD₆₀₀ nm'de ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre gece kültürlerden 1.5×10^8 hücre/ml olacak şekilde SDA besiyerine yayma ekim yapıldı. Sonrasında besiyerlerine damla difüzyon yönteminde stok ekstraktlarında 10 µl olacak şekilde SDA besiyerine viyolasin damla olarak bırakıldı.

Antifungal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla patojen funguslar PDA besiyerinde açılan kuyucuklara ekildi. 1-3 gün inkübasyon sonunda damla difüzyon yönteminde stok ekstraktlarında 10 µl olacak şekilde PDA besiyerine viyolasin damla olarak bırakıldı.

3.6. Viyolasinin Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi

3.6.1. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayini

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürücü aktivite tayini Shimada ve arkadaşlarının (1992) ve Kuo ve arkadaşlarının (2012) geliştirdiği metot modifiye edilerek gerçekleştirildi. Metanol, ve etanol çözümlerinde çözünen ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan viyolasinden 1500 µL, metanolde hazırlanan 0,75 mM DPPH radikalinden 375 µL örnekle karıştırıldı. Karışım kuvvetlice çalkalandı ve karanlıkta 30 dakika bekletildi. Daha sonra spektrofotometrede 517 nm'de köre karşı ölçüm yapıldı. Kör olarak 1500 µl çözücü, 375 µl metanol (DPPH çözücüsü), kontrol olarak 1500 µl çözücü, 375 µl DPPH ilave edilerek hazırlandı. Yüzde inhibisyon formül 3.2 kullanılarak hesaplandı:

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(AK - AÖ) \div AK] \times 100 \quad (3.2)$$

AK: Kontrolün absorbansı, AÖ: Örneğin absorbansı

Farklı derişimlerle ölçülen absorbanslarla grafik çizildi. $y = ax + b$ denkleminde DPPH derişimini yarıya düşüren örnek miktarı $\mu\text{g/mL}$ cinsinden bulundu ve IC_{50} değerleri hesaplandı.

3.6.2. ABTS Radikal Süpürücü Aktivite Tayini

Viyolasin örneklerinin antioksidan kapasiteleri Arnao ve arkadaşlarının (2001) geliştirdiği yöntemle göre yapıldı. 7,4 mM ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)] ve 2,6 mM potasyum persülfat distile su içinde hazırlandı. Bu çözelti karıştırılarak 12-16 saat karanlıkta bekletildi. Sonrasında bu karışıma metanol ilave edilerek bu çözeltinin absorbansı 734 nm'de okunarak ABTS+ katyonunun absorbansı $0,700 \pm 0,02$ 'ye ayarlandı. Hazırlanan ABTS çözeltisinden 2850 μl alınarak üzerine metanol, etanol ve DMSO çözülerinde çözünen farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 150 μl viyolasin örneği ilave edildi ve elde edilen karışım karanlıkta 2 saat bekletilerek absorbansı 734 nm'de ölçüldü. Kör olarak 150 μl çözücü, 2850 μl metanol (ABTS çözücüsü), kontrol olarak 150 μl çözücü, 2850 μl ABTS ilave edilerek hazırlandı. Yüzde inhibisyon formül 3.2 kullanılarak hesaplandı.

Farklı derişimlerle ölçülen absorbanslarla grafik çizilmişdi. $y = ax + b$ denkleminde ABTS derişimini yarıya düşüren örnek miktarı $\mu\text{g/mL}$ cinsinden bulundu ve IC_{50} değerleri hesaplandı.

BÖLÜM 4. BULGULAR

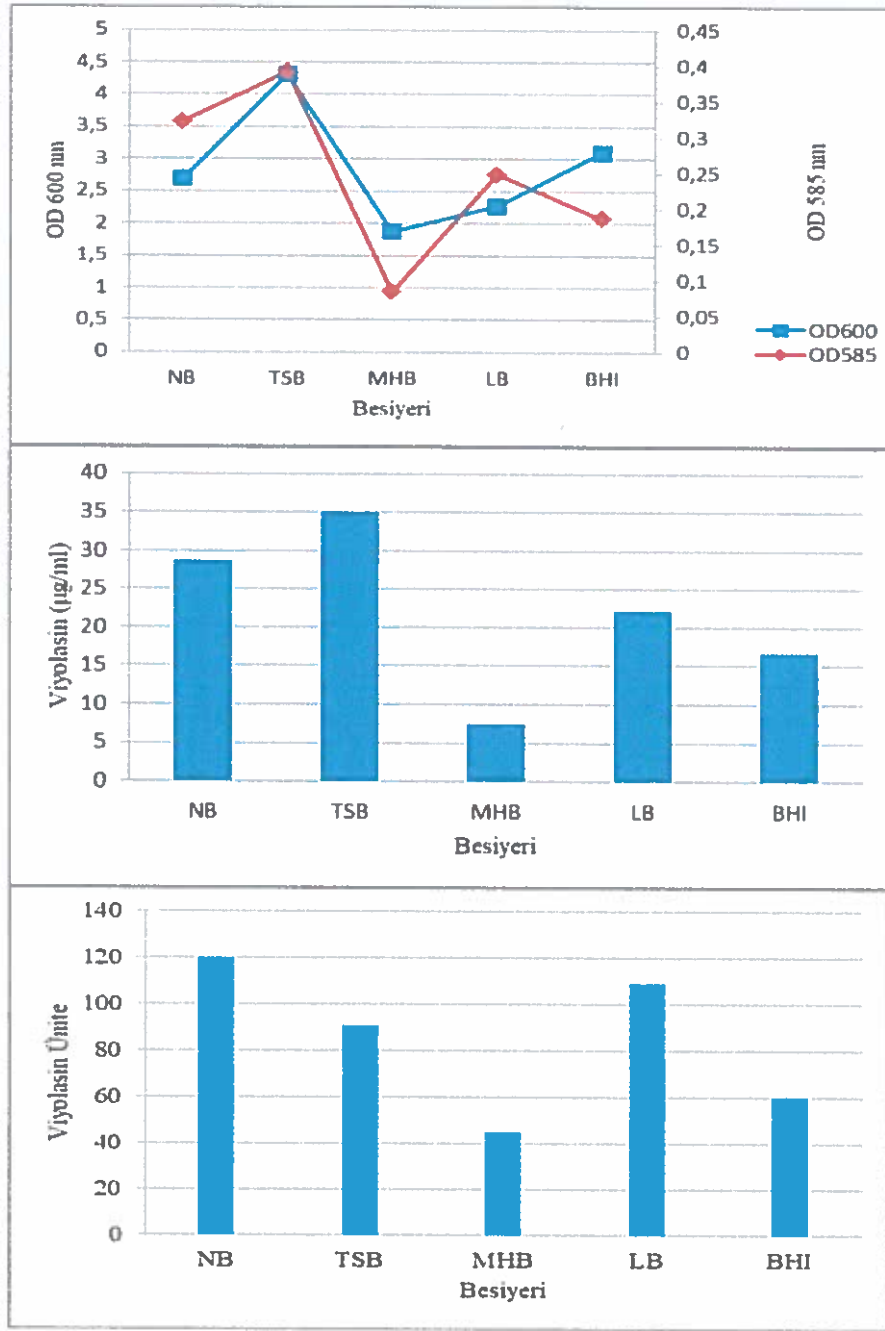
Bu çalışmada *Janthinobacterium lividum* GK suşunun ürettiği viyolasinin optimum üretim şartları karakterize edildi (Şekil 4.1). Fiziksel parametreler arasında, sıcaklık, pH, inokulum seviyesi, inkübasyon süresi, çalkalama hızı, NaCl'in, karbon ve azot kaynaklarının etkisi incelendi. Ayrıca viyolasin ekstrakt edilerek antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri araştırıldı.



Şekil 4.1. *Janthinobacterium lividum* GK suşunun farklı sıcaklıklardaki petri görüntüleri

4.1. Viyolasin Üretimi Üzerine Farklı Besiyerlerinin Etkileri

Janthinobacterium lividum GK suşunun viyolasin üretimini en iyi verimde gerçekleştirdiği besiyerini belirlemek için beş farklı besiyeri kullanıldı (Şekil 4.2). OD₆₀₀ nm'de ölçülen bakteri yoğunluğu sırasıyla en fazla TSB, BHI, NB, LB ve MHB besiyerinde gerçekleşti (Şekil 4.2). OD₅₈₅ nm'de ölçülen viyolasin miktarının en fazla TSB'de sonra NB'de ve en az MHB besiyerinde gerçekleştiği bulundu (Şekil 4.2). OD₅₈₅ nm ölçülen viyolasin OD₆₀₀ nm'de ölçülen hücresel kütleye oranlandığında elde edilen ünite miktarı en yüksek NB besiyerinde bulundu (Şekil 4.2).

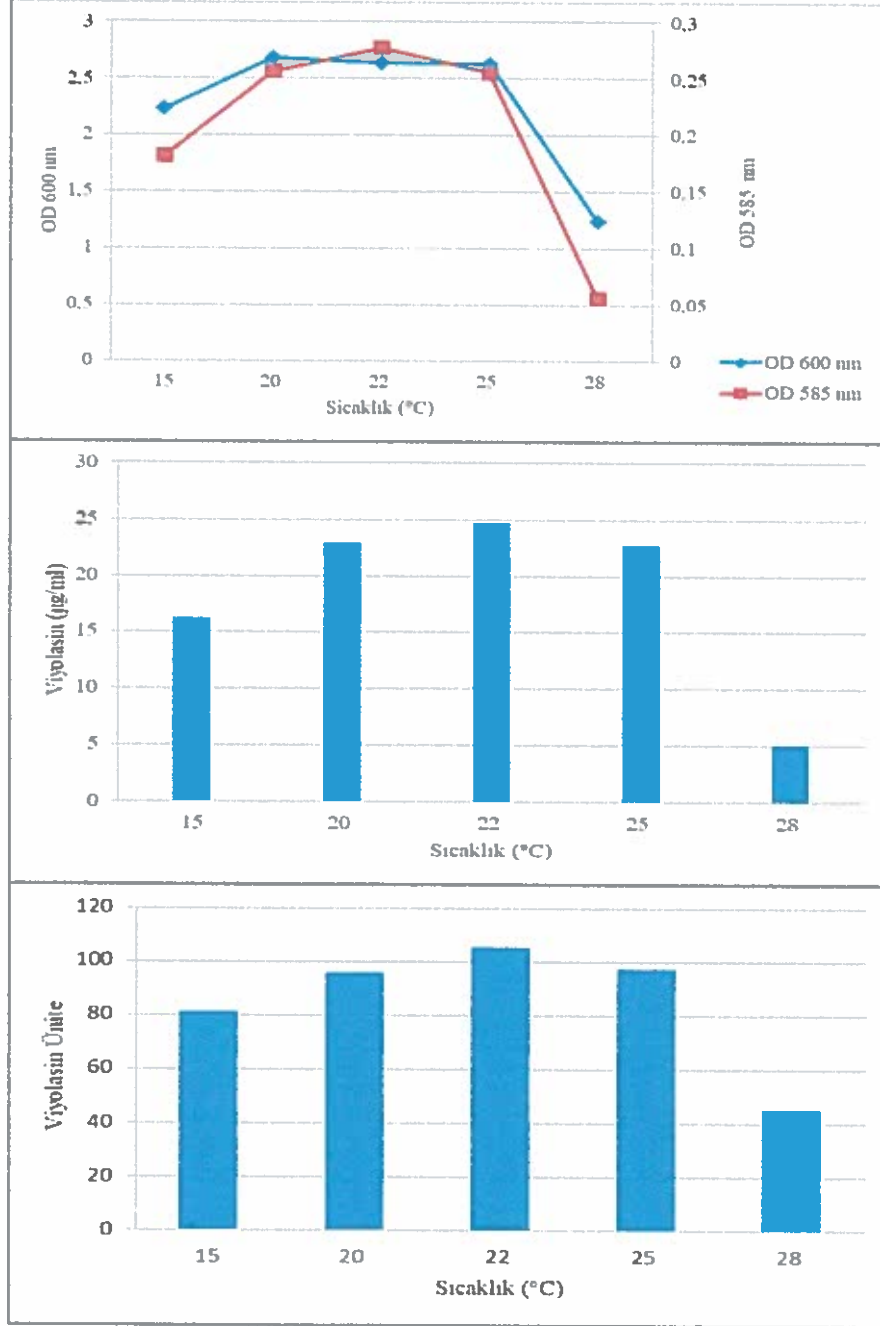


Şekil 4. 2. Viyolasin üretimi üzerinde farklı besiyerilerin etkisi.

4.2. Viyolasin Üretimi Üzerine Farklı Sıcaklıkların Etkisi

Janthinobacterium lividum GK suşunun viyolasin üretiminin 20-25°C aralığında yüksek olduğu ve optimum üretim sıcaklığının 22°C olduğu belirlendi (Şekil 4.3).

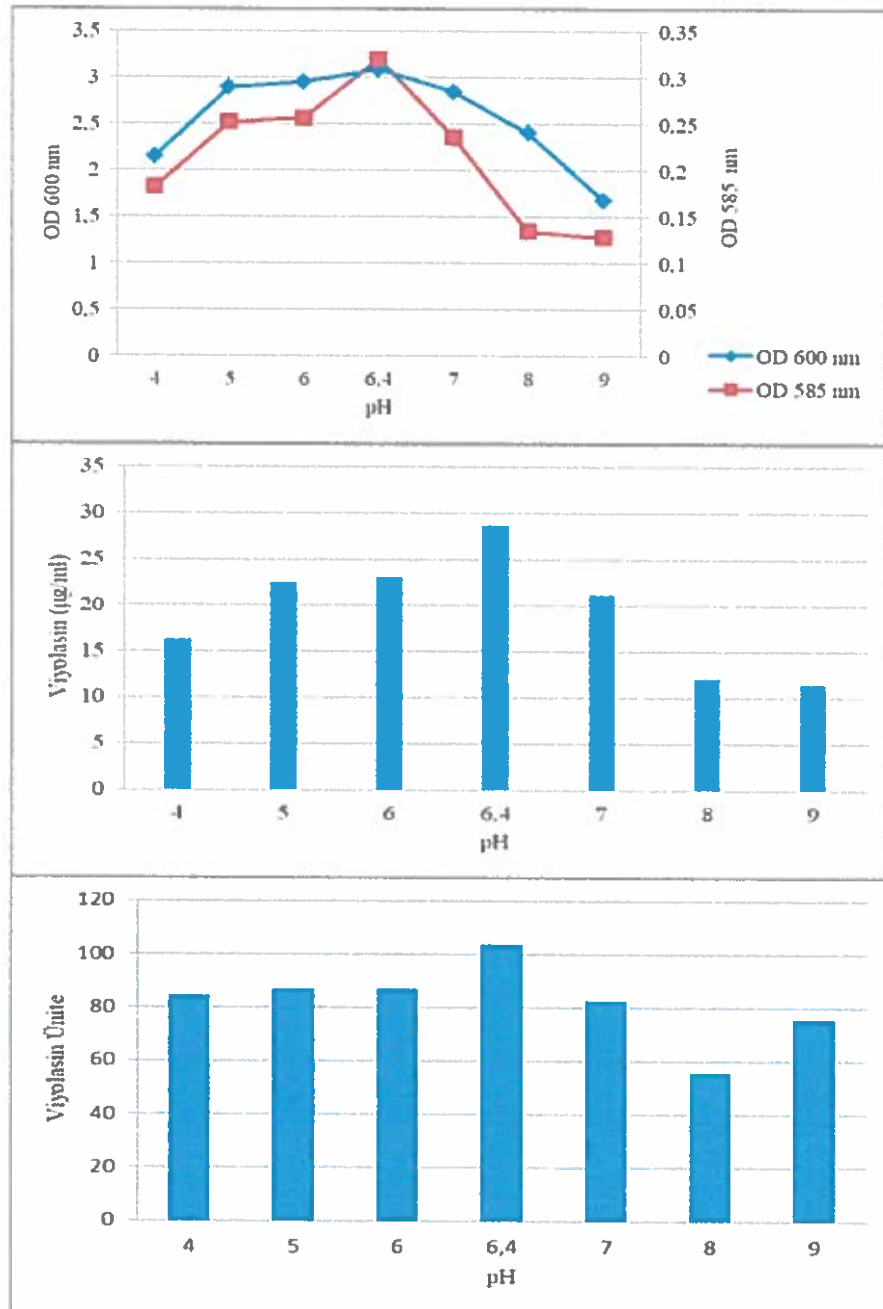
Şekil 4.3'de gösterildiği gibi düşük sıcaklıklarda daha yüksek pigment üretilmektedir. 25°C'nin üstündeki sıcaklıklarda daha az pigment üretilmektedir.



Şekil 4. 3.Viyolasin üretimi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi.

4.3. Viyolasin Üretimi Üzerine pH'nın Etkisi

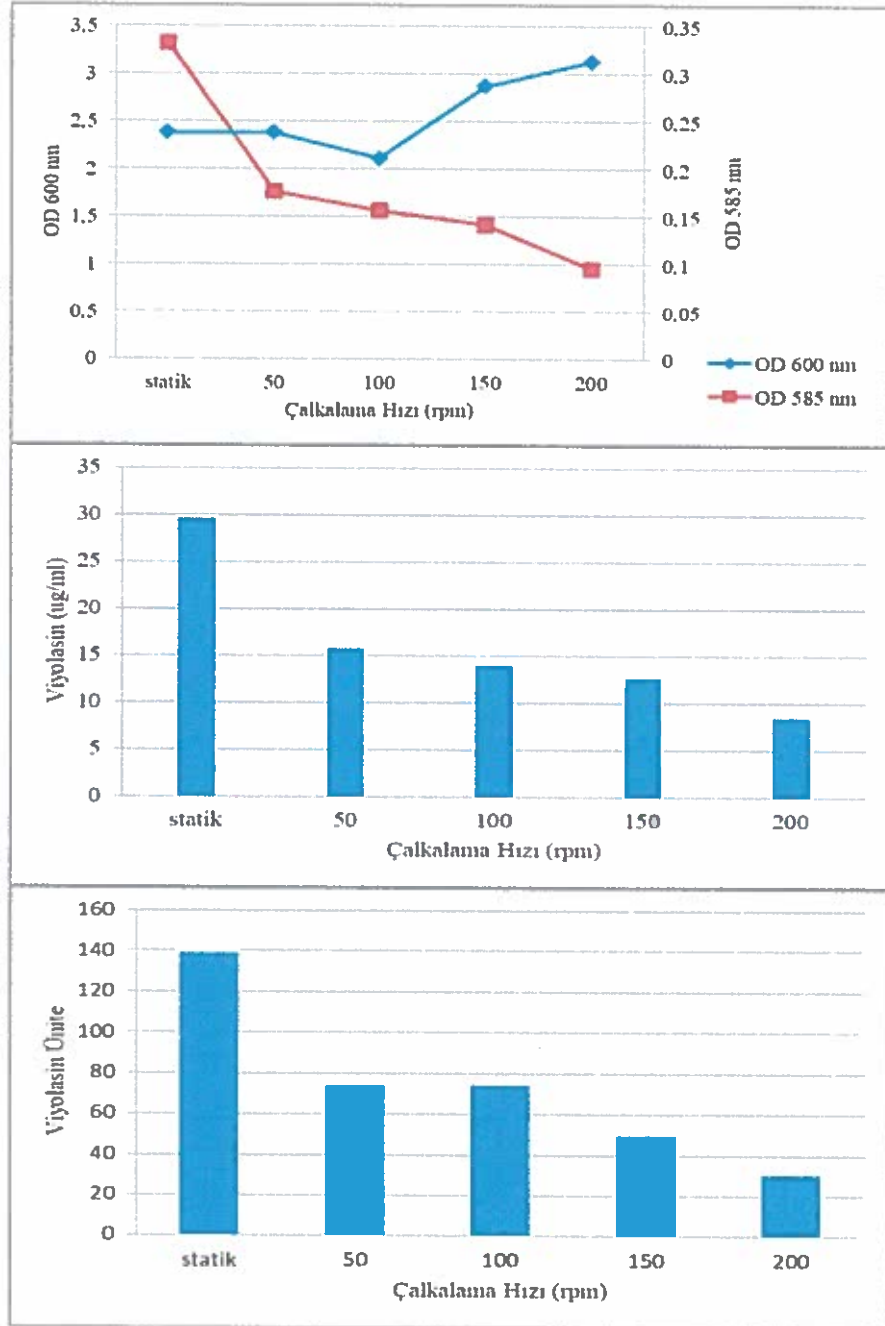
Janthinobacterium lividum GK suşunun viyolasin üretiminde pH'ın etkisi, pH'sı 4-10'a ayarlanmış NB besiyerinde incelenildi. Şekil 4.4'de görüldüğü gibi, viyolasinin optimum üretildiği pH değeri 6,4 olarak bulundu (Şekil 4.4).



Şekil 4. 4. Viyolasin üretimi üzerine pH'nın etkisi

4.4. Viyolasin Üretimi Üzerine Çalkalama Hızının Etkisi

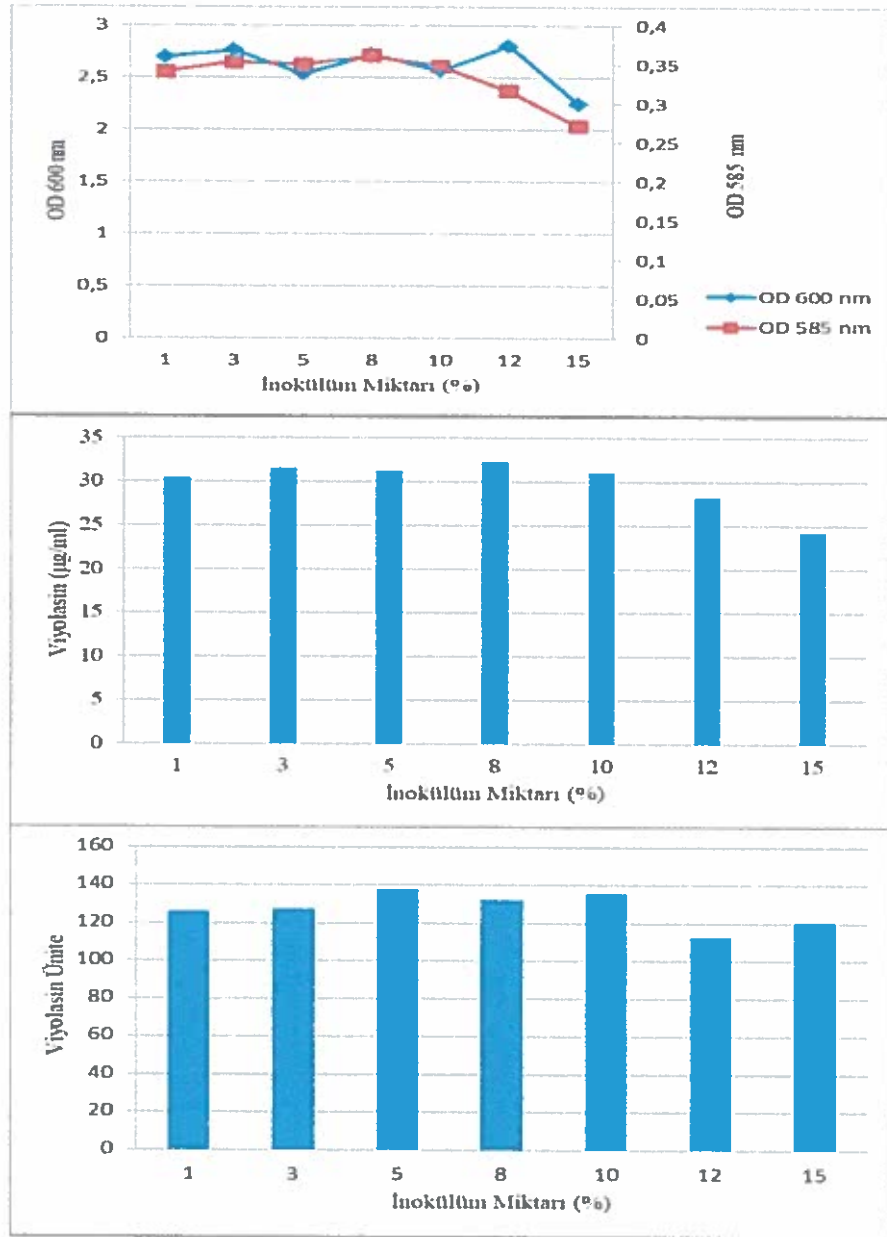
Janthinobacterium lividum GK suşunun viyolasin üretimi üzerine çalkalama hızının etkisi incelendiğinde optimum üretimin statik şartlarda olduğu tespit edildi (Şekil 4.5).



Şekil 4. 5. Viyolasin üretimi üzerine çalkalama hızının etkisi

4.5 Viyolasin Üretimi Üzerine İnokülüm Miktarının Etkisi

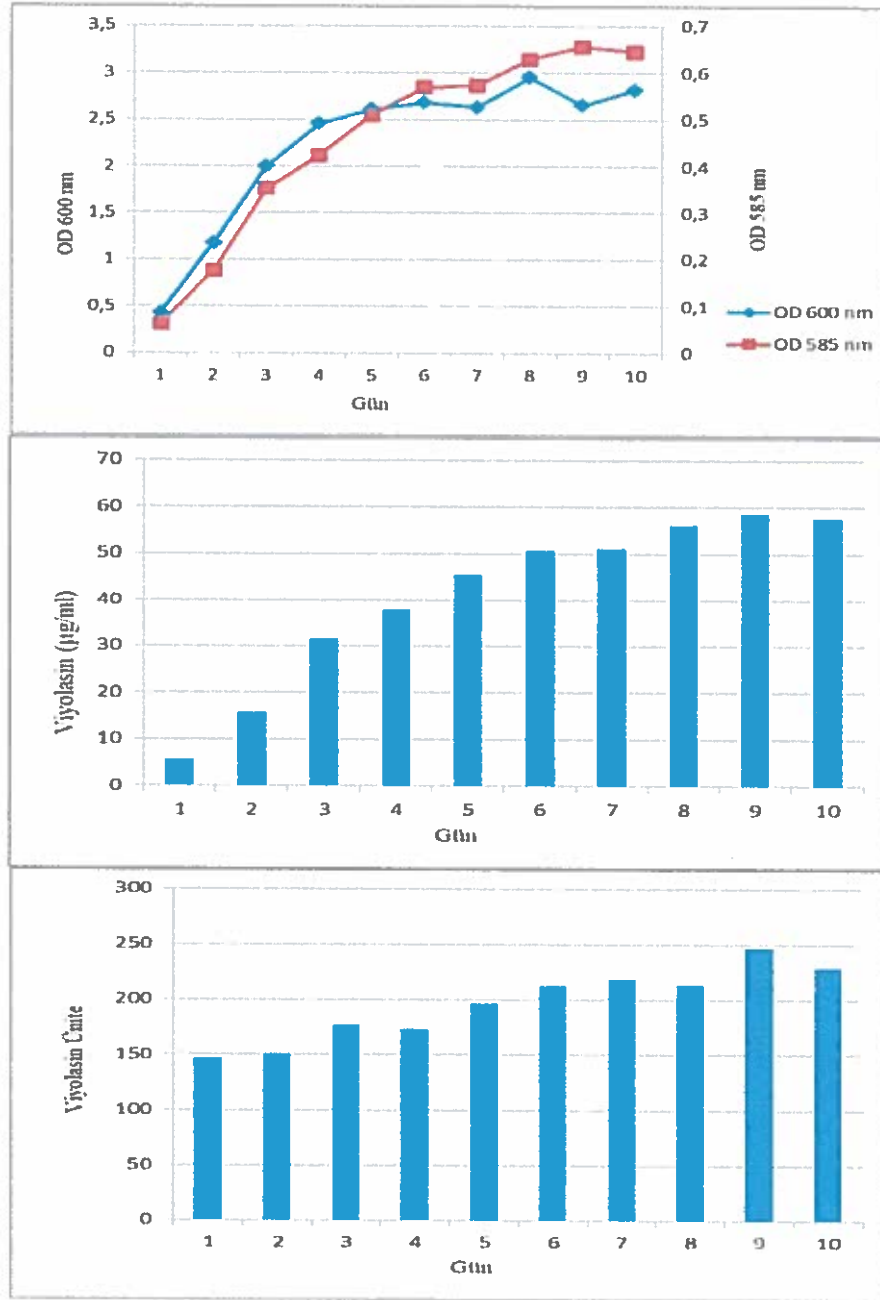
Janthinobacterium lividum GK suşunun viyolasin üretimi üzerine inokülüm miktarı incelendiğinde inokülüm miktarının çok fazla etki etmediği yapılan çalışma sonucu tespit edildi (Şekil 4.6). Viyolasin üretiminde diğerlerine göre %8 inokülüm miktarının biraz daha fazla etkili olduğu bulundu.



Şekil 4. 6. Viyolasin üretimi üzerine inokülüm miktarının etkisi.

4.6. Viyolasin Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Janthinobacterium lividum GK suşunun viyolasin üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisini belirlemek için 10 gün inkübasyona bırakıldı (Şekil 4.7). Deney sonucunda viyolasin üretiminde 2. ve 3. gün arasında diğer günlere göre artış daha fazla olduğu devam eden günlerde de üretimin artarak devam ettiği tespit edildi.

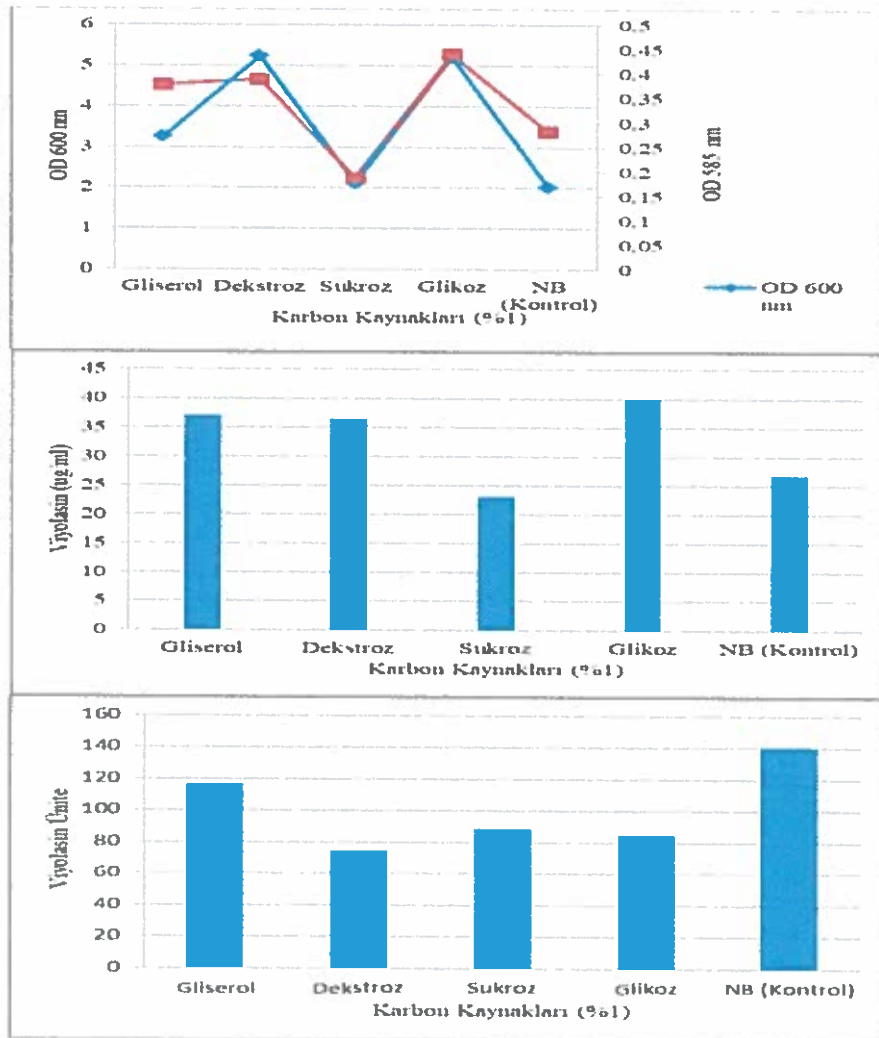


Şekil 4. 7. Viyolasin üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

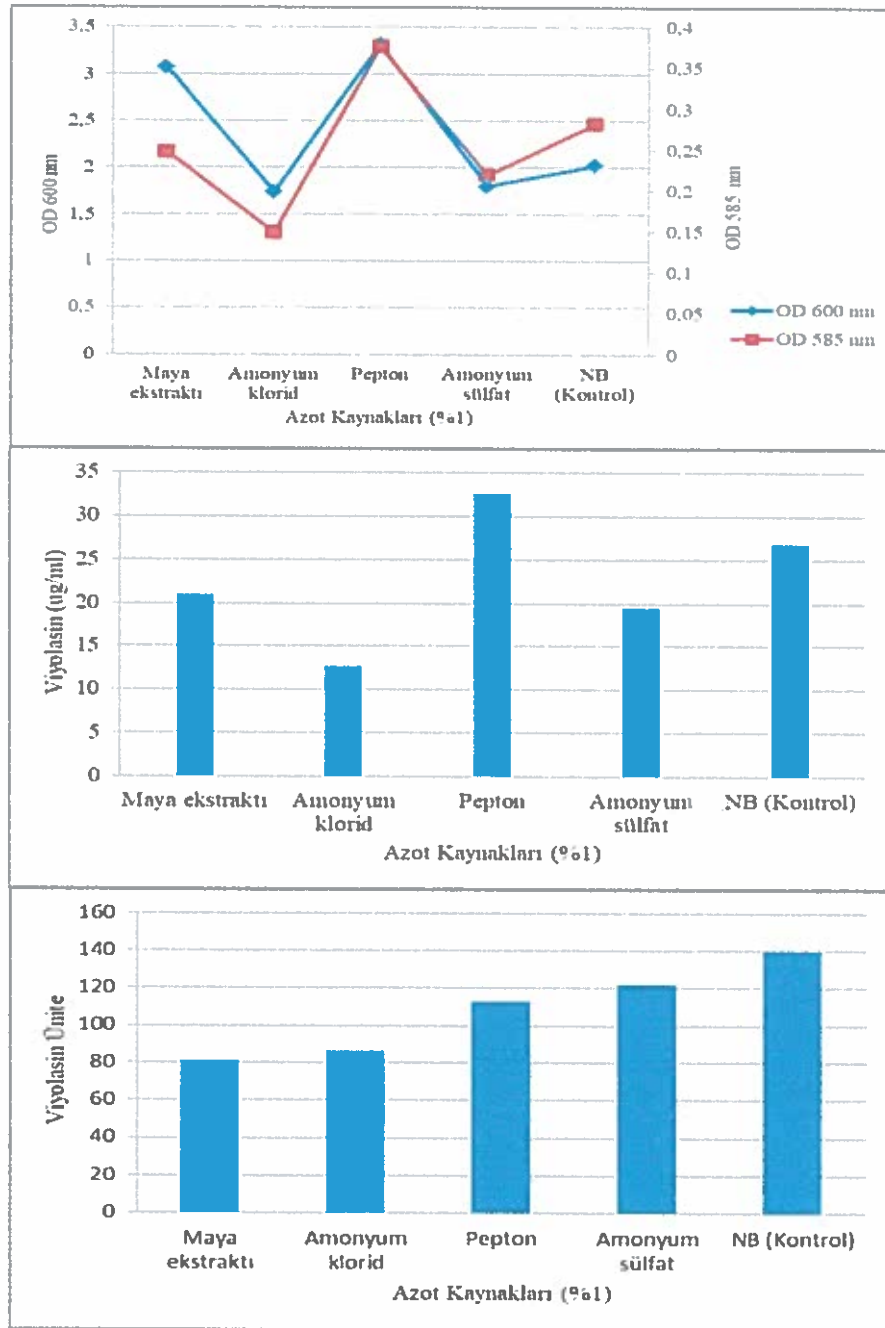
4.7. Viyolasin Üretimi Üzerine Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi

Janthinobacterium lividum GK suşunun viyolasin üretimi üzerine sukroz, glikoz, gliserol ve dekstroza karbon kaynakları ile maya ekstraktı, amonyum sülfat, amonyum klorid ve pepton azot kaynakları %1 oranında NB besiyerine ilave edildi. Karbon kaynaklarından glukoz, azot kaynaklarından pepton içeren ortamların kontrole göre ekstinksiyon katsayısı hesaplamalarına göre daha yüksek viyolasin ürettiği belirlendi (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).

Janthinobacterium lividum GK suşu pepton ve glikoz içeren NB besiyerinde 3 gün inkübe edildikten sonra ölçülen viyolasin miktarı 57 µg/ml olarak tespit edildi.



Şekil 4. 8. Karbon kaynaklarının viyolasin üretimine etkisi

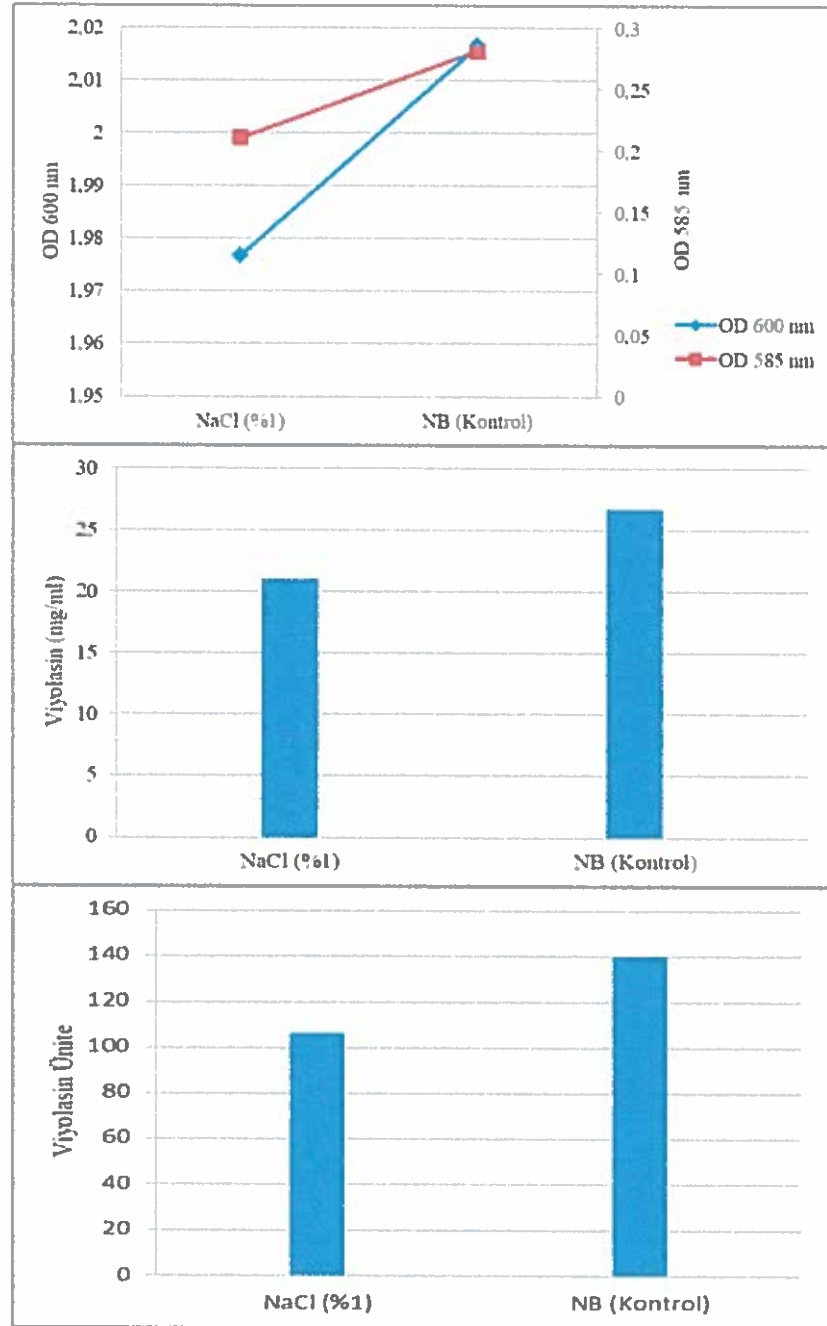


Şekil 4. 9. Azot kaynaklarının viyolasin üretimine etkisi

4.8. Viyolasin Üretimi Üzerine NaCl'nin Etkisi

Janthinobacterium lividum GK suşunun viyolasini üretimi üzerine NaCl'nin etkisini belirlemek için NB besiyerine %1, 2, 4 ve 6 oranlarında NaCl ilave edildi.

%1 NaCl içeren NB besiyerinde viyolasin üretildiği görülürken, %2 NaCl içeren NB besiyerinde bakteri yoğunluğunun az olduğu ve viyolasin üretiminin gerçekleşmediği gözlemlendi (Şekil 4.10). %4 ve üzeri NaCl’de bakteri büyümesi görülmedi.



Şekil 4. 10. Viyolasin üretimine NaCl'nin etkisi

4.9. Viyolasinin Antibakteriyel ve Antifungal Aktiviteleri

Ekstrakt edilen viyolasin örneklerinin antimikrobiyal özellikleri damla difüzyon yöntemi kullanılarak incelendi. *S. aureus*, *B.cereus*, *S. epidermidis* ve *E. faecalis*'e karşı antibakteriyel aktivite tespit edildi (Şekil 4.11). Çalışmada kullanılan test funguslarına karşı aktivite tespit edilemedi. Aktivite ölçümleri mm cinsinden yapıldı (Tablo 4.1).



Şekil 4.11. Viyolasinin damla difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktiviteleri.

Tablo 4. 1. Viyolasinin antimikrobiyal aktiviteleri

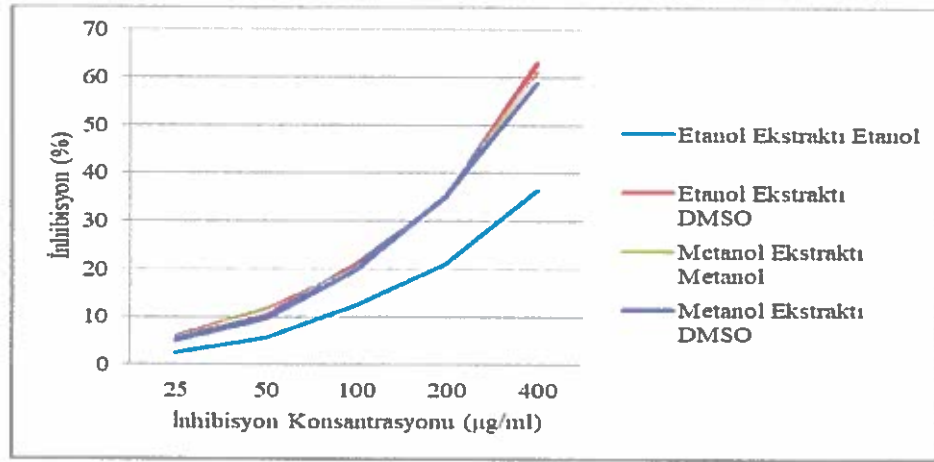
Test Mikroorganizmaları	Etanol Ekstraktı (Çözücü Etanol)	Etanol Ekstraktı (Çözücü DMSO)	Metanol Ekstraktı (Çözücü Metanol)	Metanol Ekstraktı (Çözücü DMSO)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	11	20	16	23
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579T (6A5 ^T)	5	19	2	18
<i>Bacillus cereus</i> 6A2	5	14	5	14
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	15	12	12	17
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	9	17	6	16
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13893	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 43864	-	-	-	-
<i>Fusarium culmorum</i>	-	-	-	-
<i>Fusarium graminearum</i>	-	-	-	-
<i>Fusarium subglutinans</i>	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> FMC1	-	-	-	-
<i>Fusarium culmorum</i>	-	-	-	-

Aktivite ölçümleri mm cinsinden yapılmıştır. -: aktivite yok.

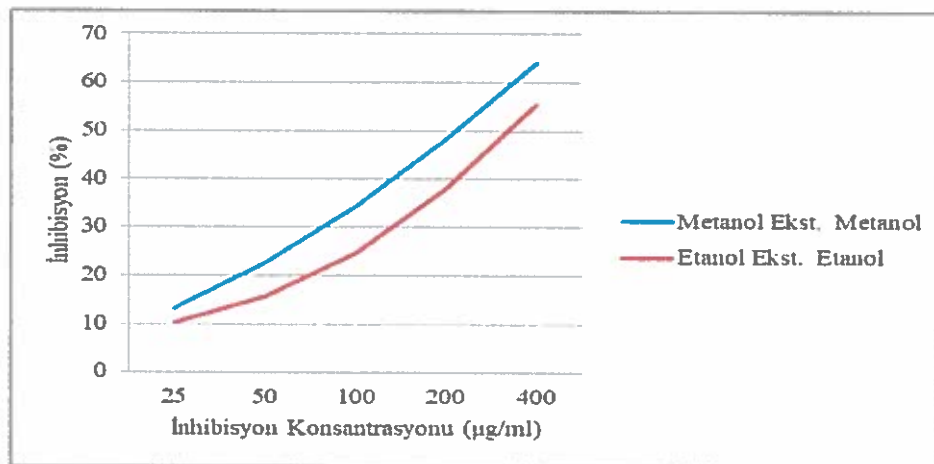
4.10. Viyolasinin Antioksidan Özellikleri

ABTS radikalini süpürücü aktivitesi üzerinde viyolasinin farklı konsantrasyonlardaki ekstraktlarının etkisi Şekil 4.12’de verildi. Buna göre etanol ekstraktının etanol ve DMSO çözücüsünde, metanol ekstraktının metanol ve DMSO çözücüsünde sırasıyla IC_{50} değerleri 541, 307, 315 ve 325 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edildi.

DPPH radikalini süpürücü aktivitesi üzerinde viyolasinin farklı konsantrasyonlardaki ekstraktlarının etkisi şekil 4.13’de verildi. Buna göre etanol ekstraktı etanol çözücüsü ve metanol ekstraktı metanol çözücüsünde uygulanan konsantrasyonlarda sırasıyla IC_{50} değerleri 334 ve 261 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edildi. DMSO çözücülerinde viyolasinin DPPH radikali süpürücü aktivitesi görülmedi.



Şekil 4. 12. Viyolasinin farklı çözümlerdeki ABTS radikalini süpürücü aktivitesi



Şekil 4. 13. Viyolasinin farklı çözümlerdeki DPPH radikalini süpürücü aktivitesi

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında 2015 yılında Giresun ilinin Kümbet Yaylasındaki bir kaplıca suyunun etrafında bulunan çamur örneğinden izole edilen ve 16S rDNA analizi sonuçlarına göre *Janthinobacterium lividum*'a benzediği belirlenen GK suşu kullanılmıştır. Sneath (1984) yaptığı bir çalışmada *Janthinobacterium*'un tipik olarak toprak ve su habitatlarından izole edilen Gram negatif bakteri olduğunu belirtmiştir. Benzer olarak Shivaji ve arkadaşları (1991) yaptıkları bir çalışmada Antarktika Denizi ve Antarktika yarımadasının topraklarından sekiz bakteri izolatının *Janthinobacterium* cinsinin üyeleri olarak tanımlamıştır. Aynı zamanda çeşitli araştırmacılar *Janthinobacterium lividum* suşlarını mantarlara direnç gösteren amfibianların derisi gibi çeşitli ortamlarda (Brucker ve ark., 2008) veya bazı semenderlerin gastrointestinal kanallarında (Wiggins ve ark., 2011) ve sağlıklı insan derisi mikrobiyotasını araştırırken de tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Ahmad ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada NB, LB, TSB ve PGB (pepton glukoz broth) ortamlarının *C. violaceum*'un viyolasin üretimini etkilediğini bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada OD₆₀₀ nm'de hücresel kitle miktarı en fazla LB'de sonra sırasıyla TSB, NB ve PGB'de gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, araştırmacılar viyolasin üretiminin en fazla NB'de en az TSB'de gerçekleştiğini rapor etmişlerdir. Bu durumu, NB'de diğer besiyerine kıyasla daha yüksek konsantrasyonda bulunan pepton ve maya ekstraktı nedeniyle olabileceğini açıklamışlardır. Peptonun, hücresel kitle ve ham viyolasin üretimi üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Mendes ve ark., 2001). Bu sonuçlar GK suşu ile elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmada *Janthinobacterium lividum* GK suşunun viyolasin üretiminin 20-25°C aralığında yüksek olduğu optimum sıcaklığın 22°C olduğu belirlenmiştir. Düşük sıcaklıklarda daha yüksek viyolasin üretimi gerçekleşirken 25°C'nin üstündeki sıcaklıklarda viyolasin üretiminin azaldığı bulunmuştur. Benzer şekilde Baricz ve

arkadaşları (2018) izole ettikleri *Janthinobacterium lividum* suşlarını R2 broth ve NB içeren ortamlarda farklı sıcaklıklarda viyolasin üretimini test etmişlerdir. -5° C'nin altında ve 30 °C'nin üstünde bakteriyel büyümenin gerçekleşmediğini ve en iyi viyolasin üretiminin, 22 °C'de olduğunu bulmuşlardır. Diğer çalışmalarda *Chromobacterium violaceum* BB-78, *C.violaceum* CCT 3496, *Pseudoalteromonas* sp X82144 ve *Duganella* sp. DSM 19531 bakterilerinin sırasıyla optimum 28, 33, 25 ve 20 °C'de viyolasin ürettikleri bildirilmiştir (Riverso ve ark., 1989; Mendes ve ark., 2001; Matz ve ark., 2004; Wang ve ark., 2009).

Janthinobacterium lividum GK suşunun viyolasin üretiminde pH'nın etkisi, NB besiyerinde 4-10 arasında incelenmiştir. Viyolasin üretimi en yüksek pH 6,4 ayarlı NB besiyerinde olduğu bulunmuştur. Asidik ve bazik ortamlarda viyolasin üretiminin azaldığı tespit edilmiştir. Palakurty ve arkadaşları (2016) yaptıkları çalışmada *Chromobacterium violaceum* tarafından viyolasin üretimi için pH'nın etkisini, NB besiyerinde 3 ila 11 arasında incelemiştir. Viyolasin üretiminin pH 7 ila 9 arasında en yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Asidik pH'ta, yani pH 3 ila 6 arasında verimin düşük olduğunu ve alkalın pH'ında viyolasin üretimi için elverişsiz olduğunu bildirmişlerdir. Riveros ve arkadaşları (1989) ve DeMoss ve Evans (1959), pH 7'nin *Chromobacterium violaceum* tarafından viyolasin üretimi için ideal olduğunu belirtmişlerdir. Shivaji ve arkadaşları (1991) Antarktikadan izole ettikleri 8 *J. lividum* suşunun pH 4 ile 9 arasında büyüebildiği ve optimum büyümenin pH 6.8 de olduğunu bildirmişlerdir. Gillis ve Logan (2015) yaptıkları çalışmada kullandıkları tipik veya atipik *J. lividum* suşlarının, optimum pH 7-8 de büyüebildiğini bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada ise Vishnu ve Palaniswamy (2017) tarafından *Chromobacterium vacinii*'nin pH 6.5'te maksimum viyolasin ürettiğini belirlemişlerdir.

Çalkalama hızı, fermentasyon işleminde çok önemli bir faktördür, çünkü yetiştirme ortamında çözünmüş oksijen miktarını arttıracaktır (Purwanto ve ark., 2009). Vishnu ve Palaniswamy (2017) yaptıkları çalışmada *C. vacinii* CV5'in statik koşullara (2421 µg/L) kıyasla, çalkalama (150 rpm) koşullarında (2720 µg/L) büyüme ve pigmentte artış olduğunu tespit etmişlerdir. Maksimum büyüme ve pigment ekstraksiyonunun çalkalama koşullarında 150 rpm'de elde edilebileceğini ve 150

rpm'den sonra çalkalama hızının artmasıyla pigment üretiminin azalacağını bildirmişlerdir. Yang ve arkadaşları (2007) *Pseudoalteromonas luteoviolacea*'da çalkalama hızının viyolasin üretimi üzerindeki etkisini araştırmışlar ve çalkalamanın *P. luteoviolacea* tarafından üretilen viyolasin üretimini etkileyen bakteriyel hücrelerin birikmesini etkilediği sonucuna varmışlardır. Çalışmalarında, viyolasin üretimi 120 rpm'de en yüksek ve çalkalama hızının artmasıyla üretimin azaldığını tespit etmişlerdir. *Janthinobacterium lividum* GK suşunun viyolasin üretimi üzerine çalkalama hızının etkisi incelendiğinde en yüksek üretimin statikte olduğu tespit edilmiştir. Artan çalkalama hızı ile birlikte pigment üretiminin azaldığı tespit edilmiştir. Wu ve arkadaşlarına (2002) göre işlemler arasındaki pigment üretiminde farklılıkların, farklı yetiştirme koşullarına cevap olarak morfolojik değişiklikler nedeniyle olabileceğini bildirmişlerdir. Kültür sıvısının çalkalama hızının, hücre duvarının yırtılması, filamentli mikroorganizmaların morfolojisindeki değişiklik, büyüme hızının verimliliğindeki ve ayrıca arzu edilen ürünlerin oluşum oranındaki farklılıklar dahil olmak üzere mikroorganizmalar üzerinde çeşitli etkilere sahip olduğunu açıklamışlardır.

Wang ve arkadaşları (2009) ve Aranda ve arkadaşları (2011) inokülüm seviyesinin, viyolasin üretimi üzerinde önemli bir etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Palakurty ve arkadaşları (2016) inokülüm seviyesinin etkisini, konsantrasyonu %1 ila %9 arasında değiştirerek incelemişlerdir. İnokülüm seviyesinin viyolasin üretiminde %3 konsantrasyona kadar önemli bir artış sağladığını tespit etmişlerdir. %3'ten daha fazla inokulum seviyelerinin eklenmesi, diğer parametrelere göre sınırlamalar nedeniyle olabilecek viyolasin üretimine fazla katkıda bulunmadığını bu nedenle %3 inokulum seviyesinin viyolasin üretimi için optimal olduğu düşündüklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise *Janthinobacterium lividum* GK suşunun viyolasin üretimi üzerine inokülüm miktarı incelendiğinde inokülüm miktarının çok fazla etki etmediği yapılan çalışma sonucu tespit edilmiştir. Viyolasin üretimi üzerine en fazla etkinin %3 ile %8 konsantrasyon aralığında olduğu, %8 den fazla inokülüm miktarının viyolasin üretimini biraz azalttığı bulunmuştur. Benzer şekilde Vishnu ve Palaniswamy (2017) yaptıkları çalışmada %8 inokulumun, *C. vaccinii*'de maksimum pigment üretimi sağladığını belirlemişlerdir. Babitha ve arkadaşları (2007) yüksek inokülüm miktarının biyokütleği arttırmakta, ancak kültür ortamının kritik bileşenlerinin artan

bakteriyel biyokütle tarafından inhibe edilmesinden dolayı pigment üretimini azalttığını bildirmişlerdir. Kashyap ve arkadaşları (2002) daha düşük inokulum boyutu, hücrelerin substrattan yararlanmak ve metabolitleri üretmek için yeterli sayıda çoğalması için daha uzun zaman gerektirdiğini, proliferatif biyokütle ve mevcut besin arasındaki dengenin metabolit sentezinin maksimum olacağı bir optimum sonuç verdiğini belirtmişlerdir.

Janthinobacterium lividum GK suşunun viyolasin üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisini belirlemek için 10 gün inkübasyona bırakılmıştır. Deney sonucunda viyolasin üretiminde 3. günde önemli bir artış gerçekleştiği, devam eden günlerde de ortamdaki viyolasin miktarının arttığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde Lu ve arkadaşları (2009), yaptıkları çalışmada toplam kültür süresinin 9 gün olduğunda, son hücre konsantrasyonu, bütün deneylerde neredeyse aynı olduğunu ve pigment içeriğinin de geri kazanılabildiğini rapor etmişlerdir. Vishnu ve Palaniswamy (2017) inkübasyon süresinin, maksimum pigment üretiminde önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada viyolasin üretiminde inkübasyon süresinin *C. vaccinii* CV5 ile etkisi 12 saatlik bir aralıkta incelemişlerdir. Pigment üretiminin en düşük 12 saatlik inkübasyonda, en fazla 72 saatlik inkübasyonda görüldüğünü ve 72 saatten sonra üretimin azaldığını tespit etmişlerdir. Wang ve arkadaşları (2009) çalışma raporlarında maksimum viyolasin üretiminin yeni bir suş *Duganella* sp. B2 tarafından 32. saatte olduğunu bildirmişlerdir. Sivarenjini (2011), *Chromobacterium* sp. tarafından inkübasyonun üçüncü gününde maksimum viyolasin üretimini rapor etmiştir. Mendes ve arkadaşları (2001) en yüksek ham violacein üretiminin, *Chromobacterium violaceum* CCT 3496 ile 36 saat sonra ve sıvı kültürlerde rekombinant *Citrobacter freundii* ATCC 05411 için 40 saat sonra elde edildiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada *Janthinobacterium lividum* GK suşunun viyolasini üretimi üzerine sukroz, glikoz, gliserol ve dekstroz karbon kaynaklarının etkisi çalışılmıştır. En fazla pigment üretimini sağlayan karbon kaynağının glikoz olduğu belirlenmiştir. Glikozdan sonra en fazla üretimi gliserol ve dekstroz ilavesi sağlamıştır. En az viyolasin üretiminin sukroz içeren besiyeri ortamında gerçekleştiği belirlenmiştir. Benzer şekilde Vishnu ve Palaniswamy (2017) yaptıkları çalışmada *Chromobacterium vaccinii* izolatının %2 glikoz içeren besiyeri ortamında optimum

viyolasin üretimi gerçekleştirdiği tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada glikozdan sonra viyolasin üretiminin en fazla olduğu karbon kaynaklarının dekstroz ve gliserol olduğunu sukroz içeren ortamda ise üretimin düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada *Janthinobacterium lividum* GK suşunun viyolasin üretimi üzerine maya ekstraktı, amonyum sülfat, amonyum klorid ve pepton azot kaynaklarının etkisi çalışılmıştır. En fazla pigment üretiminini sağlayan azot kaynağının pepton olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde Vishnu ve Palaniswamy (2017) yaptıkları çalışmada en yüksek viyolasin üretiminin sırasıyla en fazla triptofan, maya ekstraktı ve pepton içeren ortamlarda gerçekleştiğini, amonyum klorid ve amonyum sülfat içeren ortamlarda pigment üretiminin düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada %1 NaCl içeren besiyeri ortamında viyolasin üretimi kontrole göre daha az elde edilmiştir.

Bu çalışmada *Janthinobacterium lividum* GK suşundan elde edilen viyolasinin antimikrobiyal aktivitesi, damla difüzyon yöntemine göre seçilen bakteri suşlarına karşı test edilmiştir. Uygulanan konsantrasyonda farklı çözücülerde elde edilen ekstrakt *S. aureus*, *B.cereus*, *S. epidermidis* ve *E. faecalis*'e karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir. Cazoto ve arkadaşları (2011), sığır mastitinden izole edilen *Staphylococcus aureus*'a karşı viyolasinin antibakteriyel etkinliğini bildirmişlerdir. Periz (2016) yaptığı bir çalışmada viyolasinin *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini bildirmiştir. Nakamura ve arkadaşları (2002) ayrıca viyolasinin *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel aktivitesini bildirmişlerdir. Test edilen funguslara karşı antifungal aktivite bulunmamıştır.

Viyolasin izolasyonu ve biyokimyasal karakterizasyon çalışmaları 1958 yılında başlamıştır ve 1984 yılında spektroskopik olarak analiz edilmiştir. Viyolasinin birçok özelliğinin yanı sıra antioksidan özelliği de göstermektedir (Konzen ve ark., 2006). Günümüzde, çeşitli biyolojik uygulamalar ve farmasötik endüstrilerde doğal bileşikler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Çoğu, güçlü antioksidan aktiviteye sahiptir. Antioksidan, oksidatif stres nedeniyle hücreyi ve hücre hasarını koruma kapasitesine sahiptir. Oksidatif stres, tümörler, malignite, amfizem, karaciğer sirozu, ateroskleroz

ve birçok artrit gibi hastalıkların hepsi oksidatif hasarlarla klinik olarak ilişkilidir (Nithiya ve ark., 2011). DPPH radikali süpürme işlemi, bileşiğin in vitro antioksidan kapasitesini analiz etmek için hızlı, uygun maliyetli ve doğru bir testtir (Koleva ve ark., 2002; Suresh ve ark., 2008). Bu çalışmada viyolasinin antioksidan aktivitesi DPPH ve ABTS metotları kullanılarak yapılmıştır. ABTS radikal süpürme aktivite sonuçlarına göre etanol ekstraktının etanol ve DMSO çözücüsünde, metanol ekstraktının metanol ve DMSO çözücüsünde sırasıyla IC₅₀ değerleri 541, 307, 315 ve 325 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ABTS radikal süpürme aktivitesi viyolasin konsantrasyonu ile doğrudan orantılı olduğunu ortaya koymaktadır. DPPH radikal süpürme aktivite sonuçlarına göre etanol ekstraktının etanol çözücüsü ve metanol ekstraktının metanol çözücüsünde sırasıyla IC₅₀ değerleri 334 ve 261 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Vishnu ve Palaniswamy (2018) yaptıkları bir çalışmada *Chromobacterium vaccinii*'den elde ettikleri viyolasinin DPPH IC₅₀ değerini 297,88 µg/mL olarak bulmuşlardır. Bu çalışma, yeni bir antioksidan kaynağı olarak kullanılabilecek *Janthinobacterium lividum* GK tarafından üretilen viyolasin umut verici doğal mikrobiyal renklendiricilerden biri olabilecektir. İn vitro test koşulunda pigment etkili bir şekilde serbest radikalleri temizledi. Bu nedenle, viyolasin gıda ve farmasötik uygulamalarda kullanım için potansiyel bir kaynak olabilir.

Sonuç olarak, *Janthinobacterium lividum* GK suşundan elde edilen viyolasinin üretim optimum şartları 22 °C'de, NB besiyerinde, pH 6,4 de, statik şartlarda, %1 glikoz ve pepton varlığında, %8 inokülümde ve inkübasyon süresi ile doğru orantılı olarak arttığı bulundu. Viyolasinden elde edilen ekstraktların *S. aureus*, *B. cereus*, *S. epidermidis* ve *E. faecalis*'e karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edildi. Antioksidan çalışmalarında metanol ekstraktı metanol çözücüsünde IC₅₀ konsantrasyonu 261 µg/ml olarak bulundu.

KAYNAKLAR

- Aberoumand, A. 2011. A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. *World J. Dairy Food Sci*, 6(1):71–78.
- Aguilar, C., Rodriguez, R., Martinez, C., Montanez, J., Hernandez, A. 2014. Carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* YB-252 in solid-state fermentation. *Food Bioscience*, 7: 31-36.
- Ahmad, A.S., Ahmad, W.Y.W., Zakaria, Z.K., Yusof, N.Z. 2012. Applications of bacterial pigments as colorant. The Malaysian perspective, *Springer Briefs in Molecular Science*, New York, USA, 7.
- Alihosseini, F., Ju, K.S., Lango, J. 2008. Antibacterial colorants: characterization of prodiginines and their applications on textile materials. *Biotechnol. Prog*, 24(3): 742–747.
- Anju, S., Nishanth, S.K., Krishnakumar, B., Dileen Kumar, B.S. 2015. Synergistic combination of violacein and azoles that leads to enhanced killing of major human pathogenic dermatophytic fungi *Trichophyton rubrum*. *Front. Cell. Infect. Microbiol*, 5: 57.
- Antonio, R.V., Creczynski-Pasa, T.B. 2004. Genetic analysis of violacein biosynthesis by *Chromobacterium violaceum*. *Genet. Mol. Res*, 3(1): 85–91.
- Aranda S., Montes-Borrego, M., Landa, B.B. 2011. Purple pigmented violacein-producing *Duganella* spp. inhabit the rhizosphere of wild and cultivated olives in Southern Spain. *Microb. Ecol*, 62(2): 446–459.
- Arnao, M.B., Cano, A., Acosta, M. 2001. The Hydrophilic and Lipophilic Contribution to Total Antioxidant Activity. *Food Chemistry*, 73: 239–244.
- August, P., Grossman, T., Minor, C., Draper, M., MacNeil, I., Pemberton, J., Call, K., Holt, D., Osburne, M. 2000. Sequence analysis and functional characterization of the violacein biosynthetic pathway from *Chromobacterium violaceum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*, 2(4): 513–519.
- Avgustin, J.A., Bertok, D.Z., Kostanjsek, R., Avgustin, G. 2013. Isolation and characterization of a novel violacein-like pigment producing psychrotrophic bacterial species *Janthinobacterium svalbardensis* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103(4) : 763–769.
- Babitha, S., Soccol, C.R., Pandey, A. 2007. Solid-state fermentation for the production of Monascus pigments from jackfruit seed. *Biores. Technol*, 98: 1554–1560.

- Banerjee, D., Chatterjee, S., Banerjee, U., Guha, A.K., Ray, L. 2011. Green Pigment from *Bacillus cereus* M116 (MTCC 5521): production parameters and antibacterial activity. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 164(6): 767–779.
- Baricz, A., Teban, A., Chiriac, C.M., Szekeres, E., Farkas, A., Nica, M., Dascălu, A., Opreșan, C., Lavin, P., Coman, C. 2018. Investigating the potential use of an Antarctic variant of *Janthinobacterium lividum* for tackling antimicrobial resistance in a One Health approach. *Scientific Reports*, 8:15272, doi: 10.1038/s41598-018-33691-6
- Bener, M., Özyürek, M., Güclü, K., Apak, R. 2010. Polyphenolic contents of natural dyes produced from industrial plants assayed by HPLC and novel spectrophotometric methods. *Ind. Crop. Prod*, 32(3): 499–506.
- Bergonzini, C. 1881. Um nuovo bacterio colorato, *Ann. Societ{ dei Naturalisti e Matematici di Modena*, 2: 149–158.
- Blosser R.S., Gray, K.M. 2000. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. *J. Microbiol. Methods*, 40(1): 47–55.
- Bridle, P., Timberlake, C.F. 1997. Anthocyanins as natural food colour selected aspects. *Food Chem*, 58: 103–109.
- Bromberg, N., Dreyfuss, J.L., Regatieri, C.V., Palladino, M.V., Durán, N., Nader, H.B., Haun, M., Justo, G.Z. 2010. Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor. *Chemico-Biological Interactions*, 186(1): 43– 52.
- Brucker, R.M., Harris, R.N., Schwantes, C.R., Gallaher, T.N., Flaherty, D.C., Lam, B.A., Minbiole, K.P. 2008. Amphibian chemical defense: antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander. *J Chem Ecol.*, 34: 1422–1429.
- Campàs, C., Dalmau, M., Montaner, B., Barragán, M., Bellosillo, B., Colomer, D., Pons, G., Pérez-Tomás, R., Gil, J. 2003. Prodigiosin induces apoptosis of B and T cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 17(4): 746–750.
- Cao, W., Chen, W., Sun, S., Guo, P., Jirong, S., Tian, C. 2007. Investigating the antioxidant mechanism of violacein by density functional theory method. *J. Mol. Struct. Theochem.*, 817: 1–4.
- Carvalho, D.D., Costa, F.T.M., Duran, N., Haun, M. 2006. Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells. *Toxicology in Vitro*, 20(8): 1514–1521.
- Cazoto, L.L., Martins, D., Ribeiro, M.G., Duran, N., Nakazato, G. 2011. Antibacterial activity of violacein against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *J. Antibiot.*, 64: 395–397.
- Chen, M.T., Tseng, Y.Y. 1989. Efficacy of antimicrobial substances from *Monascus* metabolites on preservation of meat. In: 35. International Congress of Meat Science and Technology, Copenhagen (Denmark)

- Chidambaram, K.V., Zainul, A.Z., Wan, A.A. 2013. Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48(7): 1065–1079.
- Choi, S. Y., Yoon, K. H., Lee, J. I., Mitchell, R. J. 2015. Violacein: Properties and production of a versatile bacterial pigment. *BioMed research international*, DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/465056>
- Choudhari, S.M., Laxmi, A., Singhal, R.S. 2008. Use of metabolic stimulators and inhibitors for enhanced production of B-carotene and lycopene by *Blakeslea trispora* NRRL2895 and 2896. *Bioresource Technolog*, 99: 3166–3173.
- Cristea, D., Vilarem, G. 2006. Improving light fastness of natural dyes on cotton yarn. *Dyes and Pigments*, 70(3): 238–245.
- Dantas, C., Tauler, R., Ferreira, M.M.C. 2013. Exploring in vivo violacein biosynthesis by application of multivariate curve resolution on fused UV–VIS absorption, fluorescence, and liquid chromatography–mass spectrometry data. *Anal. Bioanal. Chem*, 405(4): 1293–1302.
- De Moss, R.D., Happel, M.E. 1959. Nutritional requirements of *Chromobacterium violaceum*. *J. Bacteriol.*, 77:137–141.
- DeMoss, R.D. 1967. Violacein. *Antibiotics*, 2:77–81
- DeMoss, R.D., Evans, N.R. 1960. Incorporation of C¹⁴-labeled substrates into violacein. *J. Bacteriol*, 79: 729–733.
- DeMoss, R.D., Evans, N.R. 1959. Physiological aspects of violacein biosynthesis in non-proliferating cells. *J. Bacteriol*, 78(4): 583–588.
- Drew, S. W., Demain, A. L. 1977. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Annual Review of Microbiology*, 31: 343–356.
- Dufosse, L. 2009. Pigments, microbial. Schaechter, Moselio. *Encyclopedia Microbiol.*, doi: 10.1016/B978-012373944-5.00155-3
- Durán, M., Ponezi, A.N., Faljoni-Alario, A., Teixeira, M.F., Justo, G.Z., Durán, N. 2012. Potential applications of violacein: a microbial pigment. *Medicinal Chemistry Research*, 21(7): 1524–1532.
- Duran, N., Erazo, S., Campos, V. 1983. Bacterial Chemistry-II. Antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. *An. Acad. Bras. Cienc*, 55: 231–234.
- Duran, N., Haun, M. 1997. Production process of preparation and purification of antitumoral 3 [1, 2-dihydro-5-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)-2-oxo-3Hpyrrol-3-ylidene]-1, 3-dihydro-2H-indol-2-one. *Brazilian Patent*, In press. PIBr. 9702918.
- Duran, N., Justo, G.Z., Dur'an, M., Brocchi, M., Cordi, L., Tasic, L., Castro, G.K., Nakazato, G. 2016. Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein – its main secondary metabolite: a review. *Biotechnol. Adv*, 34(5): 1030–1045.
- Duran, N., Justo, Z.J., Ferreira, C.V., Melo, P.S., Cordi, L., Martins, D. 2007. Violacin Properties and Biological Activities, In Press. *Biotechnol. Appl. Biochem*, DOI:10.1042/BA20070115

- Duran, N.D., Menck, C.F.M. 2001. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. Crit. Rev. Microbiol, 27(3): 201–222.
- El-Banna, A.A., El-Razek, A.M.A., El-Mahdy, A.R. 2012. Some Factors Affecting the Production of Carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *Glutinis*, Food and Nutrition Sciences, 3:64–71.
- El-Rhman, A.A., El-Banna, A.A., El-Razek, A.M.A., El-Mahdy, A. 2012. Isolation, identification and screening of carotenoid-producing strains of *Rhodotorula glutinis*. Food and Nutrition Sciences, 3(5):627–633.
- Erdal, P., Ökmen, G. 2013. Microbial pigments used in foods. Turkish Journal Of Scientific Reviews, 6(2): 56–68.
- Ferreira, C.V., Bos, C.L., Versteeg, H.H., Justo, G.Z., Durán, N., Peppelenbosch, M.P. 2004. Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. Blood, 104(5):1459–1464.
- Fuhrmann, H., Vallentin, G., Surmann, P., Kaiser, P. 2007. A small-scale method for quantitation of carotenoids in bacteria and yeasts. J. Microbiol. Methods, 70(1): 142–149.
- Gallardo, M.J., Staforelli, J.P., Meza, P., Bordeu, I., Torres, S. 2014. Characterization of *Chromobacterium violaceum* pigment through a hyperspectral imaging system. AMB. Express, 4: 4.
- Gillis, M., Logan, N.A. 2015. Janthinobacterium In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 1–12
- Hakvag, S., Fjaervik, E., Klinkenberg, G., Borgos, S.E., Josefsen, K.D., Ellingsen, T.E., Zotchev, S.B. 2009. Violacein-producing *Collimonas* sp. from the sea surface microlayer of coastal waters in Trøndelag, Norway. Marine Drugs, 7(4): 576–588.
- Hirano, S., Asamizu, S., Onaka, H., Shiro, Y., Nagano, S. 2008. Crystal structure of VioE, a key player in the construction of the molecular skeleton of violacein. J. Biol. Chem, 283(10): 6459–6466.
- Hizbullahi, M.U., Nafi'u, A., Mustapha, G., Hauwa'u, M.M. 2017. Bacterial pigments and its significance. MOJ. Bioequiv. Availab, 4(3):285–288.
- Hoshino, T. 2011. Violacein and related tryptophan metabolites produced by *Chromobacterium violaceum*: biosynthetic mechanism and pathway for construction of violacein core. Appl. Microbiol. Biotechnol, 91(6): 1463–1475.
- Jensen, M.B., López-de-Dicastillo, Bergamo, C.A., Payet, R.M., Liu, X., Konczak, I. 2011. Influence of copigment derived from Tasmanian pepper leaf on Davidson's plum anthocyanins. J. Food. Sci, 76(3):447–453.
- Jiang, P.X., Wang, H.S., Xiao, S., Fang, M.Y., Zhang, R.P., He, S.Y., Lou, K., Xing, X.H. 2012. Pathway redesign for deoxyviolacein biosynthesis in *Citrobacter freundii* and characterization of this pigment. Appl. Microbiol. Biotechnol, 94(6): 1521–1532.

- Joshi, C., Patel, P., Singh, A., Sukhadiya, J., Shah, V., Kothari, V. 2017. Frequency-dependent response of *Chromobacterium violaceum* to sonic stimulation, and altered gene expression associated with enhanced violacein production at 300 Hz. bioRxiv, [http:// dx.doi.org/10.1101/098186](http://dx.doi.org/10.1101/098186).
- Joshi, V.K., Attri, D., Bala, A., Bhushan, S. 2003. Microbial pigments. Ind. Journal of Biotechnolog, 2: 362–369.
- Jude, B.A., Tanner, J., Koko T., McLaughlin, E. C. 2012. Analysis, characterization, and synthesis of violacein from *Janthinobacterium* isolate extracts. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 244.
- Kamla, M., Jayanti, T., Sneha, G. 2012. A review on microbial pigment. Int. J. Microbial. Res. Technol, 1(4):361–365.
- Kashyap, P., Sabu, A., Pandey, A., Szakacs, G. 2002. Extra-cellular L-glutaminase production by *Zygosaccharomyces rouxii* under solid state fermentation. Process Biochemistry, 38: 307– 312.
- Kavak, F. 2006. Making fountain pen ink from logwood (*Alnus glutinosa* L. Gaertn) leaves by extraction method, Gaziosmanpasa University Graduate School of Natural and Applied Science Department of Chemistry Masters Thesis.
- Kim S.J., Shin, S.C., Hong S.G., Lee, Y.M., Lee, H., Lee, J., Choi, I.G., Park, H. 2012. Genome sequence of *Janthinobacterium* sp. strain PAMC 25724, isolated from alpine glacier cryoconite. J. Bacteriol, 194(8): 2096.
- Kim, C., Jung, H., Kim, J.H., Shin, C.S. 2006. Effect of monascus pigment derivatives on the electrophoretic mobility of bacteria, and the cell adsorption and antibacterial activities of pigments. Colloids Surf. B, 47(2): 153–159.
- Kim, H., Han, S.B., Lee, C., Lee, K., Park, S., Kim, Y. 2003. Use of prodigiosin for treating diabetes mellitus. US patent. 6,638,968
- Kim, H.W., Kim, J.B., Cho, S.M., Chung, M.N., Lee, Y.M., Chu S.M., Che, J.H., Kim, S.N., Kim, S.Y., Cho, Y.S., Kim, J.H., Park, H.J., Lee, D.J. 2012. Anthocyanin changes in the Korean purple-fleshed sweet potato, Shinzami, as affected by steaming and baking. Food Chemistry, 130(4): 966–972.
- Kodach, L.L., Bos, C.L., Durán, N., Peppelenbosch, M.P., Ferreira, C.V., Hardwick, J.C. 2006. Synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. Carcinogenesis, 27(3): 508–516.
- Koes, R.E., Quattrocchio, F., Mol, J.N. 1994. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. BioEssays, 16(2): 123–132.
- Koleva, I.I., Van, Beek, T.A., Linse, J.P.H., Groot, A., Evstatieva, L.N. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. Phytochem. Anal, 13: 8–17.
- Kong, J.M., Chia, L.S., Koh, N.K., Chia, T.F., Brouillard, R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry, 64(5): 923–933.

- Konzen, M., De, Marco, D., Cordova, C.A., Vieira, T.O., Antônio, R.V., Creczynski-Pasa, T.B. 2006. Antioxidant properties of violacein: possible relation on its biological function. *Bioor. Med. Chem*, 14(24): 8307–8313.
- Kothari, V., Sakshi, S., Divya, P. 2017. Recent research advances on *Chromobacterium violaceum*. *Asian Pac. J. Trop. Med*, 10(8), 744–752.
- Krishnamurthy, K.V., Siva, R., Senthil, T.K. 2002. Natural dye-yielding plants of Shervaroy Hills of Eastern Ghats. In *Proceedings of National Seminar on the Conservation of the Eastern Ghats*, Tirupathi, Andra Pardesh, 151–153.
- Kumar, A., Vishwakarma, H.S., Singh, J., Dwivedi, S., Kumar, M. 2015. Microbial Pigments: Production and Their Applications in Various Industries. *IJPCBS*, 5(1): 203–212.
- Kuo, Y.H., Hsu, H.C., Chen, Y.C., Liang, T.W., Wang, S.L. 2012. A Novel Compound with Antioxidant Activity Produced by *Serratia ureilytica* TKU013. *J. Agric. Food. Chem*, 60: 9043–9047.
- Laatsch, H., Thomson, R.H. 1984. Spectroscopic properties of violacein and related compound: crystal structure of tetramethylviolacein. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. II*, 1331–1339
- Lee, Y.R., Robert, J., Whang, M., Whang, K.S. 2016. Isolation and characterization of antifungal violacein producing bacterium *Collimonas* sp. DEC-B5. *Korean J. Microbiol*, 52(2): 212–219.
- Li, W. J., Zhang, Y. Q., Park, D. J., Li, C. T., Xu, L. H., Kim, C. J., Jiang, C. L. 2004. *Duganella violaceinigra* sp. nov., a novel mesophilic bacterium isolated from forest soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 54 (5): 1811–1814.
- Libkind, D., Brizzio, S., Van, Broock, M. 2004. *Rhodotorula mucilaginosa*, a carotenoid producing yeast strain from a Patagonian highaltitude lake. *Folia Microbiol*, 49(1): 19–25.
- Lichstein, H.C., Van De Sand, V.F. 1946. The antibiotic activity of violacein, prodigiosin, and phthiocol. *J Bacteriol.*, 52(1): 145.
- Lopes, S.C.P., Blanco, Y.C., Justa, G.Z., Nogueira, P.A., Rodrigues, F.L.S., Goelnitz, U., Wunderlich, G., Bracchi, M., Duran, N., Costa, F.T.M. 2009. Violacein Extracted from *Chromobacterium violaceum* Inhibits Plasmodium Growth In Vitro and In Vivo. *Antimicrob. Agents Chemother*, In Press., DOI: 10.1128/AAC.00693-08.
- Lu, Y., L. Wang, Y., Xue, Y., Zhang, C., Xing, X.H., Lou, K., Zhang, Z., Li, Y., Zhang, G., Bi, J., Su, Z. 2009. Production of violet pigment by a newly isolated psychrotrophic bacterium from a glacier in Xinjiang, China. *Biochem. Eng. J*, 43(2): 135–141.
- Mapari, S.A., Nielsen, K.F., Larsen, T.O., Frisvad, J.C., Meyer, A.S., Thrane, U. 2005. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Curr. Opin. in Biotechnol*, 16(2): 231–238.

- Marchal, L., Ungureanu, C., Chirvase, A.A., Foucault, A. 2013. Centrifugal partition extraction, a new method for direct metabolites recovery from culture broth: Case study of torularhodin recovery from *Rhodotorula rubra*. *Bioresource Technology*, 132: 406–409.
- Martins, D., Costa, F., Brocchi, M., Duran, N. 2011. Evaluation of the antibacterial activity of poly-(d, l-lactide-co-glycolide) nanoparticles containing violacein. *J Nanopart Res*, 13: 355–363.
- Masuelli, L., Pantanella, F., La Regina, G., Benvenuto, M., Fantini, M., Mattera, R., Di Stefano, E., Mattei, M., Silvestri, R., Schippa, S., Manzari, V., Modesti, A., Bei, R. 2015. Violacein, an indole-derived purple-colored natural pigment produced by *Janthinobacterium lividum*, inhibits the growth of head and neck carcinoma cell lines both in vitro and in vivo. *Tumour Biology*, In Press, 37(3): 3705–3717
- Matz, C., Deines, P., Boenigk, J., Arndt, H., Eberl, L., Kjelleberg, S., Jürgens, K. 2004. Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nano flagellates. *Appl. Environ. Microbiol*, 70(3): 1593–1599.
- Matz, C., Webb, J.S., Schupp, P.J., Phang, S.Y., Penesyan, A., Egan, S., Steinberg, P., Kjelleberg, S. 2008. Marine biofilm bacteria evade eukaryotic predation by targeted chemical defense. *PLoS ONE*, DOI : 10.1371/journal.pone.0002744.
- May, G., Brummer, B., Ott, H. 1991. Treatment of prophylaxis of polio and herpes virus infections—comprises admin. of 3-(1,2-dihydro-5-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)-2-oxo-3Hpyrrole-3-ylidene)-1,3-dihydro-2H-indol-2-one. DE 3935066 Patent
- Mccarthy, S.A, R., Johnson, M., Kakimoto, D., Sakata, T. 1985. Effects of various agents on the pigment (violacein) and antibiotic production of *Alteromonas luteoviolacea*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish*, 51(7): 1115–1121.
- Mehta, T.R., 2012. Effect of Violacein Extracted from Different *Chromobacterium violaceum* Strains on Growth of Cancer Cells. Tennessee State University, M.Sc Thesis.
- Melo, P.S., Justo, G.Z., De Azevedo, M.B.M., Dura'n, N.M., 2003. Violacein and its beta-cyclodextrin complexes induce apoptosis and differentiation in HL60 cells. *Toxicology*, 186: 217–225.
- Melo, P.S., Maria, S.S., Vidal, B.C., Haun, M., Durán, N. 2000. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal*, 36(8): 539–543.
- Mendes, A.S., Carvalho, J.E., Duarte, M.C.T., Dura'n, N., Bruns, R.E. 2001. Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production. *Bacteriology Lett*, 23: 1963–1969.
- Mizuno, W.G., Jezeski, J.J. 1961. Starter metabolism V. The mechanism of acetoin formation as determined with C14-labeled substrates 1, 2. *J Dairy Sci*, 44(4): 579–588.

- Mohana, D.C., Thippeswamy, S., Abhishek, R.U. 2013. Antioxidant, antibacterial, and ultraviolet-protective properties of carotenoids isolated from *Micrococcus* spp. *Radiation Prot Environ*, 36(4):168.
- Mojib, N., Philpott, R., Huang, J.P., Niederweis, M., Bej, A.K. 2010. Antimycobacterial activity of in vitro of pigments isolated from Antarctic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98(4): 531–540.
- Moss, M.O., Ryall, C., Logan, N.A. 1978. The classification and characterization of chromobacteria from a lowland river. *J. Gen. Microbiol*, 105(1): 11–21.
- Nakamura Y, Sawada T, Morita Y, Tamiya, E. 2002. Isolation of a psychrotrophic bacterium from the organic residue of a water tank keeping rainbow trout and antibacterial effect of violet pigment produced from the strain. *Biochem. Eng. J*, 12(1): 79–86.
- Nakamura, A., Magae, J., Tsuji, R.F., Yamasaki, M., Nagai, K. 1989. Suppression of cytotoxic T cell induction in vivo by prodigiosin 25-C. *Transplantation*, 47(6): 1013–6.
- Nakamura, Y., Asada, C., Sawada, T. 2003. Production of antibacterial violet pigment by psychrotropic bacterium RT102 strain. *Biotechnol. Bioprocess Eng*, 8(1): 37–40.
- Nakashima, T., Kurachi, M., Kato, Y., Yamaguchi, K., Oda, T. 2005. Characterization of bacterium isolated from the sediment at coastal area of omura bay in Japan and several biological activities of pigment produced by this isolate. *Microbiol. Immunol*, 49(5): 407–415.
- Nakata, H., Yamauchi, T., Fujisawa, H. 1979. Phenylalanine Hydroxylase From *Chromobacterium violaceum*. Purification and characterization. *J. Biol. Chem*, 254(6): 1829–33.
- Nithiya, S., Karthik, N., Jayabharathi, J. 2011. In vitro antioxidant activity of hindered piperidone derivatives. *Int. J. Pharm. Pharmsci*, 3: 254–256.
- Palukurty, M.A., Pyla, S.P., Silarapu, S., Somalanka, S.R. 2016. Analyzing Alternative Nutrient Supplements and Optimization of Production Parameters for Violacein using Central Composite Design. *IJSER*, 7(7): 294.
- Pantanella, F., Berlutti, F., Passariello, C., Sarli, S., Morea, C., Schippa, S. 2007. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *J. Appl. Microbiol*, 102(4): 992–999.
- Parajó, J.C., Santos, V., Vázquez, M. 1998. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose, *Process Biochemistry*, 33(2): 181–187.
- Parekh, S., Vinci, V.A., Strobel R.J. 2000. Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 54(3): 287–301.
- Parmar, M., Phutela, U.G. 2015. Biocolors: The New Generation Additives. *Int. J. Cur. Microbiol. App. Sci*, 4(7): 688–694.

- Patel, P., Ali, A.K., Nair, Nishith, N., Kothari, V. 2015. In vitro Antibacterial Activity of *Manilkara hexandra* (Sapotaceae) Seed Extracts and Violacein against Multidrug Resistant *Streptococcus mutans*. JNR, 15(1): 2320–3358.
- Periz, Ç.D. 2016. *Chromobacterium Violaceum* Atcc 12472 Suşundan Viyolasin Ekstraksiyonu Ve Viyolasinin Antibakteriyel Ve Antikanser Özelliklerinin İncelenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD, Yüksek Lisans Tezi
- Purwanto, L.A., Ibrahim, D., Sudrajat, H. 2009. Effect of agitation speed on morphological changes in *Aspergillus niger* hyphae during production of tannase. WJAC, 4(1): 34–38.
- Radjasa, O.K., Limantara, L., Sabdon, A. 2009. Antibacterial activity of a pigment producing-bacterium associated with *Halimeda* sp. from eland-locked marine lake kakaban. Indonesia. J. Coast. Dev, 12(2): 100–104
- Raisainen, R., Nousiainen, P., Hynninen, P.H. 2002. Dermorubin and 5-chlorodermorubin natural anthraquinone carboxylic acids as dyes for wool. Textile Research Journal, 72(11): 973–976.
- Rashid, M., Fakruddin, M., Mazumdar, R.M., Kaniz, F., Chowdhury, M. 2014. Antibacterial activity of pigments isolated from pigmentforming soil bacteria. Environmental Pollution, 53, 54
- Rettori, D. 1996. Production, Extraction and Purification of Violacein: An Antibiotic Produced by *Chromobacterium violaceum*. Chemistry Institute, Universidade Estadual de Campinas, M.Sc. Thesis.
- Richard, C. 1993. *Chromobacterium violaceum*, opportunist pathogenic bacteria in tropical and subtropical regions. Le Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 86(3): 169–173.
- Riveros, R., Huan, M., Duran, N. 1989. Effect of growth conditions on production of violacein by *Chromobacterium violaceum* (BB-78 strain). Braz. Journal of Med. Biol. Resources, 22(5): 569–577.
- Rymbai, H., Sharma, R.R., Srivastav, M. 2011. Biocolorants and its implications in health and food Industry - A Review. Int. J. Pharm.Tech. Res, 3(4).
- Sakaki, H., Nochi, H., Komemushi, S., Miki, W. 2002. Effect of active oxygen species on the productivity of torularhodin by *Rhodotorula glutinis* No. 21. J. Biosci. Bioeng, 93(3): 338–340.
- Sánchez, C., Braña, A.F., Méndez, C., Salas, J.A. 2006. Reevaluation of the violacein biosynthetic pathway and its relationship to indolocarbazole biosynthesis. Chem. BioChem., 7(8): 1231–1240.
- Sasidharan, A., Sasidharan, N.K., Amma, D.B.M.S., Vasu, R.K., Nataraja A.V., Bhaskaran, K. 2015. Antifungal activity of violacein purified from a novel strain of *Chromobacterium* sp. NIIST (MTCC 5522). J Microbiol, 10: 694–701.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. J. Agric. Food Chem, 40: 945–948.

- Shirata, A., Tsukamoto, T., Kato, H., Hata, T., Yasui, T., Kojima, A. 1998. Blue purple pigment manufacture with microorganism and applications of the pigment. Jpn Kokai Tokkyo Koho, JP 10113169 A
- Shirata, A., Tsukamoto, T., Yasui, H., Hata, T., Hasayaka, S., Kojima, A., Kato, H. 2000. Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing. Jpn. Agric. Res. Q, 34(2): 131–140.
- Shivaji, S., Ray, M.K., Seshu, K.G., Reddy, G.S.N., Saisree, L., Wynn-Williams D.D. 1991. Identification of *Janthinobacterium lividum* from the soils of the islands of Scotia Ridge and from Antarctic Peninsula. Polar Biology, 11:267–271.
- Simova, E.D., Frengova, G.I., Beshkova, D.M. 2004. Synthesis of carotenoids by *Rhodotorula rubra* GED8 co-cultured with yogurt starter cultures in whey ultrafiltrate. J. Ind. Microbiol. Biotechnol, 31: 115–121.
- Sivarenjini, G. 2011. Production of violacein by a newly isolated bacterium *Chromobacterium* sp JC1 (dissertation) Jawaharlal Nehru Technological University; 2011. <http://hdl.handle.net/10603/4573>
- Sneath, P.H.A. 1984. Genus *Janthinobacterium*. In N.R. Krieg and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology. The Williams and Wilkins Co, Baltimore, 3: 376–377.
- Soliev, A.B., Hosokawa, K., Enomoto, K. 2011. Bioactive pigments from marine bacteria: applications and physiological roles. Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine, <http://dx.doi.org/10.1155/2011/670349>
- Souza, D. A.O., Aily, D.C.G., Sato, D.N., Duran, N.A. 1999. Atividade da violaceina in vitro sobre o *Mycobacterium tuberculosis* H37RA. Revista do Instituto Adolfo Lutz, 58: 59–62.
- Sözübatmaz, B. 2005. Antimicrobial effects of carotenoids extracted from *Rhodotorula glutinis*. Department of Food Engineering Institute of Natural and Applied Science University of Çukurova, Adana, Turkey, MSc Thesis.
- Suresh, P.K., Sucheta, S., Sudarshana, V.D., Selvamani, P., Latha, S. 2008. Antioxidant activity in some selected Indian medicinal plants. Afr. J. Biotechnol, 7: 1826–1828.
- Suryawanshi, R. K., Patil, C.D., Borase, H.P., Narkhede, C.P., Stevenson, A., Hallsworth, J.E., Patil, S.V. 2014. Towards an understanding of bacterial metabolites prodigiosin and violacein and their potential for use in commercial sunscreens. Int. J. Cosmet. Sci, 37(1): 98–107
- Tan, T.L., Montforts, F.P., Meyer, D. 2002. Microbiological method for the biosynthesis of natural blue-violet colorants violacein and desoxyviolacein. PCT Int. Appl. WO 2002050299 A2
- Tibor, C. 2006. Liquid Chromatography of Natural pigments and synthetic dyes. J. Chromatography Library, 71: 602.
- Tobie, W.C. 1934. The pigment of *Bacillus violaceus* I. The production, extraction, and purification of violacein. J. Bacteriol, 29: 223–227.

- Tokatlı, M., Özçelik, F. 2008. Food colorants production from microbial sources, Turkey 10. Food Congress, Erzurum.
- Türkkan, E. 2007. Antibacterial effects against some pathogen food-borne bacteria of carotenoids extracted from *Rhodotorula glutinis*. Department of Food Engineering Institute of Natural and Applied Science University of Çukurova, Adana, Turkey, MSc Thesis.
- Türkkan, E., Erginkaya, Z. 2008. Antibacterial effects against *Staphylococcus aureus* of carotenoids extracted from *Rhodotorula glutinis*. Turkey 10. Food Congress, Erzurum.
- Umadevi, K., Krishnaveni, M. 2013. Antibacterial activity of pigment produced from *Micrococcus luteus* KF532949. Int. J. Chem. Anal. Sci, 4(3): 149–152.
- Ungureanu, C., Ferdes, M. 2012. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of torularhodin. Adv. Sci. Lett, 18(1): 50–53.
- Ungureanu, C., Ferdes, M., Chirvase, A.A., Mocanu, E. 2011. Method for Torularhodin Separation and Analysis in the Yeast *Rhodotorula rubra* Aerobically Cultivated in Lab Bioreactor, DOI: 10.3303/CET1124158
- Ungureanu, C., Marchal, L., Chirvase, A.A., Foucault, A. 2013. Centrifugal partition extraction, a new method for direct metabolites recovery from culture broth: Case study of torularhodin recovery from *Rhodotorula rubra*. Bioresour technol, 132: 406–409.
- Vasconcelos, A.T.R., De, Almeida, D.F., Hungria, M., Guimarães, C.T., Antˆonio, R.V., Almeida, F.C., et.al. 2003. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(20): 11660–11665.
- Venil, C. K., Aruldass, C. A., Halim, M. H. A., Khasim, A. R., Zakaria, Z. A., Ahmad, W. A. 2015. Spray drying of violet pigment from *Chromobacterium violaceum* UTM 5 and its application in food model systems. Int. Biodeterior. Biodegradation, 102: 324–329.
- Venil, C.K., Lakshmanaperumalsamy, P. 2009. An insightful overview on microbial pigment: prodigiosin. Ele. J. Biol, 5(3): 49–61.
- Venkatasubramanian, S., Vijaeeswarri, J., Anna, Lakshmi, J. 2011. Effective natural dye extraction from different plant materials using ultrasound. Ind. Crops. and Prod, 33(1):116–122.
- Vishnu, T.S., Palaniswamy, M, 2017, Impact Of Various Fermentation Conditions On The Production Of Violacein By The Novel Isolate *Chromobacterium vaccinu*. Int. J. of Pharm. Bio. Sci, 8(3): 514–522.
- Vishnu. T.S., Palaniswamy, M. 2018. Systematic Approach on Evaluating the *in vitro* Antioxidant Activity of Violacein; Novel Isolate *Chromobacterium Vaccinii* CV5. Biomed. Pharmacol. J, 11(2): 703–709.
- Wang, H.S., Jiang P.X, Lu Y., Zhiyong, R., Ruibo, J., Xin-Hui, X., Kai, L., Dong, W. 2009. Optimization of culture conditions for violacein production by a new strain of *Duganella* sp. B2. Biochem. Eng. J, 44(2-3): 119– 124,

- Wang, J., Mazza, G. 2002. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *J. Agric. Food Chem.*, 50(15): 4183–4189.
- Wiggins, P. J., Smith, J.M., Harris, R.N., Minbiole, K.P.C. 2011. Gut of red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*) may serve as a reservoir for an antifungal cutaneous bacterium. *J. Herpetol*, 45(3): 329–32.
- Wissgott, U., Bortlik, K. 1996. Prospects for new natural food colorants, *Trends Food Sci. Technol*, 7: 298–302.
- Wu, W.T., Hsu, Y.L., Ko, Y.F., Yao, L.L. 2002. Effect of shear stress on cultivation of *Bacillus thuringiensis* for thuringiensin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 58: 175–177.
- Xu, P., Rizzoni, E.A., Sul, S.Y., Stephanopoulos, G. 2016. Improving metabolic pathway efficiency by statistical model based multivariate regulatory metabolic engineering (MRME). *ACS Synt. Biol*, 6(1): 148–158.
- Yada, S., Wang, Y., Zou, Y., Nagasaki, K., Hosokawa, K., Osaka, I., Arakawa, R., Enomoto, K. 2007. Isolation and characterization of two groups of novel marine bacteria producing violacein. *Mar. Biotechnol*, 10(2): 128–132.
- Yada, S., Wang, Y., Zou, Y., Nagasaki, K., Hosokawa, K., Osaka, I., Arakawa, R., Enomoto, K. 2008. Isolation and characterization of two groups of novel marine bacteria producing violacein. *Mar. Biotechnol*, 10(2): 128–132.
- Yadav, S.K., Prabha, R. 2014. Extraction of Pigments from *Rhodotorula* Species of Dairy Environmemehnt, *Indian J. Sci. Technol*, 7(12): 1973–1977.
- Yang, L.H., Xiong, H., Lee, O.O., Qi, S.H., Qian, P.Y. 2007. Effect of agitation on violacein production in *Pseudoalteromonas luteoviolacea* isolated from a marine sponge. *Lett. Appl. Microbiol*, 44(6): 625–630.
- Yuodim, K.A., McDonald, J, Kalt W, Joseph, J.A. 2002. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults (small star, filled). *J. Nutr. Biochem*, 13(5): 282–288.
- Yurkov, A.M., Vustin, M.M., Tyaglov, B.V., Maksimova, I.A., Sineokiy, S.P. 2008. Pigmented basidiomycetous yeasts are a promising soruce of carotenoids and ubiquinone Q10. *Microbiology*, 77(1): 1–6.
- Yusof, N.Z. 2008. Isolation and applications of red pigment from *Serratia marcescens*. Faculty of Science Universiti Teknologi Malaysia, Malaysia, MSc Thesis.
- Zhang, X., Enomoto, K. 2011. Characterization of a gene cluster and its putative promoter region for violacein biosynthesis in *Pseudoalteromonas* sp. 520P1. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 90(6): 1963–1971.
- Zimmerman, B., 1881. Review of Bergonzini on *Cromobacterium*. *Botanisches Centralblatt*, 4: 1528–1530.

Zoz, L., Carvalho, J.C., Soccol, V.T., Casagrande, T.C., Cardoso, L. 2015. Torularhodin and Torulene: Bioproduction, Properties and Prospective Applications in Food and Cosmetics - a Review, *Braz. Arch. Biol. Technol*, 58(2): 278–288.

ÖZGEÇMİŞ

Burak KARACA 1990 yılında Bakırköy’de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini İstanbulda tamamladı. 2007 yılında Sağmalcılar Lisesi’nden mezun oldu. 2008 yılında başladığı Giresun Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nü 2012 yılında bitirdi. 2012 yılında Giresun Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 2015 yılında Ahlat Selçuklu Anadolu Lisesine Biyoloji Öğretmeni olarak atandı. 2017 yılından beri Espiye Şehit Cengiz Sarıbaş Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesinde çalışmaktadır. Evli ve bir çocuk babasıdır.