

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM ATCC 12472 SUŞUNDAN
VİYOLASİN EKSTRAKSİYONU VE VİYOLASİNİN
ANTİBAKTERİYEL VE ANTİKANSER ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

Çağdaş Deniz PERİZ

Danışman
Doç. Dr. Seyhan ULUSOY

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2016



© 2016 [Çağdaş Deniz PERİZ]

TEZ ONAYI

Çağdaş Deniz PERİZ tarafından hazırlanan "***Chromobacterium violaceum* ATCC 12472** Suşundan **Viyolasin Ekstraksiyonu ve Viyolasinin Antibakteriyel ve Antikanser Özelliklerinin İncelenmesi**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Doç. Dr. Seyhan ULUSOY
Süleyman Demirel Üniversitesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Gülgün TINAZ
Marmara Üniversitesi

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Hakan KULEAŞAN
Süleyman Demirel Üniversitesi

Enstitü Müdürü Doç.Dr.Yasin TUNCER

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Çağdaş Deniz PERİZ



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	7
2.1.Viyolasin Pigmenti.....	8
2.1.1. Çevreyi algılama sisteminde viyolasinin rolü.....	11
2.2. <i>Chromobacterium violaceum</i> ve Viyolasinin Keşfi	11
2.3. <i>Chromobacterium violaceum</i> 'un Özellikleri	12
2.4. Mikrodalga ve Ultrases Uygulama Ekstraksiyon Yöntemleri	13
3. MATERYAL METOT	15
3.1. Kullanılan Besiyerleri ve Bakteriyel Suşlar	15
3.2. <i>Chromobacterium violaceum</i> 'dan Viyolasin Ekstraksiyonu	15
3.2.1. Ultrases uygulama ile viyolasin ekstraksiyonu	16
3.2.2. Mikrodalga uygulama ile ekstraksiyon yöntemi	17
3.3.Viyolasin Örneklerinin Antibakteriyel Özelliklerinin İncelenmesi	17
3.4. Mikrodalga ve Ultrases Uygulama ile Elde Edilen Ekstraktların Viyolasin ve Deoksiviyolasin Miktarlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Yöntemi ile Belirlenmesi.....	18
3.5. Viyolasin Örneklerinin HeLa Hücreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi.....	19
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	20
4.1. Viyolasin Ekstraksiyonu.....	20
4.1.1. Viyolasinin ultrases uygulama ile ekstraksiyonu	20
4.1.2. Viyolasinin mikrodalga ile ekstraksiyonu.....	22
4.2. Viyolasin Örneklerinin Antibakteriyel Özelliklerinin İncelenmesi	24
4.2.1. Ultrases uygulama ile ekstrakte edilen viyolasin örneklerinin antibakteriyel özelliklerinin incelenmesi.....	25
4.2.2. Mikrodalga yöntemi ile ekstrakte edilen viyolasin örneklerinin antibakteriyel etkilerinin incelenmesi	32
4.3. Viyolasin miktarlarının HPLC ile Belirlenmesi	36
4.4. Viyolasinin HeLa Hücreleri Üzerine Etkileri	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	44
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ.....	56

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 SUŞUNDAN VİYOLASİN EKSTRAKSİYONU VE VİYOLASİNİN ANTİBAKTERİYEL VE ANTİKANSER ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Çağdaş Deniz PERİZ

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Seyhan ULUSOY

Viyolasin, Gram-negatif bakteri *Chromobacterium violaceum* tarafından üretilen, anti-bakteriyel, anti-protozoal, anti-viral, anti-fungal, anti-oksidan ve anti-kanser aktivitelere sahip olan mor renkli doğal bir pigmenttir.

Bu çalışmada viyolasin *C. violaceum* ATCC 12472 suşundan, mikrodalga ve ultrases uygulama yöntemleri kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon için çözücü olarak metanol, etanol, aseton ve etil asetat kullanılmıştır.

Ekstraktlar *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) için antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ekstratların viyolasin miktarları Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile belirlenmiştir.

Etanol ve metanol ekstratlarının HeLa hücreleri üzerinde güçlü sitotoksik etki gösterdikleri tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Viyolasin, *Chromobacterium violaceum*, anti-bakteriyel, anti-kanser, HPLC.

2016, 56 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

AN EXTRACTION OF THE VIOLACEIN FROM *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 STRAIN AND ANTIBACTERIAL AND ANTICANCER ACTIVITY OF VIOLACEIN

Çağdaş Deniz PERİZ

Suleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Seyhan ULUSOY

Violacein is a natural violet pigment from Gram-negative bacteria produced by *Chromobacterium violaceum*, which has an antibacterial, antiprotozoal, antiviral, antifungal, antioxidant and anti-cancer activity.

In this study, violacein was extracted from *C. violaceum* ATCC 12472 strain using microwave and ultrasonic methods. Methanol, ethanol, acetone and ethyl acetate were used as solvents for extraction.

The extracts were found to exert an antibacterial effect against *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 25923 and *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA). Violacein amounts in the extracts were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC).

Ethanol and methanol extracts were revealed to have a strong cytotoxic effect on HeLa cells.

Keywords: Violacein, *Chromobacterium violaceum*, anti-bacterial, anti-cancer, HPLC.

2016, 56 pages

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca, hoş görü ortamı içerisinde, değerli tecrübe ve destekleriyle bana yol gösteren değerli Danışman Hocam Doç. Dr. Seyhan ULUSOY'a saygı ve teşekkürlerimi borç bilirim.

Laboratuar çalışmalarım boyunca Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin imkânlarını kullanmam konusunda desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Gülcan ÖZKAN'a, mikrodalga ekstraksiyon işlemi sırasında desteklerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Erkan KARACABEY'e ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen laboratuar personeli hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Örneklerin antikanser etkisinin incelenmesinde destek olan Prof.Dr. Gülgün TINAZ ve Araştırma Görevlisi Turgut ŞEKERLER hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans çalışma arkadaşım sevgili Ramadan Bilgin AKALIN'a destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

4365-YL1-15 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan değerli aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Çağdaş Deniz PERİZ
ISPARTA, 2016

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Viyolasin'in Kimyasal Yapısı	2
Şekil 2.1. Viyolasin Biyosentesi.....	8
Şekil 3.1. Roche xCELLigence System	19
Şekil 4.1. <i>C. violaceum</i> ATCC 12472 suşunun ürettiği viyolasin pigmentinin sıvı besiyeri içindeki görüntüsü.....	20
Şekil 4.2. Ultrases uygulama yöntemi ile ekstrakte edilen örneklerin 585 nm için ölçülen absorbans değerleri	21
Şekil 4.3. Ekstraksiyon öncesi üretilen <i>C. violaceum</i> ATCC 12472'nin 600 nm için absorbans değerleri.....	22
Şekil 4.4. Mikrodalga ekstraksiyonu ile elde edilen viyolasin örneklerinin 585 nm için absorbans değerleri	23
Şekil 4.5. Ekstraksiyon öncesi üretilen <i>C. violaceum</i> ATCC 12472'nin 600 nm için absorbans değerleri.....	24
Şekil 4.6. Ultrases uygulama ile ekstrakte edilmiş viyolasin örneklerinin <i>S. aureus</i> ATCC 25923 için kuyucuk difüzyon yöntemiyle elde edilmiş inhibisyon zon çapları (mm).....	26
Şekil 4.7. Ultrases uygulama ile ekstrakte edilmiş viyolasin örneklerinin <i>S. aureus</i> ATCC 4300 (MRSA) için kuyucuk difüzyon yöntemiyle elde edilmiş inhibisyon zon çapları (mm)	28
Şekil 4.8. Ultrases uygulama ile ekstrakte edilmiş viyolasin örneklerinin <i>B. cereus</i> ATCC 11778 için kuyucuk difüzyon yöntemiyle elde edilmiş inhibisyon zon çapları (mm)	30
Şekil 4.9. Mikrodalga ile ekstrakte edilmiş viyolasin örneklerinin <i>S. aureus</i> ATCC 25923 için kuyucuk difüzyon yöntemiyle elde edilmiş inhibisyon zon çapları (mm).....	33
Şekil 4.10. Mikrodalga ile ekstrakte edilmiş viyolasin örneklerinin <i>S. aureus</i> ATCC 43300 (MRSA) için kuyucuk difüzyon yöntemiyle elde edilmiş inhibisyon zon çapları (mm)	34
Şekil 4.11. Mikrodalga ile ekstrakte edilmiş viyolasin örneklerinin <i>B. cereus</i> ATCC 11778 için kuyucuk difüzyon yöntemiyle elde edilmiş inhibisyon zon çapları (mm).....	35
Şekil 4.12. Saf viyolasin (1) ve deoksiviyolasin (2) HPLC kromatogramı.	36
Şekil 4.13. Ultrases uygulama ile metanol, etanol, etilasetat ve aseton ekstraktlarına ait HPLC kromatogramı viyolasin 1: Metanol, 2: Aseton, 3: Etanol, 4: Etil asetat ekstraktı; deoksiviyolasin 1a: Metanol, 2a: Aseton, 3a: Etanol, 4a: Etilasetat ekstraktı.	38
Şekil 4.14. Ultrases uygulama ile metanol, etanol, etil asetat ve aseton ekstraktlarına ait mg ekstrakt içinde µg viyolasin (a) ve deoksiviyolasin(b) miktarları.....	39
Şekil 4.15. Mikrodalga uygulaması ile metanol, etanol, etilasetat ve aseton ekstraktlarına ait HPLC kromatogramı viyolasin 1:Metanol, 2: Aseton, 3: Etanol, 4: Etilasetat ekstraktı; deoksiviyolasin 1a:Metanol, 2a: Aseton, 3a: Etanol, 4a: Etil asetat ekstraktı.....	40
Şekil 4.16. Mikrodalga uygulaması ile metanol, etanol, etilasetat ve aseton ekstraktlarına ait mg ekstrakt içinde µg viyolasin (a) ve	

deoksiviyolasin(b) miktarları.....	41
Şekil 4.17. Ultrases uygulama Etanol ekstraktının HeLa hücreleri üzerine etkisi	42
Şekil 4.18. Ultrases uygulama Metanol ekstraktının HeLa hücreleri üzerine etkisi.....	43



ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1. Viyolasin üretebilme yeteneğine sahip olan türlerin lokalitesi.	1
Çizelge 4.1. Ultrases uygulaması ile elde edilen ekstraktların S. aureus ATCC 25923, S. aureus ATCC 43300 ve B. cereus ATCC 11778 için % MİK(hacim/hacim) değerleri.....	31
Çizelge 4.2. Mikrodalga uygulaması ile elde edilen ekstraktların S. aureus ATCC 25923, S. aureus ATCC 43300 ve B. cereus ATCC 11778 için % MİK(hacim/hacim) değerleri.....	35
Çizelge 4.3. Ultrases uygulama ve mikrodalga uygulaması ile metanol, etanol, etilasetat ve aseton ekstraktlarına ait viyolasin ve deoksiviyolasin değerleri (μg viyolasin/mg ekstrakt).....	37



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AHL	Açıl Homoserin Lakton
gHz	Gigahertz
HPLC	Yüksek performanslı Sıvı Kromatografi
kHz	Kilohertz
mg	Miligram
mM	Milimolar
mm	Milimetre
MBK	Minimum bakterisidal konsantrasyon
mHz	Megahertz
MIK	Minimum inhibitör konsantrasyon
nm	Nanometre
OD	Optik Dansite
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre



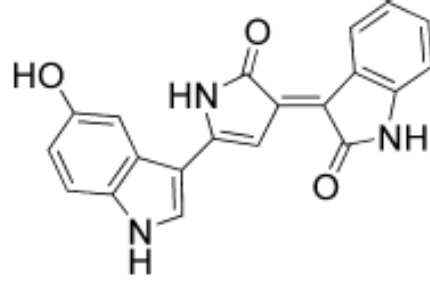
1. GİRİŞ

Viyolasin, *Chromobacterium violaceum* tarafından üretilen ve doğal antibiyotik olarak bilinen mor bir pigmenttir. Bir indol olarak viyolasinin psikrotrofik bakteri RT102, *Janthinobacterium lividum* ve *Alteromonas luteovioacea* denilen suşlarından da değişken verim ve koşullarda üretimi rapor edilmesine rağmen *C. violaceum*'dan üretimi tercih edilmektedir. Bunun sebebi veriminin daha yüksek olmasıdır (Duran vd., 2012; Page, 2015). Bir bisindol olarak viyolasin; *Collimonas sp.*, *Duganella sp.*, *Janthinobacterium sp.*, *Microbulbifer sp.* ve *Pseudoalteromonas sp.* dahil olmak üzere farklı bakteri suşları tarafından da üretilmektedir. Bu viyolasin üreticileri filogenetik olarak çeşitlidir ve izole edilebilecek bir çok kaynakları vardır. Çizelge 1.1'de görüldüğü gibi, bu bakteriler deniz süngerleri yüzeyleri ve zeytin bahçelerinin rizosferinde ve hatta buzullar içinde bulunabilirler (Choi vd., 2015; Sasidharan vd., 2015).

Çizelge 1.1 Viyolasin üretebilme yeteneğine sahip olan türlerin lokalitesi (Choi vd., 2015).

Suş Türü	Lokalitesi
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Göller, Atık Sular, Topraklar
<i>Collimonas sp.</i>	Arktik Kıyı Suları
<i>Duganella sp.</i>	Tarım Toprağı (Zeytin)
<i>D. violaceinigra</i>	Orman Toprağı
<i>Janthinobacterium lividum</i>	Buzullar
<i>J. svalbardensis</i>	Buzullar
<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	Derin Deniz Suları(320m)
<i>P. luteovioacea</i>	Deniz Süngeri Yüzeyi

C. violaceum ATCC 12472 suşunun ürettiği ve indol türevi olan viyolasin pigmenti *vioA*, *vioB*, *vioC*, *vioD* ve *vioE* olarak adlandırılan gen serileri tarafından üretilir. Bir viyolasin zinciri 8 kilo baz (kb)'dır (Harrison ve Ronczka, 2013; Page, 2015). Viyolasin'in kimyasal yapısı Şekil 1.1'de görüldüğü gibidir (Marlon vd., 2006; Dantas vd., 2012; Gallardo vd., 2014).



Şekil 1.1. Violasin'in Kimyasal Yapısı (Marlon vd., 2006)

Viyolasin pigmentinin rapor edilmiş çeşitli biyolojik özellikleri antifungal aktivite, antitümoral aktivite, antiparaziter aktivite, antiprotozoal aktivite, antioksidan aktivite, antiviral aktivite ve antibakteriyel aktivite olarak sayılabilir (Mendes vd., 2001; Duran vd., 2007). Antifungal aktiviteye örnek olarak; meyvelerde beyaz kök çürüklüğü hastalığına karşı uygulanabilirliği ortaya konmuştur. Ayrıca çeşitli bitki ve insan patojeni olan mantar türlerinde de etkilidir (Nakata vd., 1979; Sasidharan vd., 2015). Antiprotozoal aktivitede ise saflaştırılmış viyolasin *Spumella sp.* ve *Ochromonas sp.* gibi silli protozoa türlerinde yüksek oranda toksisite gösterdiği bilinmektedir. Aynı zamanda viyolasin *Trypanosoma cruzi* ve *Leishmania amazonensis*'e karşı antiparaziter aktivite göstermektedir (Lopes vd., 2009).

Viyolasin, biyolojik fonksiyonlarından dolayı önemli bir antioksidan aktiviteye sahiptir. Bakterilerin ürettiği serbest radikallerle reaksiyona girerek hücrelere zarar vermesini önler. Ayrıca viyolasin hepatit-A, adenovirüs, poliovirus, rotavirus, ve herpes virüsüne karşı antiviral aktivite göstermektedir (Rettori 1996; Duran vd., 2007; Günaydın ve Erdem, 2015). Yapılan çeşitli antimikrobiyal testlerde viyolasinin Gram-pozitif bakterilerin büyümesini olağanüstü bir şekilde inhibe etme yeteneğine sahip olduğu görülürken Gram-negatif bakteriler üzerinde oldukça az etkili olmuştur, *Clostridium welchii* adı verilen bakteri haricinde diğer Gram-pozitif bakteriler üzerinde antibakteriyel etkiye sahiptir. Ayrıca *Neisseria meningitidis* dışında kalan diğer Gram-negatif bakterilerin büyümesi üzerinde hafif de olsa inhibisyona neden olduğu rapor edilmiştir (Duran vd., 2007). Ek olarak bir antibiyotik tek başına bakteri

üzerinde etkili olamazken, çeşitli konsantrasyonlarda saf viyolasin eklendikten sonra antibiyotiğin daha etkili sonuçlar ortaya koyduğu tespit edilmiştir (Lopes vd., 2009; Leal vd., 2015). Antitümoral aktiviteye örnek olarak ise; çeşitli kanser hücreleri üzerinde apoptozis yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Viyolasinin insan kolon kanseri, akciğer kanseri, meme kanseri, serviks kanseri, lenfoma ve lösemi hücre hatlarında apoptozise neden olduğu ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine engel olduğu tanımlanmıştır. Ayrıca tümör oluşumunu azaltmada etkili olduğu belirtilmiştir (Melo vd., 2000; Melo vd., 2003; Carvalho vd., 2006; Mehta, 2012; Leal, 2015).

Açıl homoserin lakton (AHL) üretimine bağlı olarak sentezlenen viyolasinin miktarı görsel olarak izlenebilir ve kantitatif olarak ölçülebildiğinden çevreyi algılama sisteminin indirgenmesi yönünde yapılan araştırmalarda kullanılabilir. Çevreyi algılama sistemi, bakteri hücreleri arasındaki iletişimin sinyal molekülleri aracılığıyla düzenlenmesi ve bu sayede bakterilerin antibiyotiklere karşı daha dayanıklı olmasına olanak sağlayan bir sistemdir. Bu sistem bloke edilerek sorun ortadan kaldırılması ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Kodach vd., 2006; Choi vd., 2015).

Endüstriyel uygulama alanları olarak viyolasinin kumaş ve saç boyası üretiminde mikrobisit olarak kullanıldığı belirlenmiştir. Benzer şekilde ipek, pamuk ve yünde bunun yanı sıra naylon yapımında kullanılmaktadır. Sonuç olarak *C. violaceum* metabolitlerinin klinik, endüstriyel ve biyoteknolojik açıdan önemli uygulamalarının olduğu bilinmektedir (Gourson vd., 1999; Duran ve Menck, 2001; Duran vd., 2012; Choi vd., 2015). Viyolasin gibi doğal ürünler gelecek vaat eden farmakolojik aktivitelere sahip tükenmeyen kaynaklar olması açısından da oldukça önemlidir (Rettori ve Duran, 1998).

C. violaceum genellikle tropik ve alt tropik iklimlerde, su ve toprakta bulunan, Gram-negatif, saprofit bir kokobasildir. Glukoz, trehaloz, N-asetil glukosamin ve glukonazı fermente eder. Agar besiyerinde koyu mor metal renkli parlaklığa sahip dışbükey koloniler üretir (Dias vd., 2005).

İlk olarak Brezilya'da Amazon Nehri'nden izole edilmiştir (Lopes vd., 2009). Aerobik ve anaerobik koşullara uyum sağlayabilir. Buda esnek ve verimli bir metabolizmaya sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Aerobik koşullarda enerji elde etmek için Embden-Meyerhoff yolu, trikarboksilik asit yolu ve diğer solunum yolu zincirlerini kullanır (Chong ve Lam, 1997). İnsanlarda ve hayvanlarda fırsatçı patojendir. *C. violaceum* ile enfekte olan bir insanda oluşturduğu enfeksiyon selülit ve cilt apseleriyle başlar ve akciğer, karaciğer ve dalakta olmak üzere çoklu organ apseleriyle devam eder (Moore vd., 2001). İmmün sistemi baskılanmış hastalarda ölümcül enfeksiyonlara neden olduğu ciddi vakaların Arjantin, Avustralya, Brezilya, Küba, Nijerya, Singapur, Tayvan ve Vietnam'da teşhis edildiği belirtilmiştir (Chong ve Lam, 1997; Bilton ve Johnson, 2000).

C. violaceum'un viyolasin üretebilmesi için oksijen ve L-triptofana ihtiyacı olduğunu ve *C. violaceum* anaerobik koşullarda viyolasin üretemediği tespit edilmiştir (Mendes vd., 2001).

C. violaceum ayrıca izonitril bir grup içeren aerosiyanidin, ve *C. violaceum*'un pigmentless süşundan izole edilen aerokavin denilen antibiyotikleri üretmektedir. Bu antibiyotikler Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere karşı (in vitro) antibakteriyel etki göstermektedirler (Parker vd., 1988; Singh vd., 1988; Mehta, 2011).

C. violaceum tarafından doğal olarak üretilen viyolasinin antibakteriyel ve antikanser özelliklerinin olması ve farmakolojik alanda alternatif tedavi yöntemlerine katkıda bulunması açısından oldukça önemlidir. Ancak, viyolasin tarafından uyarılan sitotoksik mekanizmalar halen tam olarak anlaşılammıştır ve bu hücre ölümü mekanizmaları ile ilgili çalışmaların yapılması ve yeni yöntemlerin geliştirilmesi yeni tedavi yaklaşımları ve kullanım alanlarını geliştirmek için yararlı olacağı düşünülmektedir.

Rahman vd., (2015) tarafından yapılan çevreyi algılama sistemi çalışmalarında kullanılmak üzere *Amommum tsao-ko* ekstratını elde edilmek üzere mikrodalga

uygulama yöntemi ile ekstraksiyon tercih edilmiştir. Mikrodalgalar yüksek frekanslı elektromanyetik dalgalardır (300-300000 MHz). Mikrodalga enerji kullanılarak ısıtmanın prensibi, iyonların iletimi ve dipol rotasyonu (dönme) yoluyla molekül üzerine mikrodalga'nın direkt etkisi temeline dayanır. Çoğu uygulamalarda bu iki mekanizma eş zamanlı meydana gelir. Başarılı bir ekstraksiyon gerçekleştirmek için uygun çözücü seçimi çok önemlidir. Ekstraksiyon genellikle kapalı bir kaptaki gerçekleştirilir. Bu durumda basınç artar ve çözücü kaynama noktasından daha yüksek sıcaklıklara kadar ısıtılabilir. Isıtma işlemi 2 dakikadan daha az bir zaman alır. Daha sonra örnek ışınlanır ve genellikle 10-30 dakika aralığında ekstrakte edilir (Büyüktuncel, 2012).

Falleh vd., (2012) tarafından yapılan çalışmada ise *Mesembryanthemum edule* bitkisinin özünü elde etmek için etanol ve metanol kullanılarak ultrases uygulama yöntemi tercih edilmiştir. Ve bu sayede antioksidan özellikleri incelenmiştir. Genel tanımıyla ultrases uygulama, ses dalgalarının saniyede 20.000 veya daha fazla titreşimleri sonucunda üretilen bir enerjidir. Ultrases tekniği, ekstrakt eldesinde, ısısal olmayan etkili bir alternatif metottur. Ultrases uygulama, hücre duvarlarını mekanik olarak parçalar ve materyal aktarımı sağlar. Hücre duvarının yıkılmasıyla hücre içindeki bileşenler, hücre dışına kolayca çıkabilmektedir. Ultrases uygulaması hücre duvarını etkilediğinden, bu yöntemle yapılan ekstraksiyon işlemi diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre daha hızlıdır. Ayrıca ultrases uygulaması ekstraksiyon kinetiğini ve ekstraktın kalitesini de artırır. Diğer yöntemlere göre basit, hızlı, ucuz ve daha verimlidir. Bu yüzden sıkça kullanılan ekstraksiyon yöntemlerinden biridir (Ergün vd., 2013).

Bu çalışma kapsamında *C. violaceum* ATCC 12472 suşundan ultrases ve mikrodalga ekstraksiyon yöntemleri ile viyolasin ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi sırasında etanol, aseton, metanol ve etil asetat kullanılmıştır.

Ekstrakte edilen viyolasin miktarı spektrofotometrik olarak OD 585nm de ölçülerek ppm olarak miktarı belirlenmiştir. Elde edilen viyolasinin *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Bacillus cereus*

ATCC 11778, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 için antibakteriyel ve servikal kanser hücreleri (HeLa) üzerine antikanser özellikleri incelenmiştir.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Uluslararası literatürde viyolasinin farklı özelliklerini konu alan pek çok çalışma mevcuttur. Viyolasinin antibakteriyel etkileri incelendiğinde *C. welchii* haricinde *B. subtilis*, *B. megaterium*, *S. aureus* ATCC 29213, ATCC 25923, ve ATCC 43300 gibi Gram-pozitif bakterilere karşı antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir. Yine viyolasinin *Neisseria meningitidis* haricinde *Flavobacterium balustinum*, *Serratia marcescens*, ve *E. coli* gibi Gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyel etki göstermediği tespit edilmiştir (Duran vd., 1983; Nakamura vd., 2002, 2003; Martins vd., 2011). Ayrıca viyolasinin *S. aureus* gibi Gram-pozitif patojenlere karşı antibiyotik olarak kullanılabilirliği rapor edilmiştir (Duran vd., 2012).

Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü'nde, kanser hücre hatları kullanılarak yapılan çalışmalarda, saflaştırılmış viyolasin GI50 ile MOLT-4 lösemi, NCI-H460 büyük hücreli akciğer kanseri ve KM12 kolon kanseri hücre hatlarına karşı etkili faaliyetler gösterdiğini ortaya koymuştur (Melo vd., 2000). Lösemi hatları da dahil olmak üzere neoplastik hücre hatlarına karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. Viyolasinin lösemi hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin normal lökosit hücreleri ile kıyaslandığında daha etkin olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle lösemi tedavisinde umut verici aday olacağı düşünülmektedir (Melo vd., 2003). Yapılan bir diğer çalışmada ise viyolasinin HT29, Caco-2, SW480, HCT116, ve DLD1 gibi insan kolon kanser hücrelerinin viyolasine karşı oldukça duyarlı olduğunu tespit edilmiştir (Kocdach vd., 2006).

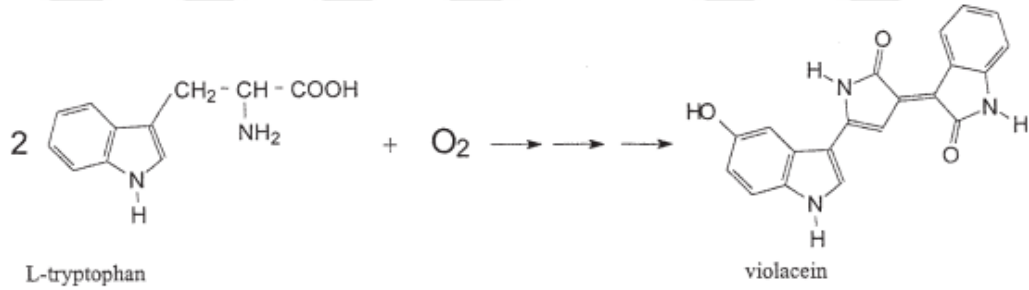
Mehta (2012), tarafından yapılan çalışmada üç farklı *C. violaceum* (14N23, 14N1, 12472) suşundan edilen viyolasin; meme (BT20), kolon (SW620) ve serviks (HeLa) kanser hücreleri 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda maruz bırakılmıştır. Bunun sonucunda viyolasinin SW620 kolon kanseri hücre hatlarında 0.05 µg/ml BT20'de, 0.05µg/ml ve 0.025 µg/ml konsantrasyonlarda etkili olduğu tespit edilmiştir. Fakat HeLa hücreleri üzerinde fazla etkili olmamıştır. Kontrol hücreleriyle kıyaslandığında 14N1 ve 12472'den ekstrakte edilen viyolasin BT20 meme kanseri hücre hattında sırasıyla 0.05 µg/ml ve 0.05 µg/ml and 0.025µg/ml konsantrasyonlarda hücre canlılığını inhibe etmiştir.

Ayrıca, BT20 meme kanseri hücre hattında, *C. violaceum* 12472'den ekstrakte edilen viyolasin 14N23 ile kıyaslandığında daha etkili olduğu görülmüştür.

Leal vd., (2015), tarafından yapılan çalışmada ise viyolasinin neden olduğu sitotoksiste, iki hücre hattında gözlenmiştir. Ardından, MRC-5 ve HeLa hücrelerinin viyolasin ile tedaviye daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

2.1. Viyolasin Pigmenti

Viyolasin, başlıca *C. violaceum*'dan üretilen çeşitli biyolojik özelliklere sahip, indol türevi mor bir pigmenttir (Duran vd., 2007; Leal vd., 2015). Viyolasin üretimi, spesifik olarak N-heksanoil homoserin lakton tarafından indüklenir (Blosser ve Gray, 2000). De Moss ve Evans, (1960) viyolasin sentezi için moleküler oksijen ve triptofan'ın gerekli olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca oksijenin yokluğunda triptofandan sentez başlamadığını ortaya koymuşlardır Viyolasin biyosentezi Şekil 2.1'de görüldüğü gibidir (Mehta, 2011).



Şekil 2.1. Viyolasin Biyosentezi (De Moss and Evan, 1960)

Viyolasin, çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğundan dolayı bilim dünyasında büyük ilgi görmüştür. Herpes simpleks virüsü, poliovirus ,hepatit-A virüsü, adenovirüs ve rotavirüse karşı antiviral aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (May vd., 1991; Rettori 1996; Duran vd., 2007; Duran ve Menck, 2001; Masuelli vd., 2015). Viyolasin bir mantar öldürücü olarak da kullanılabilir. Dut ağaçlarında beyaz kök çürüklüğüne neden olan *Rosellinia necatrix* gibi fitopatojenik mantarlara karşı aktivite göstermiştir (Shirata vd., 2000). Ek olarak viyolasin bitki ve insan patojeni olan *Cryptococcus*

gastricus, *Trichophyton rubrum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum*, ve *Candida albicans* gibi patojenik mantar ve maya türleri ne karşı etkili olmuştur. En iyi etkinlik insanda ayak mantarı enfeksiyonuna neden olan *Trichophyton rubrum* üzerinde görülmüştür. Piyasada mevcut olan bavistin ve amfoterisin B gibi yaygın antifungal maddeler ile karşılaştırıldığında, viyolasinin daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Sasidharan vd., 2015). Hatta viyolasin azol grubu ilaçlarla birlikte kombine edilip uygulandığından *T. rubrum* üzerinde oldukça etkili olduğu tespit edilmiştir (Anju vd., 2015). Aynı zamanda viyolasin, bitkiler ve amfibilerde bulunan patojenik mantarlara karşı biyolojik kontrol potansiyelinin olduğu da rapor edilmiştir (Barreto, 2008; Brucker, 2008; Becker, 2009; Sasidharan vd., 2015).

Klorokin duyarlı ve dirençli suşlardan *Plasmodium falciparum* suşlarını (in vitro) mikromolar konsantrasyonlarda etkin bir şekilde öldürdüğü tespit edilmiştir. Hatta viyolasin, parazit tespit edildikten sonra (in vivo) *Plasmodium chabaudi chabaudi* ile enfekte olan fareleri bu parazitten koruduğu anlaşılmıştır (Snounou vd., 2005; Stefanie vd., 2009; Lopes, vd., 2009; Mehta, 2012).

Viyolasin, *Spumella sp.* ve *Ochromonas sp.* gibi silli protozoa kültürlerine karşı yüksek toksisite göstermiştir. Aynı zamanda *Trypanosoma cruzi* üzerinde de anti-tripanosidal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Daha önce tarif edilen biyolojik özelliklere ek olarak, viyolasin *Leishmania amazonensis* promastigotlarına karşı da etkili olduğu tespit edilmiştir (Duran vd. 2007).

Viyolasinin antibakteriyel etkilerinin de olduğu bilinmektedir (de Carvalho vd., 2006; Duran vd., 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 vd., 2012). Minimum inhibitör konsantrasyonlarda *Mycobacterium tuberculosis'a* (H37Ra) karşı in vitro antimikobakteriyel aktivite sergilemiştir (De Souza vd., 1999; Duran ve Menck, 2001; Mehta, 2011). Ayrıca viyolasin

diğer antibiyotikler ile kombinasyon halinde uygulandığı zaman, bakterilerle savaşta tek bir antibiyotikten daha fazla etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) gibi patojenik bakterilerin antibiyotiğe dirençli suşlarında da etkili olmasıyla dikkat çekmiştir (Choi vd., 2015). İnsanlarda diş çürümesine neden olan çoklu ilaç direncine sahip *Streptococcus mutans* büyümesinde orta seviyeli inhibisyon meydana getirmiştir (Patel vd., 2015). Choi vd., (2015) tarafından yapılan çalışmada *Duganella violaceinogra*'dan ekstrakte edilen viyolasin de *S. aureus*'un büyümesini inhibe ettiğini tespit etmiştir.

Viyolasinin biyolojik aktivitesi prokaryotlarla sınırlı değildir. *C. Elegans* gibi bakteriovorus, protozoa ve metazoa üyelerinde de olumsuz etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Choi, vd., 2015).

Viyolasinin anti-kanser aktivitesinin de olduğu deneyler sonucunda tespit edilmiştir (de Carvalho vd., 2006; Duran vd., 2007). Viyolasinin terapötik uygulamaları birçok yeni araştırmaların odak noktası olmuştur (Melo vd., 2003; Saraiva vd., 2004). Lösemi, akciğer kanseri, meme kanseri, serviks kanseri, baş ve boyun kanseri ve kolon kanseri hücre hatlarında antikanser etkileri tespit edilmiştir (Melo vd., 2000 ,2003; Kocdach vd., 2006; Mehta, 2011; Masuelli, 2015). Yapılan bir diğer çalışmada lösemi hücreleri, lenfoma, akciğer ve kolon kanseri hücrelerinin kültürlerinde ve AIDS ile ilgili lenfomalarda tedavi edici özelliklerinin olduğu ortaya konmuştur (Duran ve Haun, 1997; Melo vd., 2000). Kodach (2006) tarafından yapılan çalışmada ise HT29, SW480, HCT116, ve DLD1 gibi insan kolon kanser hücrelerinin viyolasine karşı oldukça duyarlı olduğunu rapor edilmiştir. Viyolasin farelerde bulunan tümör hücrelerinin hacminde azalmaya neden olmuş ve tümörlü farelerin ömürlerini uzatmayı başarmıştır. Bunun önemi viyolasinin ilk in vivo anti-tümör aktivitesi olarak tanımlanmış olmasıdır (Bromberg vd., 2010). Daha önemlisi viyolasin çeşitli kanser hücrelerinde apoptosize neden olduğu halde normal insan lenfositleri ve monositlerinin etkisiz olduğu gösterilmiştir (Ferreira vd., 2004). Görülen bütün durumlarda viyolasinin normal hücreler üzerinde toksisite yaratması için kanser hücrelerine kıyasla daha yüksek miktarda viyolasin gerektirdiği

görülmüştür (Melo vd., 2000; Bromberg ve Duran, 2001). Bunlara ek olarak viyolasin normal hücrelere kıyasla kanser hücreleri üzerinde daha toksik olması klinik kullanım için oldukça önemlidir (Choi vd., 2015).

2.1.1. Çevreyi algılama sisteminde viyolasinin rolü

Doğadan elde edilen bakteriyel suşlardan üretilen viyolasin biyofilm üretimi ile ilişkili olan ikincil metabolittir. Ayrıca *C. violaceum* ve diğer suşları dahilinde üretimi çevreyi algılama sistemi tarafından düzenlenmektedir. İkincil metabolitler genellikle bakterilerin üreme ve büyüme gibi önemli ihtiyaçları dışında diğer fonksiyonlarına da hizmet vermektedir. Bu moleküllerin çoğu biyolojik olarak aktif ve diğer bakterilere karşı rekabet amaçlı mücadele için bazı toksik özelliklere sahiptir.

Belirtildiği gibi, viyolasin üreten bakteriler, deniz, tatlı su ve toprak gibi çok çeşitli doğal ortamlarda bulunmaktadır. Bu nedenle, viyolasinin ana biyolojik veya ekolojik rolünü kesin olarak belirlemek oldukça güçtür. Viyolasin üreticileri arasındaki bir ortak nokta genellikle sesil olarak yaşamalarıdır bu da onları predatörlere karşı savunmasız yapmaktadır. Viyolasin onu üreten suş için bazı savunma mekanizmalarının oluşmasında hizmet etmektedir. Aynı zamanda bu sesil bakterilere rekabet avantajı da sağlamaktadır. Ayrıca saflaştırılmış viyolasin kamçılılar, siliyatlar ve amipler gibi farklı protozoon türlerinde de viyolasin üreten biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu fonksiyonel çalışmalar ikincil metabolit olan viyolasinin diğer bakteriyel predatörler ve rekabetçiler karşı koruma sağladığını göstermektedir (Choi vd., 2015).

2.2. *Chromobacterium violaceum* ve Viyolasinin Keşfi

1880 yılında İtalyan araştırmacı Bergonzini Modena Üniversitesi'nde çalışma yaptığı sırada kazayla bir keşif yapmıştır. Mart ayının sonuna doğru "bozunmayı geciktirici eylem mekanizmaları"ni çalışmak için ovalbumin solüsyonları hazırlamaktadır. Araştırmacı deneyden sonra kontrol solüsyonlarını ortadan kaldırmayı unutmasıyla örnekler üzerinde beklenmedik bir hal gözlemlemiş ve

bunu fantastik olarak tanımlamıştır. Buharlaştırma işleminden sonra çok yoğun mor renkli ince bir film tabakasıyla kaplı solüsyon elde etmiştir. Başlangıçta bu renklendirmeyi sergileyen *Cromococcus violaceus* denilen bakteriden kaynaklandığı şüphelenirse de bu olasılık çözümlenmesi nedeniyle ortadan kaldırılmıştır. Yapılan testlerden sonra, bu renklenmenin yeni bir bakteri olan *Cromobacterium violaceum* adlı bakteri olduğu sonucuna 1881 yılında "yeni bir bakterinin keşfi" olarak varılmıştır ve yayınlanmıştır (Bergonzini, 1881). De mos Boisbaudran tarafından tescil edilen, görünen spektrum absorbanlarına dayanarak bu organizmanın *Cromobacterium violaceum*, bileşiğinin ise viyolasin olduğunu rapor etmiştir (De Moss, 1967). Daha sonra bu bakterinin adı Zimmerman tarafından *Chromobacterium violaceum* olarak değiştirilmiştir (Zimmerman, 1881).

2.3. *Chromobacterium violaceum*'un Özellikleri

C. violaceum tropikal ve subtropikal bölgelerde, toprakta ve suda geniş yayılım gösteren, Gram-negatif, fakültatif bir beta proteobakteriyum olan bir bakteridir. %5 koyun kanı içeren kanlı agarda inkübe edildiğinde oluşan koloniler siyah ya da çok koyu mor olarak görülmektedir. Toprak ve su dışında süt ve süt ürünleri, kontamine olmuş sularda yada kontamine olmuş topraklarda yetişen maydanoz, şeker pancarı gibi birçok besin maddesinde de bu mikroorganizmaya rastlanmıştır (Dias vd., 2005; Mehta, 2012; Choi, vd., 2015).

C. violaceum viyolasin adı verilen mor bir pigment üretir. Ürettiği viyolasin pigmentinin pek çok biyolojik aktivitesi mevcuttur. Ayrıca ilaç sanayinde de ürettiği antibiyotikler büyük önem taşımaktadır (Kaufman vd., 1986; Lopes vd., 2009; Mehta, 2012; Leal, 2015). Bu bakterinin, anaerobik ve aerobik koşullarda yaşaması mümkün olduğu halde viyolasini yalnızca oksijen varlığında, yani aerobik koşullarda üretebildiği belirlenmiştir (Duran vd., 2012). *C. violaceum* ayrıca prosiyanidin (Parker vd., 1988) ve aerokavin gibi başka antibiyotikler de üretir (Liu vd., 1988; Lopes vd., 2009).

1905 yılında Wooley tarafından potansiyel patojenitesi tespit edilmiştir. Bu da Filipinlerde bufalolarda septisemiye neden olan organizma olarak tanımlanmıştır (Holt ve Krieg 1984; Ponte ve Jenkins, 1992). Malezya'da kaydedilen ilk rapordan bu yana, insan *C. violaceum* enfeksiyonları dünya genelinde rapor edilmiştir. *C. violaceum* yüksek mortalite oranı ile şiddetli enfeksiyonlara neden olmaktadır. *C. violaceum* ile enfekte olan canlılarda hastalık selülit ve deri apseleriyle başlar ve bunların hızlı gelişmesiyle sepsis ve çoklu organ abseleriyle devam etmektedir. Bu organ abseleri özellikle karaciğer ve dalakta meydana gelmektedir (Moore vd., 2001; Duran ve De Souza, 2001; Chattopadhyay vd., 2002; Page, 2015). Daha sonraki çalışmalarda *C. violaceum*'un insanlarda ciddi enfeksiyonlara yol açmasına rağmen, etki alanının çok düşük olduğu görülmüştür. Amerika Birleşik Devletleri'nde enfekte bireylerin teşhisi ve analizinden sonra, *C. violaceum*'un esas olarak bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olabilen düşük derecede patojen madde olduğu tespit edilmiştir. Bu noktaya kadar bahsedilen tüm olgular pigment içeren bakterilerdir, fakat pigmentsiz suşların da enfeksiyonlara yol açtığı vakalar da mevcuttur (Sivendran ve Tan, 1977; Petrillo vd., 1984; Mendes vd., 2001).

C. violaceum'un bir başka göze çarpan özelliği ise, neden olduğu enfeksiyonun tedavi sırasında kullanılan bir çok antibiyotiğe karşı dirençli olmasıdır. Bunun sebebi viyolasin pigmenti çevreyi algılama sistemi sayesinde bakteriye savunma mekanizması kazandırmasıdır (Fantinatti-Garboggini vd., 2004).

2.4. Mikrodalga ve Ultrases Uygulama Ekstraksiyon Yöntemleri

Mikrodalgalar 0.3–300 GHz aralığında değişen elektromanyetik radyasyonlardır ve genellikle doğal ürünlerde 2.5–75 GHz'de ekstraksiyon gerçekleştirilmektedir. Mikrodalga enerjisinin etkinliği büyük oranda çözücünün içeriğine, bitki materyaline ve uygulanan mikrodalga gücüne bağlı olmaktadır. Polar moleküller ve iyonik türlerin bulunduğu durumlarda daha hızlı bir enerji yayılması gerçekleşmektedir. Klasik temas yoluyla ısı iletimi

yöntemlerinin aksine, mikrodalgalar örneğın tamamını aynı anda ısıtılmaktadır. Mikrodalga yardımıyla ekstraksiyon iki farklı sistemle gerçekleştirilmektedir. En yaygın sistem, sıcaklık ve basınç kontrol edilebilen kapalı bir kap içerisinde yapılan kapalı sistem ekstraksiyonudur. Diğer yöntem ise atmosferik basınç altında açık kap içerisinde gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemin avantajı, ekstraksiyon süresinin ve kullanılan çözücü miktarının büyük oranda az olmasıdır. Mikrodalga Ekstraksiyon yöntemiyle bitkilerdeki polifenoller ve lignanlar ayrıştırılabilmektedir (Kaufmann ve Christen 2002; Kaufmann vd., 2007; Beejmohun vd., 2007; Cellat, 2011).

Ses dalgaları-destekli sıvı ekstraksiyonu, ultrases ekstraksiyon olarak adlandırılır. Bu yöntemde örneğe 20 kHz üstündeki frekanslarla akustik titreşimler uygulanır. Bu titreşimler sıvının içinden geçtiğinde kavitasyon (boşluk oluşumu) meydana gelir. Ultrason enerjisinin neden olduğu kavitasyon olarak bilinen bu etki sıvı ortamda çok sayıda ufacık kabarcıklar üretir ve katıların mekanik olarak sarsılmasına neden olarak partiküllerin kopmasını sağlar. En çok kullanılan ve en ucuz ultrasonik radyasyon kaynağı ultrasonik banyodur. Ultrases uygulama genellikle yağ, esansiyel yağlar, antioksidanlar gibi maddelerin ekstraksiyonunda kullanılmaktadır. Soyadan yağ ekstraksiyonunda ultrases uygulaması ekstraksiyon verimini önemli ölçüde arttırmıştır. Gingseng saponinlerinin ekstraksiyonunun ultrases destekli sistemde geleneksel Soxhlet ekstraksiyonundan üç kat daha hızlı olduğu tespit edilmiştir (Tadeo vd., 2010; Büyüktuncel, 2011).

3. MATERYAL METOT

3.1. Kullanılan Besiyerleri ve Bakteriyel Suşlar

Tez çalışma kapsamında kullanılan bakteri suşları Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü bakteri kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. Bu suşlar *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 ve *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 şeklindedir. Bu suşlar üretilmek üzere Müller Hinton Agar, Kanlı Agar ve Luria Bertani (LB) sıvı besiyerleri kullanılmıştır.

Çalışmaların yapılabilmesi için steril kabinler kullanılmış, kullanımdan önce ultraviyole lambaları açılmış ve çalışmadan en az 15 dk önce % 70'lik etil alkolle kabin içi silinmek suretiyle kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.2. *Chromobacterium violaceum*'dan Viyolasin Ekstraksiyonu

İlk olarak *C. violaceum* ATCC 12472 suşu -80°C'den alınarak kanlı agar (%2) besiyerine öze yardımıyla ekilerek 35°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra gelişen mor renkli kolonilerden öze yardımıyla 2 koloni alınarak hazırlanan 5ml LB sıvı besiyerine inokule edilmiş, 35°C'de 120rpm'de çalkalamalı inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi gerçekleştikten sonra tüplerde mor renkli tanecikler şeklinde üreme gözlemlenmiştir. Sonrasında 100ml'lik (içerisinde 50ml LB olan) şişeler hazırlanıp otoklavlanmıştır. Otoklav sonrası şişelere 5ml içinde üretilen *C. violaceum* ATCC 12472 kültüründen 200'er µl olacak şekilde pipetlenmiş ve çalkalamalı inkübatörde 24 saat 35°C'de 120rpm'de inkübe edilmiştir. 100ml'lik şişelerde üretilen *C. violaceum* ATCC 12472 kültürlerinin OD600nm absorbansları ölçülerek hücre yoğunlukları belirlenmiştir.

50ml LB sıvı besiyeri içeren şişelerde *C. violaceum* ATCC 12472 üretimi gerçekleştirildikten sonra iki farklı ekstraksiyon yöntemi (mikrodalga ve ultrases uygulama) uygulanarak ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Sonrasında bu kültürlerin tamamı santrifüj tüplerine aktarılarak (4000 devir, 30dk) santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda üst faz atılmıştır ve pelet üzerine pigment ekstraksiyonu için farklı şişelere ayrı ayrı etanol, metanol, aseton ve etil asetat toplam 25ml olacak şekilde 5'er ml 5 kez eklenmiştir.

3.2.1. Ultrases uygulama ile viyolasin ekstraksiyonu

Ultrasonik dalgalar bir ortamdan geçerken kütle transferine neden olan iç ve dış dirence tesir eden bir seri etkide bulunurlar. Ultrason destekli ekstraksiyon uygulamalarındaki yüksek yoğunlukta ve yüksek frekanstaki ultrason dalgalarının materyal üzerindeki etkilerine yönelik çalışmalar literatürde bulunmaktadır. Ultrason etkisiyle hücre duvarlarını yıkarak içerisindeki ekstrakte edilmesi istenen bileşenlerin ortaya çıkması kolaylaşmaktadır. Ultrason destekli ekstraksiyon sistemi ucuz, basit ve verimli olması nedeniyle geleneksel ekstraksiyon tekniklerine iyi bir alternatiftir. Bu nedenle ultrason destekli ekstraksiyon gelecekteki uygulamalar için önemli potansiyele sahiptir (Vinatoru vd., 1999; İlgün, 2014).

Ultrases destekli ekstraksiyon yönteminde çözücüler eklendikten sonra her bir örnek ultrases banyoda 10 ve 20dk dakika bekletilmiştir. Ultrases uygulama sonrası elde edilen viyolasin steril 50'lik falkonlara aktarılarak döner buharlaştırıcıda (45°C, 200 devir) takılarak çözücülerini tamamen uçurulmuştur. Bu işlem sonunda steril tüplerde yalnızca viyolasin pigmenti kalmıştır. Bu tüpler hassas tartıda tartılıp ağırlıkları kaydedilmiştir. Sonra DMSO eklenerek viyolasin çözülmüş ve spektrofotometrede OD 585nm'de absorbanları ölçülerek viyolasin miktarı ppm olarak belirlenmiştir. Her bir çözücü için ekstraksiyon işlemi en az ikişer kez tekrarlanmıştır. Elde edilen ekstraktlar kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Mikrodalga ile ekstraksiyon yöntemi

Mikrodalgalar 0.3–300 GHz aralığında değişen elektromanyetik radyasyonlardır. Moleküllerin kutuplarındaki yükseltgenen zayıf hidrojen bağlarının koparılması prensibine dayanır. Yapılan çalışmalarda serumdan ve iskelet dokularından ilaç (pentobarbital, ketamin, diazepam) ekstraksiyonu için mikrodalga yöntemi kullanılmıştır (İlgün, 2014; Cellat, 2011).

Çalışma sırasında viyolasin ekstraksiyonu için kullanılan bir diğer yöntem mikrodalga ile ekstraksiyon yöntemidir. Ayrı ayrı şişelerde üretilen *C. violaceum* ATCC 12472 kültürleri santrifüj işlemi (4000devir, 30dk) sonrası pelet içerisindeki viyolasinin ekstraksiyonu için üzerine 25ml etanol, aseton, metanol ve etil asetat eklenmiştir. Sonrasında örnekler 2450 MHz, 30°C'de 20 dakika mikrodalga'da bekletilmiştir. Daha sonra örnekler steril falkonlara alınıp döner buharlaştırıcıda (45°C, 200 devir) çözücüler tamamen uçurulmuştur. Viyolasin pigmenti üzerine DMSO eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Bu işlemlerden sonra örnekler spektrofotometrede OD585nm'de her birinin absorbansları ölçülerek viyolasin miktarı ppm olarak belirlenmiştir. Her bir çözücü için ekstraksiyon işlemi en az ikişer kez tekrarlanmıştır. Elde edilen ekstraktlar kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3. Viyolasin Örneklerinin Antibakteriyel Özelliklerinin İncelenmesi

Ekstrakte edilen viyolasin örneklerinin antibakteriyel özellikleri kuyucuk difüzyon testi kullanılarak incelenmiştir. Öncelikle -80 derecede bulunan *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6051, *B. cereus* ATCC 11778, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 43300 adlı bakteriler öze yardımıyla önceden hazırlanmış MH agar üzerine ekilmiştir. Bu petriler, *S. aures* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 ve *S. aureus* ATCC 43300 için 35°C'de, *B. subtilis* ATCC 6051, *B. cereus* ATCC 11778 için 30°C'de 24 saat inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası her bir örnekten öze yardımıyla iki koloni alınıp 50ml LB besiyerine inokule edilmiştir. Bütün tüpler

karıştırılarak 4-6 saat yatay çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bu bakteri kültürleri 0,5 Mc Farland bulanıklığa eşdeğer bulanıklıkta ayarlanmıştır. Sonrasında %0,5 agar içeren yumuşak agar (5ml) içerisine 100µl bakteri kültürlerinin her birinden eklenerek LB agar petrilere ikinci kat olarak dökülmüştür. Yumuşak agar katılaştıktan sonra üzerine kuyucuklar açılmıştır. Bu kuyucuklara viyolisin örneklerinden 50'şer µl yüklenmiştir. Bir diğer kuyucuğa ise kontrol olarak levofloksasin kullanılmıştır. Sonrasında *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 ve *S. aureus* ATCC 43300 için 35°C'de, *B. subtilis* ATCC 6051, *B. cereus* ATCC 11778 için 30°C'de 24 saat inkübe edilip inhibisyon zon çapları ölçülerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

Etkili ekstratların *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 11778 ve *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) için minimum inhibitör konsantrasyon (MIK) değerleri incelenmiştir. Bunun için mikrolaka kuyucuklarına 850 µl Müeller Hinton (MH) besiyeri eklenmiştir. Sonrasında bir gece inkübe edilen *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 11778 ve *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) kültürleri 0.5 Mc Farland bulanıklığa eşdeğer bulanıklıkta ayarlanıp kuyucuklara 20'şer µl eklenmiştir. Ardından viyolisin örneklerinden son derişimi %7.5, %3.75, %1.875, %0.9375 olacak şekilde seyreltilerek mikrolaka kuyucuklarına eklenmiş ve 24 saat *B. cereus* ATCC 11778 için 30°C ve *S. aureus* ATCC 25923 ve *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) için 35°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örneklerden önceden hazırlanmış LB agar petrilere damlatılarak 24 saat 30°C veya 35°C'de inkübe edilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.4. Mikrodalga ve Ultrases Uygulama ile Elde Edilen Ekstratların Viyolisin ve Deoksiviyolisin Miktarlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Yöntemi ile Belirlenmesi

Analizler Shimadzu (Japan) marka HPLC sistemi ile yapıldı. HPLC sistemi, sistem kontrol ünitesi (SCL 10AVP), pompa (LC-10ADVP), Diode Array dedektör (SPD-M10AVP), manuel enjektör, kolon fırını (CTO-10ACVP) ve degasser (DGU-14A) oluşmaktaydı. Çalışmada Agilent zorbax XDB-C18, (5µ, 4.6 mm ID× 250 mm) kolon ve (70:30 v/v) metanol:su karışımından oluşan hareketli faz

kullanılmıştır Enjeksiyon hacmi 20 µL, akış 0.8ml/dakika ve kolon fırını sıcaklığı 30°C, viyolasin ve deoksiviyolasin analizi için dalga boyu 585 nm olarak ayarlanmıştır.

3.5. Viyolasin Örneklerinin HeLa Hücreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi

HeLa (servikal kanser hücreleri) hücrelerine viyolasinin etkisinin incelenmesi için, öncelikle plate kuyucuklarına, kuyucuk başına 10000 hücre olacak şekilde HeLa hücreleri eklenerek ve 37°C de 30 dk inkübe edilmiştir. 24 saat inkübasyondan sonra kuyucuklara son derişimleri %5, 2.5, 1.25 olacak şekilde viyolasin örneklerinden eklenerek Real-Time Cell Analyzer (RTCA) station (Roche Diagnostics) cihazında inkübe edilmiştir (Şekil 3.1). Cihazda 72 saat boyunca her 15 dakikada bir ölçüm alınarak sonuçlar değerlendirilmiştir.



Şekil 3.1. Roche xCELLigence System

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Viyolasin Ekstraksiyonu

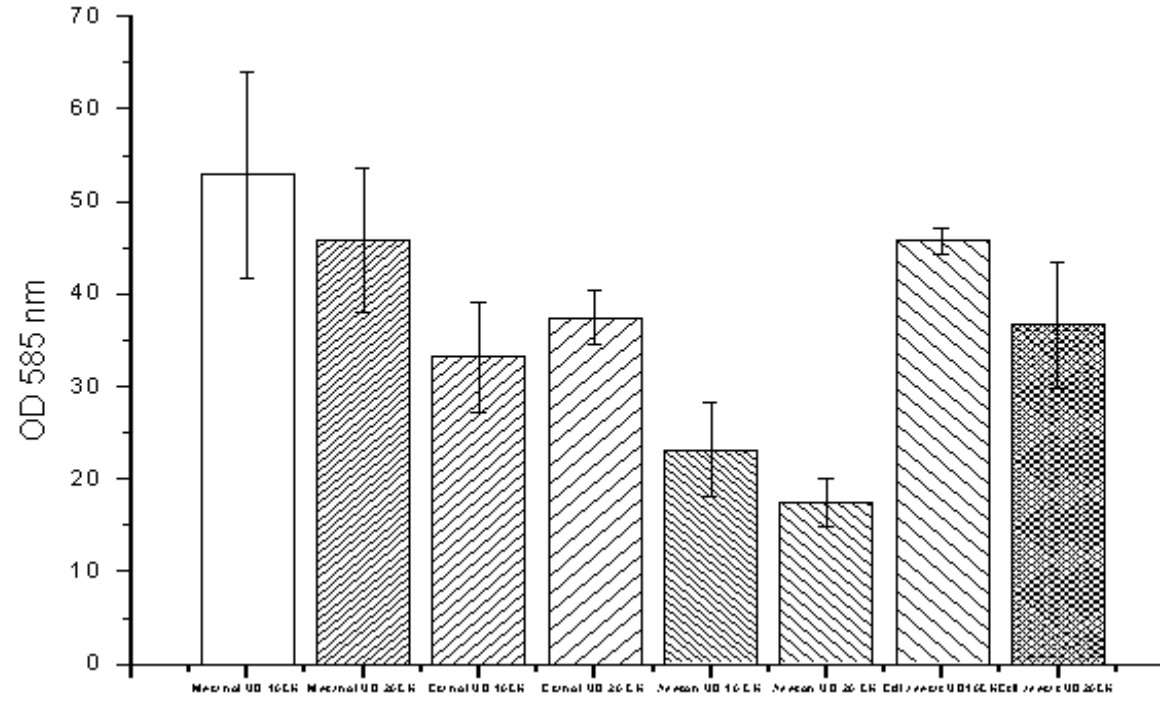
C. violaceum ATCC 12472 suşu kullanarak LB sıvı besiyerinde kùltürler geliőtirilmiőtir (Şekil 4.1). Daha sonra bu kùltürlerden ultrases ve mikrodalga yöntemleri kullanılarak viyolasin ekstraksiyonu yapılmıştır.



Şekil 4.1. *C. violaceum* ATCC 12472 suşunun ürettiği viyolasin pigmentinin sıvı besiyeri içindeki görüntüsü

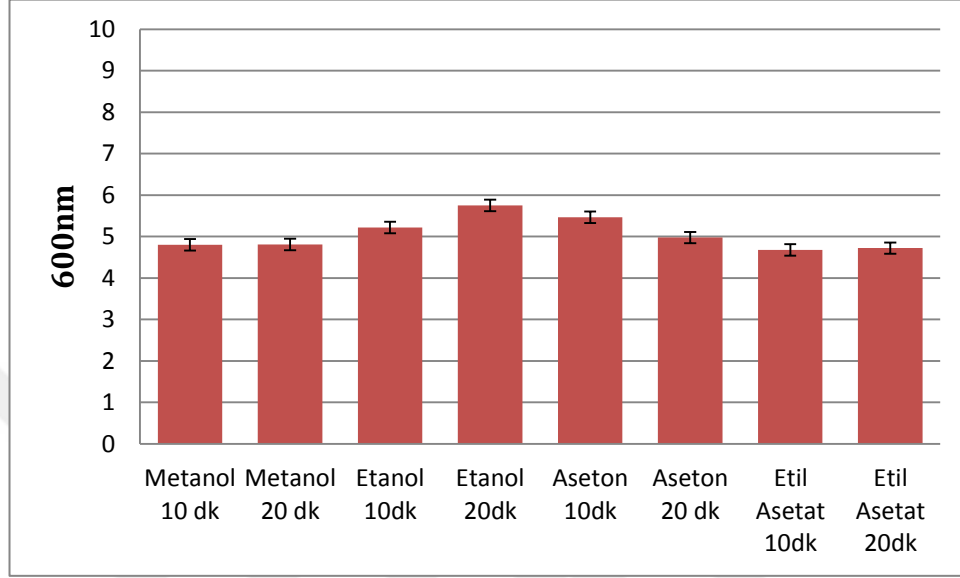
4.1.1. Viyolasinin ultrases uygulama ile ekstraksiyonu

C. violaceum ATCC 12472 kùltürlerinin ultrases uygulama ile ekstaksiyon öncesi 600 nm için absorbans değerleri ölçülerek kaydedilmiştir. Sonrasında bu kùltürlerden ultrases uygulama ile ekstrakte edilen viyolasin örneklerinin 585 nm için absorbans değerleri ölçülerek viyolasin miktarları değerlendirilmiştir. Buna göre en yüksek derişimde viyolasin metanol 10dk ($OD_{585}:46.2$) ultrases uygulama sonucu elde edilirken en düşük viyolasin ise aseton 20dk ($OD_{585}:17.5$) ultrases uygulaması ile elde edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Ultrases uygulama yöntemi ile ekstrakte edilen örneklerin 585 nm için ölçülen absorbans değerleri

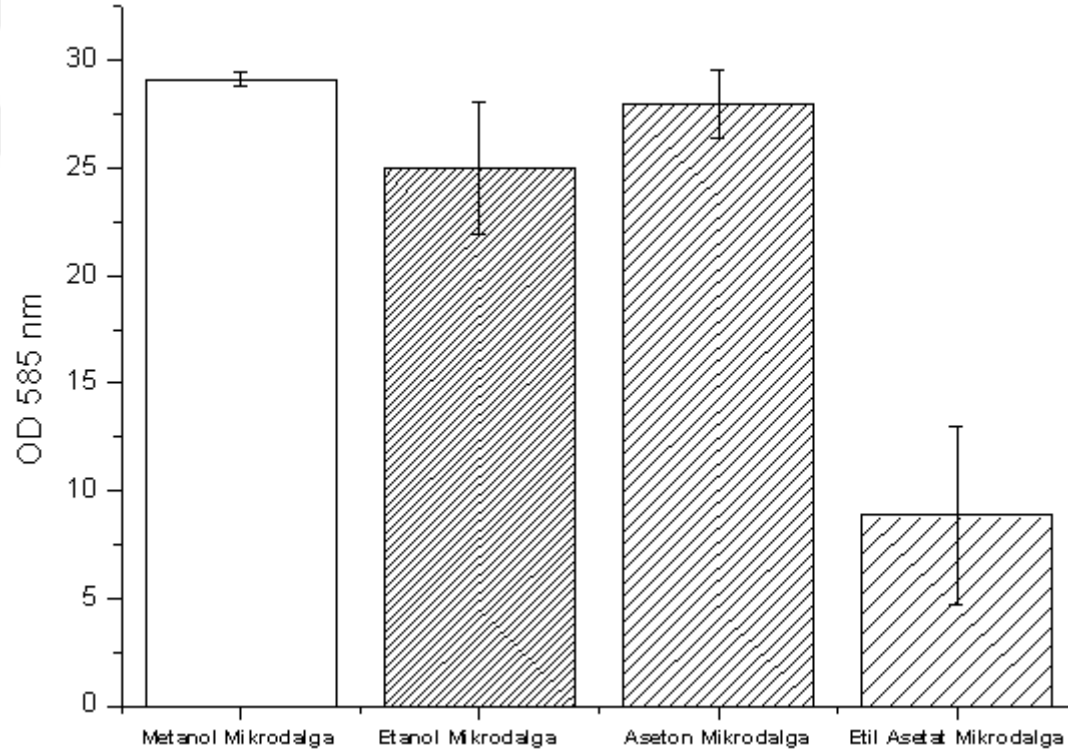
C. violaceum ATCC 12472 kültürlerinin 600 nm için absorbans değerleri kaydedilmiştir (Şekil 4.3). Bu sonuçlara göre suşun biyokütlesiyle pigment üretimi arasında bir ilişki olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. Ekstraksiyon öncesi üretilen *C. violaceum* ATCC 12472'nin 600 nm için absorbans değerleri

4.1.2. Viyolasinin mikrodalga ile ekstraksiyonu

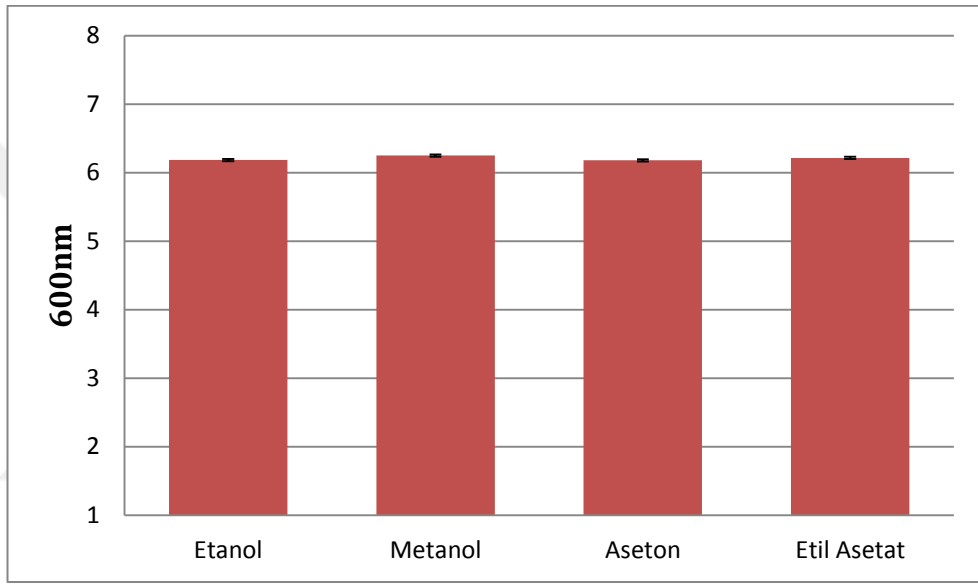
C. violaceum ATCC 12472 kültürlerinin mikrodalga ile ekstraksiyon öncesi 600 nm için absorbans değerleri ölçülerek kaydedilmiştir. Sonrasında bu kültürlerden mikrodalga ile ekstrakte edilen viyolasin örneklerinin 585 nm için absorbans değerleri ölçülerek viyolasin miktarları değerlendirilmiştir. Buna göre en yüksek derişimde viyolasin metanol ($OD_{585}:29.1$) ile elde edilirken en düşük viyolasin ise etil asetat ($OD_{585}:8.86$) ile elde edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Mikrodalga ekstraksiyonu ile elde edilen viyolasin örneklerinin 585 nm için absorbans değerleri

Bu sonuçlara göre ultrases ekstraksiyon ile elde edilen viyolasin örneklerinin 585 nm için ölçülen en yüksek absorbans değeri metanol 10dk için (OD_{585} : 46.2), mikrodalga için metanol (OD_{585} :29.15) göre daha yüksektir.

C. violaceum ATCC 12472 kültürlerinin 600 nm için absorbans değerleri kaydedilmiştir (Şekil 4.5.). Bu sonuçlara göre suşun biyokütlesiyle pigment üretimi arasında bir ilişki olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. Ekstraksiyon öncesi üretilen *C. violaceum* ATCC 12472'nin 600 nm için absorbans değerleri

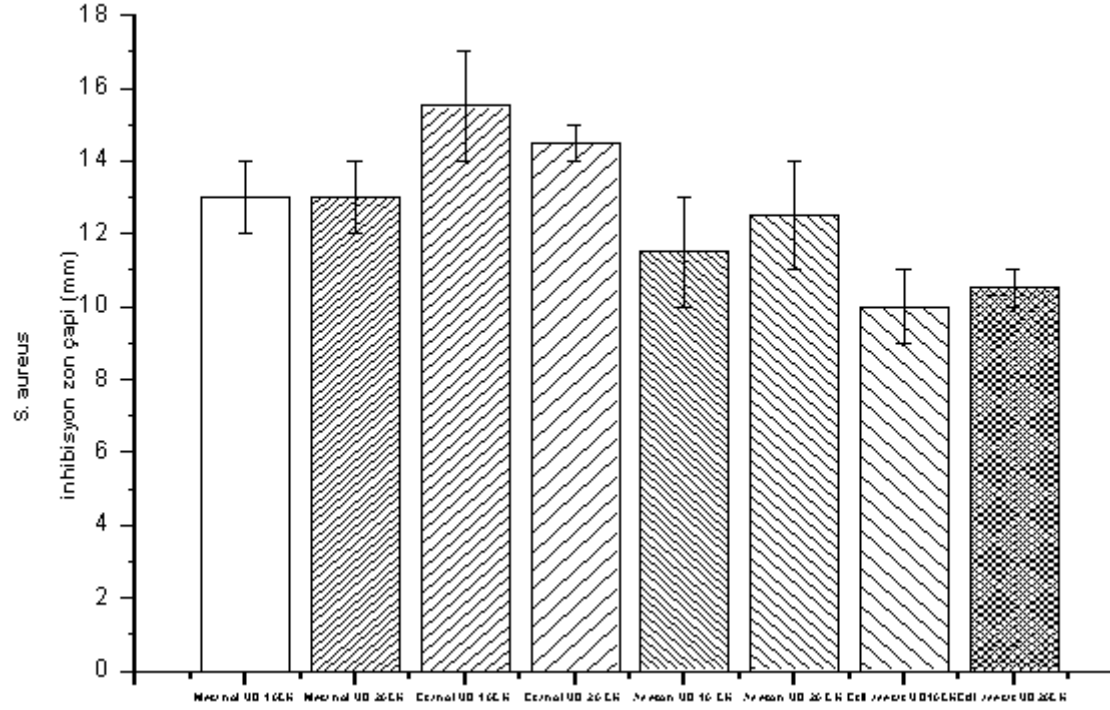
4.2. Viyolasin Örneklerinin Antibakteriyel Özelliklerinin İncelenmesi

Mikrodalga ve ultrases ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen viyolasin örneklerinin antibakteriyel özellikleri agar difüzyon testiyle araştırılmıştır. Daha sonra MİK değerleri belirlenmiştir. Testlerde *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6051, *B. cereus* ATCC 11778, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) suşları kullanılmıştır.

4.2.1. Ultrases uygulama ile ekstrakte edilen viyolasin örneklerinin antibakteriyel özelliklerinin incelenmesi

Viyolasin ekstraksiyonu için ultrases uygulama kullanılarak etanol 10dk (15.5 mm) ve 20dk (14.5mm) ile ekstrakte edilen örneklerin *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerine antibakteriyel etkilerinin en yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.6).



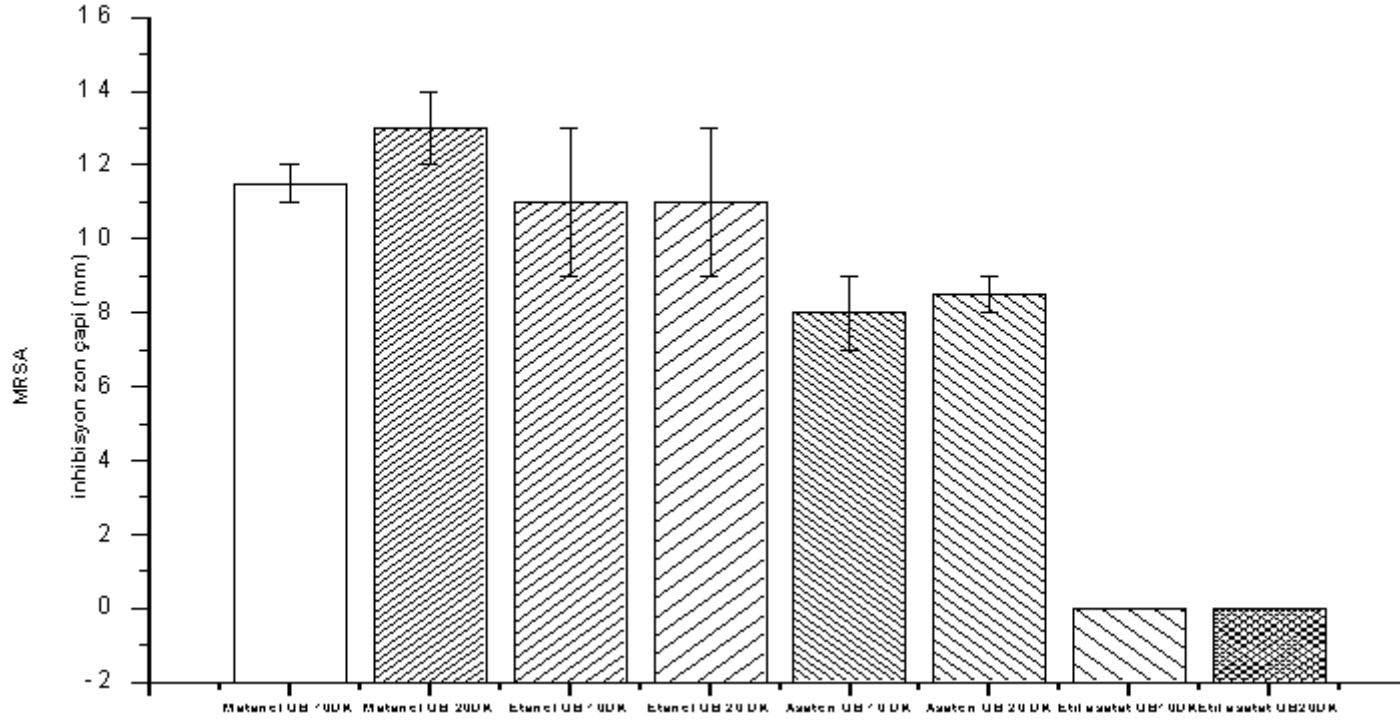


Şekil 4.6. Ultrases uygulama ile ekstrakte edilmiş viyolasin örneklerinin *S. aureus* ATCC 25923 için kuyucuk difüzyon yöntemiyle elde edilmiş inhibisyon zon çapları (mm).

Viyolasin ekstraksiyonu için kullanılan çözücülerden metanolün, 10dk (13mm) ve 20dk (13mm) ultrases uygulama ekstraktlarının etanol 10dk (15.5mm) ve 20dk (14.5mm) örneklerine göre daha düşük inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak sonuçlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir.

Viyolasin ekstraksiyonu için ultrases uygulama kullanılarak metanol 10dk (11.5mm) ve 20dk (13mm) ile ekstrakte edilen örneklerin *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) suşu üzerine antibakteriyel etkilerinin en yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7).

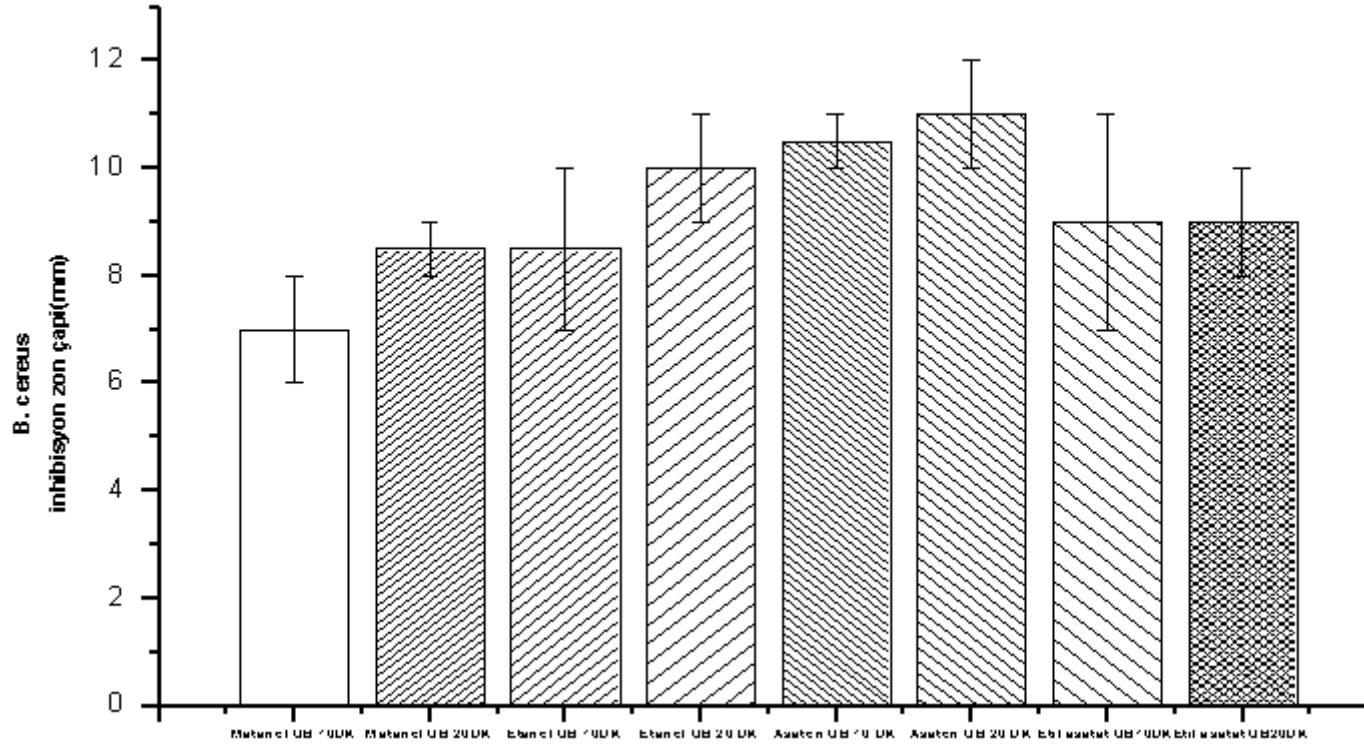




Şekil 4.7. Ultrases uygulama ile ekstrakte edilmiş viyolasin örneklerinin *S. aureus* ATCC 4300 (MRSA) için kuyucuk difüzyon yöntemiyle elde edilmiş inhibisyon zon çapları (mm).

Viyolasin ekstraksiyonu için kullanılan çözücülerden etanolün, 10dk (11mm) ve 20dk (11mm) ultrases uygulama ekstraktlarının metanol 10dk (11.5mm) ve 20dk (13mm) örneklerine göre daha düşük inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak sonuçlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir. Ayrıca etil asetat ile ekstrakte edilen örneklerin *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) suşu üzerinde etkisiz olduğu tespit edilmiştir.

Viyolasin ekstraksiyonu için ultrases uygulama kullanılarak aseton 10dk (10.5mm) ve 20dk (11mm) ile ekstrakte edilen örneklerin *B. cereus* ATCC 11778 suşu üzerine antibakteriyel etkilerinin en yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Ultrases uygulama ile ekstrakte edilmiş viyolasin örneklerinin *B. cereus* ATCC 11778 için kuyucuk difüzyon yöntemiyle elde edilmiş inhibisyon zon çapları (mm)

Viyolasin ekstraksiyonu için kullanılan çözücülerden etanolün, 10dk (8.5mm), 20dk (10mm) ve etil asetatın, 10dk (9mm) ve 20dk (9mm) ultrases uygulama ekstraktlarının aseton 10dk (10.5mm) ve 20dk (11mm) örneklerine göre daha düşük inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak sonuçlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir.

Daha sonra bu örneklerin *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) *B. cereus* ATCC 11778 için MİK değerleri belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Ultrases uygulaması ile elde edilen ekstraktların *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300 ve *B. cereus* ATCC 11778 için % MİK(hacim/hacim) değerleri (*:MİK değeri test edilen derişimin üstündedir veya yoktur).

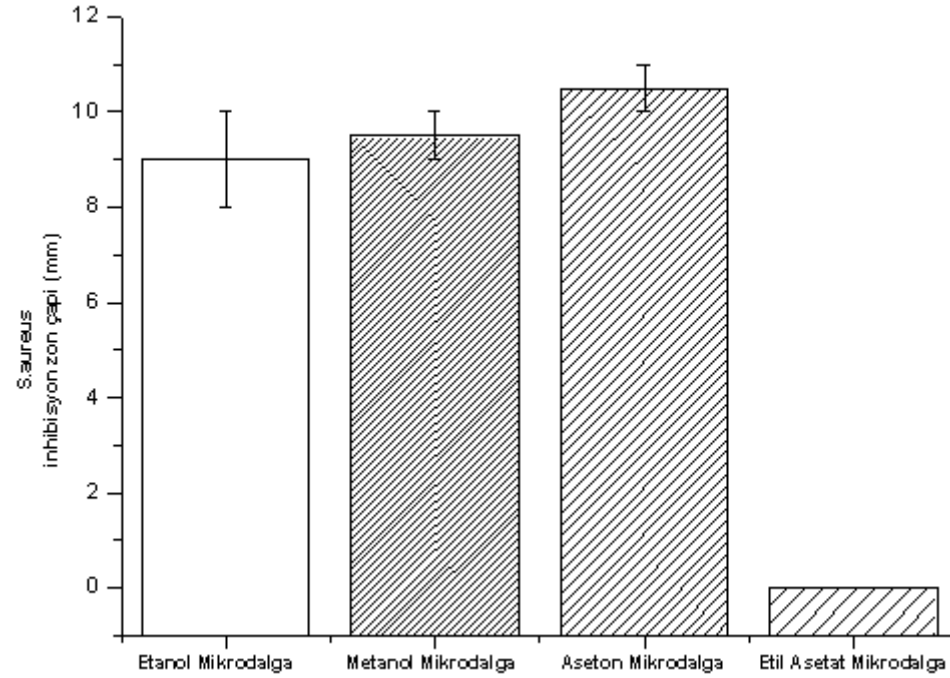
Örnek ismi	% MİK Değerleri (hacim/hacim)		
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>B. cereus</i> ATCC 11778
Etanol 10dk	*	*	7.5
Etanol 20dk	3.75	3.75	1.875
Metanol 10dk	3.75	1.875	3.75
Metanol 20dk	3.75	3.75	1.875
Aseton 10dk	*	*	3.75
Aseton 20dk	3.75	*	3.75
Etil Asetat 10dk	*	*	7.5
Etil Aseat 20dk	*	*	7.5

Ultrases uygulama ile elde edilen viyolasin örneklerinin *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) için antibakteriyel etkisi olduğu tespit edilmiştir. Ancak viyolasin örneklerinin *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 6051 için antibakteriyel etkisi olmadığı tespit edilmiştir. En yüksek antibakteriyel etkinlik, etanol ve metanol ile ekstrakte edilen viyolasin örnekleri için tespit edilirken; daha sonra sırasıyla aseton ve etil asetat ile ekstrakte edilen viyolasin örnekleri etkili bulunmuştur.

4.2.2. Mikrodalga yöntemi ile ekstrakte edilen viyolasin örneklerinin antibakteriyel etkilerinin incelenmesi

Viyolasin ekstraksiyonu için mikrodalga kullanılarak aseton (11mm) ile ekstrakte edilen örneklerin *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerine antibakteriyel etkilerinin en yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9).

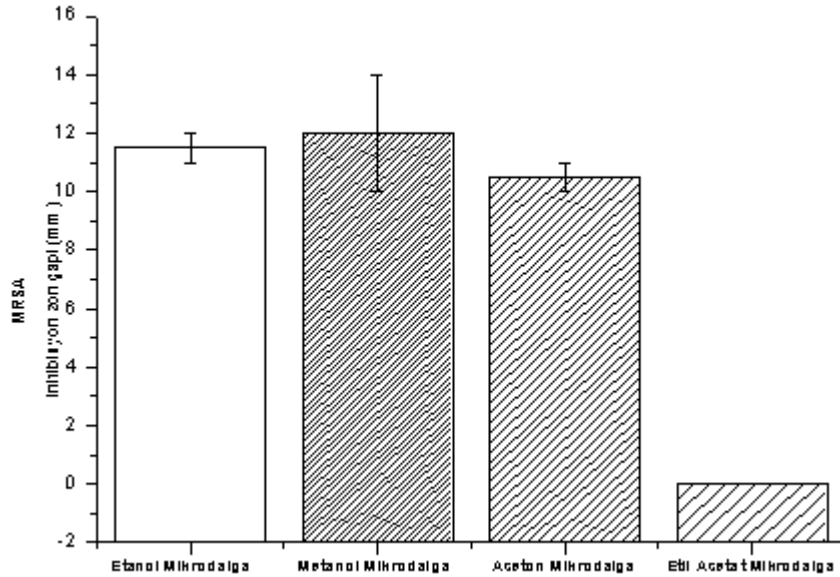




Şekil 4.9. Mikrodalga ile ekstrakte edilmiş viyolisin örneklerinin *S. aureus* ATCC 25923 için kuyucuk difüzyon yöntemiyle elde edilmiş inhibisyon zon çapları (mm).

Viyolasin ekstraksiyonu için kullanılan çözücülerden metanol (9.5mm) ve etanol (9mm) ile ekstrakte edilen örneklerinin aseton (11mm) ile ekstrakte edilen örneklerinden daha düşük inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak sonuçlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir. Etil asetat ile ekstrakte edilen örneklerin ise *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerinde etkisiz olduğu tespit edilmiştir.

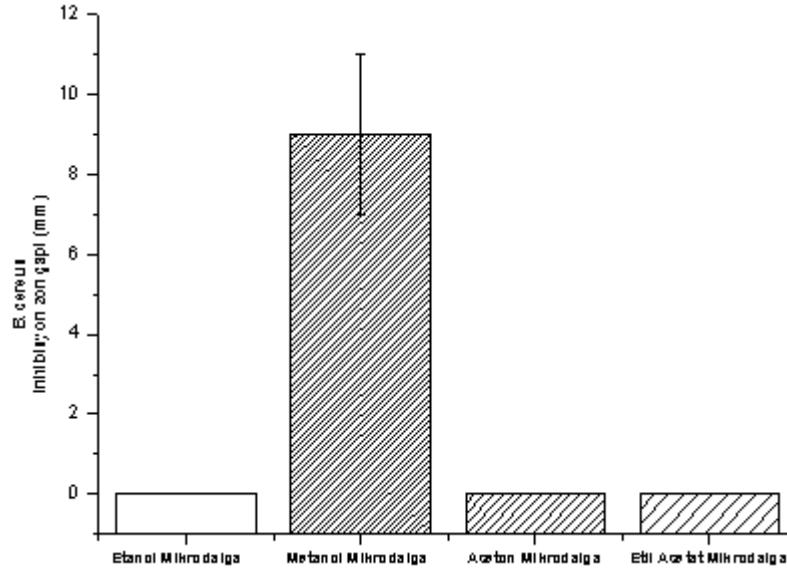
Viyolasin ekstraksiyonu için mikrodalga kullanılarak metanol (12.5 mm) ile ekstrakte edilen örneklerin *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) suşu üzerinde antibakteriyel etkilerinin en yüksek olduğu tespit edilmiştir. (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Mikrodalga ile ekstrakte edilmiş viyolasin örneklerinin *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) için kuyucuk difüzyon yöntemiyle elde edilmiş inhibisyon zon çapları (mm).

Viyolasin ekstraksiyonu için kullanılan çözücülerden aseton (10.5mm) ve etanol (11.5mm) ile ekstrakte edilen örneklerinin metanol (12.5mm) ile ekstrakte edilen örneklerinden daha düşük inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak sonuçlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir. Etil asetat ile ekstrakte edilen örneklerin *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) üzerinde antibakteriyel etkisi tespit edilmemiştir.

Viyolasin ekstraksiyonu için mikrodalga kullanılarak metanol (9mm) ile ekstrakte edilen örneklerin *B. cereus* ATCC 11778 suşu üzerinde antibakteriyel etkilerinin en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Aseton, etil asetat ve etanol ile ekstrakte edilen örneklerin ise bu suş üzerinde antibakteriyel etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Mikrodalga ile ekstrakte edilmiş viyolasin örneklerinin *B. cereus* ATCC 11778 için kuyucuk difüzyon yöntemiyle elde edilmiş inhibisyon zon çapları (mm).

Daha sonra bu örneklerin *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300, *B. cereus* ATCC 11778 için MİK değerleri belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

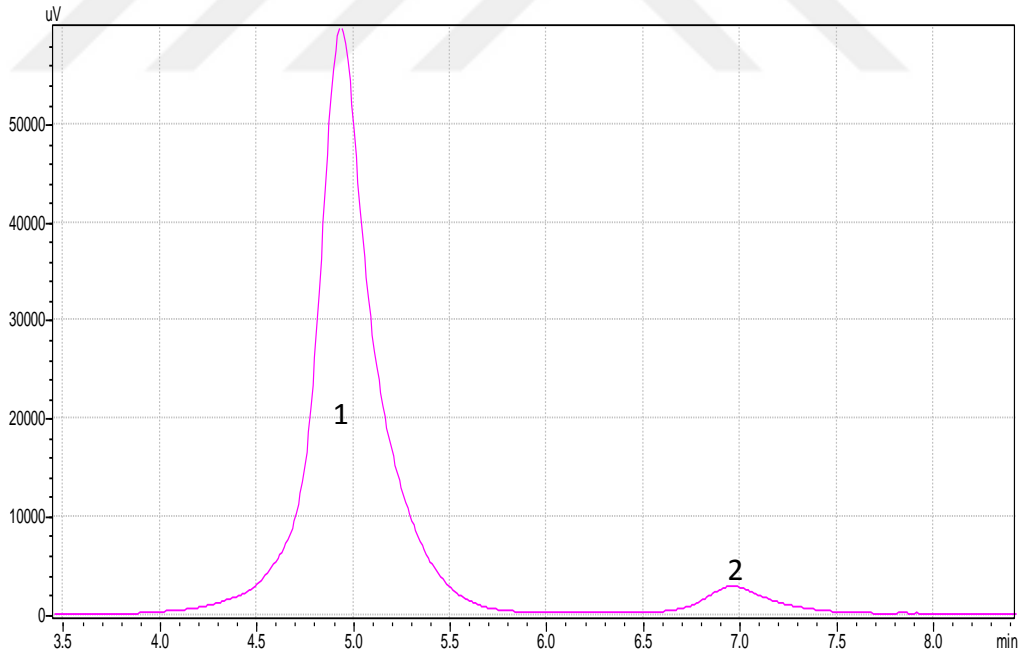
Çizelge 4.2. Mikrodalga uygulaması ile elde edilen ekstraktların *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300 ve *B. cereus* ATCC 11778 için % MİK(hacim/hacim) değerleri (*:MİK değeri test edilen derişimin üstündedir veya yoktur).

Örnek ismi	% MİK Değerleri (hacim/hacim)		
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>B. cereus</i> ATCC 11778
Etanol	*	3.75	3.75
Metanol	7.5	3.75	3.75
Aseton	7.5	*	3.75
Etil Asetat	*	*	*

Mikrodalga ekstraksiyon yöntemi ve ultrases ekstraksiyon yöntemleriyle ekstrakte edilen viyolasinin *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) adlı suşlar üzerinde antibakteriyel etkiye sahip olduğu ancak *P. aeruginosa* ATCC 27850, *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 6051 suşları üzerinde antibakteriyel etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Ek olarak bu sonuçlar *S. aureus* (MRSA) adlı çoklu direnç gösteren patojen bakterinin viyolasine karşı duyarlı olduğunu göstermektedir. En yüksek inhibisyonun ultrases uygulama ile ekstrakte edilen örneklerden elde edildiği tespit edilmiştir. Ancak sonuçlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir.

4.3. Viyolasin miktarlarının HPLC ile Belirlenmesi

Ultrases uygulama metanol, etanol, etil asetat, aseton ve mikrodalga uygulaması metanol, etanol, etil asetat, aseton ekstraksiyonu ile elde edilen viyolasin miktarları saf viyolasin standartı kullanılarak mg ekstrakt içinde µg viyolasin ve deoksiviyolasin olarak HPLC kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 4.12).

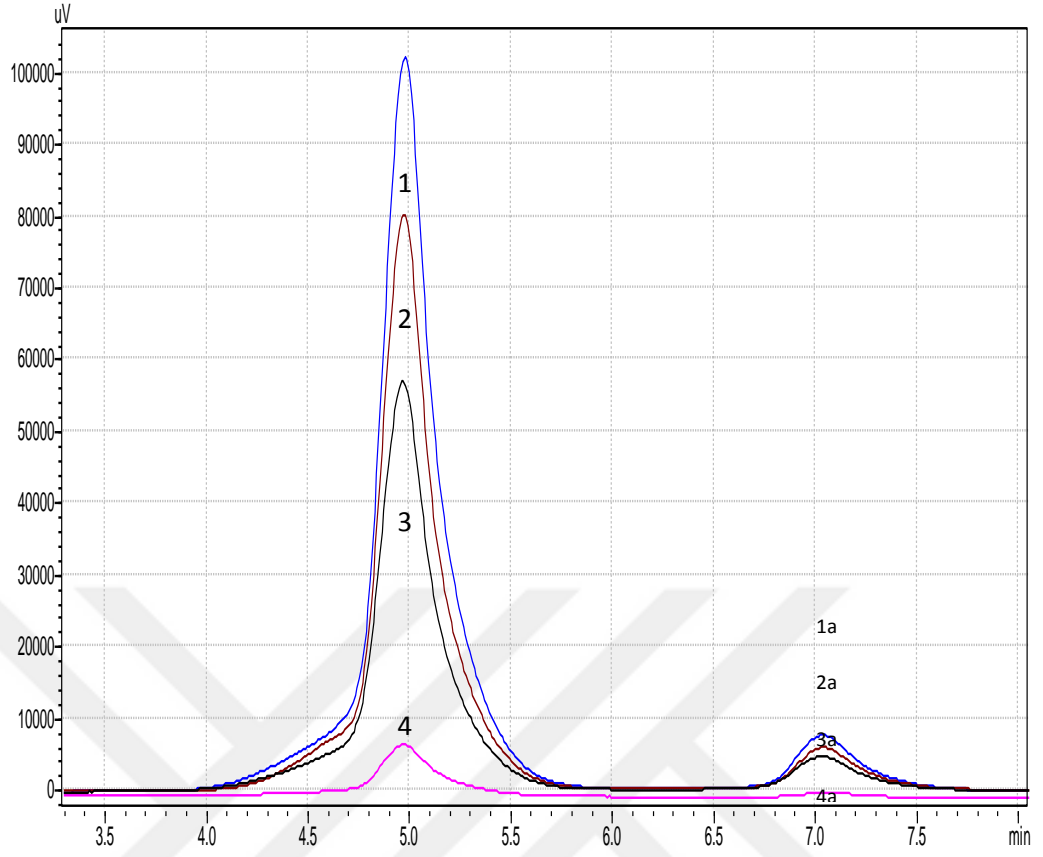


Şekil 4.12. Saf viyolasin (1) ve deoksiviyolasin (2) HPLC kromatogramı.

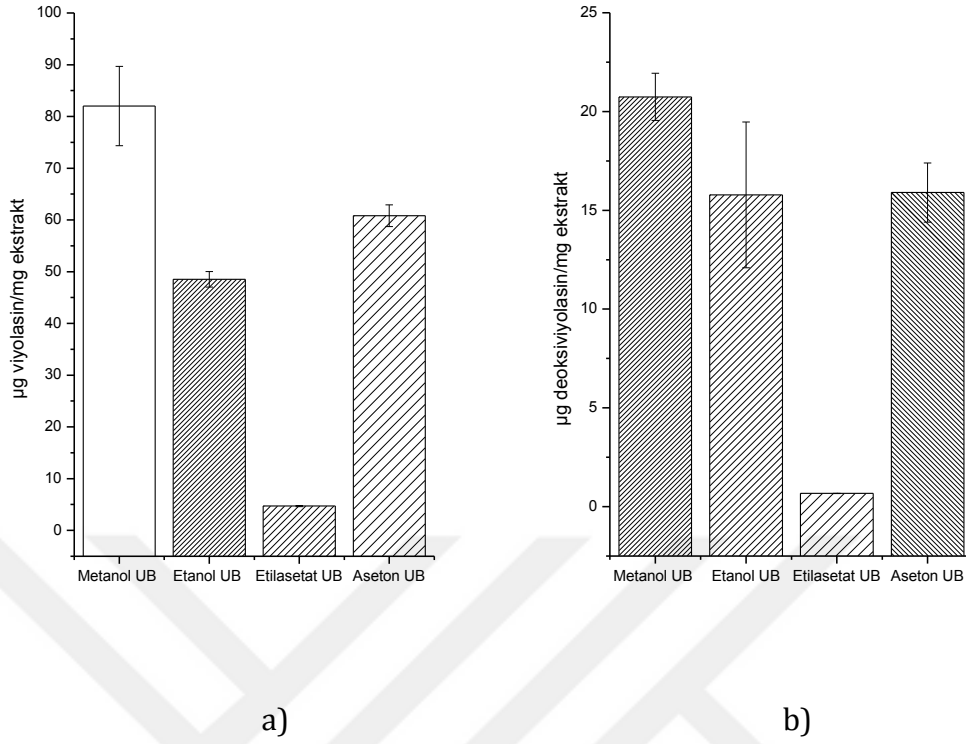
HPLC sonuçlarına göre, ultrases uygulama ile farklı çözücülerin ekstraktları karşılaştırıldığı zaman en yüksek derişimde viyolasin ve deoksiviyolasinin metanol ekstraksiyonu (82.0 ± 7.7 μg viyolasin/mg ekstrakt, 20.7 ± 1.2 μg deoksiviyolasin/mg ekstrakt) ile elde edildiği tespit edilirken en düşük derişimde viyolasin ve deoksiviyolasinin etil asetat ekstraksiyonu (4.7 ± 0.1 μg viyolasin/mg ekstrakt: 0.67 ± 0.002 μg deoksiviyolasin/mg ekstrakt) ile elde edildiği belirlenmiştir (Şekil 4.13, 4.14, 4.5, Çizelge 4.1).

Çizelge 4.3. Ultrases uygulama ve mikrodalga uygulaması ile metanol, etanol, etilasetat ve aseton ekstraktlarına ait viyolasin ve deoksiviyolasin değerleri (μg viyolasin/mg ekstrakt).

	Viyolasin		Deoksiviyolasin	
Örnekler	μg viyolasin/mg ekstrakt	SD	μg viyolasin/mg ekstrakt	SD
Ultrases Uygulaması				
Metanol UB	82.0	7.7	20.7	1.2
Etanol UB	48.5	1.5	15.8	3.7
Aseton UB	60.8	2.1	15.9	1.5
Etil Asetat UB	4.70	0.12	0.670	0.002
Mikrodalga Uygulaması				
Metanol M	68.8	4.4	17.2	2.3
Etanol M	44.5	1.0	11.9	1.1
Aseton M	49.8	3.8	15.7	1.2
Etil Asetat M	5.9	0.1	3.4	0.1

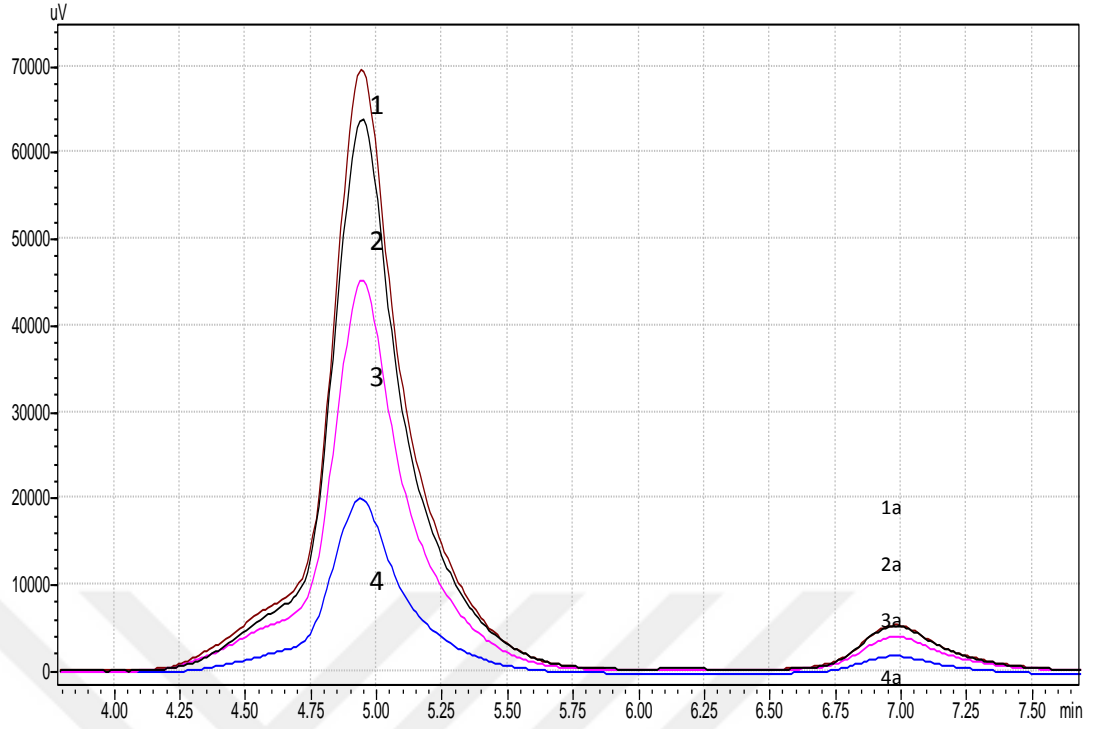


Şekil 4.13. Ultrases uygulama ile metanol, etanol, etilasetat ve aseton ekstraktlarına ait HPLC kromatogramı viyolasin 1: Metanol, 2: Aseton, 3: Etanol, 4: Etil asetat ekstraktı; deoksiviyolasin 1a: Metanol, 2a: Aseton, 3a: Etanol, 4a: Etilasetat ekstraktı.

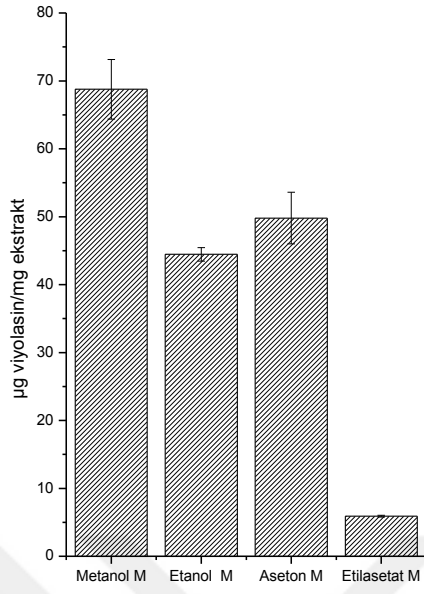


Şekil 4.14. Ultrases uygulama ile metanol, etanol, etil asetat ve aseton ekstraktlarına ait mg ekstrakt içinde µg viyolasin (a) ve deoksiviyolasin(b) miktarları.

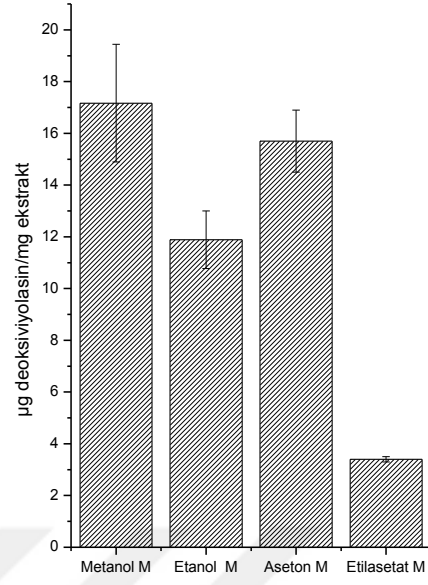
HPLC sonuçlarına göre, mikrodalga ile farklı çözücülerin ekstraktları karşılaştırıldığı zaman en yüksek derişimde viyolasin ve deoksiviyolasinin metanol ekstraksiyonu (68.8 ± 4.4 µg viyolasin/mg ekstrakt, 17.2 ± 2.3 µg deoksiviyolasin/mg ekstrakt) ile elde edildiği tespit edilirken en düşük derişimde viyolasin ve deoksiviyolasinin etil asetat ekstraksiyonu (5.9 ± 0.1 µg viyolasin/mg ekstrakt: 3.4 ± 0.1 µg deoksiviyolasin/mg ekstrakt) ile elde edildiği belirlenmiştir (Şekil 4.15, 4.16, 4.7, Çizelge 4.1).



Şekil 4.15. Mikrodalga uygulaması ile metanol, etanol, etilasetat ve aseton ekstraktlarına ait HPLC kromatogramı viyolasin 1: Metanol, 2: Aseton, 3: Etanol, 4: Etilasetat ekstraktı; deoksiviyolasin 1a: Metanol, 2a: Aseton, 3a: Etanol, 4a: Etilasetat ekstraktı



a)

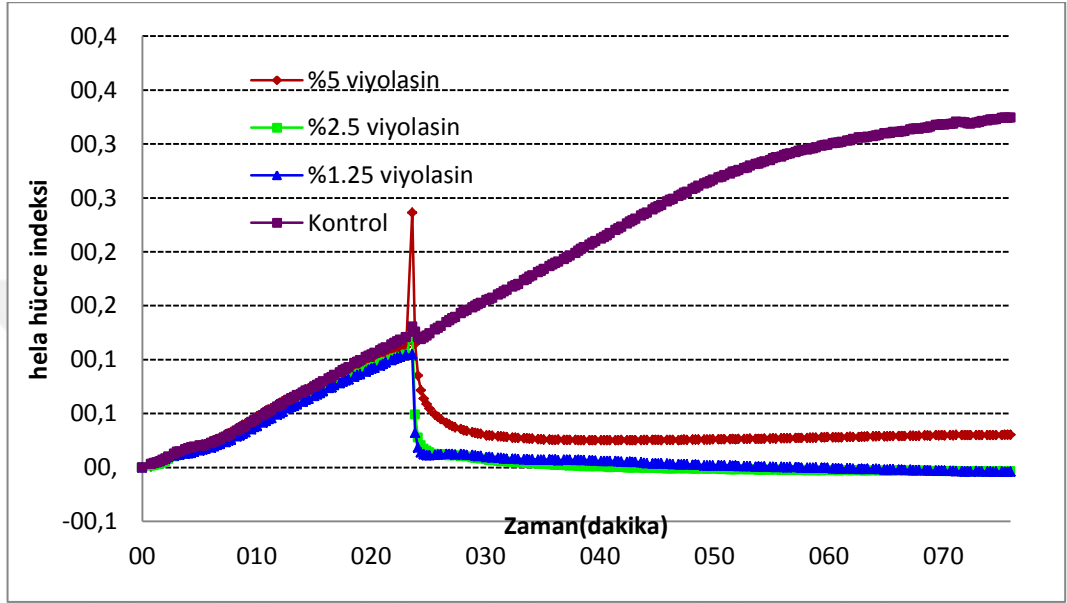


b)

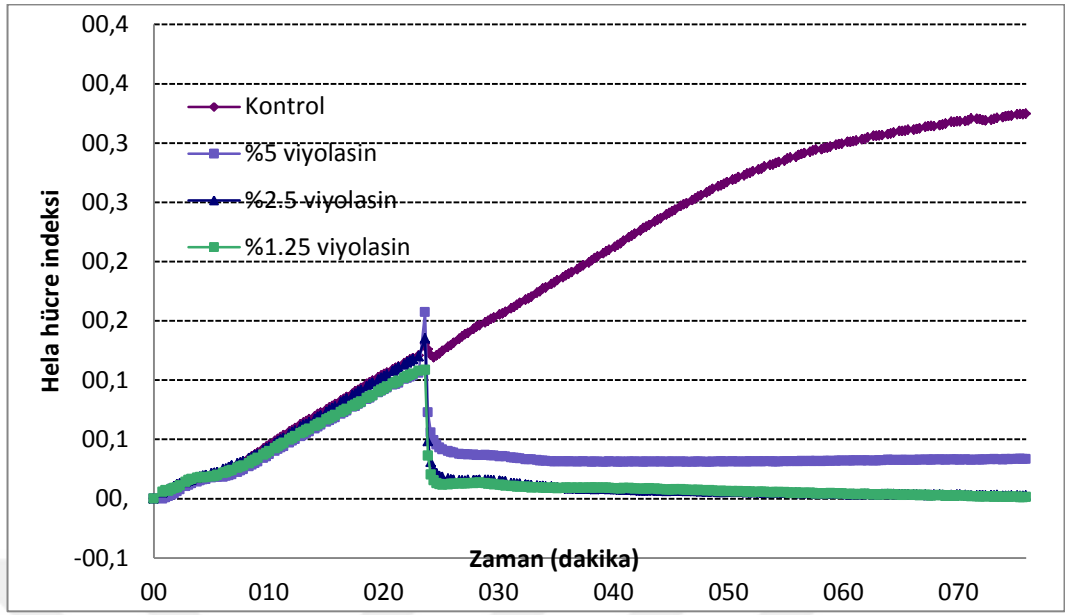
Şekil 4.16. Mikrodalga uygulaması ile metanol, etanol, etilasetat ve aseton ekstraktlarına ait mg ekstrakt içinde μg viyolasin (a) ve deoksiviyolasin(b) miktarları

4.4. Viyolasinin HeLa Hücreleri Üzerine Etkileri

Viyolasinin HeLa hücreleri üzerinde antikanser etkileri incelenmek üzere ultrases ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilen viyolasin örneklerinden etanol 10dk, metanol 10dk örnekleri seçilmiştir.



Şekil 4.17. Ultrases uygulama Etanol ekstraktının HeLa hücreleri üzerine etkisi



Şekil 4.18. Ultrases uygulama Metanol ekstraktının HeLa hücreleri üzerine etkisi

Ultrases uygulama Metanol ekstraktının HeLa hücreleri üzerine etkisi incelenmek üzere seçilen viyolasin ekstraktlarının (etanol, metanol) değişen konsantrasyonlarında (%5, %2.5, %1.25) 20. dakikadan itibaren HeLa hücrelerini tamamen öldürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.17, 4.18).

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Günümüzde yaşam ve çalışma koşullarının değişmesi, ilaç tüketimlerine özen gösterilmemesi ve gereksiz fazla miktarda antibiyotik kullanımına bağlı olarak bakterilerin antibiyotik dirençlerinin artması, teknolojinin gelişmesiyle hazır gıdaların daha fazla tüketilmesi ve bunların içeriğinde bulunan katkı maddeleri, aşırı sigara tüketimi gibi etkenlerden dolayı artan kanser vakaları, buna bağlı olarak gelişen hastalık çeşitlerinin artması üzerine yeni tedavi yöntemleri ve alternatif yeni ilaç arayışı her geçen gün artmaktadır. Doğada keşfedilmeyi bekleyen pek çok molekül (pigmentler vs.) yeni tedavi yöntemleri ve alternatif ilaç üretimine katkı sağlamaktadır. Bu doğal moleküllerden biri olan viyolasin önemli biyolojik aktiviteler ve farmakolojik özelliklere sahip doğal antibiyotik olarak nitelendirilmektedir. Daha önceki çalışmalarda viyolasinin antibakteriyel ve kanser hücrelerinin büyümesini inhibe etme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir (Melo vd., 2000; Duran ve Menck, 2001; Melo vd., 2003; Ferreira vd., 2004; de Carvalho vd., 2006; Kodach vd., 2006; Duran vd., 2007; Mehta, 2012).

Bu çalışmanın amacı, *C. violaceum* ATCC 12472 suşundan daha önce viyolasin ekstraksiyonu için kullanılmamış ultrases ve mikrodalga yöntemleri uygulanarak, ekstrakte edilen viyolasinin antikanser ve antibakteriyel özelliklerinin incelenmesidir. Konu ile ilgili olarak yurt dışında çalışmalar bulunmasına rağmen, ülkemizde yapılmış çalışma bulunmamaktadır.

C. violaceum ATCC 12472 suşundan ekstrakte edilen viyolasin güçlü antibakteriyel etkilere sahiptir. Antibakteriyel özelliğinin yanı sıra antibiyotiklerle kombinasyon halinde uygulandığında viyolasinin etkinliğini arttırdığı tespit edilmiştir. Memelilerde *S. aureus* ve *E. coli* mastite neden olan etiyolojik ajanlardır. Genellikle penisilin adlı antibiyotikle tedavisi önerilmektedir. Ancak bu antibiyotiğe karşı *S. aureus* direnç göstermektedir. Viyolasin ile penisilin, mastit enfeksiyonu taşıyan sığırlardan izole edilen *S. aureus* suşlarına birlikte uygulandığında büyümelerini tamamen inhibe ettikleri tespit edilmiştir (Cazoto vd., 2011). Bu şekilde çoklu direnç gösteren patojen bakterilerde (MRSA) dahi etkili olması sebebiyle dikkat çekmiştir. Hatta

insanlarda diş çürümesine neden olan çoklu ilaç direncine sahip *S. mutans* büyümesinde orta seviyeli inhibisyon meydana getirmiştir Bu yüzden geleceğin umut verici antibiyotik adaydır (Patel vd., 2015; Choi vd., 2015).

Yapılan çeşitli antimikrobiyal testlerde farklı konsantrasyonlarda viyolasinin Gram-pozitif bakterilerin büyümesini inhibe etme yeteneğine sahip olduğu görülürken Gram-negatif bakteriler üzerinde oldukça az etkili olduğu tespit edilmiştir (Duran vd., 2007). Ek olarak viyolasin sadece büyüme inhibisyonu değil aynı zamanda bakterilerin ölümüne neden olduğu bilinmektedir. *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) karşı antimikobakteriyel in vitro aktivitesi, rapor edilmiştir (Duran ve De Souza, 2001) Viyolasin *Flavobacterium balustinum*, *Serratia marcescens*, ve *E. coli* gibi Gram-negatif bakteriler de büyümeyi inhibe etmediği rapor edilmiştir (Nakamura vd., 2002). Psikrotrofik bakteri RT102 türünden ekstrakte edilen viyolasin ve deoksiviyolasin karışımının *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* üzerindeki antibakteriyel etkileri incelenmiştir. Sonuç olarak viyolasin Gram- pozitif bakteriler olan *S. aureus*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* ve *B. subtilis* üzerinde artan konsantrasyonlarda büyüme inhibisyonu sergilemiştir. Gram-negatif bakterilerden *P. aeruginosa* ve *E. coli* üzerinde ise büyüme inhibisyonu tespit edilmemiştir (Nakamura vd., 2003). Fakat nanopartikül yüklenen viyolasin *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ve *Salmonella enterica* üzerinde in vitro antibakteriyel etki gösterdiği rapor edilmiştir (Martins vd., 2010).

Bu çalışmada ise *C. violaceum* ATCC 12472 suşundan mikrodalga ve ultrases uygulama yöntemleriyle ekstrakte edilen viyolasinin *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6051, *B. cereus* ATCC 11778, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) suşları üzerindeki antibakteriyel etkileri incelenmiştir. Sonuç olarak ultrases uygulama yöntemi ile ekstrakte edilen örneklerin *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 11778 ve , *S. aureus* ATCC 43300 suşları üzerinde büyüme inhibisyonu gösterdiği tespit edilmiştir. Mikrodalga yöntemiyle ekstrakte edilen örneklerin *S. aureus* ATCC 25923 ve *S. aureus* ATCC 43300 suşları üzerinde büyüme inhibisyonu gösterirken *B. cereus*

ATCC 11778 suşunda ise düşük seviyeli inhibisyon tespit edilmiştir. Ultrases ve mikrodalga yöntemleriyle ekstrakte edilen örneklerden hiçbirinin *B. cereus* ATCC 11778, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *E. coli* ATCC 25922 suşları üzerinde antibakteriyel etkisi tespit edilmemiştir.

C. violaceum ATCC 12472 suşundan ekstrakte edilen viyolasinin lösemi, akciğer kanseri, meme kanseri, serviks kanseri ve kolon kanseri hücre hatlarında inhibe edici etkisi olduğu tespit edilmiştir (Melo vd., 2000 ,2003; Kodach vd., 2006; de Carvalho vd., 2006; Mehta, 2012;). *J. lividum* adlı bakteriden ekstrakte edilen viyolasinin en ölümcül kanser türlerinden biri olan baş ve boyun kanseri hücre hattı üzerinde in vivo ve in vitro etkileri incelendiğinde viyolasinin inhibe edici etki gösterdiği analiz edilmiştir (Masuelli, 2015). MCF-7 insan göğüs kanseri hücrelerinin 48 saat viyolasine maruz bırakılması sonucu bu hücrelerde apoptoza neden olduğu tespit edilmiştir (Alshatwi vd., 2016). Ayrıca viyolasin HL60 lösemik gibi çeşitli kanser hücrelerinde apoptozise neden olurken, normal insan lenfositleri ve monositlerinde etkisiz olduğunun tespit edilmiştir. (Ferreira vd., 2004). Gimenez vd., (2005) tarafından yapılan çalışmada çin hamsteri fibroblast hücreleri üzerinde yüksek konsantrasyonlarda viyolasinin sitotoksosite analizinde hücre canlılığını %50 inhibe ettiği tespit edilmiştir. Fakat insan lösemi hücreleri üzerinde düşük konsantrasyonlarda viyolasinin normal fibroblast hücrelerinden daha fazla toksisiteye sahip olduğu bildirilmiştir. Viyolasin normal hücrelere kıyasla kanser hücreleri üzerinde daha toksik olması klinik kullanım için önemlidir (Duran vd., 2012). Ayrıca HT29, Caco-2, SW480, HCT116, ve DLD1 gibi insan kolon kanser hücrelerinin viyolasine karşı oldukça duyarlı olduğunu tespit edilmiştir (Kodach vd., 2006). De Carvalho vd., (2006) tarafından yapılan çalışmada ise Caco-2 ve HT29 hücreleri 48 saat viyolasine maruz bırakıldıktan sonra Caco-2 hücrelerinde apoptoz daha hızlı gerçekleşirken, HT29 hücreleri direnç göstermiştir. Bu tutarsızlığın Caco-2 ve HT29 arasındaki spesifik hücre özelliklerine bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir. Viyolasinin in vivo ve in vitro çalışmaları sonucunda , Ehrlich asit tümörüne karşı anti-tümör aktivitesi olduğu tespit edilmiştir (Bromberg vd., 2010). De Azevedo vd., (2000) tarafından yapılan çalışmada viyolasin, β -siklodekstrin ile birlikte uygulandığında çin hamsteri V-

79 hücre hatları üzerinde inhibisyonu %15 arttırdığı tespit edilmiştir. Viyolasinin, β -siklodekstrin ile birlikte uygulandığı başka bir çalışmada insanlarda ölümcül olan HL60 (Lösemik) hücre hattı üzerinde antitümör aktivite sergilediği analiz edilmiştir (Melo vd., 2003). Melo vd., (2009) tarafından yapılan ileriki çalışmalarda ise HL60 hücre hattı üzerinde, poli (D, L-laktid-ko-glikolid) adlı nanopartikül yüklü viyolasinin etkilerini incelenmiştir. Sonuç olarak bu karışımın hücrelerde apoptozu tetiklediği tespit edilmiş olup umut verici tedavi adayı olabileceği düşünülmektedir. Değişen konsantrasyonlarda viyolasinin, insan üveal melanom hücre hatları üzerinde (in vitro) %50 oranında inhibisyon sergilediği rapor edilmiştir (Saraiva vd., 2004).

De Carvalho vd., (2006) tarafından yapılan çalışmada *C. violaceum*'dan sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle ekstrakte edilen viyolasinin 48 saat sonunda kolon kanseri hücre hattı üzerinde apoptozise neden olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda viyolasinin farelerde bulunan tümör hücrelerinde büyümeyi azalttığı ve bu farelerin ömürlerini uzattığı tespit edilmiştir (Bromberg vd., 2010).

Mehta (2012) tarafından yapılan çalışmada sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak kanser hücrelerinin büyümesi üzerine etkilerini test etmek için *C. violaceum* 14N23, 14N1, 12472, 140NP, 140P suşlarından ekstratlar hazırlanmıştır. Bu viyolasin ekstratları 0.05 $\mu\text{g/ml}$ ve 0.025 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda kolon, göğüs ve serviks kanseri (HeLa) hücrelerinin canlılığını inhibe etmiş ve anlamlı bir farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Fakat *C. violaceum* 12472 suşundan elde edilen ekstratın HeLa hücreleri üzerinde inhibisyonu diğerlerine kıyasla en az olduğu tespit edilmiştir (Mehta, 2012). Bu çalışmada ise *C. violaceum* ATCC 12472 suşundan etanol 10dk ve metanol 10dk ultrases uygulama ile elde edilen ekstratlarının değişen konsantrasyonlarında (%5, %2.5, %1.25) 20. dakikadan itibaren HeLa hücrelerini tamamen öldürdüğü tespit edilmiştir. Ekstraksiyon yöntemi olarak kullanılan ultrases uygulama yöntemi diğerlerine göre kısa zamanda viyolasin eldesi sağlar. Bu çalışmada farklı ekstraksiyon yöntemi kullanılmasına rağmen viyolasinin kanser hücre hatları üzerindeki inhibisyonu rapor edilen diğer çalışmalarla uyum içindedir.

Ultrases uygulama ile partikül çapının azalması ile, katı ve sıvı kısımlar arasındaki yüzey alanı artar. Ultrasesin mekanik aktivitesi, çözücünün dokulara doğru olan dağılımını hızlandırır. Mekanik olarak hücre duvarı yıkıldığından hücre içi bileşenler, çözücüye kolayca geçmektedir. Wang vd., (2008) tarafından yapılan çalışmada buğday kepeğinden fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu işleminin optimizasyonu sonucunda en uygun işlemin %64'lük etanolla 60°C'de 25 dakika süreyle uygulanan ultrases ekstraksiyonla elde edildiği vurgulanmıştır. Dereotunun ekstraksiyonunda kullanılan ultrason destekli ekstraksiyon sisteminde alınan sonuçların geleneksel ekstraksiyona göre 1.3 - 2 kat daha hızlı olduğu bulunmuştur (İlgün, 2014).

Literatür incelemesinde, mikrodalga ve ultrases uygulama yöntemleri kullanılarak viyolasin ekstraksiyonu yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada ise mikrodalga ve ultrases uygulama yöntemleriyle ekstraksiyon yapılarak elde edilen viyolasin örneklerinin antibakteriyel ve antikanser etki gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu çalışma viyolasinin bilinen özelliklerinin arttırılması, yeni ekstraksiyon yöntemleri eklenmesi, alternatif ilaç ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından önemli olup literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Alshatwia, A., Subash-Babua., P., Antonisamyb P., 2016. Violacein induces apoptosis in human breast cancer cells through up regulation of BAX, p53 and down regulation of MDM2. *Experimental and Toxicologic Pathology* 68 , 89–97.
- 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*. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology*, In press.
- Barreto, E. S., Torres, A. R., Barreto, M. R., Vasconcelos, A. T. R., Astolfi-Filho, S. & Hungria, M., 2008. Diversity in antifungal activity of strains of *Chromobacterium violaceum* from the Brazilian Amazon. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, 783–790.
- Beejmohun, V., Fliniaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensaddek, L., Christen, P., Kovensky, J., Fliniaux , M., Mesnard, F., 2007. Microwave-Assisted Extraction Of The Main Phenolic Compounds In Flaxseed. *Phytochemical Analysis*, 18, 275-282.
- Becker, M.H., Brucker, R.M., Schwantes, C.R., Harris, R. N. & Minbiole, K.P.C., 2009. The bacterially produced metabolite violacein is associated with survival of amphibians infected with a lethal fungus. *Applied Environmental Microbiology*, 75, 6635–6638.
- Bergonzini, C. 1881. Um nuevo bacterio colorato, *Ann. Società dei Naturalisti e Matematici di Modena*, 2,149–158.
- Bilton, B.D., Johnson, L.W., 2000. Recurrent Nonfatal *Chromobacterium violaceum* Infection In A Non-immuno Compromised Patient. *Infections In Medicine*, 17, 686–690.
- Blosser, R.S., Gray, K.M., 2000. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for Nacyl homoserine lactone autoinducers. *Journal of Microbiological Methods*, 40: 47–55.
- Bromberg, N., Dura'n, N., 2001. Violacein transformation by peroxidases and oxidases: implications on its biological properties. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 463–467.
- Bromberg, N., Dreyfuss, J.L., Regatieri, C.V., Palladino, M.V., Dura'n, N., Nader, H.B., Haun, M., Justo, G.Z., 2010. Growth inhibition and proapoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor. *Chemico-Biological Interaction*, 186, 43-52.

- Brucker, R.M., Harris, R.N., Schwantes, C.R., Gallaher, T.N., Flaherty, D.C., Lam, B.A., and Minbiole, K.P., 2008. Amphibian chemical defense: antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 1422–1429.
- Büyüktuncel, E., 2011. Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 32(2), 209-242.
- 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, 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. *The Journal of Antibiotics*, In Press
- Chattopadhyay, A., Kumar, V., Bhat, N., Rao, P., 2002. *Chromobacterium violaceum* infection: a rare but frequently fatal disease. *Journal of Pediatric Surgery*, 37,108–110.
- Cellat, K., 2011. Bazı Endemik Bitkilerin Uçucu Yağ Bileşenlerin Ekstrakte Edilmesi ve İçeriklerinin Araştırılması. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 73s, Adana.
- Choi, S.Y., Kim, S., Lyuk, S., Kim A.B., Mitchell, R.J., 2015a. High-level production of violacein by the newly isolated *Duganella violaceinigratr*. NI28 and its impact on *Staphylococcus aureus*. *Scientific Report*, In press.
- Choi, S.Y., Yoon, K., Lee, I.L., Mitchell, R.J., 2015b. Violacein: Properties and Production of a Versatile Bacterial Pigment. 18.11.2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/465056>.
- Chong, C.Y., Lam, M.S. 1997. Case Report and Review of Chromobacterium sepsis-a Gram Negative Sepsis Mimicking Melioidosis. *Singapore Medical Journal*, 38, 263–265.
- Dantas, C., Volpe, P.L.O., Duran, N., Ferreira, M.M.C., 2012. The Violacein Biosynthesis Monitored By Multi-wavelength Fluorescence Spectroscopy and By the parafac Method. 18.11.2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532012005000083>.
- Dias, J., Siqueira, I.C., Ruf, H., Ramost, E.A., Maciel, E.A.P., Rolin, A., Jabur, L., Vasconcelos, Silvano, C., 2005. *Chromobacterium violaceum* in Sibling, Brazil. *Emerging Infectious Diseases journal*, 11(9), 1443–1445.

- De Azevedo, M.B.M., Aldere, J., Rodriguez, J.A., Souza, A.O., Rettrori, D., Torsoni, M.A., Alario, F.A., Haun, M., Duran, N., 2004. Biological Activities of Violacein, a New Antitumoral Indole Derivative, in an Inclusion Complex with β -Cyclodextrin. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 37, 93-101.
- De Moss, R.D. and Evans, N.R., Incorporation of C14-labeled substrates into violacein, 1960. *Journal of Bacteriology*. 79, 729-733.
- De Moss, R.D., Violacein, 1967. *Antibiotics*, 2: 77-81
- De Souza, A.O., Aily, D.C.G., Sato, D.N., Durán, N., 1999. Atividade da violaceina *in vitro* sobre o *Mycobacterium tuberculosis* H37RA. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 58:59-62.
- De Carvalho, D.D., Costa, F.T.M., Duran, N., Haun, M., 2006. Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells. *Toxicology In Vitro*, 20:1514-1521.
- Dura'n, 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-3H-pyrrol-3-ylidene]-1, 3-dihydro-2H-indol-2-one. Brazilian Patent, In press.
- Duran, N., Menck, C.F.M., 2001. *Chromobacterium violaceum*: A Review of Pharmacological and Industrial Perspectives. *Critical Reviews in Microbiology*, 27(3), 201-222.
- Duran, N. De Souza, A.O., 2001. Process for the violacein application as antimycobacterial agent. Brazilian Patent, In press.
- Duran, N., Justo, Z.J., Ferreira, C.V., Melo, P.S., Cordi, L., Martins, D., 2007. Violacin Properties and Biological Activities, In Press.
- Duran, M., Ponezi, A.N., Alario, A.F., Teixeira, M.F.S., Justo, G.S., Duran, N., 2012. Potential Applications of Violacein: a Microbial pigment. *Medicinal Chemistry Research*, 21, 1524-1532.
- Duran, N. De Souza, A.O., 2001. Process for the violacein application as antimycobacterial agent. Brazilian Patent, In press.
- Ergün, A.R., Baysal, T., Bozkır, H., 2013. Ultrases Yöntemi ile Karetonoitlerin Ekstraksiyonu. doi: 10.5505/gida.2013.30074, 38 (4), 239-246.

- Fantinatti, G.F., Almeida, R., Vdo, A.P., Barbosa, T.A., Trevilato, P.B., Neto, C.E., 2004. Drug resistance in *Chromobacterium violaceum*. Genetics and Molecular Research, 3, 134–147.
- Ferreira, C.V., Bos, C.L., Versreeg, H.H., Justo, G.Z., Dura'n, N., Peppelenbosch, M.P., 2004. Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. Blood, 104:1459–1464.
- 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.
- Gimenez, I. F., Anazetti, M. C., Melo, P. S., Haun, M., De Azevedo, M. M. M., Dur'an, N. and Alves, O. L., 2005. Cytotoxicity on V79 and HL60 Cell Lines by Thiolated-Cyclodextrin-Au/Violacein Nanoparticles. Journal of Biomedical Nanotechnology. 1, 352–358.
- Gourson, C., Benhaddou, R., Granet, R., Krausz, P., Verneuil, B., Branland, P., Chauvelon, G., Thibault, J.F., Saulnier, L. 1999. Valorization Of Maize Bran To Obtain Biodegradable Plastic Films. Journal of Applied Polymer Science, 74, 3040–3045.
- Günaydın, M., Erdem, B., 2015. *Chromobacterium violaceum*'un Tanımlanması ve Kullanım Alanları. Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi, 6, 15-18.
- Harrison, J., Ronczka, J., 2013. An Extraction of the Violacein Sequence From pJP101 For Expression and Analysis In pHSG398. The Journal of Innovation Impact, 6, 24-37.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, 64, 580–582.
- İlgün A., 2014. Analitik Kimyada Örnek Hazırlama Teknikleri. Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Bitirme Tezi, 55s, Kayseri.
- Kodach, L.L., CL, Durán, N., Peppelenbosch, M.P., Ferreira, C.V., Hardwick, J.C., 2006a. Violacein Synergistically Increases 5-fluorouracil Cytotoxicity, Induces Apoptosis and Inhibits Akt-mediated Signal Transduction in Human Colorectal Cancer Cells. Carcinogenesis, 27(3) ,508–16.
- Kodach, L.L., Bos, C.L., Dura'n, N., Peppelenbosch, M.P., Ferreira, C.V., Hardwick, J.C.H. ,2006b. Inhibition of Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells by violacein abrogates 5-fluorouracil chemoresistance. Carcinogenesis, 27:508–516

- Kaufmann, B., Christen, P., 2002. Recent extraction techniques for natural products: microwaveassisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical analysis* 13,105–113.
- Kaufmann, B., Rudaz, S., Cerkaoui, S., Veuthey, J.L., Chisten, P., 2007 *Influence Of Plant Matrix On Microwave-Assisted Extraction Process. The Case Of Diosgenin Extracted From Fenugreek*. *Phytochemical Analysis*. 18, 70-76.
- Leal, A.M.S., Queiraz, J.D.F., Medeiros, S.R.B., Lima, T.K.S., Agnez-Lima, L.P., 2015. *Violacein Induces Cell Death By Triggering Mitochondrial Membrane Hyperpolarization In Vitro*. *BMC Microbiology*, 7,15-115.
- 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*. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, In Press.
- Marlon, K., De Marco, D., Cordova, C.A.S., Vieira, T., Antonio, R., Crezynski-Pasa, T.B., 2006. *Antioxidant Properties Of Violacein: Possible Relation On Its Biological Function*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 8307-8313.
- Martins, D., Costa, F.T.M., Brocchi, M., Durán, N., 2010. *Evaluation of the antibacterial activity of poly-(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles containing violacein*. *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 26-40.
- Martins, D., Costa, F.T.M., Brocchi, M., Duran, N., 2011. *Evaluation of the antibacterial activity of poly-(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles containing violacein*. *Journal of Nanoparticle Research*, 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.
- Mehta, T.R., 2012. *Effect of Violacein Extracted from Different Chromobacterium violaceum Strains on Growth of Cancer Cells*. Tennessee State University, M.Sc Thesis, 46p, ABD.
- Melo, P.S., Maria, S.S., Vidal, B.C., Haun, M., Duran, N., 2000. *Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells*. *Cellular & Developmental Biology - Animal*, 36,539–543.
- Melo, P.S., Justo, G.Z., De Azevedo, M.B.M., Durán, N.M., 2003. *Violacein and its beta-cyclodextrin complexes induce apoptosis and differentiation in HL60 cells*. *Toxicology*, 186, 217–225.

- Melo, P.S., De Azevedo, M.M., Frungillo, L., Anazetti, M.C., Marcato, P. D., Durán, N., 2009. Nanocytotoxicity: Violacein and Violacein-Loaded Poly (*D, L*-lactide-co-glycolide) Nanoparticles Acting on Human Leukemic Cells. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10, 192-201.
- Mendes, A.S., Carvalho, J.H., Duarte, M.C.T., Duran, N., Bruns, R.E., 2001. Factorial Design And Response Surface Optimization of Crude Violacein For *Chromobacterium violaceum* Production. *Biotechnology Letters*, 23, 1963–1969.
- Moore, C., Lane J., Stephens, J., 2001. Successful Treatment of An Infant With *Chromobacterium violaceum* Sepsis. *Clinical Infectious Diseases*, 32(6), 107–110.
- 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. *Biochemical Engineering Journal*, 12, 79–86.
- Nakamura, Y., Asada, C., Sawada, T., 2003. Production of antibacterial violet pigment by psychrotropic bacterium RT102 strain. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8,37–40.
- Nakata, H., Yamauchi T., Fujisawa, H. 1979. Phenylalanine Hydroxylase From *Chromobacterium violaceum*. Purification and Characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(6), 1829-33.
- Page, A.M., 2015. The Antibacterial Activity of Tryptophan-derived Pigments Violacein and Deoxychromoviridans on Four Common Bacterial Strains. 22.10.2015. http://digitalcommons.bard.edu/senproj_f2015/22/.
- Patel, P., Ali, A.k., Nair, Nishith, N., Kothari., 2015. In vitro Antibacterial Activity of *Manilkara hexandra* (Sapotaceae) Seed Extracts and Violacein against Multidrug Resistant *Streptococcus mutans*. *Journal of Natural Remedies*, 2320-3358.
- Petrillo, V.F., Severo, V., Santos, M.M., Edelweiss, E.L., 1984. Recurrent infection with *Chromobacterium violaceum*: first case report from South America. *Journal Infect*, 9, 167–169.
- Ponte, R. and Jenkins, S.G., 1992. Fatal *Chromobacterium violaceum* infections associated with exposure to stagnant water. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 11, 583–586.
- Rahman, M.R.T., Lou, Z., Yu, F., Wang, P., Wang, H., 2015. Anti-quorum sensing and anti-biofilm activity of *Amomum tsaoko* (*Amomum tsaoko* Crevost et Lemarie) on foodborne pathogens. *Saudi Journal of Biological Sciences*, In Press.

- Rettori, D. 1996. Production, Extraction and Purification of Violacein: An Antibiotic Produced by *Chromobacterium violaceum*. M.Sc. Thesis. Chemistry Institute, Universidade Estadual de Campinas, Brazil.
- 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). *Journal of Microbiology*, 10, 694-701.
- Singh, P.D., Liu, W.C., Gougoutas, J.Z., Malley, M.F., Porubcan, M.A., Trejo, W.H., Wells, J.S., Sykes, R.B., 1988. Aerocavin, a New Antibiotic Produced by *Chromobacterium violaceum*. *The Journal of Antibiotics*, 41(4), 446-453.
- Sivendran, R., Tan, S.H., 1977. Pathogenicity of nonpigmented cultures of *Chromobacterium violaceum*. *Journal Clinical. Microbiology*, 5, 514-516.
- Snounou, G., A. C. Gruner, C. D. Müller-Graf, D. Mazier, and L. Re'nia, 2005. The *Plasmodium* sporozoite survives RTS,S vaccination. *Trends Parasitology*, 21,456-461.
- Saraiva, V.S., Marshall, J.C., Cools-Lartigue, j., Burnier, M.N.Jr., 2004. Cytotoxic effects of violacein in human uveal melanoma cell lines. *Melanoma research*, 14, 421-424.
- Tadeo, J.L., Sanchez-Brunete, C., Albero, B., Garcia-Valcarcel, A.I., 2010. Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soilsamples. *Journal of Chromatography*, 1217(16), 2415.
- Vinatoru M, Toma M, Mason TJ. 1999. Ultrasound-assisted extraction of bioactive principles from plants and their constituents. In *Advances in Sonochemistry*, 5, 209-248.
- Wooley, P.G., 1905. *Bacillus violaceus manilae* (a pathogenic organism), *The Johns Hopkins Medical Journal*. 16, 89-90.
- Zimmerman, B., 1881. Review of Bergonzini on *Cromobacterium*. *Botanisches Centralblatt*, 4, 1528-1530.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Çağdaş Deniz PERİZ

Doğum Yeri ve Yılı : Rize, 1990

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : denizperiz@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Fener YDA Lisesi, 2008

Lisans : SDÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü