



***Streptomyces bottropensis* SY8 KÖKENLİ MELANİNİN
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Şevval YILDIRIM

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Prof. Dr. Mesut TAŞKIN

2024

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

***Streptomyces bottropensis* SY8 KÖKENLİ MELANİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

(Investigation of Biological Activities of *Streptomyces bottropensis* SY8-Derived Melanin)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şevval YILDIRIM

Danışman: Prof. Dr. Mesut TAŞKIN

Erzurum
Aralık, 2024

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Şevval YILDIRIM tarafından hazırlanan “*Streptomyces bottropensis* SY8 KÖKENLİ MELANİNLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı çalışması 27 / 12 / 2024 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve genetik Bilim Dalında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ <i>Erzurum Teknik Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Mesut TAŞKIN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Özkan BALTAÇI <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Akif ÖMEROĞLU <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
İkinci Tez Danışmanı:	Doç. Dr. Nazlı Pınar ASLAN <i>Bingöl Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim Kurulunun
.../.../.... tarih ve
sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Alper NUHOĞLU

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Mesut TAŞKIN danışmanlığında sunulan “*Streptomyces bottropensis* SY8 KÖKENLİ MELANİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümlerİ	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	16	30
Kuramsal Temeller	11	30
Materyal ve Yöntem	8	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	6	20
Sonuç ve Öneriler	0	20
Tezin Geneli	12	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olraması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Şevval YILDIRIM	Prof. Dr. Mesut TAŞKIN
tarih	tarih
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren, destekleyen ve çalışmama katkı sağlayan değerli danışmanım Prof. Dr. Mesut TAŞKIN'a, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda eğitimim süresince emeği geçen bölüm hocalarıma, yüksek lisansım boyunca desteklerini her zaman hissetmiş olduğum, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayıp yardımını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım; Meryem DOYMUŞ, Fatih KAYAR, Fatma Üneş ALTINOK, Elvan EROĞLU, Ayşenur ÖZDEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayata dair her alanda yanımda olan, çalışmalarım süresince beni destekleyen Mert ÇELİK'e, bu süreçte sevgileri, fedakarlıkları ve her daim yanımda olarak bana güç veren, bugünlere gelmemde büyük emekleri olan kıymetli ailem; annem Saliha YILDIRIM, babam Orhan YILDIRIM, abim Cihat Taha YILDIRIM ve kardeşim Orhun YILDIRIM'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Şevval YILDIRIM

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Streptomyces bottropensis SY8 KÖKENLİ MELANİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Şevval YILDIRIM

Danışman: Prof. Dr. Mesut TAŞKIN

Amaç: Bakteri kaynaklı pigmentlerin en bilinenleri melaninler, karotenoidler, prodigiozin, viyolasin, piyosiyenin, bakteriyoklorofiller ve monasinlerdir. Melaninler, UV, güneş ve gama radyasyonuna karşı koruyucu bir rol oynar ve ağır metal toksisitesine karşı dayanıklılık sağlar. Bu çalışma, hücre dışı melanin üretebilen yeni bir *Streptomyces* suşunun izole edilmesi ve bu izolattan saflaştırılan melaninin biyolojik aktivitelerinin araştırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Yöntem: İzolasyon deneyleri tirozin agar besiyerinde gerçekleştirilmiştir. İzolatların melanin üretim yetenekleri tirozin broth besiyeri ortamında test edilmiştir. Melanin üretici en iyi izolatan tanımlanması 16S rRNA dizi analizine göre gerçekleştirilmiştir. Bu izolatanın melanin üretme yeteneğini artırmak için, farklı besiyerleri, kültür pH' ları, sıcaklıklar ve inkübasyon süreleri test edilmiştir. Melanin saflaştırılması asit çöktürmesi (5N HCl) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan melaninin karakterizasyonu için, fonksiyonel grup analizi (FTIR) ve dalga boyu taraması (UV-VIS spektrofotometre) yapılmıştır. Melaninin *in vitro* antioksidant aktivitesi DPPH, ABTS, hidroksil (OH•) ve süperoksit (O₂•) radikallerine karşı test edilmiştir. Melaninin sitotoksitesisi, deri yaşlanma karşıtı (H₂O₂ ile indüklenen hücre yaşlanması) ve yara iyileştirme özellikleri (çizik yöntemi) *in vitro* da L929 hücre hattı (fare fibroblast hücre hattı) üzerinde araştırılmıştır. Melaninin irritasyon özelliği Tavuk yumurtası-koryoallantoik membran (HET-CAM) testine, antibakteriyel özelliği ise kuyu-difüzyon yöntemine göre analiz edilmiştir.

Bulgular: Toplam 18 bakteri izolatu arasında, patates tarlası toprağından izole edilen SY8 suşunun en fazla melanin ürettiği belirlenmiştir. Bu izolat *S. bottropensis* (GenBank: PQ565816) olarak teşhis edilmiştir. Bu izolattan maksimum melanin üretimi PYITB (pepton-maya ekstraktı-demir-tirozin broth) besiyerinde başarılmıştır. Melanin üretimi için diğer optimal parametrelerin pH 8, 30°C' lik sıcaklık ve 168 saatlik inkübasyon süresi olduğu belirlenmiştir. Saflaştırılan melanin için maksimum absorbans 235 nm'de ölçülmüştür. FTIR analizlerinde, melanin yapısını işaret eden absorbans bandları tespit edilmiştir. Melaninin, DPPH, ABTS, OH• ve O₂• radikallerini etkisizleştirebildiği belirlenmiştir. Melanin L929 hücreleri üzerinde sitotoksitesiteye neden olmamış ancak ve H₂O₂ ile indüklenen hücre yaşlanmasını azaltabilmiştir. HET-CAM testi melaninin irritasyona neden olmadığını, kuyu-difüzyon testi ise melanin antibakteriyel etkinliğe sahip olmadığını ortaya çıkardı. Çizik testi ise kontrole oranla melaninin hücre göçünü ve yara kapanmasını istatistiksel olarak artırdığını ortaya çıkardı.

Sonuçlar: Bu çalışma, *S. bottropensis*'in melanin üretim potansiyeline ilişkin ilk rapordur. Çalışma bu bakteriden elde edilen melaninin, deri yaşlanmasının engellenmesi ve deri yaralarının iyileştirilmesi amacıyla kullanılabileceğini ortaya çıkarmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Streptomyces*, melanin, toprak, izolasyon, biyolojik aktivite

Aralık 2024, 65 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *Streptomyces bottropensis* SY8 - DERIVED MELANIN

Şevval YILDIRIM

Supervisor: Prof. Dr. Mesut TAŞKIN

Purpose: The most well-known pigments of bacterial origin are melanins, carotenoids, prodigiosin, violacin, pyocyanin, bacteriochlorophylls and monacins. Melanins play a protective role against UV, solar and gamma radiation and provide resistance to heavy metal toxicity. This study was performed to isolate a new *Streptomyces* strain capable of producing extracellular melanin and to investigate the biological activities of melanin purified from this isolate.

Method: Isolation experiments were carried out on tyrosine agar medium. Melanin production potentials of isolates were tested in tyrosine broth medium. Identification of the best melanin producing isolate was carried out according to 16S rRNA sequence analysis. To increase the melanin-producing ability of this isolate, different media, culture pHs, temperatures and incubation times were tested. Purification of melanin was carried out by acid precipitation (5N HCl) method. For the characterization of purified melanin, functional group analysis (FTIR) and wavelength scanning (UV-VIS spectrophotometry) were performed. The *in vitro* antioxidant activity of melanin was tested against DPPH, ABTS, hydroxyl (OH•) and superoxide (O₂•) radicals. The cytotoxicity, skin anti-aging (H₂O₂-induced cell senescence) and wound healing properties (scratch method) of melanin were investigated *in vitro* on the L929 cell line (mouse fibroblast cell line). The irritation property of melanin was analyzed according to the Chicken egg-chorioallantoic membrane (HET-CAM) test, and its antibacterial property was analyzed according to the well-diffusion method.

Findings: Among the 18 bacterial isolates, the SY8 strain isolated from potato field soil was found to produce the maximum amount of melanin. This isolate was identified as *S. bottropensis* (GenBank: PQ565816). Maximum melanin production from this isolate was achieved in PYITB (peptone-yeast extract-iron-tyrosine broth) medium. Other optimal parameters for melanin production were initial pH of 8, temperature of 30°C and incubation time of 168 hours. The maximum absorbance for purified melanin was measured at 235 nm. In FTIR analyses, absorbance bands indicating the structure of melanin were detected. Melanin could neutralize DPPH, ABTS, OH• and O₂• radicals. It was determined that melanin did not cause cytotoxicity on L929 cells but could reduce H₂O₂-induced cell senescence. The HET-CAM test revealed that melanin did not cause irritation, while the well-diffusion test revealed that melanin did not have antibacterial activity. The scratch test revealed that melanin statistically increased cell migration and wound closure compared to the control.

Conclusions: This study is the first report on the melanin production potential of *S. bottropensis*. The study revealed that melanin obtained from this bacterium can be used to prevent skin aging and heal skin wounds.

Keywords: *Streptomyces*, melanin, soil, isolation, biological activity

December 2024, 65 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	x
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	3
Mikrobiyal Pigment Üretimini Etkileyen Başlıca Faktörler	3
Mikrobiyal pigmentlerin kullanım alanları	3
Melanin	4
Melanin sentezi	9
Pigmentlerin bakterilere sağladığı yararlar	10
Uygulama alanları	11
MATERYAL VE METOT	20
Melanin Üreten <i>Streptomyces</i> Suşlarının İzolasyonu	20
<i>Streptomyces</i> İzolatlarının Melanin Üretim Potansiyeli ve Tirozinaz Aktivitesinin Analizi	20
En üretken izolatın moleküler olarak tanımlanması	21
Çalkalamalı şişe kültüründe melanin üretiminin optimizasyonu	21
Fermantasyon Parametrelerinin Analizi.....	21
Tirozinaz aktivitesinin belirlenmesi	21
Melaninin saflaştırılması.....	22
Saflaştırılmış Melaninin Karakterizasyonu.....	22
Melanin'in suda çözünürlüğü ve UV-vis spektrofotometrik analizi	22
Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) ile melaninin analizi	23
Saflaştırılmış Melaninin <i>In Vitro</i> Antioksidan Aktivitesi	23
Saflaştırılmış Melaninin Sitotoksikite Analizi	24

Hücre içi ROS'un ölçümü.....	25
Saflaştırılmış Melaninin H ₂ O ₂ Kaynaklı Yaşlanmaya Karşı <i>In Vitro</i> Koruyucu Etkisi..	25
Saflaştırılmış Melaninin <i>In Vitro</i> Yara İyileştirme Potansiyelinin Araştırılması	25
Saflaştırılmış Melaninin Antimikrobiyal Özelliğinin Araştırılması	26
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	27
Ekstrasellular Melanin Üreten Mikroorganizmaların İzolasyonu.....	27
SY8 Kodlu İzolatın Moleküler Teşhisi	28
SY8 Kodlu İzolat' dan Melanin Üretiminin Optimizasyonu	29
Melaninin Total Üretimi ve Saflaştırılması	31
Melaninin Karakterizasyonu	31
Melaninin suda çözünürlüğü ve UV-vis spektrofotometrik analizi	31
Melaninin FTIR analizi	32
Saflaştırılmış Melaninin <i>In Vitro</i> Antioksidan Aktivitesi	33
Saflaştırılmış melaninin sitotoksosite analizi.....	34
Melanin H ₂ O ₂ ile İndüklenen Deri Yaşlanmasına Karşı Koruyucu Etkisi	36
Saflaştırılmış Melaninin <i>In Vitro</i> Yara İyileştirme Potansiyeli	36
Saflaştırılmış Melaninin HET-CAM Testi ile İrritasyon Özelliğinin Araştırılması	39
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	41
KAYNAKLAR.....	42
ÖZGEÇMİŞ.....	53

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. İzolatların Pigment ve Tirozinaz Üretme Potansiyelleri	28
--	----



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Streptomyces izolatlarının 16S rRNA dizi analizi sonuçlarına göre filogenetik ağacı.....	29
Şekil 2. SY8 Kodlu İzolat' dan Melanin Üretiminin Optimizasyonu	31
Şekil 3. Saflaştırılan melaninin UV-Vis spektrumu	32
Şekil 4. Saflaştırılmış Melaninin FTIR ile Fonksiyonel Gruplarının Analizi	33
Şekil 5. Saflaştırılan melaninin DPPH (a), ABTS (b), OH• (c) ve O ₂ ^{•-} (d) radikallerine karşı <i>in vitro</i> antioksidant aktiviteleri	34
Şekil 6. Melanin toksisitesinin L929 hücre hattı üzerinde test edilmesi	35
Şekil 7. L929 hücre hattında 4 saatlik inkübasyondan sonra test örneğinin hücre içi ROS düzeyi üzerindeki etkileri	35
Şekil 8. Test örneğinin L929 hücre hattında indüklenen H ₂ O ₂ 'ye (250µM) karşı potansiyel koruyucu etkileri.....	36
Şekil 9. Melaninin zamana bağlı olarak L929 hücre hattında <i>in vitro</i> yara iyileşmesi/çizik testi üzerine etkisi.....	37
Şekil 10. L929 hücre hattında hücre göçünün morfolojik görüntülenmesi.....	37
Şekil 10. L929 hücre hattında hücre göçünün morfolojik görüntülenmesi.....	38
Şekil 11. Test numunesine maruz kalmasından sonra farklı zaman noktalarındaki HET-CAM test sonuçları	39
Şekil 12. Saflaştırılan melaninin antimikrobiyal etkinliğinin test edilmesi	40

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
Da	: Dalton
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DPPH	: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil radikali
EPR	: Elektron Paramagnetik Rezonansı
ESI-MS	: Elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometrisi
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi
HET-CAM	: Tavuk yumurtası testi-koryoallantoik membran
kDa	: Kilodalton
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PKS	: Poliketid sentaz
ROS	: Reaktif oksidatif stres
rRNA	: ribozomal RNA
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel Elektroforez
UV	: Ultraviyole
XRD	: X-Işını Difraksiyon spektroskopisi

GİRİŞ

Pigmentler, genellikle biyolojik, kimyasal veya fiziksel süreçler sonucu oluşan, ışığın 380 ile 750 nm arasındaki dalga boyunu absorbe edebilen ve görünür spektrumun geri kalanını yansıtan moleküler yapılardır (Ramesh *et al.* 2019). Biyolojik terim biliminde pigment; canlılarda bulunan, hücrelerin içindeki granüllerde oluşan, dokularda biriken veya vücut sıvılarında süspansiyon şeklinde bulunan renklendirici maddeler olarak tanımlanmıştır (Aberoumand, 2011).

Doğal pigmentler, mikroorganizmalar, bitkiler, algler, likenler gibi farklı organizmalardan ve minerallerden elde edilen bileşiklerdir. Pigment üreten mikroorganizmalar, renk çeşitliliği bakımından zengindir ve doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Mantarlar ve bakteriler gibi mikroorganizmalar, doğal yollardan elde edilen pigmentlerin kolaylıkla bulunabilen alternatif kaynaklarını oluşturmaktadır (Arulselvi *et al.* 2014). Bakterilerden izole edilen doğal pigmentler, bakteriyel pigmentler olarak ifade edilmektedir. Prodigiosin, viyolasin, melanin bakteriler tarafından üretilen pigmentler arasında yer almaktadır. Literatürde *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Flavobacterium*, *Rhodobacter*, *Pseudomonas* gibi bakterilerin pigment ürettiği rapor edilmiştir. Mikrobiyal fermantasyonun, hammadde eksikliği olmaması, büyük ölçüde parçalanabilir olması, mevsimsel olmaması, daha kolay çıkarımı, daha ucuz üretimi ve daha yüksek verimi gibi ürün üretiminde sayısız avantajı vardır (Devassy *et al.* 2024). Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen başlıca pigmentlere riboflavin, beta-karoten, kantaksantin, prodigiosin, fikosiyenin, melanin, viyolasin, astaksantin ve likopen örnek olarak gösterilebilir (Özdal, 2019; Sen *et al.* 2019). Bu pigmentler gıda, plastik, tekstil, boya, baskı ve kâğıt gibi endüstrilerde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Mikrobiyal pigmentler antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, antiinflamatuvar, antiproliferatif, immün baskılayıcı gibi özelliklere sahiptir (Narsing *et al.* 2017).

Melanin, birçok endüstride çok sayıda biyoteknolojik uygulama için umut vadeden bir biyomalzeme olarak kabul edilen doğal bir pigmenttir. Bakteriler, algler, mantarlar, sefolopodlar ve deniz hıyarında yaygın olarak bulunmaktadır. Eumelaninler, feomelaninler ve allomelaninler olmak üzere üç tip melanin tanınmaktadır. Eumelaninler, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda bulunan baskın formlardır ve bazı mantarlarda görülmektedir; feomelaninler ise memelilere veya kuşlara özgüdür. Her ikisi de tirozin türevleridir, ancak feomelaninler, eumelaninlerdeki indol üniteleri yerine çoğunlukla benzotiazin ve benzotiazol

olmak üzere kükürt içeren monomerik ünitelerden oluşur. Azot içermeyen bitki ve mantar melanini genel olarak allomelanin olarak adlandırılır (Glagoleva *et al.* 2020). Melanin; kararlı serbest radikal durumu, ultraviyole-görünür (UV-Vis) ışık Emilimi ve kompleks oluşturma ve iyon değişimi kapasiteleri gibi benzersiz özellikleri nedeniyle, çok çeşitli biyomedikal ve teknolojik uygulamalar için giderek artan bir ilgi görmektedir (Eom *et al.* 2024).

Melanin pigmenti, sahip olduğu çeşitli biyolojik aktiviteleri nedeniyle sağlık, çevre, gıda, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde önemli potansiyele sahiptir. Antimikrobiyal, antikanser, antioksidan, antiinflamatuvar immünomodülatör, radyoprotektif gibi özellikleri, melanin pigmentini farmasötik ve biyoteknolojik uygulamalarda araştırılmaya değer bir bileşik yapmaktadır (Ghattavi *et al.* 2022; Narsing *et al.* 2017).

Bu özellikler göz önünde bulundurularak yapılan tez çalışmasında; topraktan izole edilen *Streptomyces bottropensis*'in sıvı kültür fermentasyonundan melanin üretimi gerçekleştirilmiştir ve pigmentin antikanser, antimikrobiyal, anti-aging ve yara iyileştirici özellikleri araştırılmıştır.

KURAMSAL TEMELLER

Mikrobiyal Pigment Üretimini Etkileyen Başlıca Faktörler

Mikrobiyal pigmentlerin üretimi, mikroorganizmanın türüne bağlı olarak inkübasyon sıcaklığından etkilenir. Örneğin *Monascus sp.*'nin büyümesi pigment üretimi için 25-28 °C gerektirirken, *Pseudomonas*'ın büyümesi ve pigment üretimi için 35-36 °C gerekir. Mikroorganizmaların yetiştirildiği ortamın pH'ı pigment üretimini etkileyen faktörlerdir. pH'ta ki ufak değişiklikler pigmentin renk tonunda değişikliğe yol açabilir. pH her mikroorganizma türünde farklılık gösterir. Örneğin *Monascus sp.* ve *rhodotorula* için optimum pH sırasıyla 5,5-6,5 ve 4,0-4,5'tir.

Mikroorganizmanın büyümesi ve gelişmesi karbon kaynağının türünden etkilenir. Glikoz ve oligosakkaritleri büyüme ve pigment üretimi için daha iyi karbon kaynaklarıdır. Örneğin *Monascus sp.* için hacimsel pigment oluşumu nişasta ve dekstrin üzerinde en iyi glikoz ve maltoz üzerinde orta düzeyde ancak fruktoz üzerinde zayıftır. Mikrobiyal pigmentlerin üretimi, mikroorganizmaya bağlı olarak azot kaynağından da etkilenir. Örneğin *monascus* pigmentinin üretimi için en iyi kaynak amonyum klorürdür, ardından amonyum nitrat ve glutamat gelir. Örneğin pepton kullanımı *Monascus sp.*'den pigment üretiminde önemli bir rol oynar. Azot kaynağı değişkenliği pigment renginin koyuluğu açıklığı veya bulanıklığı içinde önemlidir (Joshi *et al.* 2003).

Fermentasyonun tekniği bir diğer faktördür. Fermentasyon tekniklerindeki gelişmeler, pigmentlerinin kolay üretilmesine ve saflaştırılmasını sağlamıştır. Katı faz fermentasyonu, derin kültür fermentasyonundan 3 kat daha fazla pigment verir (Kumar *et al.* 2015). Pigment üretiminde mineraller de önemli rol oynar. Çinko (Zn) sıvı ortamda büyümeyi durdururken, katı ortamda kuvvetli büyüme ve gelişim gözlenir (Joshi *et al.* 2003). Bunlardan başka kültür ortamı, havalandırma oranı, ışık şiddeti ve kalitesi, inorganik maddeler [$\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, Na_2CO_3 , ZnSO_4 , MgSO_4 , FeSO_4 , MnSO_4 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$] ayrıca deterjan katkıları, yağlar ve surfaktantlar da pigment üretimini artırıcı aktivatörler olarak yer almaktadır.

Mikrobiyal pigmentlerin kullanım alanları

Sentetik pigmentler, gıda, tekstil, kozmetik ve eczacılık gibi birçok sektörde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, bu pigmentlerin tüketicilere yönelik toksik etkileri, doğal pigmentlerin araştırılmasını ve kullanımını teşvik etmektedir. Doğal pigmentler, sadece

ekonomik açıdan daha cazip hale gelmekle kalmaz, aynı zamanda antioksidan ve antikanser özellikler kazandırılarak sağlık açısından da olumlu katkılar sağlar (Tuli *et al.* 2015).

Bakteriyel pigmentler, çeşitli alanlarda önemli kullanım potansiyeli sunan biyomoleküllerdir. Bu pigmentler, gıda endüstrisinde doğal boyar madde olarak kullanılır ve gıdaların güneş ışığından korunmasını sağlayarak, raf ömrünü ve kaliteyi artırmada etkili olabilirler. Tekstil sektöründe ise mikrobiyal kökenli kumaş boyaları olarak kullanılma potansiyelleri vardır (Rao *et al.* 2017).

Bakteri pigmentleri bu uygulamaların yanı sıra ilaç endüstrisi için antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, antiprotozoal, antidiyabet, yara onarımı, yaşlanma karşıtı, parkinson ve migren tedavisinde, katarakt önlenmesinde, antiülserojenik ve daha pek çok biyolojik aktivitelere sahiptir (Özdemir M., 2019).

Bakteriyel pigmentler aynı zamanda çevresel değişikliklere karşı duyarlılığı ölçmek için biyoindikatör olarak da değerlendirilebilir, bu da onların kullanım yelpazesini genişletmektedir. (Rao *et al.* 2017).

Melanin

Latince, 'melanin' karanlık anlamına gelen 'melanos' kelimesinden geldiği bilinmektedir. Bilimsel anlamda ilk olarak 1840'ta İsveçli bilim adamı Berzelius tarafından koyu renkli bir pigment için kullanılmıştır (Singh *et al.* 2021)

Melanin, bitkilerde ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan koyu kahverengi ile siyah arasında değişen bir pigmenttir (Mason, 1959). Bu melaninler, polimerize fenolik ve/veya indolik bileşiklerden oluşan, doğada yaygın olarak bulunan doğal pigmentlerdir. Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilen bu esrarengiz biyolojik makromoleküller, bakterilerden insanlara kadar geniş bir yelpazede doğal olarak bulunur. Melaninlerin biyolojik çeşitliliği, bu pigmentin doğadaki önemini vurgulamaktadır.

Melanin hem kresolaz hem de katekolaz aktivitelerini gösteren bir monooksijenaz olan tirozinaz enziminin etkisiyle oluşur (Lerch, 1981). Tirozinazın iki enzimatik aktivitesi, 3,4-dihidroksifenilalanini dopakroma dönüştürmek için bir araya gelir; bu dopakrom, ardından bir dizi enzimatik olmayan reaksiyonla polimerize edilerek melanini oluşturur (Pomerantz and Murthy 1974).

Melanin üretiminin gerçekleştiği bilinen bakteriler arasında *Aeromonas* (Aurstad and Dahle 1972), *Azotobacter* (Sen and Sen 1965), *Mycobacterium* (Prabhakaran *et al.* 1968), *Micrococcus* (Mung and Kondrat'eva 1981), *Bacillus* (Aronson and Wermus 1965), *Legionella*

(Baine *et al.* 1978), *Streptomyces* (Arai and Mikami 1972), cinslerinin türleri yer aldığı bilinmektedir.

Woese ve ark. (1990) tarafından önerilen moleküler tabanlı yaklaşıma göre, dünyadaki yaşam formları Archaea, Bacteria ve Eukarya olmak üzere üç ana alana ayrılır. Eukarya alanı, iki katmanlı bir zarla çevrili iyi tanımlanmış bir çekirdeğe ve belirgin bir zar içinde diğer organellere sahip organizmaları içerirken, Bacteria ve Archaea alanları, sitoplazmalarında belirli bir zarla çevrili genoma (çekirdek) ve organellere sahip olmayan prokaryotik organizmaları içerir (Krishnan 2021; Lee *et al.* 2023; Lee ve Ghos 2023). Bakteriler alanı çok sayıda şubeyi içerir; ancak Actinobacteria, Bacteroidetes (Bacteroidota), Cyanobacteria, Firmicutes ve Proteobacteria (Pseudomonadota) gibi bazı şubeler endüstriyel, biyoteknolojik ve tıbbi kullanımları nedeniyle iyi bilinmektedir. Actinobacteria şubesi Bakteriler alanındaki en büyük şubelerden biridir. Genomlarında yüksek GC içeriğine sahip spor oluşturan bakterilerdir ve hem sucul (deniz dahil) hem de karasal ekosistemlerde yaygın olarak bulunurlar. Actinobacteria heterotrofik veya kemoototrofik olabilir, ancak çoğu kemoheterotroftir ve çok çeşitli besin kaynakları ve karmaşık polimerler kullanır. Morfolojik özellikler açısından, Actinobacteria üyeleri büyüme koşullarına bağlı olarak değişir; ancak, çoğunluğu filamentli mantarlara benzer tipik bir miselyal organizasyon sergiler. Actinobacteria genellikle aerobiktir; ancak bazı cinsler fakültatif veya zorunlu anaerobik üyeler içerir. Gram boyası pozitif veya Gram boyası değişken olarak kabul edilirler (Barka *et al.* 2016; Li ve ark., 2016; Amin *et al.* 2020). "Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria"ya göre, Actinobacteria şubesi 5 sınıf, 19 takım, 50 aile ve 221 cins içerir. Ancak, hala keşfedilmeye devam eden çok sayıda yeni takson bulunmaktadır, dolayısıyla bu listeleme kesinlikle tamamlanmamıştır (Amin *et al.* 2020).

Actinobacteria'nın en bilindik cinslerinden birisi *Streptomyces* dir. Bu cins içerisinde *Streptomyces glaucescens* ve *Streptomyces castaneoglobisporus* gibi türleri barındırmaktadır. Bu cinsin çok büyük bir genoma sahip olduğu belirtilmektedir.

En yüksek pigment üretiminin olduğu cins *Streptomyces* olarak raporlanmıştır (Conn ve Jean, 1941).

Yapılana çalışmalarda *streptomyces*'lerin polisakkarit, pigment, fenolikler, peptit ve antibiyotik gibi biyoaktif metabolitler ürettiği rapor edilmiştir. Bu metabolitlerin ise antikanser, antioksidant, antibakteriyel ve anti fungal gibi biyolojik aktiviteler sergilediği açıklanmıştır (El-Naggar *et al.* 2017; Polapally *et al.* 2022). Örneğin, *Streptomyces griseus* türünün antibakteriyel aktiviteye sahip streptomisin antibiyotiğini, *Streptomyces peucetius* türünün daunorubisin antibiyotiğini ürettiği belirtilmektedir (Lerner *et al.* 1949). *Streptomyces*'ler tarafından üretilen

önemli pigmentlere ise karatenoidler, melaninler ve flavonoidler örnek verilmektedir (Khajeh *et al.* 2006), yapılan çalışmalarda *Streptomyces glaucescens* ve *Streptomyces puniceus* türülerinin melanin üretme kapasitesine sahip olduğu ve bu türler tarafından üretilen melaninlerin antikanser ve antioksidan gibi biyolojik aktiviteler sergilediği rapor edilmiştir (El-Naggar *et al.* 2017; Polapally *et al.* 2022).

Radyasyon, X-ışını, ultraviyole ışık ve nükleer radyasyonu kapsayan geniş bir yelpazede, organik makromoleküller üzerinde biyoaktif etkiler yaratan başlıca çevresel stres faktörlerinden biridir. Güneş radyasyonunun yaklaşık %3'ünü oluşturan ultraviyole (UV) ışınları, aşırı maruz kalma durumunda ciltte yanıklara veya kansere, bağışıklık sisteminin zayıflamasına, katarakta ve biyolojik ya da kimyasal pestisitlerin etkinliğinin azalmasına veya bozulmasına yol açabilir. (Ignoffo and Garcia 1978; Hanson *et al.* 2006; Ye *et al.* 2014) Doğal yollardan elde edilen bileşiklerin; fosfatilkolin, robin mavisi, flavonoidler, berberin, B2 vitamini, 2-hidroksi-4-metoksi-dibenzofenon, kojik asit, kinurenin asit ve melaninin gibi, güçlü antiradyasyon aktivitesi gösterdikleri kanıtlanmış ve rapor edilmiştir (Sundaram and Curry 1996; Markhami 1998; Kranthi *et al.* 2001; Kato *et al.* 2012). Bundan dolayı organizmaları radyasyonun zararlarından korumak amacıyla güvenilir ve doğal UV koruyucular araştırılması ve geliştirilmesi önem taşımaktadır.

Mikrobiyal pigmentlerden melaninler, genellikle kozmetik endüstrisinde kremlerde ve gözlük camlarında fotokoruyucu olarak ve uranyum gibi radyoaktif atıkların bloke edilmesinde kullanılır. Bakteri melanin genleri, rekombinant bakteri suşunu taramak için raportör genler olarak kullanılmıştır (Rao, Prabhu, Xiao ve Li, 2017).

Sentetik güneş koruyucu maddelerinin canlılar üzerindeki olumsuz etkileri keşfedildikten sonra, kozmetik, pestisit ve diğer endüstrilerde doğal fotokoruyucu maddelere olan ilgi artmış ve bu durum, doğal güneş koruyucuların geliştirilmesi yönündeki çalışmaları hızlandırmıştır. Zorlayıcı çevresel koşullar altında birçok mikroorganizma melanin pigmentleri sentezleyerek kendilerini UV radyasyonu, sıcaklık değişimleri, ağır metaller ve diğer dış tehditlere karşı korur. Melaninler, aynı zamanda radyonüklidlerin ve ağır metal iyonlarının adsorbanları olarak kullanılarak serbest radikallerin temizlenmesi ve radyasyona karşı koruma gibi güçlü biyolojik aktiviteler gösterir (Gauslaa and Solhaug 2001; Tu *et al.* 2009). Bu pigmentler, aşırı sıcaklıklar, kuraklık ve metallere maruz kalma gibi ciddi çevresel stres faktörleri altında organizmaların hayatta kalma oranını artırabilir ve sentetik pigmentlerin yerine geçebilir (Orzechowski *et al.* 2002).

Hayvanlar ve bitkiler kullanılarak elde edilen melaninin endüstriyel üretimi, yüksek maliyet gibi dezavantajlar nedeniyle engellenmiştir.

Melanin pigmentlerinin mikroorganizmalar tarafından sentezlenmesi, onların çevresel stres faktörlerine karşı direnç kazanmasını sağlayarak hayatta kalma şanslarını artırır. Böceklerde ve yumuşakçalarda savunma mekanizmasına yardımcı olduğu bilinirken (Palumbo, 2003; Vavricka *et al.* 2014), çeşitli mantar ve bakterilerde ise virülans mekanizmasını arttırdığı gözlenmektedir (Nosanchuk ve Casadevall, 2003).

Bu pigmentler, UV radyasyonu, yüksek sıcaklıklar, ağır metaller ve hidrolitik enzimler gibi dış tehditlere karşı etkili bir koruma sağlar (Venil *et al.* 2013; Ye *et al.* 2014). Özellikle ultraviyole radyasyonu, güneş ışığının %3'ünü oluşturmasına rağmen, aşırı maruz kalma durumunda ciltte yanıklara, kansere ve bağışıklık sisteminin zayıflamasına neden olabilir. Bu durum, doğal fotokoruyucu maddelere olan ilgiyi artırmış ve sentetik güneş koruyucuların yerini doğal alternatiflerin almasına yönelik çalışmaları hızlandırmıştır. Melanin, bu süreçte öne çıkan bir biyolojik molekül olarak hem mikroorganizmaları korur hem de radyonüklidlerin ve ağır metal iyonlarının adsorpsiyonu yoluyla çevresel toksinlerin etkisini azaltır (Babitskaya *et al.* 2000). Bunun yanı sıra, melaninlerin serbest radikalleri temizlemedeki etkinliği, radyasyona karşı koruma sağlamada önemli bir rol oynar. Melaninler, sentetik pigmentlerin dezavantajları karşısında doğal bir alternatif olarak görülmekte ve bu pigmentlerin biyolojik aktiviteleri, çeşitli çevresel stres faktörleri altında hayatta kalma oranlarını iyileştirmekte etkilidir (Kumar *et al.* 2011).

Sonuç olarak, melanin pigmentleri, hem mikroorganizmalar için hayati bir savunma mekanizması olarak hem de çevresel toksinlere karşı etkili bir biyolojik kalkan olarak işlev görür. Sentetik güneş koruyucuların olumsuz etkileri göz önüne alındığında, melanin gibi doğal bileşiklerin kullanımı, çevresel stres faktörlerine karşı koruma sağlamak için daha güvenli ve etkili bir alternatif sunar. Melaninlerin biyolojik aktiviteleri, yalnızca mikroorganizmaların hayatta kalmasını desteklemekle kalmaz, aynı zamanda insan sağlığı üzerinde de olumlu etkiler yaratır. Bu nedenle, melanin pigmentlerinin hem bilimsel araştırmalarda hem de endüstriyel uygulamalarda daha fazla incelenmesi ve kullanılması, çevresel ve biyolojik tehditlere karşı daha sürdürülebilir ve doğal çözümler geliştirmek için büyük bir potansiyele sahiptir.

Bu karmaşık ve yüksek moleküler ağırlığa sahip doğal biyopolimerler, negatif yüklü ve hidrofobik özellikleriyle bilinir. Amorf yapıda olan bu biyo-makromoleküller, asidik ortamlarda polimerleşir, ancak su ve organik çözücülerde çözünmezler. 200-400 nm dalga boylarında maksimum emilim kapasitesine sahiptirler ve oksitleyici maddeler, özellikle H₂O₂ gibi bileşiklere karşı duyarlılık gösterirler, bu da renk kaybıyla kendini belli eder (Tarangini and Mishra 2014; Banerjee *et al.* 2014). Bunun yanında, bu doğal pigmentler antimikrobiyal, antiviral, antioksidan ve karaciğer koruyucu etkiler gibi birçok biyoaktif özelliğe de sahiptir. Bu

yapısal özellikleri sayesinde, melanin pigmentleri hem biyolojik hem de endüstriyel alanlarda geniş bir kullanım potansiyeli taşır.

Melanin pigmentleri, farklı metabolik yollar ve öncüllerle enzimatik ya da enzimatik olmayan (Banerjee *et al.* 2014) süreçlerle sentezlenen beş ana alt gruba ayrılır: eumelanin, piomelanin, feomelanin, allomelanin ve nöromelanin.

Melanin, yapısal monomerlerine göre ise üç ana kategoriye ayrıldığı bilinmektedir; eumelanin, feomelanin ve allomelanin.

Eumelaninler ve feomelaninler genellikle hayvan türlerinde bulunur (Nicolaus *et al.* 1964). Eumelanin ve feomelanin, tirozin veya fenilalanin amino asitlerinden türetilir. İlk aşamada bu amino asitler okside edilerek dihidroksifenilalanin (DOPA) ve dopakinon meydana gelir, ardından feomelanin pigmenti, DOPA'nın sisteinilasyonu ile oluşur. Sisteinilasyon nedeniyle, kükürt içeren feomelanin pigmenti sarımsı-kırmızımsı bir renge sahipken, eumelanin siyahımsı-kahverengi bir renk gösterir. (Turick *et al.* 2010).

Allomelaninler mikroorganizmalarda ve bitkilerde tanımlanmıştır (Nicolaus *et al.* 1964). Allomelaninler diğer melanin türlerinden farklı olarak oldukça heterojen bir yapıya sahiptir ve azot içermemeleri en belirgin ayırt edici özellikleridir. Bu pigment grubu, dihidrofolat, homojentisik asit ve katekoller gibi çeşitli polimer gruplarından oluşur (Płonka and Grabacka 2006).

Nöromelanin, katekolamin bazlı çözünmeyen koyu bir polimerik pigmenttir ve insan merkezi sinir sistemindeki dopaminerjik nöronlarda üretilir (Xu and Chan 2015). Nöromelanin, hem benzotiyazin hem de indol birimlerinden oluşur (Haining ve Achat-Mendes, 2017). Nöromelanin, yaşlanma sürecinde substantia nigra'da birikir ve aşırı dopaminin nöromelanine dönüşmesi sinir hücrelerini koruyarak nörodejeneratif hasarların önlenmesine yardımcı olur. Bununla birlikte, melanin pigmentinin ağır metalleri şelatlama kapasitesi nedeniyle Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların tetiklenebileceği de bildirilmektedir (Fedorow *et al.* 2005; Zucca *et al.* 2017).

Piyomelanin, homojentisik asidin oksidasyonunun bir ürünüdür (Pralea *et al.* 2019). Piyomelanin pigmenti, tirozin veya fenilalanin amino asitlerinin katabolizmasından türeyen bir başka melanin çeşididir. Bu süreçte tirozin amino asidi, 4-hidroksifenilpirüvik asit dioksijenaz (4-HPPD) ve homojentisik asit oksidaz (HGA-oksidaz) enzimleri tarafından fumarat ve asetoasetata ayrıştırılır. Eğer HGA-oksidaz enzimi yetersizse veya yoksa, fazla miktarda üretilen homojentisik asit hücre dışına atılır ve bu asit, hücre dışında birikerek otoksidasyon ve kendiliğinden polimerizasyon sonucu piyomelanin pigmentine dönüşür (Turick *et al.* 2010).

Bu beş farklı makromoleküler pigmentlerin antioksidan, antiviral, antimikrobiyal, antivenin, anti-inflamatuar ve anti-proliferatif etkileri gibi birçok farklı ve faydalı biyoaktif özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Bu özelliklere ek olarak, melanin pigmentlerinin karaciğer koruyucu özelliği, ilaç taşıyıcı özelliği ve UV emici özellikleri de farklı çalışmalarda rapor edilmiştir (El-Naggar and El-Ewasy 2017; Zerrad *et al.* 2014; Teplyakova and Kosogova 2015; Sava *et al.* 2003; Araújo *et al.* 2014).

Melanin sentezi

Melanin sentezi için birçok farklı yol vardır, ancak hepsi hidroksillenmiş aromatik bileşiklerin oksidasyonunu içerir. Bu bileşiklerden bazıları, özel düzenlemeye tabi olan özel biyosentetik yollarda tirozinazlar, lakkazlar veya poliketid sentazlar tarafından sentezlenir. Diğer hidroksillenmiş aromatik bileşikler, tirozinin bozunması gibi katabolik yollarda ara maddelerdir ve bozunma yollarındaki dengesizlikler veya kesintiler sonucunda birikebilirler.

Mikrobiyal melanin biyosentezinde yer alan üç temel enzim bulunmaktadır: tirozinaz, lakkaz ve poliketid sentaz (PKS).

Tirozinaz, bakır bağımlı bir enzim olup, monofenollerin hidroksilasyonu ve kinonlara oksidasyonu gibi reaksiyonlarda rol oynar. Bu enzim, melanin üretiminde kritik bir faktör olarak tanınmıştır. Tirozinazlar hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerde melanin sentezine katılır. Örneğin, *Streptomyces castaneoglobisporus*'tan elde edilen tirozinazın yapısı detaylı bir şekilde incelenmiş, bu enzimlerin melanin biyosentezinde ne kadar önemli olduğu ortaya konulmuştur (Faccio *et al.* 2012).

Daha sonra 2011'de, *Bacillus megaterium*'dan bakteriyel tirozinaz ve *Agaricus bisporus*'tan fungal muadili üç boyutlu yapının ayrıntılı incelemesine tabi tutuldu. Tirozinazlar, *Marinomonas mediterranea*, *Vibrio nigripulchritudo*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus licheniformis* vb. gibi gram pozitif ve gram negatif bakterilerde melanin üretimini sağlar. Mikrobiyal tirozinazlar üzerine yapılan farklı çalışmalar, organizmaların uzun ömür için tirozinazlara ihtiyaç duyduğu gerçeğini ortaya koymaktadır (Faccio *et al.* 2012)

Lakkaz, polifenoller, metoksi-ikameli fenoller ve diaminler gibi geniş bir substrat yelpazesini işleyebilen mavi-bakır glikoprotein yapısında bir enzimdir. Özellikle siringaldazin substratına özgü olarak kabul edilen lakkaz, hem DHN-melanin (Upadhyay *et al.* 2016) hem de DOPA melanin (Eisenman *et al.* 2007) biyosentezinde görev alır. Lakkaz, tirozinazdan farklı olarak, dihidroksi fenollerin kinonlara tek adımlı oksidasyonunu katalize eder (Langfelder *et al.* 2003). Bitkilerde ve mantarlarda yaygın olarak bulunmakla birlikte, bakterilerdeki varlığı da son dönemlerde araştırılmaya başlanmıştır. *Bacillus subtilis*'ten bir enzim olan Cota,

kahverengi spor benzeri pigmentten sorumlu bakır bağımlı bir lakkazdır (Hullo *et al.* 2001). İnsan fungal patojeni *Cryptococcus neoformans*'tan gelen lakkaz enziminin hem L- hem de D-DOPA'dan melanin üretme potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (Eisenman *et al.* 2007). *Pseudomonas putida* F6, *Alteromonas*, *Bacillus sp.* gibi suşlarda hem tirozinazın hem de lakkazın birlikte reaksiyon yürüttüğü bildirilmiştir (Pavan *et al.* 2020).

Poliketid sentaz (PKS) ise, çeşitli mikroorganizmalarda bulunan ve pigmentler, antibiyotikler ile toksinler gibi ikincil metabolitlerin üretiminde görev alan bir enzim grubudur. PKS, DHN-melanin sentezinde önemli bir rol oynar (Plonka ve Grabacka, 2006) ve farklı mantarlarda melanin biyosentezi için gerekli gen kümelerinde bulunur. PKS'nin yapısı, β -ketosentaz, asiltransferaz ve asil taşıyıcı alanlarından oluşur ve bu yapısal özellikler farklı organizmalar arasında büyük ölçüde korunmuştur (Fujii ve ark., 2001). Örneğin, *Penicillium marneffei* gibi patojenik mantarlarda PKS geninin melanin üretimi ve virülans ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Pigmentlerin bakterilere sağladığı yararlar

Bakteriler tarafından üretilen pigmentlerin çoğunun, ultraviyole (UV) ışınlarına karşı koruma sağladığı ve pigment üreten bakterilerin, pigmentless türlere kıyasla hayatta kalma oranlarını artırdığı tespit edilmiştir (Stafsnes *et al.* 2013). Örneğin, kırmızı prodigiosin pigmenti üreten *Vibrio* suşları, UV ışığına maruz kaldıklarında pigment üretmeyen suşlardan 1000 kat daha fazla hayatta kalma yeteneği gösterir (Boric *et al.* 2011). Antartika'da bulunan heterotrofik bakterilerde karotenoid pigmentlerinin üretimi, bu bakterilerin soğuk ortamlara adapte olmalarını ve donma-çözülme ile güneş radyasyonu gibi çevresel stres faktörlerine karşı direnç göstermelerini sağlar (Dieser *et al.* 2010). Bunun yanı sıra, bakteriyel fenazinler, biyofilm oluşumunu teşvik eden hücrel gen ekspresyonlarını düzenleyerek bakteri hayatta kalmasını destekler (Konzen *et al.* 2006). Zorlu çevre koşullarında yaşayan mikroorganizmalar, örneğin *Halococcus morrhuae*, *Halobacterium salinarium* ve *Thermus filiformis* gibi türler tarafından üretilen C50-karotenoidler, hücre zarını stabilize eder ve antioksidan özellikleri sayesinde bu mikroorganizmaların hayatta kalmasına önemli katkı sağlar (Mandelli *et al.* 2012).

Bakteriyel melaninler, çeşitli toksik kimyasal bileşikleri nötralize ederek hücreleri korur (Plonka and Grabacka 2006). Rhizobium türlerinde melanin, nodüllerde biriken polifenolik bileşiklerin detoksifikasyonunu sağlar (Margalith 1992). Aynı şekilde, *Roseobacter* türleri tarafından üretilen indigoidin, potansiyel rakip bakterileri yok ederek baskın hale gelmelerine yardımcı olur (Soliev *et al.* 2011). Ayrıca, *Pseudomonas fluorescens* tarafından üretilen pyoverdinin, demir taşınmasını kolaylaştırarak bakteriyel büyümeye katkıda bulunur (Visca *et al.* 2006). Araştırmalar, denizden izole edilen pigmentli bakterilerin, pigmentli olmayan

bakterilere kıyasla ağır metallere ve antibiyotiklere karşı daha dirençli olduğunu göstermektedir (Nair *et al.* 1992). Fotosentetik bakteriler, klorofile benzer bakteriyoklorofiller, bakteriyorodopsin ve proteorodopsin gibi pigmentlere sahiptir (Bryant and Frigaard 2006).

Pseudomonas aeruginosa, *Vibrio campbellii* ve *Chromobacterium violaceum* tarafından sırasıyla üretilen piyosiyenin (Hall *et al.* 2016), pyomelanin (Wang *et al.* 2013) ve violasin (Duran and Menck 2001) pigmentleri, patojeniteyi artıran faktörler olarak öne çıkmaktadır. Benzer şekilde, *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivalis* ve *Streptococcus agalactiae* tarafından üretilen stafiloksantin, porfirin ve granadaen pigmentleri de virülansla ilişkilendirilmiştir (Liu and Nizet 2009). *Xanthomonas campestris* ise karnabahar, lahana ve diğer bitkilerde hastalıklara neden olan sarı renkli ksantomonadin pigmentini üretir (Tuli *et al.* 2014; Ozdal and Kurbanoglu 2018). Balıklarda furunkulosis hastalığına neden olan *Aeromonas salmonicida* ise melanin benzeri bileşikler üretir (Margalith 1992).

Birçok bakteriyel pigmentin üretimi, çevresel algılama mekanizması olan Quorum sensing ile bağlantılıdır ve bu süreçte açillenmiş homoserin laktonlar (AHL) rol oynar (Thomson *et al.* 2000). Özellikle azot içeren pigmentlerin, örneğin prodigiosin, piyosiyenin, violasin ve melanin, sentezinde amino asitler öncül madde olarak kullanılır. Endüstriyel pigment üretiminde ise uygun substratlar, fizikokimyasal parametreler, mutajenik ajanlar (UV ışını, etil metan sülfonat, etidyum bromür) ve gen aktarımı gibi faktörler, pigment verimini artırmak için kullanılabilir (Larsen 2002).

Uygulama alanları

Melanin pigmentinin çeşitli mikrobiyal türler tarafından üretilen formları, çok çeşitli uygulama alanlarına sahip olup, farklı biyolojik aktiviteler sergilemektedir. Örneğin, *Inonotus obliquus* mantarından elde edilen suda çözünür melanin, insülin duyarlılığını artırıcı etkisiyle dikkat çekmiştir ve yüksek yağlı diyetlerle beslenen obez farelerde yağlanmayı azaltmıştır (Lee and Hyun, 2014).

Ayrıca, melanin, yılan zehirlerine karşı antivenom özellik göstermekte olup, bu etkisini kalsiyum ve yılan zehrinin önemli bileşenlerinden biri olan fosfolipaz A2'ye spesifik olmayan bir bağlanma yoluyla sergilemektedir (Hung *et al.* 2004). Melaninin düşük toksisiteye sahip olması ve yılan zehirlerine karşı antagonistik etkisi, yılan ısırıklarına karşı potansiyel olarak hayat kurtarıcı bir tedavi olabileceğini göstermektedir.

Melanin aynı zamanda biyoremediasyon çalışmalarında da kullanılmaktadır. Melanize mantarlar ve fungal melanin, kirlenmiş ortamlardan toksinlerin uzaklaştırılmasında etkili olduğu gibi (Mattoon *et al.* 2021), melanin ağır metallerin (örneğin, Hg, Cr, Cu, Pb, Cd, Zn)

emilimini de kolaylaştırmaktadır (Manirethan *et al.* 2018; Oh *et al.* 2021). Bu özellik, melanini su ve çevre kirliliği ile mücadelede önemli bir bileşen haline getirmektedir (Coelho *et al.* 2020). Kronik hastalıkların çoğu serbest radikallerle ilişkilendirildiğinden, melanin güçlü antioksidan özellikleriyle öne çıkmaktadır (Phaniendra *et al.* 2015). Melanin, serbest radikallerle etkileşime girerek bu zararlı bileşenlerin yok edilmesine katkıda bulunur (Lobo *et al.* 2010). Ömelaninlerin antioksidan ve elektriksel özellikleri, onları kök hücre uygulamaları için de potansiyel bir aday yapmıştır (Cavallini *et al.* 2020). Bakteriye pigmentlerin, özellikle *Streptomyces glaucescens*'ten elde edilen melanin pigmentinin, antioksidan aktivite gösterdiği bilinmektedir (El-Naggar and El-Ewasy 2017).

Bugüne kadar, çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen melaninlerin antioksidatif potansiyelleri değerlendirilen birçok çalışma yapılmıştır. Bunlardan bazıları aşağıda listelenmiştir. El-Naggar ve ekibi (2017), *Streptomyces glaucescens* NEAE-H aktinobakterisinden izole edilen melaninin antioksidan ve antikanser özelliklerini incelemiştir. ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) testi sonuçlarına göre, melanin %57,2 oranında radikal temizleme aktivitesi sergilemiş ve bu değer, %89,6 aktivite gösteren standart antioksidan Askorbik asit ile karşılaştırılabilir bulunmuştur. Ayrıca, melaninin HFB4 cilt kanseri hücre hattına karşı belirgin bir sitotoksik etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Polapally ve arkadaşları (2022) tarafından gerçekleştirilen başka bir *in vitro* çalışma ise, *S. puniceus* RHPR9'dan elde edilen melanin pigmentinin *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* üzerinde antibakteriyel aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Aynı çalışmada, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) testi ile 100 µg/mL melanin konsantrasyonunun %89,01 gibi yüksek bir antioksidan aktivite sergilediği, aynı konsantrasyondaki askorbik asitin ise %96,16 aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca, Sheefaa ve Sivaperumal (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, deniz *Streptomyces* türünden elde edilen melaninin DPPH radikal temizleme ve lipid peroksidasyon inhibisyon aktiviteleri olduğu bildirilmiştir.

Mikrobiyal pigmentler, aynı zamanda çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal ajan olarak da işlev görürler. Karotenoidler, melaninler, flavinler, kinonlar, monasinler, violacein ve indigo gibi pigmentler, etkili antimikrobiyal ajanlar olarak tanınmaktadır (Malik *et al.* 2012). Kanser tedavisinde ise toksik olmayan, yan etkileri azaltılmış kemoterapötik ajanların geliştirilmesine yönelik araştırmalar devam etmektedir (Saputra *et al.* 2018). *Streptomyces glaucescens* NEAE-H'den elde edilen melanin pigmenti, HFB4 cilt kanseri hücre hattına karşı güçlü sitotoksik aktivite sergilemiş (El Naggar *et al.* 2017) ve *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen ömelanin, meme kanseri hücre hattı (MCF-7), insan hepatoselüler karsinom hücre hattı

(HepG2) ve kolon karsinoma hücre hattına (HCT116) karşı antikanser özellikler göstermiştir (Gamal Shalaby *et al.* 2019). İn vitro çalışmalar, melaninin kanserli hücre hatlarına karşı güçlü bir sitotoksik etki gösterirken, sağlıklı hücelere minimal toksisite sergilediğini ortaya koymuştur (El-Naggar and El-Ewasy, 2017). Ayrıca, melanin pigmentlerinin farelerin gastrointestinal sistemini koruyabileceği ve hücrel apoptozu önleyebileceği öne sürülmektedir (Revskeya *et al.* 2012).

Antiviral özellikleri açısından melanin, insan immün yetmezlik virüsü tip 1 ve 2'nin (HIV-1 ve HIV-2) replikasyonunu inhibe etme potansiyeline sahiptir (Montefiori and Zhou 1991), bu da melanin pigmentlerinin geniş bir biyomedikal uygulama yelpazesinde değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Parkinson, dopaminerjik nöronların bozulması veya kaybı nedeni ile oluşan hastalıktır. Bakteriyel melanin pigmenti, kan-beyin bariyerini geçtikten sonra beyindeki kılcal damarların genişlemesine neden olup beyindeki kan akışını artırmaktadır (Petrosyan 2015).

1948'de Howar ve Mason, melanin oluşumunda tirozinaz enziminin rol oynadığı biyosentetik yolu aydınlatıldılar. Bunu takiben, 1949'da Lerner ve meslektaşları, Harding-Passey fare melanomundan memeli tirozinazını izole edip özelliklerini incelediler. Araştırmaları, bu enzimin aktivitesinin sitoplazmik parçacıklarla bağlantılı olduğunu ve normal doku özütlerinde çözelti halinde bulunmadığını ortaya koydu.

1972'de Lerch ve Ettlincer, *Streptomyces glaucescens* türünden bir tirozinaz enziminin saflaştırılması ve özelliklerinin incelenmesi üzerine bir çalışma yürüttüler. Bu enzim, ortalama 29.100 Da molekül ağırlığına sahip olup, bakır içeren bir atom barındırmaktadır. Ayrıca, KCN ve 4-nitro-katekol tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiği belirlenmiştir.

1996 yılında Ikeda ve ekibi, *Streptomyces castaneoglobisporus*'tan elde edilen ve yüksek düzeyde melanin sentezi gerçekleştiren bir gen operonunu klonlayıp dizilemişlerdir. Çalışmaları sonucunda, *S. castaneoglobisporus*'taki tirozinaz aktivitesinin güçlü ifadesinde, daha önce düşünüldüğü gibi TYRC değil, ORF378 adlı genin etkili olduğunu öne sürmüşlerdir.

Kong ve diğer araştırmacılar, 2000 yılında *Thermomicrobium roseum*'dan izole edilen oldukça kararlı bir tirozinazın saflaştırılması ve özelliklerinin belirlenmesi üzerine bir çalışma gerçekleştirdiler. Bu enzimin en yüksek aktiviteyi pH 9,5 ve 70 °C'de gösterdiği ve aktivitesinin 1 mM Mg²⁺, K⁺ veya Cu²⁺ ilavesi ile arttığı tespit edildi.

2002 yılında Solano ve ekibi, *Marinomonas mediterranea*'dan SDS ile aktive edilen bir tirozinazın klonlanması ve moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirdiler. Çalışmada elde edilen bulgular, enzimin aktivasyonunun, dibakır aktif bölgesine substratın erişimini

kolaylaştıran SDS kaynaklı bir yapısal değişiklikten kaynaklandığını, bu değişikliğin de içsel floresans ve kinetik özelliklerle doğrulandığını gösterdi.

2005 yılında Armen ve ekibi, suda çözünebilir *Bacillus thuringiensis* melaninini izole ederek saflaştırdı ve fizikokimyasal özelliklerini inceledi. SDS-PAGE analizi, saflaştırılmış melaninin moleküler ağırlığının 4 kDa olduğunu gösterdi ve melanin içindeki paramagnetik merkezlerin yoğunluğunun $0,21 \times 10^{18}$ spin/g olduğunu belirlediler.

2005 yılında Roan ve ekibi, PCR tekniklerini kullanarak *B. thuringiensis* 4D11'den tirozinaz kodlayan mel genini klonladılar ve bu geni *Escherichia coli* DH5 α 'ya aktardılar. Rekombinant plazmid pGEM1179'da yer alan 1179 bp'lik DNA parçasının, *E. coli* alıcı suşuna melanin sentezleme yeteneği kazandırdığını belirlediler.

2006 yılında Khajeh ve ekibi, yeni keşfedilen bir melanogenik toprak bakterisinde lakkaz ve tirozinaz aktivitelerini izole ederek bu enzimlerin biyokimyasal özelliklerini incelediler. Çalışmaları sonucunda, üretilen melaninin bu bakteri suşunu ultraviyole ışınlarına ve oksidatif strese karşı koruduğu tespit edilmiştir.

Raval ve ekibi, 2012 yılında tirozinaz üreten bir izolatın tanımlanmasını ve L-DOPA üretiminin doğrulanmasını sağlamış ve bu süreçte tirozinaz ile L-DOPA'nın maksimum verimle elde edilmesi için gerekli çevresel koşulların optimize edilmesi üzerine çalışmalar yapmıştır.

Actinoalloteichus sp. türünden DOPA melanin üretimi ve karakterizasyonuna odaklanan çalışmada, bu melaninin antibakteriyel, antioksidan ve metal şelatlama aktiviteleri in vitro deneylerle gösterilmiştir. Çalışmada, farklı karbon ve azot kaynaklarının melanin üretimi üzerindeki etkisi araştırılmış ve sonuçlar, en yüksek melanin üretiminin karbon kaynağı olarak glukoz ve azot kaynağı olarak kazein kullanıldığında elde edildiğini ortaya koymuştur (Manivasagan *et al.* 2013).

Pseudomonas stutzeri'den elde edilen melanin, UV-Vis, FT-IR, EPR ve XRD analizleri kullanılarak biyofiziksel olarak karakterize edilmiştir. Ayrıca, bu melaninin antioksidan özellikler taşıdığı da belirlenmiştir (Ganesh Kumar *et al.* 2013).

Aspergillus cinsine ait 6 farklı türün melanin üretim süreçlerini inceleyen bir çalışmada, her türün melanin üretim kapasitesinin ve mekanizmasının farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. *A. tamarii* ve *A. flavus* türlerinde melanin yalnızca biyokütleden elde edilirken, *A. terreus* için melanin yalnızca kültür süzüntüsünde bulunmuştur. Bu durum, melanin sentezinin türler arasında farklı stratejilerle gerçekleştirildiğini ortaya koymaktadır. *A. sydowii*'de ise melanin miktarı ihmal edilebilir düzeyde tespit edilmiştir, bu da bu türün melanin üretim kapasitesinin oldukça düşük olduğunu göstermektedir.

Melanin miktarının en yüksek olduğu türler ise *A. niger* ve *A. tamarii* olarak belirlenmiştir; bu türlerde melanin hem kültür filtratında hem de mantar biyokütlesinde yüksek miktarda bulunmaktadır. Bu durum, *A. niger* ve *A. tamarii*'nin melanin sentezinde diğer türlere göre daha aktif olduğunu göstermektedir. DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin) yolu ile melanin üreten *A. niger*, *A. tamarii* ve *A. flavus*, melanin biyosentezinde benzer bir yolu takip ederken, *A. tubingensis* ve *A. terreus*'un melanin üretimi DHN (1,8-dihidroksinaftalin) yolu ile gerçekleştirilmiştir. Bu bulgular, *Aspergillus* türlerinde melanin üretim mekanizmalarının oldukça çeşitlilik gösterdiğini ve her türün bu biyosentez yolunu farklı şekillerde kullandığını ortaya koymaktadır (Pal *et al.* 2013).

Özellikle *A. terreus*'un melanin sentezinde yer alan enzimlerin ve ara ürünlerin belirlendiği ve karakterizasyonunun yapıldığı çalışmada, bu melaninin UV stresi ve asidik ortam koşullarına karşı koruma sağladığı, ayrıca konidyumların amipler tarafından fagositoza uğrama olasılığını azalttığı tespit edilmiştir (Geib *et al.* 2016). Bu, melanin üretiminin bu tür için çevresel streslere karşı hayatta kalma avantajı sağladığını ortaya koyar. Aynı zamanda, melanin pigmentinin bu türlerdeki korunma mekanizmasında önemli bir rol oynadığını ve bu pigmentin organizmanın çevresel adaptasyonunda kritik bir bileşen olduğunu göstermektedir.

Melanin üretimi, *Aspergillus* cinsinin farklı türlerinde biyokimyasal çeşitlilik göstermekte olup, bu çeşitlilik, türlerin ekolojik nişlerinde ve yaşam döngülerinde önemli farklılıklara neden olmaktadır. Örneğin, *A. niger* ve *A. tamarii*'nin yüksek melanin üretim kapasitesi, bu türlerin daha fazla UV ışınımına ve çevresel strese maruz kaldıkları ortamlarda yaşamalarını ve hayatta kalmalarını desteklemektedir. Öte yandan, *A. sydowii* gibi düşük melanin üretim kapasitesine sahip türler, muhtemelen daha korunaklı ortamlarda veya farklı korunma mekanizmaları geliştirmiştir.

A. terreus'un melanin sentezinde yer alan enzimlerin ayrıntılı karakterizasyonu, bu türün melanin üretiminde benzersiz bir biyokimyasal yola sahip olduğunu ortaya koymuştur. Melanin, bu türde UV ışınımına ve asidik ortamlara karşı koruma sağlarken, aynı zamanda amiplerin fagositoz yeteneğini de azaltarak, organizmanın hayatta kalma şansını artırmaktadır. Bu özellikler, *A. terreus*'un çevresel stres faktörlerine karşı geliştirdiği adaptasyon stratejilerinin bir parçası olarak düşünülebilir.

Sonuç olarak, *Aspergillus* türleri arasındaki melanin üretim mekanizmaları, türlerin ekolojik ve biyolojik gereksinimlerine göre evrimsel olarak şekillenmiş olup, bu türlerin çevresel streslere karşı korunma stratejilerinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu çalışma, *Aspergillus* türleri arasında melanin üretiminin büyük ölçüde çeşitlilik gösterdiğini ve bu çeşitliliğin organizmaların yaşam ortamlarına ve karşılaştıkları çevresel zorluklara bağlı olarak

geliştiğini göstermektedir. Her bir türün melanin üretim yolu ve kapasitesi, onların ekolojik nişlerinde hayatta kalma ve üreme stratejilerinde kritik bir faktör olarak ortaya çıkmaktadır.

Deriden izole edilen *Ochroconis mirabilis*'in genomu analiz edilmiştir. Bu mantarın, melanin ve çeşitli enzimler üreterek farklı ortamlarda hayatta kalma stratejileri hakkında daha derin bir anlayış sağladığı ortaya konulmuştur (Yew *et al.* 2016).

Auricularia auricula tarafından üretilen melaninin yapısı ayrıntılı olarak belirlenmiş ve incelenmiştir. Azot oranı düşük veya azotsuz ortamların melanin üretiminde önemli bir düşüşe yol açtığı ve tirozin eksikliğinin de melanin sentezini azalttığı rapor edilmiştir. UV-Vis, FTIR, NMR ve elemental analiz sonuçlarına göre, elde edilen melaninin ömelanin olduğu ve 5,6-dihidroksiindol ile 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asidin makromoleküler bir polimer yapısına sahip olduğu saptanmıştır (Sun *et al.* 2016).

Wang ve arkadaşlarının (2017) çalışmasında, PVA/dopamin-melanin nanokompozit filmlerin, 200–400 nm arasındaki tüm UV bölgesini tamamen engelleyebildiği ve aynı zamanda görünür spektrumda yüksek şeffaflığını koruduğu gösterilmiştir. Bu çalışma, ışığa duyarlı malzemeler için etkili bir UV koruması ve şeffaf malzeme üretimi sağlamıştır. Ayrıca, *Termitomyces albuminosus*'tan elde edilen melanin pigmentinin UV-Vis, FTIR, NMR ve elemental analizleri sonucunda %54,6 C, %3,5 H, %2,4 N, %26,9 O ve %12 S içerdiği ve feomelanin yapısına sahip olduğu belirlenmiştir (De Souza *et al.* 2018).

Klebsiella pneumoniae S-1, *Alcaligenes faecalis* PBI ve *Enterobacter sp.* ABI bakterilerinin, 3 g/L tirozin varlığında, homogentisik asit öncülüğünde piyomelanin sentezlediği bildirilmiştir (Singh *et al.* 2018).

Auricularia auricula üzerinde yapılan çalışmada, %1 metanol, %0,25 fıstık yağı, %1 stearik asit veya %0,5 palmitik asidin melanin biyosentezini desteklediği, ancak Tween 80'in melanin oluşumunu belirgin şekilde azalttığı tespit edilmiştir. İnhibitör testi ve taramalı elektron mikroskopu analizleri, üretilen melaninin ömelanin yapısında olduğunu ortaya koymuş ve bu melaninin güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Wu *et al.* 2018).

A. auricula'dan elde edilen melaninin kimyasal antioksidan aktivitesi ve H₂O₂ kaynaklı hücresel oksidatif hasara karşı koruyucu etkisi incelenmiştir. Hücre morfolojisi üzerine yapılan gözlemler, melaninin oksidatif stresin neden olduğu hücresel morfolojik değişiklikleri düzelttiğini göstermiştir (Liu *et al.* 2019).

Suwannarach ve ekibi (2019), *Spissiomycetes endophytica* SDBRCMU319 türünden melanin pigmentinin ilk kez saflaştırılmasını, karakterizasyonunu ve optimizasyonunu gerçekleştirmiştir. Çalışmalarında, pigmentin asidik ortamda çökeldiğini, alkali çözeltilerde

çözündüğünü, oksitleyici ajanlarla rengini kaybettiğini ve çoğu organik çözücü ile suda çözünmediğini gözlemlemişlerdir. Pigmentin UV-Vis, FTIR ve EPR analizlerine dayanarak melanin olduğunu doğrulamışlardır. En yüksek mantar pigmenti verimini ise glikoz, maya özütü ve pepton içeren bir ortamda, 6,0 başlangıç pH'ında ve 25°C'de üç hafta süren kültürasyon sonunda elde etmişlerdir (Suwannarach *et al.* 2019).

Mürekkep balığından elde edilen melanin kullanılarak agar bazlı fonksiyonel filmler geliştirilmiştir. Melanin eklemesinin, agar filmin UV korumasını, hidrofobik özelliklerini, mekanik dayanıklılığını ve su buharı bariyerini iyileştirdiği tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, agar/melanin kompozit filmlerinin antioksidan özellikler sergilediği görülmüştür. Sepya mürekkebinden elde edilen melaninin, gıda paketlenme ve biyomedikal alanlarda antioksidan biyopolimer filmler geliştirmek için etkili bir dolgu maddesi olarak kullanılabilceği sonucuna varmışlardır (Roy and Rhim, 2019).

PVA/sentetik melanin kullanılarak şeffaf bir film üretilmiş ve bu melanin içeren UV koruyucu filmin, şeffaf bir kondansatör olarak kullanılabilceği ifade edilmiştir (Albano *et al.* 2019).

Kalamar mürekkebinden elde edilen melanin, farklı oranlarda (%0, 0.25, 0.5 ve 1.0) jelatin filmlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır. Melanin eklenmesi, filmin şeffaflığını azaltmış; ancak UV engelleme, mekanik dayanıklılık, termal stabilite ve su buharı bariyeri gibi özelliklerde iyileşme sağlamıştır. Jelatin/melanin nanokompozit filmlerin tüm bu özelliklerinin melanin konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, bu nanokompozit filmler, gıda paketlenme ve biyomedikal alanlar için büyük potansiyel taşıyan güçlü antioksidan aktiviteler sergilemiştir (Shankar *et al.* 2019).

Oh ve arkadaşları (2020) yaptıkları bir çalışmada, *Amorphotheca resiniae* küfünden elde edilen melaninin kimyasal yapısını analiz etmiş ve antioksidan potansiyelini incelemişlerdir. Yapısal analiz, saflaştırılmış melaninin eumelanine benzediğini ortaya koymuştur. Bu melanin, ABTS ve DPPH radikal temizleme analizlerinde güçlü antioksidan aktivite göstermiştir. Başka bir çalışmada, Fu ve arkadaşları (2022), *Sporisorium reilianum* küfünden elde edilen L-25 melaninin kimyasal yapısını ve biyolojik aktivitelerini açıklamaya odaklanmışlardır. Yapısal analiz, L-25 melaninin bir DL-hidroksifenilalanin (DOPA) tipi melanin olduğunu ortaya koymuştur. L-25, DPPH radikallerine karşı güçlü bir temizleme potansiyeli göstermiştir. Dahası, L-25, ROS ve malondialdehit seviyelerini ve laktat dehidrogenaz içeriğini azaltarak HepG2 hücrelerini oksidatif hasara karşı korumuştur.

Lachnum YM30'dan izole edilen hücre içi melaninin yapısal formülü, fungal ömelaninin karakteristik özelliklerini gösteren UV analizi, IR analizi, elemental analiz, NMR

ve ESI-MS analizlerine dayanarak belirlenmiştir. Saflaştırılmış melaninin, enflamatuar etkileri azalttığı bildirilmiştir (Xu *et al.* 2020).

Aspergillus fumigatus'un 1,8-dihidroksinaftalin (DHN) melaninini sentezlediği rapor edilmiştir. *Myristica fragrans*'ın hekzan ekstraktlarının ise *A. fumigatus*'un melanin üretimini %77 oranında düşürdüğü tespit edilmiştir (Hoda *et al.* 2020).

Pseudomonas sp. türü tarafından üretilen ömelaninin UV-B radyasyonuna karşı koruyucu etkisi ve sitotoksisite potansiyeli, fare fibroblast hücre hatları NIH3 T3 üzerinde in vitro olarak değerlendirilmiştir. Saflaştırılan pigment, sahip olduğu antioksidan özellikler sayesinde, fare fibroblast hücrelerini UV-B ışınlarının zararlı etkilerinden etkin bir şekilde koruyarak fotokoruyucu potansiyelini göstermiştir (Seelam *et al.* 2021).

Dietzia, kuraklığa ve ultraviyole ışınlarına karşı dayanıklı bir aktinobakteri türüdür. Bu bakterinin, L-tirozin varlığında koyu kahverengi bir melanin pigmenti üretebildiği tespit edilmiştir. Melaninin, serbest radikalleri yok etme ve güneşin ultraviyole ışınlarına karşı koruma sağlama gibi çeşitli biyolojik özellikler sergilediği belirlenmiştir. Ayrıca, Dietzia NM3'ten elde edilen melaninin, krom iyonlarını adsorpsiyon yoluyla uzaklaştırma yeteneği olduğu saptanmıştır (Eskandari and Etemadifar, 2021).

Surendirakumar ve arkadaşları (2022), endofitik küf *Phoma sp.* RDSE17'den elde edilen pigmentin biyolojik aktivitelerini değerlendirdiler. Saflaştırılmış pigmentin melanin olduğu doğrulandı ve yüksek DPPH radikal giderici aktivite gösterdi. Dahası, yazarlar *Phoma sp.* RDSE17'den türetilen melaninin patojenik bakteri ve mantarlara karşı antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğunu da bildirdiler. Dahası, bu pigment konsantrasyona bağlı bir şekilde bir insan akciğer kanseri hücre hattına (A549) karşı antikanser aktivite de gösterdi. Barretto ve Vootla (2020), *Cryptococcus rajasthanensis* mayasından elde edilen melaninin biyolojik aktivitelerini araştırdılar. Analizleri, bu mayadan türetilen melaninin antimikrobiyal, antioksidan (DPPH testi), antiinflamatuvar ve antikanser aktivitelere sahip olduğunu ve bunun terapötik potansiyelini gösterdiğini buldu. Chen ve arkadaşları (2021), *Auricularia auricula-judae* mantarındaki melaninin in vitro O₂•⁻, ABTS ve OH• radikallerini temizleyebileceğini ve *C. elegans*'ın in vivo ömrünü önemli ölçüde uzatabileceğini gösterdi. Li ve arkadaşları (2022), *Inonotus hispidus* mantarının meyve veren gövdelerinden iki farklı melanin fraksiyonunun (suda çözünen ve suda çözünmeyen melanin) antioksidan yeteneklerini test etti. Suda çözünen melaninin insan hepatik LO2 hücrelerinde H₂O₂ kaynaklı oksidatif hasarı ve hücre içi ROS'u önemli ölçüde azalttığını buldular.

Tong ve arkadaşları (2023), *Ophiocordyceps sinensis* mantarından elde edilen melaninin in vitro ağır metal şelatlama ve serbest radikalleri (DPPH ve ABTS) temizleme

aktiviteleri sergilediğini ve hücre içi ROS'u azaltabileceğini ve insan embriyonik böbrek hücre hattını (HEK293) H₂O₂ kaynaklı oksidatif hasara karşı koruyabileceğini ortaya koydu. Ayrıca melaninin UV bloke edici aktivite göstererek *S. cerevisiae* hücrelerini koruyabildiğini gösterdiler. Ma ve arkadaşları (2023), *Auricularia heimuer* mantarından elde edilen melaninin alkali çözeltilerde oldukça çözünür olduğunu ancak damıtılmış su ve organik çözücülerde çözünmediğini buldular. Ayrıca bu spesifik melaninin DPPH, OH• ve ABTS radikallerine karşı güçlü bir temizleme aktivitesine sahip olduğunu gösterdiler.



MATERYAL VE METOT

Melanin Üreten *Streptomyces* Suşlarının İzolasyonu

Melanin üreten *Streptomyces* suşlarının izolasyonu, (g/L) 20 agar, 1 L-tirozin, 0,5 KH₂PO₄, 0,4 MgSO₄·7H₂O, 0,5 NaCl, 0,03 FeSO₄, 0,03 MnSO₄, 0,004 CoCl₂, 0,003 CuCl₂ ve 0,002 ZnCl₂'den oluşan tirozin agar (TA) besiyerinde (pH 7,0) gerçekleştirilmiştir (Besiyerinde, tirozin tek başına karbon ve azot kaynağı olarak kullanıldı). Bunun için farklı toprak örneklerinden (domates tarlası toprağı, patates tarlası toprağı, ayçiçeğı tarlası toprağı, mısır tarlası toprağı ve buğday tarlası toprağı) (Erzurum, Türkiye) alınan toprak örnekleri steril tuzlu su ile seri olarak seyreltilmiş, seyreltilmiş örneklerin 0,1 mL'si TA içeren petri kaplarına yayılmış ve daha sonra petri kapları 30°C'de 10 gün boyunca aerobik olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca petri kapları dikkatlice incelenmiş ve ortama ekstraselüler formda pigment (kahverengi-siyah) salgılayan mantar benzeri filamentli koloniler alt kültürlerle alınarak saflaştırılmıştır.

Streptomyces İzolatlarının Melanin Üretim Potansiyeli ve Tirozinaz Aktivitesinin Analizi

Bu aşamada kahverengi-siyah pigmentasyon gösteren bakterilerin melanin üretim potansiyeli sıvı kültürde, yani tirozin broth (TB) besiyerinde test edilmiştir. TB ile TA arasındaki tek fark TB'nin agar içermemesidir. Bunun için TA besiyerinde yetiştirilen her izolat için miselyumdan çıkarılan bir parça (çapı 0,5 cm) 250 ml' lik erlen içerisindeki steril TB besiyerine (100 ml) ekilmiştir. Daha sonra erlenler çalkalayıcıya yerleştirilmiş ve 150 rpm çalkalama hızıyla 30°C'de 10 gün inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda kültürler santrifüj edilmiş ve üstteki sıvıdaki melanin miktarı ve tirozinaz aktivitesi belirlenmiştir. Öte yandan pigmentin melanin olduğuna dair ön kanıt elde etmek için pigmentin dalga boyu taraması bir UV-Vis spektrofotometre üzerinde 200-700 nm'de gerçekleştirilmiştir. Dalga boyu tarama işlemi için, kurutulmuş pigment ilk olarak alkalik pH'da çözülmüştür. Bu amaçla kurutulmuş pigmentin bulunduğu tüpe distile su eklenmiş ve daha sonra 5 M NaOH (Son konsantrasyon 10 mg/ml) kullanılarak süspansiyonun pH'sı 12'ye ayarlanmıştır. Elde edilen verilere göre en yüksek miktarda melanin üreten izolat seçilerek çalışmanın ilerleyen aşamalarında kullanılmıştır.

En üretken izolataın moleküler olarak tanımlanması

Maksimum miktarda ekstraselüler melanin üreten izolat, 16S rRNA dizi analizine göre tanımlanmıştır. Bunun için, izolat başlangıçta 30°C'de 120 saat boyunca TA besiyerinde aktive edilmiştir. İnkübasyondan sonra, gelişmiş miselyumlardan çıkarılan bir parça (çapı 0,5 cm) 250 mL'lik bir erlen içerisinde steril TB besiyerine (100 ml) ekilmiştir. Erlen, 30°C'de ve 150 rpm'de 120 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra en üretken izolataın genomik DNA'sı genomik DNA saflaştırma kiti (Promega wizardR, A2360) kullanılarak izole edilmiştir. DNA örneğinin saflığını kontrol etmek için 260 nm'deki ve 280 nm'deki absorbansların oranı ölçülmüştür. 16S rRNA geninin PCR amplifikasyonu aşağıdaki oligonükleotid primerleri kullanılarak yapıldı: UNI16S-F (5'-ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA) ve UNI16S-R (5'-ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA). PCR ürününün pGEM-T vektör sistemine (Promega, İngiltere) klonlanmasından sonra, rekombinant plazmidler Wizard® Plus SV Minipreps (Promega, İngiltere) kullanılarak geliştirilen kolonilerden izole edilmiştir. Klon daha sonra dizilenmiş (Macrogen) ve dizi, GenBank veritabanındaki dizilerle karşılaştırılmıştır.

Çalkalamalı şişe kültüründe melanin üretiminin optimizasyonu

Optimizasyon çalışmalarının ilk adımında, üç farklı kültür ortamında en iyi izolat ile melanin üretimi test edilmiştir. İlk ortam, kimyasal bileşimi yukarıda açıklanan TB'ydı. İkinci ortam, yani PYIB (pepton-maya özütü-demir broth), 5 g/L pepton, 1 g/L maya özütü ve 0,5 g/L ferrik amonyum sitrat ve sudan (pH 7,0) oluşuyordu. Üçüncü ortam (PYITB), 1 g/L tirozinin yanı sıra 5 g/L pepton, 1 g/L maya özütü, 0,5 g/L ferrik amonyum sitrat ve su içeriyordu (pH 7,0). Optimizasyon deneylerinin sonraki aşamalarında, başlangıç pH'sının (5-9), sıcaklığın (20-40) ve inkübasyon süresinin (72-192 saat) melanin üretimine etkileri araştırılmıştır. Optimizasyon deneyleri, 100 mL üretim ortamı içeren 250 mL' lik erlenler içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Fermantasyon Parametrelerinin Analizi

Tirozinaz aktivitesinin belirlenmesi

Ekstraselüler tirozinaz aktivitesi, önceki çalışmalarda bildirilen yöntemlere göre bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir (El-Naggar ve ark., 2017; Restaino ve ark., 2024). Kısacası, santrifüjlemeyle (4 °C'de 15 dakika boyunca 12.000 rpm) elde edilen kültür süpernatantının 0,5 mL'si, L-3, 4-dihidroksifenil alanin (L-DOPA, 4 mg/ml fosfat tamponu) içeren 2 ml 0,1 M potasyum fosfat tamponuna (pH 7) eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 30 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra reaksiyon karışımındaki kırmızı renklenmenin absorbansı (Spektrofotometre DU800, Beckman Coulter, Brea, CA, ABD)

kullanılarak 280 nm'de ölçülmüştür (Tepkimede tirozinazlar, L-DOPA'nın kırmızı renk veren dopakinona oksidasyonunu katalize eder). Bir birim tirozinaz, dakikada absorbansta 0,001 birimlik artışa neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Melaninin saflaştırılması

Üstteki çözeltideki melanin asidik çöktürme ile saflaştırılmıştır (Restaino ve ark., 2024). Bu amaçla, üstteki çözeltiye son pH 1,5'e düşene kadar 5 M HCl çözeltisi eklenmiş ve ardından 24 saat boyunca 4 °C'de tutulmuştur. Bu sürenin sonunda, melanini çökeltecek için çözelti santrifüj edilmiştir (4 °C'de ve 6000 rpm'de 15 dakika). Sıvı fraksiyon uzaklaştırılmış ve çöken melanin saf su ile hafifçe yıkanmıştır. Son olarak, melanin 50 °C'de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuştur. Bu şekilde kısmen saflaştırılmış melanin elde edilmiştir. Tarama ve optimizasyon deneyleri sırasında kısmen saflaştırılmış melanin miktarı dikkate alınmıştır. Ancak, kimyasal karakterizasyon ve biyolojik aktiviteye odaklanan deneyler tamamen saflaştırılmış melanin kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Daha ileri saflaştırma için yukarıda açıklanan protokol tekrar uygulanmıştır. Yani, kısmen saflaştırılmış-kurutulmuş melanin damıtılmış suda çözüldükten sonra, hazırlanan melanin süspansiyonu sırasıyla asidik çöktürmeye (5 saat boyunca karıştırma koşulları altında 5 M HCl çözeltisi ile), santrifüjlemeye (15 dakika boyunca 4 °C ve 6000 rpm'de) ve kurutma işlemlerine tabi tutulmuştur. Bu şekilde, safsızlıklar (proteinler, nükleik asitler, vb.) giderilmesi amaçlanmış ve tamamen saflaştırılmış melanin hazırlanmıştır. Bu melanin daha sonra kimyasal karakterizasyon ve biyolojik aktivite ile ilgili deneylerde kullanılmıştır.

Saflaştırılmış Melaninin Karakterizasyonu

Melanin'in suda çözünürlüğü ve UV-vis spektrofotometrik analizi

Çalışmada kullanılan melanin asit çöktürme yöntemi ile saflaştırıldığından dolayı asidik olup suda çözünmez özelliktedir. Bu yüzden kurutulmuş melaninin ilk olarak su içerisinde farklı pH' larda çözünürlüğü test edilmiştir. Bunun için melanin saf su içerisine aktarılmış (10 mg/ml) ve süspansiyonun pH' sı 5 M NaOH kullanılarak farklı pH' lara (4-12) ayarlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonlar 5 dk boyunca oda sıcaklığında vorteks işlemine tabi tutulmuş ve bu sürenin sonunda karışımlar 5000 rpm' de 10 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından sıvı kısım uzaklaştırılmış, alttaki çökelti 50°C' de sabit ağırlığa kadar kurutulmuş ve ardından tartılmıştır. Başlangıç miktarından çökelti miktarı çıkartılarak melanin çözünürlüğü hesaplanmıştır. Öte yandan, maksimum melanin çözünürlüğünün tespit edildiği örnek dalga boyu taraması için kullanılmıştır (Melanin için dalga boyu taraması UV-vis spektrofotometre kullanılarak 200-700 nm' de yapılmıştır).

Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) ile melaninin analizi

Saflaştırılmış melaninin fonksiyonel grupları Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile analiz edilmiştir. Bu amaçla, 3 mg melanin ve 5 g potasyum bromür (KBr) ayrı ayrı (sırasıyla 60°C ve 120°C'de) düşük basınç altında 12 saat kurutulmuştur. Melanin 100 mg KBr ile homojenize edilmiş ve karışım yaklaşık 0,2 mm kalınlığında çok ince diskler oluşturmak için sıkıştırılmıştır. Son olarak, karışımın FT-IR spektrumları 4000-400 cm⁻¹ aralığında analiz edilmiştir.

Saflaştırılmış Melaninin *In Vitro* Antioksidan Aktivitesi

DPPH radikalini uzaklaştırma aktivitesinin test edilmesi için, 0,3 mL numuneye (Melanin veya C vitamini çözeltisi) yaklaşık 0,9 ml DPPH çözeltisi (2 mg/mL) ilave edilip ve karışımın, oda sıcaklığında 30 dakika süreyle reaksiyona sokulduktan sonra absorbans 517 nm'de ölçülmüştür (Erel 2004; Ji *et al.* 2022). Test edilen örneklerin DPPH radikaline karşı temizleme aktiviteleri (%) denklem 1'e göre hesaplanmıştır [A₀ (kontrol): distile su ve DPPH içeren solüsyonun absorbansı, A₁: DPPH ve melanin veya C vitamini içeren solüsyonun absorbansı, A₂: DPPH içermeyen diğer bileşenleri içeren solüsyonun absorbansı (DPPH yerine etanol)].

$$\% \text{ Scavenging} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad (1)$$

Melaninin ABTS radikalini temizleme potansiyelini test etmek için ilk olarak ABTS çözeltisi hazırlanmıştır. Bu amaçla 9,9 mg potasyum persülfat, 15 ml ABTS sulu çözeltisi (5,55 mmol/L) ile karıştırılacak ve çözelti, mavi-yeşil renk oluşuncaya kadar karanlık ortamda 25°C'de 15 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra bu çözelti PBS (100 µmol/L, pH 7,4) çözeltisi ile 734 nm'de absorbansı 0,7 olana kadar seyreltilmiştir. Daha sonra numunenin 1 mL'si (melanin veya C vitamini) 2 mL ABTS solüsyonu ile 25 dakika reaksiyona sokulacak ve ardından karışımın absorbans değeri 734 nm'de ölçülmüştür (Erel 2004; Ji *et al.* 2022). Test edilen örneklerin ABTS radikaline karşı giderme aktiviteleri (%) denklem 1'e göre hesaplanmıştır [A₀ (kontrol): distile su ve ABTS içeren solüsyonun absorbansı, A₁: ABTS ve melanin veya C vitamini içeren solüsyonun absorbansı, A₂: ABTS içermeyen diğer bileşenleri içeren solüsyonun absorbansı (ABTS yerine distile su)].

Melaninin hidroksil radikali (OH•) temizleme aktivitesi, Qiao *et al.* (2009) ve Ji *et al.* (2022) tarafından açıklanan yöntemle göre belirlenmiştir. Bunun için numunenin 0,5 mL'si (melanin veya C vitamini), 0,5 mL salisilik asit çözeltisi (9 mmol/L), 0,5 ml FeSO₄ çözeltisi (9 mmol/L) ve 0,5 ml H₂O₂ çözeltisi (9 mmol/L) ile karıştırılmıştır. Hazırlanan son çözelti 37°C'de 40 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda karışımın absorbansı 510 nm'de

ölçülmüştür. Test edilen örneklerin OH• radikaline karşı giderme aktiviteleri (%) denklem 1'e göre hesaplanmıştır [A₀ (kontrol): numune (melanin veya C vitamini) ve H₂O₂ çözeltisi yerine distile su içeren çözeltinin absorbansı, A₁: numune (melanin veya C vitamini) ve diğer bileşenleri içeren karışımın absorbansı, A₂: H₂O₂ içermeyen (yerine distile su) fakat numune dahil diğer bileşenleri içeren solüsyonun absorbansı].

Melaninin' nin O₂•- radikali giderme gücü önceki çalışmalarda açıklanan yöntemle göre (Liu *et al.* 1997; Bi *et al.* 2013) hafif değişikliklerle test edilmiştir. Bunun için, 1 mL melanin çözeltisi, 1 mL 300 µM nitrotetrazolium blue chloride (NBT), 1 mL 936 µM β-nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) ve 1 mL 120 µM fenazin metosülfat (PMS) 100 mM'de fosfat tamponu (pH 7,4) içerisinde karıştırılmıştır. Karışım 1 dakika karıştırıldıktan sonra karanlık ortamda 25°C'de 5 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra reaksiyon karışımının absorbansı 560 nm'de ölçülmüş ve O₂•- radikali giderme potansiyeli denklem 1' e göre hesaplanmıştır. [A₀ (kontrol): numune yerine distile su diğer bileşenleri içeren solüsyonun absorbansı, A₁: numune (melanin veya C vitamini) ve diğer bileşenleri içeren solüsyonun absorbansı, A₂: NBT içermeyen (yerine PBS) fakat numune dahil diğer bileşenleri içeren solüsyonun absorbansı].

Saflaştırılmış Melaninin Sitotoksosite Analizi

L929 (fare fibroblast hücre hattı, ATCC CCL-1) hücreleri, L-glutamin, %10 fetal dana serumu (FBS) ve 100 U/ml penisilin/streptomisin takviyeleri içeren DMEM/F-12 ortamında 37°C'de %5 CO₂ inkübasyonunda kültüre edilmiştir. Kültür ortamı her 2 günde bir değiştirilmiştir.

Sitotoksosite, mitokondriyal redüktaz aktivitesini ölçen in vitro suda çözünür tetrazolyum tuzu (WST-1) testi ile belirlenmiştir (Bakan ve ark., 2020). 3×10⁴ hücre/mL konsantrasyonu 96 kuyulu plakalara ekilmiş ve kültürlenmiş hücreler farklı dozlarda test örneğiyle (6,25-1000 µg/ml) muamele edilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Muamele edilmemiş hücreler negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Optik yoğunluk, çok kuyulu bir plaka okuyucusunda (Thermo Scientific™ Multiskan™ Mikroplaka Spektrofotometresi) 450 nm'de ölçülmüştür. Bağlı canlılık, negatif kontrollere (işlenmemiş hücreler) göre hesaplanmıştır. Canlılık yüzdesi aşağıdaki gibi belirlenmiştir;

$$(\%) \text{ Viable cells} = \frac{[(\text{absorbance of treated cells}) - (\text{absorbance of the blank})]}{[(\text{absorbance of the control}) - (\text{absorbance of the blank})]} \times 100$$

Hücre içi ROS'un ölçümü

DCFH-DA ve DHE tabanlı test, floresan moleküler bir prob kullanılarak yapılan bir oksidatif stres testidir (Beus ve ark., 2023). Farklı reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından 2',7-diklorofluorescein (DCFH) ve dihidroetidyum (DHE) boyasının oksidasyonuna dayanır. DCFH-DA hücre zarlarına serbestçe nüfuz eder ve hücreler tarafından hidrolize edilerek DCFH oluşturulur ve bu da hidroksil radikallerinin varlığında floresan 2',7'-diklorofluorescein'e (DCF) oksitlenir. DHE, bir süperoksit radikalının varlığında hücre içi olarak kararlı olan floresan 2-hidroetidyum'a (EoH) oksitlenir ve bu da dönüşümler arası değişkenlik riski olmadan DHE floresansının hassas bir şekilde ölçülmesine olanak tanır. ROS oluşumunun doz bağımlı ölçümleri, L929 hücreleri üzerinde 37°C'de 4 saat boyunca 6,25-1000 µg/ml doz aralığında test örneği ile muamele edilerek gerçekleştirilmiştir. Hidrojen peroksit (100 µM H₂O₂) pozitif kontrol olarak kullanılmış ve H₂O₂ ile muamele edilmeyen hücreler negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Test materyaline maruz bırakıldıktan sonra hücreler üç kez PBS ile yıkanmış ve daha sonra 30 dakika boyunca 20 µM DCFH-DA ve 20 µM DHE boyası ile boyanmıştır. Hücreler daha sonra tekrar PBS ile iki kez yıkanmış ve 485 nm dalga boyunda ve 535 nm emisyon dalga boyunda bir plaka okuyucu kullanılarak ölçülmüştür. Veriler, karşılık gelen negatif kontrollere kıyasla yüzde floresans olarak ifade edilmiştir.

Saflaştırılmış Melaninin H₂O₂ Kaynaklı Yaşlanmaya Karşı *In Vitro* Koruyucu Etkisi

L929 hücreleri, H₂O₂ ekilmeden önce 24 saat boyunca takviyeler içeren DMEM/F12 ortamında 96 kuyulu plakalara (1x10⁴ hücre/kuyu) ekilmiştir. 24 saat sonra hücreler bir kez kültür ortamıyla yıkanmış ve 2 saat boyunca 250 µM H₂O₂ ile muamele edilmiştir. Hücre canlılığı, test materyali ve/veya H₂O₂ ile muameleden sonra WST-1 ile tespit edilmiştir. Hücreler, %5 CO₂ içeren nemli bir atmosferde 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Numunelerin 450 nm'deki absorbansı, çok kuyulu bir plaka okuyucusu (Thermo Scientific™ Multiskan™ Mikroparka Spektrofotometresi) kullanılarak ölçülmüştür. Optik yoğunluk, her plakadaki uyarılmamış hücrelerin absorbansına göre normalize edilmiş ve kontrol değerlerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir (Chang ve ark., 2018).

Saflaştırılmış Melaninin *In Vitro* Yara İyileştirme Potansiyelinin Araştırılması

L929 hücre hattında IBIDI 2-kuyulu-Kültür-Ek Parçaları (Cat No: 81176, Almanya) kullanılarak *in vitro* yara iyileşmesi/çizilme testi gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, her bir kuyuya 1x10⁴ hücre/mL ekilmiş ve 24 saat boyunca 37°C'de kültüre bırakılmıştır (Lin ve ark., 2019, Bakan ve ark., 2020). İnkübasyondan sonra, plastik aparat atılmış ve hücreler PBS (Ca/Mg içermeyen) ile yıkanmıştır. Daha sonra farklı konsantrasyonlarda test materyali içeren serumsuz

ortamla muamele edilmiştir. Tedaviden sonra, hücreler gözlemlenmiş ve aralık kapanana kadar zaman noktasından ters mikroskop (ZEISS) altında fotoğraflanmıştır. Aralık ölçümleri Image J programı ile değerlendirilmiş ve kapanma yüzdesi üç tekrarla hesaplanmıştır.

Saflaştırılmış Melaninin HET-CAM Testi ile İrritasyon Özelliğinin Araştırılması

HET-CAM (tavuk yumurtası testi-koryoallantoik membran) testi, ICCVAM önerilerine göre test bileşiklerinin tahriş/antianjiyojenik potansiyelini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmıştır (Luepke ve ark., 1985, ICCVAM, 2010). Test, hayvan deneylerine alternatif yöntemlerin kullanılmasıyla hızlı ve güvenilirdir. Bu çalışmada döllenmiş tavuk yumurtaları (50-60 g) kullanılmıştır (n = 3). Yumurtalar $37 \pm 0,5$ ° C'de, %70 nemde 7 gün inkübe edilmiştir. 7. günde yumurtaların ekvatorunda bir cam (2x2 cm) açılmış, her test örneğinden 300 µL doğrudan CAM'a damlatılmış ve 0,5, 2 ve 5 dakikalık aralıklarla temas halinde bırakılmıştır. Negatif kontrol olarak %0,9 NaCl çözeltisi ve pozitif kontrol olarak 0,1 N NaOH kullanılmıştır. Membran vasküler hasar açısından incelenmiş ve geçen süre düzenlenmiştir. Oluşabilecek tahriş derecesi skoru (IS) aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır;

$$IS = (301 - tH) \times 5 + (301 - tL) \times 7 + (301 - tC) \times 9$$

tH, tL ve tC sırasıyla hemoliz, lizis ve pıhtılaşmanın meydana gelmesi için gereken süredir (saniye cinsinden). Formülasyonlar, IS değerlerine bağlı olarak tahriş edici olmayan (IS <1), hafif tahriş edici ($1 \leq IS < 5$), orta derecede tahriş edici ($5 \leq IS < 10$) veya şiddetli tahriş edici (IS > 10) olarak sınıflandırılır.

Saflaştırılmış Melaninin Antimikrobiyal Özelliğinin Araştırılması

Melanin'in antimikrobiyal etkinliği, Agar Well difüzyon testine göre iki gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Bacillus cereus* ATCC 11778) ve iki gram negatif (*Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894 ve *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883) bakteriye karşı test edilmiştir. Etkinliği farklı konsantrasyonlarda (250, 500, 750 ve 1000 µg/mL) test edilmiştir. Test bakterilerinin kültürleri önce Nutrient Broth (NB) ortamında 24 saat hazırlanmış ve kültürün 0,1 mL'si (kültürlerin yoğunluğu 0,5 McFarland'a ayarlandı) steril bir pamuklu çubuk kullanılarak besin agarı (NA) içeren petri kaplarına yayılmıştır. Daha sonra, farklı konsantrasyonlarda (250, 500, 750, 1000 ve 1250 µg/mL) hazırlanan melanin solüsyonlarından 40 µL, bir delici yardımıyla NA üzerinde açılan kuyucuklara eklenmiştir. Son olarak, petri kapları 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, kuyucuk etrafında oluşan zonlar ölçülmüştür.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Ekstrasellular Melanin Üreten Mikroorganizmaların İzolasyonu

Mevcut izolasyon çalışmalarında, tyrosin agar (TA) besiyeri üzerinde filamentli yapıda koloni oluşturan ve besiyerine kahve-siyah tonlarında pigment salgılayan (ekstrasellular) kolonilerin saflaştırılması amaçlanmıştır. Bu kriterler göz önüne alınarak, TA besiyeri üzerinde farklı olduğu düşünülen toplam 16 koloni saflaştırılmıştır. Bu kolonilerin, 4 tanesinin izolasyon kaynağı ayçiçeği tarlası toprağı, 2' sinin mısır tarlası toprağı, 4' ünün patates tarlası toprağı, 3' ünün domates tarlası toprağı ve 3' ünün buğday tarlası toprağı idi. 16 izolatın daha sonra sıvı besiyerindeki tyrosinaz aktiviteleri ve ekstrasellular melanin üretme yetenekleri araştırılmıştır. Bütün izolatların tyrosinaz aktivitesine sahip olduğu belirlensede, maksimum tyrosinaz aktivitesi (5250 U/L) SY8 izolatı için ölçülmüştür. Benzer şekilde, bütün izolatlar sıvı besiyerinde kahverengi-siyah renklenme meydana getirirse de görsel olarak en fazla renklenme SY8 izolatının kültüründe tespit edilmiştir. Ayrıca, yöntem kısmında belirtildiği gibi pigment santrifüj ve asit muamelesi işlemleri ile saflaştırılmış ve daha sonra da kurutulmuş ve tartılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre sıvı kültürde en yüksek miktarda (1.87 gr/L) pigmenti patates tarlası toprağından izole edilen SY8 izolatının ürettiği tespit edilmiştir. Dahası, sadece SY8 izolatının değil patates tarlası toprağından izole edilen diğer izolatlarında (SY5, SY6 ve SY7) melanin üretme potansiyeli diğer 12 izolttan daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, melanin üreten mikroorganizmalar için patates tarlası toprağının iyi bir izolasyon kaynağı olduğunu işaret etmektedir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, maksimum miktarda melanin üreten SY8 kodlu izolat, çalışmanın sonraki aşamaları için seçilmiştir.

Tablo 1. İzolatların Pigment ve Tirozinaz Üretme Potansiyelleri

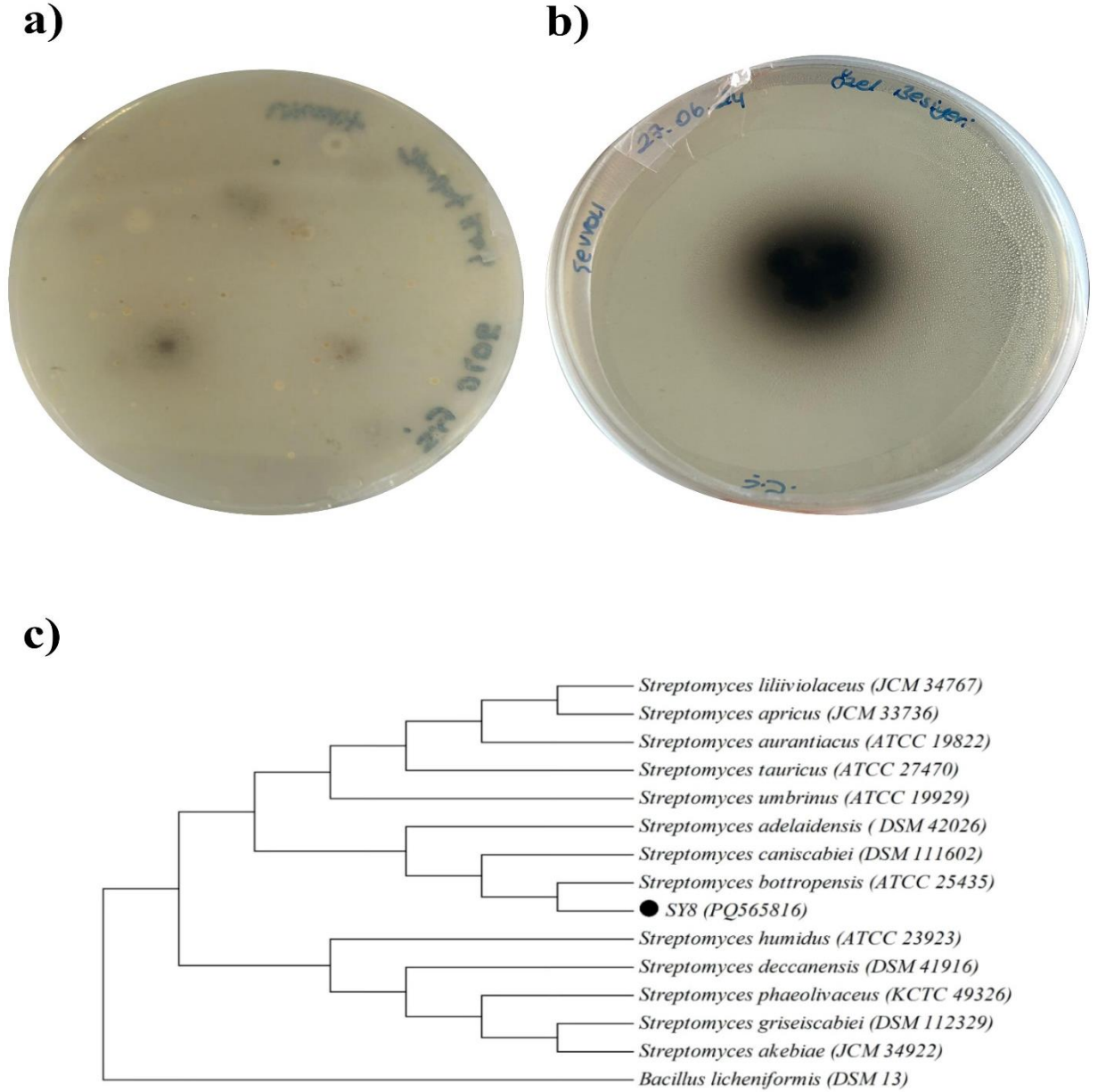
İzolasyon kaynağı	İzolat kodu	Tirozinaz aktivitesi (U/L)	Melanin	
			Miktar (g/L)	Renklenme
Ayçiçeği tarlası toprağı	SY1	1760	0.34	Zayıf
	SY2	1340	0.39	Zayıf
	SY3	2360	0.66	Orta
	SY4	3420	1.21	İyi
Patates tarlası toprağı	SY5	5760	1.63	İyi
	SY6	4830	1.48	İyi
	SY7	1640	0.81	Orta
	SY8	5250	1.87	Orta
Mısır tarlası toprağı	SY9	1460	0.33	Zayıf
	SY10	3450	1.12	Orta
Domates tarlası toprağı	SY11	3130	0.89	Orta
	SY12	5740	1.59	Orta
	SY13	1120	0.23	Zayıf
Buğday tarlası toprağı	SY14	2350	0.77	Orta
	SY15	4340	1.35	İyi
	SY16	2690	0.76	Orta

zayıf < 0.5 g/L, 0.5 < orta < 1 g/L, iyi ≥ 1 g/L

SY8 Kodlu İzolatın Moleküler Teşhisi

16S rRNA dizi analizine göre, SY8 izolatı *Streptomyces bottropensis* (GenBank: PQ565816) olarak tanımlanmıştır. *S. bottropensis*, çeşitli toprak ortamlarından izole edilen zorunlu aerobik, spor oluşturan bir bakteridir (Ahmed *et al.* 2020; Ma *et al.* 2020). Bu türün bazı suşlarının patatesten yaygın uyuz hastalığına neden olduğu belgelenmiştir (Leiminger *et al.* 2013; Zhou *et al.* 2017; Karagöz ve Kotan, 2017; Sarwar *et al.* 2018). Literatürdeki bu bilgiler göz önüne alındığında, SY8 suşunun patates tarla toprağından izole edilmesi şaşırtıcı olmamalıdır. Literatürde, *S. bottropensis* suşlarının makrosiklik peptid antibiyotik bottromisin ve tip II poliketidler (rishirilidler ve mensakarsin) ürettiği bildirilmiştir (Tsypik *et al.* 2021). Ayrıca, önceki bir çalışmada (Leiminger *et al.* 2013), *S. bottropensis* türlerinin bazı suşlarının agar besiyerinde melanoid pigmentleri sentezleyebildiği bildirilmiştir. Ancak, *S. bottropensis* suşlarından melanin üretimi (çalkalamalı erlen kültüründe veya fermentör kültüründe) veya saflaştırılmış melaninlerinin karakterizasyonu ve biyolojik aktiviteleri hakkında literatür çalışması yoktur. Bu nedenle, mevcut çalışmada, *S. bottropensis* SY8'den çalkalamalı erlen

kültüründe melanin üretilmesi ve üretilen melaninin karakterize edilmesi ve biyolojik aktivitelerinin araştırılması biyoteknolojik ve tıbbi çalışmalara katkıda bulunabilir.

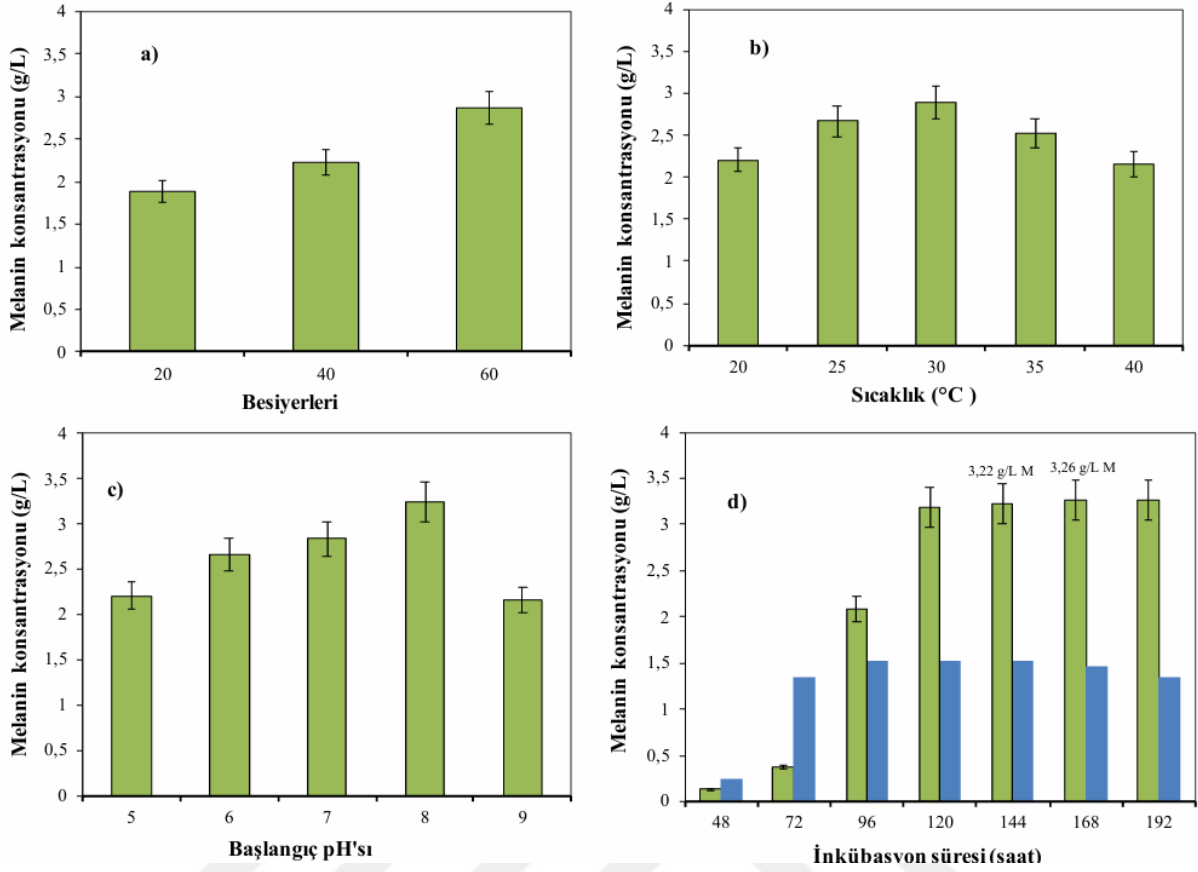


Şekil 1. Streptomyces izolatlarının 16S rRNA dizi analizi sonuçlarına göre filogenetik ağacı

SY8 Kodlu İzolat' dan Melanin Üretiminin Optimizasyonu

Literatürde *Streptomyces* suşlarının melanin üretim kapasitesinin ortam tipi, sıcaklık, başlangıç pH'ı ve inkübasyon süresi gibi farklı kültür parametrelerinden etkilendiği belirtilmektedir (Dholakiya *et al.* 2017; El-Naggar ve El-Ewasy, 2017; Krasesintra *et al.* 2023; El-Zawawy *et al.* 2024). Bu nedenle, bu parametreler *S. bottropensis* SY8'den melanin

üretimini artırmak için optimize edilmiştir. Sonuçlar, melanin verimliliğinin TB besiyerinde (tirozin ve mineral tuzları) düşük, PYIB besiyerinde (pepton-maya özütü-demir broth) orta ve PYITB besiyerinde (pepton-maya özütü-demir-tirozin broth) yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Şekil a). 20 ila 40 °C arasındaki test edilen sıcaklık değerleri arasında, maksimum melanin üretimi 30 °C'de elde edilmiştir (Şekil b). Bakterinin melanin üretme potansiyeli pH 5 ila 9 aralığında test edildiğinde, maksimum melanin üretiminin 8,0'luk bir başlangıç kültür Ph'sında başarıldığı belirlenmiştir (Şekil c). Optimizasyon deneylerinin son aşamasında, 48 ila 192 saatlik inkübasyon süresinin melanin üretimi ve hücre büyümesi üzerindeki etkisi test edilmiştir. Şekil d'de görüldüğü gibi, kültürün ilk 48 saati içinde kültürde zayıf bir hücre büyümesi ve düşük melanin sentezi olduğu görünmektedir. Hücre büyümesi 48. saatten sonra, melanin sentezi ise 72. saatten sonra önemli artış göstermiştir. Hücre büyümesi, yani hücre kuru ağırlığı 96. saatte maksimum seviyeye ulaşmıştır ve 96 ile 144. saatler arasında sabit kalmıştır. 144 ile 168. saatler arasında hücre kuru ağırlığında küçük bir azalma tespit edilmiştir. Bu azalma, kültürdeki besin öğelerinin tükenmesi nedeniyle bakteri hücrelerinin canlılığını kaybetmesi ve lizisiyle açıklanabilir. Hücre kuru ağırlığı 144-168. saatler arasında azalmasına rağmen melanin üretimi 168. saate kadar devam etmiştir. Bu durum 144-168. saatler arasında hücre lizisine bağlı olarak hücre içi melaninin kültür sıvısına salınması ile açıklanabilir. Ancak melanin konsantrasyonu 168. saatten sonra kültürde stabil hale gelmiştir. Tüm bu sonuçlar daha önceki çalışmalarda bildirilen diğer *Streptomyces* suşlarında da olduğu gibi, uzun inkübasyon süresi *S. bottropensis* SY8'de de melanin sentezini artırdığını ortaya koymuştur (El-Naggar ve El-Ewasy, 2017; Rudrappa *et al.* 2022; El-Zawawy *et al.* 2024) Ancak 168. saatte 120. saate göre daha fazla melanin üretimi meydana gelmesine rağmen farkın çok küçük olduğu unutulmamalıdır. Çalkalayıcının çalıştırılması için gereken elektrik ve iş gücü göz önüne alındığında, mevcut çalışmanın sonraki karakterizasyon ve biyolojik aktivite deneylerinde kullanılacak melanin üretimi için 120 saatlik bir inkübasyon süresi seçilmiştir.



Şekil 2. SY8 Kodlu İzolat' dan Melanin Üretiminin Optimizasyonu

Melaninin Total Üretimi ve Saflaştırılması

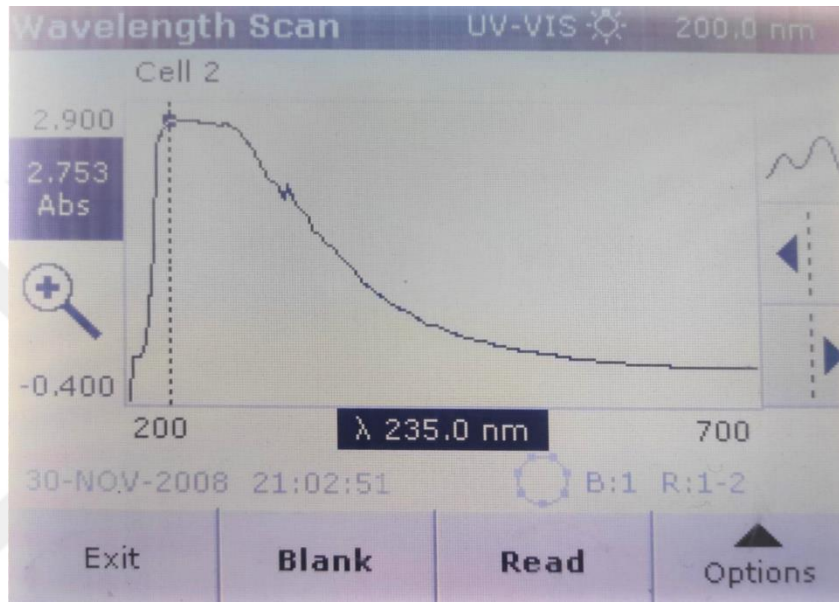
Karakterizasyon ve biyolojik aktivite deneyleri için büyük miktarda melanin gerektiğinden, melanin optimize edilmiş kültür koşulları altında (her biri 100 mL üretim ortamı içeren toplam 20 erlen) daha büyük hacimde (2 L) tekrar üretilmiştir. 120 saatlik inkübasyon süresinin sonunda, kültürler bir erlende birleştirilmiş ve melaninin tam saflaştırılması yöntemler bölümünde belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılmış melanin daha sonra karakterizasyon ve biyolojik aktivite deneyleri için kullanılmıştır.

Melaninin Karakterizasyonu

Melaninin suda çözünürlüğü ve UV-vis spektrofotometrik analizi

Görsel inceleme, pH 4 ila 7 aralığında karışımın dibinde çok fazla melanin çökeltisi olduğunu, melanin çözünürlüğünün yani kahverengi-siyah renk oluşumunun ise pH 7'nin üzerinde önemli ölçüde arttığını ve çökelti miktarının azaldığını ortaya koymuştur. Benzer şekilde, kantitatif analizler 7'nin üzerindeki pH değerlerin melaninin suda çözünürlüğünü artırdığını açıkça ortaya çıkartmıştır. Örneğin, melanin çözünürlüğünün pH 8, 9, 10, 11 ve 12'de

sırasıyla %42,3, %71,3, %81,4, %88,9 ve %93,7 olduğu belirlenmiştir. Çözünürlük oranlarına dayanarak, UV-Vis analizi için pH 12 olan melanin çözeltisi kullanılmıştır. *S. bottropensis* SY8 tarafından üretilen pigmentin melanin olduğuna dair ön kanıt elde etmek için, pigment için dalga boyu taraması 200-700 nm'de bir UV-Vis spektrofotometresinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3). Tarama sonuçları, melaninin 235 nm'de maksimum absorbanansa sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgu, *Streptomyces* türevi melaninlerin çoğunlukla 200-255 nm civarında maksimum absorpsiyon verdiğini gösteren literatürle tutarlıdır (El-Naggar ve El-Ewasy, 2017; Bayram *et al.* 2020; Li *et al.* 2021; Restaino *et al.* 2022; El-Zawawy *et al.* 2024).

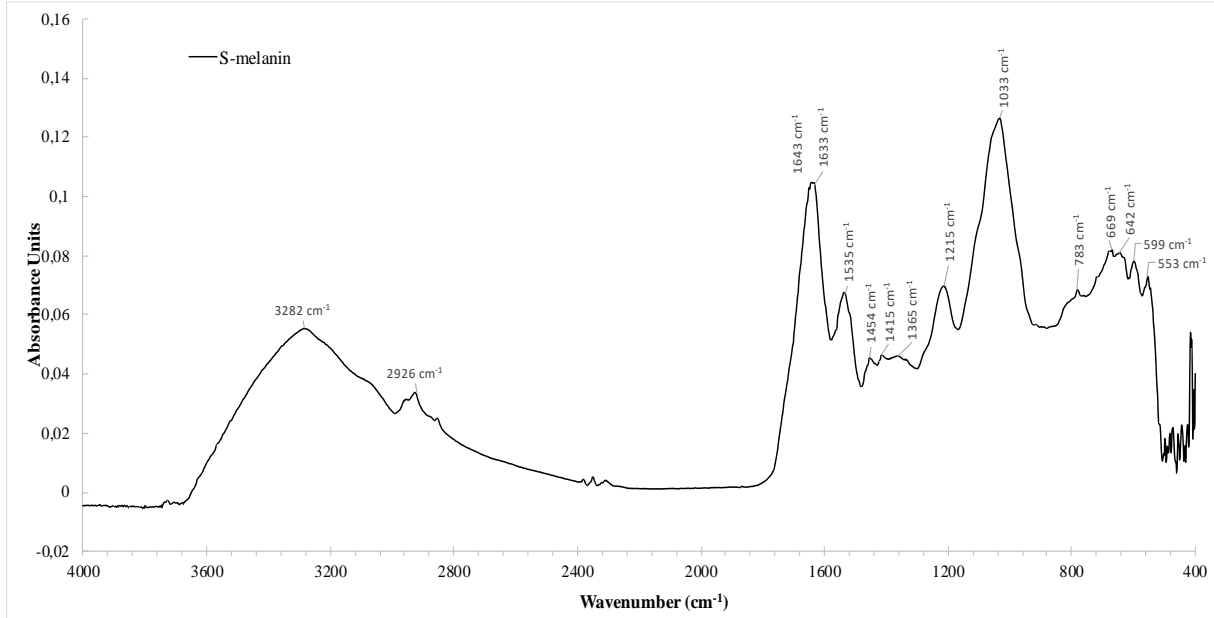


Şekil 3. Saflaştırılan melaninin UV-Vis spektrumu

Melaninin FTIR analizi

FTIR analizi melaninin 3282, 2926, 1643, 1633, 1535, 1454, 1415, 1365, 1215, 1033, 783, 669, 642, 599 ve 533 cm^{-1} 'de güçlü bantlar gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Melanin için 3282 cm^{-1} 'deki bant, moleküller arası hidrojen bağlarının ve -OH gerilme titreşiminin varlığına atfedilmiştir (Kayar ve ark., 2022). 2921 cm^{-1} 'deki güçlü bant, alifatik C-H grubunun (-CH₂ ve -CH₃) gerilme titreşimiyle ilişkili olduğu düşünülmüştür. Ayrıca, melanin pigmentlerinin alifatik C-H gruplarının 1400 ile 1500 cm^{-1} arasında bantlar verdiği bilinmektedir (Sajjan *et al.* 2010). Bu nedenle, melanin için 1454 cm^{-1} ve 1415 cm^{-1} 'de tespit edilen güçlü bantlar, alifatik C-H gruplarının (-CH, -CH₂ ve -CH₃) eğilme titreşim modlarının varlığına da atfedilmiştir. Daha önce açıklandığı gibi (Kayar *et al.* 2022), 1600 ve 1700 cm^{-1} aralığındaki bantlar (1643 cm^{-1} ve 1635 cm^{-1}), C=O ve C-N gruplarının gerilme titreşimi, 1480-1575 cm^{-1} aralığındaki bant (1535 cm^{-1}), N-H bükülmesi ve C-N gerilme titreşimine atfedilmiştir. 1365 cm^{-1} 'de tespit edilen güçlü absorbanın, daha önce bildirildiği gibi, bir C=O veya COO-grubunun varlığıyla ilişkili olduğu düşünülmüştür (Qiu *et al.* 2023). Önceki çalışmalarda

bildirildiği üzere (Sajjan *et al.* 2010; Wang ve Rhim, 2019; Khouqeer *et al.* 2022), 1033 cm⁻¹'deki güçlü absorbans melanin pigmentindeki alifatik yapının düzlem içi C-H'ına, 950 ila 750 cm⁻¹ aralığındaki bant (783 cm⁻¹) aromatik C-H düzlem dışı bükülmeye ve 700 cm⁻¹'in altındaki melanin için karakteristik olan bantlar (669, 642, 599 ve 533 cm⁻¹) ise alken C-H yapısına atfedilmiştir.

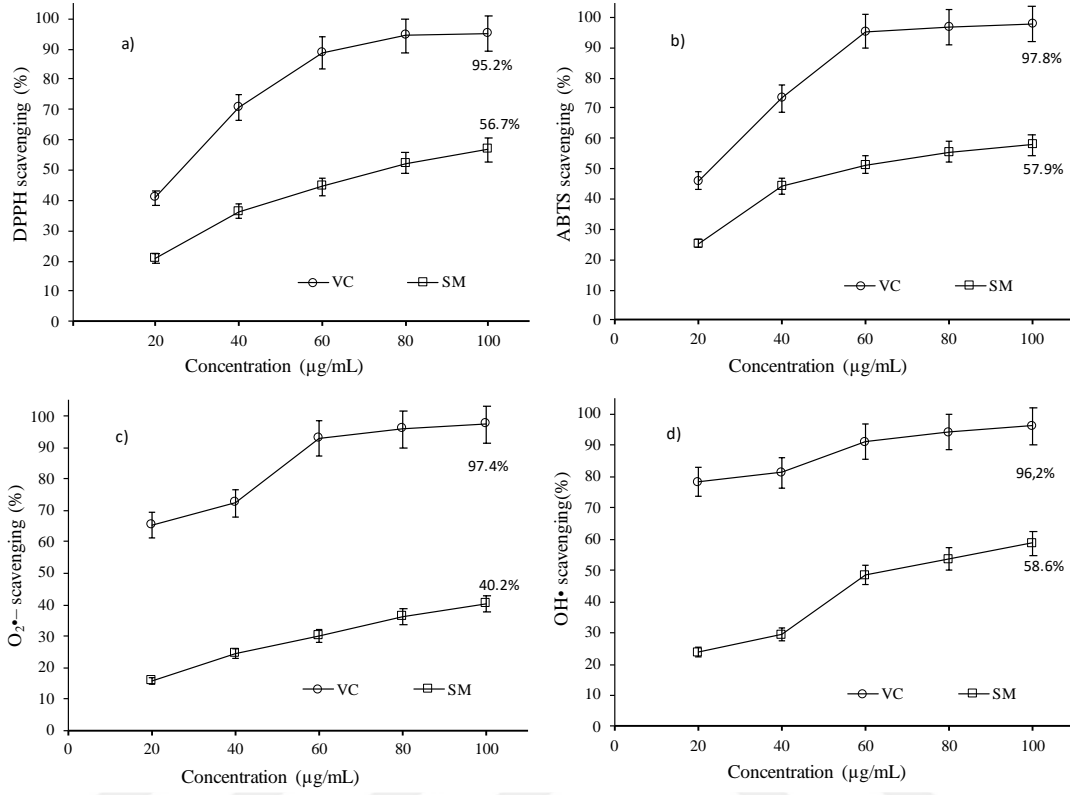


Şekil 4. Saflaştırılmış Melaninin FTIR ile Fonksiyonel Gruplarının Analizi

Saflaştırılmış Melaninin *In Vitro* Antioksidan Aktivitesi

Antioksidanlar, serbest radikal oluşturabilen maddelerin oksidasyon reaksiyonlarını önleyebilen ve yavaşlatabilen moleküllerdir. İnsanlardaki antioksidan moleküller ya vücut tarafından endojen olarak üretilir ya da ekzojen olarak dışarıdan alınır. Hem endojen hem de ekzojen antioksidanlar ROS temizleyici olarak görev yaparak ROS' u normal seviyelerde tutmaktadır (Arslan et al. 2023). Ekzojen antioksidanlar ise esas olarak bitkiler ve hayvanlardan elde edilmektedir. Literatürde, bitkilerin yanı sıra mantar, bakteri ve alg gibi organizmalarında ekzojen antioksidantların kaynakları olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (Esim et al. 2024). Örneğin, bakteriler polisakkaritler ve pigmentler gibi metabolitler üretmekte ve bu metabolitlerde *in vitro* ve *in vivo*'da antioksidan aktiviteler sergilemektedir (Chandra et al. 2020; Arslan et al. 2023; Esim et al. 2024). Melaninler bakteri kökenli antioksidant aktiviteli pigmentlerin en önemlileri arasında yer almaktadır (Mary et al. 2020; Polapally et al. 2022; Wu et al. 2022). Mevcut çalışmada da *S. bottropensis* SY8' den saflaştırılan melanin pigmentinin *in vitro* antioksidan aktivitesi araştırılmıştır. Şekil 5' ten görülebileceği gibi melanin test edilen radikallere karşı [DPPH, ABTS, hidroksil (OH•) ve süperoksit (O₂⁻)] antioksidant aktivitesi vitamin C' den daha düşük olsada, melaninin bu radikallerinin tamamına karşı kayda değer

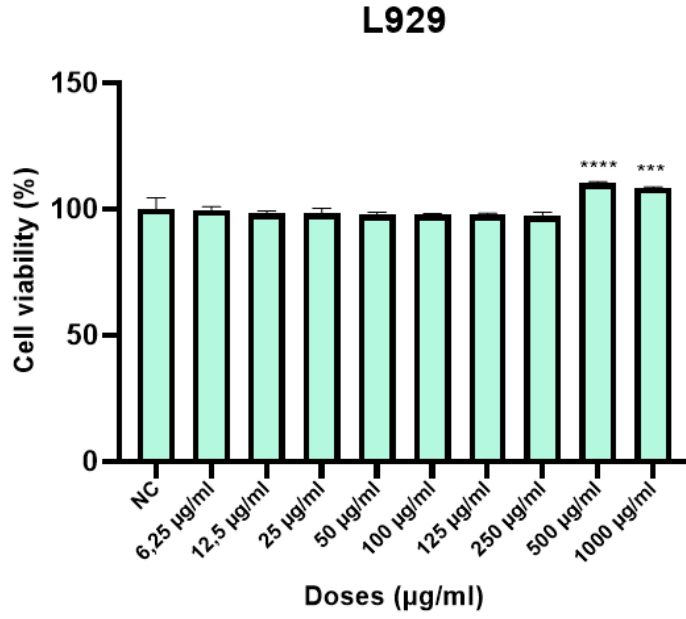
seveyede antioksidant aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Melanin için en yüksek antioksidant aktivite OH• radikaline (%58.6), bunun ardından da sırasıyla ABTS (%57.9), DPPH (%56.7) ve O₂^{•-} (%40.2) radikallerine karşı ölçülmüştür.



Şekil 5. Saflaştırılan melaninin DPPH (a), ABTS (b), OH• (c) ve O₂^{•-} (d) radikallerine karşı in vitro antioksidant aktiviteleri

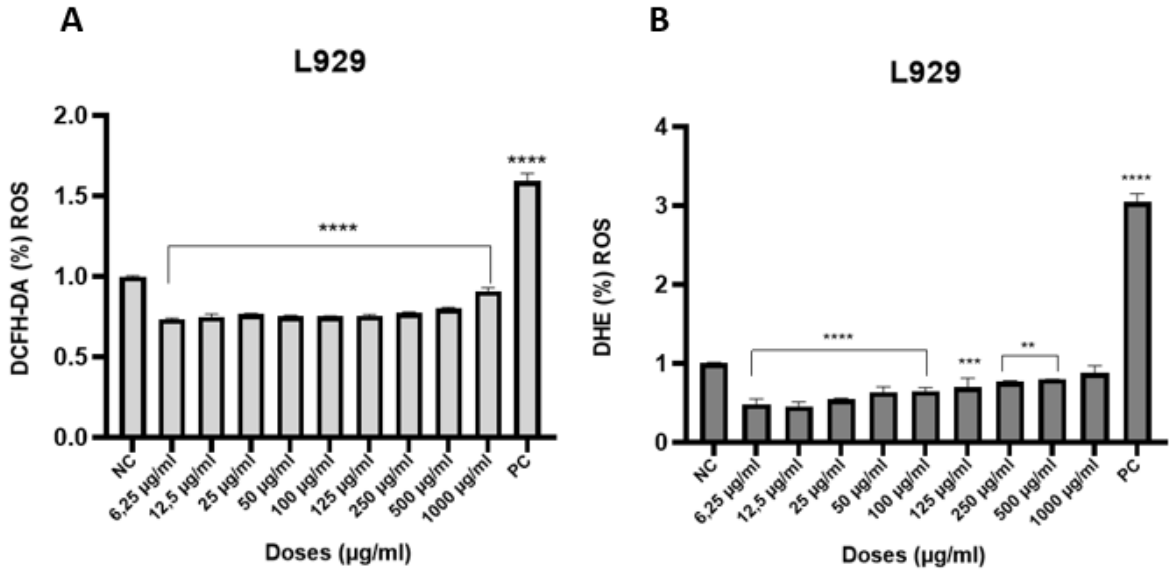
Saflaştırılmış melaninin sitotoksosite analizi

Deneyler, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, test materyaline 24 saat maruz bırakılan L929 hücre hattı üzerinde sitotoksik bir etki oluşmadığını ortaya çıkardı (Şekil 6).



Şekil 6. Melanin toksisitesinin L929 hücre hattı üzerinde test edilmesi. Hücre hattı melaninin farklı konsantrasyonlarına 24 saat süreyle maruz bırakılmış ve hücre canlılığı WST-1 testi ile analiz edilmiştir. Tüm veriler üç bağımsız tekrardan elde edildi ve ortalama±SD olarak sunulmuştur.

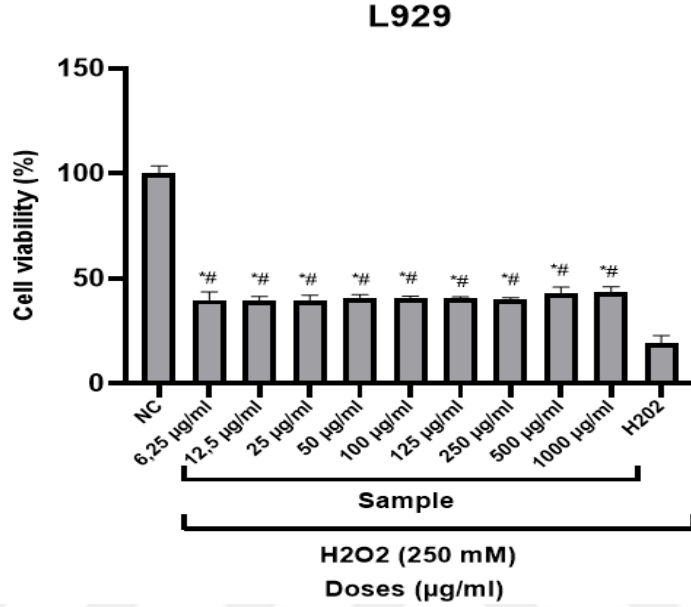
Bu aşamada, DCFH-DA ve DHE boyası kullanılarak ROS'un hücre içi düzeylerinin ölçümü, test örneği maruziyetiyle veya maruziyetsiz L929 hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. DCF ve DHE floresan sinyali uygulanan dozlarda önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir, bu da Şekil 7'de gösterildiği gibi ROS üretiminin kontrol gruplarına kıyasla azaldığını işaret etmektedir.



Şekil 7. L929 hücre hattında 4 saatlik inkübasyondan sonra test örneğinin hücre içi ROS düzeyi üzerindeki etkileri. Hücreler 20 µM DCFH-DA (A) ve 20 µM DHE boyası (B) ile boyandı. NC: Negatif kontrol (H₂O₂ ile işlem görmemiş), PC: Pozitif Kontrol (H₂O₂ ile işlem görmüş). Veriler, negatif kontrollere karşı hesaplama ile ±SD ile ortalama floresan sinyalini temsil eder ve örnek başına en az 10.000 olay toplanır

Melanin H₂O₂ ile İndüklenen Deri Yaşlanmasına Karşı Koruyucu Etkisi

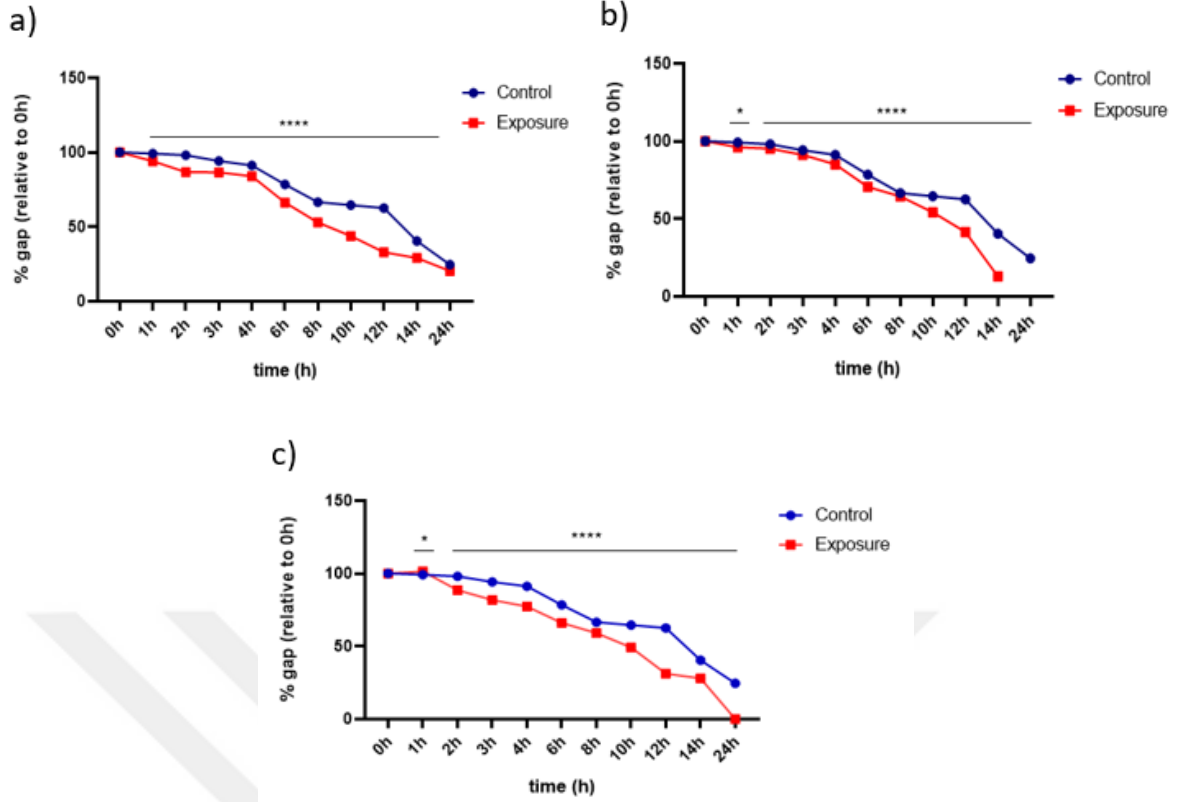
Elde edilen sonuçlar (şekil 8), H₂O₂' nin hücre canlılığını azalttığını ancak melanin uygulamasının canlılığı koruduğunu ortaya çıkardı. Özellikle, 500 ve 1000 µg melanin konsantrasyonlarında L929 hücrelerinin canlılığı üzerinde daha fazla koruyucu etkiye sahip olduğu tespit edildi.



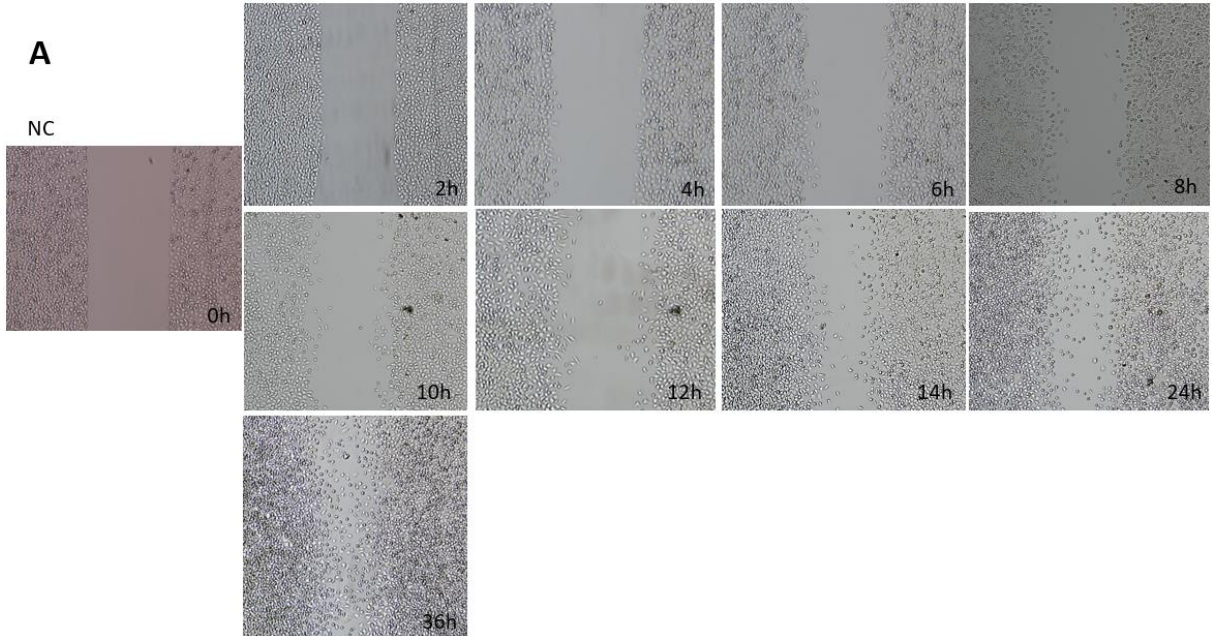
Şekil 8. Test örneğinin L929 hücre hattında indüklenen H₂O₂'ye (250µM) karşı potansiyel koruyucu etkileri. Hücreler 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda test örneğiyle muamele edildi, ön işlem 2 saat boyunca 250µM H₂O₂ ile yapıldı. Hücre canlılığı testi, negatif kontrollere (*) ve pozitif kontrole (#) karşı hesaplama yapılarak yürütüldü. Veriler, üç bağımsız deneyin ortalaması ± SD'dir

Saflaştırılmış Melaninin *In Vitro* Yara İyileştirme Potansiyeli

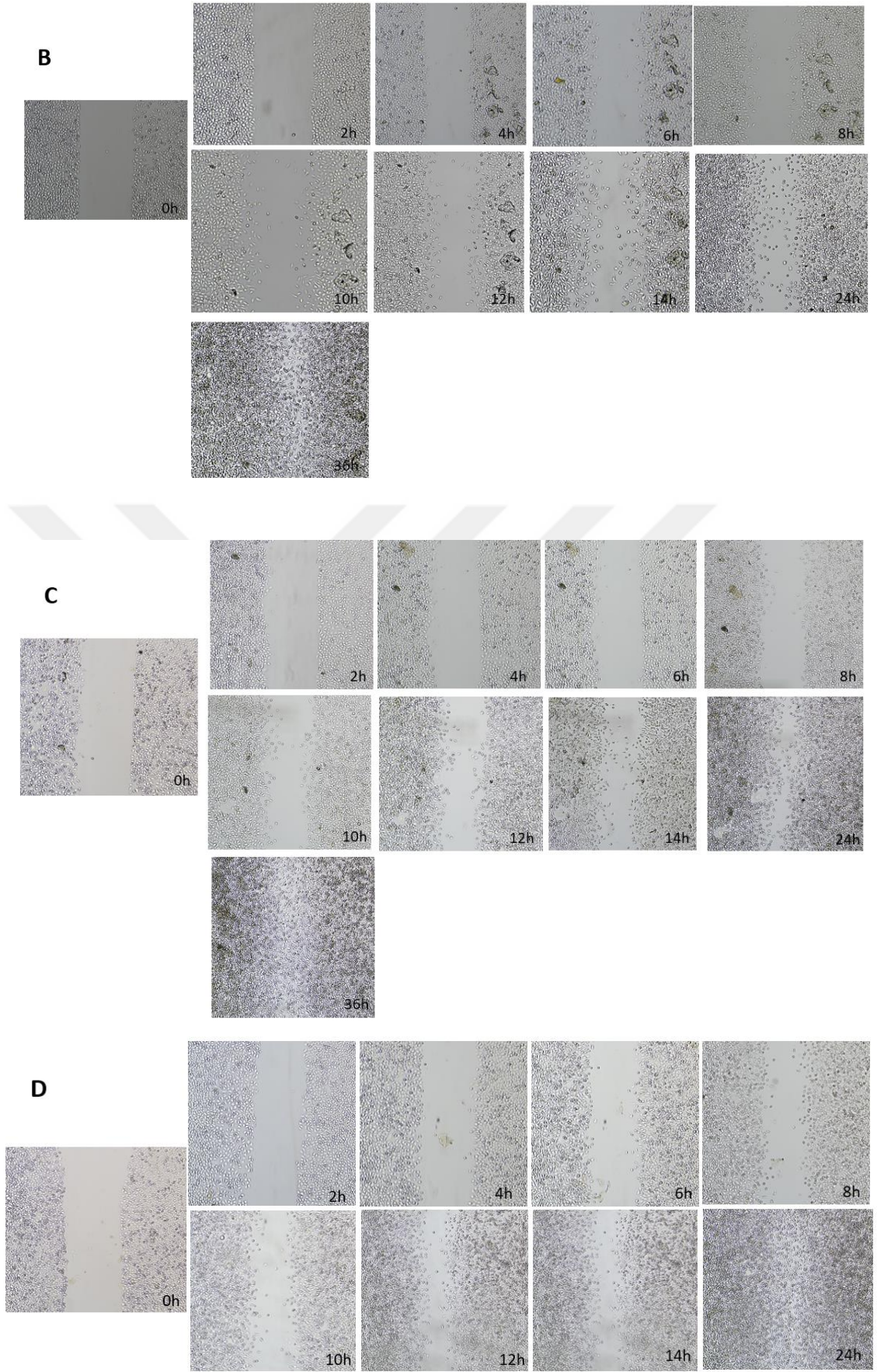
In vitro yara iyileşmesi/çizik testi, uygulanan maddeye göre göç sırasında hücrelerin morfolojik özelliklerini, hücreler arası etkileşimi ve kapanma zamanını gözlemlemek için kullanılmıştır. Deneyde, sitotoksisite test sonuçları dikkate alınarak, yara iyileşmesi üzerinde test maddesinin etkisini görmek için üç farklı doz seçilmiştir. Deney sonuçlarına göre, hücre göçü üzerinde uygulanan dozlar arasında fark bulunmaktadır. 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1 mg/ml uygulanan dozlar arasındaki fark karşılaştırıldığında, en iyi kapanma oranının en yüksek dozda olduğu görülmüştür. Negatif kontrol de dahil olmak üzere tüm gruplar 36 saatte kapanırken, 1 mg/ml doz grubu 24 saatte tamamen kapanmıştır. Kontrol ve maruz kalma grubu arasındaki kapanış farkı yüzdesi sırasıyla %20, %12, %27 olarak hesaplanmıştır (Şekil 9). Hücrelerin morfolojik değişimleri Şekil 10'da sunulmuştur.



Şekil 9. Melaninin zamana bağlı olarak L929 hücre hattında in vitro yara iyileşmesi/çizik testi üzerine etkisi a) 250 µg/ml, b) 500 µg/ml, c) 1 mg/ml uygulanan doz grupları. Veriler üç tekrarla ortalama ±SD olarak sunuldu



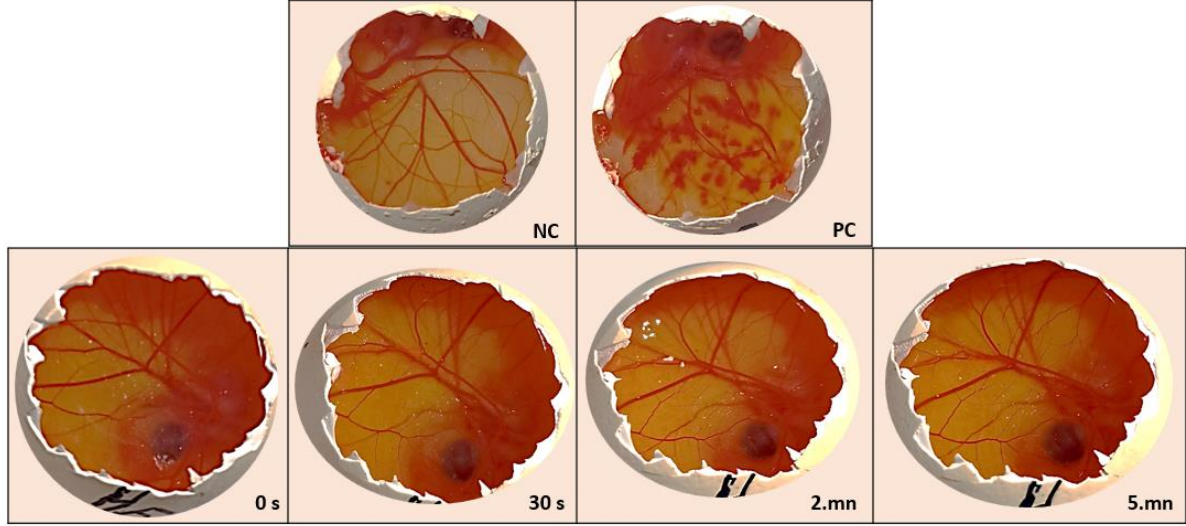
Şekil 10. L929 hücre hattında hücre göçünün morfolojik görüntülenmesi, 0 ile 36 saatlik zaman aralığında maruz kalma ve kontrol grupları arasında karşılaştırılabilir sonuçlar (10x büyütme). **A.** Negatif kontrol, **B.** 250 µg/ml, **C.** 500 µg/ml, **D.** 1mg/ml.



Şekil 10. L929 hücre hattında hücre göçünün morfolojik görüntülenmesi, 0 ila 36 saatlik zaman aralığında maruz kalma ve kontrol grupları arasında karşılaştırılabilir sonuçlar (10x büyütme). **A.** Negatif kontrol, **B.** 250 µg/ml, **C)** 500 µg/ml, **D)** 1mg/ml. (Devamı)

Saflaştırılmış Melaninin HET-CAM Testi ile İrritasyon Özelliğinin Araştırılması

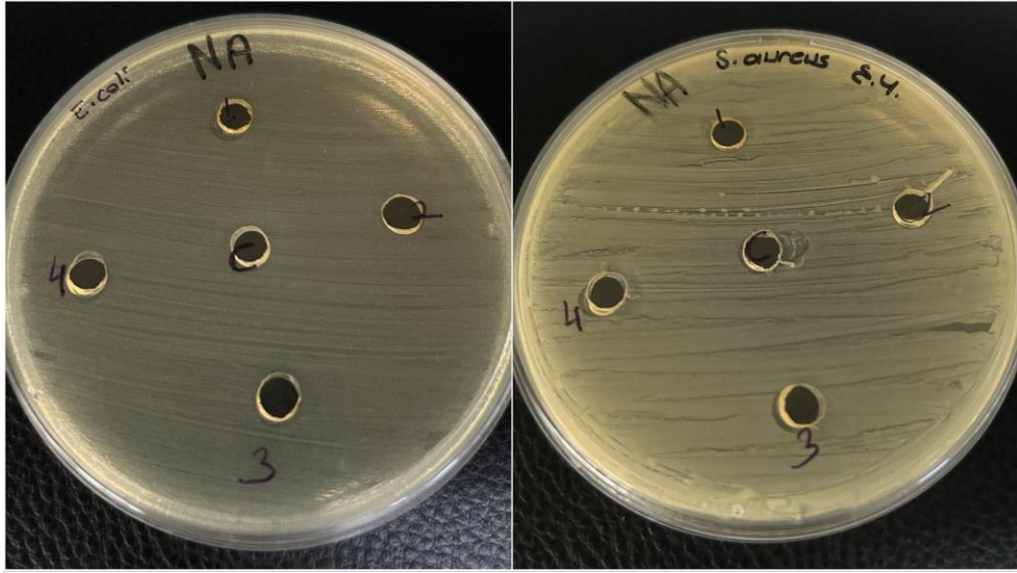
HET-CAM testinde, örnek yumurtaların CAM'ında muameleden sonra oluşan hemoraji, lizis ve pıhtılaşma parametreleri açısından kan damarlarının görsel muayene değişiklikleriyle değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, Şekil 11'de sunulduğu gibi herhangi bir tahriş etkisi ve belirgin bir damar yaralanması gözlenmemiştir.



Şekil 11. Test numunesine maruz kalmasından sonra farklı zaman noktalarındaki HET-CAM test sonuçları. Negatif kontrol olarak %0,9 NaCl, pozitif kontrol olarak ise 0,1 M NaOH kullanıldı (n=3)

Saflaştırılmış Melaninin Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

Literatürde *Streptomyces* türleri dahil mikroorganizmalardan elde edilen melaninlerin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir (Atta *et al.* 2015; Zerrad *et al.* 2015; El-Zawawy *et al.* 2024). Mevcut çalışmada ise test edilen konsantrasyonların hiçbirinde saflaştırılan melaninin gerek *E. coli* gerekse *S. aureus'* a karşı antimikrobiyal etkinlik göstermediği tespit edildi.



Şekil 12. Saflaştırılan melaninin antimikrobiyal etkinliğinin test edilmesi

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Mevcut çalışma patates tarlası toprağından izole edilen *Streptomyces bottropensis* SY8 bakterisinin yüksek miktarda melanin üretme kapasitesine sahip olduğunu, bu bakterinin melanin üretme yeteneğinin uygun besiyeri, pH, sıcaklık ve inkübasyon sürelerinin seçimi sayesinde artırılabilceğini ortaya çıkarmıştır. Çalışma ayrıca, bu bakteriden saflaştırılan melaninin *in vitro*' da DPPH, ABTS, OH• ve O2• radikallerine karşı antioksidant aktivite gösterdiğini, fibroblast hücreleri üzerinde toksisiteye neden olmadığını tam tersine bu hücreleri

H₂O₂ ile indüklenen yaşlanmaya karşı koruduğunu ve onların göçünü artırarak yara iyileştirme potansiyeli gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Elde edilen bu bulgular, melaninin kozmetik endüstrisinde deri yaşlanmasına karşı ve sağlık alanında ise deri yaralarının iyileştirilmesi için kullanılabileceğini göstermektedir. Sonraki çalışmalarımızda bu melaninin radyasyon ve güneş ışığına karşı koruyucu özellikleri ve antikanser aktivitesini test etmeyi planlamaktayız. Ayrıca, sonraki çalışmalarımızda tyrosin bakımından zengin ucuz substratlar kullanarak *S. bottropensis* SY8' den melanin üretmeyi de hedeflemekteyiz.

KAYNAKLAR

- Aberoumand, A. (2011). A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry.
- Albano, L. G. S., Paulin, J. V., Trino, L. D., Fernandes, S. L., & Graeff, C. F. O. (2019). Ultraviolet protective thin film based on PVA–melanin/rod-coated silver nanowires and its application as a transparent capacitor. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(47805).
- Amin, D. H., Abdallah, N. A., Abolmaaty, A., Tolba, S., & Wellington, E. M. (2020). Microbiological and molecular insights on rare Actinobacteria harboring bioactive prospective. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1), 1–12.
- Arai, T., & Mikami, Y. (1972). Chromogenicity of *Streptomyces*. *Applied Microbiology*, 23, 402–406.
- Araújo, M., Viveiros, R., Correia, T. R., Correia, I. J., Correia, V. D., Bonifácio, T., Casimiro, A., & Aguiar-Ricardo, A. (2014). Natural melanin: A potential pH-responsive drug release device. *International Journal of Pharmaceutics*, 469(1), 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.04.051>
- Aronson, J. N., & Wermus, G. R. (1965). Effects of *m*-tyrosine on growth and sporulation of *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology*, 90, 38–46.
- Arslan, N. P., Dawar, P., Albayrak, S., Doymus, M., Azad, F., Esim, N., & Taskin, M. (2023). Fungi-derived natural antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–24.
- Atta, H. M., El-Sayed, A. S., El-Desoukey, M. A., Hassan, M., & El-Gazar, M. (2015). Biochemical studies on the Natamycin antibiotic produced by *Streptomyces lydicus*: Fermentation, extraction and biological activities. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19(4), 360-371.
- Aurstad, K., & Dahle, H. K. (1972). The production and some properties of the brown pigment of *Aeromonas liquefaciens*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 13, 251–259.
- Babitskaya, V., Shcherba, V., Filimonova, T., & Grigorochuk, E. (2000). Melanin pigments from the fungi *Paecilomyces variotii* and *Aspergillus carbonarius*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36, 128–133.
- Baine, W., Rasheed, J. K., Feeley, J. C., Gorman, G. W., & Casida, L. E. Jr. (1978). Effect of supplemental L-tyrosine on pigment production in cultures of the Legionnaire's disease bacterium. *Current Microbiology*, 1, 93–94.
- Banerjee, A., Supakar, S., & Banerjee, R. (2014). Melanin from the nitrogen-fixing bacterium *Azotobacter chroococcum*: A spectroscopic characterization. *PLoS ONE*, 9(1), e84574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084574>
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1–43.

- Bayram, S. (2021). Production, purification, and characterization of *Streptomyces* sp. strain MPPS2 extracellular pyomelanin pigment. *Archives of Microbiology*, 203(7), 4419–4426.
- Bayram, S., Dengiz, C., Gerçek, Y. C., Çetin, İ., & Topçul, M. R. (2020). Bioproduction, structure elucidation, and in vitro antiproliferative effect of eumelanin pigment from *Streptomyces parvus* BSB49. *Archives of Microbiology*, 202, 2401–2409. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01956-2>
- Bennett, J. W., & Bentley, R. (2000). Seeing red: The story of prodigiosin. *Advances in Applied Microbiology*, 47, 1–32.
- Bilgehan, H. (1992). *Temel mikrobiyoloji ve bağışıklık sistemi*. Barış Yayınları.
- Bilgehan, H. (2000). *Klinik mikrobiyoloji özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları*. Barış Yayınları.
- Borić, M., Danevčič, T., & Stopar, D. (2011). Prodigiosin from *Vibrio* sp. DSM 14379; a new UV-protective pigment. *Microbial Ecology*, 62(3), 528.
- Bryant, D. A., & Frigaard, N. U. (2006). Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated. *Trends in Microbiology*, 14(11), 488–496.
- Cavallini, C., Vitiello, G., Adinolfi, B., Silvestri, B., Armanetti, P., Manini, P., Pezzella, A., D’Ischia, M., Luciani, G., & Menichetti, L. (2020). Melanin and melanin-like hybrid materials in regenerative medicine. *Nanomaterials*, 10(1518).
- Chandra, P., Sharma, R. K., & Arora, D. S. (2020). Antioxidant compounds from microbial sources: A review. *Food Research International*, 129, 108849.
- Chang, H.T., Jan C.R., Liang W.Z. (2018) Protective effects of a phenolic glycoside compound curculigoside on H₂O₂- induced oxidative stress and cytotoxicity in normal human breast epithelial cells. *Journal of Functional Foods* 41: 171–182
- Coelho, E., Reis, T. A., Cotrim, M., Mullan, T. K., & Corrêa, B. (2020). Resistant fungi isolated from contaminated uranium mine in Brazil shows a high capacity to uptake uranium from water. *Chemosphere*, 248, 126068.
- Conn, H. J., & Jean, E. C. (1941). Value of pigmentation in classifying actinomycetes. *Journal of Bacteriology*, 42, 791–799.
- Coyne, V. E., & Al-Harhi, L. E. N. A. (1992). Induction of melanin biosynthesis in *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9), 2861–2865.
- Çakmak Sancar, B., Öztürk, M., Akhan, M., & Ergün, Ö. (2023). Mikrobiyal pigmentlerin gıdalarda renklendirici olarak kullanılması. *İstanbul Gelişim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*.
- Dalfard, A. B., Khajeh, K., Soudi, M. R., Naderi-Manesh, H., Ranjbar, B., & Sajedi, R. H. (2006). Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(7), 1409–1416.
- De Souza, R. A., Kamat, N. M., & Nadkarni, V. S. (2018). Purification and characterisation of a sulphur-rich melanin from edible mushroom *Termitomyces albuminosus* Heim. *Mycology*, 9, 296–306.
- Devassy, E., Rebello, S., Puthur, S., Anoopkumar, A. N., Aneesh, E. M., Sindhu, R., ... & Pandey, A. (2024). Bacterial pigments in food production-associated advantages and disadvantages. *chetana: An Ivarian Journal for Scientific Research*, 1-5.

- Dieser, M., Greenwood, M., & Foreman, C. M. (2010). Carotenoid pigmentation in Antarctic heterotrophic bacteria as a strategy to withstand environmental stresses. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 42(4), 396–405.
- Downham, A., & Collins, P. (2000). Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science and Technology*, 35, 5–22.
- Durán, N., & Menck, C. F. (2001). *Chromobacterium violaceum*: A review of pharmacological and industrial perspectives. *Critical Reviews in Microbiology*, 27(3), 201–222.
- Eisenman, H. C., Mues, M., Weber, S. E., Frases, S., Chaskes, S., Gerfen, G., & Casadevall, A. (2007). *Cryptococcus neoformans* lakkaz hem D- hem de L-DOPA'dan melanin sentezini katalize eder. *Mikrobiyoloji*, 153, 3954–3962. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/011049-0>
- Elahian, F., Moghimi, B., Dinmohammadi, F., Ghamghami, M., Hamidi, M., & Mirzaei, S. A. (2013). The anticancer agent prodigiosin is not a multidrug resistance protein substrate. *DNA and Cell Biology*, 32(3), 90–97.
- El-Naggar, N. E. A., & El-Ewasy, S. M. (2017). Bioproduction, characterization, anticancer, and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. *Scientific Reports*, 7(1), 42129.
- El-Zawawy, N. A., Kenawy, E. R., Ahmed, S., & El-Sapagh, S. (2024). Bioproduction and optimization of newly characterized melanin pigment from *Streptomyces djakartensis* NSS-3 with its anticancer, antimicrobial, and radioprotective properties. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 23.
- Eom, T., Ozlu, B., Ivanová, L., Lee, S., Lee, H., Krajčovič, J., & Shim, B. S. (2024). Multifunctional Natural and Synthetic Melanin for Bioelectronic Applications: A Review. *Biomacromolecules*, 25(9), 5489–5511.
- Erdal, P., & Ökmen, G. (2013). Gıdalarda kullanılan mikrobiyal kaynaklı pigmentler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2, 56–68.
- Esim, N., Dawar, P., Arslan, N. P., Orak, T., Doymus, M., Azad, F., ... & Taskin, M. (2024). Natural metabolites with antioxidant activity from micro-and macro-algae. *Food Bioscience*, 105089.
- Eskandari, S., & Etemadifar, Z. (2021). Biocompatibility and radioprotection by newly characterized melanin pigment and its production from *Dietzia schimae* NM3 in optimized whey medium by response surface methodology. *Annals of Microbiology*, 71, 17.
- Eskandari, S., & Etemadifar, Z. (2021). Melanin biopolymers from newly isolated *Pseudomonas koreensis* strain UIS 19 with potential for cosmetics application, and optimization on molasses waste medium. *Journal of Applied Microbiology*, 131, 1331–1343.
- Faccio, G., Kruus, K., Saloheimo, M., & Thöny-Meyer, L. (2012). Bacterial tyrosinases and their applications. *Process Biochemistry*, 47(12), 1749–1760.
- Fedorow, H., Tribl, F., Halliday, G., Gerlach, M., Riederer, P., & Double, K. L. (2005). Neuromelanin in human dopamine neurons: Comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 75(2), 109–124. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.02.001>
- Fujii, I., Watanabe, A., Sankawa, U., & Ebizuka, Y. (2001). Claisen cyclase encoded by polyketide synthase gene *wA* is involved in fungal melanin biosynthesis in *Aspergillus*

nidulans. *Chemistry & Biology*, 8, 189–197. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)90068-1](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)90068-1)

- Gamal Shalaby, A. S., Ragab, T. I. M., Helal, M. M. I., & Esawy, M. A. (2019). Optimization of *Bacillus licheniformis* MAL tyrosinase: In vitro anticancer activity for brown and black eumelanin. *Heliyon*, 5, e01657.
- Ganesh Kumar, C., Sahu, N., Narender Reddy, G., Prasad, R. B. N., Nagesh, N., & Kamal, A. (2013). Production of melanin pigment from *Pseudomonas stutzeri* isolated from red seaweed *Hypnea musciformis*. *Letters in Applied Microbiology*, 57(4), 295–302.
- Gauslaa, Y., & Solhaug, K. A. (2001). Fungal melanins as a sunscreen for symbiotic green algae in the lichen *Lobaria pulmonaria*. *Oecologia*, 126, 462–471.
- Geib, E., Gressler, M., Viediernikova, I., Hillmann, F., Jacobsen, I. D., Nietzsche, S., Hertweck, C., & Brock, M. (2016). A non-canonical melanin biosynthesis pathway protects *Aspergillus terreus* conidia from environmental stress. *Cell Chemical Biology*, 23, 587–597.
- Ghattavi, K., Homaei, A., Kamrani, E., & Kim, S. K. (2022). Melanin pigment derived from marine organisms and its industrial applications. *Dyes and Pigments*, 201, 110214.
- Glagoleva, A. Y., Shoeva, O. Y., & Khlestkina, E. K. (2020). Melanin pigment in plants: Current knowledge and future perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 11, 770.
- Gürçüm, B. H., & Öneş, A. (2018). Bakteri ve mikroalglerin tekstil boyacılığında ve baskıcılığında kullanım olanakları. *İdil Dergisi*, 7(46), 701–709.
- Gürkok, S., & Özdal, M. (2023). Biyoteknolojide mikrobiyal pigmentler. *Eylemdeki Biyoteknoloji: Doğanın Potansiyelinin Ortaya Çıkarılması*, 7.
- Haining, R. L., & Achat-Mendes, C. (2017). Neuromelanin is not a molecular bystander in modern medicine. *Neural Regeneration Research*, 12, 372–375. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.202928>
- Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A., Forbes, A., Perkins, A., ... & Grant, G. (2016). Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, 8(8), 236.
- Hanson, K. M., Gratton, E., & Bardeen, C. J. (2006). Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. *Free Radical Biology and Medicine*, 41, 1205–1212.
- Harris, A. K., Williamson, N. R., Slater, H., Cox, A., Abbasi, S., Foulds, I., ... & Salmond, G. P. (2004). The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species- and strain-dependent genome context variation. *Microbiology*, 150(11), 3547–3560.
- Hizbullah, M. U., Farouq, A. A., Baki, A. S., Dabai, M. U., Nafi'u, A., Nata'ala, M. K., & Mustapha, G. (2018). Studies on bio-color production by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from soil. *Journal of Advances in Microbiology*, 12(1), 1–12.
- Hoda, S., Vermani, M., Joshi, R. K., Shankar, J., & Vijayaraghavan, P. (2020). Anti-melanogenic activity of *Myristica fragrans* extract against *Aspergillus fumigatus* using phenotypic-based screening. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20, 67.
- Huang, S., Pan, Y., Gan, D., Ouyang, X., Tang, S., Ekunwe, S. I., & Wang, H. (2011). Antioxidant activities and UV-protective properties of melanin from the berry of *Cinnamomum burmannii* and *Osmanthus fragrans*. *Medicinal Chemistry Research*, 20, 475–481.

- Hullo, M. F., Moszer, I., Danchin, A., & Martin-Verstraete, I. (2001). CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *Journal of Bacteriology*, 183, 5426–5430. <https://doi.org/10.1128/jb.183.18.5426-5430.2001>
- Hung, Y. C., Sava, V., Hong, M. Y., & Huang, G. S. (2004). Inhibitory effects on phospholipase A2 and antivenin activity of melanin extracted from *Thea sinensis* Linn. *Life Sciences*, 74, 2037–2047.
- Ignoffo, C. M., & Garcia, C. (1978). UV-photo inactivation of cells and spores of *Bacillus thuringiensis* and effects of peroxide on inactivation. *Environmental Entomology*, 7, 270–272.
- Indra Arulselvi, P., Umamaheswari, S., Ranandkumar Sharma, G., Karthik, C., & Jayakrishna, C. (2014). Screening of yellow pigment producing bacterial isolates from various eco-climatic areas and analysis of the carotenoid produced by the isolate. *Journal of Food Processing & Technology*, 5, 292.
- Joshi, C., Kothari, V., & Patel, P. (2016). Importance of selecting appropriate wavelength, while quantifying growth and production of quorum sensing regulated pigments in bacteria. *Recent Patents on Biotechnology*, 10(2), 145–152.
- Joshi, V. K., Attri, D., Bala, A., & Bhushan, S. (2003). Microbial pigments.
- Karcıoğlu, C. (2024). *Corynebacterium glutamicum* ile tirozinaza bağlı melanin üretimi (Yüksek lisans tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi. (Tez No. 866811).
- Kato, T., Horie, N., ... & Matsuta, T. (2012). Anti-UV/HIV activity of Kampo medicines and constituent plant extracts. *In Vivo*, 26, 1007–1013.
- Keleş, Y. (2015). Antosiyanin pigmentlerin biyokimyası ve analizi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8(1), 19–25.
- Kim, D., Kim, J. F., Yim, J. H., Kwon, S. K., Lee, C. H., & Lee, H. K. (2008). Red to red—the marine bacterium *Hahella chejuensis* and its product prodigiosin for mitigation of harmful algal blooms. *Biotechnology*, 18(10), 1621–1629.
- 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. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(24), 8307–8313.
- Kotob, S. I., Coon, S. L., Quintero, E. J., & Weiner, R. M. (1995). Homogentisic acid is the primary precursor of melanin synthesis in *Vibrio cholerae*, a *Hyphomonas* strain, and *Shewanella colwelliana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1620–1622.
- Kranthi, K. R., Kranthi, S., & Mohan, K. S. (2001). Potential of mango leaf extract containing flavonoids as UV protectant against inactivation of *Heliothis armigera* (Hubner) NPV. *Entomological Research*, 25, 155–160.
- Krishnan, B. (2021). Eukaryota. In J. Vonk & T. Shackelford (Eds.), *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_1026-2
- Kumar, C. G., Mongolla, P., Pombala, S., Kamle, A., & Joseph, J. (2011). Physicochemical characterization and antioxidant activity of melanin from a novel strain of *Aspergillus bridgeri* ICTF-201. *Letters in Applied Microbiology*, 53, 350–358.
- Lagashetti, A. C., Dufossé, L., Singh, S. K., & Singh, P. N. (2019). Fungal pigments and their prospects in different industries. *Microorganisms*, 7(12), 604.
- Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G., & Brakhage, A. A. (2003). Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 38, 143–158. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00526-1](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00526-1)

- Larsen, R. A., Wilson, M. M., Guss, A. M., & Metcalf, W. W. (2002). Genetic analysis of pigment biosynthesis in *Xanthobacter autotrophicus* Py2 using a new, highly efficient transposon mutagenesis system functional in a wide variety of bacteria. *Archives of Microbiology*, 178(3), 193–201.
- Lee, A., & Ghosh, P. R. (2023). Cellular and molecular physiology. In P. K. Das, V. Sejian, J. Mukherjee, & D. Banerjee (Eds.), *Textbook of Veterinary Physiology* (pp. 1–25). Springer, Singapore.
- Lee, J-H., & Hyun, C-K. (2014). Insulin-sensitizing and beneficial lipid-metabolic effects of the water-soluble melanin complex extracted from *Inonotus obliquus*. *Phytotherapy Research*, 28, 1320–1328.
- Lerch, K. (1981). Copper monooxygenases: Tyrosinase and dopamine beta-monooxygenase. In H. Sigel (Ed.), *Metal ions in biological systems, vol. 13: Copper proteins* (pp. 143–186). Marcel Dekker, Inc.
- Li, C., Ji, C., & Tang, B. (2018). Purification, characterization, and biological activity of melanin from *Streptomyces* sp. *FEMS Microbiology Letters*, 365(19), fny077.
- Liu, G. Y., & Nizet, V. (2009). Color me bad: Microbial pigments as virulence factors. *Trends in Microbiology*, 17(9), 406–413.
- Liu, X., Hou, R., Wang, D., Mai, M., Wu, X., Zheng, M., & Fu, J. (2019). Comprehensive utilization of edible mushroom *Auricularia auricula* waste residue—Extraction, physicochemical properties of melanin and its antioxidant activity. *Food Science & Nutrition*, 7, 3774–3783.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants, and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126.
- Malik, K., Tokkas, J., & Goyal, S. (2012). Microbial pigments: A review. *International Journal of Microbial Resource Technology*, 1(4), 361–365.
- Mandelli, F., Miranda, V. S., Rodrigues, E., & Mercadante, A. Z. (2012). Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1781–1790.
- Manirethan, V., Raval, K., Rajan, R., Thaira, H., & Balakrishnan, R. M. (2018). Kinetic and thermodynamic studies on the adsorption of heavy metals from aqueous solution by melanin nanopigment obtained from marine source: *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of Environmental Management*, 214, 315–324.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Senthilkumar, K., Sivakumar, K., & Kim, S-K. (2013). Isolation and characterization of biologically active melanin from *Actinoalloteichus* sp. MA-32. *International Journal of Biological Macromolecules*, 58, 263–274.
- Margalith, P. Z. (1992). *Pigment microbiology* (pp. 1-156). London: Chapman & Hall.
- Markham, K. R., Ryan, K. G., ... & Bloor, S. J. (1998). An increase in the luteolin: Apigenin ratio in *Marchantia polymorpha* on UV-B enhancement. *Phytochemistry*, 48, 791–794.
- Mary, T., Srimathi, S. D., Krishna, A. R., Jayaprabha, C., & Ramasamy, S. (2020). Antioxidant activity and sun screening effects of Bacterial melanin. *Journal of BioScience and Biotechnology*, 9(1), 47-58.
- Mason, H. S. (1959). Structure of melanins. In M. Gordon (Ed.), *Pigment cell biology* (pp. 563–581). Academic Press, Inc.
- Mattoon, E. R., Cordero, R. J. B., & Casadevall, A. (2021). Fungal melanins and applications in healthcare, bioremediation, and industry. *Journal of Fungi*, 7, 488.

- Michael, H. S. R., Subiramanian, S. R., Thyagarajan, D., Mohammed, N. B., Saravanakumar, V. K., Govindaraj, M., & Ramesh Kumar, C. (2023). Melanin biopolymers from microbial world with future perspectives—A review. *Archives of Microbiology*, 205(9), 306.
- Montefiori, D. C., & Zhou, J. Y. (1991). Selective antiviral activity of synthetic soluble L-tyrosine and L-dopa melanins against human immunodeficiency virus in vitro. *Antiviral Research*, 15, 11–25. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(91\)90037-r](https://doi.org/10.1016/0166-3542(91)90037-r)
- Nair, S., Chandramohan, D., & Bharathi, P. L. (1992). Differential sensitivity of pigmented and non-pigmented marine bacteria to metals.
- Narsing-Rao, M. P., Xiao, M., & Li, W. J. (2017). Fungal and bacterial pigments: secondary metabolites with wide applications. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1113.
- Nicolaus, R. A., M. Piattelli, & E. Fattorusso. (1964). The structure of melanins and melanogenesis-IV. *Tetrahedron* 20: 1163-1172.
- Nosanchuk, J. D., & Casadevall, A. (2006). Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), 3519-3528.
- Oh, J-J., Kim, J. Y., Kim, Y. J., Kim, S., & Kim, G-H. (2021). Utilization of extracellular fungal melanin as an eco-friendly biosorbent for treatment of metal-contaminated effluents.
- Orzechowski, A., Ostaszewski, P., Jank, M., & Berwid, S. J. (2002). Bioactive substances of plant origin in food--impact on genomics. *Reproduction, nutrition, development*, 42(5), 461–477. <https://doi.org/10.1051/rnd:2002037>
- Ozdal, M. (2019). Bakteriyel pigmentlerin üretimi ve farmakolojik kullanım alanları. In: Sağlık, H. A., & Günday, A. (Eds.), *Fen Bilimleri ve Matematik Alanında Yeni Ufuklar* (ss. 115-139). Gece Kitaplığı.
- Ozdal, M., & Kurbanoglu, E. B. (2018). Valorisation of chicken feathers for xanthan gum production using *Xanthomonas campestris* MO-03. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 259-263.
- Pal, A.K., Gajjar, D.U., Vasavada, A.R. (2013). DOPA and DHN pathway orchestrate melanin synthesis in *Aspergillus* species. *Medical Mycology*, 1–9.
- Palumbo, A. (2003). Melanogenesis in the Ink Gland of *Sepia officinalis*. *Pigment Cell Research* 16, 517–522. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2003.00080.x>.
- Pavan, M. E., López, N. I., & Pettinari, M. J. (2020). Melanin biosynthesis in bacteria, regulation, and production perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(4), 1357-1370.
- Petrosyan, T. (2015). Bacterial melanin in rat models of Parkinson's disease: a potential neuroprotective strategy. *Neural Regeneration Research*, 10(2), 211.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11-26.
- Płonka, P., Grabacka M. (2006) Melanin synthesis in microorganisms: biotechnological and medical aspects. *Acta Biochim. Pol* 53(3):429–443
- Polapally, R., Mansani, M., Rajkumar, K., Burgula, S., Hameeda, B., Alhazmi, A., ... & Sayyed, R. Z. (2022). Melanin pigment of *Streptomyces puniceus* RHPR9 exhibits antibacterial, antioxidant and anticancer activities. *PLoS One*, 17(4), e0266676.

- Polapally, R., Mansani, M., Rajkumar, K., Burgula, S., Hameeda, B., Alhazmi, A., Bantun, F., Almalki, A. H., Haque, S., ... & El Enshasy, H. A. (2022) *Streptomyces puniceus* sergiler. *PLoS BIR*, 17, e0197709
- Pomerantz, S. H., Murthy, V., V. (1974). Purification and properties of tyrosinases from *Vibrio tyrosinaticus*. *Arch. Bio chem. Biophys.* 160:73-82.
- Prabhakaran, K., W. F. Kirchheimer, & E. B. Harris. (1968). Oxidation of phenolic compounds by *Mycobacterium leprae* and inhibition of phenolase by substrate analogs and copper chelators. *J. Bacteriol.* 95:2051-2053.
- Pralea, I-E., Moldovan, R-C., Petrache, A-M., Ilieş, M., Hegheş, S-C., Ielciu, I., Nicoară, R., Moldovan, M., Ene, M., Radu, M., Uifălean, A., & Iuga, C-A. (2019). From Extraction to Advanced Analytical Methods: The Challenges of Melanin Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 3943.
- Ramesh, C., Vinithkumar, N. V., Kirubakaran, R., Venil, C. K., & Dufossé, L. (2019). Multifaceted applications of microbial pigments: current knowledge, challenges and future directions for public health implications. *Microorganisms*, 7(7), 186.
- Restaino, O. F., Manini, P., Kordjazi, T., Alfieri, M. L., Ripa, M., Mariniello, L., & Porta, R. (2024). Biotechnological production and characterization of extracellular melanin by *Streptomyces nashvillensis*. *Microorganisms*, 12(2), 297.
- Revskaia, E., Chu, P., Howell, R.C., Schweitzer, A.D., Bryan, R.A., Harris, M., Gerfen, G., Jiang, Z., Jandl, T., Kim, K., Ting, L.-M., Sellers, R.S., Dadachova, E., & Casadevall, A. (2012). Compton scattering by internal shields based on melanin-containing mushrooms provides protection of gastrointestinal tract from ionizing radiation. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 27, 570–576.
- Roy, S., Rhim, J.W. (2019). Agar-based antioxidant composite films incorporated with melanin nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 94, 391–398.
- Roy, S., Rhim, J.W. (2019). Preparation of carrageenan-based functional nanocomposite films incorporated with melanin nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 176, 317–324.
- Saputra, E. C., Huang, L., Chen, Y., & Tucker-Kellogg, L. (2018). Combination therapy and the evolution of resistance: the theoretical merits of synergism and antagonism in cancer. *Cancer Research*, 78(9), 2419-2431.
- Sava, V., Hung, Y., Blagodarsky, V., Hong, M. Y., & Huang, G. (2003) The liver protecting activity of melanin-like pigment derived from black tea. *Food Res Int* 36(5):505–511. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00199-0](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00199-0)
- Seelam, S.D., Agsar, D., Halmuthur M., S.K., Reddy Shetty, P., Vemireddy, S., Reddy, K.M., Umesh, M.K. & Rajitha, C. (2021). Characterization and photoprotective potentiality of lime dwelling *Pseudomonas* mediated melanin as sunscreen agent against UV-B radiations. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 216, 112126.
- Sen, M., Sen, P. (1965). Interspecific transformation in *Azotobacter*. *J. Gen. Microbiol.* 41:1-6.
- Shankar, S., Wang, L.F., & Rhim, J.W. (2019). Effect of melanin nanoparticles on the mechanical, water vapor barrier, and antioxidant properties of gelatin-based films for food packaging application. *Food Packaging and Shelf Life*, 21, 100363.
- Sheefaa, M. I., & Sivaperumal, P. (2022). Antioxidant activities from melanin pigment produced by marine actinobacterium of *Streptomyces* species. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 13(Suppl 1), S84.

- Singh, D., Kumar, J., Kumar, A. (2018). Isolation of pyomelanin from bacteria and evidences showing its synthesis by 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase enzyme encoded by hppD gene. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 864–873.
- Singh, S., Nimse, S. B., Mathew, D. E., Dhimmarr, A., Sahastrabudhe, H., Gajjar, A., ... & Shinde, P. B. (2021). Microbial melanin: Recent advances in biosynthesis, extraction, characterization, and applications. *Biotechnology Advances*, 53, 107773.
- Soliev, A. B., Hosokawa, K., & Enomoto, K. (2011). Bio active pigments from marine bacteria: applications and physiological roles. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, <https://doi.org/10.1155/2011/670349>
- Stafsnes, M. H., & Bruheim, P. (2013). Pigmented marine heterotrophic bacteria: Occurrence, diversity, and cha racterization of pigmentation. *Marine Biomaterials: Characterization, Isolation and Applications*. CRC Press, Boca Raton, 117-148.
- Sun-Shujing-Zhang, X., Sun-Shiwei-Zhang, L., Shan, S., & Zhu, H. (2016). Production of natural melanin by *Auricularia auricula* and study on its molecular structure. *Food Chemistry*. 190, 801–807.
- Sundaram, K. M. S., Curry, J. (1996) Photostabilization of the botanical in secticide azadirachtin in the presence of lecithin as UV pro tectant. *Environ Sci Heal* 31:1041–60.
- Surwase, S. N., Jadhav, S. B., Phugare, S. S., & Jadhav, J. P. (2013). Optimization of melanin production by *Brevundimonas* sp. SGJ using response surface methodology. *3 Biotech* 87–194. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0082-4>.
- Suwannarach, N., Kumla, J., Watanabe, B., Matsui, K., & Lumyong, S. (2019). Characterization of melanin and optimal conditions for pigment production by an endophytic fungus, *Spissiomycetes endophytica* SDBR-CMU319. *PLoS One*, 14(9), e0222187.
- Tarangini, K., Mishra, S. (2014) Production of melanin by soil microbial isolate on fruit waste extract: two step optimization of key param eters. *Biotechnol Rep* 4(2014):139–146. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.10.001>
- Teplyakova, T., Kosogova, T. (2015) Fungal bioactive compounds with antiviral effect. *J Pharm Pharmacol* 3(8):357. <https://doi.org/10.17265/2328-2150/2015.08.001>
- Thomson, N. R., Crow, M. A., McGowan, S. J., Cox, A., & Salmond, G. P. C. (2000). Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing logy, 36(3), 539-556.
- Tu, Y. G., Sun, Y. Z., & Tian, Y. G. (2009). Physicochemical characterisa tion and antioxidant activity of melanin from the muscles of Taihe Black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Bris son). *Food Chem* 2009;114:1345–50.
- Tuli, H. S., Chaudhary, P., Beniwal, V., & Sharma, A. K. (2015). Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 4669-4678.
- Tuli, H. S., Sandhu, S. S., & Sharma, A. K. (2014). Phar macological and therapeutic potential of Cordyceps with special reference to Cordycepin. *3 Biotech*, 4(1), 1-12.
- Tunca, M. (2019). Biyoaktif bakteriyel pigmentlerin izolasyonu, karakterizasyonu ve alternatif ilaç olarak uygulamaları (Yüksek lisans tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 571623).

- Turick, C. E., Knox, A. S., Becnel, J. M., Ekechukwu, A. A., & Milliken, C. E. (2010). Properties and function of pyomelanin. *Biopolymers* 449:72. <https://doi.org/10.5772/10273>
- Turick, C. E., Knox, A. S., Becnel, J. M., Ekechukwu, A. A., & Milliken, C.E. (2010). Properties and function of pyomelanin. *Biopolymers* 449:72. <https://doi.org/10.5772/10273>
- Upadhyay, S., Xu, X., Lowry, D., Jackson, J. C., Roberson, R. W., & Lin, X. (2016). Hücrealtı Fungal melanin için biyosentetik makinelerin bölümlendirilmesi ve ticareti. *Hücre Temsilcisi* 14, 2511–2518. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.059>
- Valipour, E. (2015). Isolation and characterization of a tyrosinase enzyme from native bacterial strain, cloning of the related gene, characterization of the recombinant enzyme and analysis of its biotechnological applications such as L-DOPA and melanin production (Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi). <http://library.cu.edu.tr/tezler/10627.pdf> adresinden edinilmiştir.
- Vavricka, C. J., Han, Q., Mehere, P., Ding, H., Christensen, B. M., & Li, J. (2014). Tirozin böceklerden ve memelilerden elde edilen metabolik enzimler: karşılaştırmalı bir bakış açısı. *Böcek Bilimi*. 21, 13–19. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12038>.
- Venil, C. K., Zakaria, Z. A., & Ahmad, W. A. (2013) Bacterial pigments and their applications. *Process Biochem* 48(7):1065–1079. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.006>
- Visca, P., Imperi, F., & Lamont, I. L. (2007). Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignifican ce. *Trends in Microbiology*, 15(1), 22-30.
- Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., & Howard-Jones, A. R. (2006). Biological formation of pyrroles: Nature's logic and enzymatic machinery. *Natural Product Reports*, 23(4), 517-531.
- Wang, Z., Lin, B., Mostaghim, A., Rubin, R. A., Glaser, E. R., Mittraparp-arthorn, P., Thompson, J.R., Vuddhakul, V., & Vora, G. J. (2013). *Vibrio campbellii* hmgA mediated pyomelanization impairs quorum sensing, virulence, and cellular fitness. *Frontiers in microbiology*, 4, 379.
- Williamson, N. R., Fineran, P. C., Leeper, F. J., & Salmond, G. P. (2006). The biosynthesis and regulation *Microbiology*, 4(12), 887-899.
- Wilson, W., Lowman, D., Puthumana, J., Kuriakose, R., Singh, I. B., & Philip, R. (2024). Biocompatible melanin from the marine black yeast *Hortaea werneckii* R23 with antioxidant and photoprotection property. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-16.
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA*, 87(12), 4576-4579.
- Wu, C. C., Li, H., Yin, Z. W., Zhang, H. T., Gao, M. J., Zhu, L., & Zhan, X. B. (2022). Isolation, purification, and characterization of novel melanin from the submerged fermentation of *Rhizobium radiobacter*. *Process Biochemistry*, 121, 263-275.
- Wu, J. M., Hsu, T. A., and Lee, C. K. (2003). Expression of the gene coding for bacterial hemoglobin improves β -galactosidase production in a recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 25(17), 1457-1462.
- Wu, Z., Zhang, M., Yang, Huandong, Zhou, H., & Yang, H. (2018). Production, physico chemical characterization and antioxidant activity of natural melanin from submerged cultures of the mushroom *Auricularia auricula*. *Food Bioscience*, 26, 49–56.

- Xu, S., Chan, P. (2015) Interaction between neuromelanin and alpha synuclein in Parkinson's disease. *Biomolecules* 5(2):1122–1142. <https://doi.org/10.3390/biom5021122>
- Xu, C., Chen, T., Li, J., Jin, M., & Ye, M. (2020). The structural analysis and its hepatoprotective activity of melanin isolated from *Lachnum sp.* *Process Biochemistry*, 90, 249–256.
- Ye, M., Guo, G. Y., Lu, Y., Song, S., Wang, H. Y., & Yang, L. (2014) Purification, structure and anti-radiation activity of melanin from *Lachnum YM404*. *Int J Biol Macromol* 63:170–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.046>
- Ye, M., Guo, G. Y., & Lu Yetal. (2014) Purification, structureandanti-radiation activity of melanin from *Lachnum YM404*. *Int J Biol Macromol* 2014;63:170–6.
- Yenilmez, A., 2017. Fungal biyopreparatların ticari formülasyonlarında kullanılabilecek UV koruyucu pigment üreten fungusların izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu. Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Yew, S. M., Chan, C. L., Kuan, C. S., Toh, Y. F., Ngeow, Y. F., Na, S. L., Lee, K. W., Hoh, C. C., Yee, W.Y., & Ng, K. P. (2016). The genome of newly classified *Ochroconis mirabilis*: Insights into fungal adaptation to different living conditions. *BMC Genomics*, 17, 91.
- Zerrad, A., Anissi, J., Ghanam, J., Sendide, K., Mohammed, E. H. (2014) Antioxidant and antimicrobial activities of melanin produced by a *Pseudomonas balearica* strain. *J Biotech Lett* 5(1):87–94
- Zucca, F. A., Segura-Aguilar J., Ferrari, E., Muñoz, P., Paris, I., Sulzer, D., & Zecca, L. (2017) Interactions of iron, dopamine and neuromelanin pathways in brain aging and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 155:96–119. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.09.012>

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Şevval YILDIRIM
Doğum tarihi:
Doğum Yeri:
Uyruğu:
Adres:
Tel:
E-mail:
Eğitim
Lise: Yomra Anadolu Lisesi
Lisans: Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
Tezden Üretilmiş Yayınlar