



**BİYOAKTİF BAKTERİYAL PİGMENTLERİN İZOLASYONU,
KARAKTERİZASYONU VE ALTERNATİF İLAÇ OLARAK
UYGULAMALARI**

Merve TUNCA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2019

Merve TUNCA tarafından hazırlanan “BİYOAKTİF BAKTERİYEL PİGMENTLERİN İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE ALTERNATİF İLAÇ OLARAK UYGULAMALARI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Belma ASLIM

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Başkan: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye: Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Tez Savunma Tarihi: 22/07/2019

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Merve TUNCA

22/07/2019

BİYOAKTİF BAKTERİYEL PİGMENTLERİN İZOLASYONU,
KARAKTERİZASYONU VE ALTERNATİF İLAÇ OLARAK UYGULAMALARI
(Yüksek Lisans Tezi)

Merve TUNCA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2019

ÖZET

Bu çalışmada, gıda, tekstil ve ilaç endüstrisinde, nörolojik hasara ve karsinojenik etkiye karşı koruyucu aktiviteye sahip olan, doğal gıda ve tekstil renklendiricisi veya nöral hasardan koruyucu/antikanser ajanı ilaç etken maddesi olarak kullanılabilecek bakteriyel kaynaklı pigment bulunması amaçlanmıştır. Bu kapsamda piyosiyanın üretimi için *Pseudomonas aeruginosa* MB713 suşu, prodigiosin üretimi için ise *Serratia marcescens* MB703 suşu kullanılmıştır. Suşların en iyi pigment üretme koşullarında pigment miktarları spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Pigmentlerin UV-Vis spektrofotometre, FT-IR ve GC-MS analizleri ile karakterizasyonu yapılmıştır. Pigmentler çözücü ekstraksiyonu yapılarak, kısmi olarak saflaştırılmış ve toz haline getirilmiştir. Pigmentlerin, SHSY-5Y insan nöroblastoma hücrelerinde canlılık üzerine etkileri, HT-29 insan kolon kanseri ve SK-MEL-30 insan melanoma hücrelerinde ise antiproliferatif etkileri MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Pigmentlerin antioksidan etkileri SOD ve CAT aktivitelerine ve MDA miktarlarına göre ELISA ile ortaya konulmuştur. Ayrıca, *in vitro* ve hücre modelinde asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyon etkileri Ellman yöntemine göre tespit edilmiştir. Suşların piyosiyanın üretimi 51 µg/mL iken, prodigiosin üretimi 72 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Piyosiyanın ve prodigiosin pigmentlerinin SK-MEL-30 hücrelerinde IC₅₀ değerleri sırasıyla 72 µM ve 70 µM olarak bulunmuştur. HT-29 hücrelerinde ise sadece prodigiosinin anlamlı antiproliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir (IC₅₀ 47 µM). Nöroblastoma hücreesindeki AChE inhibisyon etkileri incelendiğinde, piyosiyanın 100 µM uygulamada %40'a yakın inhibisyon gösterirken, prodigiosin hem *in vitro* hem de hücrel çalışmalarda inhibitörük etki göstermemiştir. Piyosiyanın ve prodigiosinin çok yüksek olmamakla birlikte, denenen tüm antioksidan parametreler üzerinde etkili olduğu ancak, piyosiyanınin daha fazla öne çıktığı görülmüştür. Bu sonuçlara göre, piyosiyanın pigmentinin antioksidan etkisi, SK-MEL-30 hücrelerinde antiproliferatif etkisi ve nöroblastom hücrelerinde nörodejeneratif hasara karşı koruyucu etkisinden dolayı piyosiyanın pigmentinin ilaç etken maddesi veya tekstilde deri kanserine gıdada ise Alzheimer gibi hastalıklara karşı koruyucu boyar madde olarak kullanımı öngörülebilir. Prodigiosin pigmenti ise HT-29 hücrelerinde gösterdiği antiproliferatif ve antioksidan etkiye göre ilaç etken maddesi veya kolon kanserine karşı koruyucu gıda boyar maddesi olarak kullanımı düşünülebilir.

Bilim Kodu : 20309
Anahtar Kelimeler : *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, Piyosiyanın, Prodigiosin, antiproliferatif etki, antioksidan etki, AChE inhibisyonu, nöral koruyucu, gıda/tekstil boyar madde
Sayfa Adedi : 121
Danışman : Prof. Dr. Belma ASLIM

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE BACTERIAL PIGMENTS AND THEIR APPLICATIONS AS ALTERNATIVE MEDICINE

(M. Sc. Thesis)

Merve TUNCA

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2019

ABSTRACT

Herein it was aimed to discover a pigment of bacterial origin with protective effects against neurological injury and carcinogenic actions, which may be used in food, textile, and drug industry as a natural food and textile colorizer or active ingredient of a neural protector/anticancer agent. In this context, *Pseudomonas aeruginosa* MB713 strain was used for pyocyanin production and *Serratia marcescens* MB703 strain for prodigiosin production. The strains' pigment amounts were determined spectrophotometrically under best pigment production conditions. The pigments' UV-Vis spectrophotometer, FT-IR, and GC-MS analyses and characterizations were performed. The pigments were partially purified and pulverized using solvent extraction. The pigments' effects on viability in SHSY-5Y human neuroblastoma cells and their antiproliferative effects in HT-29 human colon cancer and SK-MEL-30 human melanoma cells were determined using the MTT method. The pigments' antioxidant effects were determined with ELISA based on their SOD and CAT activities and MDA amounts. Additionally, their *in vitro* and cell model acetylcholinesterase (AChE) inhibitory effects were determined with the Ellman method. The strains' pyocyanin production was 51 µg/mL and prodigiosin production 71 µg/mL. Pyocyanin and prodigiosin pigments' IC₅₀ values in SK-MEL-30 cell were 72 µM and 70 µM, respectively. In HT-29 cells only prodigiosin showed a significant antiproliferative action (IC₅₀ 47 µM). An analysis of their AChE inhibitory effects in neuroblastoma cell revealed that pyocyanin showed near 40% inhibition in 100 µM application whereas prodigiosin showed no inhibitory action both *in vitro* and in cellular studies. It was shown that pyocyanin and prodigiosin were effective, albeit not to a significant degree, on all studied antioxidant parameters, but pyocyanin had a more prominent effect. According to these results indicating pyocyanin's antioxidant effect, antiproliferative effect in the SK-MEL-30 cell, and protective effect against neurodegenerative injury in neuroblastoma cell, its use as an active drug ingredient or as a preservative colorant against skin cancer in textile industry and Alzheimer's disease in food industry may be suggested. Prodigiosin, on the other hand, may be used as an active drug ingredient or preservative food colorant against colon cancer as indicated by its antiproliferative and antioxidant effects in the HT-29 cell.

Science Code : 20309

Key Words : *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, Pyocyanin, Prodigiosin, antiproliferative effect, antioxidant effect, AChE inhibition, neural protector, food/textile colorant

Page number : 121

Supervisor : Prof. Dr. Belma ASLIM

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada, eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, bilgilerini benimle paylaşan ve desteklerini esirgemeyen, her türlü araştırma olanağını sağlayarak, güzel bir çalışma ortaya koyma olanağı sunan ve her koşulda yanımda olan tez danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Belma ASLIM'a, deneysel çalışmalarında bana farklı konularda bakış açısı katarak ufkumu genişleten Gazi Üniversitesi Turizm Fakültesi Mutfak Sanatları Bölümü'nün değerli Öğr. Üyesi Prof. Dr. Fügen DURLU ÖZKAYA ve Başkent Üniversitesi Güzel Sanatlar, Tasarım ve Mimarlık Fakültesi Moda ve Tekstil Tasarımı Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Halide SARIOĞLU'na, bakteri çalışmalarında kullandığım *Serratia marcescens* MB703 suşunu temin ettiğim Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'ndan Arş. Gör. Dr. Gözde KOŞARSOY AĞÇELİ'ye, o kadar yoğunluğunun arasında GC-MS analizimi yaparak bana yardımcı olan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğr. Üyesi Doç. Dr. Sinem ASLAN ERDEM'e, gerek deney, gerekse tez sürecim boyunca her koşulda yanımda olan, yakın uzak demeden her an yardımına koşan değerli hocalarım sayın Dr. Öğr. Üyesi Ümmügülsüm TÜKENMEZ EMRE'ye, Seda ŞİRİN'e, Gonca KOÇANCI'ya, gece gündüz demeden, tez sürecimin her aşamasında bilgisi ve tecrübesiyle bana yardımcı olan kıymetli arkadaşım Seda BİKİRİÇ'e, bana destek olan değerli arkadaşlarım Kübra ÇELİK'e ve Kübra TAN'a ve Gazi Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarı'nı paylaştığım tüm arkadaşlarıma, bu zorlu süreçte maddi ve manevi hiçbir desteği esirgemeyen, gösterdikleri anlayış, özveri ve fedakarlıklarından dolayı canım aileme ve tezimin her aşamasında yardımına koşan ve tüm zorluklarımı benimle paylaşarak sevgisi, sabrı ve özverisiyle yanımda olan değerli nişanlım İbrahim Gürkan KOYUN'a sonsuz teşekkürlerimi iletirim.

Bir kısmı, 05/2018-13 kodlu BAP projesi tarafından desteklenmiş olan çalışmamdaki katkılarından dolayı Gazi üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP)'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	7
2.1. Pigmentler.....	7
2.2. Bakteriyel Pigmentler	8
2.2.1. Pigment oluşturan bakteriler	9
2.2.2. Bakteriyel pigmentlerin yapılarına göre sınıflandırılması	10
2.3. Bakteriyel Pigmentlerin Tercih Edilme Sebepleri ve Kullanım Alanları.....	12
2.3.1. Gıda endüstrisi	13
2.3.2. İlaç endüstrisi	15
2.3.3. Tekstil endüstrisi	16
2.3.4. Diğer endüstriler	17
2.4. <i>Pseudomonas</i> Cinsine Ait Bakterilerin Pigmentleri.....	18
2.4.1. <i>Pseudomonas</i> cinsine ait bakterilerin pigmentleri ve pigment yapıları ...	19
2.4.2. <i>P. aeruginosa</i> 'dan izole edilen piyosiyanin pigmentinin yapısı ve sentez mekanizması.....	21
2.4.3. <i>P. aeruginosa</i> 'dan izole edilen piyosiyanin pigmentinin üretimini etkileyen faktörler	23

	Sayfa
2.4.4. <i>P. aeruginosa</i> 'dan izole edilen piyosiyenin pigmentinin biyolojik etkinlikleri	23
2.5. <i>Serratia</i> Cinsine Ait Bakterilerin Pigmentleri	24
2.5.1. <i>Serratia</i> cinsine ait bakterilerin pigmentleri ve pigment yapıları	25
2.5.2. <i>S. marcescens</i> 'ten izole edilen prodigiosin pigmentinin yapısı ve sentez mekanizması.....	26
2.5.3. <i>S. marcescens</i> 'ten izole edilen prodigiosin pigmentinin üretimini etkileyen faktörler	27
2.5.4. <i>S. marcescens</i> 'ten izole edilen prodigiosin pigmentinin biyolojik etkinlikleri	28
2.6. Piyosiyenin ve Prodigiosin Pigmentlerinin Biyoteknolojik Olarak Kullanımı ve Farklı Kullanım Potansiyalleri	29
3. MATERYAL METOT	31
3.1. Materyal.....	31
3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteriler	31
3.1.2. Bakterilerin geliştirilmesinde ve saflık kontrollerinde kullanılan besi ortamları	31
3.1.3. Bakterilerin pigment üretiminde kullanılan besiyerleri	32
3.1.4. Çalışmada kullanılan hücre hatları.....	32
3.2. Mikroorganizmaların Gelişme Ortamları ve Aktifleştirilmesi	33
3.2.1. Bakterilerin McFarland ayarlaması ve canlı hücre sayımları	34
3.2.2. Mikroorganizmaların muhafazası	34
3.2.3. 16S rRNA gen bölgesine göre moleküler tanımlama	35
3.3. Pigmentlerin Kısmi Saflaştırması	36
3.3.1. Piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin miktarlarının belirlenmesi....	38
3.3.2. Prodigiosin standardı hazırlanması	40
3.4. TLC (Thin Layer Chromotography) ile Piyosiyenin ve Prosigiosin Pigmentlerinin Saflık Kontrolleri	41
3.4.1. Piyosiyenin pigmentinin ince kolon kromatografisi (TLC).....	41

	Sayfa
3.4.2. Prodigiosin pigmentinin ince kolon kromatografisi (TLC)	41
3.5. Piyosiyenin ve Prodigiosin Pigmentlerin Karakterizasyonu	41
3.5.1. Spektrofotometrik analiz	42
3.5.2. FT-IR ile analiz	42
3.5.3. GC-MS ile analiz	42
3.6. Piyosiyenin ve Prodigiosin Pigmentlerinin Biyolojik Etkinlik Testleri	43
3.6.1. Çalışmalarda kullanılan hücre hatları, hücrelerin geliştirilmesi ve muhafazası	43
3.6.2. Piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin SHSY-5Y ve L929 hücre hatlarında sitotoksik, SK-MEL-30 ve HT-29 hücre hatlarında ise antiproliferatif etkilerinin belirlenmesi	44
3.6.3. Piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin <i>in vitro</i> ve hücrel AChE inhibisyon etkisinin belirlenmesi	46
3.6.4. Piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin SHSY-5Y hücresinde H ₂ O ₂ ile oluşturulan oksidatif hasarla lipid peroksidasyon ürünü (Malondialdehit) seviyesinin belirlenmesi.....	48
3.6.5. Piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin antioksidan etkilerinin belirlenmesi.....	48
3.7. Elde Edilen Pigmentlerin Endüstriyel Uygulamaları	49
3.8. İstatistiksel Analizler	50
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	51
4.1. Çalışmada Kullanılan Bakterilerin Gelişim Eğrileri ve Suşların Canlılık Miktarları	51
4.1.1. <i>P. aeruginosa</i> MB713 suşunun farklı koşullarda gelişimleri ve canlılıkları	51
4.1.2. <i>S. marcescens</i> MB703 farklı koşullarda gelişimleri ve canlılıkları	54
4.2. Çalışmada Kullanılan Bakterilerin Pigment Üretim Eğrileri	56
4.2.1. <i>P. aeruginosa</i> MB713 suşunun piyosiyenin pigmenti üretimi	57
4.2.2. <i>S. marcescens</i> MB703 suşunun prodigiosin pigmenti üretimi.....	59
4.3. Piyosiyenin ve Prodigiosin Pigmentlerinin Miktarlarına Ait Bulgular	59

	Sayfa
4.4. Pigmentlerin İçerik Analizlerine Ait Bulgular	61
4.4.1. Spektrofotometrik analiz	61
4.4.2. GC-MS analizi	63
4.4.3. FT-IR analizi	64
4.5. Piyosiyanin ve Prodigiosin Pigmentlerinin Biyolojik Aktiviteleri.....	66
4.5.1. Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin sağlıklı SHSY-5Y ve L929 hücreleri üzerine sitotoksisiteleri	66
4.5.2. Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin <i>in vitro</i> asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyonu	68
4.5.3. H ₂ O ₂ ile indüklenmiş SHSY-5Y hücresinde piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin hücrel AChE inhibisyonu.....	69
4.5.4. H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar oluşturulan nöroblastoma hücrelerinde (SHSY-5Y) piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin antioksidan etkileri	70
4.5.5. Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin SK-MEL-30 ve HT-29 kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri	74
4.5.6. Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin antioksidan etkiye bağlı antikanser etkileri	75
4.6. Piyosiyanin ve Prodigiosin Pigmentlerinin Endüstriyel Uygulamaları.....	79
4.6.1. Gıda uygulamaları.....	79
4.6.2. Tekstil uygulamaları	80
4.6.3. Kozmetik uygulamaları.....	81
5. TARTIŞMA	83
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	99
KAYNAKLAR	103
ÖZGEÇMİŞ	121

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. <i>P. aeruginosa</i> MB713 pigment üretimini arttırmak için kullanılan MFDm besi ortamı	32
Çizelge 4.1. <i>P. aeruginosa</i> MB713 suşunun, besi ortamına ve çalkalama koşullarına göre pigment verim tablosu	60
Çizelge 4.2. <i>S. marcescens</i> MB703 suşunun, sıvı ve katı besi ortamına göre pigment miktar tablosu	60
Çizelge 4.3. <i>S. marcescens</i> MB703 suşunun NA besi ortamında, 1-7 gün üretiminde günlere göre prodigiosin pigmentinin miktarı (mg/L).....	61
Çizelge 4.4. 10-100 µM piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerini <i>in vitro</i> % AChE inhibisyonları	68

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. <i>P. aeruginosa</i> MB713 suşunun çalkalamalı ve çalkalamasız koşullarda, 1-7 gün inkübasyonda MFDm besi ortamında gelişiminin optik yoğunluğu	52
Şekil 4.2. <i>P. aeruginosa</i> MB713 suşunun çalkalamalı ve çalkalamasız koşullarda, 1-7 gün inkübasyonda NB besi ortamında gelişiminin optik yoğunluğu	52
Şekil 4.3. <i>P. aeruginosa</i> MB713 suşunun MFDm besi ortamında, 1-7 gün inkübasyon süresinde canlılık eğrisi.....	52
Şekil 4.4. <i>P. aeruginosa</i> MB713 suşunun NB besi ortamında, 1-7 gün inkübasyon süresinde canlılık eğrisi	53
Şekil 4.5. <i>S. marcescens</i> MB703 suşunun NB ve farklı oranlarda gliserol içeren NB besi ortamında, 1-7 gün inkübasyon süresinde gelişiminin optik yoğunluğu	55
Şekil 4.6. <i>S. marcescens</i> MB703 suşunun NB ve farklı oranlarda gliserol içeren NB besi ortamlarında 1-7 gün inkübasyon süresinde canlılık eğrisi	55
Şekil 4.7. <i>P. aeruginosa</i> MB713 suşunun 1-7 gün inkübasyon süresinde, MFDm besiyerinde çalkalamalı ve çalkalamasız koşullarda piyosianin pigmentinin optik yoğunluğu.....	57
Şekil 4.8. <i>P. aeruginosa</i> MB713 suşunun 1-7 gün inkübasyon süresinde, NB besi ortamında, çalkalamalı ve çalkalamasız koşullarda piyosianin pigmentinin optik yoğunluğu.....	58
Şekil 4.9. <i>S. marcescens</i> MB703 suşunun 1-7 gün inkübasyon süresinde, NB besi ortamında prodigiosin pigmentinin optik yoğunluğu	59
Şekil 4.10. <i>P. aeruginosa</i> MB713 suşundan izole edilen piyosianin pigmentinin, suda UV absorpsiyon spektrum (nm) görüntüsü	62
Şekil 4.11. <i>P. aeruginosa</i> MB713 suşundan izole edilen piyosianin pigmentinin, Etanol'de UV absorpsiyon spektrum (nm) görüntüsü	62
Şekil 4.12. <i>S. marcescens</i> MB703 suşundan izole edilen, prodigiosin pigmentinin, suda UV absorpsiyon spektrum (nm) görüntüsü	63
Şekil 4.13. <i>S.marcescens</i> MB703 suşundan izole edilen prodigiosin pigmentinin, Etanol'de UV absorpsiyon spektrum (nm) görüntüsü	63
Şekil 4.14. <i>P. aeruginosa</i> MB713 tarafından üretilen piyosianinn pigmentinin GC-MS spektrumu	64
Şekil 4.15. <i>P. aeruginosa</i> MB713 suşu tarafından üretilen piyosianin pigmentinin FT-IR spektrumu.....	65

Şekil	Sayfa
Şekil 4.16. <i>S. marcescens</i> MB703 suşu tarafından üretilen prodigiosin pigmentinin FT-IR spektrumu	66
Şekil 4.17. Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin uygulandığı SHSY-5Y hücrelerinde kontrole göre % hücre canlılık miktarları	67
Şekil 4.18. Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin uygulandığı L929 kontrole göre % hücre canlılık miktarları.	67
Şekil 4.19. 150 µM H ₂ O ₂ ile AChE aktivitesi, uyarılmış SHSY-5Y hücrelerine piyosiyanin ve prodigiosin uygulamasının hücresel % AChE aktivitesi.....	70
Şekil 4.20. 150 µM H ₂ O ₂ ile indüklenmiş SHSY-5Y nöroblastoma hücresine uygulanan piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin Malondialdehit (MDA) miktarına etkisi	72
Şekil 4.21. 150 µM H ₂ O ₂ ile indüklenmiş SHSY-5Y nöroblastoma hücresine uygulanan piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesine etkisi	73
Şekil 4.22. 150 µM H ₂ O ₂ ile indüklenmiş SHSY-5Y nöroblastoma hücresine uygulanan piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin Katalaz (CAT) aktivitesine etkisi	73
Şekil 4.23. 10-100 µM konsantrasyon aralığında piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin SK-MEL-30 hücrelerinde % hücre canlılığına göre antiproliferatif etkileri.....	75
Şekil 4.24. 10-100 µM konsantrasyon aralığında piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin HT-29 hücrelerinde % hücre canlılığına göre antiproliferatif etkileri.....	75
Şekil 4.25. SK-MEL-30 deri kanseri hücresine uygulanan piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin SOD aktivitesine etkisi	77
Şekil 4.26. SK-MEL-30 deri kanseri hücresine uygulanan piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin CAT aktivitesine etkisi	77
Şekil 4.27. HT-29 kolon kanseri hücresine uygulanan piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin SOD aktivitesine etkisi.....	78
Şekil 4.28. HT-29 kolon kanseri hücresine uygulanan piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin CAT aktivitesine etkisi.....	78

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın sıvı/katı besi ortamında piyosiyenin üretimi ve iki fazlı ekstraksiyonu A. Sıvı besi ortamı B. Katı besi ortamı C. Ekstraksiyon.....	20
Resim 2.2. <i>S. marcescens</i> 'in sıvı/katı besi ortamında üretimi ve prodigiosin pigmentinin ekstraktı A. Sıvı besi ortamı B. Katı besi ortamı C. Prodigiosin ekstraktı	24
Resim 2.3. Prodigiosin türevlerinin yapısı.....	26
Resim 2.4. <i>S. marcescens</i> 'in Luria Bertani (LB) besiyerinde 18 saat inkübasyonda farklı sıcaklıklarda kolonilerdeki pigmentasyonu A. 30°C ve B. 37°C	27
Resim 3.1. Çalışmada kullanılan bakterilerin ışık mikroskobu görüntüleri (100X). <i>S. marcescens</i> MB703 (A) <i>P. aeruginosa</i> MB713 (B).....	31
Resim 3.2. A. Nutrient Agar besi ortamında 37°C <i>P. aeruginosa</i> MB713 suşunun tek koloni ekimi B. Nutrient Agar besi ortamında 28°C'de <i>S. marcescens</i> MB703 suşunun tek koloni ekimi.....	33
Resim 3.3. Piyosiyenin pigmentinin eldesi A. Süpernatantın kloroform ile muamelesi sonucunda oluşan faz ayrımı B. Piyosiyenin pigmentinin bulunduğu mavi renkli kloroform fazı C. Piyosiyenin içeren kloroform fazının evaporatörde uçurularak toz haline getirilmiş görüntüsü	37
Resim 3.4. Prodigiosin pigmentinin evaporatörde uçurularak toz haline getirilmiş görüntüsü	38
Resim 3.5. Piyosiyenin pigmentinin miktar tayinindeki fazlar. A. Piyosiyenin pigmentinin kloroformla muamele edilmiş kültür ortamı B. Piyosiyenin pigmentinin toplandığı asidik kırmızı faz.....	39
Resim 3.6. Etanol-su çözeltisi ile prodigiosinin konsantrasyona bağlı oluşan renk skalası	40
Resim 4.1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın MFDm besi ortamında 1-7 gün inkübasyon süresinde çalkalamasız (A) ve çalkalamalı (B) koşullarda gelişimi ve piyosiyenin üretimi	53
Resim 4.2. <i>P. aeruginosa</i> MB713 suşunun NB besiyerinde 1-7 gün inkübasyon süresinde çalkalamasız (A) ve çalkalamalı (B) koşullardaki gelişimi ve piyosiyenin üretimi	54
Resim 4.3. <i>S. marcescens</i> MB703 suşunun ve 1-7 gün inkübasyon süresinde %1 gliserol içeren Nutrient Broth (A) ve %2 gliserol içeren Nutrient Broth (B) besi ortamında gelişimi.....	56

Resim	Sayfa
Resim 4.4. <i>P. aeruginosa</i> MB713 suşunun, NB besiyerinde (çalkalamasız) piyosiyenin üretimi	58
Resim 4.5. <i>P. aeruginosa</i> MB713 suşunun MFDm besiyerinde çalkalamasız (A) ve çalkalamalı (B) ortamda piyosiyenin pigmenti üretimi	58
Resim 4.6. <i>S. marcescens</i> MB703 suşunun Nutrient Agar besi ortamında, 1-7 gün inkübasyon süresinde ürettiği pigmentin çözeltileri.....	61
Resim 4.7. Agarla katılaştırılmış pigmentlerin 100°C’de (A) ve 121°C’de (B) 15 dk. kaynatılmasının renk stabilitesine etkisi.....	79
Resim 4.8. Şeker hamuruna uygulanmış prodigiosin pigmentinin farklı derişimlerde hamurda oluşturduğu renk	80
Resim 4.9. Farklı derişimlerde uygulanan prodigiosin ve piyosiyenin pigmentlerinin pamuklu kumaşa boyar madde olarak uygulaması.....	80
Resim 4.10. Şeffaf ojeye uygulanmış prodigiosin pigmentinin ojede oluşturduğu pembe renk.....	81

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılan simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
C	Karbon
Da	Dalton
g	Gram
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HCl	Hidrojen Klorür
kDa	Kilodalton
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
N	Azot
NaCl	Sodyum Klorür
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
pH	Asitlik bazlık birimi
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µm	Mikrometre

Kısaltmalar	Açıklamalar
abs	Absorbans
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
AChE-i	Asetilkolinesteraz inhibitörü

Kısaltmalar	Açıklamalar
AH	Alzheimer Hastalığı
ATCC	Amerikan Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)
ATP	Adenozin Trifosfat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAT	Katalaz
cfu	Koloni Oluşturan Birim (Colony forming unit)
DEHB	Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu
dk.	Dakika
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DTNB	5,5'-Ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FBS	Fetal Bovin Serum
FDM	Frank and DeMoss Besiyeri
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi
GC-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi
IC₅₀	Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyon (The half maximal inhibitory concentration)
LB	Luria Bertani Besiyeri
MAP	Metil Amil Pirol
MBC	Metoksi Bipirrol Karbaldehit
MDA	Malondialdehit
MFDM	Modifiye Edilmiş Frank and DeMoss Besiyeri
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
NCBI	Biyoteknoloji Bilgisi Ulusal Merkezi (National Center for Biotechnology Information)
OBX	Obatoclax
OD	Optik Yoğunluk (Optical Density)
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline)
PCA	Fenazin-l-karboksilik asit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Kısaltmalar	Açıklamalar
PDC	Fenazin-1, 6-dikarboksilik asit
PG	Pepton-Glisero1 Besiyeri
QS	Sinyal Algılama (Quorum Sensing)
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
rpm	Dakikada Devir Sayısı
SD	Standart Sapma
SF	Serum Fizyolojik
sn	Saniye
SOD	Süperoksit Dismutaz
sp.	Tür
SPF	Güneş Koruma Faktörü
spp.	Türler
subsp	Alttür
TLC	İnce Kolon Kromatografisi
UV-Vis	UV-Görünür Bölge Spektroskopisi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Pigment üretim özelliği taksonominin tüm hayat formları arasında oldukça yaygın biçimde dağıtılmıştır. Hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmaların yaşayan farklı üyelerinin çeşitli pigmentler ürettiği rapor edilmiştir. Mikroorganizmalar arasında yaygın renk, yapı ve fonksiyon çeşitliliği gösteren pigmentler bildirilmiştir. Mikrobiyal pigmentler hakkında çok az araştırma olmasına rağmen, özellikle bunları üreten mikroorganizma(lar)daki biyolojik rolleri hakkındaki araştırmaların yoğunlukta olduğu dikkat çekmektedir (Joshi, Kothari ve Patel, 2016). Mikroorganizmalardan elde edilen ve sekonder metabolit olarak üretilen pigmentler antioksidan, antikanser, antimikrobiyal ve antifungal etki gösterdiğinden klinik çalışmalarda kullanılabilecek ideal etken maddeler olarak bildirilmektedir (Pandey, Chander ve Sainis, 2009).

Hem saprofit hem de patojen mikroorganizmalar pigment olarak adlandırılan renkli maddeleri üretebilen türler içermektedir. Bu mikroorganizmalar katı besi ortamlarında üretildikleri zaman cinslerine ve türlerine özel renkte koloniler meydana getirirler. Pigmentler; “fotosentetik olanlar” ve “fotosentetik olmayanlar” olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Fotosentetik olmayan pigmentler suda erimezler, koloni içerisinde kalırlar ve ortama yayılamadıklarından kolonilerin renkli görünmelerine yol açarlar. Fotosentetik olan pigmentler ise; suda eriyebilir, mikroorganizmalar tarafından sıvı veya katı besi ortamında üretildiklerinde besi ortamına geçebilir ve ortamın renginin değişmesine sebep olurlar (Wu, Hsu ve Lee, 2003). Bu sınıflandırmaya ek olarak pigmentlerde birkaç sınıflandırma daha bulunmaktadır. Pigmentler organik/inorganik veya doğal/sentetik olarak da sınıflandırılırlar. Doğal kaynaklardan elde edilen pigmentlerin sınıflandırılmasında ise, fotosentetik özelliğinin yanı sıra yapısal eğilimleri ve doğal oluşumları da kullanılmaktadır (Darshan ve Manonmani, 2015).

Piyosiyanin, *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen (5-metil-1-hidroksifenazin) biyolojik olarak aktif mavi renkli fenazin pigmentidir (Priyaja, Jayesh, Philip ve Singh, 2016). Doğal ve sentetik fenazinler, geniş spektrumlu antibiyotikleri (Abken ve diğerleri, 1998), antimalaryal (Hussain ve diğerleri, 2011), tripanosidal (Neves-Pinto ve diğerleri, 2002), antihepatit C viral replikasyon aktiviteleri (Wang ve diğerleri, 2000), lösemi ve solid tümörde antitümör aktivitesi (Rewcastle, Denny ve Baguley, 1987), antikarsinomatöz aktivitesi (Imamura ve diğerleri, 1997), nöroprotektif özellikleri (Shinya, Shimizu,

Kunigami, Furihata ve Seto, 1995), antifungal özelliği (Kerr ve diğerleri, 1999), topoizomeras I ve II'nin ikili inhibitörlerini (Wang ve diğerleri, 2002) kapsayan, ilgi çekici biyolojik aktivite gösteren maddelerdir (Laursen ve Nielsen, 2004). Bu etkin biyolojik özelliklerine rağmen ilaç etken maddesi olarak, kanserden ve Alzheimer'dan koruyucu özellikleri, kapsamlı olarak çalışılmamış ve bu koruyucu özellikleri ile doğal boyar madde olarak kullanılma potansiyelleri ortaya konulmamıştır.

Prodigiosin, pirolil pirometan iskeleti ile tanınan ve ilk olarak *Serratia marcescens*'ten izole edilen kırmızı renkli bir pigmenttir (El-Batal, El-Hendawy ve Faraag, 2018). Prodigiosin, *S. marcescens* tarafından, mono ve bi-pirol öncüllerinin ayrı ayrı ele alındığı ve daha sonra doğrusal tripirol kırmızı pigment oluşturmak üzere birleştirildiği çatallı biyosentez yolunu takiben üretilir (Boger ve Patel, 1988). Bu pigment, geniş faaliyet yelpazesine sahip olmakla birlikte, son yıllarda yapılan araştırmalar mükemmel klinik ilişkisi nedeniyle prodigiosinlerin immün baskılayıcı ve antikanser faaliyetlerine odaklanmıştır (Pandey, Chander ve Sainis, 2009). Bunlara ek olarak, prodigiosinin farklı modellerdeki transplantasyon ve oto-immün bozukluklarda önemli ölçüde *in vivo* immün baskılayıcı aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Pandey, Chander ve Sainis, 2007). Prodigiosinin anti-proliferatif ve sitotoksik etkileri yalnızca kültüre edilmiş tümör hücre hatlarında değil insandaki en önemli kanser hücrelerinden B-hücresi kronik lenfotik lösemi hastalarında da gözlemlenmiştir (Campas ve diğerleri, 2003). Piyosiyanin gibi prodigiosininde ilaç etken madde adayı ve birçok hastalığa karşı koruyucu boyar madde olarak kullanım potansiyelleri ortaya konulmamıştır.

Doğal mikrobiyal ürünler kimyasal çeşitlilik ve ilaç öncülü potansiyeline sahip en zengin kaynaklardan biridir (Deorukhkar, Chander, Ghosh ve Sainis, 2007). Mikrobiyal kaynaklı doğal ürünler ilaç adayı ve etken maddesi olarak önemli kaynaklar arasında yer almaya başlamıştır. 1940'lardan 2014'lere kadar birçoğu ilaç endüstrisinde payı olan, doğal kaynaklardan (bitki, hayvan ve mikroorganizma) elde edilen ürünler ve türevleri, enfeksiyon hastalıklarının, kanser, diyabet vb. hastalıkların tedavilerinde insan sağlığı için ön tedavi olarak geliştirilmiş ve yaygın olarak kullanılan önemli bir pazarı temsil etmektedir (Newman ve Cragg, 2016; Büyüksırt ve Kuleaşan, 2013).

Sentetik boyalar uzun yıllar tekstil, kâğıt, kozmetik, ilaç ve gıda endüstrilerinde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır ancak, sentetik boyaların birçoğu toksin olmakla

birlikte, bazı sentetik boyalar ise, potansiyel olarak kanserojendir (Ali, 2010; Ünyayar, Mazmancı, Erkurt, Atacag ve Gizir, 2005). Bunun yanı sıra, sentetik pigmentlerin birçoğu uzun süre bozunmadan kalabilmeleri nedeniyle çevre üzerinde de büyük olumsuz etkiler oluşturmaktadır. Birçok sektörde kullanılan sentetik boyar maddelerin kullanıldığı ürünlerin, atık olarak sulara atılması ile doğal flora ve fauna bozulmaktadır (Dhanve, Kalyani, Phugare ve Jadhav, 2009). Ayrıca, bu atıkların canlılar için zehirli ve kanserojen oldukları kanıtlanmıştır (Becenen, 2017). Sentetik renklerin zararlı etkisini ortadan kaldırmak için, tüm dünyada doğal kaynaklardan pigment ve renk üretimi için süreç geliştirmede önemli bir çaba vardır (Unagul ve diğerleri, 2005; Gupta, Gark, Prakash, Goyal ve Gupta, 2011). Örneğin, sentetik boyalardan olan azo boyalar, doğal bağırsak biyotasında aromatik aminlere ayrışarak, çocuklarda dikkat dağınıklığı ve hiperaktiviteye sebep olurken, yetişkinlerde baş ağrılarına neden olmaktadır (Kucharska ve Grabka, 2010). Boyalar, genel olarak karmaşık ve yüksek molekül ağırlıklı, bileşiklerdir. Kimyasal yapıları itibarıyla ısıya, suya ve birçok kimyasala direnç gösterebilirler ve kompleks sentetik yapılarından dolayı dekolorizasyonları oldukça zordur (Becenen, 2017). Önemli sentetik boyar maddelerinden olan ve yapılarında bir azo grup ($N=N$ -) barındıran azo boyar maddelerinin, tekstil sanayisinde yoğun şekilde kullanılmalarına karşın, biyolojik parçalamaya dirençli olmaları ve canlılar üzerinde toksisite göstermelerinden dolayı atık su arıtımında sorun oluşturmaktadır (Becenen, 2017). Bundan dolayı, azo boyar madde içeren atık sular, çevresel açıdan ciddi tehdit unsuru olarak görülmektedir (Gündüz Balpetek ve Gülümser, 2014).

Mikrobiyal pigmentlerin üretimlerinin mevsimsel duyarlılık göstermemesi, yüksek verimde elde edilebilirlikleri, biyoaktif özellik göstermeleri, doğada giderilebilir olmaları ve biyolojik olarak uyumlu olmaları nedeniyle bu pigmentler, gıda, tekstil, kozmetik ve daha pek çok alanda kullanılan, bitki veya hayvanlardan elde edilen doğal boyar maddelere ve sentetik boyar maddelere alternatif olarak uygulanması beklenmektedir (Büyüksırt ve Kuleaşan, 2013). Tüm bu bilgiler ışığında, doğadaki farklı renklerde pigmentler üreten bakterilerin gıda, tekstil, ilaç ve kozmetik alanında kullanılabilecek boyar maddelerin etken maddesini oluşturacak önemli bir kaynak olduğu düşünülmüştür. Bu tez çalışmasında, doğal bakteriyel pigment elde etmek için, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Kültür Koleksiyonu'ndan, pigment oluşturan *P. aeruginosa* MB713 ve Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen *S. marcescens* MB703 suşları kullanılmıştır. Çalışmada:

1. Her iki suştan izole edilen piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin üretimini stimüle edecek koşulların belirlenerek, bu pigmentlerin optimum üretilme koşullarının ve pigment üretimini indükleyen maddelerin belirlenmesi,
2. *P. aeruginosa* MB713 ve *S. marcescens* MB703'ten izole edilen pigmentlerin UV-Vis sepektrumu ile çözeltideki moleküller veya inorganik iyon ve komplekslerin ölçümü, FT-IR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) ile numune içindeki organik veya inorganik yapıdaki katı, sıvı ve gaz moleküllerin ve GC-MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi) ile numunedeki uçucu maddelerin kütlelerine bağlı olarak analizi ile bu pigmentlerin doğrulanması ve moleküler yapılarının tespiti,
3. İndüklenmiş koşullarda üretilen ve kısmi olarak saflaştırılan piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin miktarlarının belirlenmesi,
4. İzole edilen pigmentlerin insan nöroblastoma hücresi (SHSY-5Y) ve fare fibroblast hücresi (L929) üzerine sitotoksik etkilerinin belirlenmesi,
5. Piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin, insan deri kanseri hücresi (SK-MEL-30) ve insan kolon kanseri hücresi (HT-29) üzerine antiproliferatif etkilerinin ortaya konması,
6. İzole edilen pigmentlerin, 150 μM H_2O_2 kimyasal ajanı ile uyarılarak model oluşturulan nöroblastoma hücresindeki, Alzheimer hastalığının belirteci olan asetilkolinesteraz (AChE) enzim artışıındaki inhibisyon oranlarının tespit edilmesi,
7. Piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin nöroblastoma hücrelerinde 150 μM H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif hasara karşı koruyucu etkilerinin Malondialdehit (MDA) miktarı ile tayini,
8. Piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin, antioksidan (Süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT)) etkilerinin belirlenmesi,
9. İzole edilen bakteriyel pigmentlerin gıda, tekstil ve kozmetikte uygulanabilirliğinin belirlenmesi,
10. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlarla, piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin deri kanseri ve kolon kanseri gibi hastalıklarda ilaç adayı olabilecek etken madde potansiyeli taşıyıp taşımadığının ortaya konması amaçlanmıştır. Ayrıca, oksidatif hasarla oluşturulan hücresel Alzheimer modelinde, piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin nöral koruyucu etkilerinin ortaya konulması hedeflenmiştir.

Bu çalışma, 15/2018-13 kodlu BAP projesi tarafından desteklenmiş olup, bu tez kapsamında elde edilen veriler ışığında biyoaktiviteleri kanıtlanmış olan *P. aeruginosa* MB713 ve *S. marcescens* MB703 suşlarından elde edilen ve bu mikroorganizmaların

sekonder metabolit olarak ürettikleri piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin, yüksek miktarda üretilecek şekilde indüklenerek karakterize edilmesi ve farklı endüstriyel alanlarda kullanılabilmesi için, biyolojik etkinliklerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Yapılan biyolojik etkinlik testleri ile toksik olmayan konsantrasyonlarda, antioksidan özelliği, kolon kanserindeki antiproliferatif aktivitesi ile kolon kanserinden ayrıca, AChE inhibitör etkisi ile Alzheimer'dan koruyucu doğal gıda boyar maddesi elde edilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda, deri kanserinde belirlenen antiproliferatif etkinliği ve antioksidan aktivitesi ile tekstilde antikanser etkiye sahip boyar madde eldesi hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Pigmentler

Pigmentler, pek çok endüstriyel alan için önemli özelliklere sahip bileşiklerdir. Kaynaklarına göre Pigmentler organik/inorganik veya doğal/sentetik olarak sınıflandırılırlar. Sentetik pigmentler laboratuvar ortamında sentezlenirken, doğal pigmentler organik maddelerden (hayvan, bitki ve mikroorganizma) izole edilirler (Bilgehan, 1992). Doğal kaynaklardan elde edilen pigmentlerin sınıflandırılması, pigmentlerin elde edildikleri kaynaklar veya kimyasal yapıları dikkate alınarak, iki şekilde yapılabilir (Darshan ve Manonmani, 2015; Sigurdson, Tang ve Giusti, 2017). Kaynaklarına göre pigmentler; bitkisel, hayvansal, mikrobiyal ve mineral kaynaklı pigmentler olarak sınıflandırılmaktadırlar. Kimyasal yapılarına göre ise; flavonoid türevleri, isoprenoid türevleri, pirol türevleri ve azot-heterosiklik türevleri olarak sınıflandırılırlar (Sigurdson, Tang ve Giusti, 2017).

Sentetik pigmentler uzun yıllar tekstil, kâğıt, kozmetik, ilaç ve gıda endüstrilerinde kapsamlı bir şekilde kullanılmakta olmasına karşın, bu boyalarının çoğunun toksik olmasının yanı sıra kanserojen etkiye de sebep olmaktadır (Ali, 2010; Zhang, Zhan, Su ve Zhang, 2006; Ünyayar ve diğerleri, 2005). Bu sentetik maddelerin birçoğu uzun süreli stabiliteyi dolayısıyla çevre üzerinde büyük bir etkiye de sahiptir; çünkü sentetik pigmentlerin çoğu doğal flora ve faunaya etki eden doğal su kaynaklarına bırakılırlar (Dhanve, Kalyani, Phugare ve Jadhav, 2009). Eritrosin ve Sunset yellow, sırasıyla kırmızı ve sarı renklendirici olarak gıda endüstrisinde, ilaç ve kozmetik ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu pigmentler birçok ülke tarafından yasaklanmıştır. Sentetik renklendirme ajanları, deney hayvanlarının farklı organlarında belirli hasarların nedensel ajanları olarak gösterilmiştir, örneğin beyin ve testislerde nörotransmitterlerde dengesizliğe neden olduğu belirtilmiştir. Khiralla, Salen ve El-Malky (2015)'nin yapmış oldukları *in vivo* çalışmalarda, Eritrosin ve Sunset yellow azo boyalarının kullanılması, farklı beyin bölgelerinde histopatolojik değişikliklerle ilişkili hem dopamin hem de noradrenalin konsantrasyonunda dengesizliğe ve hiperaktiviteye neden olduğu bildirilmiş, sentetik renklendiricilerin aşırı dozu uygulandığında, beyin histolojik yapısında (serebrum striatum, serebral korteks, serebellum ve hipokampus) ciddi değişiklikler ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bu değişiklikler, hiperaktivite ve hormon dengesizliği (dopamin,

noradrenalin, ICSH ve testosteron dahil) ile ilişkilendirilmiştir. Sentetik renklerin bu zararlı etkilerini azaltmak veya ortadan kaldırmak için, tüm dünyada doğal kaynaklardan pigment üretim sürecini geliştirmeye ilgi önemli ölçüde artmıştır (Unagul ve diğerleri, 2005; Gupta ve diğerleri, 2011).

Bitkisel kaynaklardan elde edilen pigmentlerin sentetik pigmentlere alternatif olarak yaygın şekilde kullanılmasına karşın, mikrobiyal pigmentler bitkisel pigmentlerin aksine, üretimlerinin mevsimsel etkilenme göstermemesi, laboratuvar şartlarında kolaylıkla üretilmesi, yüksek oranda verim elde edilebilmesi ve üretildikleri mikroorganizmaların hızlı büyümeleri sebebiyle büyük avantajları bulunmaktadır (Rao, Prabhu, Xiao ve Li, 2017). Ayrıca, geçen yirmi yılda bitkilerin mikroorganizmaların yanı sıra, de izole edilebilen karotenoidlerce zengin beslenmenin prostat büyümesi, katarakt oluşumunun engellenmesi ve kalp-damar hastalıklarının önlenmesi ile Alzheimer ve Parkinson gibi nörolojik bozukluklardaki önemi giderek artmaktadır. (Yılmaz, 2010).

2.2. Bakteriyel Pigmentler

Pigment üretimi gerçekleştiren mikroorganizmalar, bazı bakterileri, mantar, maya ve alg türlerini içermektedir (Bilgehan, 1992). Mantarlardan izole edilen pigmentler, fungal pigmentler olarak tanımlanırken; bakterilerden izole edilen doğal pigmentler, bakteriyel pigmentler olarak ifade edilmektedir. Bakterilerin hücre içerisinde kalan veya bulundukları ortama salınan çok farklı çeşitlerde pigmentler üretmelerine karşın, en yaygın olarak kırmızı, turuncu, sarı bazen de yeşil renk pigment ürettikleri gözlenmektedir (Joshi, Kothari ve Patel, 2016; Bilgehan, 2000). Bazı bakteriler, pigmentlerini renksiz olan lökobaz bileşikleri formunda üretirler. Üretilen bu lökobaz bileşikler, oksijenle temas etmesi durumunda okside olarak renklenir, hidrojenlenerek de rengini kaybederek lökobaz formuna dönebilir. Bakteriler bu redoks aktiviteleri sayesinde, mikrobiyolojik uygulamalarda işaret olarak kullanılırlar. Örneğin; Tifo bakterisi ve *E. coli* varlığının belirlenmesi için, ortama hidrojen alıcısı bir boya katılarak, bu bakterilerin ürettikleri lökobaz bileşiğine göre ortamın rengini değiştirmeleri beklenir. Bu durumda ortamda hangi mikroorganizmanın bulunduğu tespit edilir (Joshi, Kothari ve Patel, 2016).

Genellikle bakteriler ürettikleri besi ortamında mat, yarı saydam veya renksiz koloniler oluştururlar. Pigment üretimi gösteren bakteriler ise, hücre içi pigmentleri ürettiyorlarsa,

besi ortamında ürettikleri renkte koloniler oluştururlar. Hücre dışına salınan pigmentleri üreten bakterilerin kolonileri renksizdir ancak, ürettikleri pigmentin rengini besi ortamına vererek besi ortamının rengini değiştirirler. Hücre içi pigmentler hücre içinde kaldıklarından, besi ortamında çözünemez ve besi ortamını boyamazlar ve pigment hücre içerisinde kalır. Ancak, hücre dışı pigmentler suda çözüldüğünden, besi ortamında renk değişimine sebep olurlar (Bilgehan, 1992).

Bazı sentetik boyaların zararlı etkileri nedeni ile, organik maddelerden elde edilen pigmentlere olan talep günden güne artmaktadır. Fungal ve bakteriyel pigmentler doğal olarak elde edilen pigmentlere alternatif olarak sunulan pigmentlerdir (Rao, Prabhu, Xiao ve Li, 2017). Bakteriyel pigmentlerin geniş alanlarda kullanılabilmesini sağlayan avantajlarının yanı sıra, çevresel streslere ve UV ışığına maruz kaldıklarında stabilite gösterip göstermemesi de önemli bir kriter olarak düşünülmektedir. Ancak, bu alanda çok fazla çalışılmamıştır (Gürcüm ve Öneş, 2018). Bunlara ek olarak mikrobiyal biyoteknoloji bilimi ve uygulamalarının gelişmesine bağlı olarak mikrobiyal pigmentler; gıda, tekstil, kozmetik ve ilaç endüstrisinde de gittikçe kıymeti artan maddeler olarak yerini almaktadır (Kim, Park ve Lee, 1995).

2.2.1. Pigment oluşturan bakteriler

Pigmentler, bakterilerin hayati metabolitleri olmamakla birlikte, hayatta kalmalarını kolaylaştıracak bazı avantajlar sağlayan sekonder metabolitlerdir. Bakteriler tarafından üretilen bu pigmentler bakteriye fotosentezle enerji eldesi, UV koruması, oksidan maddelere karşı koruma, aşırı ısıya ve soğuğa karşı koruma, diğer mikroorganizmaların antimikrobiyal özelliklerine karşı koruma, besin eldesi (demir vs.) ve savunma mekanizması gibi avantajlar sağlamaktadır (Hizbullah ve diğerleri, 2018). Patojen veya fırsatçı patojen bakteriler tarafından üretilen pigmentlerin çoğunun virülans faktör olarak etki ettiği gösterilmiş olmasına karşın, bu pigmentlerin *in vivo/in vitro* biyolojik aktiviteye sahip olduğu da rapor edilmiştir (Joshi, Kothari ve Patel, 2016).

Çizelge 2.1. Bakteriye pigmentler ve bu pigmentlerin uygulamaları

Mikroorganizma	Pigment	Renk	Uygulamalar	Kaynak
<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	Cycloprodigiosin	Sarı	Antiplasmodiyal, antikanser	Pankaj ve Kumar, 2016; Kirti, Amita, Priti, Kumar ve Jyoti, 2014
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Violacein	Mor	Antioksidant, ROS etkisini giderici, antifungal ajan	Pankaj ve Kumar, 2016; Kirti ve diğerleri, 2014; Numan ve diğerleri, 2018
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piyosyanin	Mavi, Yeşil	Sitotoksikite, nötrofilapoptozis, proinflatuar, antimikrobiyal ajan	Pankaj ve Kumar, 2016
<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	Astaxanthin	Pembe-Kırmızı	Antioksidant, fotoprotektant, antikanser, antiinflatuar, gıda renklendiricisi	Pankaj ve Kumar, 2016
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Cathaxanthin	Turuncu	Antioksidant, antikanser	Pankaj ve Kumar, 2016
<i>Streptomyces</i> sp.	Undecylprodigiosin	Kırmızı	Antibakteriyel, antioksidatif	Pankaj ve Kumar, 2016
<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphyloxanthin	Altın Sarısı	Antioksidant, ROS etkisini giderici	Pankaj ve Kumar, 2016; Kirti ve diğerleri, 2014
<i>Xanthomonas oryzae</i>	Xanthomonadin	Sarı	Fotohasara karşı koruma	Pankaj ve Kumar, 2016
<i>Serratia marcescens</i>	Prodigiosin	Kırmızı	Sitotoksikite; antiproliferatif etki; diabetes mellitus; B-cell kronik lenfotik lösemi hastaları	Pankaj ve Kumar, 2016; Kirti ve diğerleri, 2014; Numan ve diğerleri, 2018
<i>Flavobacterium</i>	Zeaxanthin	Sarı	Hayvan derisinin ve yumurta sarısının sade rengini artırmak için kanatlı yemlerinde bir katkı maddesi olarak; kozmetik ve gıda endüstrisinde renklendirici olarak	Pankaj ve Kumar, 2016
<i>Vogesella indigofera</i>	Blue pigment	Mavi	Ağır metal giderimi	Rao ve diğerleri, 2017

Çizelge 2.1’de pigmentleri yaygın olarak çalışılan bazı bakteriler, ürettikleri pigmentler ve bu pigmentlerin uygulama alanları verilmiştir. Çizelge 2.1’de verilen bu pigment üreten bakteri türlerine ek daha pek çok pigment üreten mikroorganizma türü bulunmaktadır

2.2.2. Bakteriye pigmentlerin yapılarına göre sınıflandırılması

Doğal kaynaklardan (bitki, böcek, mikroorganizma) elde edilen pigmentlerin sınıflandırılmasında yapısal eğilimleri ve doğal oluşumları dikkate alınmaktadır (Darshan ve Manonmani, 2015).

Bakteriyel pigmentler yapılarına göre 6 sınıfta toplanır:

Karotenoidler: Bu pigment türü, doymamış bir hidrokarbon olan karoten içerdikleri için bu isimle adlandırılırlar. Bunlar; sarı, kırmızı ve turuncu renge sahip pigment gruplarıdır ve suda erimezler. Buna karşılık alkol, eter, kloroform ve karbon sülfür gibi kimyasal çözücülerde erirler. Bitkilerden de izole edilebilen bu pigmentlerin ilk olarak bakterilerde ortaya çıktığı düşünülmektedir (Yılmaz, 2010). Tüm karotenoidler tetraterpenoidler/ksantofiller (oksijen içerirler) ve karotenler (yalnızca hidrokarbon içerirler, oksijen içermezler) olarak iki sınıfa ayrılırlar (Köcher ve Müller, 2011; Rymbai, Sharma ve Srivastav, 2011). Karotenoid üreten mikroorganizmalara, *Flavobacterium multivorum*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Amauroderma aurantiacum*, *Paracoccus carotinifaciens* türleri örnek olarak verilebilir. Karotenoid üreten bu mikroorganizmalar topraktan, mağaradan, sucul ortamlardan izole edilebilirler (Rao, Prabhu, Xiao ve Li, 2017).

Antosiyaninler: Bu pigment grubu flavonoid pigmentlerin en önemli grubudur (Keleş, 2015). Daha çok meyve ve bitkilerde rastlanan bu pigment türü, su ve alkolde erirken eterde erimez. Glikozit karakter gösteren antosiyaninler, kırmızı ve mavi renktedir. Bu grup pigmentler en fazla *Streptomyces griseus* ve *Actinomyces*'in türlerinde bulunur. Ancak, rekombinant DNA çalışmaları ile *Escherichia coli* gibi bakterilerin de bu pigmenti üretmesi sağlanmıştır (Yan, Li ve Koffas, 2008).

Melaninler: Melaninler, indolik polimerlerdir. Eumelaninler, pheomelaninler ve allomelaninler olarak sınıflandırılırlar (Surwas, Jadhav, Phugare ve Jadhav, 2013; Banerje, Supakar ve Banerje, 2014). Çözücülerde erimeyen bir yapıya sahiptirler. Genellikle siyah, kahverengi ve kırmızı renklere sahiptirler. *Azotobacter chroococcum*, *Rhizobium*, *Vibrio cholerae*, *Burkholderia cepacia* gibi bakterilerde melanin pigmentlerinin farklı yapıları tespit edilmiştir (Plonka ve Grabacka, 2006).

Fenazin Türevleri: Bu pigmentler suda ve kloroformda erirler. *Pseudomonas aeruginosa*'nın piyosiyenin pigmenti bu gruba ait bir pigmentlerdendir (Wu, Hsu ve Lee, 2003). Fenazin üretimi phz gen ifadelerine dayanmaktadır (Blankenfeldt, 2013). *Nocardia*, *Sorangium*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Vibrio*, *Pelangiobacter* cinsleri de fenazin türevi pigmentler üretmektedir (Cimmino, Andolfi ve Evidente, 2013).

Kinonlar: *Pseudomonas*, *Actinomyces*, *Mycobacteri*'lerde rastlanan kinonlar, suda erimezler, yoğun ve parlak renklere sahiptirler (Gürcüm ve Öneş, 2018). Kinonlar, doymamış bir halkasal ketondan meydana gelir. Kinonlar yapılarına göre benzokinonlar, naptakinonlar ve antrakininonlar olarak sınıflara ayrılırlar (Deveoğlu ve Karadağ, 2011). Bazı kinon grubuna ait olan antrakininon tipi bileşikler, renkli antimikrobiyal tekstil materyallerinin üretiminde fonksiyonel boyalar olarak işlev görebilen renkler sağlamanın yanı sıra önemli ölçüde antibakteriyel aktivite göstermektedir (Gürcüm ve Öneş, 2018).

Piroller: Piroller, dört karbon atomu ve bir azot atomundan oluşan beş üyeli bir halka ile karakterize edilirler. Prodigiosin, klorofil, fikosiyanin gibi yapısında pirol halkası bulunan pigmentler bu gruba aittir (Wu, Hsu ve Lee, 2003; Walsh, Garneau-Tsodikova ve Howard-Jones, 2006). *Pseudomonas magnesorubra*, *S. coelicolor*, *Actinomadura pelletieri*, *Vibrio gazogenes*, *Pseudoalteromonas denitrificans*, *Vibrio* sp. bakterilerden izole edilirler (Bennett ve Bentley, 2000; Harris ve diğerleri, 2004; Williamson, Fineran, Leeper ve Salmond, 2006; Kim ve diğerleri, 2008; Elahian ve diğerleri, 2013).

2.3. Bakteriyel Pigmentlerin Tercih Edilme Sebepleri ve Kullanım Alanları

Sentetik pigmentler; gıda, tekstil, kozmetik ve eczacılık gibi çeşitli endüstrilerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, sentetik pigmentlerin tüketiciler üzerindeki toksisiteleri, doğal pigmentleri araştırmaya ve kullanmaya teşvik etmektedir. Doğal pigmentler, yalnızca ürünlerin pazarlanabilirliğini artırmakla kalmaz, kullanıldıkları ürünlere antioksidan, antikanser gibi özellikler de kazandırarak, sağlık üzerine pozitif yönde katkı sağlar (Tuli, Chaundhary, Beniwal ve Sharma, 2015). Farklı endüstriyel alanlarda kullanılan doğal pigmentler genellikle bitkisel veya mikrobiyal kaynaklı olmakla birlikte, bitkilerden elde edilen doğal pigmentlerin ışık, ısı ya da pH ya karşı toleranslı olmaması, suda çözünmesi ve mevsimsel değişikliklerden etkilenmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır. Hava koşullarından bağımsız, ucuz kültür ortamlarında mikroorganizmaların kolay ve hızlı gelişmesi, çok çeşitli C ve N kaynaklarını kullanabilmeleri, pH, sıcaklık, mineral konsantrasyonu ve değişimine karşı daha toleranslı olmaları, yüksek pigment verimi, pelletten kolayca ayrılabilmesi ve genlerine daha kolay müdahale edilerek farklı renk elde edilme olanağı mikroorganizmaların, pigment üretiminde öne çıkmasını sağlamaktadır (Pankaj ve Kumar, 2016; Venil ve Lakshmanaperumalsamy, 2009). Bu avantajlar, mikrobiyal pigment üretiminin, çeşitli

endüstriyel uygulamalar için araştırmalarda öne çıkmasını sağlamıştır (Gürcüm ve Öneş, 2018). Ancak, bu avantajlarının yanında yapılan son çalışmalarda, bazı endüstriyel uygulamalar için bakteriyel pigmentlerin, büyük ölçeklerde, fermentasyon tanklarında üretimlerinin geliştirilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (Charkoudian, Fitzgerald, Khosla ve Champlin, 2010).

Bakteriyel pigmentlerin üretimini ekonomik olarak uygulanabilir hale getirmek için, çok sayıda pigmentin biyosentezinden sorumlu olan genlerin klonlanarak, rekombinant DNA teknolojisinin yardımıyla, bu pigmentlerin üretimi arttırılabilmektedir. Alternatif olarak, farklı renkleri ürettirebilecek biyosentetik yollar da tasarlanabilir (Gürcüm ve Öneş, 2018). Ayrıca, bir bakteriyel pigmentin moleküler yapısını ve rengini oluşturmak için yolda ve süreçte, biyosentetik yollarla değişiklik meydana getirilebilir. Bu çalışmaya örnek olarak mavi renkli aktinorhodin pigmentini üreten *Streptomyces coelicolor*'in, parlak sarı renge sahip kalafungin adlı bir maddeyi üretmek için genetik olarak modifiye edilmiş olması verilebilir (Gürcüm ve Öneş, 2018).

Bakteriyel pigmentler, gıda, tekstil, kozmetik ve eczacılık endüstrisi başta olmak üzere, farklı alanlarda kullanım potansiyeli gösteren maddelerdir. Gıdalarda; boyar madde olarak, gıdaları güneşten koruyucu ve bu sayede gıdaların kalitesini artırıcı olarak, tekstilde; mikrobiyal kumaş boyası olarak, farklı endüstrilerde antimikrobiyal ve antikanser ajan olarak, antioksidan olarak ve biyoindikatör olarak kullanım potansiyelleri ortaya konmuştur (Rao, Prabhu, Xiao ve Li, 2017).

2.3.1. Gıda endüstrisi

Sentetik gıda katkı maddelerinin ve koruyucuların besin alerjileri, gıda intoleransı, kanser, multipl skleroz, dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu (DEHB), beyin hasarı, bulantı, kardiyak, erken doğum gibi pek çok sağlık sorununa sebep olduğu bildirilmiştir (Erkmen, 2010; Rovina, Siddiquee ve Shaarani, 2017; Chung, 2016). Sentetik boyalar; azo boyaları, trifenilmetan boyaları, ksanen boyaları, indigotin boyalar ve kinolin boyaları olarak sınıflandırılır. Küresel boya üretiminin yarısından fazlasında en büyük renk grubu olan azo boyalar moleküler yapılarında kromofor olarak azo grubu (-N=N-) içeren boyalardır. En yaygın boyalardan bir diğeri de Allura Red boyasıdır. Önceki çalışmalarda bu boyanın

toksik ve karsinogenik etkilerinin yanı sıra çocuklarda hiperaktiviteye sebep olduğu bildirilmiştir (Rovina, Siddiquee ve Shaarani, 2016).

Sentetik pigmentlerden eritrosin ve sunset yellow, sırasıyla kırmızı ve sarı renklendirici olarak gıda endüstrisinde, ilaç ve kozmetik ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu pigmentler birçok ülke tarafından yasaklanmıştır. Sentetik renklendirme ajanları, deney hayvanlarının farklı organlarında belirli hasarların nedensel ajanları olarak gösterilmiştir. Örneğin beyin ve testislerde nörotransmitterlerde dengesizliğe neden olduğu belirtilmiştir (Khiralla, Salem ve El-Malky, 2015). Khiralla, Salem ve El-Malky (2015)'nin yapmış oldukları *in vivo* çalışmalarda, Eritrosin ve Sunset yellow azo boyalarının gıdada kullanılması, farklı beyin bölgelerinde histopatolojik değişikliklerle ilişkili olan dopamin ve noradrenalin konsantrasyonunda dengesizlik oluşturarak, bu hormonların nörotransmisyonu üzerine etki eder. Bu etki sonucunda, bireylerde dikkat eksikliği ve hiperaktivite meydana geldiği bildirilmiş, bu renklendiricilerin aşırı dozu uygulandığında, beyin histolojik yapısında (serebrum striatum, serebral korteks, serebellum ve hipokampus) ciddi değişiklikler görüldüğü ortaya konmuştur. Bu değişiklikler hiperaktivite ve hormon dengesizliği (dopamin, noradrenalin, ICSH ve testosteron dahil) ile ilişkilendirilmiştir. Araştırmalara tabi tutulan diğer sentetik boyalara ve etkilerine baktığımızda, Tartrazine; dikkat eksikliği / hiperaktivite bozukluğu (DEHB) riski ve olası kanser, alerji vb. risklere, Sarı kinolin; astım, dikkat eksikliği / hiperaktivite bozukluğuna ve döküntülere, Amaranth; astım, egzama, hiperaktivite, doğum kusurlarına ve ölüme, Ponceau 4R.; alerjik ve aynı zamanda potansiyel kanserojen etkilere, Benzoik asit ise, aşırı duyarlılık reaksiyonu, astım ve nörolojik bozukluklara neden olduğu bilinen ve gıda, kozmetik, tekstil gibi endüstriyel alanlarda kullanılan sentetik boyalardır (Dikshit ve Tallapragada, 2018).

Sentetik gıda renk maddeleri için gerekli olan güvenlik testleri ile, toksik oldukları belirlenen bazı renk maddelerinin kullanımı yasaklanmıştır. Örneğin, gıdadaki sentetik boyalardan olan azo boyalar bağırsak florasında aromatik aminlere ayrışarak, çocuklarda dikkat dağınıklığı ve hiperaktiviteye sebep olurken, yetişkinlerde baş ağrılarına neden olur (Kucharska ve Grabka, 2010). Ancak, doğal pigmentler sentetik pigmentlere göre daha düşük toksisiteye sahip olmaları nedeniyle gıda korumasında antibakteriyel olarak kullanılmaktadır. (Hizbullah ve diğerleri, 2018). Tüm bunların üstüne, bilinçli tüketiciler tarafından doğal renk maddelerine olan talep artmıştır. Bu da, son yıllarda başvuru patent sayısının da gösterdiği gibi, doğal gıda boyalarını geliştirmeye yönelik çalışmaların

artmasına yol açmıştır. Endüstriyel olarak kullanımlarına bakıldığında, yaygın olan pigmentlerden karotenoidlerin singlet oksijen ve serbest radikalleri temizleyici, antikanser ajanı, immun cevap uyarıcı ve yumuşak içecekleri, unlu malülleri ve kozmetik katkı maddeleri olarak yarar sağladıkları bilinmektedir (Numan ve diğerleri, 2018). Ayrıca, bazı mikrobiyal pigmentlerin renklendirici ve biyoaktif özelliklerinin yararlı etkilerinden dolayı fonksiyonel gıda olarak kullanılabilirlikleri de rapor edilmiştir (Pankaj ve Kumar, 2016).

2.3.2. İlaç endüstrisi

Birçok ilacın toksik etkisi ve etkinliğinin sınırlı olması nedeniyle araştırmaları, daha güvenli, geniş spektrumlu yeni ilaç etken maddelerini araştırmaya zorlar. Günümüzde, antibiyotik kullanımı ile artan ilaç direncine sahip patojenlere karşı yeni kaynaklardan antibiyotik geliştirilmesi talep edilmektedir. Ayrıca, ölüm ajanı olarak tarif edilen kanser için uygun bir ilaç bulunmamaktadır. Yeni patojenlerin yayılımının artması ve kanser hastalarında ilaç direncinin kontrolü için eldeki imkanların kısıtlı olması nedeniyle, yeni ilaçlara olan talep artmaktadır (Numan ve diğerleri, 2018).

Doğal mikrobiyal ürünler, kimyasal çeşitlilik ve potansiyel ilaç öncüllerinin en zengin kaynaklarından birini oluşturmaktadır (Deorukhkar, Chander, Ghosh ve Sainis, 2007). 1940'lerden günümüze kadar, birçoğu ilaç endüstrisinde kullanılan doğal ürünler ve bu ürünlerin türevleri, özellikle enfeksiyonların, kanser ve diyabet gibi hastalıkların tedavilerinde insan sağlığı için ön tedavi olarak geliştirilmiştir ve yaygın olarak kullanılan önemli bir pazarı temsil eder (Newman ve Cragg, 2016).

Çoğu sentetik antitümör ilacı, yalnızca tümör hücrelerini değil, normal hücreleri de öldürürerek ciddi yan etkilere sebep olmaktadır. Organizmalardan geliştirilen doğal antitümör ilaçlarının hem kanser terapisinde etkili olduğu hem de sentetik ilaçlara göre daha az toksik olduğu kanıtlanmıştır (Cragg, Grothaus ve Newman, 2009; G. Ravelo, Estévez-Braun, Chávez-Orellana, Pérez-Sacau ve Mesa-Siverio, 2004). 1940'lerden beri 100.000'den fazla doğal anti tümör ilacı tanımlanmıştır. Son yıllarda Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından, hayvan, bitki, mikroorganizma ve deniz canlılarından çok sayıda antitümör ilacı tanımlanmış ve kabul edilmiştir (Cragg, Grothaus ve Newman, 2009; Kumaran, Kim ve Hur, 2010).

Bazı doğal kaynaklı pigmentler, ilaç ve sağlık alanında hastalık kontrol belirteci veya iyileştirici ajan olarak kullanılabilir. Örnek olarak zeaksantin yaşı bağli dejenerasyondan koruyucu olarak hareket ettiği düşünölmektedir. Bunun yanı sıra astaksantin, kardiyovasköler hastalıkların önlenmesinde ve bağışıklık sisteminin güçlendirilmesinde yardımcı olur (Pankaj ve Kumar, 2016). Ayrıca antaksantin, *Helicobacter pylori*'ye karşı biyoaktivitenin artırılmasında ve yüksek antioksidan aktiviteye bağli kataraktın önlenmesinde oldukça önemlidir (Sabbagh ve Namvar, 2017). Mikrobiyal pigmentlerden olan melaninler de, insan metastatik melanomunun tedavisinde monoklonal antikorlar üretmek için kullanılır. Bu çalışmalara ek olarak yapılan bazı çalışmalarda, antioksidant olarak kullanılan mikrobiyal pigmentlerin (karotenoid, melanin, ksantomonadin vb.), kanser ve kalp hastalıkları gibi birçok hastalığın görölme sıklığını önleyebileceği gösterilmiştir (Rao, Prabhu, Xiao ve Li, 2017).

2.3.3. Tekstil endüstrisi

Günümüzde kullanılan sentetik boyar maddelerin birçoğunun toksik ve kanserojen olduğu, bunun yanı sıra, bu sentetik boyaların atıklarının çevre kirliliği oluşturduğu ortaya konduğunda, doğal boyar maddeler yeniden gündeme gelmiştir (Ali, Nisar ve Hussain, 2007). Bitki kaynaklı doğal boyaların kullanımının avantajları, doğal atıklardan elde edilen boyar maddelerin kullanımı halinde bu atıkların ekonomiye kazandırılmış olması, daha az su tüketimi, enerji tasarrufu ve kolay bozunabilir (çözölebilir) oluşuyla çevreye zarar vermiyor olmasıdır. Ancak bakteri ve alglerden elde edilen boyar maddeleri konu edinen çalışmalar henüz Ar-Ge aşamasında olduğundan, tekstil endüstrisi içinde yeterince yer almamaktadır (Gürcüm ve Öneş, 2018).

Yapılan çalışmalarda mantar, bakteri gibi mikroorganizmaların üretilmesiyle elde edilen pigmentlerin, doğal boyar maddelere alternatif bir renk kaynağı olarak kullanılabildiği gösterilmiştir. Mikroorganizmalar karotenoidler, flavonoidler, kinonlar ve rubraminler gibi çok çeşitli stabil pigmentler üretirler ve pigment üretiminde bitki ve hayvanların kullanımına kıyasla daha yüksek verime sahiptir. Ayrıca, bazı doğal renklendirici maddeler, özellikle antrakinin tipi bileşikler, renkli tekstil materyallerinin üretiminde işlevsel boyalar olarak görev alabilecek canlı renkler sağlamanın yanında, önemli ölçüde antibakteriyel aktivite göstermektedir (Gürcüm ve Öneş, 2018). Sentetik boyar maddelerin aksine, mikrobiyal pigmentlerin pek çoğunun kanser, alerji vb. hastalıklara sebep olmadığı,

hatta antibiyotik ve anti-kanser özelliklere sahip olabileceği ortaya konmuştur (Ökmen ve Türkcan, 2013). Saranya, Jayapria ve Tamilselvi, (2012)'nin fenazin türevi olan piyorubrin pigmenti ile yapmış oldukları ipek boyaması çalışmalarının sonucunda, boyanmış ipeğin bakteri türlerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği, bu nedenle bu kullanılan tekstil ürünlerinde fenazin boyamasının uygulanabilirliği ortaya konmuştur.

Baskı mürekkepleri, boyalar ve kaplama maddesi gibi diğer sanayi sektörleri daha hızlı büyümesi beklenirken, tekstil endüstrisi organik pigmentlerin ve boyaların en büyük tüketicisi olmaya devam etmektedir. Tekstil endüstrisinde yaklaşık 1,3 milyon ton sentetik boya ve boya öncülleri kullanmaktadır (Venil, Zakaria ve Ahmad, 2013). Boya işlemleri sırasında her yıl yaklaşık olarak 200.000 ton boya, atık olarak kaybedilmektedir. Bu durumdan dolayı çevre dostu boyalara ilgi artmıştır. Mikrobiyal pigmentler, tekstilde kumaş boyanmasında kullanılabilecek çevre dostu renklendiricilerdir (Chadni, Rahaman, Jerin, Hoque ve Reza, 2017). Yapılan bazı çalışmalarda *Vibrio* suşlarından elde edilen kırmızı prodigiosin pigmentinin yün, naylon, ipek ve akrilik elyaflar için boyar madde olarak kullanımı gösterilmiştir (Thomson, Crow, McGowan, Cox ve Salmond, 2000; Sabbagh ve Namvar, 2017). Sabbagh ve Namvar (2017) tarafından yürütülen bir çalışmada ise *S. marcescens* tarafından üretilen prodigiosin pigmenti, akrilik kumaş, polyester, ipek ve pamuklu kumaşları boyamak için uygulanmıştır. Farklı kumaş tiplerini boyamak için birçok mikrobiyal pigment kullanılmıştır. Bir renklendirici olarak, mikrobiyal boyalarla boyanmış tekstil materyalleri antimikrobiyal özellik gösterirler. *Vibrio* türlerinden elde edilen prodigiosinler kumaş boyamada kullanıldıklarında, *Staphylococcus aureus* ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyel özellik göstermektedirler (Rao, Prabhu, Xiao ve Li, 2017).

2.3.4. Diğer endüstriler

Mikrobiyal pigmentlerin farklı endüstriyel alanlardaki uygulamaları günden güne artmaktadır (Pankaj ve Kumar, 2016). Bu pigmentlerin gıda, tekstil, kozmetik ve ilaç sektörü gibi yaygın kullanıldığı alanlar dışında uygulamaları da mevcuttur. Bu alanlara örnek olarak pigmentlerin indikatör olarak kullanımları verilebilir. İndikatör olarak kullanılan mor renkli pigment, *Flexibacter* ve *Sporocytophaga* bakterilerinden izole edilmekte ve içme sularındaki kirliliğin göstergesi olarak kullanılmaktadır. Bir diğer indikatör örneği, *V. indigofera* bakterisinden elde edilen mavi renkli bir pigmenttir. Bu bakteri normal çevresel büyüme koşullarında mavi renkli pigment üretmektedir ancak,

heksavalent krom (Cr^{+6}) gibi ağır metallere maruz kaldığında pigment üretimi göstermez (Pankaj ve Kumar, 2016; Rao, Prabhu, Xiao ve Li, 2017). Bunun yanında mikrobiyal pigmentler, sıcaklık değişimini izlemek için de kullanılabilirler. Örneğin, *Pantoea agglomerans* olarak bilinen bir bakteri, yalnızca 10 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda koyu mavi bir pigment üretmektedir. Bu nedenle gıdaların ve klinik malzemelerin düşük sıcaklıkta depolanması yönetimi için sıcaklık göstergesi olarak kullanılabilir (Fujikawa ve Akimoto, 2011).

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). Pigmentlerin biyokimyasal çalışmalarda işaretleyici olarak kullanımlarının yanı sıra, gıda endüstrisinde renklendirici madde olarak, ilaç ve su kültürü endüstrisi gibi çok sayıda alanlarda endüstriyel uygulamaları bulunmaktadır (Pankaj ve Kumar, 2016).

Çoğu mikrobiyal pigmentin plastik, boya, kağıt ve baskı endüstrisinde de renklendirici olarak kullanımlarına oldukça büyük bir talep bulunmaktadır (Pankaj ve Kumar, 2016). Bunların yanı sıra ressam boyaları, deri dekorasyonu, imitasyon deri, inşaat materyalleri, yüzey kaplamaları, kauçuk, kağıt, kozmetik, seramik ve emayelerde de boyar madde olarak kullanımları raporlanmıştır (Erdal ve Ökmen, 2013).

2.4. *Pseudomonas* Cinsine Ait Bakterilerin Pigmentleri

Pseudomonas cinsi bakteriler, *Pseudomonadaceae* familyası içinde yer alan Gram negatif, nonfermentatif, sporsuz, polar flagellaları ile hareket eden aerobik basillerdir. (Speert, Campbell, Davidson ve Wong, 1993). Ayrıca, kültürdeki tatlı üzüm benzeri koku özelliği de *P. aeruginosa*'yı tanımlamada ayırıcı bir özelliktir. Bu özellik 2-aminoasetofenona aittir (Çufalı, 2011). *Pseudomonas* cinsine ait türler, 6 değişik şekeri metabolize etmek için 2-keto-deoksiglukonat yolunu kullandıklarından dolayı, ATP üretimi için elektron taşıma zincirine ihtiyaç duyarlar. Elektron taşıma zincirine ihtiyaç duymalarından dolayı *Pseudomonas* cinsi zorunlu aerob bakteridir (Maçın, 2014). *Pseudomonas* spp., minimum besin varlığında 4-42°C gibi geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilen bakterilerdir ancak, gelişme gösterdiği optimum sıcaklık 37°C'dir. Türlerin tamamı optimum gelişmeyi nötral

veya alkali pH (7,0-8,5) aralığında gösterir (Çufalı, 2011). Pigmentasyon, pigment üreten *Pseudomonas* cinsine türlerinin ayrımında kullanılan önemli bir özelliktir (Keskin ve Ekmekçi, 2003).

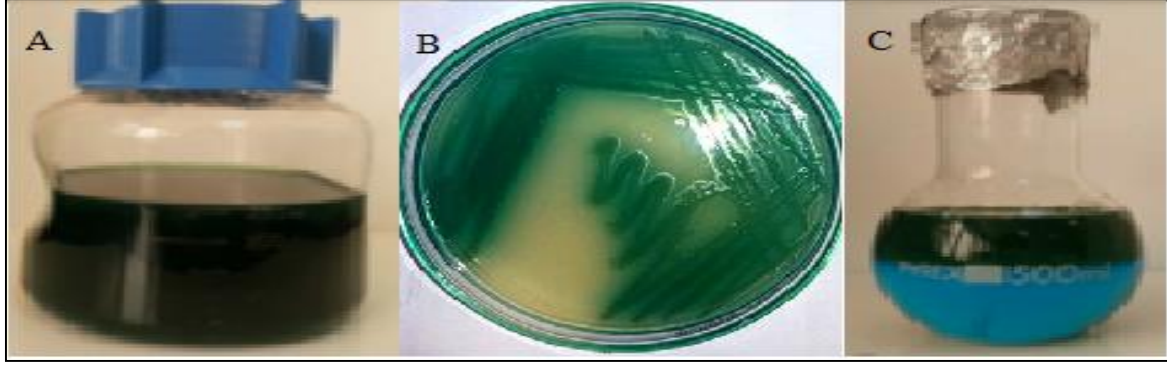
Pseudomonas türlerinin piyoverdin, piyosiyenin, piyorubin ve piyomelanin adı verilen çeşitli pigmentler oluşturdıkları ve bu pigmentler sayesinde seçici bir özellik kazandıkları belirtilmiştir (Daly, Boshard ve Matsen, 1984). Fenazinler, *Pseudomonas*'ların suda çözünebilir pigmentleridir. Suda çözünen pigmentler arasında en çok bilinenleri piyoverdin ve piyosiyenidir. Diğer fenazin pigmenti ise, özellikle *Pseudomonas chlororaphis* bakterisine özgü olan, suda diğer pigmentlere kıyasla daha az çözünebilen ve koloni etrafında kristalize olma özelliği gösteren klororafin (chlororaphin) olarak adlandırılmış yeşil bir pigmenttir. Bir diğer pigment Lemonnierin, *Pseudomonas lemonnierin* suşu için karakterize olan hücre içinde bulunan ve suda çözünmeyen bir pigmenttir. Karotenoidler ise, genellikle sarı veya turuncu renkli, suda çözünmeyen ve *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas vasicularis*, *Pseudomonas flava*, *Pseudomonas pseudoflava*, *Pseudomonas palleronii*, *Pseudomonas rhodos*, *Pseudomonas echinoides*, *Pseudomonas radiora* gibi birçok tür tarafından üretilen pigmentlerdir. Yaşlı *Pseudomonas* kültürlerinde (10 günlük) melanin pigmentlerinin üretildiği de tespit edilmiştir (Rana ve Chauhan, 2018)

2.4.1. *Pseudomonas* cinsine ait bakterilerin pigmentleri ve pigment yapıları

Pseudomonas türleri, piyosiyenin (mavi-yeşil), piyoverdin (sarı, yeşil ve floresan), piyomelanin (açık kahverengi) ve piyorubrin (kırmızı-kahverengi) gibi ürettiği farklı pigmentler nedeniyle dikkat çekmektedir (Meyer, 2000). *P. aeruginosa* birçok çeşit pigment üretebilme kapasitesine sahiptir ve en çok çalışılan *Pseudomonas* türüdür. *Pseudomonas* türlerinin üretmiş oldukları pigmentleri tek tek aşağıdaki şekilde ele alabiliriz:

Piyosiyenin ($C_{13}H_{10}N_2O$), suda ve kloroformda eriyen, fluoresans vermeyen fenazin grubundan mavi-yeşil renkte olan ve azot içeren heterosiklik bir bileşiktir (Karatuna ve Yağcı, 2008; Jayaseelan, Ramaswamy ve Dharmaraj, 2014). İzolatlarının yaklaşık %90-95'i normalde “mavi pus” olarak adlandırılan olarak adlandırılan ve Resim 2.1’de farklı ortamlardaki renk kompozisyonları gösterilen piyosiyenin pigmentini üretir (Laxmi ve

Bhat, 2016). Piyosiyenin türevi olan piyoselin, *P. aeruginosa*'ların sideroforlarından biridir. Biyogenetik olarak, salisilik asit ve sisteinin iki molekülünün kondensasyon ürünüdür (Meyer, 2000).



Resim 2.1. *P. aeruginosa*'nın sıvı/katı besi ortamında piyosiyenin üretimi ve iki fazlı ekstraksiyonu A. Sıvı besi ortamı B. Katı besi ortamı C. Ekstraksiyon (Alzahrani ve Alqahtani, 2016; Gahlout, Prajapati, Chauhan, Patel ve Solanki, 2017)

Piyoverdin, fluoresens grupta yer alan suda eriyen, kloroformda erimeyen, ultraviyole ışığında fluoresens veren, sarı-yeşil renkte bir pigment grubunu ifade eder (Karatuna ve Yağcı, 2008). Flouresan, *Pseudomonas* türleri tarafından demir açlığı koşulları altında üretilen yapısal olarak ilişkili bir yan etki grubudur. Pek çok *Pseudomonas*, birden fazla tipte yanıl molekül türü oluştururken, piyoverdinler her zaman birincil demir alım sistemidir. Çalışılan en iyi piyoverdin, *P. aeruginosa* tarafından üretilen piyoverdin I'dir (PVDI). Piyoverdin ($C_{56}H_{87}N_{18}O_{22}$), 1364.632 Da molekül ağırlığına sahip bir maddedir (Yeterian ve diğerleri, 2010). *Pseudomonas* türlerinden elde edilen piyosiyenin ve piyoverdin pigmentlerinin siderefor fonksiyonları vardır (Karatuna ve Yağcı, 2008).

Piyomelaninler, fenolik veya indolik bileşiklerin oksidatif polimerizasyonu ile oluşturulan, yüksek moleküler ağırlıklı pigmentlerdir. Piyomelanin, *P. aeruginosa* kökenlilerin %2-3'ü tarafından oluşturulan ve başka hiçbir bakteri tarafından sentezlenmeyen, suda eriyen, kahverengimsi-siyah renkte bir pigmenttir (Meyer, 2000). *P. aeruginosa*'ya ek olarak, bakterilerden insana kadar değişen her canlı organizma taksonlarından melanogenez ara ürünlerine göre dört kategoride sınıflandırılmış olan piyomelanin ve diğer melanin formlarının üretildiği açıklanmıştır: eumelanin, feomelanin, allomelanin ve piyomelanin (Mahmood, Mohammed ve May, 2015). Bu pigmentin esas görevi, üretildiği organizmayı

UV ışığına karşı korumaktır. Ayrıca, piyomelanin üretimi sonucu *P. aeruginosa*'da oksidatif stresin azaldığı görülmüştür (Turick, Knox, Becnel, Ekechukwu ve Milliken, 2010).

Piyorubin, bazı *P. aeruginosa* suşları tarafından üretilen, parlak kırmızı renkte, suda çözünebilen ancak kloroformda çözünemeyen, fenazin türü bir pigmenttir. Düşük oksijen konsantrasyonunda geri dönüşümsüz olarak rengini yitirir. Piyorubin klinik izolatların %2'sinde üretilir ve tüm pH değerlerinde kırmızı renktedir (Meyer, 2000).

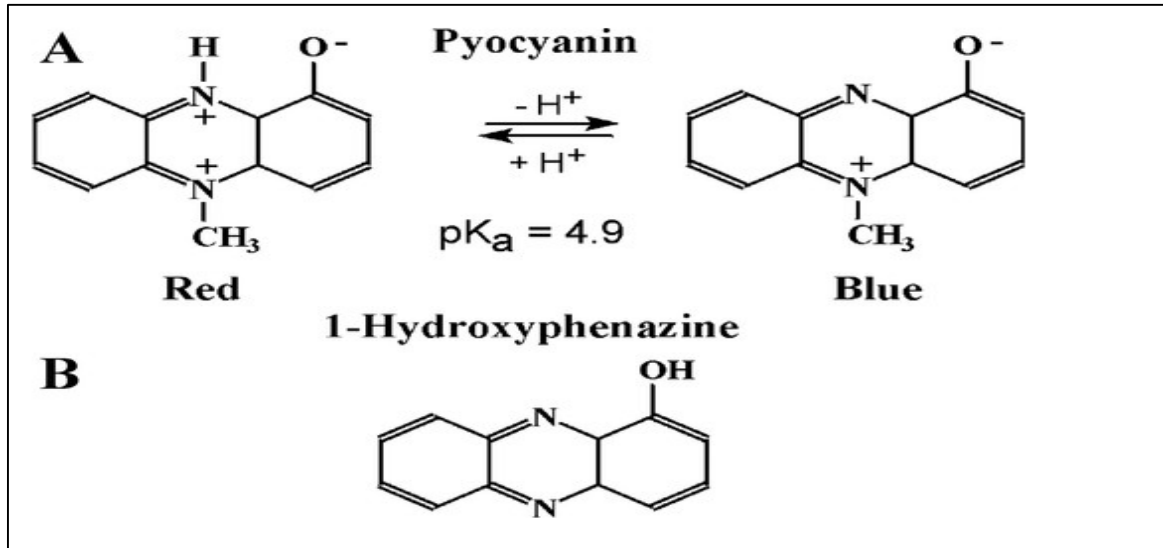
2.4.2. *P. aeruginosa*'dan izole edilen piyosiyanin pigmentinin yapısı ve sentez mekanizması

P. aeruginosa, toprak, bataklıklar ve kıyı deniz yaşam alanlarının yanı sıra bitki üzerinde ve hayvansal dokularda yaşayabilen, Gram-negatif, aerobik, sporsuz, kapsülsüz, hareketli ve basil şeklinde bir bakteridir. Hidrofilik olduğu için lavabolardan, sebzelerden, nehir sularından ve hatta antiseptik solüsyonlardan bile rahatlıkla izole edilebilir. *P. aeruginosa*, ilk kez Fransız eczacı Carle Gessard tarafından 1882 yılında, mavi yara akıntılarından tanımlanmıştır (Hizbullah ve diğerleri, 2018; Brooun, Liu ve Lewis, 2000; Speert, Campbell, Davidson ve Wong, 1993). *P. aeruginosa* suşlarının hareketli olmaları, bulundukları besi ortamından yeterince faydalanmalarını sağlamaktadır. (Lau, Hassett, Ran, Kong, 2004). Uygun besi ortamında optimum 30-37°C'lerde ve hafif alkali ortamlarda gelişen *P. aeruginosa* 42°C'de üreyebilme yeteneğine sahiptir ve arka arkaya 3 pasajda 42°C'de üreyebilmesi, *P. fluorescens*'den ayırt edici bir özelliğidir. *P. aeruginosa* suşları, sıvı besiyerinde yüzeyde zar oluşturdıkları bir üreme gösterirler ve zarın hemen altında mavi yeşil pigmenti gözle görülebilir. Uzun süre beklemiş *P. aeruginosa* kültür ortamları zamanla alkali duruma geldiğinden, bakteriler litik fazda ürettikleri metabolitlerle erir ve sıvı besiyerini berraklaştırır. Pigment oluşumu kültür koşullarına bağlı olan bu bakterilerin pigment üretme özellikleri mutasyonla kaybolur ya da aynı anda birçok pigment oluşumu görülebilir. *P. aeruginosa*'nın ürettiği piyosiyanin pigmenti oksijensiz ortamda oluşmaz (Aslan, Kanbay ve Işık, 2018). Piyoverdin, piyosiyanin pigmenti ile birlikte üretildiğinde besi ortamında yeşil renk gözlenir (Bennett, Dolin ve Blaser, 2014).

Piyosiyanin (N-metil-1-hidroksifenazin) pigmenti, hareketini tek kutuplu flagellum ile sağlayan, gram negatif, aerobik *P. aeruginosa* tarafından üretilen mavi-yeşil renge sahip

fenazin türü bir pigmenttir. Suda ve kloroformda eriyen ve floresans vermeyen bu pigment, sıvı besiyerlerinde üretilmiş bakteri kültürlerine kloroform eklenir ve çalkalanırsa besiyerinin içinde çökmüş halde bulunan kloroform içerisinde kristalize olarak mavi-yeşil renkte gözlenir. (Moore ve Flaws, 2011; Essar, Eberly, Hadero ve Crawford, 1990; Cox, 1986). Piyosiyanin pigmentinin öncü molekülü olan korizmik asitten, son hali olan üç halkalı piyosiyanine sentezlenirken, *phzRABCDEFGH* operonu ve *phzH*, *phzM*, *phzS* genleri görev alır (Karatuna ve Yağcı, 2008).

Piyosiyanin zayıf asit özelliği veren fenol gruplu, suda çözünen bir zwitter iyonudur. Zwitter iyon özelliği, piyosiyanin pigmentinin nötr ve bazik pH değerlerinde negatif yüklenerek mavi, asidik pH değerlerinde pozitif yüklenerek (protonlanarak) kırmızı renkle karakterize edilmesini sağlar. Zwitter iyon özelliklerin ve düşük molekül ağırlığı (210,23 g/mol)'nın piyosiyanin pigmentine kolayca nüfuz etme ve lokal çevrelerde yayılarak sitoplazmik membranla etkileşime girme özelliği kazandırdığı düşünülmektedir (Hall ve diğerleri, 2016; McFarland ve diğerleri, 2013). Bu pigmentin kloroform ile ekstraksiyonu sırasında zwitter iyon özelliğinden kaynaklanan pH değişimine göre ortamdaki renk değişiminin ifadesi Şekil 2.1'de gösterilmektedir.



Şekil 2.1. *P. aeruginosa*'nın ürettiği piyosiyanin molekülünün asidik ortamda pozitif yüklü formu (kırmızı) ve bazik ortamda nötr formu (mavi) (A) ve 1-Hidroksifenazin'in kimyasal yapısı (B) (O'Malley, Reszka, Spitz, Denning ve Britigan, 2004)

2.4.3. *P. aeruginosa*'dan izole edilen piyosiyenin pigmentinin üretimini etkileyen faktörler

P. aeruginosa çok basit besiyerlerinde dahi üreyebilmektedir. En iyi üremeyi aerob ortamlarda gösterirken, ortamda nitrat varlığında nitratı termal elektron alıcısı olarak kullanarak anaerob ortamda da üreme gösterebilir (Bennett, Dolin ve Blaser, 2014). Bu pigmentin üretiminde karbon kaynağı olarak genellikle gliserol kullanılmakta ve farklı içeriklere sahip besi ortamlarında üretilen piyosiyenin miktarı da farklı olmaktadır (Cox, 1986). *P. aeruginosa*, düşük demir içerikli besiyerlerinde bol miktarda pigment üretmektedirler (Cox, 1986).

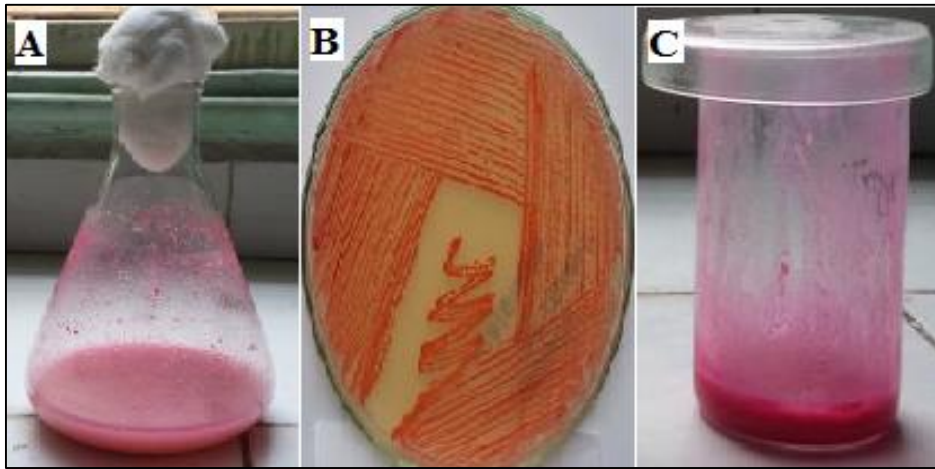
2.4.4. *P. aeruginosa*'dan izole edilen piyosiyenin pigmentinin biyolojik etkinlikleri

Doğal ve sentetik fenazinler, geniş spektrumlu antibiyotikleri, antimalaryal (Hussain ve diğerleri, 2011), tripanosidal (Neves-Pinto ve diğerleri, 2002), antihepatit C viral replikasyon aktiviteleri (Wang ve diğerleri, 2000), lösemi ve solid tümörde antitümör aktiviteleri, antikarsinomatöz aktiviteleri, nöroprotektif özellikleri, antifungal özellikleri, antikanser aktivite sağlayan topoizomera I ve II inhibitörlerini (Wang ve diğerleri, 2002) kapsayan önemli biyolojik aktiviteler göstermeleri nedeniyle, ilaç endüstrisinde büyük ilgi görmektedirler (Laursen ve Nielsen, 2004). Ancak, bu pigmentler doğal olarak üretildiklerinde, pigmenti üreten canlıya da oldukça çeşitli yararlar sağlar ve organizmanın yaşama şansını artırıcı etkilere sahiptir (Jayaseelan, Ramaswamy ve Dharmaraj, 2014).

P. aeruginosa, çoğalabilmek için demire gereksinim duyar ve transferrin, ferritin gibi vücut proteinleri ile demir için yarışır. Kısıtlı demir içeren ortamlarda, piyosiyenin ve piyoverdin demir iyonları ile şelasyon yapar ve membran içindeki reseptör proteinlere bağlanarak, demirin hücre içine alınmasını sağlar. Bu pigmentler çevredeki demiri bağlayarak *P. aeruginosa*'nın metabolizması için demir sağlamalarının yanı sıra, Ekzotoksin A'nın üretimini düzenlediği gibi kendi üretimini de düzenleyerek virülansta rol oynarlar (Karatuna ve Yağcı, 2008). Sekonder metabolit olarak üretilen bu pigment çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite göstererek, bakterilerin hayatta kalmasını ve diğer bakterilerle rekabet etmelerini sağlamaktadır (Lau, Hassett, Ran ve Kong, 2004). Piyosiyenin, biyo-kontrol ajanı olarak kullanılmıştır ve antibakteriyel ve antifungal aktiviteye sahiptir (Jayaseelan, Ramaswamy ve Dharmaraj, 2014).

2.5. *Serratia* Cinsine Ait Bakterilerin Pigmentleri

Enterobacteriaceae familyasına ait olan *Serratia* spp., Gram negatif basillerdir. Bu bakteriler, standart besi ortamlarında iyi büyüme gösterirler ve kolay tanınmalarını sağlayan koyu kırmızı renkte, prodigionin iskeletine sahip olan prodigiosin ve türevi pigmentleri üretirler (Sakuraoka, Suzuki ve Morohoshi, 2019; Shahitha ve Poornima, 2012). *Serratia* cinsine ait türler su, toprak, bitki, böcek, insan ve hayvanlardan izole edilebilir ve yalnızca aerobik koşullar altında pigmentasyon gösterirler. Pigmentasyon üretimi, türler arasında oldukça değişkenlik gösterir ve tür, inkübasyon süresi, çalkalama koşulları gibi pek çok faktöre bağlıdır (Khanafari, Assadi ve Fakhr, 2006). *Serratia* cinsinin türlerinden ayrı olarak, *Pseudomonas magneslorubra*, *Vibrio psikiyatri*, *Vibrio gazogenes*, *A. rubra*, *Rugamonas rubra* ve *Streptoverticillium rubroreticuli* türleri de prodigiosin üretmektedir (Darshan ve Manonmani, 2015). *S. marcescens* tarafından üretilen prodigiosin pigmentinin sıvı, katı besiyerindeki görüntüsü ve ekstrakte edilmiş hali Resim 2.2’de verilmiştir.



Resim 2.2. *S. marcescens*'in sıvı/katı besi ortamında üretimi ve prodigiosin pigmentinin ekstraktı A. Sıvı besi ortamı B. Katı besi ortamı C. Prodigiosin ekstraktı (Rokade ve Pethe, 2017)

Prodigiosinler, sitosolün asitleşmesine yol açan H^+/Cl^- simport aktiviteye teşvik eder. Bazı kanser hücrelerinde apoptozise neden olan sikloprodigiosin de bu aktiviteye sebep olmaktadır (Khanafari, Assadi ve Fakhr, 2006).

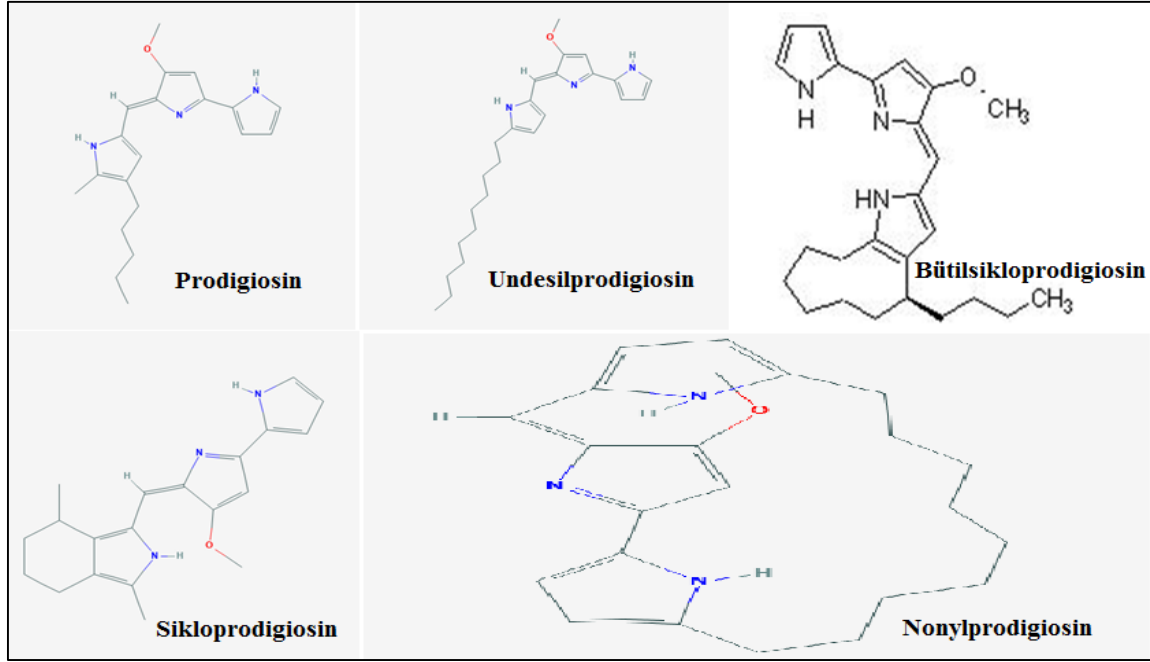
2.5.1. *Serratia* cinsine ait bakterilerin pigmentleri ve pigment yapıları

Prodigioninler, bakteriyel büyüme eğrisinin durgunluk fazında oluşan, doğal kırmızı renkli heterosiklik tripirollerdir. Günümüzde, prodigiosin benzeri bileşikleri tanımlamak için prodigionin kelimesi kullanılmaktadır. Prodigioninler üç temel sınıftan oluşmaktadırlar (Resim 2.3).

İlk grup, lineer tripirol grubudur. Çoğunlukla *S. marcescens*, *Serratia plymuthica*, *Hahella chejuensis* ve *Vibrio psychroerythreus*'tan izole edilen prodigiosin ve *Streptomyces longisporus ruber*, *Streptoverticillium rubrreticuli* ve *Saccharopolyspora* sp.'dan izole edilen undesilprodigiosini içerir. Prodigiosin ($C_{20}H_{25}N_3O$)'de birbirine bağlı iki rotamerde cis (veya β) ve trans (veya α) bulunur. Bu formlar arasındaki denge pH'ya bağlıdır (Darshan ve Manonmani, 2015). Prodigiosin pigmentinin molekül ağırlığı 323,44 g/mol'dür (Pubchem). Undesilprodigiosin ($C_{25}H_{35}N_3O$) ise, 393,575 g/mol moleküler ağırlığa sahiptir (Pubchem).

İkinci grup, makrosiklik gruptur. Pirol A ve pirol C arasındaki halka formasyonu ile tanınırlar. Bu grupta bulunan tek pigment olan Siklononilprodigiosin ($C_{23}H_{29}N_3O$) pigmenti 363,5 g/mol molekül ağırlığına sahiptir ve *Actinomadura pelletieri* ve *Actinomadura madurae* bakterilerinden izole edilmektedir.

Üçüncü grup ise, Pirol C'de halkası bulunan, halkasal bir gruptur. *Alteromonas rubra* ve *P. denitrificans*'den izole edilen sikloprodigiosinleri ve *Saccharopolyspora* sp. ve *S. coelicolor*'dan izole edilen bütilsikloheptilprodigionin pigmentleri, bu grup içinde değerlendirilir (Bennett and Bentley, 2000; Harris ve diğerleri, 2004; Williamson, Fineran, Leeper ve Salmond, 2006; Kim ve diğerleri, 2008; Elahian ve diğerleri, 2013).



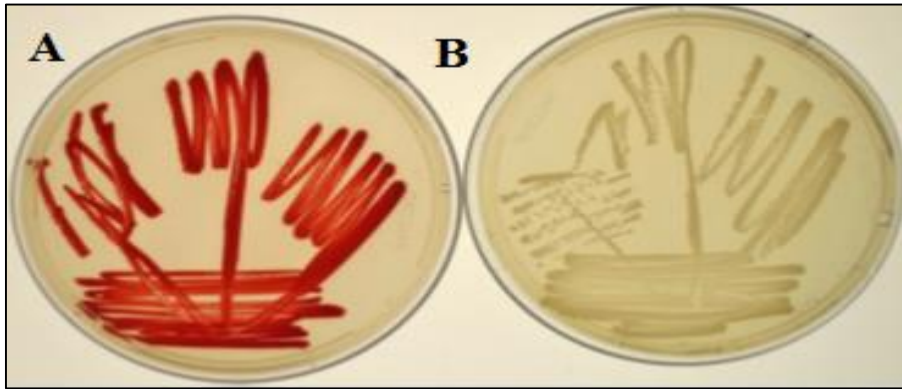
Resim 2.3. Prodigiosin türevlerinin yapısı (Kimata, Izawa, Kawasaki ve Hayakawa, 2017; Pubchem)

2.5.2. *S. marcescens*'ten izole edilen prodigiosin pigmentinin yapısı ve sentez mekanizması

Prodigionin ailesine ait kırmızı renkli, biyoaktif prodigiosin pigmenti üç pirol halkası, çeşitli alkil grupları ve pirolilpirrometen çekirdeği içeren bir bileşiktir (Bennet ve Bentley, 2000; Hage-Hülsmann ve diğerleri, 2018; Shaikh, 2016). Bu tanımlamanın yanı sıra *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp. ve *Streptomyces* sp. gibi birkaç mikroorganizma tarafından üretilen ve antibiyotik özelliğine sahip olan bu pigment, antibiyotik biyosentezi olarak da tanımlanırlar (Kimata, Izawa, Kawasaki ve Hayakawa, 2017). İlk olarak *S. marcescens*'ten izole edilen prodigiosin, farklı bakteriler tarafından da üretilebilmektedir (Yüce, Biçer, Kavuncuoğlu, Ozelgun ve Ongüt, 2014). Bu pigment, Metil Amil Pirol (MAP) ve Metoksi Bipirrol Karbaldehit (MBC) olarak adlandırılan iki bileşenin yoğunlaşma tepkimesiyle sentezlenir. MAP ve MBC üretiminden sorumlu genler, 14 genli bir operon tarafından organize edilir (Ravindran, Sunderrajan ve Pennathur, 2019; Harris ve diğerleri, 2004). Prodigiosin pigmentinin *S. marcescens*'in intraselular granüllerinde ve hücre ile ilişkili veziküllerinde bulunduğu gösterilmiştir (Kobayashi ve Ichikawa, 1991) ve pigmenti ekstrakt edilmesi için hücre duvarını yıkmak gerekir (Khanam ve Chandra, 2018).

2.5.3. *S. marcescens*'ten izole edilen prodigiosin pigmentinin üretimini etkileyen faktörler

Prodigiosin üretiminin birçok çevresel faktörden, inorganik fosfat varlığından, besiyeri içeriğinden, sıcaklıktan ve pH'dan etkilendiği gözlemlenmiştir. *Serratia* spp.'den pigment üretimi ve izolasyonu için kullanılan çok sayıda seçici besiyeri vardır. Günümüzde prodigiosin biyosentezi için kullanılan besi ortamları Nutrient Broth (NB) ve Pepton-Gliserol Broth (PG)'tur. Yapılan bazı çalışmalarda pigment verimini arttırmak için kullanılan susam tohumunun, pigment verimini arttırdığı ortaya konmuştur (Darshan ve Manonmani, 2015). NB besiyerinde maksimum pigment üretimi 28°C ile 30°C aralığında görülürken, 37°C'de bu besiyerinde pigmentasyon görülmediği ortaya konmuştur. Susam tohumu tozu ile hazırlanan besiyerine C kaynağı olarak eklenen glukoz ve maltozun prodigiosin üretimini inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Darshan ve Manonmani, 2015). Yüksek verimde pigment üretimi için optimum pH ise, 6-7 aralığında tespit edilmiştir (Das, Samal, Sahoo ve Sabat, 2018).



Resim 2.4. *S. marcescens*'in Luria Bertani (LB) besiyerinde 18 saat inkübasyonda farklı sıcaklıklarda kolonilerdeki pigmentasyonu A. 30°C ve B. 37°C (Romanowski ve diğerleri, 2019)

Yapılan çalışmalar sonucunda *Serratia* türlerine göre pigment üretiminde etkili C kaynağı farklılık göstermekle birlikte, *S. marcescens* için en ideal C kaynağı gliserol olarak bulunmuşken, en kötü C kaynağı glukoz olarak tespit edilmiştir. Çalışılan azot kaynaklarından soya pepton, et özütü ve fıstık tozunun da tripton ve maya özütüne göre pigment üretimini arttırmada etkili olduğu gösterilmiştir (Lin ve diğerleri, 2019)

2.5.4. *S. marcescens*'ten izole edilen prodigiosin pigmentinin biyolojik etkinlikleri

S. marcescens suşlarından izole edilen prodigiosin pigmentlerinin anti-UV özelliklerinin yanı sıra antibakteriyel, antifungal, antiproliferatif ve antioksidan özelliklerinin de olduğu yapılan çalışmalar sonucu ortaya konmuştur (Sundaramoorthy, Yogesh ve Dhandapani, 2009). Bu biyoaktif sekonder metabolit son zamanlarda miyelom, T hücreli lösemi, Burkitt lenfoması ve meme, kolon, karaciğer ve akciğer kanserleri üzerindeki immün sistemi baskılayıcı ve antikanser etkileri nedeniyle dikkat çekmiştir. Günümüzde prodigiosinin dört antikanser etki mekanizması tanımlanmıştır. Bu mekanizmalar; hücre içi asitlenmenin başlaması, Topoizomera I ve II inhibitörü olan DNA bölünmesinin başlaması, MAPK aktivitesinin düzenlenmesi ve hücre döngüsünün inhibisyonudur (Pérez-Tomás ve Viñas, 2010; Francisco ve diğerleri, 2007; Williamson ve diğerleri, 2005; Agwa ve diğerleri, 2018; Elahian ve diğerleri, 2013).

Antibakteriyel etkisi tespit edilen prodigiosinin, Gram pozitif bakterilerden *S. aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus avium* ve *Streptococcus pyogenes*, Gram negatif bakterilerden ise *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Proteus mirabilis* ve *Klebsiella pneumonia* gibi bakteriler üzerinde bu etkiyi gösterdiği ortaya konmuştur. Prodigiosinin antibakteriyel etkinliği prodigiosinin membran dışına çıkabilme ve DNAGiraz ve Topoizomera IV gibi hedef enzimleri inhibe edebilme yeteneği sonucunda ortaya çıkmaktadır (Darshan ve Manonmani, 2015). Yapılan bazı çalışmalar prodigiosinin baktetiyostatik etkisini ortaya koymaktadır. Bunun yanı sıra Ames Testi ile prodigiosin pigmentinin genotoksik etkisinin olmadığı da gösterilmiştir (Darshan ve Manonmani, 2015; Guryanov, Karamova, Yusupova, Gnezdilov ve Koshkarova, 2013).

Prodigiosin, antimikrobiyal, antibakteriyel, antifungal, antimalaryal, antibiyotik, antioksidan, antikanser (Montaner ve Prez-Toms, 2003), anti-UV, immün baskılayıcı ve antidiyabetik gibi özellikleri sebebiyle tıp, kozmetik, ilaç ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (Yüce ve diğerleri, 2014; Khanam ve Chandra, 2018). Undesilprodigiosin, metasikloprodigiosin, nonylprodigiosin, norprodigiosin ve roseophilin gibi izoformları olan prodigiosin, bu biyoaktif özelliklerine ek olarak, immün baskılayıcı etkisinden dolayı da tıbbi olarak kullanım alanlarına sahiptir (Elahian ve diğerleri, 2013). Prodigiosin tarafından indüklenen DNA bölünmesi, molekül içindeki A halkası yapısı ile yakından ilgilidir. Prodigiosinin bipirol halka bulundurması, prodigiosin pigmentinin bakır

aracılı nükleaz aktivitesi göstermesini sağlamaktadır. Prodigiosinlerin farklı yapılara sahip olması nedeniyle, sitotoksikite yetenekleri de değişiklik göstermektedir (Liu ve diğerleri, 2018a).

Son yıllarda yapılan araştırmalarla, geniş faaliyet yelpazesine sahip olan prodigiosinlerin mükemmel klinik etkilerinden dolayı immün baskılayıcı ve antikanser faaliyetlerine odaklanılmıştır (Pandey, Chander ve Sainis, 2009). Prodigiosinin farklı modellerdeki transplantasyon ve oto-immün bozukluklarda önemli ölçüde *in vivo* immün baskılayıcı aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Pandey, Chander ve Sainis, 2007). Prodigiosinin anti-proliferatif ve sitotoksik etkileri, yalnızca hücrel çalışmalarda değil insandaki en önemli kanser hücrelerinden B-hücresi kronik lenfotik lösemi hastaları üzerinde yürütülen *in vivo* çalışmalarda da gözlemlenmiştir (Campas ve diğerleri, 2003).

Prodigiosin, şu an için Aida Pharmaceutical A.Ş. tarafından ön klinik çalışmalara tabi tutulan bir pigmenttir. Ek olarak, prelinik çalışmalarda ve günümüzdeki birkaç klinik denemede, bir prodigiosin analogu ve bir BH₃ (Bor hidrür) taklitçi ajanı olan Obatoclast (sentetik prodigiosin)'ın, yalnızca ajan olarak uygulamalarda veya bir kaç kemoterapötik ilaçla kombinasyonlu olarak uygulamalarda antikanser madde olarak ümit verdiğini göstermektedir (Pérez-Tomás ve Viñas, 2010). Bu çalışmalar, yeni antikanser ilaçlarının geliştirilmesinde prodigiosinin kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır (Pérez-Tomás ve Viñas, 2010). Ayrıca Kim ve diğerleri (2003) tarafından da, Diabetes Mellitus tedavisinde prodigiosin kullanımı, prodigiosinin diyabeti önlemek ve tedavi etmek için aktif bir bileşen olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir.

2.6. Piyosiyenin ve Prodigiosin Pigmentlerinin Biyoteknolojik Olarak Kullanımı ve Farklı Kullanım Potansiyelleri

Piyosiyenin pigmentinin gıda, tekstil ve ilaç gibi endüstriyel alanlarda kullanımlarının yanı sıra bu pigmentin insanlarda, özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde idrar yolu enfeksiyonları, yara enfeksiyonları ve bazen zatürreye neden olan Enterobacteriaceae familyasının bir üyesi olarak bilinen *Citrobacter* sp. üzerinde antibakteriyal etkisi bulunmasından dolayı inhibitör olarak kullanımları rapor edilmiştir (Saha, Thavasi ve Jayalashmi, 2008; Sabbagh ve Namvar, 2017).

Güneş kremi uygulamasının, malign ve premalign cilt lezyonlarını önlemek veya en aza indirmek için önemli bir strateji olduğu düşünüldüğünde, piyosiyanın UV-B koruyucu etkisi ve SPF'nin geliştirilmesindeki rolü değerlendirilmiştir. Bu yöntemle belirlenen ticari güneş koruyucu losyonların SPF'si, etiketli SPF ile yakından eşleşmiştir. Bu nedenle, sonuçlar Piyosiyanın ile birleştirilen güneş koruyucusunun, tek başına güneş koruyucusuna kıyasla daha fazla UV-B koruyucu etkiye sahip olduğunu kanıtlamıştır (Patil, Paradeshi ve Chaudhari, 2016). Suryawanshi, Patil, Borase, Salunke ve Patil, (2014)'da, prodigiosinin güneş koruyucu olarak kullanımını araştırmış ve prodigiosinin fotokoruyucu aktiviteye sahip olan Aloe vera yaprağı ve salatalık meyvesine katkı maddesi olarak uygulanarak, güneş koruyucuların koruma faktörlerini (SPF) artırdığını ortaya koymuşlardır.

Sekonder metabolit olarak *S. marcescens* basta olmak üzere, pek çok bakteri tarafından üretilen prodigiosin pigmentinin gıda, tekstil ve ilaç alanında alışılmış olan uygulamaları dışında, güncel olarak pek çok alanda yapılan AR-GE çalışmaları devam etmektedir. Araştırmacılar prodigiosin pigmentinin kauçuk lateks, kağıt ve polimetil içinde bir boya maddesi olarak metakrilatı değerlendirdi, böylece sentetik pigmentlere bir alternatif olabilirliği gösterildi. Sonuçlar doğrultusunda, metakrilat ve kauçuk için boya olarak prodigiosin ve ayrıca pH göstergesi olarak prodigiosin boyalı kağıdın kullanım kapsamını göstermektedir. Dahası, doğaldır, suda çözünmez ve çevre dostudur (Joshi, Kothari ve Patel 2018). Shaikh (2016)'nın prodigiosin ile ilgili yapmış olduğu pek çok çalışmada prodigiosin, pH indikatörü, mum, tekstil malzemesi, kâğıt ürünler ve tırnak boyası olarak uygulanması için değerlendirmede bulunmuştur. Çalışmaları sonucunda pigment mum ve kumaş tarafından özümsemiştir. Bu sonuç doğrultusunda prodigiosin pigmentinin renkli mum yapımında kullanılabileceği öne sürülmüştür.

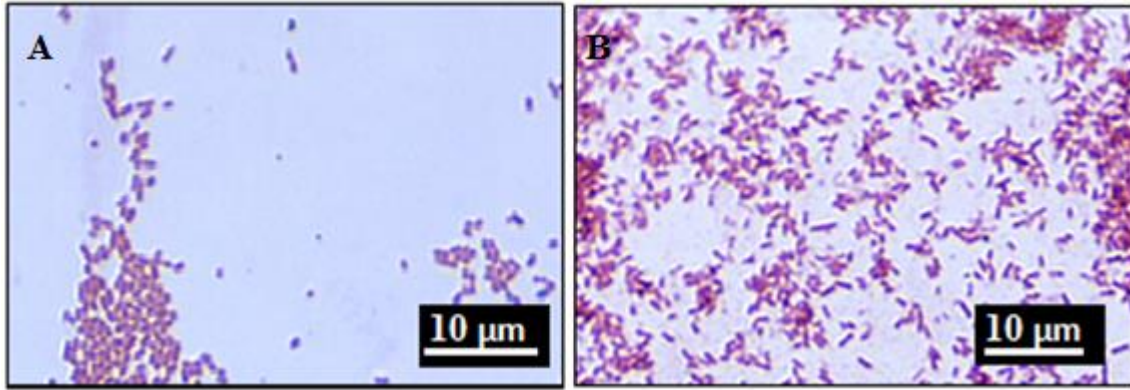
Prodiginin ailesinin iki üyesi prodigiosin ve obatoclax (OBX), antikanser özelliklerine sahip, şu anda klinik çalışmalar altında olan küçük moleküllerdir (Espona-Fiedler ve diğerleri, 2012). OBX, GeminX Pharmaceuticals (yakın zamanda Cephalon tarafından satın alındı) tarafından geliştirilen ve BH3 mimetik bir ilaç olarak tanımlanmış olan sentetik bir indolilprodigiosin türevidir (Nguyen ve diğerleri, 2007). OBX, şu anda pankreas kanserinin tedavisi için preklinik çalışmalar altındadır. Ayrıca, lösemi, lenfoma ve solid tümör maligniteleri ile ilgili faz I / II klinik çalışmalarındadır (Kumar ve Kumar, 2015).

3. MATERYAL METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteriler

Bu çalışmada pigment üreten suşlar seçilmiştir. Kullanılan bakteri türlerinden *P. aeruginosa* MB713 suşu Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Kültür Koleksiyonu'ndan, *S. marcescens* MB703 suşu ise, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir.



Resim 3.1. Çalışmada kullanılan bakterilerin ışık mikroskobu görüntüleri (100X). *S. marcescens* MB703 (A) *P. aeruginosa* MB713 (B)

3.1.2. Bakterilerin geliştirilmesinde ve saflık kontrollerinde kullanılan besi ortamları

Çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* MB713 ve *S. marcescens* MB703 suşlarının geliştirilmesinde Nutrient Broth (NB; 10 g pepton, 10 g et özütü, 5 g NaCl (sodyum klorür), 1000 mL distile su, pH 7,0±0,2) ve Nutrient Agar (NA; 10 g pepton, 10 g et özütü, 5 g NaCl, 15 g agar, 1000 mL distile su, pH 7,0±0,2) besiyerleri kullanılmıştır. Belirtilen miktarlarda maddeler tartılıp, bir miktar distile su ile manyetik karıştırıcıda, homojen hale gelinceye kadar karıştırılarak, son hacim 1000 mL olmak üzere pH'sı 7,0±0,2'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan besi ortamları 121°C'de 15 dk. otoklavda (Tomy-Sx 700E) steril edilmiştir.

3.1.3. Bakterilerin pigment üretiminde kullanılan besiyerleri

Çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* MB713 suşunun pigment üretimini indükleyen besiyerini bulmak için yapılan çalışmalarda NB (SIGMA) ve Frank and DeMoss (1959)'un besi ortamı modifiye edilerek kullanılmıştır (Frank ve DeMoss, 1959). Kullanılan MFDM (Modifiye Frank and De Moss) besi ortamı içeriği Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. *P. aeruginosa* MB713 pigment üretimini arttırmak için kullanılan MFDM besi ortamı

Maddeler	Miktar (g/L)
L-Fenilalanin	10,0
K ₂ HPO ₄	0,139
MgCl ₂ .6H ₂ O	4,06
K ₂ SO ₄	14,2
FeCl ₂	0,1
NaCl	0,5
Gliserol	20,0 mL/L

Çalışmada kullanılan *S. marcescens* MB703 suşunun pigment üretimini indükleyen besiyerini bulmak için yapılan çalışmalarda NB, %1 ve %2 oranında gliserol ile zenginleştirilmiş NB ve NA kullanılmıştır.

Her bir besiyeri için yukarıda belirtilen miktarlarda maddeler tartılıp, bir miktar distile su ile manyetik karıştırıcıda homojen hale gelinceye kadar karıştırılmış ve son hacim 1000 mL olmak üzere pH'sı $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. MFDM besi ortamı için pH $7,2 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyerleri otoklavda, 121 °C'de 15 dk. steril edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan serum fizyolojik (SF) çözeltisi ise %0,875 oranında NaCl'nin tartılarak saf su içerisinde çözdürülerek otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edilmesi ile elde edilmiştir.

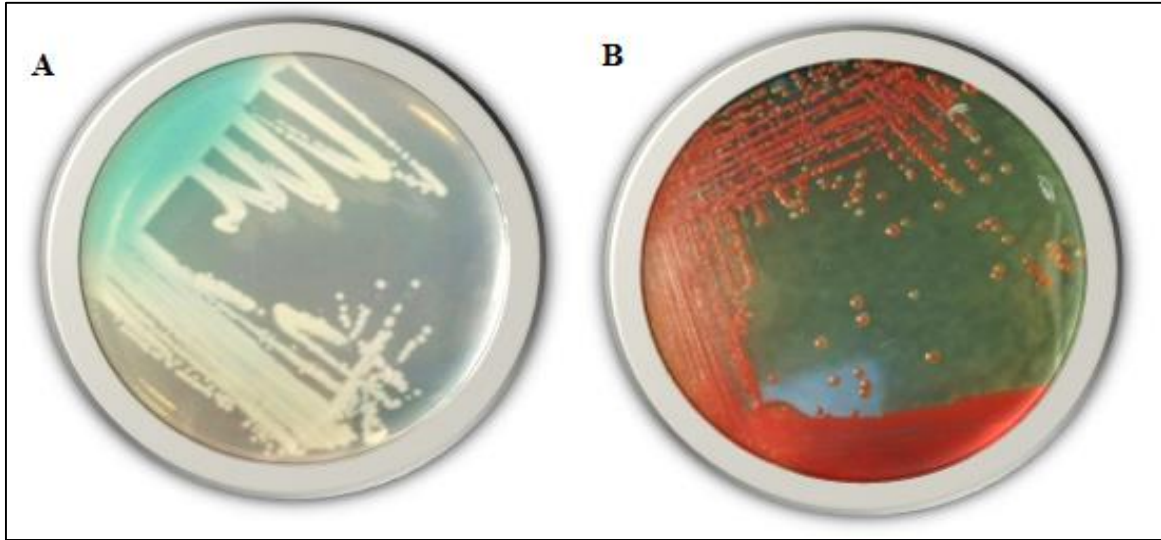
3.1.4. Çalışmada kullanılan hücre hatları

Çalışmada dört farklı hücre hattı kullanılmıştır. Kullanılan SHSY-5Y (insan nöroblastoma hücresi) hücre hattı Hacettepe Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Tuba

Tüylü Küçükılınç'tan temin edilmiştir. HT-29 (kolorektal adenokarsinoma hücresi) hücre hattı ise ATCC® HTB-38™ kodlu hücresidir. SK-MEL-30 (insan deri kanseri hücresi) hücre hattı ve L929 (fare fibroblast hücresi) hücre hattı ŞAP Enstitüsü'nden temin edilmiştir.

3.2. Mikroorganizmaların Gelişme Ortamları ve Aktifleştirilmesi

P. aeruginosa MB713 ve *S. marcescens* MB703 suşlarının geliştirilmesinde NB ve NA besi ortamları kullanılmıştır. Suşlar, NB içerisine %2 olacak şekilde ekilmiştir. *P. aeruginosa* MB713 suşu, 37°C'de 150 rpm'de (İnfors AG CH-4103 Bottmingen) 16-18 saat, *S. marcescens* MB703 suşu ise, 28°C'de 150 rpm'de 24-48 saat geliştirilmiş (Raypa/Incuberm/Dıgıt), geliştirilen kültürler en az iki kez aktifleştirilmiştir. İki kez aktifleştirilmiş kültürler, denemelere alınmadan önce canlı bakteri sayımları ve McFarland (Biosan Den-1) ayarlamaları yapılmıştır. Denemelere alınacak aktif bakterilerin optik yoğunlukları McFarland cihazında 8 (canlılık $\sim 10^8$ kob/mL)'e ayarlanarak, çalışmalara alınmıştır.



Resim 3.2. A. Nutrient Agar besi ortamında 37°C *P. aeruginosa* MB713 suşunun tek koloni ekimi B. Nutrient Agar besi ortamında 28°C'de *S. marcescens* MB703 suşunun tek koloni ekimi

3.2.1. Bakterilerin McFarland ayarlaması ve canlı hücre sayımları

McFarland ayarlaması

Çalışmada kullanılan bakterilerin optik yoğunluklarını ayarlamak amacıyla, bakteri suşları 5 mL besiyerinde 2 kez aktifleştirilmiştir. Sonrasında 4000 rpm’de santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve pellet 5 mL steril SF ile çözülerek tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılmış ve bu sayede aktif bakteri kültürünün besiyerinden arındırılması sağlanmıştır. Bu şekilde SF ile yıkama işlemi 2 kez gerçekleştirilmiş ve bakteri pelleti elde edilmiştir. Optik yoğunluğun ayarlanmasında içerisinde steril 5 ml SF bulunan cam tüpler kullanılmıştır. Öncelikle McFarland densitometre cihazında bu tüplerin okuma işlemi yapılmış ve sonrasında okunan değer üzerine bakterilerin yoğunlukları 8 olacak şekilde bakteri eklenmiştir. Optik yoğunluğu 8’e ayarlanmış bakteriler canlı hücre sayımının yapılabilmesi için aşağıda da anlatıldığı şekilde katı besi ortamlarına ekilmiştir.

Canlı hücre sayımı ve hesaplaması

McFarland densitometre cihazında optik yoğunlukları ayarlanmış olan bakteriler, seri dilüsyon yöntemiyle dilüe edilmiştir. Elde edilen 6 farklı dilüsyonun her birinden 100 µL alınarak, Bölüm 3.2’de verilen uygun katı besi ortamlarına drigalski ile yayma ekim yapılmıştır. Çalışmalar 3 paralelli olacak şekilde yürütülmüştür. 37°C’de 18-24 saat inkübasyona bırakılan petri kutularında oluşan koloniler sayılarak örneklerde canlı mikroorganizma sayıları belirlenmiştir (Gürgün ve Halkman, 1990). Her bakteri için 10^8 kob/mL canlı yoğunluğunu veren dalga boyu bu şekilde belirlenmiş olup tez süresince yapılan bütün çalışmalarda her bakteri suşu için belirlenen optik yoğunluklara göre deney çalışmaları sürdürülmüştür.

3.2.2. Mikroorganizmaların muhafazası

Bu tez çalışmasında kullanılan bakterilerin kültür stokları gliserol içinde -80°C’de derin dondurucuda, bakterilere ait ana stoklar ise liyofilize edilerek +4°C’de muhafaza edilmiştir. Bu iki muhafaza yöntemine ilişkin metotlar aşağıda verilmiştir.

Gliserol içerisinde muhafaza

2 mL'lik ağzı kapaklı cryo tüplere 900 µL gliserol konularak, otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edilmiştir. Gliserol içeren steril cryo tüplere 900 µL aktif kültür steril koşullarda ilave edilerek, bakteri suşları -80°C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar üç ayda bir yenilenmiştir (Strasser, Neureiter, Geppl, Braun ve Danner, 2009).

Liyofilizasyon yöntemi ile muhafaza

Bakterilerin liyofilizasyon yöntemi ile muhafazası literatürdeki metotlar modifiye edilerek uygulanmıştır (De Valdez, De Giori, De Ruiz Holgado ve Oliver, 1985; Cody ve diğerleri, 2008). Aktifleştirilen kültürlerden katı besi ortamına ekim yapılmış ve *P. aeruginosa* MB713 suşunun ekildiği petriler 37°C'de 18 saat, *S. marcescens* MB703 suşunun ekildiği petriler ise 28°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan koloniler, içerisinde 750 µL steril serum fizyolojik bulunan ependorflara aktarılacak (yaklaşık 50-60 koloni), pipetle homojenize edilmiştir. İçinde 750 µL steril Skimmed Milk Broth (LAB) bulunan vialler içerisine, bakteri süspansiyonundan 250 µL aktarılmıştır. Vialler -80°C'ye alınarak, 1 gece bekletilmiş ve ertesi gün liyofilizatör cihazında (Christ alpha 2-4 LD plus) liyofilize işlemine geçilmiştir.

3.2.3. 16S rRNA gen bölgesine göre moleküler tanımlama

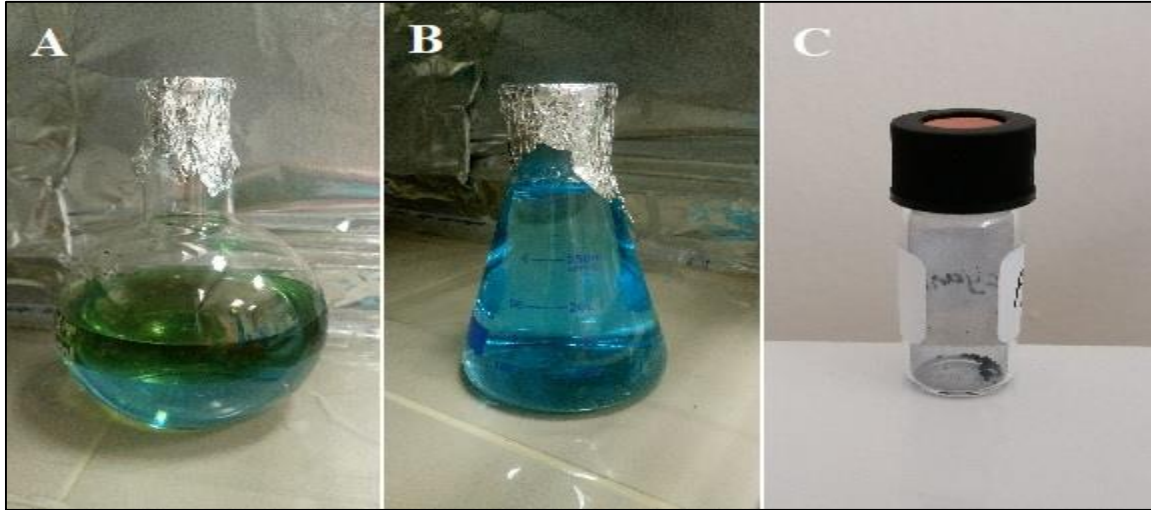
Çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* MB713 suşunun doğrulama tanımlamasında 16S rRNA gen bölgesi, universal primer olan 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') ve 1492R (5' GGTTACCTTACGACTT 3') primerleri ile çoğaltılmış, dizileme analizi sonrası NCBI (National Center for Biotechnology Information) Gen Bankası'nda, Blast (Basic Local Alignment Search Tool) programına göre yapılmıştır (Albertsen, Karst, Ziegler, Kirkegaard ve Nielsen, 2015). Gen dizisinin *S. marcescens*'e %98 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Accession Number: KY087984.1). *S. marcescens* MB703 suşunun tanımlaması ise, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'ndan Araş. Gör. Gözde KOŞARSOY AĞÇELİ tarafından yaptırılmıştır.

3.3. Pigmentlerin Kısmi Saflaştırması

Çalışmada, bakterilerden elde edilen piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin diğer çalışmalarda kullanımı ve karakterizasyonu için pigmentler kimyasal maddeler kullanılarak kısmi olarak saflaştırılmıştır ve saflaştırılma aşamasında uygulanan yöntemler aşağıda belirtilmiştir.

Piyosiyenin pigmentinin kısmi saflaştırması

Bu çalışmada NB besiyerinde aktifleştirilen *P. aeruginosa* MB713 suşunun aktif kültürlerinin optik yoğunlukları McFarland cihazında 8'e ayarlanarak, MFDm besiyerine %2 oranında aşılanmış ve 6 gün 30°C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. 6 gün inkübasyonun ardından etüvden alınan kültür 4200 rpm'de 25 dk. santrifüj edilmiştir. Pellet atılmış, süpernatant 0,45 µm milipore filtreden geçirilmiştir. Filtreden geçirilen süpernatanta, 1:2 oranında kloroform (Merck) eklenmiş ve karanlıkta 2 saat beklemeye alınmıştır. Oluşan 2 fazdan piyosiyenin içeren alttaki mavi kloroform fazı alınarak %20 oranında %37 saflıktaki 0,2 M HCl (Merck) ile muamele edilmiştir. Asitle muamele işlemi sonucunda, üstte piyosiyenin pigmentinin toplandığı kırmızı bir faz elde edilmiştir. Bu faz toplanmış ve mavi renge dönene kadar, 0,4 M Borat-NaOH tamponuyla (Ph 10) karıştırılmıştır. Bazik mavi çözelti tekrar 1:2 oranında kloroformla 2 saat muamele edilerek, piyosiyenin pigmentinin saf halde elde edilmesi sağlanmıştır. Saf mavi renk elde edildikten sonra, kloroform 45 °C'de, düşük basınçta dönen evaporatörde (Heidolph, Laborota 4000) uçurularak toz halinde piyosiyenin pigmenti elde edilmiş (Alzahrani ve Alqahtani, 2016), piyosiyenin pigmentinin saflaştırma aşamasındaki görüntüleri Resim 3.3'te verilmiştir.



Resim 3.3. Piyosianin pigmentinin eldesi A. Süpernatantın kloroform ile muamelesi sonucunda oluşan faz ayrımı B. Piyosianin pigmentinin bulunduğu mavi renkli kloroform fazı C. Piyosianin içeren kloroform fazının evaporatörde uçurularak toz haline getirilmiş görüntüsü

Prodigiosin pigmentinin kısmi saflaştırması

Çalışmada kullanılan *S. marcescens* MB703 suşu, NB besiyerinde 28°C’de 150 rpm’de 24 saat inkübasyon ile aktifleştirilmiş ve ardından aktif kültürlerin optik yoğunlukları McFarland cihazında 8’e ayarlanmıştır. Bu aşamadan sonra yoğunlukları ayarlanan bakteri suşları NB besi ortamına %2 oranında aşıl原因arak, 28°C’de 150 rpm’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bakteri kültürlerinden 100 µL alınarak, NA’a yayma ekim yapılmış ve 5 gün 28°C’de inkübasyona bırakılmıştır. 5 gün inkübasyonun ardından petrilerden 1 g koloni toplanarak, %96’lık 20 mL etanolde (Merck) sonikatörle renksiz pellet elde edilene kadar çözdürülmüştür. Pembe renkli etanol-örnek çözeltisi +4°C’de 10.000 rpm’de 20 dk. santrifüj edilmiştir. Renksiz pellet atılarak, süpernatant 45°C’de düşük basınçta dönen evaporatörde (Heidolph, Laborota 4000) uçurulmuştur (Xu, Xia ve Yang, 2011). Pigmentin evaporatörle çözücünden uzaklaştırılmış hali Resim 3.4’de verilmiştir.



Resim 3.4. Prodigiosin pigmentinin evaporatörde uçurularak toz haline getirilmiş görüntüsü

3.3.1. Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin miktarlarının belirlenmesi

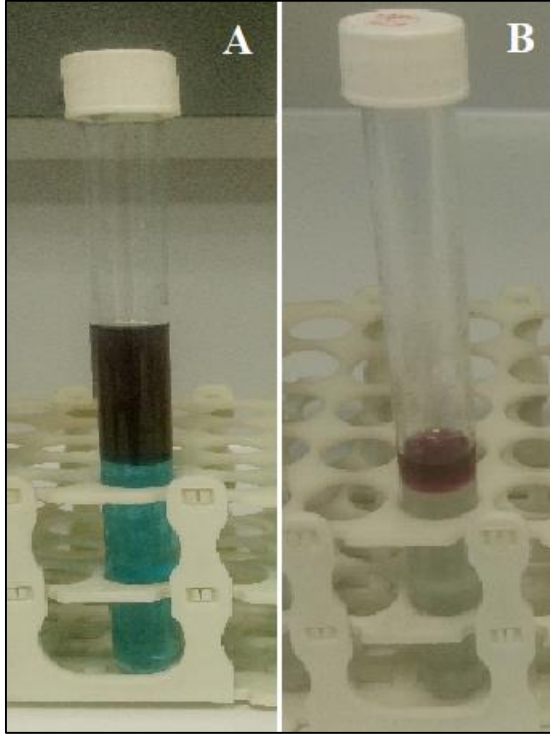
Piyosiyanin pigmentinin miktar tayini

MFDM besiyerine ekilmiş *P. aeruginosa* MB713 suşunun ürettiği piyosiyanin pigmentinin miktarları 1-7 gün inkübasyon süresince spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bu çalışma sonunda, *P. aeruginosa* MB713 suşunun piyosiyanini maksimum miktarda ürettiği inkübasyon süresi ve bundan sonraki piyosiyanin pigmenti ile ilgili çalışmalarda bu inkübasyon süresi kullanılacaktır. Bakteri suşunun, pigmenti maksimum verimde, 6 günlük inkübasyonda ürettiği tespit edilmiştir. 1-7 gün inkübasyon süresi sonunda pigment saflaştırılmıştır. İki kez aktiveştirilmiş kültür (McFarland 8), 50 mL MFDM besiyerine ekilerek, 1-7 gün 30°C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından 5 mL kültür örneği 4200 rpm de 25 dk. santrifüj (Nüve) edilmiş ve 0,45 µm milipore filtreden geçirilerek, 1:2 oranında kloroform ile 2 saat muamele edilmiştir. Kloroform ile muamelenin ardından, %20 oranında, %37 saflıkta 0,2 M HCl ile karıştırılan kloroform fazının üst kısımda kırmızı renkte oluşan üst faz alınarak (Resim 3.6), 520 nm'de spektrofotometre (Hitachi) ile optik yoğunluğu ölçülmüş, aşağıda verilen formüle göre piyosiyanin pigmentinin miktarı µg/mL olarak hesaplanmıştır (Alzahrani ve Alqahtani, 2016; Abo-Zaid, Wagih, Matar, Ashmawy ve Hafez, 2015; El-Fouly, Sharaf, Shahin, El-Bialy ve Omara, 2015).

Piyosiyanin $\mu\text{g/mL} = \text{OD}_{520} \times 17,072$

OD_{520} : Piyosiyanin pigmentinin toplandığı asidik kırmızı fazın 520 nm'deki değeri

17,072: Katsayı (Alzahrani ve Alqahtani, 2016)



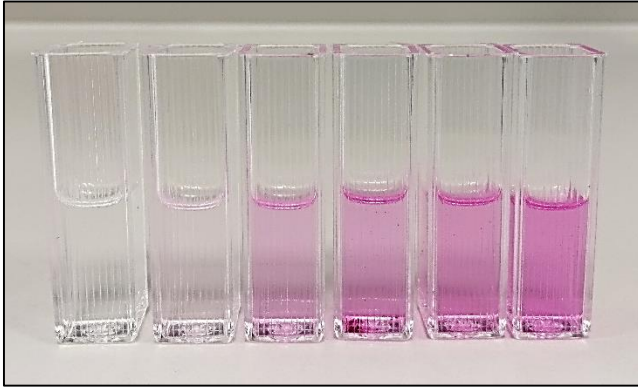
Resim 3.5. Piyosiyanin pigmentinin miktar tayinindeki fazlar. A. Piyosiyanin pigmentinin kloroformla muamele edilmiş kültür ortamı B. Piyosiyanin pigmentinin toplandığı asidik kırmızı faz

Prodigiosin pigmentinin miktar tayini

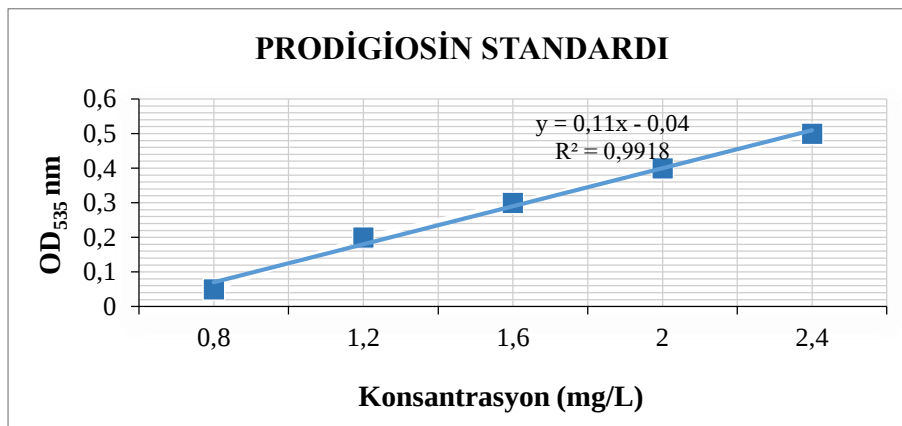
McFarland cihazında optik yoğunluğu 8'e ayarlanan *S. marcescens* MB703 suşu NB besiyerine ekilerek 150 rpm'de 28°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu şekilde aktifleştirilen bakteriler NA'a yayma ekim yapılarak, 7 gün 28°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında oluşan koloniler, 1 g olacak şekilde toplanmış ve 20'şer mL etanol içerisine alınarak çözülmüştür. Sonrasında 10 dk. sonikatörle pellet renksizleşene kadar muamele edilmiştir. Elde edilen pembe renkli etanol çözeltisi 10.000 rpm'de 20 dk. +4°C' de santrifüj edilmiş ve 0,45 μm milipore filtreden geçirilmiştir. Filtrasyon sonrası 1 M HCl'den %10 oranında eklenerek asitle muamele edilen filtrat, litredeki prodigiosin miktarı miligram cinsinden Şekil 3.1'de verilen standarda göre hesaplanmıştır (Elmenshawey, Abdelrazak, Mowafey ve Osman, 2017).

3.3.2. Prodigiosin standardı hazırlanması

Prodigiosin miktarının mg/mL olarak hesaplanabilmesi amacıyla prodigiosin standardı hazırlanmıştır. Bu standart, 0,8-2,4 mg/L arasında değişen oranlarda prodigiosin eklenen %90'lık etanol-su (pH 3,0) çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır (Resim 3.5). Elde edilen pigment çözeltileri, mikroküvetlere alınarak spektrofotometrede 535 nm'de absorbans değerleri ölçülmüş, bu değerlere göre grafik oluşturularak formül elde edilmiştir (Şekil 3.1). Prodigiosinin okunan absorbans değerleri kullanılarak pigment miktarı standart formüle ($y = 0,11x - 0,04$) göre mg/mL olarak hesaplanmıştır (Gong, Ren, Fu, Li ve Zhang, 2017; Heinemann, Howard ve Palocz, 1970).



Resim 3.6. Etanol-su çözeltisi ile prodigiosinin konsantrasyona bağlı oluşan renk skalası



Şekil 3.1. Prodigiosin standart eğrisi

3.4. TLC (Thin Layer Chromotography) ile Piyosiyanin ve Prodigiosin Pigmentlerinin Saflık Kontrolleri

3.4.1. Piyosiyanin pigmentinin ince kolon kromatografisi (TLC)

Fermentasyon süresi sonunda besi ortamı 5000 rpm’de 10 dk. 4°C’de santrüfuj edilmiştir. Hüresiz süpernatant ayırma hunisine alınmış ve üzerine 1:1 oranında kloroform ilave edilmiştir. Çalkalamadan sonra alt renkli kloroform fazı ayrı behere alınmış ve işlem 3 kez tekrarlanmıştır. İnce tabaka kromatografisinde yürütücü olarak kloroform kullanılmıştır. TLC’den mavi renkli tabaka kazanmış ve metanolde çözünmüştür (Cheluvappa, 2014).

Rf değeri (yürüme hızı) : 0,7

3.4.2. Prodigiosin pigmentinin ince kolon kromatografisi (TLC)

Fermentasyon süresi sonunda besi ortamı 5000 rpm’de 10 dakika 4°C’de santrüfuj edilmiştir. Hüresiz süpernatant uzaklaştırılmış ve altta kalan biyomas üzerine methanol (veya etanol/aseton) ilave edilmiştir. Karışım hızlıca çalkalandıktan sonra 60°C su banyosunda 5 dk. bekletilmiştir. Süre sonunda karışım 5000 rpm’de 10 dakika 4°C’de santrüfuj edilmiş ve bu işlem biyomasların renksiz hale gelinceye kadar tekrarlanmıştır. Elde edilen pigment çözeltisi TLC sisteminde butanol:hekzan (2:1) yürütücü olarak kullanılmıştır (Patil, Patil, Salunke ve Salunkhe, 2011). Pigment yürütücü sisteminden kazanmış ve metanolde çözünerek elde edilmiştir.

Rf değeri (yürüme hızı) : 0,9

3.5. Piyosiyanin ve Prodigiosin Pigmentlerin Karakterizasyonu

Pigmentlerin karakterizasyonu amacı ile UV-Visible spektrofotometresi, FT-IR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) spektroskopisi ve GC-MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi) analizleri yapılmıştır. UV-visible spektrofotometresi ile moleküllerin veya inorganik iyon ve komplekslerin ölçümünün yapılması, FT-IR spektroskopisi ile moleküler bağ karakterizasyonu yapılarak, organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel grupların ve yapıdaki bağların ortaya konması, GC-MS ile, gaz

kromatografi kolonunda ayrılan maddelerin teşhisi, tayini, yapı analizi ve bu maddelerin kütlelerine göre belirlenmesi amaçlanmıştır.

3.5.1. Spektrofotometrik analiz

Kuru halde bulunan piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin UV-Visible spektrofotometrik analizi, Düzce Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (DÜBİT)'ne hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. Pigment örnekleri, etanol ve su içerisinde çözündürülerek 200-800 nm aralığındaki Shimadzu UV-1800 spektrofotometre kullanılarak, pigmentlerin maksimum absorpsiyonu ölçülmüştür (Suryawanshi ve diğerleri, 2014).

3.5.2. FT-IR ile analiz

Piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin FT-IR (Fourier transform infrared spectrophotometer) spektrofotometre analizi, Düzce Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (DÜBİT)'ne hizmet alımı şeklinde yaptırılmış ve analizde Shimadzu IR prestige 21 cihazı kullanılmıştır. Analiz, Suryawanshi ve diğerleri (2014)'nin kullanmış oldukları metot modifiye edilerek gerçekleştirilmiş ve 3500 ile 750 cm^{-1} nm dalga boyu arasında tarama yapılmıştır.

3.5.3. GC-MS ile analiz

Piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin bileşik içerik analizlerinin gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile tayini, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ne hizmet alımı şeklinde yaptırılmış ve analizde Agilent GC-MSD 5975C Inert MSD with Triple-axis detector cihazı kullanılmıştır.

GC-MS analizi 100 mg pigment örneği 1 mL etanolde çözündürülerek hazırlanan standarda göre yapılmıştır. Sıcaklık koşulları şöyledir: Başlangıç sıcaklığı 65°C'dir. Dakikada 6°C'lik bir artış hızı ile 65°C'den 250°C'ye çıkartılmıştır. 30 dakika 250°C'de bekletilmiştir. Enjektör sıcaklığı 220°C'dir ve helyum, 1,5 mL/dk.'lık bir akış hızında taşıyıcı gaz olarak kullanılmıştır. Analizde HP-INNOWAX MS kolonu (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) kullanılmıştır. Bileşikler, kütle spektrum kütüphanesi (WILEY7 ve NIST) veri tabanının

standart referans spektrumlarıyla karşılaştırarak tanımlanmıştır (Abdul-Hussein ve Atia, 2016).

3.6. Piyosiyenin ve Prodigiosin Pigmentlerinin Biyolojik Etkinlik Testleri

3.6.1. Çalışmalarda kullanılan hücre hatları, hücrelerin geliştirilmesi ve muhafazası

Çalışmada kullanılan piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin nörolojik hasara veya Alzheimer Hastalığı'na karşı koruyucu etkisine bakmak için Hacettepe Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Tuba Tüylü Küçükkılınç'tan temin edilen insan nöroblastoma hücresi (SHSY-5Y), antiproliferatif etkisine bakmak için ATCC® HTB-38™ kodlu insan kolon kanseri hücresi (HT-29) ve ŞAP Enstitüsü'nden alınan insan deri kanseri hücresi (SK-MEL-30), deri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini ve bu pigmentlerin tekstil ürünlerinde kullanımı durumunda deride toksik etkilerinin olup olmadığının belirlenmesi ve toksik etkileri varsa toksik olmayan konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla ŞAP Enstitüsü'nden temin edilen sağlıklı fare derisi hücresi (L929) kullanılmıştır.

SHSY-5Y ve HT-29 hücre hatlarının geliştirilmesi ve ortam koşulları

Çalışmada kullanılan insan nöroblastoma hücresi (SHSY-5Y) ve insan kolorektal adenokarsinoma kanser hücresi (HT-29), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (SIGMA) (Invitrogen) içerisine %10 fetal bovin serumu (FBS, SIGMA), %1 L-Glutamin (SIGMA), %1 antibiyotik (penisilin/streptomisin, SIGMA) ve %40 MCDB-201 (SIGMA) katılarak hazırlanmış besi ortamı içerisindeki flasklarda, 37°C'de %5 CO₂ bulunan inkübatörde (Sanyo) 18 saat inkübasyona bırakılarak geliştirilmiştir. Hücre besi ortamı iki günde bir değiştirilerek, hücrenin gelişimi izlenmiştir. Flasklarda %90'a yakın yayılma gösteren hücreler Tripsin/EDTA (%0,2 / %0,04) (Invitrogen/GIBCO) ile kaldırılarak tripan mavisi testi ile sayılmıştır. Hücre sayımı thoma lamı (hemositometre) adı verilen 1 mm² alana ve 0,1 mm derinliğe sahip 4x16 küçük kareden oluşan özel sayım lamaları kullanılarak ışık mikroskopunda gerçekleştirilmiştir. Hücre süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır. Çalışmanın amacına göre belirli sayıda hücre, 96'lık plaklara (10⁴ hücre/kuyu) ve 6'lık plaklara (10⁵

hücre/kuyu) aktarılarak 37°C’de, %5 CO₂’li etüvde inkübasyona bırakılmıştır (Hadjiakhoondi ve diğerleri, 2013) .

Toplam hücre sayısı/mL = Sayım sonucu x Seyreltme faktörü x 10⁴ x Besiyeri miktarı (mL)

L929 ve SK-MEL-30 hücre hattının geliştirilmesi geliştirilmesi ve ortam koşulları

Çalışmada kullanılan fare fibroblast hücresi (L929) için, DMEM içerisine %10 FBS ve %1 antibiyotik (penisilin/streptomisin) katılarak, besi ortamı hazırlanırken, SK-MEL-30 hücre hattı için ise, L929 hücre hattı besi ortamına %1 nonessential amonoasit (SIGMA) katılarak besi ortamları hazırlanmıştır. Uygun hücreler, flasklarda 37°C’de, %5 CO₂ bulunan etüvde, 18 saat inkübasyona bırakılarak geliştirilmiştir. Hücre besi ortamı iki günde bir değiştirilerek hücrelerin gelişimi izlenmiştir. Flasklarda %90’a yakın yayılma gösteren hücreler Tripsin/EDTA (%0,2 / %0,04) ile kaldırılarak, yukarıda verildiği gibi hücre sayımları medium ortamında yapılmış ve çalışmanın amacına göre belirli sayıda hücre, 96’lık plaklara (10⁴ hücre/kuyu) ve 6’lık plaklara (10⁵ hücre/kuyu) aktararak çalışmaya alınmıştır (Athira ve Jyothi, 2015; Szatrowski ve Natan, 1991).

Hücre hattının muhafaza edilmesi

Tüm hücreler, hücre mediumuna %1 dimetil sülfoksit (DMSO) (K44917943 346-Millipore, ABD) eklenerek hazırlanmış ve 0,22 µm filtreden geçirilerek besi ortamına ekilmiştir. Sonrasında 1 gün -80°C’de bekletilerek, sıvı nitrojen tankına (Cryogenics) alınmış ve bu şekilde muhafaza edilmiştir.

3.6.2. Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin SHSY-5Y ve L929 hücre hatlarında sitotoksik, SK-MEL-30 ve HT-29 hücre hatlarında ise antiproliferatif etkilerinin belirlenmesi

Bu çalışmada, pigmentlerin farklı konsantrasyonlarda, SHSY-5Y ve L929 hücrelerinde sitotoksik, SK-MEL-30 ve HT-29 hücrelerinde de antiproliferatif etkileri olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, bir diğer amaç ise, toksisitede toksik etki belirlenirse toksik olmayan (veya düşük düzeyde toksik olan), antiproliferatif etkinin belirlendiği çalışmalarda da yüksek antiproliferatif etkinin tespit edildiği uygulama koşullarının ortaya konmasıdır.

MTT testi ile hücre canlılığının ve antiproliferatif etkinin belirlenmesi

Çalışmada, uygulama yapılan hücrelerin canlılığı 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) testi ile belirlenmiştir. Hücre canlılığının, sitotoksitenin ve antiproliferatif etkinin kolorimetrik ölçümüne dayanan MTT testi, canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan mitokondriyal dehidrojenaz enzimleri, tetrazolium tuzu olan MTT'yi parçalayarak formazan kristalleri formuna dönüştürmesi esasına dayanmaktadır. Bu kristaller DMSO ile çözüldüğünde meydana gelen mor renkli çözeltinin spektrofotometrik ölçümü yapılır. MTT, sadece canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan aktif enzimler ile parçalanacağı için, bulunan absorbans değerleri canlı hücre oranları hakkında bilgi vermektedir (Freimoser, Jakob, Aebi ve Tuor, 1999). MTT testi, Dai ve diğerleri (2018) tarafından kullanılan metotta miktar değişikliği yapılarak çalışılmıştır.

Hücreler, 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu plaklara ekildikten sonra plakalara yapışmaları için 18 saat 37°C 'de, %5 CO_2 'li etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyulardaki hücrelere, hücre besiyeri içinde çözünerek 10-100 μM derişimlerde ayarlanmış 200 μL hacimde piyosiyanin ve prodigiosin pigmentleri uygulanmış ve 37°C 'de, %5 CO_2 'li etüvde 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak uygulama yapılmamış hücre hatları kullanılmıştır. İnkübasyondan sonra MTT (SIGMA) çalışması yapılmıştır. Bu metoda göre, 20 μL MTT solüsyonu (5 mg/mL, PBS içinde) (SIGMA), hücrelerin bulunduğu kuyulara eklenmiş ve 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyular boşaltılıp 200 μL DMSO eklenerek 30 dk. karanlıkta bekletilmiştir. Optik yoğunluk, 570 nm'de ELISA mikrolaka okuyucuda (Epoch BioTech) kolorimetrik olarak ölçülmüş, hücre kültürü kontrol grubunda ölçülen absorbans değeri % 100 canlı olarak kabul edilmiş ve diğer hücre gruplarındaki yüzde canlılıklar da bu değerden hareketle aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Kim ve diğerleri, 2006). ABD'deki NCI bitki tarama programına göre, ham ekstraktın genellikle *in vitro* sitotoksik aktivitesi, IC_{50} değeri ≤ 20 $\mu\text{g/mL}$ olarak dikkate alınmaktadır. Bir ekstraktın IC_{50} değerinin ≤ 20 $\mu\text{g/mL}$ olması, o ekstraktın herhangi bir hücre hattına karşı yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Sriwiriyan, Ninpesh, Sukpondma, Nasomyon ve Graidist, 2014).

$$\% \text{ Canlılık} = [(A1 / A2) \times 100]$$

A1= Örnek çözeltilerinin 570 nm dalga boyundaki absorbansı

A2= Kontrol çözeltilerinin 570 nm dalga boyundaki ortalama absorbansı

3.6.3. Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin *in vitro* ve hücrel AChE inhibisyon etkisinin belirlenmesi

Bu çalışmada, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların belirteci olan AChE enzim aktivitesinin artışı üzerinde piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin baskılayıcı etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma iki farklı deneyle test edilmiştir. Her iki pigmentin AChE etkisi Ellman yöntemine göre *in vitro* olarak test edilmiştir. Ayrıca, SHSY-5Y hücrelerinde H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif hasar modeli ile indüklenen AChE enziminin, piyosiyanin ve prodigiosin pigmentleri ile inhibisyon düzeyi hücrel AChE inhibisyon etki deneyi ile belirlenmiştir.

1. Yöntem: *in vitro* AChE inhibisyon etkisinin Ellman yöntemi ile belirlenmesi

Enzim kaynağı olarak elektrikli yılan balığı AChE'si (SIGMA) kullanılırken, substrat olarak asetilkolin iyodür, renklendirici madde olarak ise 5,5'-Ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit (DTNB) kullanılmıştır. 96 kuyucuklu mikropolanın her birine 100 µL 0,1 mM fosfat tamponu (pH 7,0), 100'er µL 10, 25, 50, 75 ve 100 µM derişimlerdeki piyosiyanin ve prodigiosin pigment çözeltileri ve 20 µL AChE çözeltisi ilave edilip, mikropalakalar 25°C'de 15 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerini içermeyen çözücü kullanılmıştır. 7,5 mg NaHCO₃ içeren 5 mL 0,1 M fosfat tamponunun içerisinde 19,8 mg DTNB çözündürülmüştür. DTNB çözeltisi 1/8 oranında 0,1 M fosfat tamponu (pH 8,0) ile seyreltilmiştir. Kuyulara, sulandırılan DTNB çözeltisinden 50'şer µL eklenmiştir. dH₂O ile hazırlanmış 21,7 mg/mL asetilkolin iyodür çözeltisi, 1/40 oranında 0,1 mM fosfat tamponu (pH 8) ile seyreltilmiştir. Kuyulara, seyreltik asetilkolin iyodür çözeltisinden 50'şer µL eklenerek tepkime başlatılmıştır. Mikropalaka, 25°C'de, karanlıkta 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Asetilkolin iyodür hidrolizi, DTNB'nin tiokolinlerin reaksiyonu sonucu oluşan sarı renkli 5-thio-2-nitrobenzoat oluşumundan gözlenmiştir. AChE enzim inhibisyonu, mikropale okuyucuda (Epoch Take 3 Plate reader) 412 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleriyle belirlenmiş ve % AChE inhibisyonu olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Ellman, Courtney, Andres Jr ve Featherstone, 1961).

$$\%AChE \text{ İnhibisyon} = 1 - [(A1 / A2) \times 100]$$

A1= Örnek çözeltilerinin 412 nm dalga boyundaki absorbansı

A2= Kontrol çözeltilerinin 412 nm dalga boyundaki ortalama absorbansı

2. Yöntem: Pigmentlerin H₂O₂ ile indüklenmiş hücresel AChE inhibisyon etkisinin belirlenmesi

Bu çalışma, ön çalışma olarak yapılan *in vitro* AChE aktivitesi ölçümünün hücre modeli üzerinde çalışılarak daha doğru sonuçlar elde etmek amacıyla yapılmıştır. *In vitro* AChE çalışması laboratuvar koşullarında gerçekleştirilen ve birebir doğru veriler vermeyen bir çalışma olduğundan ötürü, hücresel AChE çalışmasında model hücre olarak kullanılan SHSY-5Y hücrelerine yapılan uygulamalar, çevre koşullarından etkilendiği için daha doğru veriler elde etmemizi sağlamaktadır.

Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin H₂O₂'nin oluşturduğu oksidatif hasara bağlı AChE enzim indüklenmesine karşı koruyucu etkisini test etmek için model hücre olarak nöral kökenli olması nedeniyle SHSY-5Y hücre hattı kullanılmıştır (Shipley, Mangold ve Szpara, 2016). Bu çalışmada, hücrede 150 µM H₂O₂ uygulamasıyla oksidasyon modeli oluşturulmuştur. Kuyulara 1x10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde hücreler ekilmiştir. Ekilen hücreler, kuyulara tutunmaları için 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından kontrol grupları dışındaki tüm kuyulara, hücre besiyeri ile hazırlanmış 2 mL 10-100 µM konsantrasyon aralığında pigment uygulanmıştır. Pigment uygulanan hücreler 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda pigmentli besiyerleri uzaklaştırılmış, SHSY-5Y hücrelerine besiyeri ile hazırlanmış 2 mL 150 µM H₂O₂ uygulanarak, uygulama yapılmış hücreler tekrar 37°C'de, %5 CO₂'li etüvde 18 saat inkübe edilmiştir. Uygulama gruplarında toplam protein izolasyonu yapılmış, daha sonra Ellman yöntemi kullanılarak AChE seviyeleri belirlenmiştir. Bu çalışmada iki kontrol grubu kullanılmıştır. İlk kontrol grubunda, yalnızca hücre besi ortamında geliştirilmiş hücreler, ikinci kontrol grubunda ise, H₂O₂ uygulanmış hücre besi ortamı içerisinde geliştirilmiş hücreler kullanılmıştır. Hücreler, AChE indüklenmiş hücrelerde piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin koruyucu etkisinin belirlenmesi için bu şekilde hazırlanmıştır. AChE inhibisyon oranı, Ellman yöntemine göre 412 nm dalga boyunda optik yoğunlukları okunmuş ve hesaplanmıştır (Ellman, Courtney, Andres ve Featherstone, 1961). Kontrole göre enzim inhibisyonu, % AChE inhibisyon formülüne göre hesaplanmıştır (Schwartz, Blundon ve Adler, 2007).

$$\%AChE \text{ İnhibisyon} = 1 - [(A1 / A2) \times 100]$$

A1= Örnek çözeltilerinin 412 nm dalga boyundaki absorbansı

A2= Kontrol çözeltilerinin 412 nm dalga boyundaki ortalama absorbansı

3.6.4. Piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin SHSY-5Y hücresinde H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif hasarla lipid peroksidasyon ürünü (Malondialdehit) seviyesinin belirlenmesi

Çalışmada, oksidatif hasarla ilişkili hücre içi Serbest Oksijen Türleri'nin, hücre membran lipidlerini oksidasyona uğratarak lipidlerden, toksik bir ürün olarak üretilen malondialdehid (MDA)'ın miktarı tespit edilmiştir. Bu doğrultuda, SHSY-5Y hücrelerine 150 µM H₂O₂ uygulanarak, hücrelerde oksidatif hasar oluşturulmuş ve hasara uğrayan hücreler model olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada, oksidatif hasar sonucu artan MDA oluşumunun, piyosiyenin ve prodigiosin tarafından baskılanıp baskılanmadığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, SHSY-5Y hücreleri, 6 kuyucuklu plaklara 1x10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelere 18 saat 10, 25, 50, 75 ve 100 µM pigment uygulamasının ardından 150 µM H₂O₂ içeren besiyeri 18 saat uygulanmıştır. Uygulama yapılmamış SHSY-5Y hücre grubu kontrol olarak çalışma gruplarına dahil edilmiştir. Oksidatif hasar yaratılarak oluşturulan model hücre grubundaki MDA miktarı kontrol grubuna göre hesaplanmıştır. Pigment uygulanmış gruplardaki MDA miktarları ise model hücre grubuna göre hesaplanmıştır. Uygulamanın sonunda hücrelerdeki MDA seviyesinin belirlenmesi, MDA (Malondialdehyde) ELISA Kit (EU2577; FineTest; Çin) kullanılarak üretici firma talimatları doğrultusunda yapılmıştır. Sonuçlar, 450 nm'de ELISA'da okuma yapılarak hesaplanmıştır. Deney 3 paralelli ve 2 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

3.6.5. Piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin antioksidan etkilerinin belirlenmesi

Bu çalışmada piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin hem antikanser hem de Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu özellikleri bakımından önemli olacak antioksidan etkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Çalışmada her iki pigmentin (10-100 µM) SOD ve CAT enzimleri üzerine etkisi kanser hücrelerinden SK-MEL-30 ve HT-29 hücre hatlarında, sinir hücresi olarak da SHSY-5Y hücre hattında çalışılmıştır. Hücrelere, 10-100 µM piyosiyenin ve prodigiosin pigmentleri uygulanarak 18 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından pigmentli besiyerleri uzaklaştırılmış, hücrelere besiyeri ile hazırlanmış 2 mL 150 µM H₂O₂ uygulanmış ve 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hiçbir uygulama yapılmamış besiyeri içinde geliştirilen hücre kültürü kontrol olarak kullanılmıştır. Hücrelerden toplam protein elde edebilmek için, uygulamaların ardından hücreler soğuk 1xPBS ile yıkanmıştır. Bütün PBS çekildikten sonra 1 mL soğuk çözme

tamponu, direk hücrelerin üzerine uygulanmıştır. Deneyler 3 paralelli ve 2 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Farklı derişimlerdeki piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin SHSY-5Y, SK-MEL-30 ve HT-29 hücreleri üzerindeki antioksidan etkisinin belirlenmesi için SOD enzim aktivitesi Cayman Kits, USA # 706002 kiti kullanılarak 440-460 nm’de mikropate okuyucuda okunmuş ve U/mL cinsinden hesaplanmıştır. CAT enzim aktivitesi ise, Cayman Kits, USA # 707002 kiti kullanılarak 540 nm’de mikropate okuyucuda okunmuş ve $\mu\text{mol/mL}$ olarak hesaplanmıştır (Saritaş, Uyanık ve Hamurcu, 2011).

3.7. Elde Edilen Pigmentlerin Endüstriyel Uygulamaları

Gıda uygulamaları

Bu çalışmada, elde edilen piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin renk stabilitelerini koruyup korumadığını ve renklendirici olarak kullanıldığında gıdaya rengini ne kadar yoğunlukta verebildiğinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda piyosiyenin pigmenti için 100 μM ve prodigiosin pigmenti için 100 μM sulu çözeltiler hazırlanmıştır. Renk stabilitesi çalışması için 5 mL’lik 100 μM piyosiyenin ve 100 μM prodigiosin çözeltisine %3 agar eklenerek bu çözeltiler 100 ve 121°C’de 15’er dk. kaynatılmış ve oda sıcaklığında katılaşmaya bırakılmıştır.

Gıda uygulamalarında değerlendirebilmek amacıyla çalışmada şeker hamuru kullanılmıştır. 100, 1000 ve 2000 μM olmak üzere sulu çözeltileri hazırlanan prodigiosin pigmentinin her çözeltisinden 0,5 ml alınarak, 3 gram olacak şekilde tartılmış olan şeker hamurlarına ilave edilmiştir. Pigmentler eşit oranda dağılına kadar şeker hamurları el ile yoğurulmuştur.

Kumaş uygulamaları

Bu çalışmada, elde edilen piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin, kumaşta boyar madde olarak kullanımının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, Gulani, Bhattacharya ve Das (2012)’nin uyguladıkları metotta kullanılan çözücü ve durulama yöntemlerinde değişiklikler yapılarak metot modifiye edilmiştir. Kullanılan piyosiyenin pigmenti 4000 μM ve prodigiosin pigmenti ise 100, 1000, 2000 ve 4000 μM derişimlerde sulu çözelti olarak hazırlanmış, 50 mL’lik falkonlara alınmıştır. Boya tutuculuğunun artırılması için pigment çözeltilerine 2,5 g NaCl ilave edilmiştir. Boya tutuculuğunun daha iyi olduğu

bilinen pamuklu kumaşlardan 5x5'lik parçalar kesilerek, 50 mL'lik çözeltilerin içerisinde 48 saat muamelenin ardından, boyanmış olan kumaşlar 30 saniye kadar %10'luk sirkeli suda kaynatılmış, boyanın kumaşa tutunması sağlanmıştır. Kaynatma işleminin ardından kumaşlar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır (Gulani, Bhattacharya ve Das, 2012).

Kozmetik uygulaması

Bu çalışmada, elde edilen prodigiosin pigmentinin kozmetikte kullanımının ortaya konması amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan 2 mL prodigiosin pigmenti Shaikh (2016) metoduna göre şeffaf ojeye uygulanmıştır.

3.8. İstatistiksel Analizler

Tüm çalışmalarda, her çalışma için paralel sayısı değişmekle birlikte bakteri gelişimi, pigment üretimi ve pigment miktar tayini çalışmaları 3 paralelli ve iki tekrarlı, hücre çalışmaları ise, 5 paralelli (bazı çalışmalarda 9 paralelli) ve iki tekrarlı olarak yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen veriler, bu tekrarların ortalaması, $\pm$ SD (standart sapma) şeklinde verilmiştir. Çalışma sonuçları SPSS 16.0 programı kullanılarak, istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Farklı derişimlerdeki pigment uygulamalarının gruplar arasındaki sitotoksisite, antiproliferatif, AChE inhibisyon ve antioksidan etkileri arasındaki farklılık, Tek Yönlü Anova (One Way ANOVA) Post Hoc Tukey HSD testi ile belirlenmiştir. Tüm deneylerde uygulama gruplarının kontrol grubu ile arasındaki farklılık ve pigmentlerin gruplar arasındaki sitotoksisite, antiproliferatif, AChE inhibisyon ve antioksidan etkileri arasındaki farklılık t-testi ile analiz edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık 0,95 önem düzeyinde, $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

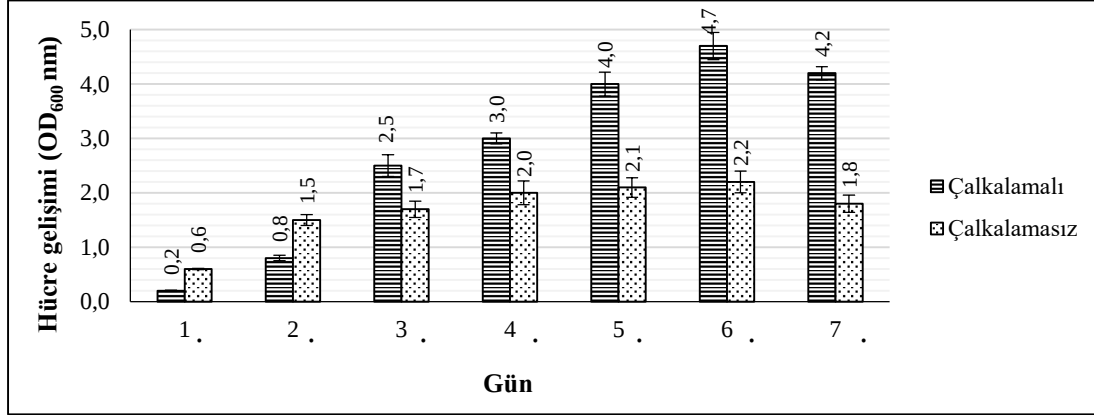
4.1. Çalışmada Kullanılan Bakterilerin Gelişim Eğrileri ve Suşların Canlılık Miktarları

Bu çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* MB713 ve *S. marcescens* MB703 suşlarının öncelikle en iyi gelişim koşulları test edilmiş ve bu koşullarda ürettiği pigmentlerin miktarlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, suşların besi ortamları ve çalkalamalı-çalkalamasız koşullarda (*P. aeruginosa* MB713 suşu için) gelişim süreleri belirlenmiştir. Çalışmalar sonunda denenen koşullarda, spektrofotometrik olarak optik yoğunlukları ve kob/mL olarak canlılıkları belirlenmiş ve sonuçlar grafik olarak sunulmuştur.

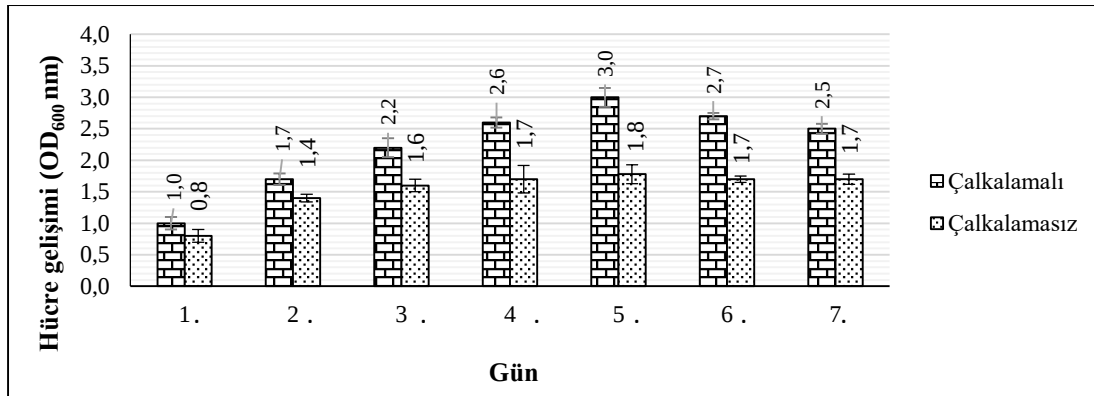
4.1.1. *P. aeruginosa* MB713 suşunun farklı koşullarda gelişimleri ve canlılıkları

Bu çalışmada, *P. aeruginosa* MB713 suşu, NB ve MFDM besi ortamlarında çalkalamalı (150 rpm) ve çalkalamasız etüvlerde 7 gün boyunca geliştirilmiş, inkübasyon süresince her gün bakteri yoğunlukları (abs) ölçülmüş ve canlılıkları (kob/mL) hesaplanmıştır. *P. aeruginosa* MB713 suşunun, NB besi ortamında en iyi gelişimi çalkalamalı koşullarda 5. günde, MFDM besi ortamında ise çalkalamalı koşullarda 6. günde gösterdiği tespit edilmiştir. İki besi ortamı karşılaştırıldığında, bakteri yoğunluğu olarak *P. aeruginosa* MB713 suşunun en iyi gelişimi çalkalamalı koşullarda, MFDM besi ortamında ve 6 günlük inkübasyonda gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, MFDM besi ortamında gelişimlerinin NB'ye göre daha iyi olduğu dikkat çekmiştir. Tüm koşullarda *P. aeruginosa* MB713 suşunun, kob/mL olarak oluşturulan canlılık eğrilerinde ise, MFDM besi ortamında çalkalamalı olarak 6 günlük inkübasyon sonunda en iyi gelişimi göstermiştir. Bu sonuçlar, hücre yoğunluğu (abs) çalışmalarında elde edilen sonuçları desteklemiştir. Canlılık eğrileri çalışmasındaki sonuçlar, n:3'ün ortalaması şeklinde $\pm$ SD olarak Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te sunulmuştur. Aynı koşullarda, canlılık artışına bağlı olarak pigment üretimlerinin de artış gösterdiği, canlılık ve pigment üretimi arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür (Resim 4.1 ve Resim 4.2). MFDM besi ortamında çalkalamanın, *P. aeruginosa* MB713 bakterisinin gelişimini anlamlı düzeyde artırdığı istatistiksel analizlere göre ($p<0,05$) ortaya konulmuştur. Inkübasyon süresindeki artışın da bakteri gelişimini NB besi ortamı için 5. güne, MFDM besi ortamı için ise 6. güne kadar anlamlı olarak artırdığı tespit

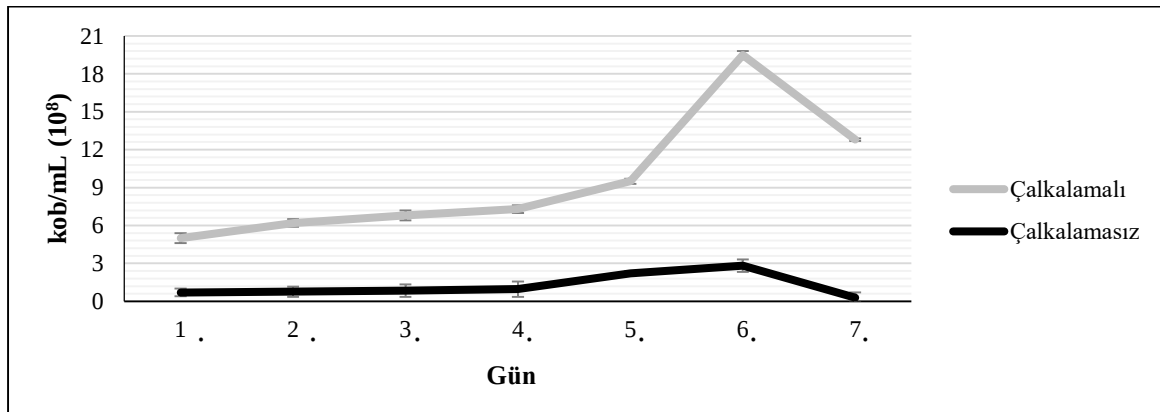
edilmiştir ($p<0,05$). Sonuçlar, $n:3$ 'ün ortalaması ve $\pm SD$ olarak, Şekil 4.1 ve 4.2'de sunulmuştur.



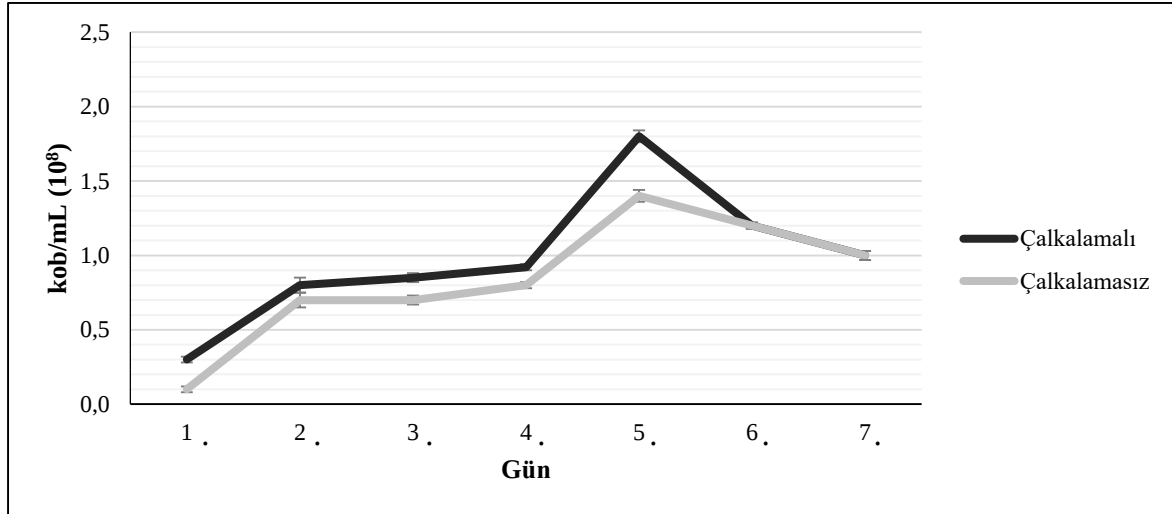
Şekil 4.1. *P. aeruginosa* MB713 suşunun çalkalamalı ve çalkalanmasız koşullarda, 1-7 gün inkübasyonda MFDM besiyerinde gelişiminin optik yoğunluğu



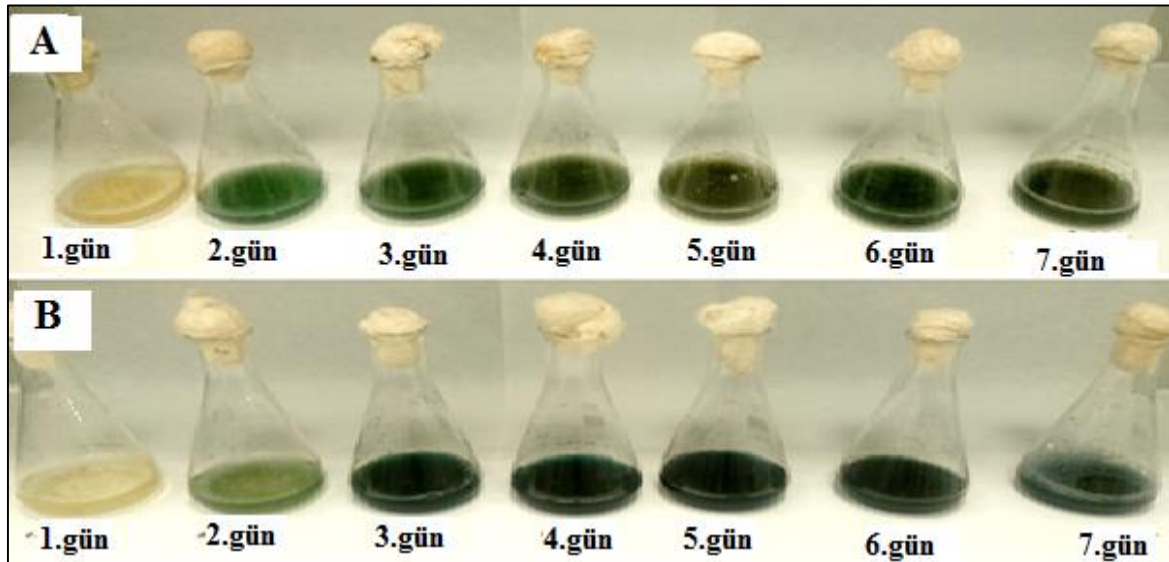
Şekil 4.2. *P. aeruginosa* MB713 suşunun çalkalamalı ve çalkalanmasız koşullarda, 1-7 gün inkübasyonda NB besiyerinde gelişiminin optik yoğunluğu



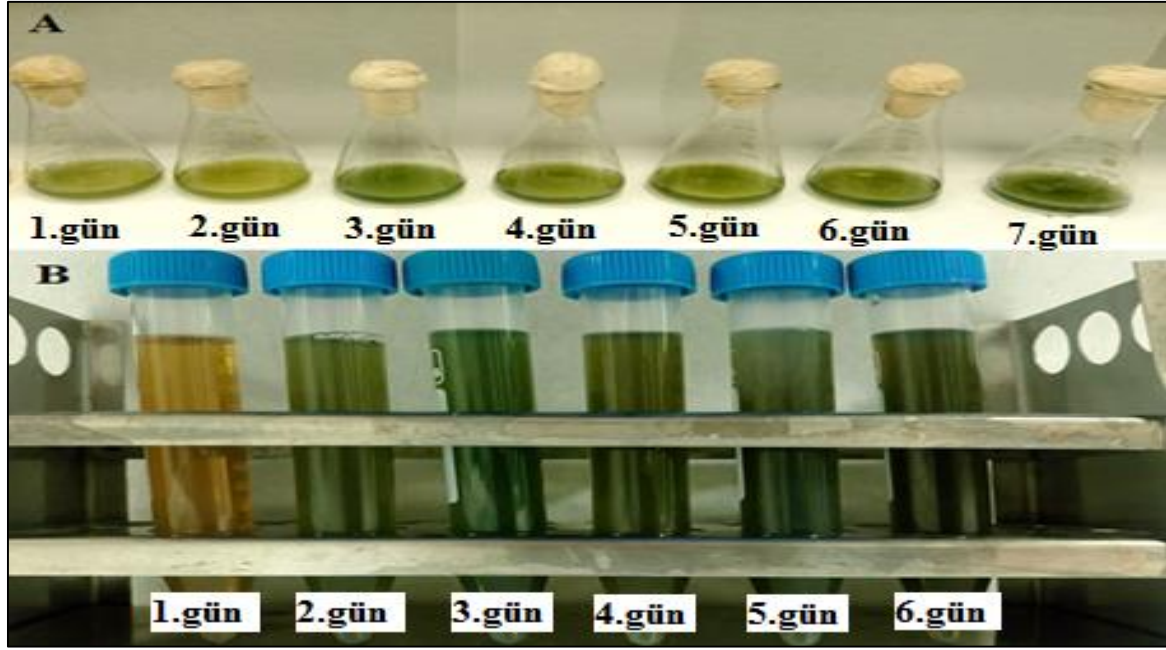
Şekil 4.3. *P. aeruginosa* MB713 suşunun MFDM besiyerinde, 1-7 gün inkübasyon süresince canlılık eğrisi



Şekil 4.4. *P. aeruginosa* MB713 suşunun NB besi ortamında, 1-7 gün inkübasyon süresinde canlılık eğrisi



Resim 4.1. *P. aeruginosa*'nın MFDM besi ortamında 1-7 gün inkübasyon süresinde çalkalamasız (A) ve çalkalamalı (B) koşullarda gelişimi ve piyosiyenin üretimi

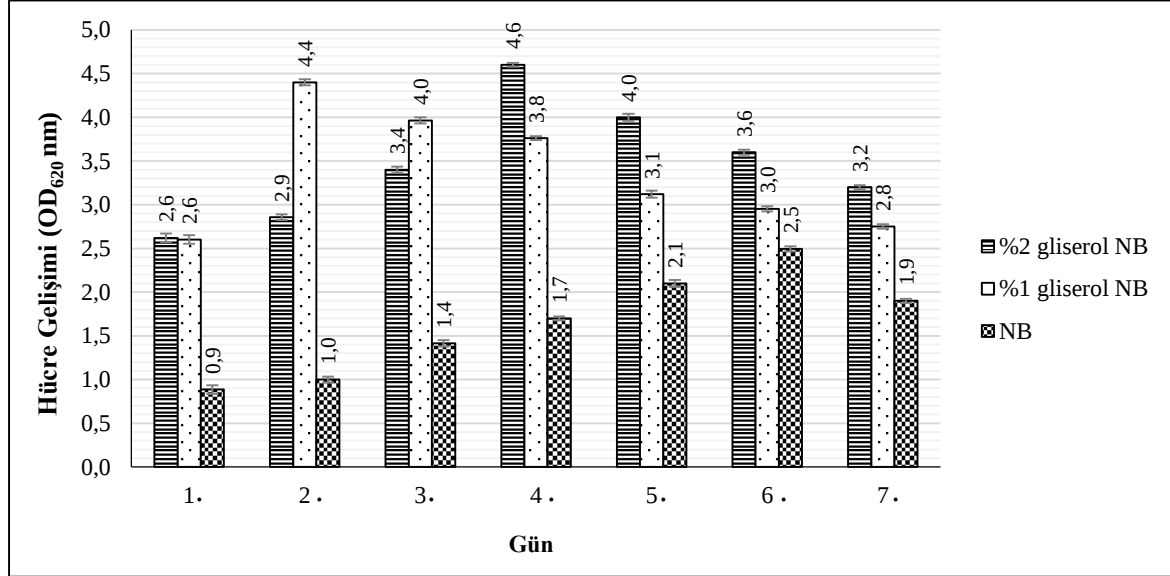


Resim 4.2. *P. aeruginosa* MB713 suşunun NB besiyerinde 1-7 gün inkübasyon süresinde çalkalamasız (A) ve çalkalamalı (B) koşullardaki gelişimi ve piyosiyanın üretimi

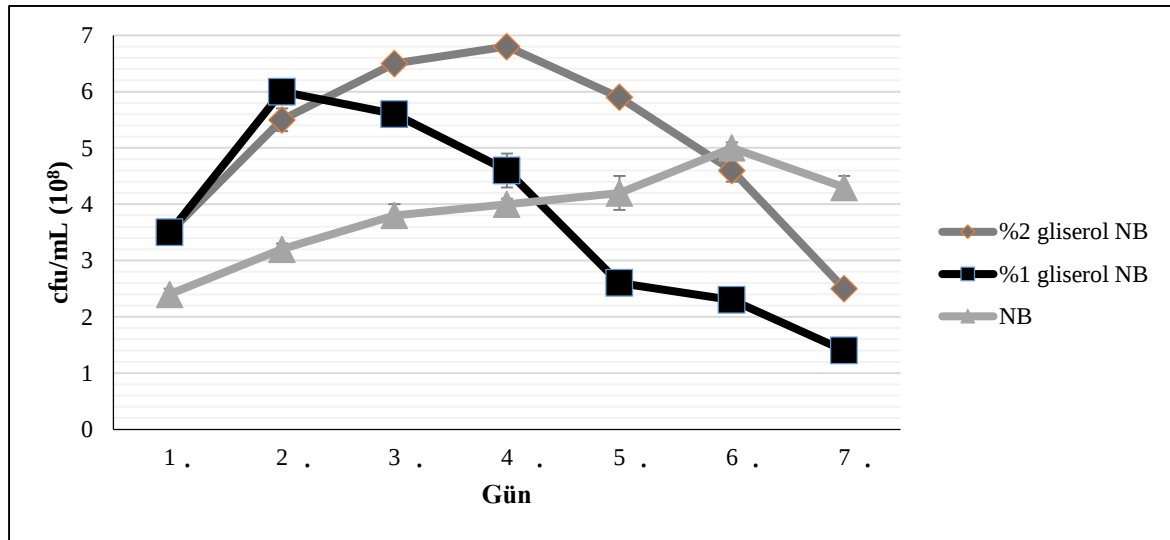
4.1.2. *S. marcescens* MB703 farklı koşullarda gelişimleri ve canlılıkları

Bu çalışmada, *S. marcescens* MB703 suşunun NB ve farklı oranlarda gliserol eklenmiş (%1 ve %2) NB besi ortamında çalkalamalı (150 rpm) olarak, 28°C’de 1-7 gün inkübasyon boyunca geliştirilmiş, inkübasyon süresince her gün bakteri yoğunlukları (abs) ölçülmüş ve canlılıkları (kob/mL) hesaplanmıştır. Kullanılan besi ortamlarında *S. marcescens* MB703 suşunun en iyi gelişimi, %2 gliserol içeren NB besiyerinde gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan suşun 7 günlük inkübasyon sonunda en iyi gelişimi NB besi ortamında 6. günde, %1 gliserol içeren NB besi ortamında 2. günde ve %2 gliserol içeren NB besi ortamında ise 4. günde gösterdiği tespit edilmiştir. Bu suş için Şekil 4.5 değerlendirildiğinde, suşun en iyi gelişimi her bir besi ortamında farklı olmakla birlikte, maksimum gelişimi %2 gliserol içeren NB besi ortamında 4. günde gösterdiği belirlenmiş, bu sonuçlar Şekil 4.6’da verilen canlılık sayımı sonuçları ile desteklenmiştir. NB ve farklı oranlarda gliserol içeren NB besi ortamı çalışmalarında gliserolün bakteri gelişimini artırdığı dikkat çekmiştir (Resim 4.3). Şekil 4.6’da verilen canlılık sayımı sonuçlarına bakıldığında ise, veriler yoğunluk ölçümleri ile paralellik gösterdiği dikkat çekmiştir. Yapılan istatistiksel analizlere göre, NB ile yapılan gelişim çalışmasında eklenen gliserolün, gelişimi anlamlı ölçüde artırdığı ($p<0,05$) istatistiksel olarak yapılan analizle

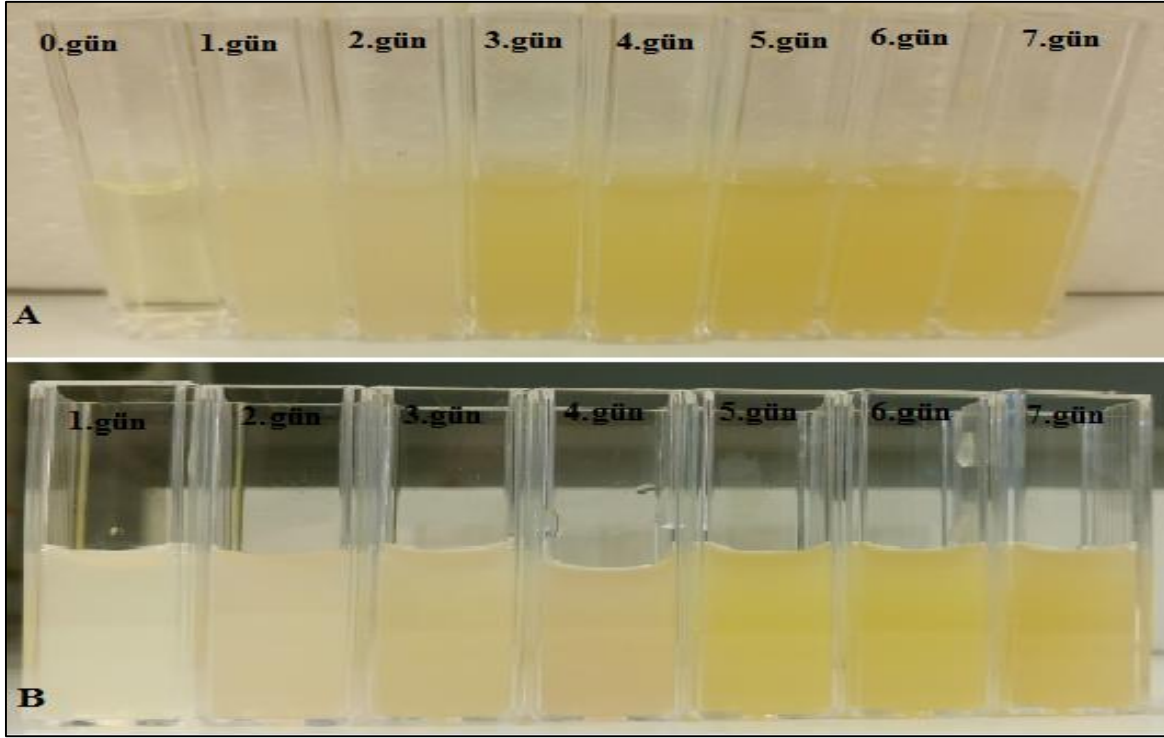
doğrulanmıştır. Sonuçlar, n:3'ün ortalaması ve $\pm$ SD olarak, Şekil 4.5 ve 4.6'da sunulmuştur.



Şekil 4.5. *S. marcescens* MB703 suşunun NB ve farklı oranlarda gliserol içeren NB besi ortamında, 1-7 gün inkübasyon süresinde gelişiminin optik yoğunluğu



Şekil 4.6. *S. marcescens* MB703 suşunun NB ve farklı oranlarda gliserol içeren NB besi ortamlarında 1-7 gün inkübasyon süresinde canlılık eğrisi



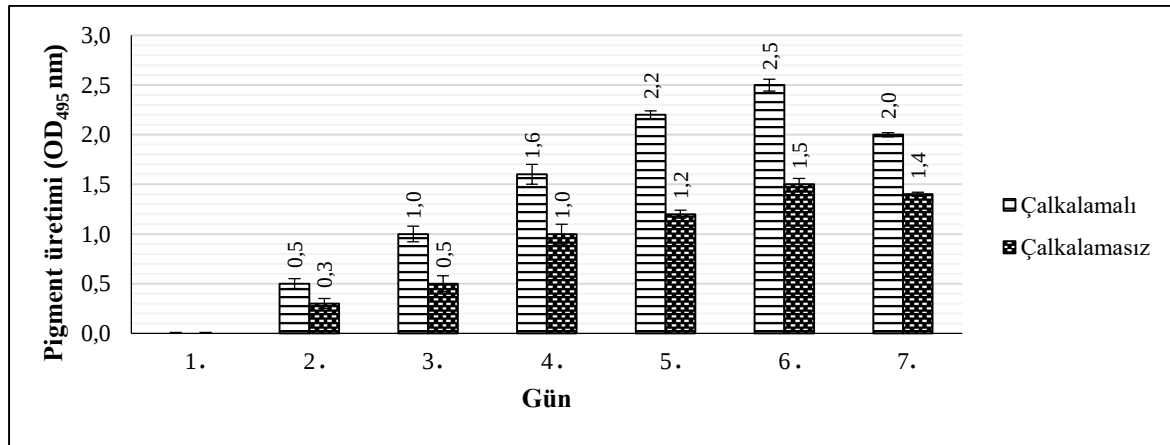
Resim 4.3. *S. marcescens* MB703 suşunun ve 1-7 gün inkübasyon süresinde %1 gliserol içeren Nutrient Broth (A) ve %2 gliserol içeren Nutrient Broth (B) besi ortamında gelişimi

4.2. Çalışmada Kullanılan Bakterilerin Pigment Üretim Eğrileri

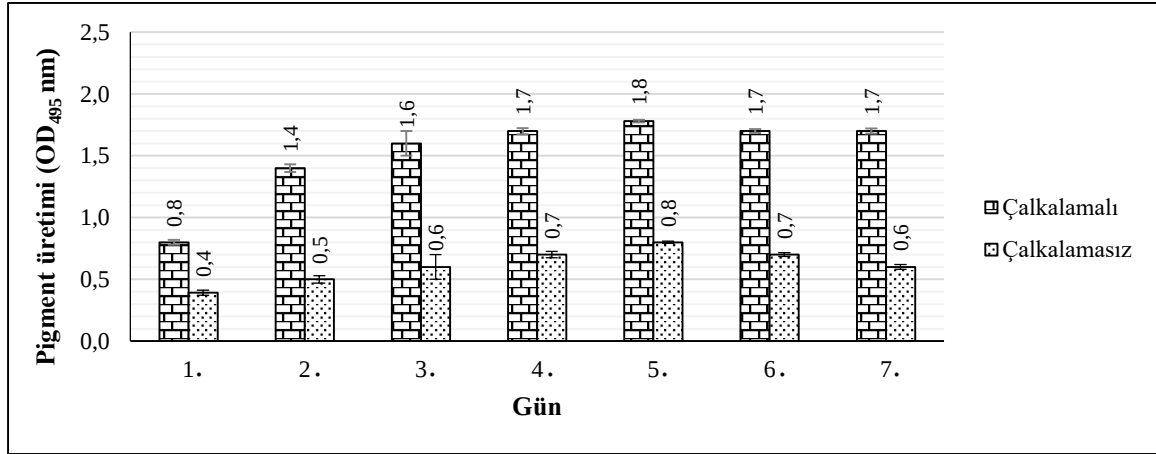
Bu çalışmada, *P. aeruginosa* MB713 ve *S. marcescens* MB703 suşlarının farklı pigment üretimi için uygun koşulların belirlenmesi amacıyla, gelişme koşullarında öne çıkan sonuçlar denenmiştir. Bu doğrultuda maksimum pigment üretimi sağlayan koşulların belirlenmesi için, besi ortamı, inkübasyon süresi ve çalkalamalı-çalkalamasız gelişme ortamları test edilmiştir. *P. aeruginosa* MB713 suşunun piyosiyenin üretiminde inkübasyon süreleri, besi ortamları ve çalkalamalı/çalkalamasız koşullar denenmiş, piyosiyenin üretimi, spektrofotometrik olarak, 495 nm dalga boyunda ölçülmüş, sonuçlar absorbans olarak verilmiştir. *S. marcescens* MB703 suşundan prodigiosin pigmenti üretiminde NB besi ortamı, gliserol ile zenginleştirilmiş NB besi ortamı, NA besi ortamı ve inkübasyon süreleri denenmiş, prodigiosin üretimi spektrofotometrede, 535 nm dalga boyunda ölçülerek absorbans olarak belirlenmiştir. Çalışmaların sonunda, en iyi pigment üretiminin görüldüğü koşullar belirlenmiş ve bu koşullarda üretilen pigmentler kısmi olarak saflaştırılarak, pigmentlerin miktarları hesaplanmıştır.

4.2.1. *P. aeruginosa* MB713 suşunun piyosiyanın pigmenti üretimi

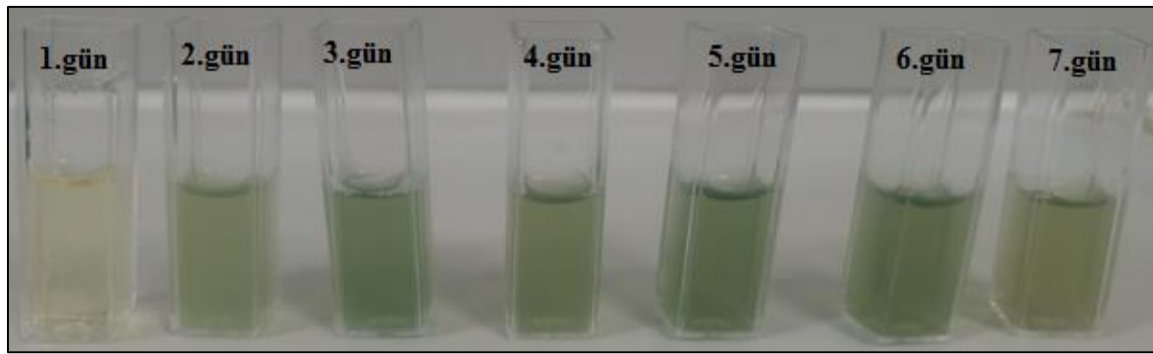
Bu çalışmada, *P. aeruginosa* MB713 suşunun NB besi ortamında ve MFDM besi ortamında çalkalamalı (150 rpm) ve çalkalamasız olarak 1-7 gün inkübasyon boyunca üremeye bağlı pigment oluşumu, spektrofotometrede absorbans olarak belirlenmiştir. *P. aeruginosa* MB713 suşu, en iyi piyosiyanın üretimini MFDM besi ortamında, çalkalamalı koşullarda ve 6 gün inkübasyon sonunda göstermiştir. Resim 4.5'te, *P. aeruginosa* MB713 suşunun, MFDM besi ortamında, NB besi ortamına göre (Resim 4.4) piyosiyanın pigmentini daha iyi ürettiği ve en iyi pigment üretiminin MFDM besi ortamında, çalkalamalı koşullarda olduğu gösterilmiştir. MFDM besi ortamında çalkalamanın istatistiksel analizine göre *P. aeruginosa* MB713 bakterisinin pigment üretimi anlamlı düzeyde artırdığı ($p<0,05$) ortaya konmuştur. Inkübasyon süresinin de pigment üretimini MFDM besi ortamında 6. güne, NB besi ortamında 5. güne kadar anlamlı olarak artırdığı istatistiksel olarak test edilmiştir ($p<0,05$). Yapılan bakteriyel çalışmaların sonucunda, devam eden çalışmalarda pigment üretiminin maksimum verimde elde edilmesinin önemli olması nedeniyle, piyosiyanın üretimi için MFDM besi ortamının ve çalkalamalı koşulların kullanılması öngörülmüştür. Sonuçlar, n:3'ün ortalaması ve $\pm$ SD olarak, Şekil 4.7 ve 4.8'de sunulmuştur.



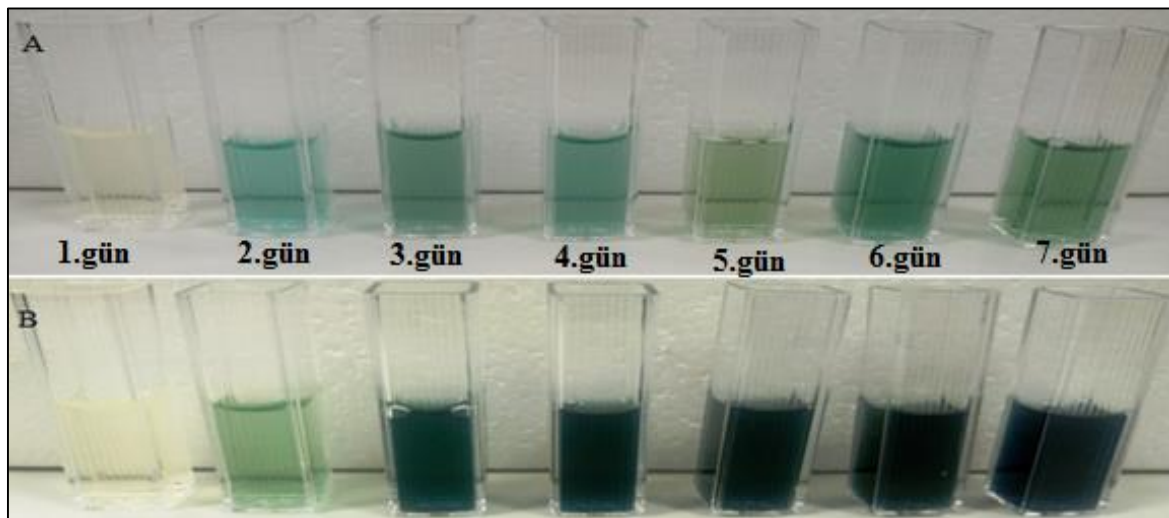
Şekil 4.7. *P. aeruginosa* MB713 suşunun 1-7 gün inkübasyon süresinde, MFDM besiyerinde çalkalamalı ve çalkalamasız koşullarda piyosiyanın pigmentinin optik yoğunluğu



Şekil 4.8. *P. aeruginosa* MB713 suşunun 1-7 gün inkübasyon süresinde, NB besi ortamında, çalkalamalı ve çalkalamasız koşullarda piyosiyenin pigmentinin optik yoğunluğu



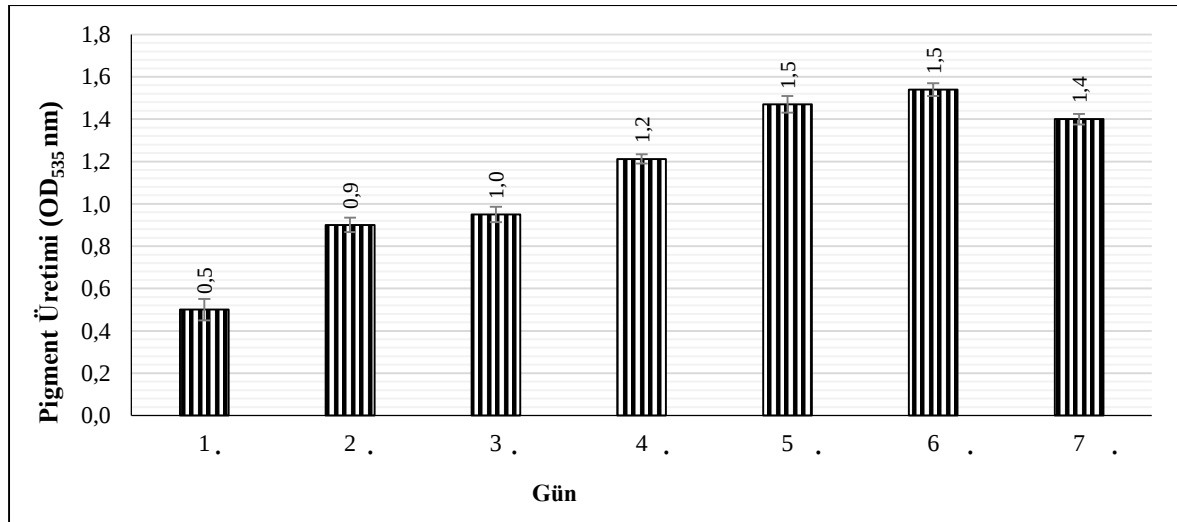
Resim 4.4. *P. aeruginosa* MB713 suşunun, NB besiyerinde (çalkalamasız) piyosiyenin üretimi



Resim 4.5. *P. aeruginosa* MB713 suşunun MFD besiyerinde çalkalamasız (A) ve çalkalamalı (B) ortamda piyosiyenin pigmenti üretimi

4.2.2. *S. marcescens* MB703 suşunun prodigiosin pigmenti üretimi

Bu çalışmada, *S. marcescens* MB703 suşunun NB besi ortamında çalkalamalı (150 rpm) olarak 28°C’de, 7 gün inkübasyon boyunca pigment üretim eğrileri çıkarılmıştır. Suşun gliserol içeren (%1 ve %2) NB besi ortamında biyomasi yüksek yoğunlukta olmasına rağmen pigment üretimi gözlenmemiş ve şekilleri oluşturulamamıştır. Kullanılan besi ortamlarında *S. marcescens* MB703 suşunun yalnızca gliserol içermeyen NB besi ortamında gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan suşun 1-7 gün inkübasyon sonunda maksimum pigment üretimini NB besi ortamında 6. günde gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizlere göre, inkübasyon süresinin pigment üretimini 6. güne kadar anlamlı düzeyde artırdığı ($p<0,05$) belirlenmiştir. Sonuçlar, n:3’ün ortalaması ve $\pm$ SD olarak, Şekil 4.9’da sunulmuştur.



Şekil 4.9. *S. marcescens* MB703 suşunun 1-7 gün inkübasyon süresinde, NB besi ortamında prodigiosin pigmentinin optik yoğunluğu

4.3. Piyosiyanin ve Prodigiosin Pigmentlerinin Miktarlarına Ait Bulgular

Çalışmamızda, *P. aeruginosa* MB713 suşunun farklı besi ortamı (MFDM ve NB) ve çalkalamalı/çalkalamasız koşullarda ürettiği piyosiyanin pigmentinin miktarı, kısmi olarak saflaştırıldıktan sonra belirlenmiştir. Aynı zamanda *S. marcescens* MB703 suşunun ürettiği prodigiosin pigmentinin NB’de maksimum sürede, NA’da ise 1-7 gün inkübasyon süresinde pigment miktarları, prodigiosin pigmenti kısmi olarak saflaştırıldıktan sonra tespit edilmiştir. Piyosiyanin pigmentinin maksimum üretiminin MFDM besi ortamında ve

çalkalamalı koşullarda gerçekleştiği belirlenmiştir (51 µg/mL). *S. marcescens* MB703 suşunun inkübasyon sürelerine göre, en iyi pigment üretimi NA besi ortamında 6. ve 7. günde tespit edilmiştir (72 mg/L). Katı besi ortamında, inkübasyon süresinin, pigment miktarını etkilediği ortaya konmuştur (Resim 4.6). NA'dan koloni toplanarak elde edilen prodigiosin pigment miktarı, NB besi ortamından elde edilen pigment miktarına göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda çalkalama koşullarının piyosiyanın miktarını arttırdığı $p<0,05$ anlamlılık düzeyinde tespit edilmiştir. Buna ek olarak agarda üretilen bakterilerin inkübasyon sürelerinin prodigiosin miktarını anlamlı düzeyde ($p<0,05$) arttırdığı da istatistiksel testlerle ortaya konmuştur. Sonuçlar, n:3'ün ortalaması ve $\pm$ SD olarak, Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.1. *P. aeruginosa* MB713 suşunun, besi ortamına ve çalkalama koşullarına göre pigment verim tablosu

Besiyeri	Piyosiyanın Miktarı (µg/mL)
NB ^a	10±0,4
NB ^b	23±0,8
MFDM ^c	41±0,5
MFDM ^d	51±0,7

^a: Mikroorganizmanın NB besiyerinde çalkalamasız inkübatörde üretimi

^b: Mikroorganizmanın NB besiyerinde 150 rpm devirde çalkalamalı inkübatörde üretimi

^c: Mikroorganizmanın Modifiye Frank and De Moss besiyerinde çalkalamasız inkübatörde üretimi

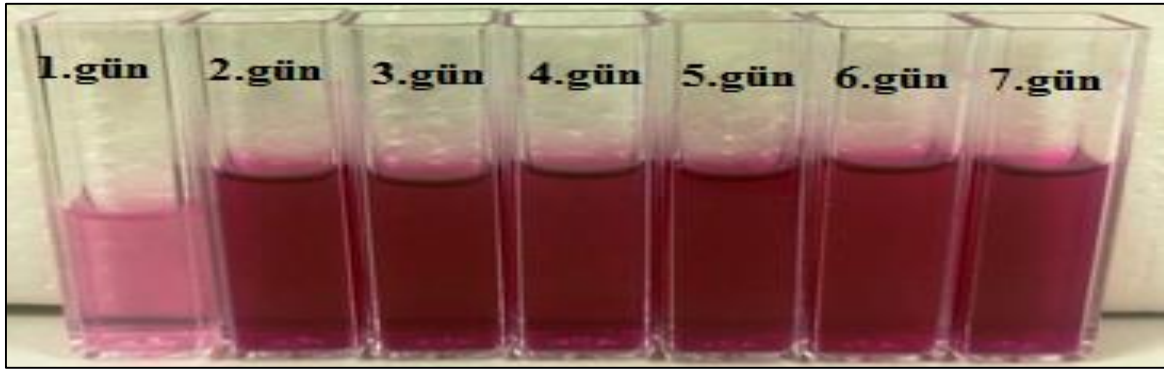
^d: Mikroorganizmanın Modifiye Frank and De Moss besiyerinde 150 rpm devirde çalkalamalı inkübatörde üretimi

Çizelge 4.2. *S. marcescens* MB703 suşunun, sıvı ve katı besi ortamına göre pigment miktar tablosu

Besiyeri	Prodigiosin Miktarı (mg/L)
Nutrient Broth	13±0,2
Nutrient Agar	72±0,5

Çizelge 4.3. *S. marcescens* MB703 suşunun NA besi ortamında, 1-7 gün üretiminde günlere göre prodigiosin pigmentinin miktarı (mg/L)

Gün	Prodigiosin Miktarı (mg/L)
1.	11±0,8
2.	62±1,0
3.	66±0,6
4.	67±1,2
5.	70±0,4
6.	72±0,5
7.	72±0,7



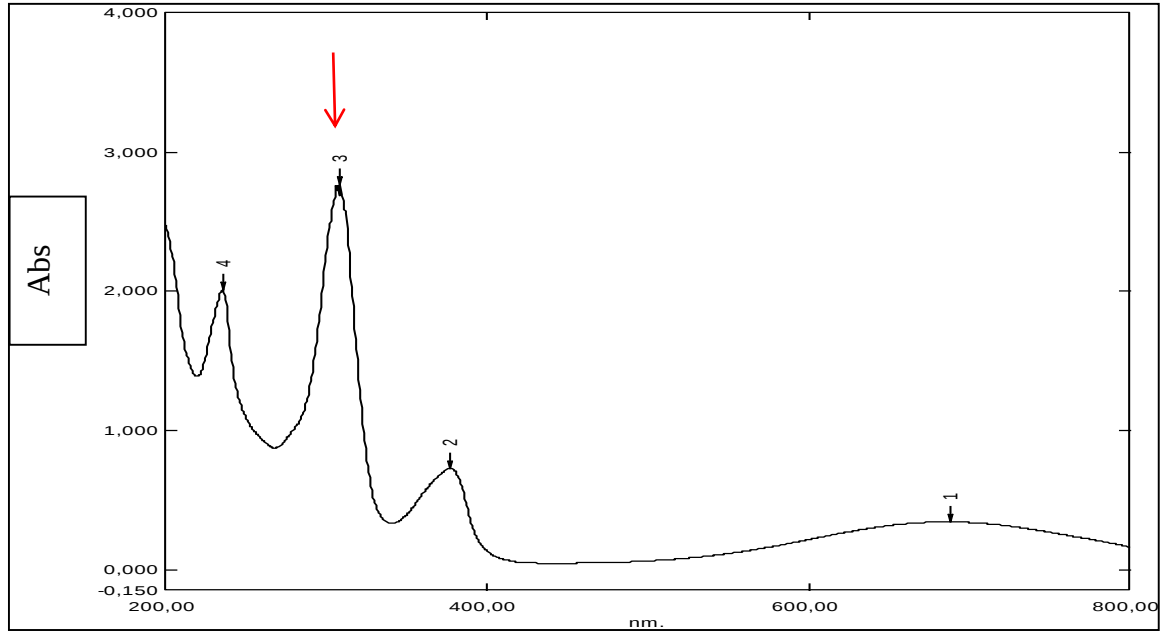
Resim 4.6. *S. marcescens* MB703 suşunun Nutrient Agar besi ortamında, 1-7 gün inkübasyon süresinde ürettiği pigmentin çözeltileri

4.4. Pigmentlerin İçerik Analizlerine Ait Bulgular

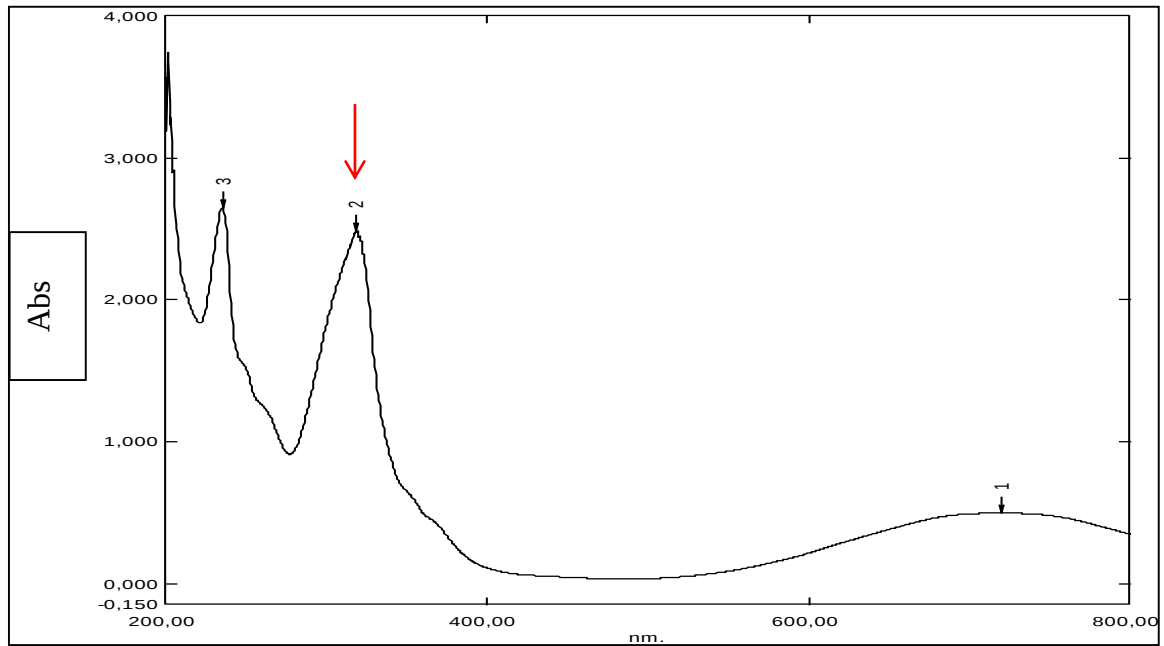
4.4.1. Spektrofotometrik analiz

Piyosiyanin pigmenti

Kısmi olarak saflaştırılmış olan piyosiyanin pigmentinin UV-Visible spektrofotometrik analizinde, saf su ve % 95'lik etanol olmak üzere iki ayrı çözücüdeki spektrofotometrik görüntüsü Şekil 4.10 ve 4.11'de verilmektedir. Şekil 4.10'da verilen saf sudaki pigmentin kırmızı okla gösterilen dalga boyunda verdiği pik ve Şekil 4.11'de etanoldeki pigmentin kırmızı okla gösterilen dalga boyunda verdiği pik piyosiyanin varlığını göstermektedir. Her iki çözücü için de maksimum pik 300-400 nm aralığında görülmektedir. Su için maksimum pik 300 nm olarak belirlenirken, etanol için maksimum pik 370 nm olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.10. *P. aeruginosa* MB713 suşundan izole edilen piyosiyanin pigmentinin, suda UV absorbsiyon spektrum (nm) görüntüsü

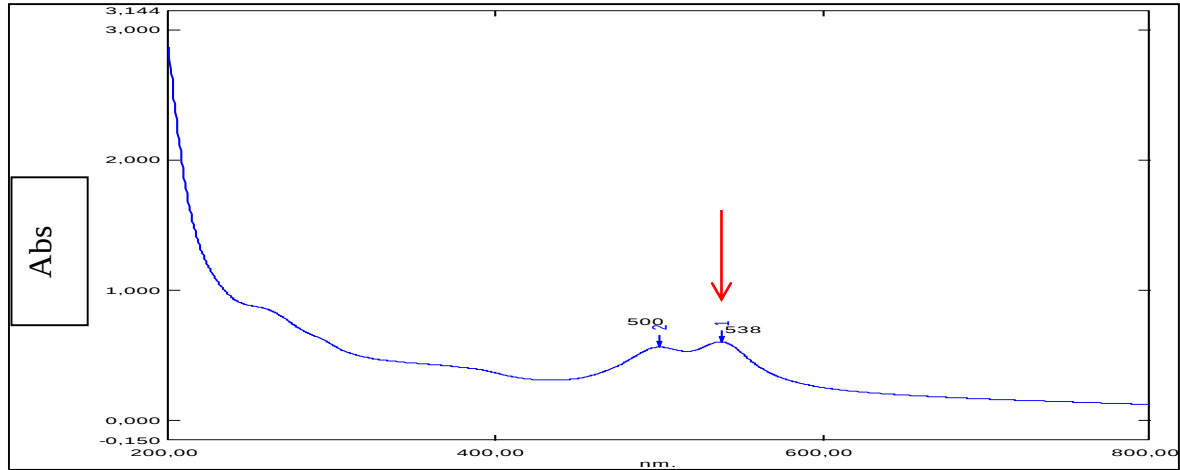


Şekil 4.11. *P. aeruginosa* MB713 suşundan izole edilen piyosiyanin pigmentinin, Etanol'de UV absorbsiyon spektrum (nm) görüntüsü

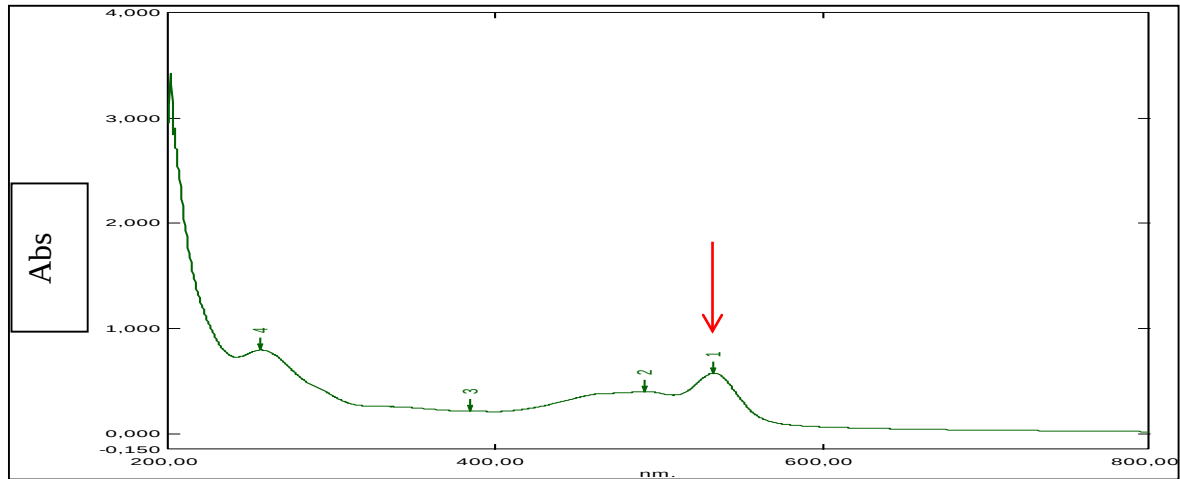
Prodigiosin pigmenti

Kısmi olarak saflaştırılmış olan prodigiosin pigmentinin UV-Visible spektrofotometrik analizinde, saf su ve % 95'lik etanol olmak üzere iki ayrı çözücüdeki spektrofotometrik görüntüsü Şekil 4.12 ve 4.13'te verilmektedir. Şekil 4.12'de verilen saf sudaki pigmentin

kırmızı okla gösterilen dalga boyunda verdiği pik ve Şekil 4.13'te etanoldeki pigmentin kırmızı okla gösterilen dalga boyunda verdiği pik prodigiosin varlığını göstermektedir. Su için maksimum pik 500 ve 538 nm olarak belirlenirken, etanol için maksimum pik 538 nm olarak belirlenmiştir. Bu pikler, prodigiosin bileşiğinin varlığını göstermektedir.



Şekil 4.12. *S. marcescens* MB703 suşundan izole edilen, prodigiosin pigmentinin, suda UV absorpsiyon spektrum (nm) görüntüsü

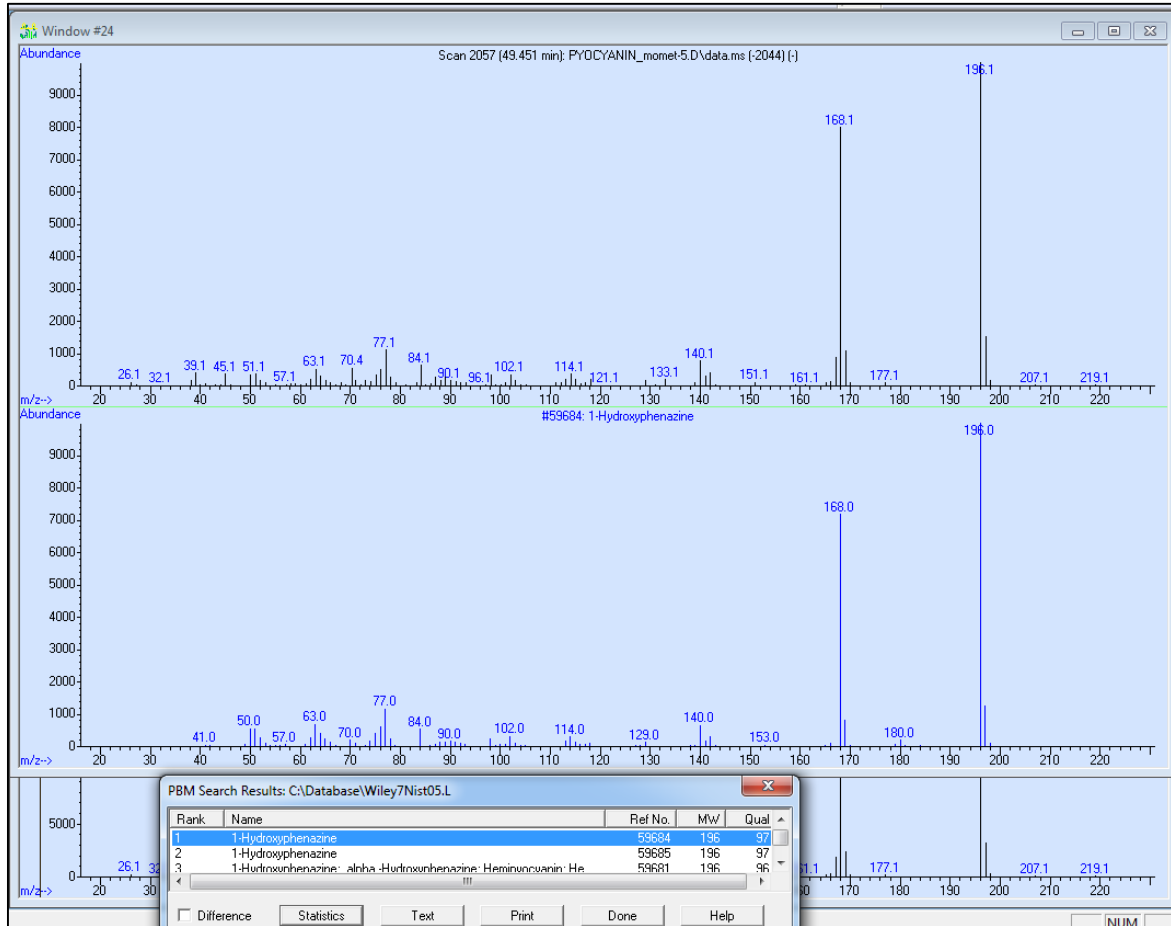


Şekil 4.13. *S.marcescens* MB703 suşundan izole edilen prodigiosin pigmentinin, Etanol'de UV absorpsiyon spektrum (nm) görüntüsü

4.4.2. GC-MS analizi

P. aeruginosa MB713 suşu tarafından üretilen piyosiyenin bileşiğinin kütle spektrum analizi ile 1-hidroksifenazin (hemipiyosiyenin) olarak tanımlanan gaz kromatografik analizinde 49 dk. boyunca Şekil 4.14'te gösterilen yapısı ile 196 m/Z'de yoğun moleküler

iyon zirvesi veren keskin bir tepe noktası göstermiştir. Ekstrede 196 m/Z'de görülen pik fenazın türevi olan hemipiyosiyanin varlığını gösterdiğinden, analiz edilen bileşenin piyosiyanin pigmenti olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.14. *P. aeruginosa* MB713 tarafından üretilen piyosiyaninin pigmentinin GC-MS spektrumu

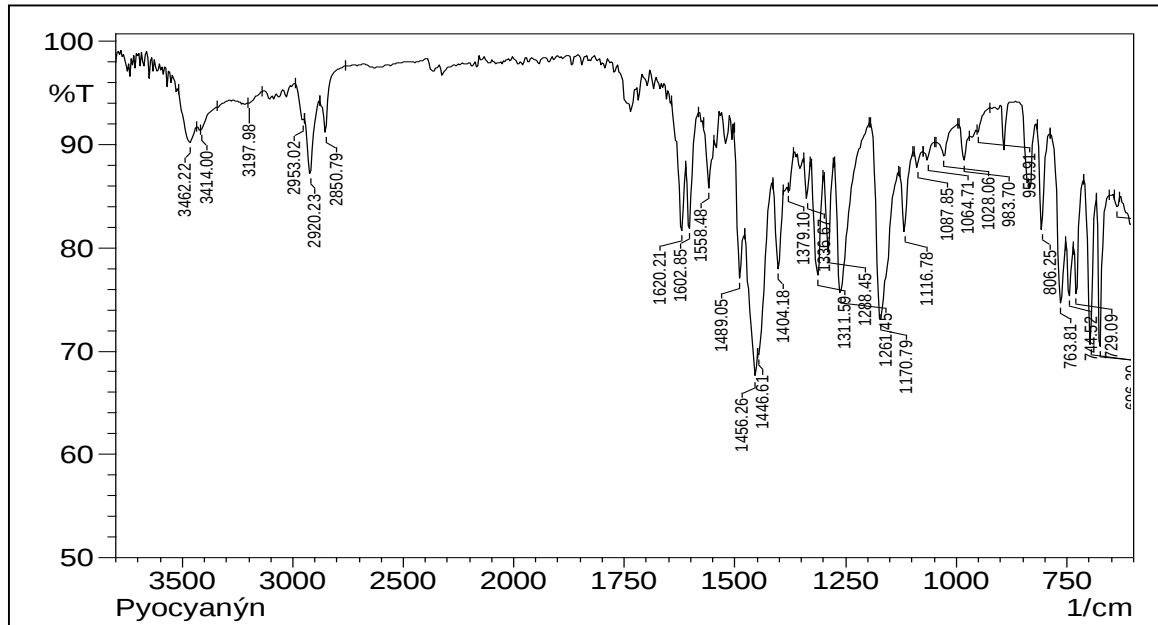
S. marcescens MB703 suşu tarafından üretilen prodigiosin pigmentinin varlığı GC-MS analizi ile saptanamamış ancak, IR spektrumu ile varlığı kanıtlanmıştır. Çalışmada kullanılan GC-MS analiz koşulları değiştirilerek denemeler yeniden yapılmalıdır.

4.4.3. FT-IR analizi

Piyosiyanin pigmenti

P. aeruginosa MB713 suşu tarafından üretilen pigmentin fonksiyonel gruplarının (metil, metilen, karbonil, aldehit, keton, amid, hidroksil gibi) belirlenmesi ve buna bağlı olarak

karakterizasyonu amacıyla FT-IR analizi yapılmıştır. Yapılan FT-IR analizine ait sonuçlar Şekil 4.15'te yer almaktadır. Analizler $750\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ aralığında ATR metodu ile gerçekleştirilmiştir. 3462 cm^{-1} 'deki tepe, O-H bağının varlığını, 2953 cm^{-1} 'deki pik ise, C-H aromatik bağının varlığını göstermektedir. 1602 cm^{-1} 'de gösterilen tepe, C = N bağını temsil ederken, aromatik bir hidrokarbon olarak bileşik, aromatik halkadaki C-C gericiliğinin titreşimleri nedeniyle $1500\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ ve $1600\text{--}1585\text{ cm}^{-1}$ bölgelerinde emilim göstermiştir. CH_3 varlığında $1380\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ 'deki alkil grubunun (metil) C-H bağı gerilerek pik oluşturmuştur. 1301 cm^{-1} 'deki tepe, C = O bağına karşılık gelmektedir. Yapılan FT-IR spektrumu, molekülde fenazin varlığını göstermiştir. Bu analiz sonucunda, aromatik halka içeren bu pigmentin piyosiyenin pigmenti olduğu doğrulanmıştır.

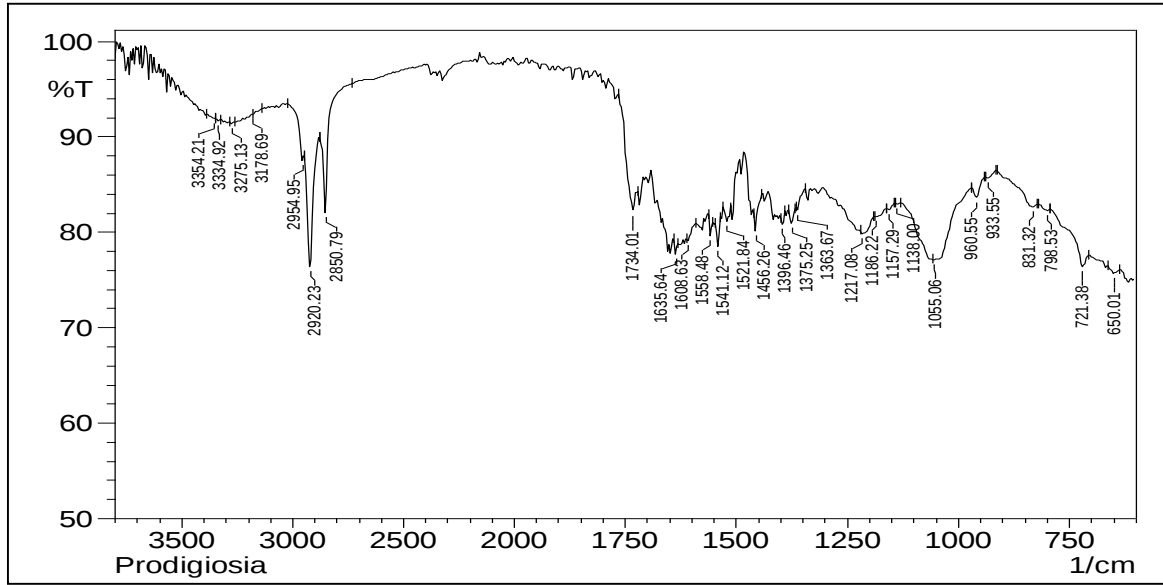


Şekil 4.15. *P. aeruginosa* MB713 suşu tarafından üretilen piyosiyenin pigmentinin FT-IR spektrumu

Prodigiosin pigmenti

S. marcescens MB703 kodlu bakteri tarafından üretilen pigmentin karakterize edilebilmesi adına yapılan FT-IR analizlerine ait sonuçlar Şekil 4.16'da yer almaktadır. Analizler $750\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ aralığında ATR metodu ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.16'da verilen prodigiosin FT-IR spektrumu, prodigiosin yapısında karakteristik olan (N-H) gruplarını gösteren 3350 cm^{-1} 'de bir emme bandı oluşturmuştur; 2927 cm^{-1} , 1458.18 cm^{-1} ve 2855 cm^{-1} , metilen gruplarının varlığını ve metilen gruplarının simetrik gerilmesini göstermektedir. 1650 cm^{-1}

'deki karakteristik tepe, C = O gerilmesinden kaynaklanmaktadır. 1635.34 cm^{-1} 'de pirol halkasından dolayı gerilme görülmüştür. 1377 cm^{-1} 'de zirve, OH bükülmesinden dolayı oluşmuş ve 1145 cm^{-1} 'de zirve CO esasına dayandırılmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda, prodigiosin için fonksiyonel olan gruplar, pirol, amid, metilen, metil ve alkendir.



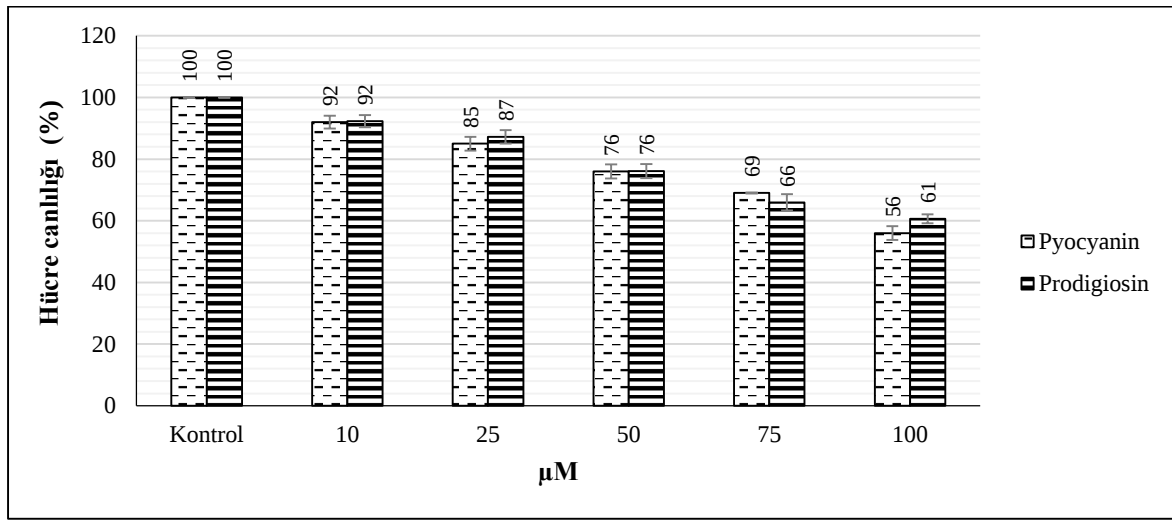
Şekil 4.16. *S. marcescens* MB703 suşu tarafından üretilen prodigiosin pigmentinin FT-IR spektrumu

4.5. Piyosiyanin ve Prodigiosin Pigmentlerinin Biyolojik Aktiviteleri

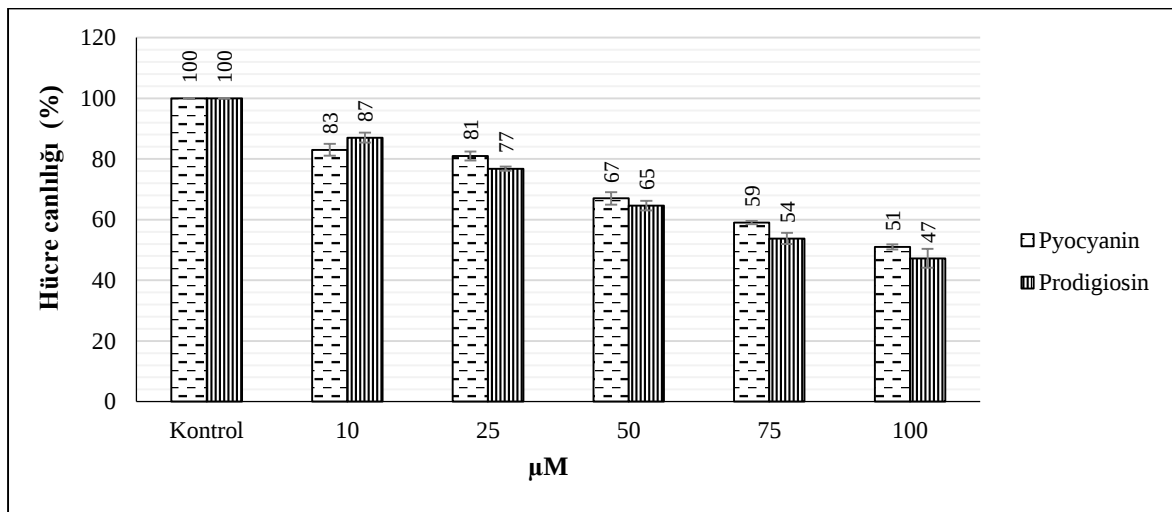
4.5.1. Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin sağlıklı SHSY-5Y ve L929 hücreleri üzerine sitotoksiteleri

Çalışmada, piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin insan nöroblastoma hücresi (SHSY-5Y) ve fare fibroblast hücresi (L929) üzerinde denenen dozlarının sitotoksik etki gösterip göstermediğinin belirlenmesi amaçlanmıştır ve bu çalışma MTT yöntemi ile yapılmıştır. Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin denenen tüm konsantrasyonlarda her iki hücrede de etkisi benzer bulunurken, L929 hücresinin, SHSY-5Y hücresine göre piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerine kısmen daha duyarlı olduğu görülmüştür. Pigmentlerin artan konsantrasyonlarda sitotoksik etkisinin arttığı tespit edilmiştir. Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin IC_{50} değerleri sırası ile SHSY-5Y hücresinde 115 μM ve 130 μM , L929 hücresinde ise, 101 μM ve 83 μM olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, piyosiyanin pigmentinin her iki hücrede de %50'nin üzerinde ölüm göstermediğinden sitotoksik olmadığı ve devam eden çalışmalarda bu konsantrasyonların kullanılabileceği

öngörülmüştür. Prodigiosin pigmenti ise, SHSY-5Y hücresinde tüm konsantrasyonlarda %50'nin altında ölüme sebep olurken, yalnızca 100 μ M konsantrasyon L929 hücresinde %50'nin üzerine çıkan ölüme sebep olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.17 ve 4.18). İstatistiksel olarak yapılan testlerde her iki hücrede pigmentler arasında anlamlı ($p>0,05$) bir fark olmadığı belirlenmiştir. İstatistiksel analiz sonuçları, deneysel olarak elde ettiğimiz sonuçları desteklemiştir. Benzer olarak artan konsantrasyonlarda her iki pigmentin her iki hücrede toksisitesinin arttığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Tüm çalışmaların sonuçları, n:5'in ortalaması ve $\pm$ SD olarak, Şekil 4.17 ve 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.17. Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin uygulandığı SHSY-5Y hücrelerinde kontrole göre % hücre canlılık miktarları



Şekil 4.18. Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin uygulandığı L929 kontrole göre % hücre canlılık miktarları.

4.5.2. Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin *in vitro* asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyonu

Çalışmada, artan konsantrasyonlarda uygulanan piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin *in vitro* AChE inhibitör etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır, AChE inhibisyon miktarları Ellman metoduna göre incelenmiştir. Çalışmada, pozitif kontrol olarak Amerikan İlaç Dairesi (FDA) onaylı AChE-i olan galantamin kullanılmış, pigmentlerin galantamin ile karşılaştırmalı olarak AChE-i etkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Piyosiyanin ve prodigiosin pigment derişimlerinin *in vitro* AChE inhibisyon özellikleri ile ilgili bulgularımızda, piyosiyanin pigmentinin nöral ölüm etkenlerinden olan AChE enzimi üzerinde inhibitörük etkisi tespit edilmiş ve artan konsantrasyonlarda bu etkinin arttığı ortaya konulmuştur. AChE'ye maksimum inhibitör etki, 100 µM piyosiyanin pigmenti uygulamasında görölmüştür (~%38). Prodigiosin pigmentinin hiçbir derişiminde AChE enzimi üzerinde inhibitör etki göstermediği görölmüştür. Piyosiyanin pigmentinin AChE inhibisyonunun artan konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı ölçüde artırmıştır ($p<0,05$). İstatistiksel analiz sonuçları, deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen bulguları desteklemiştir. Prodigiosin pigmenti uygulamasında artan konsantrasyonlarda kontrole göre AChE inhibisyonuna etkisinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). Sonuçlar, n:9'un ortalaması ve $\pm$ SD olarak, Şekil Çizelge 4.4'te sunulmuştur.

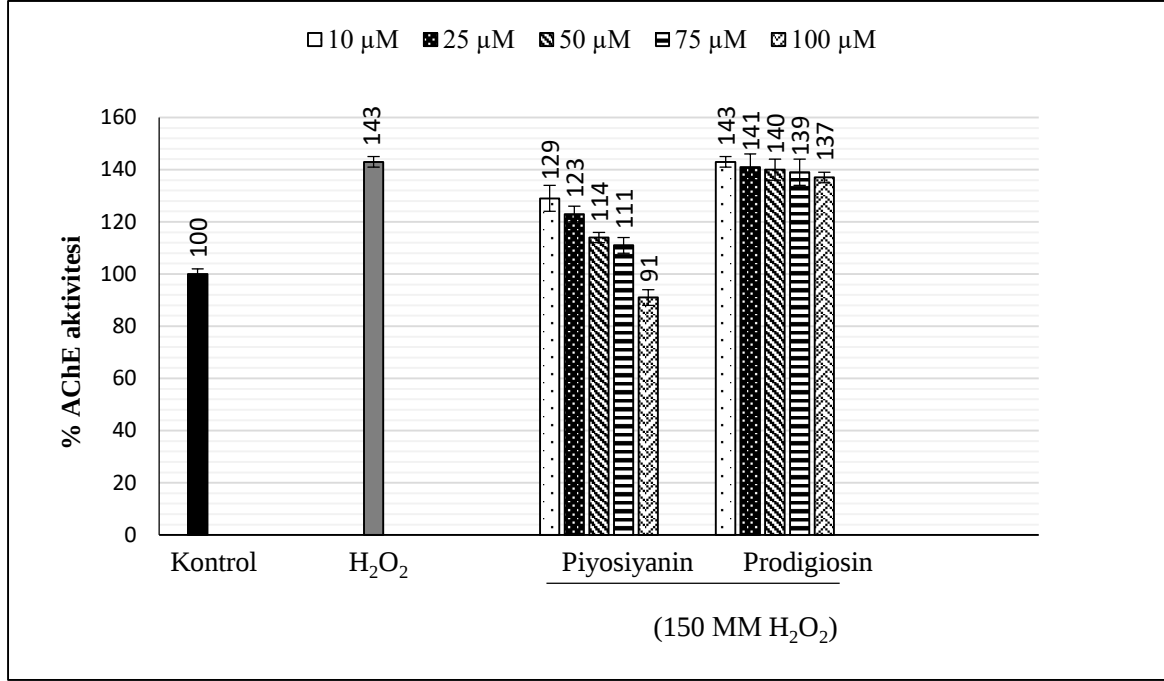
Çizelge 4.4. 10-100 µM piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerini *in vitro* % AChE inhibisyonları

Uygulamalar	% AChE İnhibisyonu					
	Kontrol	10 µM	25 µM	50 µM	75 µM	100 µM
Piyosiyanin	0±0	23±0	27±1	31±0	35±0	38±1
Prodigiosin	0±0	2±0	2±0	2±0	2±0	3±0

Yapılan *in vitro* AChE çalışması sonucunda, piyosiyanin pigmentinin *in vitro* AChE inhibisyon etkisinden yola çıkarak, bu pigmentin AChE inhibitörü olarak kullanılabileceği önerilebilir.

4.5.3. H₂O₂ ile indüklenmiş SHSY-5Y hücresinde piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin hücrel AChE inhibisyonu

Çalışmada, artan konsantrasyonlarda uygulanan piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin H₂O₂ ile hücrel AChE'yi uyarılmış nöroblastom hücresinde, piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin inhibitör etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. H₂O₂ ile oluşturulan hücrel modelin AChE inhibisyon miktarları Ellman metoduna göre belirlenmiştir. H₂O₂ ile uyarılmış kontrol grubundaki AChE aktivitesi, besiyeri dışında hiçbir şey uygulanmamış olan kontrol grubuna göre ~%45 (143±2) artış göstermiştir. AChE inhibisyonundaki artış, H₂O₂ ile uyarılmış ve pigment uygulanmamış olan kontrol grubuna göre % olarak hesaplanmıştır. Kontrole göre uygulanan piyosiyenin pigmenti, AChE enzimi üzerinde inhibitör etki oluştururken, prodigiosin pigmenti enzim üzerinde herhangi bir inhibisyon etkisi oluşmuştur. Piyosiyenin pigmentinin, artan konsantrasyonlara bağlı olarak, H₂O₂ ile uyarılan AChE'yi, indüklenmemiş olan kontrol grubundaki AChE seviyesinden de aşağıya düşürdüğü belirlenmiştir. Piyosiyenin pigmentinin en yüksek inhibisyon etkisini gösterdiği konsantrasyon 100 µM olarak tespit edilmiştir (~%40 inhibisyon). Yapılan istatistiksel analizler sonucunda da piyosiyenin pigmentinin artan konsantrasyonlara bağlı olarak göstermiş olduğu inhibitör etkinin arttığı doğrulanmış ve $p<0,05$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur. Elde edilen bulgular, piyosiyenin pigmentinin SHSY-5Y hücrelerini H₂O₂'nin sebep olduğu AChE aktivasyonunu önemli ölçüde baskılayarak, AChE'ye bağlı nöral hasara karşı koruyucu etkisinin olduğunu ortaya koymuştur. Prodigiosin pigmentinin de 75 ve 100 µM konsantrasyonlarının indüklenen AChE'yi baskıladığı görülmekle birlikte, bu baskılamının düşük oranda olduğu dikkat çekmiştir. Sonuçlar, n:9'un ortalaması ve ±SD olarak, Şekil 4.19'da sunulmuştur.



Şekil 4.19. 150 μM H₂O₂ ile AChE aktivitesi, uyarılmış SHSY-5Y hücrelerine piyosiyenin ve prodigiosin uygulamasının hücrel % AChE aktivitesi

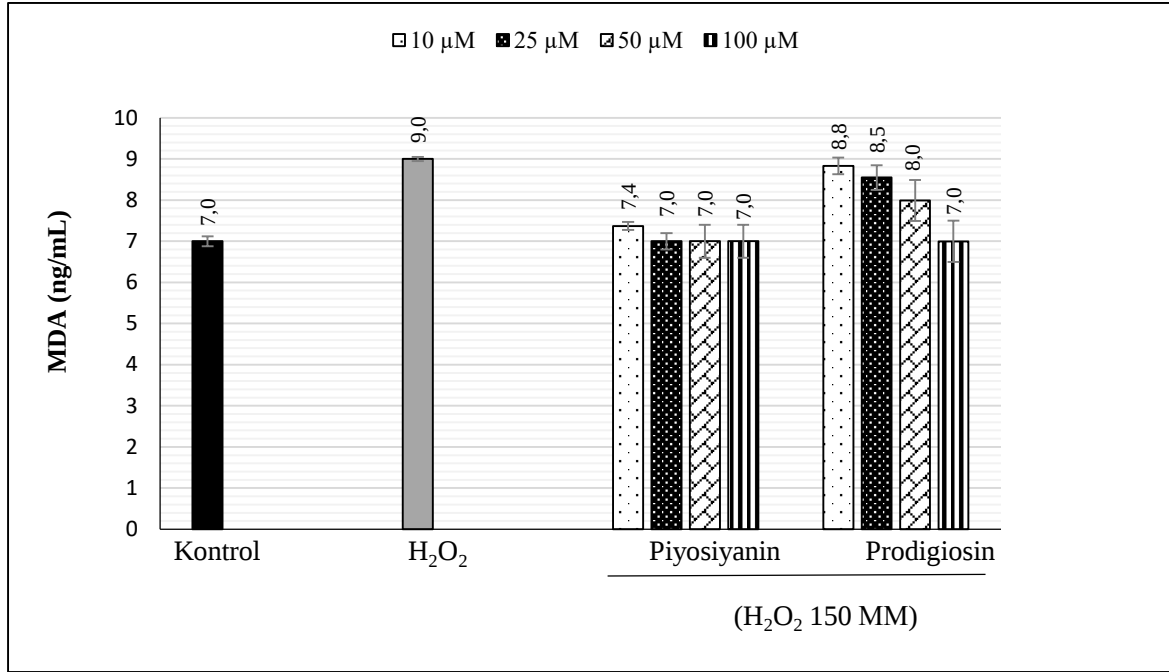
4.5.4. H₂O₂ ile oksidatif hasar oluşturulan nöroblastoma hücrelerinde (SHSY-5Y) piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin antioksidan etkileri

Bu çalışmada, H₂O₂ ile nöroblastoma hücrelerinde oluşturulan oksidatif hasarın etkisinin MDA düzeyinde belirlenmesi ve piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin, oluşturulan hücre modelinde, oksidatif hasara karşı antioksidan enzimler düzeyinde etkisinin ortaya konması amaçlanmıştır. Bu çalışmayla, her iki pigmentin oksidatif hasara bağlı oluşan hastalıklarda koruyucu etkisi belirlenerek, sinir hücrelerinde antioksidan ajan olarak kullanım potansiyelleri ortaya konulmuş olacaktır.

Oksidatif hasarın MDA düzeyinde belirlenmesi

Bu çalışma, Bölüm 3.6.4'te verildiği şekilde ELISA kit yöntemi ile ölçümler yapılarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar grafiklendirilmiştir. Çalışma, SHSY-5Y hücrelerinde ELISA ile antioksidan aktivitenin belirlenmesi sonuçlarını kuvvetlendirmek amacıyla yapılmıştır. Bu kapsamda, 150 μM H₂O₂ ile ~%30 indüklenen SHSY-5Y hücrelerinde pigmentlerin, hücreleri oksidatif hasardan koruma oranlarının ortaya konması amacıyla MDA seviyeleri belirlenmiştir. Çalışmada, piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin ve H₂O₂'nin 18 saat boyunca nöroblastoma hücrelerine uygulanmasının ardından, hücrelerde oluşan lipid

persoksidasyon ürünlerinin miktarı ELISA kiti ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerin uygulandığı gruplarda MDA miktarı, besiyeri dışında hiçbir şey uygulanmamış olan kontrol grubundaki miktara kadar düşmüştür (Şekil 4.22). Çalışmamızda, serbest radikallerin lipidler ve proteinleri etkilemesi ile oluşan MDA, H_2O_2 ile indüklenerek MDA miktarını ~%40 oranında artırmıştır. Özellikle H_2O_2 grubunda oluşan MDA düzeyinin, pigment uygulaması yapılmış olan gruplarda oluşan MDA düzeyine göre yüksek olması, H_2O_2 indüklü oksidatif hasarın arttığını ancak piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin hücreyi oksidatif hasara karşı koruduğunu doğrulamaktadır. Yapılan çalışmalar genel olarak değerlendirildiğinde hem piyosiyenin hem de prodigiosinin SHSY-5Y hücrelerinde H_2O_2 ile indüklenen MDA seviyesini baskıladığı, bu baskılamada piyosiyenin pigmentinin oksidatif hasara karşı koruyucu etkisinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. 18 saat H_2O_2 uygulanmış grupta 9 ng/mL olarak tespit edilen MDA seviyesini piyosiyenin pigmentinin doz artışının önemli ölçüde etkilemediği ve uygulanan dozların MDA seviyesi üzerinde anlamlı ölçüde etki göstermediği tespit edilmiştir ($p>0,05$). Prodigiosin uygulamalarında ise, tüm derişimlerin, oluşan MDA miktarı kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir farka sahip olduğu ($p<0,05$), en yüksek etkinin 50 ve 100 μM 'lık konsantrasyonlarında görüldüğü, H_2O_2 'nin meydana getirdiği MDA miktarındaki artışı ise, tüm pigment konsantrasyonlarının azalttığı istatistiksel olarak doğrulanmıştır ($p<0,05$). Sonuçlar, n:5'in ortalaması ve $\pm SD$ olarak, Şekil 4.20'de sunulmuştur.

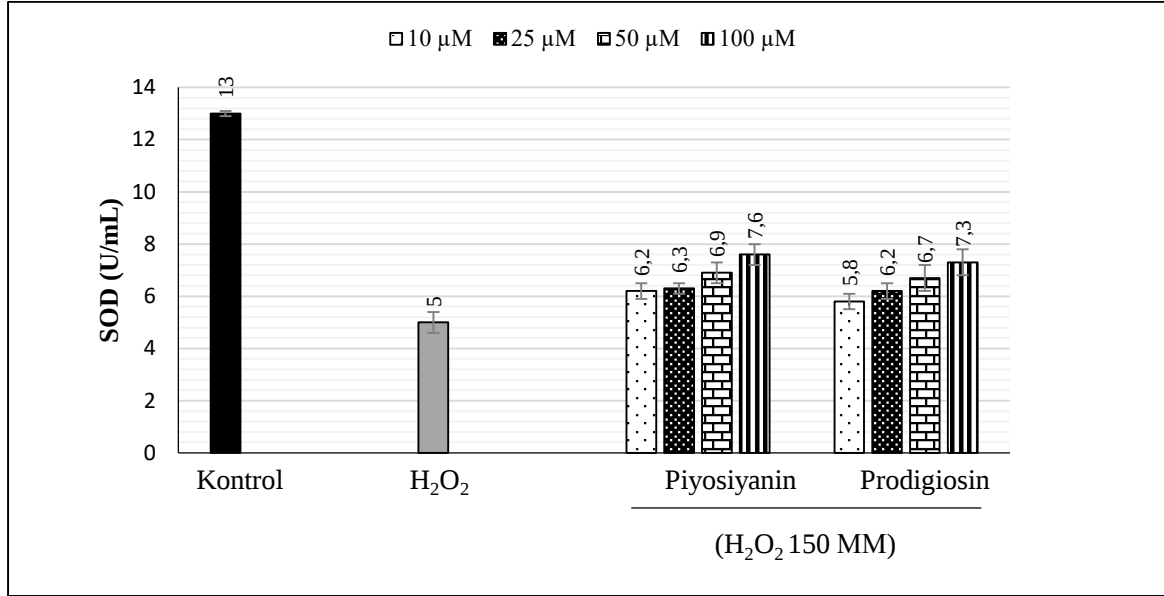


Şekil 4.20. 150 µM H₂O₂ ile indüklenmiş SHSY-5Y nöroblastoma hücrelerine uygulanan piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin Malondialdehit (MDA) miktarına etkisi

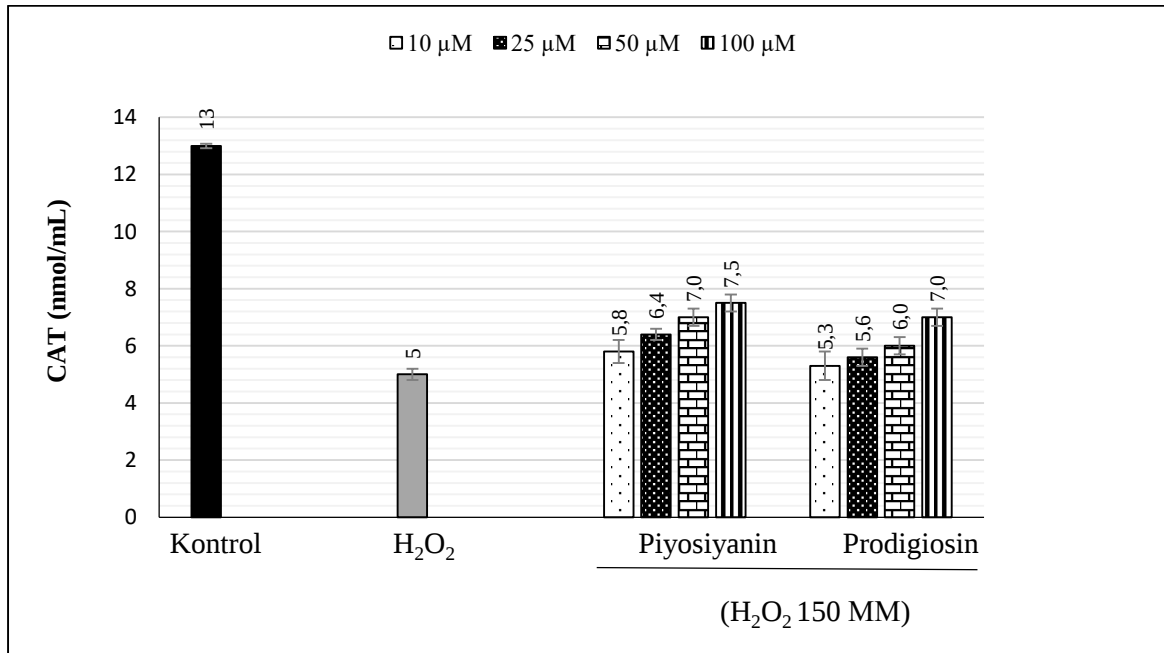
Oksidatif hasarın SOD ve CAT antioksidan enzimleri düzeyinde belirlenmesi

Bu çalışma, Bölüm 3.6.5.'te verildiği şekilde, ELISA kit yöntemi ile ölçümler yapılmış ve sonuçlar grafiklendirilmiştir. Hücre besisi ortamı dışında hiçbir şey uygulanmamış kontrol hücrelerinde SOD aktivitesi 13 U/mL olarak belirlenirken, 150 µM H₂O₂ uygulanmış hücrelerde bu aktivitenin 5 U/mL'ye düştüğü belirlenmiştir. H₂O₂ uygulamasına bağlı nöroblastoma hücrelerinde oksidatif hasar hücre modeli oluşturulmuştur. Oksidatif hasar yaratılan hücrelerde antioksidan enzim seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü belirlenmiştir ($p < 0,05$). Pigment ve H₂O₂ uygulanmış hücrelerdeki artışa göre değerlendirildiğinde, H₂O₂ ile enzim aktivitesi inhibe edilmiş olan antioksidan enzimlerin pigmentler tarafından aktivitelerinin artırıldığı tespit edilmiştir. SOD ve CAT aktivitesinin düşüşü ile oluşan oksidatif hasarın, pigment konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak giderildiği ortaya konmuştur. Her iki pigmentin antioksidan etkileri değerlendirildiğinde, iki pigmentin de SOD ve CAT üzerindeki etkisinin birbirine yakın olmasının yanı sıra piyosiyenin pigmentinin daha etkili olduğu dikkat çekmektedir. Her iki pigment için en iyi antioksidan etkinin görüldüğü konsantrasyon 100 µM olduğu görülmüştür. Bu konsantrasyonda H₂O₂ ile 5 U/mL'ye baskılanan SOD ve CAT aktivitesi piyosiyenin pigmenti ile %50, prodigiosin pigmenti ile %40 artmıştır. Yapılan istatistiksel testlerde,

artan konsantrasyonlarda her iki pigmentin de antioksidatif etkisinin arttığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Sonuçlar, $n:5$ 'in ortalaması ve $\pm SD$ olarak, Şekil 4.21 ve 4.22'de sunulmuştur.



Şekil 4.21. 150 μ M H₂O₂ ile indüklenmiş SHSY-5Y nöroblastoma hücresine uygulanan piyosiyenin ve prodigosin pigmentlerinin Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesine etkisi

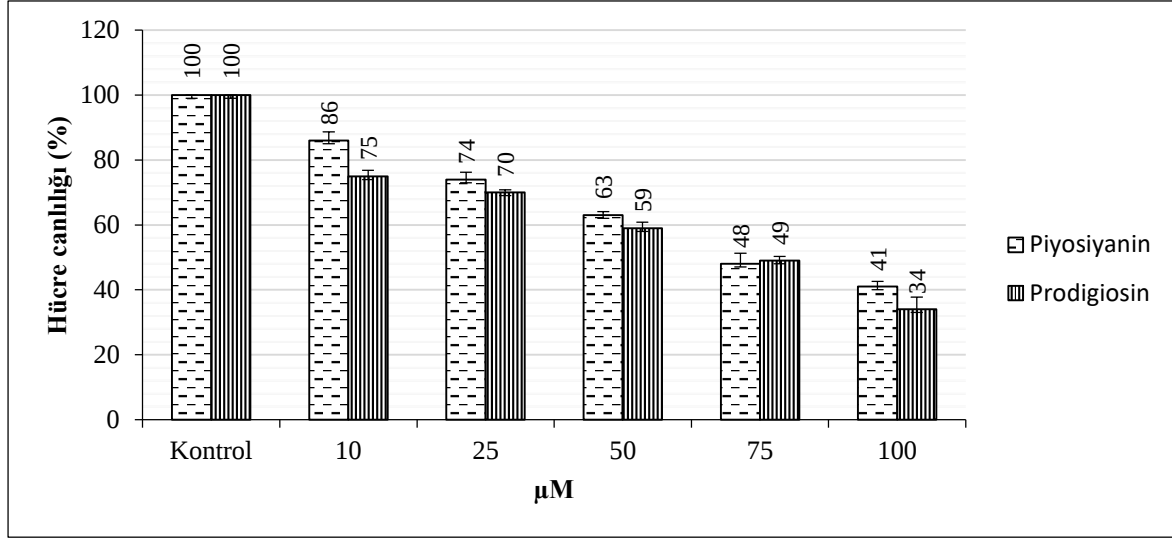


Şekil 4.22. 150 μ M H₂O₂ ile indüklenmiş SHSY-5Y nöroblastoma hücresine uygulanan piyosiyenin ve prodigosin pigmentlerinin Katalaz (CAT) aktivitesine etkisi

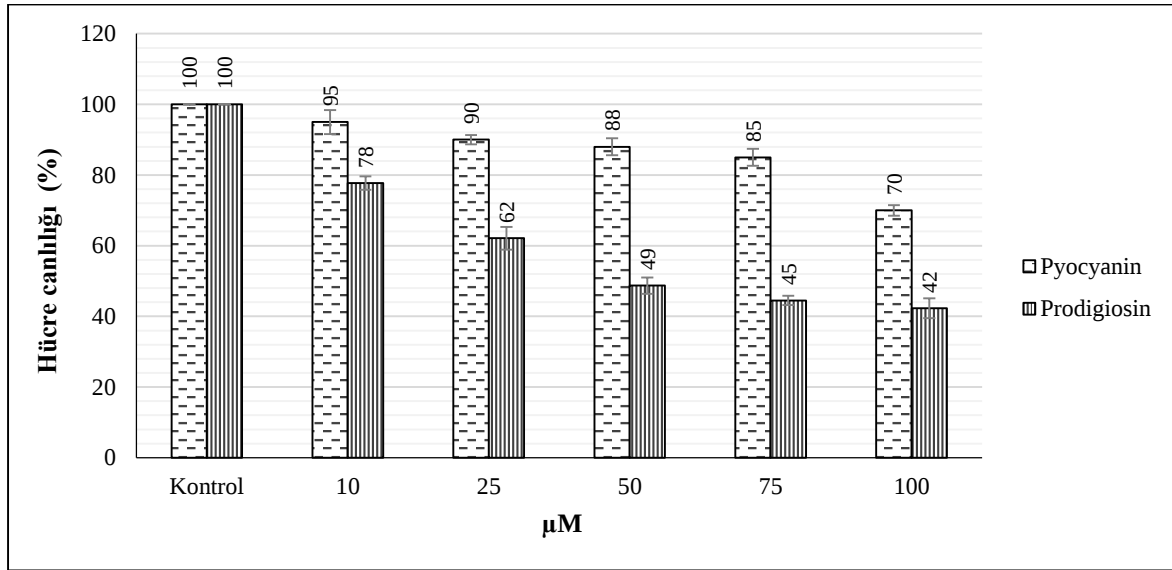
4.5.5. Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin SK-MEL-30 ve HT-29 kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri

Çalışmada, piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin insan deri kanseri hücresi (SK-MEL-30) ve insan kolon kanseri hücresi (HT-29) üzerinde denenen dozlarının antiproliferatif etki gösterip göstermediğinin belirlenmesi amaçlanmıştır ve bu çalışma MTT yöntemi ile yapılmıştır. Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentleri uygulanan SK-MEL-30 hücresinde artan pigment konsantrasyonlarına bağlı antiproliferatif etkinin de arttığı belirlenmiş ve maksimum etkinin 75 μ M ve 100 μ M konsantrasyonlarda olduğu görülmüştür (Şekil 4.23). Her iki pigmentin de SK-MEL-30 hücresinde birbirine yakın antiproliferatif etkisinin tespit edilmesine karşın, prodigiosin pigmentinin 100 μ M konsantrasyonda daha yüksek antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin SK-MEL-30 hücresi için IC₅₀ değerleri sırası ile 72 μ M ve 70 μ M olarak tespit edilmiştir.

HT-29 hücresine uygulanan piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin artan konsantrasyonlarda etkisinin arttığının gözlenmiş olmasına karşın, prodigiosinin piyosiyanine göre daha yüksek antiproliferatif etkisinin olduğu, piyosiyaninin antiproliferatif etkisinin dikkate değer olmadığı görülmüştür (Şekil 4.24). HT-29 hücresinde, piyosiyanin pigmentinin IC₅₀ değeri 179 μ M iken, prodigiosin pigmentinin IC₅₀ değeri 47 μ M olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre, prodigiosin pigmentinin piyosiyanine göre daha yüksek antiproliferatif etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak yapılan testlerde her iki hücrede pigmentler arasında anlamlı ($p<0,05$) bir fark olduğu belirlenmiş, bu sonuç deneysel olarak elde ettiğimiz sonuçları desteklemiştir. Benzer olarak artan konsantrasyonlarda her iki pigmentin her iki hücrede antiproliferatif etkisinin arttığı da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Tüm çalışmalarda sonuçlar, n:5'in ortalaması ve $\pm$ SD olarak, Şekil 4.23 ve 4.24'te verilmiştir.



Şekil 4.23. 10-100 µM konsantrasyon aralığında piyosiyenin ve prodigosin pigmentlerinin SK-MEL-30 hücrelerinde % hücre canlılığına göre antiproliferatif etkileri



Şekil 4.24. 10-100 µM konsantrasyon aralığında piyosiyenin ve prodigosin pigmentlerinin HT-29 hücrelerinde % hücre canlılığına göre antiproliferatif etkileri

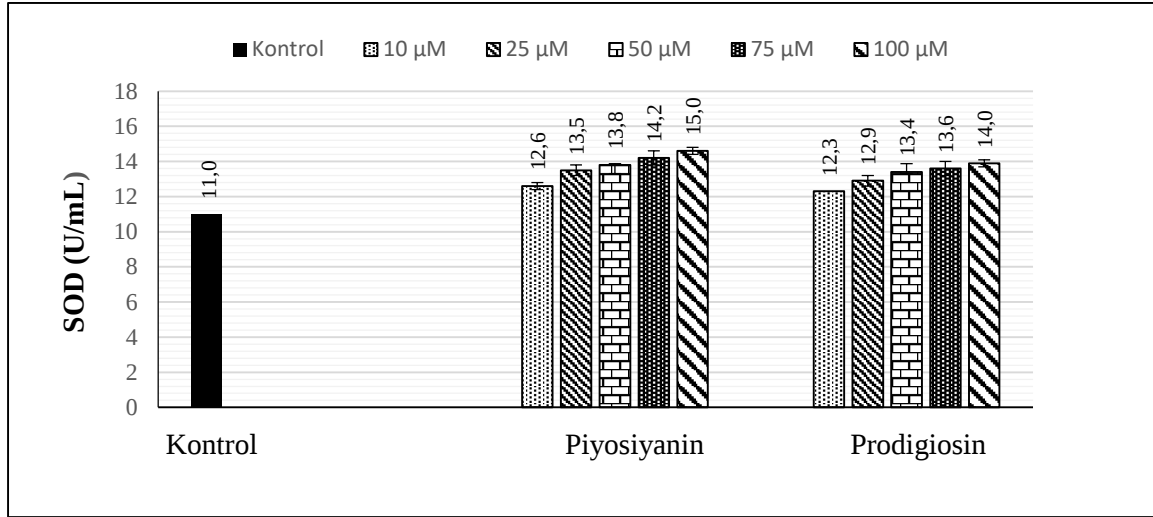
4.5.6. Piyosiyenin ve prodigosin pigmentlerinin antioksidan etkiye bağlı antikanser etkileri

Çalışmada, SK-MEL-30 ve HT-29 hücrelerine artan konsantrasyonlarda uygulanan piyosiyenin ve prodigosin pigmentlerinin, farklı kitlerle antioksidan etkilerinin ve oksidatif hasara karşı koruyucu etkilerinin olup olmadığının belirlenmesi amacı ile ELISA kullanılarak antioksidatif enzim aktivitesi ölçülmüştür. Oksidatif stresin, hücre ve doku hasarının patogeneğinde etkili olması sebebi ile oksidatif stresi azaltan ve bu stres sonucu

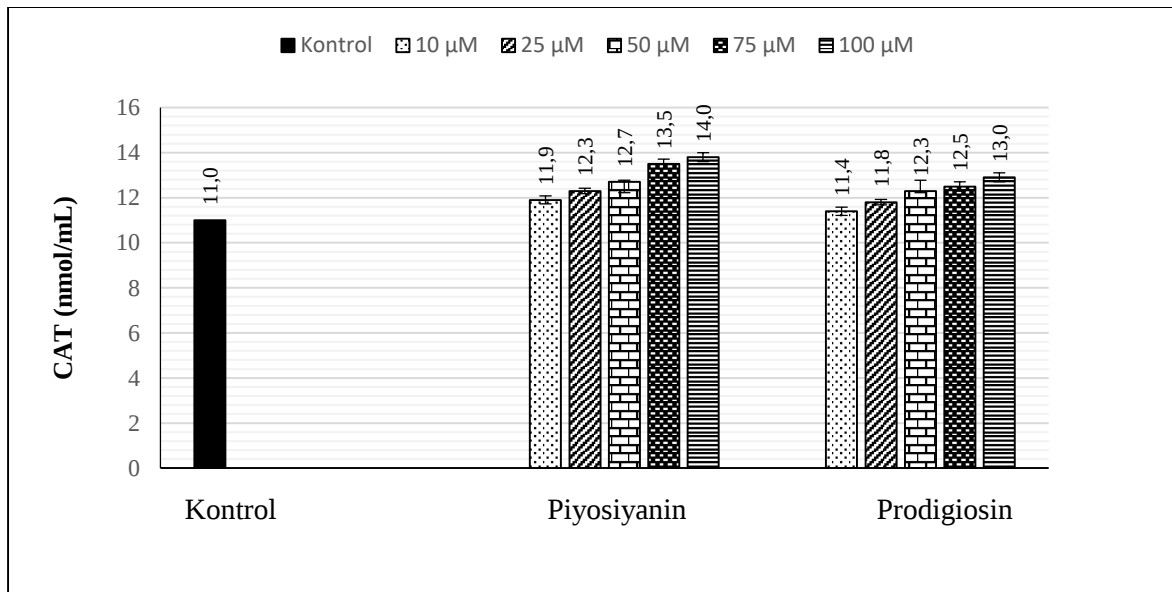
oluşan kanser gibi hastalıkları önleyen antioksidan maddeler oldukça önemlidir. SOD ve CAT enzimleri, canlı dokularda en çok bilinen önemli antioksidanlardandır. Serbest radikallerin oluşturduğu hasarların önlenmesinde, süperoksit dismutaz enziminin katalaz enzimi ile birlikte incelenmesi gerekmektedir. Çünkü SOD, süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir ve SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan hidrojen peroksit, katalaz tarafından moleküler oksijen ve suya dönüştürülerek, bu maddenin hücrede birikimi önlenmektedir. Bu çalışma, antioksidan etkiye sahip ve toksik olmayan, deri kanserinden koruyucu boyar madde geliştirmek, kolon kanserinde koruyucu ilaç etken maddesi ortaya koymak ve oksidatif hasarı önleyerek kolon kanserinden koruyucu boyar madde olabilecek pigmentleri belirlemek amacıyla yapılmıştır

Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin SOD ve CAT antioksidan enzim aktiviteleri ile deri kanseri hücresi üzerindeki antikanser etkisi

Bu çalışma, piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin deri kanserine karşı koruyucu veya deri kanserinden önleyici etken madde olup olmadığının ortaya konulması ve deri kanserine karşı koruyucu tekstil boyar maddesi olabilecek doğal boyar madde potansiyellerinin tespit edilmesi amacıyla yapılmıştır. SK-MEL-30 deri kanseri hücresine, besiyeri dışında hiçbir şey uygulanmamış kontrol grubunda SOD aktivitesi 11 U/mL ve CAT aktivitesi 11 nmol/mL olarak bulunmuştur. Piyosiyanin ve prodigiosin pigment uygulamalarının ardından SOD ve CAT aktivitesinin kontrol grubuna göre arttığı ve bu artışın da uygulanan pigment konsantrasyon artışıyla orantılı olduğu görülmüştür. Her iki pigmentin antioksidan etkilerinin birbirine yakın bulunmuş olmasına karşın, piyosiyanin pigmentinin daha etkili olduğu dikkat çekmiştir. 100 µM piyosiyanin uygulamasında SOD enzim aktivitelerinde ~%50, CAT enzim aktivitelerinde ~%40 oranında bir artış meydana geldiği gözlenmiştir. İstatistiksel olarak yapılan testler sonucunda pigmentlerin oksidatif hasara karşı koruyucu etkilerinin artan konsantrasyonlarda arttığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Sonuçlar, n:5'in ortalaması ve $\pm$ SD olarak, Şekil 4.25 ve 4.26'da sunulmuştur.



Şekil 4.25. SK-MEL-30 deri kanseri hücresine uygulanan piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin SOD aktivitesine etkisi

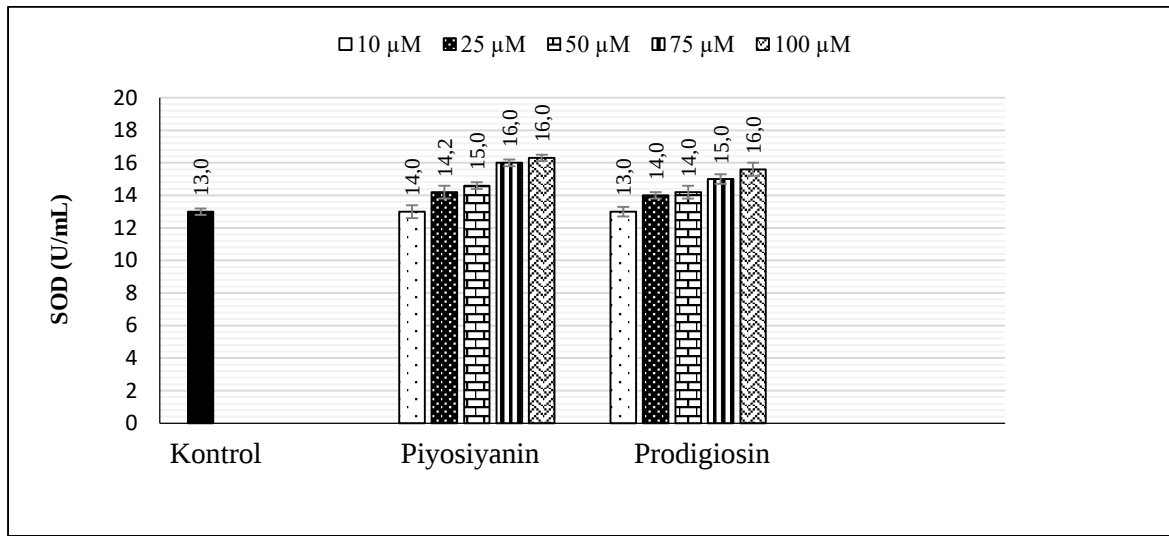


Şekil 4.26. SK-MEL-30 deri kanseri hücresine uygulanan piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin CAT aktivitesine etkisi

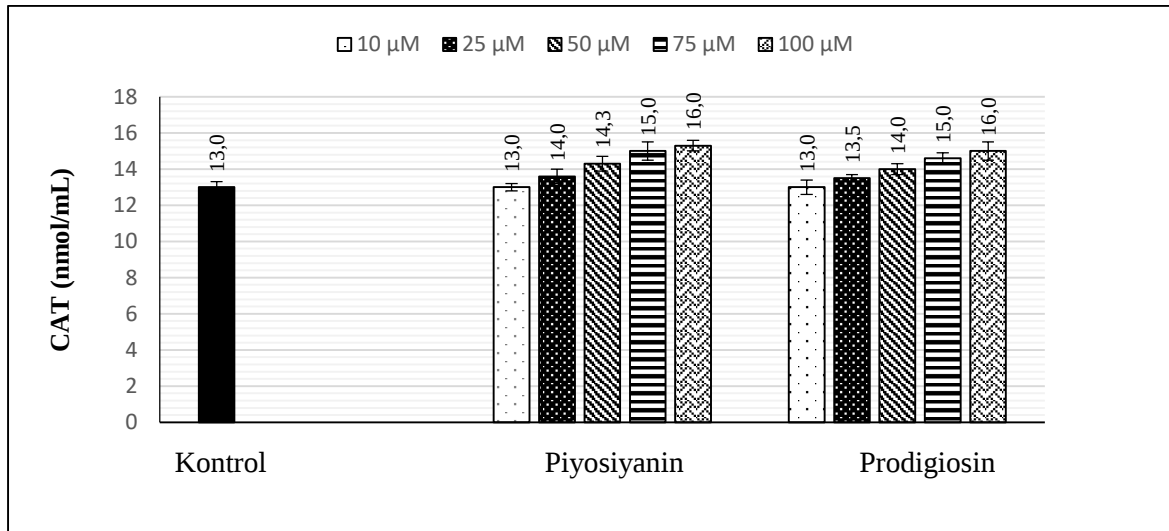
Piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin SOD ve CAT antioksidan enzim aktiviteleri ile kolon kanseri hücresi üzerindeki antikanser etkisi

HT-29 hücresine besiyeri dışında hiçbir şey uygulanmamış kontrol grubunda SOD aktivitesi 13 U/mL ve CAT aktivitesi 13 nmol/mL olarak bulunmuştur. Piyosiyenin ve prodigiosin pigment uygulamalarının ardından SOD ve CAT aktivitesinin kontrol grubuna göre arttığı ve bu artışın da uygulanan pigment konsantrasyon artışıyla orantılı olduğu görülmüştür. Her iki pigmentin sonuçları birbirine yakın bulunmuş olmakla birlikte

piyosiyanin pigmentinin daha çok öne çıktığı dikkat çekmiştir. 100 μM piyosiyanin uygulandığında SOD ve CAT enzim aktivitelerinde $\sim\%30$ 'luk bir artış görülmüştür. İstatistiksel olarak yapılan testler sonucunda pigmentlerin oksidatif hasara karşı koruyucu etkileri arasında anlamlı bir farklılık bulunmadığı tespit edilmiş ($p>0,05$) olup, bu sonuç deneysel olarak elde ettiğimiz sonuçları da destekler niteliktedir. Buna ek olarak artan konsantrasyonlarda her iki pigmentin de antioksidatif etkisinin arttığı istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Sonuçlar, n:5'in ortalaması ve $\pm\text{SD}$ olarak, Şekil 4.27 ve 4.28'de sunulmuştur.



Şekil 4.27. HT-29 kolon kanseri hücrelerine uygulanan piyosiyanin ve prodigosin pigmentlerinin SOD aktivitesine etkisi

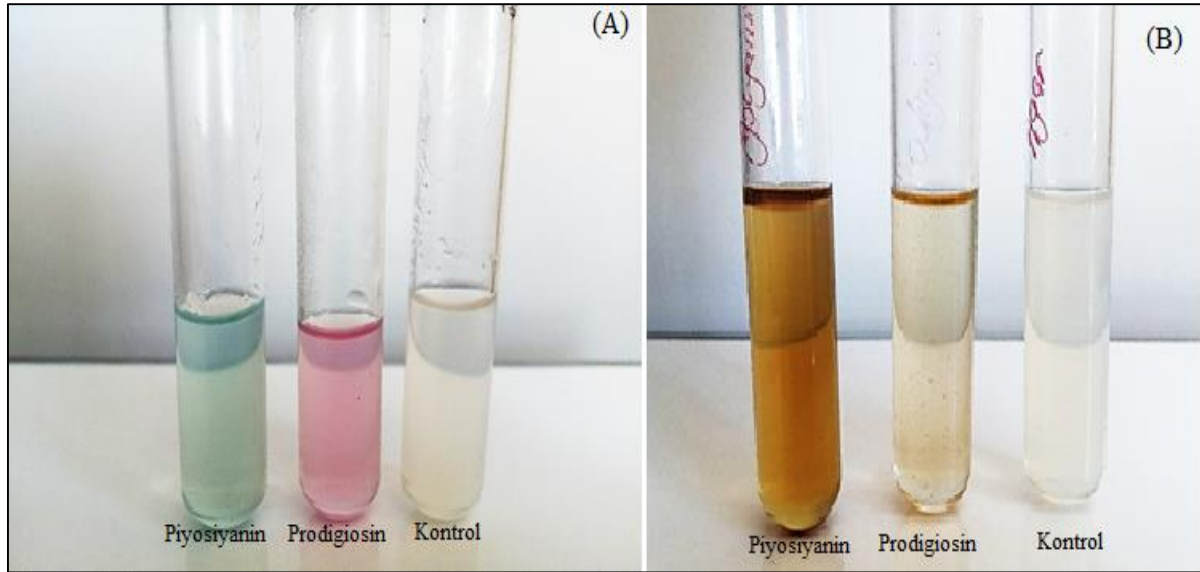


Şekil 4.28. HT-29 kolon kanseri hücrelerine uygulanan piyosiyanin ve prodigosin pigmentlerinin CAT aktivitesine etkisi

4.6. Piyosiyanin ve Prodigiosin Pigmentlerinin Endüstriyel Uygulamaları

4.6.1. Gıda uygulamaları

Bu çalışmada, piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin renk stabiliteğini koruyup korumadığını ve gıda endüstrisinde boyar madde olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda pigmentlerin 100°C’de renk stabilitesini koruduğu, 121°C’de otoklav sıcaklığında ise renklerini kaybettiği gözlemlenmiştir (Resim 4.7). Prodigiosin pigmentinin şeker hamuru uygulamasında, pigment mukus kıvamında olduğundan, beyaz renkli hamuru renklendirdiği ve artan pigment yoğunluğunda hamurdaki renklenmenin de arttığı belirlenmiş ve çalışmaya ilişkin fotoğraf Resim 4.8’de sunulmuştur. Piyosiyanin pigmenti ise, toz halde olduğundan suda çözülürülerek eklenmesi gerekmektedir. Sulandırılmış olan pigment şeker hamuruna eklendiğinde, şeker hamuru sıvılaşmış, yapısı bozulmuştur. Bu sebeple, piyosiyanin pigmentinin şeker hamuru renklendirmede kullanışlı olmadığı tespit edilmiştir.



Resim 4.7. Agarla katılaştırılmış pigmentlerin 100°C’de (A) ve 121°C’de (B) 15 dk. kaynatılmasının renk stabilitesine etkisi



Resim 4.8. Şeker hamuruna uygulanmış prodigiosin pigmentinin farklı derişimlerde hamurda oluşturduğu renk

4.6.2. Tekstil uygulamaları

Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin tekstil uygulamalarında kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi amacıyla, farklı derişimlerdeki pigmentler pamuklu beyaz kumaşlara uygulanmıştır. Yapılan uygulamayla, piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin, kumaşlarda boyar madde olarak kullanımları test edilmiştir. Çalışmada kullanılan 4000 μM piyosiyanin pigmenti ve 100, 1000, 2000 ve 4000 μM prodigiosin pigmenti ile boyanan kumaşlarda her iki pigmentin de kumaşa tutunabildiği ancak piyosiyanin pigmentinin prodigiosin pigmentine göre daha az boyama etkisi gösterdiği belirlenmiş ve çalışmaya ilişkin fotoğraf, Resim 4.9’da verilmiştir.



Resim 4.9. Farklı derişimlerde uygulanan prodigiosin ve piyosiyanin pigmentlerinin pamuklu kumaşa boyar madde olarak uygulaması

4.6.3. Kozmetik uygulamaları

Bu çalışmada şeffaf bir tırnak cılasına uygulanan prodigiosin pigmentinin kozmetikte renklendirici olarak kullanılabilirliği belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan prodigiosin pigmentinin uygulama yapılmış kozmetik ürününün yapısında şekilsel bir değişiklik meydana getirmeden renklendirdiği Resim 4.10'da görülmektedir. Piyosiyanin pigmenti, toz halde olması sebebiyle oje içerisinde tam olarak çözünemediğinden, şeffaf ojede belirgin bir renklenme göstermemiştir.



Resim 4.10. Şeffaf ojeye uygulanmış prodigiosin pigmentinin ojede oluşturduğu pembe renk

5. TARTIŞMA

Sentetik renklendiricilerin istenmeyen etkilerinden dolayı son zamanlarda, gıdanın doğadan elde edilen pigmentlerle renklendirilmesi ile ilgili araştırmalar dünya çapında önem kazanmıştır (Darshan ve Manonmani, 2015). Sentetik renklendiricilerin astım, deri döküntüleri, migren, erken doğum, kanser ve kromozom hasarı gibi rahatsızlıklara yol açtığı belirtilmiştir (Omaye, 2004). Sentetik boyar maddelerin zararlı etkilerine ortadan kaldırmak için, mikrobiyal kaynaklı pigmentler oldukça iyi bir alternatif oluşturmaktadır (Nair, Kumar ve Geo, 2017). Mikrobiyal pigmentler, toksik olmayan, karsinojenik etki göstermeyen hatta antikanser aktivite gösterebilen, farmalojik ve doğada giderilebilir maddelerdir (Venil, Zakaria ve Ahmad, 2013). Mikroorganizmalar, kolay üremeleri ve kısa sürede daha fazla pigment üretim kapasitesine sahip olmaları nedeniyle son zamanlarda, organik pigment eldesinde oldukça önem kazanmıştır. Mikrobiyal pigmentlerin üretimlerinin kolay olması, basit çözücüler kullanılarak ekstrakte edilebilmeleri, toksik olmasının aksine pek çok biyoaktif özellik göstermeleri nedeniyle endüstride renklendirici olarak önemli olduğu düşünülmektedir (Darshan ve Manonmani, 2015).

Piyosiyanin ve prodigiosin gibi bakteriyel pigmentler; antibakteriyel, antimalaryal, antifungal, antitümör ve ilaca dirençli kanser hücre hatlarına karşı antikanser aktiviteye sahip yeni bir bileşik grubu olarak kabul edilmektedir. Prodigiosin, insan melanoma hücrelerine, türevi olan sikloprodigiosinden daha iyi bir antikanser aktivite göstermektedir (Lee ve diğerleri, 2011; Shaikh, 2016). Piyosiyanin pigmentinin de içinde bulunduğu fenazin bileşiklerin ise, tümör hücreleri gibi kontrolsüz büyüyen hücrelere daha güçlü etki ettikleri, sağlıklı hücrelere karşı toksik olmadıkları rapor edilmiştir (Moayedi, Nowroozi ve Sepahy, 2018).

Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin biyoteknolojik olarak endüstriyel alanlarda kullanılabilmesi amacıyla, tanımlanmış olan bakterilerin optimum üreme koşullarının ve maksimum pigment üretimi sağladığı ortamların belirlenmesi amacıyla farklı içerikte besiyerleri denenmiş ve bakterilerin farklı koşullarda hücre yoğunlukları ve pigment üretimleri izlenmiştir. *P. aeruginosa* MB713 suşu, NB ve MFDm besi ortamlarında, çalkalamalı ve çalkalamasız koşullarda, 1 ile 7 günlük inkübasyon sonunda en iyi gelişimi MFDm (Modifiye Frank and DeMoss) besi ortamında, çalkalamalı koşullarda ve 6 günlük inkübasyonda göstermiş ve 7. günde ölüm fazına geçmiştir. NB besi ortamında ise, en iyi

gelişim 5. gün olarak belirlenmiştir. Aynı koşullarda, piyosiyanin pigmentinin absorbanası ölçülerek değerlendirildiğinde, piyosiyanin pigmentinin en iyi üretimi MFDm besiyerinde, çalkalamalı ortamda, 6 günlük inkübasyonda gösterdiği tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* MB713 suşunun en iyi gelişim süresi ile en iyi pigment üretim süresinin paralellik gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda en iyi pigment üretimi, logaritmik fazın sonunda tespit edilmiştir. Yapılan literatür çalışmalarında, piyosiyanin pigmentinin, büyümenin logaritmik fazından sonra maksimum seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir (Harris, 1950; Kurachi, 1958; Frank ve DeMoss, 1959; Gahlout, Chauhan, Patel ve Solanki, 2017; Hizbullahi ve diğerleri, 2018). Bakterilerde, büyümenin son aşamalarında, hücre gelişimi sırasında oluşan toksik öncüllerin birikmesiyle ölüm başlar. Sekonder metabolitlerin biyosentezi, besi ortamında biriken toksik maddeleri, hücrelerin ömrünü uzatan bir son ürüne dönüştürür (Krishna, Basheer, Elyas ve Chandrasekaran, 2011). Bu sebeplerden ötürü bakterinin bu metabolitleri üretimlerinin artırılması gerek bakteri gerek endüstriyel alanlardaki çalışmalar için önemlidir.

S. marcescens MB703 suşu NB (150 rpm), gliserol içeren (%1 ve %2) (150 rpm) ve NA besi ortamlarında 1 ile 7 günlük inkübasyon sonunda en iyi gelişimi %2 gliserol içeren NB besi ortamında 4. günde göstermiştir ve 5. günde ölüm fazına geçmiştir. Suşun diğer besi ortamlarında en yoğun üreme gösterdiği süreler ise, %1 gliserol içeren NB besi ortamında 2. gün, NB’de ise 6. gün olarak belirlenmiştir. Bakteri, besi ortamına eklenen maddeye ve maddenin miktarına göre gelişimde farklılık göstermiştir. Ancak pigment üretimine bakıldığında, C kaynağı olarak gliserol içeren (%1 ve %2) NB besi ortamında pigment üretimi gözlenmezken, gliserol içermeyen NB besi ortamında pigment üretimi gözlenmiştir. Ortama eklenen gliserolün hücre yoğunluğunu artırmasındaki sebep, yabancı cinslerin gliserolü C kaynağı olarak kullandıklarında daha hızlı büyümesi olarak açıklanabilir (Kisumi, Komatsubara ve Chibata, 1977). Ortamda tek bir C kaynağının bulunması durumunda, *S. marcescens* bakterisinin iyi üreme gösterdiği (Venil ve Lakshmanaperumalsamy, 2009), ortamda yalnızca N kaynağı ve inorganik tuzların bulunması durumunda ise kendini korumak için sekonder metabolit olan prodigiosin pigmentini ürettiği (Khanafari, Assadi ve Fakhr, 2006) bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda da, *S. marcescens* MB703 suşunun, ortamda C kaynağı bulunması durumunda öncelikle hücresel artışa gittiği, C kaynağının bulunmadığı, yalnızca N kaynaklarının ve tuzun bulunduğu NB besiyerinde prodigiosin pigmentini yoğun şekilde ürettiği belirlenmiştir. En yoğun pigment üretimini ise katı besi ortamında göstermiştir.

Besi ortamında bulunan C kaynaklarının, bakteri gelişimi üzerinde farklı etkilere sebep olduğu düşünülmektedir. ortamda yalnızca azot kaynağının ve inorganik tuzların bulunduğu durumda ise kendini korumak için sekonder metabolit olan prodigiosin pigmentini yoğun şekilde ürettiği düşünülmektedir.

P. aeruginosa MB713 suşunun maksimum pigment üretim ortamını belirlemek için NB ve MFDM besiyerleri ile çalışılmıştır. NB besi ortamında yalnızca azot kaynağı (maya özütü ve et özütü) ve sodyum klorür (NaCl) bulunurken, MFDM besi ortamında azot kaynağı (L-fenilalanin), karbon kaynağı (gliserol) ve inorganik tuzlar (FeCl_2 , K_2HPO_4 , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, K_2SO_4) bulunmaktadır. Maksimum pigment üretimi MFDM besi ortamında belirlenmiştir (51 $\mu\text{g/mL}$). Kullanılan modifiye besi ortamında bulunan demir (Fe), magnezyum (Mg), fosfat (PO_4) ve sülfat (SO_4) bileşiklerinin pigment üretimini indüklediği düşünülmektedir. Literatürlerde, besi ortamına eklenen fosfat bileşiğinin pigment üretimi gibi sekonder metabolitlerin üretimini indüklediği bildirilmiştir (Frank ve DeMoss, 1959; Whooley ve McLoughlin, 1982). Düşük konsantrasyonda fosfat iyonu bulunan besi ortamına, yeterli sülfat iyonu eklendiğinde piyosiyenin üretimi indüklenmektedir (Cox, 1986). Buna ek olarak bu pigmentin sentezi, demir konsantrasyonunun kontrolü altında görünmektedir; çünkü düşük fosfat içeren bir ortama demir eklenmesi, diğer bakteri türleri tarafından piyosiyenin ve ilgili fenazın pigmentlerinin sentezini uyarmaktadır (Cox, 1986; Li, Mou, Feng ve Leung, 2018). Bu iyonlara ek olarak ortamda magnezyum iyonunun bulunmasının da piyosiyenin üretimi üzerinde pozitif etkiye sahip olduğu Li ve diğerleri (2018)'nin yaptığı çalışmayla ortaya konmuştur.

Maksimum piyosiyenin üretimini sağlayan besi ortamlarında bulunan maddelerin; PO_4^{3-} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , gliserin, lösin ve DL-alanin olduğu bildirilmektedir (Ohfuji ve diğerleri, 2004; Hernandez, Kappler ve Newman, 2004; Frank and DeMoss, 1959). Barakat, Mattar, Sabae, Darwesh ve Hassan (2015)'nin NB ve farklı kaynaklar içeren besiyerlerini kullandığı çalışmada, piyosiyenin miktarını 5,28 (NB besi ortamı)-11,74 $\mu\text{g/mL}$ olarak bildirmişlerdir. Barakat ve diğerleri (2015)'nin elde ettikleri piyosiyenin miktarının, çalışmamızda *P. aeruginosa* MB713 suşunun NB besiyerinde piyosiyenin üretim miktarı (10 $\mu\text{g/mL}$) ile Barakat ve diğerleri (2015)'nin, El-Fouly ve diğerleri (2015)'nin ve Gahlout ve diğerleri (2017)'nin elde ettikleri sonuçlardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Pigment üretimindeki farklılığın, çalışmada kullanılan suş farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

S. marcescens MB703 suşunun, NB ve NA besi ortamlarındaki 1-7 günlük inkübasyonda Quorum Sensing (QS) sonucu ürettiği hücre içi pigment olan prodigiosin pigmentinin en iyi üretimi, NB besi ortamında 6. günde, NA'da ise 6. ve 7. günlerde belirlenmiştir. NB besi ortamında maksimum pigment üretimini 6. günde gösteren *S. marcescens* MB703'in pigment üretim süresi katı besi ortamı ile paralellik göstermiş, 6. günden sonra bakterinin litik faza geçtiği ve daha yoğun pigment üretimi gerçekleştiremediği tespit edilmiştir (13 mg/L). Krishna, Basheer, Elyas ve Chandrasekaran (2011) tarafından yürütülen sıvı besi ortamındaki prodigiosin üretimi çalışmalarında, prodigiosin üretiminin 0,084-38,32 µg/L olarak tespit edilmiş, sonuçlar çalışmamızda elde ettiğimiz pigment miktarından (13 mg/L) çok daha düşük bulunmuştur. *S. marcescens* MB703 suşunun, katı besi ortamından elde edilen prodigiosin miktarının (72 mg/L), sıvı besi ortamından elde edilen pigment miktarına (13 mg/L) göre daha yoğun olduğu ortaya konmuştur. Hücre içi pigment olan prodigiosinin, agarı renklendirmemesi de katı ve sıvı besi ortamına göre pigment üretiminin karşılaştırılmasında etken rol oynamaktadır. Katı ortamlarda üreyen mikroorganizmalar, yüzeye daha iyi tutunduğundan ötürü daha kuvvetli bir şekilde gerçekleşmektedir (Stankovic, Senerovic, Ilic-Tomic, Vasiljevic ve Nikodinovic-Runic, 2014; Nassif, Roux, Coradin, Bouvet ve Livage, 2004). QS mekanizması ile katı yüzeylere bakteriler daha iyi bir şekilde tutunduğundan, NA besiyerindeki kolonilerin daha iyi pigment ürettiği düşünülmüştür. Bu QS mekanizmasının artması, bakteriler arasındaki iletişimi artırdığından, katı yüzeydeki kolonilerin daha iyi pigment ürettiği düşünülmektedir. Benzer yöntemle yapılan ekstraksiyonda pigment miktarının yüksek olmasının, pigment üretiminde azot kaynağının, karbon kaynağından daha büyük bir öneme sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmalarda bakterilerin aynı koşullarda üretilmesine karşın, suş farklılığının ve/veya ekstraksiyonda kullanılan çözücülerin farklı olmasının pigment miktarını etkilediği öngörülmektedir.

Tez çalışmasında, NB ve MFDM besi ortamlarında, çalkalamalı ve çalkalamasız koşullarda piyosyanin miktarında meydana gelen değişiklik izlenmiş ve her iki besi ortamında da çalkalamalı koşullarda piyosyanin üretiminin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmada en yüksek miktarda piyosyanin üretimi, MFDM besi ortamında, çalkalamalı koşullarda olduğu tespit edilmiştir (51 µg/mL). Besiyerinin yüzeyi hava ile temas ettiği için, oksijen buradan içeri difüzyonla girerek erir ve üst kısımları, dip kısımlara oranla oksijence zengin hale gelir. Bu nedenle de, sıvı besi yerlerinin yüzeyi, diplerinden, daha fazla oksijene sahiptir. Aerobik mikroorganizmaların sıvı kültürün her

tarafında eşit dağılımı ve iyi üremesi için, besi yerinin belli aralıklarla hafifçe çalkalanması (aerasyon) gerekmektedir. *P. aeruginosa* MB713 suşu aerobik bir bakteri olduğundan, çalkalama işlemi ile sağlanan oksijen döngüsü hem bakteri gelişimini hem de pigment üretimini artırmıştır. Kurachi (1958), hem bakteriyel büyüme hem de piyosyanin üretiminin kültürün havalandırılmasıyla oksijenlenmeye bağlı (aerasyon veya çalkalama) artırabildiğini tespit etmiştir (Kurachi, 1958). Suryawanshi ve diğerleri (2014)'nin yapmış oldukları çalışmalar da, çalkalamanın pigment üretimi üzerinde etkili olduğunu ortaya koymuş (Suryawanshi ve diğerleri, 2014) ve elde ettiğimiz bulguları desteklemiştir.

Tez çalışmasında, optimum koşullarda üretilen pigmentlerin tanımlanması amacıyla, UV-Visible, FT-IR ve GC-MS analizleri yapılmıştır. Pigmentlerin karakterizasyonunda kullanılan UV-Visible spektrofotometre analizinde piyosyanin pigmenti için maksimum absorpsiyon 278 nm'de görülmüştür. Bu nm'de, piyosyanin pigmenti varlığında pik gözlenmektedir. Yapılan pek çok literatür çalışmasında 278 nm'de görülen piki piyosyanine ait olduğu ortaya konmuştur (Kerr ve diğerleri, 1999; Sudhakar, Karpagam ve Shiyama, 2013; Dahah, Djibaoui ve Nemmiche, 2016). Prodigiosin pigmentinin UV-Visible spektrofotometrik analizi incelendiğinde, analiz sonucunda maksimum absorbans 272 ve 538 nm bulunmuş ve bu piki prodigiosin varlığında görüldüğü belirlenmiştir. Azambuja, Feder ve Garcia (2004)'da, 272 ve 538 nm'de maksimum piki veren maddenin prodigiosin olduğunu doğrulamıştır. Lapenda, Silva, Vicalvi, Sena ve Nascimento (2015)'nin çalışmaları da, elde edilen bu bulguları desteklemektedir.

Piyosyanin (N metil-1-hidroksifenazin), 2 alt birim içerir. GC-MS Kromatografisi ile yapılan piyosyanin analizinde, 168 m/Z'de ve 196 m/Z'de yoğun moleküler iyon zirvesi tespit edilmiştir. Kütle spektrum analizinde 168 m/Z'de keskin bir tepe noktası gösteren madde bir fenazin bileşiği, 196 m/Z'de keskin bir tepe noktası gösteren madde ise, l-hidroksifenazin (hemipiyosyanin) olarak belirlenmiştir. Analiz sırasında 168 m/Z'de ve 196 m/Z'de aynı anda tespit edilen piklerin varlığı, GC-MS sırasında l-hidroksifenazin'e dönüşen piyosyanin pigmentinin varlığını ortaya koymaktadır. Yapılan literatür çalışmalarında, GC-MS analizinde elde edilen pikler, yapmış olduğumuz piyosyanin analizi sonuçlarını desteklemektedir (Watson, MacDermot, Wilson, Cole ve Taylor, 1986; Abdul-Hussein ve Atia, 2016; Kerr ve diğerleri, 1999; Barakat ve diğerleri, 2015). Prodigiosin pigmentinin varlığı GC-MS analizi ile saptanamamış ancak, çalışmada

kullanılan GC-MS analiz koşulları değiştirilerek denemeler yeniden yapılması gerektiği düşünülmüştür.

Piyosiyanin pigmentinin FT-IR analizinde, 1620 cm^{-1} 'de gösterilen tepe, piyosiyanin varlığı için spesifik olan C=N bağının varlığını göstermektedir. Tespit edilen diğer tepe noktalarında ise 3462 cm^{-1} 'de O-H bağı ve 2953 cm^{-1} 'de C-H- aromatik bağının bulunduğu pikler piyosiyanin pigmentinin fonksiyonel gruplarını ortaya koymuştur. Analiz sonucunda elde edilen tepe noktaları ve bu tepe noktalarında tespit edilen bağlar, piyosiyanin karakterizasyonunun ortaya konduğu literatürlerle desteklenmiş (Laxmi ve Bhat, 2016; Moayedı, Nowroozı ve Sepahy, 2018) ve analizler sonucunda ekstraktta ana molekül olarak piyosiyanin pigmentinin varlığı gösterilmiştir. Prodigiosin pigmentin FT-IR analizi sonucunda ise, prodigiosin pigmenti için spesifik olan pirol halkasının varlığı 1635 cm^{-1} 'deki tepe noktasında tespit edilmiştir. FT-IR analizinde pirol halkası varlığı sonucunda tanımlanan prodigiosin pigmenti için tespit edilen diğer fonksiyonel grup; 2920 cm^{-1} 'deki metil grubu olarak belirlenmiştir. Elmenshawey, Abdelrazak, Mowafey ve Osman (2017)'nin yapmış oldukları çalışmada molekül yapısında pirol ve metil'in bulunması, prodigiosin varlığı olarak yorumlanmıştır. Suryawanshi ve diğerleri (2014) tarafından elde edilen verilerle çalışmamızda bulduğumuz FT-IR sonuçları, prodigiosin içinde mevcut olan fonksiyonel gruplar açısından benzerlik göstermiştir. Sonuçlar, Cang ve diğerleri (2000)'nin yapmış olduğu çalışma ile de uyumlu bulunmuştur. FT-IR analizi ve spektroskopik analiz, ekstraktta ana molekül olarak prodigiosin varlığını ortaya koymuştur.

Tez çalışmasında kullanılan pigmentlerin toksik olmaması, tez kapsamında yapılmış olan çalışmalarda uygulanan dozların ve etkilerinin yorumlanabilmesi açısından önemli görülmüş ve yapılacak olan diğer çalışmalarda öngörü sağlaması için pigmentlerin sağlıklı hücreler (SHSY-5Y nöroblastoma ve L929 fare fibroblast hücreleri) üzerinde sitotoksitelerine bakılmıştır. Tez çalışmamız sırasında piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin sitotoksik etkilerinin olup olmadığı, SHSY-5Y nöroblastoma ve L929 fare fibroblast hücrelerinin canlılıkları üzerindeki etkileri incelenerek belirlenmiştir. Sonuçlarımızda, her iki pigmentin de konsantrasyon ile doğru orantılı olarak hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. ISO 10993-5 standartlarına göre, *in vitro* olarak test edilen kimyasalların sitotoksik etki düzeylerini belirlemek için dört nitel sınıflandırma grubu temel alınmıştır. Bu standartta yüksek derecede sitotoksik etki gösteren maddelerin toplam hücre konsantrasyonunun %50'nin üzerinde hücre ölümüne sebep olduğu

belirtilmişken, orta derecede sitotoksik etki gösteren maddelerin, %50-79; hafif sitotoksik etki gösteren maddelerin, %80-89; sitotoksik olmayan maddelerin ise %90'a eşit veya daha fazla hücre canlılığı sağladığı belirtilmiştir (ISO, 2009). Belirtilen ISO standartlarına göre, uygulanan bakteriyel pigmentlerden piyosiyenin pigmenti, her iki hücreye de uygulanan en yüksek konsantrasyonda (100 μM) dahi %50'nin üzerinde hücre ölümüne sebep olmazken, prodigiosin pigmentinin 100 μM konsantrasyondaki uygulamalarının L929 fibroblast hücresi için toksik olduğu tespit edilmiştir. US NCI bitki tarama programına göre, ham bitki özütlerinin *in vitro* sitotoksik etkinliğe sahip olması için, hücrelerin %50'sinin ölümüne sebep olan konsantrasyonun $\leq 20 \mu\text{g/mL}$ olması gerekmektedir (Sriwiriyaajan ve diğerleri, 2014). Ancak prodigiosin pigmenti ile yapılan bir çalışmada elde edilen bulgulara göre, nöroblastoma hücresine 24 saat 0-7 μM derişimlerde uygulamaları yapılmış olan prodigiosin pigmentinin IC_{50} değeri 1,7 μM olarak bulunmuş ve bu pigmentin SHSY-5Y için yüksek toksisiteye sahip olduğu ifade edilmiştir (Francisco ve diğerleri, 2007). Prodigiosin pigmenti ile yapılan bu çalışma dışında başka bir SHSY-5Y sitotoksikite çalışmasına rastlanmamıştır. Bu sebeple yaptığımız çalışma, bu çerçevede çalışacak olan araştırmacılar için oldukça önemlidir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada nöroblastoma hücresine 18 saat uygulanan prodigiosin pigmentinin IC_{50} değeri 130 μM olarak belirlenmiş ve ISO 10993-5 standartlarına göre toksik olmayan bir madde olarak kabul edilebilir olduğu düşünülmüştür. L929 fare fibroblast hücresine yapılan farklı konsantrasyonlardaki piyosiyenin ve prodigiosin pigmentleri uygulamalarında Laxmi ve Bhat (2016)'ın yapmış olduğu çalışmaya göre, piyosiyenin pigmentinin uygulanmış olduğu L929 fare fibroblast hücrelerine sitotoksik etki göstermediği ortaya konmuştur. Bu sonuç, çalışmalarımız doğrultusunda elde ettiğimiz verileri doğrular niteliktedir. Prodigiosin pigmenti için Deorukhkar, Chander, Ghosh ve Sainis (2007) tarafından yürütülen çalışmada, L929 hücre hattına 0,01-10 μM konsantrasyonlarda 48 saat uygulanan prodigiosin türevi bir pigment, hücre hattı üzerinde toksik etki göstermemiştir. Çalışmamızda, prodigiosin pigmentinin 18 saatlik uygulamasında aldığımız canlılık sonuçları ile Deorukhkar, Chander, Ghosh ve Sainis (2007)'nin yapmış olduğu çalışmadaki canlılık sonuçları paralellik göstermektedir.

Tez çalışması kapsamında, SHSY-5Y nöroblastoma hücrelerinde oksidatif hasar yolu ile AChE aktivitesi artırılmış hücre modeli oluşturulmuştur. Uygulanan 150 μM H_2O_2 'nin AChE enzimini aktive ederek nöroblastoma hücrelerindeki AChE seviyesini hiçbir uygulama yapılmamış olan kontrol grubuna göre ~%50 artırdığı tespit edilmiştir. Enzim

seviyesindeki artışın, kontrol grubundaki AChE seviyesine göre farkı, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.21). Hücrelerde, H_2O_2 gibi oksidatif hasara sebep olan ROS maddeler ile teşvik edilen oksidatif stresin, AChE aktivitesi üzerinde indükleyici etki gösterdiği farklı çalışmalarla kanıtlanmıştır (Zhang ve diğerleri, 2008; Molochkina, Zorina, Fatkullina, Goloschapov ve Burlakova, 2005; Bond ve diğerleri, 2006; Garcia-Ratés, Lewis, Worrall ve Greenfield, 2013; Jiang, Zhang, Zhu, Li ve Zhang, 2007). Ayrıca, en kararlı ROS olan H_2O_2 'in, hücre zarlarından kolayca geçebildiği ve çeşitli proteinlerin değişmesine neden olarak hücrede hasar oluşturabildiği, hücre membran yapısını ve aktivitesini değiştirerek, hücre içinde AChE artışına sebep olduğu gösterilmiştir (Li ve Jackson, 2002; Waldron ve Rozengurt, 2000; Knapp ve Klann, 2000; Molochkina ve diğerleri, 2005).

AChE, mitokondrilerde hücresel solunum sonucu oluşan ürünlerden biri olarak bilinen asetil koenzim A (Asetil Ko A) ve lipid metabolizmasında görev alan kolinden türetilen bir nörotransmitter olan ACh (Asetilkolin)'nin sinaptik boşlukta serbest bırakılması sonucunda oluşan sinirsel impulsu hızla sonlandırmakla görevli olan bir enzimdir. AChE enzim aktivitesinin artması ve bu artışa bağlı olarak ACh miktarının azalması sonucunda, nöron kaybı gerçekleşir. Bu nöron kayıpları öncelikle Alzheimer (AH) olmak üzere pek çok nörodejeneratif hastalığa sebep olur (Schumacher ve diğerleri, 1986; Francis, Palmer, Snape ve Wilcock, 1999; Şahin, 2002). En sık görülen nörodejeneratif hastalık olan Alzheimer'da en önemli patolojik belirteçlerden biri, kolinerjik iletim kaybına sebep olan AChE enziminde gözlenen artıştır (Mufson, Counts, Perez ve Ginsberg, 2008). Bu nedenle AH'nin tedavisinde/önlenmesinde etkili olabilecek ajanların, AChE-i (AChE inhibitör) özellik göstermeleri önemlidir. Mevcut AChE-i ilaçların, nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde tam anlamıyla başarı sağlayamadığını ve nörodejeneratif hastalıklar için tespit edilecek etken maddelerin tek bir mekanizma üzerinden etkili olmasının yeterli olmayacağını belirten literatürler bulunmaktadır (Birks, 2006; Bakar ve Yuluğ, 2009; Sherwin, 2000, Chertkow, 2002). Yine de bugün AH'nin ilaçla tedavisinde en geçerli stratejinin AChE inhibisyonu olması nedeniyle, nörodejeneratif hastalıklar üzerinde etkin maddelerin keşfi için AChE-i özellik önemli bir belirteçtir (Anand, Gill ve Mahdi, 2014). Ayrıca, hepatoselüler karsinomada (HCC) (Montenegro ve diğerleri, 2006), skuamöz hücreli karsinomada ve retinoblastomada (Qavi ve Al-Rajhi, 2009) kolinesterazların baskılandığı belirlenmiştir. Zhao ve diğerleri (2011), HCC hastalarının % 69,2'sinin kanser dokularında, AChE'nin önemli ölçüde baskılanmış olduğunu ve kanser hastalarında düşük

seviyelerde ifade edilen AChE'nin; tümör yayılması, kanserin ameliyat sonrası tekrarlama riski ve kanser hücrelerinde düşük canlılık oranı ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Koçancı ve Aslım, 2016). Çalışmalar, AChE'nin hücre çoğalmasını, ilgili sinyal yollarını ve HCC hücrelerinin duyarlılıklarını düzenlemek suretiyle, tümör gelişimini baskılayan bir işlevinin olduğunu vurgulamaktadır (Anand, Gill ve Mahdi, 2014). Çalışmamız kapsamında, 10, 25, 50, 75 ve 100 μM piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin *in vitro* ve H_2O_2 ile AChE indüklenmiş hücresel modelde gösterdikleri AChE inhibisyon sonuçları paralellik göstermektedir (%10-38). *In vitro* çalışmalar sonucunda en yüksek AChE inhibisyonu piyosiyenin pigmentinde ve 100 μM konsantrasyonda (%38 AChE inhibisyonu) gözlemlenmiştir. Hücre modelinde yapılan çalışmada ise H_2O_2 ile indüklenmiş AChE enziminde baskılama ~%40 olarak belirlenmiş ve AChE miktarı, indüklenmemiş kontrol grubundan da az miktarda bulunmuştur. Bulgularımız, piyosiyandeki AChE-i özelliğin konsantrasyon ile doğru orantılı şekilde arttığını ve maksimum inhibitör etkinin denenen en yüksek konsantrasyon olan 100 μM 'da olduğunu göstermiştir. Prodigiosin pigmentinin ise AChE'ı inhibe etmediği, *in vitro* ve hücresel çalışmalarla ortaya konmuştur. Piyosiyenin pigmentinin düşük molekül ağırlıklı ve zwitter iyon özelliği, ökaryotik sistemlerde hücre zarlarından geçişte kolaylık sağlamaktadır (Patil ve diğerleri, 2017). 210 Da molekül ağırlığına sahip piyosiyenin pigmentinin (Watson ve diğerleri, 1986) AChE inhibisyon etkisinin, hücre zarından geçebilecek kadar küçük ve redoks aktif bir bileşik olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu pigmentlerle daha önce yapılan herhangi bir AChE inhibisyon çalışması bulunmadığından, bu tez çalışması, bu kapsamda çalışacak olan araştırmacılara öncü bir çalışma niteliği taşımaktadır.

Çalışmamız kapsamında, piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin hücresel AChE inhibisyon etkileri incelenmiştir. Pigmentlerin, nörodejeneratif hastalıklara karşı güvenilir bir şekilde kullanılıp kullanılamayacağını belirlemek amacıyla, piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin H_2O_2 kaynaklı AChE indüksiyonunu giderici özellikleri incelenmiştir. Pigmentlerin, hücresel AChE inhibitör etkisi ve H_2O_2 kaynaklı AChE indüksiyonundan koruyucu özelliklerinin olup olmadığının belirlenmesi için, hücresel AChE indüksiyonu engelleyici etkisi incelenmiştir (Şekil 4.21). Sonuçlara göre, hücresel AChE artışının, kolinerjik iletim kaybına sebep olarak, nörodejeneratif süreçlerde etkili olduğunu gösteren çalışmalar (Francis, Palmer, Snape ve Wilcock, 1999; Wenk, 2003; Temiz ve Kargın, 2019) dikkate alındığında, her iki pigmentin de nörodejeneratif hasara sebep olmadığı, yalnızca piyosiyenin pigmentinin nörolojik hasarlara karşı güvenilir bir

şekilde kullanımının mümkün olabileceği öngörülmüştür. Pigmentlerin hücrel AChE inhibitör özelliği değerlendirildiğinde, piyosiyenin pigmentinin, pigment uygulanmamış ancak H₂O₂ uygulanmış kontrol grubuna göre AChE inhibitör özelliğinin olduğu ($p<0,05$) (~%38 inhibisyon), bunun yanı sıra AChE inhibisyonunu hiçbir uygulama yapılmamış kontrol grubunun altına düşürdüğü (100 µM piyosiyenin uygulamasında), prodigiosin pigmentinin ise istatistiksel olarak anlamlı bir inhibitör etki göstermediği ($p>0,05$) (%10 inhibisyon) saptanmıştır. Farklı hücre modeli üzerinde AChE-i etkilerinin Ellman metodu ile araştırıldığı çalışmalarda, AChE-i olarak kullanılan genisteinin yaklaşık %4-33, huperzine A'nın yaklaşık %40 AChE inhibisyon gösterdiği belirtilmiştir (Liu ve diğerleri, 2018b; Tang, Wang ve Tang, 2005). Buna göre, çalışmamızda kullanılan piyosiyenin pigmentinin AChE-i olarak kullanılan maddelere yakın değerlerde etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Alzheimer ile ilişkili olduğu bilinen oksidatif stresin antioksidatif aktivite ile baskılanması, Alzheimer'dan koruyucu etki yaratmaktadır (Öğüt ve Atay, 2012; Özkay, Öztürk ve Can, 2011). Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, prodigiosin pigmentine göre daha yüksek antioksidatif aktiviteye ve oksidatif hasarı giderme (MDA) özelliğine sahip olduğu belirlenmiş olan piyosiyenin pigmentinin, AChE mekanizması ile nörodejenerasyonu giderici bir ajan olarak kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Bu sonuç doğrultusunda, AChE-i etkisinin antioksidatif etki ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Yapılan literatür çalışmalarında, AChE-i etkinin antioksidatif etki ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Çakmak ve diğerleri, 2017; Öğüt ve Atay, 2012; Özkay ve diğerleri, 2011; Parlak, Uçar, Alak ve Atamanalp, 2019). AChE'nin inhibe edilmesi ile nörokoruyuculuğun sağlanabildiği yönündeki kanıtlar (Murray, Faraoni, Castro, Alza ve Cavallaro, 2013), nörodejenerasyonun önlenmesi ve giderilmesi konusunda etkin yeni ajanların araştırılmasında AChE enzimini, bir belirteç haline getirmiştir. Buna göre sonuçlar, piyosiyenin pigmentinin hücrel AChE'yi inhibe edici özelliği nedeniyle nörokoruyucu bir ajan olarak kullanılabilir olduğunu düşündürmüştür. *In vitro* sonuçlarımızda olduğu gibi hücrel AChE inhibisyonu üzerinde yapılan incelemede de, piyosiyenin pigmentinin prodigiosine göre daha etkin olduğu dikkatimizi çekmiştir. Bu etkinin, pigmentlerdeki fonksiyonel grupların farklılığından, piyosiyenin pigmentinin redoks aktif özellik göstermesinden ve/veya piyosiyenin pigmentinin prodigiosinden daha küçük bir molekül olmasından kaynaklandığı tahmin edilmiştir. Çalışmamız, piyosiyenin pigmentinin nörodejeneratif hasarı giderici özelliğinin olabileceğinin gösterildiği ilk çalışmalardan

biridir. Nörodejeneratif hastalıklara karşı ilaç alternatiflerinin araştırılmasında, çok hedefli yaklaşımların avantajlı olduğu bildirilmektedir (Piemontese, 2017). Tez çalışmamızda, piyosiyanın pigmentinin AChE aktivitesi üzerinde gösterdiği etki, nörodejeneratif hastalıklarda hem önleyici hem de tedavi edici etkilerinin olabileceğinin gösterilmiş olması bakımından önemlidir. Nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkışının önlenmesi veya geciktirilmesi, hastalık seyrinin yavaşlatılması açısından önemlidir (Post, 1999). Bu nedenle piyosiyanın pigmentinin henüz hastalık ortaya çıkmadan, hastalığa sebep olabilecek toksik etkenlerin ortadan kaldırılmasında etkili olabileceğinin gösterilmiş olması önemli bir bulgudur.

Hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikal ($OH^\cdot$), süperoksit anyon ($O_2^\cdot$) ve nitrik oksit (NO)'yu içeren Reaktif Oksijen Türleri (ROS), hücrelerin protein, DNA, karbonhidrat, lipid, enzim ve diğer molekül grupları ile reaksiyona girerek, bu moleküllerin metabolizmalarını etkilerler. Metabolizma sırasında canlı organizmalarda üretilen ROS proteinlerde veya lipidlerde geri dönüşümsüz kimyasal değişikliklere neden olan zincir reaksiyonları başlatma eğilimindedirler. Bu zararlı reaksiyonlar, hücrede fonksiyon bozukluğuna ve sitotoksisteye neden olabilir. Oksidatif stres, kardiyovasküler hastalıklar, bazı kanserler ve birtakım nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer, Parkinson vb.) gibi çeşitli insan kronik hastalıklarının gelişmesi dahil olmak üzere çok çeşitli hastalıklara neden olur (O'Sullivan ve diğerleri, 2011; Alam, Bristi ve Rafiquzzaman, 2013). Membran yapısında yer alan fosfolipidlerdeki poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu ile doğrudan hücrelere zarar vermektedirler. Vücutta her şey düzenli çalışırsa düşük düzeyde ortaya çıkan bu etkiler temizleyici enzimler ve antioksidan maddelerle etkisiz kılınırlar. Bunların üretimleri organizmanın temizleme olanaklarını aştığında dokuda yıkım başlar (Durmuş ve Ünsaldı, 2005). Bu yıkımı önleyen antioksidan enzimler, ROS detoksifikasyonunda doğrudan yer alan birincil savunma sistemidir. Katalaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzimleri ROS detoksifikasyonu gerçekleştirerek hücresel antioksidan savunma mekanizmasını oluştururlar (O'Sullivan ve diğerleri, 2011). Ayrıca ROS, biyolojik membranlarda bulunan poliansatüre yağ asitlerinde (PUFA) oksidasyona yol açarak lipid peroksidasyonunu başlatırlar. Lipid peroksidasyon reaksiyonları sonucunda oluşan lipid peroksitleri (lipid peroksit, siklik peroksit ve siklik endoperoksit), sekonder veya son ürünler olan Malondialdehit (MDA), 4-Hidroksinonenal (HNE) ve hegzanal isimli aldehitlere dönüşür (Özcan, Erdal, Çakırca ve Yönden, 2015). Bu maddelerin hücrelerde birikmesi sonucu, hücrede oksidatif hasar meydana gelir.

Hücreyi hasara uğratan bu lipit peroksidasyon ürünlerine karşı hücrenin korunması da antioksidatif etki açısından önemlidir.

Çalışmada kullanılan piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin, pek çok sağlık problemine sebep olan oksidatif hasarı önleyici ve oksidatif hasara karşı koruyucu etkileri araştırılmıştır. Her iki pigmentinde artan konsantrasyonlarda antioksidatif etkilerinin arttığı ve yakın antioksidatif etki gösterdikleri tespit edilmesine karşın, piyosiyenin pigmentinin daha öne çıktığı belirlenmiştir. H_2O_2 ile nöroblastoma hücresinde oksidatif hasar yaratılarak antioksidan enzim aktiviteleri inhibe edilmiş, pigment uygulanan gruplarda oksidatif hasar yaratılmış olan kontrol gruplarına göre, antioksidatif enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir. Her iki pigment için de antioksidan enzim aktiviteleri yakın olmasına karşın piyosiyenin pigmentinin daha öne çıktığı görülmüş, bu etkinin moleküler olarak daha küçük bir yapıda olması ve redoks aktif özellik taşımasından (Moayedı, Nowroozı ve Sepahy, 2018) kaynaklandığı düşünülmüştür. Nöroblastom hücresine uygulanan piyosiyenin ve prodigiosin pigmentleri, hücrede oksidatif hasar yaratarak, MDA miktarında meydana gelen artışı inhibe etmiştir. Pigment uygulanan grupların MDA seviyesinde düşüş gözlenmiştir. Her iki pigment de yakın oranlarda MDA üzerine etki göstermiş ancak, piyosiyenin daha yüksek inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan AChE inhibisyonu ve antioksidatif etki çalışmaları sonucunda, piyosiyenin pigmentinin antioksidatif etkilerinin bulunduğu ortaya konmuştur. Antioksidanların, serbest radikalleri nötralize ederek, nöron kayıplarına karşı terapötik etkiler gösterdiği çalışmalar dikkate alındığında, piyosiyenin pigmentinin AChE artışını inhibe edici özelliğinin yanı sıra, AChE indüksiyonundan koruyucu özelliğinin de olabileceği düşünülmüştür. Çıkan sonuçlar, pigmentlerin antioksidan etkilerinin araştırıldığı çalışmalar destekler nitelikte olup, bu pigmentlerin antioksidan enzim aktivitelerini arttırarak ve oksidatif hasara sebep olan lipit peroksidasyon ürünlerinin artışını inhibe ederek, oksidatif hasara ve oksidatif hasarın sebep olduğu durumlara karşı koruyucu etkileri bulunduğu görüşünü desteklemektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda, antioksidatif etkiye sahip olan doğal bir boyar madde olarak, bu pigmentlerin oral yolla alındığında hücrelerdeki antioksidan mekanizmayı arttırarak, oksidatif hasar sonucu oluşabilecek pek çok hastalığın önlenilebileceği düşünülmüştür. Pigmentlerin, farklı hücre hatlarında incelediğimiz antioksidatif etkileri üzerine, literatürde çalışmalar yetersiz olduğundan, yaptığımız çalışma ön çalışma niteliğindedir ve oldukça önemlidir.

Kısmi olarak saflaştırılan piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin antikanser aktiviteleri, SK-MEL-30 deri kanseri ve HT-29 kolon kanseri hücreleri üzerinde çalışılmış ve pigmentlerin 10-100 μM derişimlerde uygulamaları yapılmıştır. Deri kanseri hücrelerine 18 saat uygulama yapılan piyosiyanin pigmentinin IC_{50} değeri 72 μM , prodigiosin pigmentinin IC_{50} değeri ise 70 μM olarak belirlenmiştir. Kolon kanserinde ise yalnızca prodigiosin pigmentinin antikanser etkisi tespit edilmiştir (IC_{50} değeri 47 μM). Piyosiyanin pigmenti yalnızca deri kanseri üzerinde antikanser etki gösterirken, prodigiosin pigmenti her iki kanser hücresinde de antikanser aktivite göstermiştir. Prodigiosin pigmentinin her iki hücre hattında da antikanser etki göstermesine karşın, kolon kanseri üzerinde daha yüksek antikanser aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur. Araújo ve diğerleri (2013) tarafından yapılan çalışmaya göre, deri kanseri hücrelerinde, piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin 75 ve 100 μM derişimlerdeki uygulamalarının antikanser ajanı olarak kullanılabilirliğini düşündürürken, kolon kanserinde yalnızca prodigiosin pigmentinin 50, 75 ve 100 μM derişimlerdeki uygulamalarının antikanser ajanı olarak kullanılabilirliğini düşündürmüştür. Antikanser aktiviteleri belirlenen pigmentlerin aynı zamanda IC_{50} konsantrasyonlarının da sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. Dolayısıyla, antikanser aktivite gösteren her iki pigmentinde, güvenli bir şekilde kanser ilacı etken maddesi olarak kullanımı önerilebilir. Her iki pigmentin de deri kanserinde antiproliferatif etki göstermesine karşın, prodigiosin pigmenti daha yüksek antikanser aktivite göstermiştir. Prodigiosin pigmentinin bu etkisinin, prodigiosin pigmentine özgü olan pirol halkasına sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Piyosiyanin tarafından indüklenen kanser hücrelerindeki hücre ölümünün ise piyosiyanin pigmentinin, düşük molekül ağırlıklı redoks aktif bir madde olması ve hücre zarını kolayca geçebilen bir zwitter iyon özelliğe sahip olmasından kaynaklandığı öngörülmektedir (Zhao, Wu, Alfred, Wei ve Yang, 2014). Piyosiyanin pigmentinin DNA interkalasyonu, topoizomeraaz inhibisyonu ve hücre geçirgenliğindeki indüksiyonu gibi biyolojik özelliklerinin kanser/tümör hücrelerinin inhibisyonu için kullanılabileceği ortaya konmuştur (Patil ve diğerleri, 2017). Patil ve diğerleri (2016), saflaştırılmış piyosiyanin pigmentinin (farklı konsantrasyonlarda), insan derisi melanom hücre hattı SK-MEL-2'ye karşı antikanser aktivitesi üzerine çalışmış ve piyosiyaninin, SK-MEL-2 hücrelerine karşı, güçlü antikanser aktivitesi sergilediğini tespit etmişler, piyosiyanin pigmentinin, SK-MEL-2 hücrelerinin doza bağlı inhibisyonunu rapor edilmiştir. Patil ve ekibi (2017)'nin yapmış olduğu bir başka çalışmada elde ettikleri sonuçlar, çalışmamız sonucunda bulduğumuz piyosiyanin pigmentinin antiproliferatif etkisini desteklemektedir. Prodigiosinler, normal hücreler üzerinde çok az veya hiç etkisi

olmadan, esas olarak kanser hücrelerini hedefler. Espona-Fiedler ve diğerleri (2012), SK-MEL-28 ve SK-MEL-5 hücrelerine farklı dozlarda (1 mM-8 mM) 24 ve 48 saatlik sürelerde prodigiosin uygulamışlardır. Hücre canlılığının, prodigiosin ile doza bağlı olarak azaldığı, prodigiosinin yarı inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değerinin sırasıyla SK-MEL-28'de $4,51 \pm 0,47 \mu M$ ve SK-MEL-5'te $1,02 \pm 0,15 \mu M$ olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada, SK-MEL-28 insan melanoma hücresine 48 saatlik prodigiosin uygulamasının sonucunda IC_{50} değerinin $2,8 \mu M$ olduğu ortaya konmuştur (Lee ve diğerleri, 2011). Oh ve diğerleri (2016), altı farklı insan kanser hücresi ile yapmış oldukları antikanser çalışmasında bu hücrelere farklı konsantrasyonlarda prodigiosin uygulayarak prodigiosin pigmentinin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini incelemiştir. Bu çalışma doğrultusunda 24 saatlik pigment uygulaması yapılan SK-MEL-5 hücresi için IC_{50} değeri $41,3 \mu M$ bulunmuştur. Farklı araştırmacılar; kolorektal kanser hücre hattı (HT-29), karaciğer (HepG2), HL60 ve jurkat, göğüs (T47D) kanseri hücrelerinin prodigiosin ile tedavisinin, bu hücrelerde apoptozisin indüklenmesine yol açtığını ve hücrelerin nekrozu azalttığını göstermişlerdir (Ghoreishi ve Sam, 2017).

Gıda, tekstil ve kozmetik gibi pek çok alanda kullanılan sentetik pigmentlerin yan etkilerinin ortaya konması ile doğal pigmentlere olan ilgi günden güne ivme kazanmıştır (Ünyayar ve diğerleri, 2005). Sarıcaoğlu ve Turhan (2013) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise piyosiyenin, stabilite açısından kolaylık sağlayacak ve katılan rengi en iyi yansıtabildiği düşünüldüğü için model gıda olarak dondurmaya uygulanmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen piyosiyenin pigmentinin sade dondurmaya istenen düzeyde renk kazandırabildiği belirlenmiştir. Depolama sürecinin başında ve sonunda yapılan gözlemlerde ise 3 ay süresince renklerini koruyabildikleri ve dondurmada istenmeyen bir renk değişikliğine yol açmadığı gözlenmiştir. Çalışmanın gelinen aşamasında renk maddesine toksik testler yapılmadığından dolayı dondurmanın duyuusal özellikleri belirlenmemiştir. Bundan dolayı depolama boyunca sadece gözlemsel değerlendirmeler yapılmıştır. Namazkar ve Ahmad (2013), prodigiosinin optimum çalışma koşulları altında bir renklendirici olarak kullanılabilirliğini ortaya koymuş, buna ek olarak yoğurt, süt ve gazlı içeceklerle uygulamasını yapmışlardır (Namazkar ve Ahmad, 2013). Yürütmüş olduğumuz tez çalışmasında gıda maddesi olarak daha çok süslemelerde tercih edilen şeker hamuru seçilmiş, prodigiosin pigmentinin renklendirme olarak şeker hamurunda piyosiyenin pigmentine göre daha rahat kullanılabildiği gözlemlenmiştir.

Alzahrani ve Alqahtani (2016)'nın yapmış olduğu çalışmada daha geniş sanayi alanlarında, kumaş ve halı, kağıt ve mürekkep endüstrisinin kullanım olasılığı için kullanılan malzemelerin doğal bir renklendirici ve antibakteriyal aktivitenin yanı sıra antifungal aktiviteye sahip tekstil boyar maddesi olarak piyosiyenin kullanılmasını önermektedir. Shaikh (2016)'nın ortaya koyduğu çalışmada prodigiosin kumaş tarafından özümsemediğini ancak tekstilde deterjan kullanımının boyayı uzaklaştırmasından dolayı boyayı kumaşa sabitleyecek maddelerin kullanımını önermiştir. Krishna, Basheer, Beena ve Chandrasekaran, (2008)'de prodigiosinin tekstil malzemelerinde doğal boya olarak kullanılabilirliğini ortaya koymuştur. Benzer sonuçlar Shahitha ve Poornima (2012) tarafından yapılan çalışmada da bildirilmiş ve bizim kumaşa uyguladığımızda ortaya çıkan sonuçları desteklemiştir. Yapılan başka bir tekstil uygulamasında ise prodigiosinlerin, ipek kumaşlarda antibakteriyel özelliğe sahip bir boyar madde olarak kullanılabilirlikleri rapor edilmiştir (Gong ve diğerleri, 2018). Asit, alkali ve deterjanlara dirençli olan prodigiosin, tekstil endüstrisinde bir renklendirici olarak daha da keşfedilebilir. Pigmentin antimikrobiyal ve antioksidan potansiyeli, prodigiosinin terapötik olarak gelecekteki olası kullanımını hedefleyebilir (Gulani, Bahattacharya ve Das, 2012). Bu veriler doğrultusunda piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin kumaşa sabitlenmesini sağlayan ve mordant olarak bilinen kimyasal maddeler kullanılarak kalıcılıklarının artırılması ve antibakteriyal boyar madde olarak daha fazla çalışmalar yapılarak endüstriye sunulması düşünülmüştür.

Genel olarak sonuçlar değerlendirildiğinde bakterilerden elde edilen piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin, model hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermezken, farklı kanser hücre hatları üzerinde her iki pigmentinde farklı mekanizmalarla antiproliferatif etkiye sahip oldukları ortaya konmuştur. Piyosiyenin pigmenti yalnızca SK-MEL-30 hücre hattına antiproliferatif etki gösterirken, prodigiosin pigmenti hem SK-MEL-30 hem de HT-29 hücre hattına karşı antiproliferatif etki göstermiştir. Her iki kanser hücre hattı içinde antiproliferatif etki gösteren prodigiosin pigmentinin moleküler yapısında pirol halkası bulundurması nedeni ile daha yüksek antiproliferatif etki gösterdiği düşünülmektedir. AChE inhibisyon etkisi ve antioksidan etkisi ortaya konan piyosiyenin pigmentinin gıdalarda katkı maddesi, ilaçta etken madde olarak kullanımı sonucunda oral yolla alındığında nöral hasara karşı koruyucu ve antikanser etkeni olarak alternatif kullanımı önerilebilir. Aynı zamanda bu tez kapsamında alınan verilerden ve literatür taramalarından, pek çok farklı biyoaktiviteye sahip olan piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin, başta gıda, tekstil, ilaç ve kozmetik olmak üzere pek çok endüstriyel alanda kullanılan ve

oldukça farklı yan etkilere sahip olan sentetik katkı maddelerine ve boyar maddelere alternatif olarak kullanılabilirliği öngörülmektedir. Ancak bu alanda bakterilerden elde edilen pigmentlerin çeşitli endüstriyel uygulamalarda önerilebilmesi ve kesin bir yargıya varılabilmesi için *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yapılarak sonuçların desteklenmesi gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, *P. aeruginosa* MB713 suşundan piyosiyanın ve *S. marcescens* suşundan prodigiosin elde edilmiş ve saflaştırılarak miktar tayini yapılmıştır. Ayrıca, her iki pigmentinde UV-Vis spektrofotometrik, FT-IR ve GC-MS analizleri ile karakterizasyonu yapılmış ve pigmentler doğrulanmıştır. Biyolojik etkinlik testlerine göre, antioksidan etkileri tespit edilen pigmentlerin deri kanseri ve kolon kanseri hücreleri üzerinde antiproliferatif etkileri ve nöroblastoma hücresinde AChE inhibisyon aktivitesi (prodigiosin hariç) belirlenmiştir. Elde edilen pigmentlerin gıda ve tekstil materyallerinde boyamaları yapılmıştır. Bu etkileri dikkate alınarak bu tez kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler aşağıda özetlenmektedir:

1. Her iki suşun da maksimum pigment üretimini logaritmik fazın sonu, durgunluk fazının başında gösterdiği belirlenmiştir.
2. *P. aeruginosa* MB713 suşu tarafından üretilen piyosiyanın pigmentinin en iyi üretildiği koşul, MFDM besi ortamı, 6 günlük inkübasyon ve çalkalamalı inkübatör (51 µg/mL), *S. marcescens* MB703 suşu tarafından üretilen prodigiosin pigmentinin en iyi üretildiği koşul ise NA besi ortamı ve 6 günlük inkübasyon (72 mg/L) olarak tespit edilmiştir.
3. Pigmentlerin UV-Vis spektrofotometrik analizinde piyosiyanın pigmentinin UV spektrumu 278 nm, prodigiosin pigmentinin UV spektrumu ise 538 nm olarak belirlenmiş, bu piklerin pigment varlığını gösterdiği literatürlerle doğrulanmıştır.
4. GC-MS analizi sonucunda fenazın varlığını ifade eden, 196 m/z'deki pik, piyosiyanın pigmentinin varlığını göstermiştir. Düşük molekül ağırlığına sahip fenazın türevi olan piyosiyanın pigmentinin, biyoaktif özellikleri üzerine (AChE inhibisyonu ve antioksidatif aktivitesi) etki ettiği öngörülmüştür.
5. FT-IR analizi sonucunda görülen pikler, piyosiyanın ve prodigiosin pigmentleri için fonksiyonel grupları ortaya koymuştur. Piyosiyanın pigmenti için fonksiyonel grubun aromatik bileşikler ve fenazın halkası, prodigiosin pigmenti için ise pirol, amid, metilen, metil, alken grupları olduğu belirlenmiştir.
6. Deri kanseri ve kolon kanseri hücreleri üzerindeki antikanser aktiviteleri incelenen piyosiyanın pigmenti yalnızca SK-MEL-30 hücrelerinde bu etkiye sahipken, prodigiosin pigmentinin her iki kanser hücresinde de antiproliferatif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla bu pigmentler arasında prodigiosin pigmentinin piyosiyanine göre daha yüksek antiproliferatif etkiye sahip olmasının, antikanser çalışmalarında daha

çok tercih edilebileceği düşüncesini desteklemektedir. Prodigiosin pigmentinin daha yüksek antiproliferatif etkiye sahip olmasının sebebi pirol halkası bulundurduğu bilinen farklı kimyasal yapıya sahip olması ile ilişkilendirilebilir.

7. Sağlıklı fare fibroblast hücresinde piyosiyenin pigmentinin IC₅₀ değeri 101 µM olarak belirlenirken, prodigiosin pigmentinin IC₅₀ değerleri 83 µM olarak belirlenmiştir. Pigmentlerin insan nöroblastom hücrelerindeki IC₅₀ değerleri ise 115 µM (piyosiyenin) ve 130 µM (prodigiosin) olarak belirlenmiştir. Denenen her iki kanser hücresi için piyosiyenin ve prodigiosin pigmentlerinin IC₅₀ değerleri sırası ile deri kanseri hücresinde 72 µM ve 70 µM olarak, kolon kanseri hücresinde ise yalnızca prodigiosinin antikanser etkisi gözlemlendiğinden 47 µM olarak hesaplanmıştır. Her iki pigment için de antiproliferatif etkinin belirlendiği konsantrasyonların üzerindeki konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterdiğinin belirlenmesi, antiproliferatif çalışmalarda etkin olan konsantrasyonun, sağlıklı hücre bakımından güvenle kullanılabileceği söylenebilir.
8. *P. aeruginosa* MB713 suşundan izole edilen piyosiyenin pigmentinin, *in vitro* ve H₂O₂ ile AChE üretimi uyarılmış nöroblastoma hücrelerinde AChE inhibisyon etkisi olduğu, prodigiosinin ise AChE inhibisyon etkisi göstermediği belirlenmiştir. AChE inhibisyonu, Alzheimer'da ilaç adayı etken maddelerin seçiminin temel kriteri olarak kabul edildiğinden, piyosiyenin pigmentinin, AChE inhibisyon etkisinden dolayı Alzheimer'da ilaç adayı olma potansiyeli bulunabilir.
9. Nöroblastoma hücresinde oksidatif hasar yaratarak oluşturulan modelde, artan MDA miktarını her iki pigmentinde baskıladığı ancak, piyosiyenin pigmentinin daha yüksek baskılama gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuç dikkate alındığında, hücrede oksidatif hasara bağlı oluşabilecek nörodejeneratif hastalıklarda, piyosiyenin pigmentinin oksidatif hasarı gidererek nöral koruyucu etkisinin olduğu söylenebilir.
10. Her iki pigmentin de HT-29 kolon kanseri ve SK-MEL-30 deri kanseri hücreleri üzerinde antioksidan etki göstererek, antiproliferasyonla antikanser etki görülmüş olup, en iyi antikanser etkisini pirol halkası bulundurması nedeniyle, prodigiosin pigmentinin gösterdiği belirlenmiştir.
11. Boyar madde uygulamalarında pigmentlerin 100°C'ye kadar dayanması, özellikle bu sıcaklığa kadar olan birçok endüstriyel uygulamada kullanım potansiyellerini göstermiştir. Ayrıca, 100°C'nin üstündeki sıcaklıklara karşı renk stabilitesinin bulunmadığı, renk kalıcılığı sağlanması için üzerine çıkacak sıcaklıklardan kaçınılması gerektiği tespit edilmiştir.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde aşağıdaki öneriler elde edilmiştir.

1. Bu tez kapsamında, biyoaktiviteleri kanıtlanmış olan piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin üretimini arttıracak yeni indükleyicilerin araştırılmasıyla daha yüksek verimde pigment eldesi sağlanabilir.
2. Daha yoğun pigment üretimi için ileri derece saflaştırma yöntemleri geliştirilerek, yüksek yoğunlukta elde edilen pigmentlerin hücreler üzerindeki etkilerinin farklı konsantrasyonlarda denenerek, toksisite daha da azaltılarak, pigmentlerin uygulanmasının güvenilirliği artırılabilir.
3. Pigmentlerin toksik olmadığını ileri düzey toksisite testleriyle test edilerek, yaptığımız çalışmalar desteklenebilir.
4. Piyosiyanin ve prodigiosin pigmentlerinin nöroprotektif ve antikanser etkisinin moleküler düzeyde araştırılarak, etkilediği yollar incelenebilir ve bu yollara yapılabilecek müdahalelerle pigmentlerin etkileri artırılabilir.
5. Gıda, tekstil ve kozmetikte, farklı boyama teknikleri ve konsantre boyar maddeyle daha iyi boyanma sağlanarak, boyanın kumaşa tutunabilirliği artırılabilir ve daha az miktarda boyayla, daha verimli boyama gerçekleştirilebilir.

Sonuç olarak; *P. aeruginosa* MB713 suşundan izole edilen piyosiyanin pigmenti ve *S. marcescens* MB703 suşundan izole edilen prodigiosin pigmentinin, nöroblastoma ve sağlıklı fare fibroblast hücrelerine (sağlıklı hücreler) uygulanan dozlarının, antiproliferatif etki gösterdiği konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. Dolayısıyla, antiproliferatif etkide, bu konsantrasyonlar güvenle kullanılabilir. Piyosiyanin pigmentinin antioksidan etkisi, deri kanseri hücrelerinde antiproliferatif etkisi ve nöroblastoma hücrelerinde nörodejeneratif hasara karşı koruyucu etkisinden dolayı, piyosiyanin pigmentinin ilaç etken maddesi veya tekstilde deri kanserine, gıdada ise Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu boyar madde olarak kullanımı düşünülmüştür. Prodigiosin pigmentinin ise kolon kanseri hücrelerinde gösterdiği antiproliferatif ve antioksidan etkiye göre, ilaç etken maddesi veya kolon kanserine karşı koruyucu gıda boyar maddesi olarak kullanımı mümkün olabilir. Bu sonuçlar doğrultusunda, izole edilen pigmentlerin gıda, tekstil ve kozmetik endüstrilerinde sentetik renklendiricilere alternatif olabileceği, kanser ve AH ilaç etken maddesi olarak gösterilebileceği öngörülmüştür.

KAYNAKLAR

- Abdul-Hussein, Z. R. and Atia, S. S. (2016). Antimicrobial effect of pyocyanin extracted from *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Experimental Biology*, 6(6), 231-242.
- Abken, H. J., Tietze, M., Brodersen, J., Bäumer, S., Beifuss, U., and Deppenmeier, U. (1998). Isolation and characterization of methanophenazine and function of phenazines in membrane-bound electron transport of *Methanosarcina mazei* Gö1. *Journal of Bacteriology*, 180(8), 2027-2032.
- Abo-Zaid, G. A., Wagih, E. E., Matar, S. M., Ashmawy, N. A., and Hafez, E. E. (2015). Optimization of pyocyanin production from *Pseudomonas aeruginosa* JY21 using statistical experimental designs. *International Journal of ChemTech Research*, 8(9), 137-148.
- Agwa, M. M., Elessawy, F. M., Hussein, A., El Demellawy, M. A., Elzoghby, A. O., El-Salam, M. A., and Eldiwany, A. I. (2018). Development and validation of a robust analytical method to quantify both etoposide and prodigiosin in polymeric nanoparticles by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Analytical Methods*, 10(19), 2272-2280.
- Alam, M. N., Bristi, N. J., and Rafiquzzaman, M. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
- Albertsen, M., Karst, S. M., Ziegler, A. S., Kirkegaard, R. H., and Nielsen, P. H. (2015). Back to basics—the influence of DNA extraction and primer choice on phylogenetic analysis of activated sludge communities. *Plos One*, 10(7), 1-15.
- Ali, H. (2010). Biodegradation of synthetic dyes a review. *Water, Air, and Soil Pollution*, 213(1-4), 251-273.
- Ali, S., Nisar, N., and Hussain, T. (2007). Dyeing properties of natural dyes extracted from eucalyptus. *Journal of the Textile Institute*, 98(6), 559-562.
- Alzahrani, S. H. and Alqahtani, F. S. (2016). Pyocyanin pigment extracted from *Pseudomonas aeruginosa* isolate as antimicrobial agent and textile colorant. *International Journal of Scientific Research*, 5(9), 467-470.
- Anand, R., Gill, K. D., and Mahdi, A. A. (2014). Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*, 76(2014), 27-50.
- Araújo, L. C. C., Aguiar, J. S., Napoleão, T. H., Mota, F. V. B., Barros, A. L. S., Moura, M. C., and Paiva, P. M. G. (2013). Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. *Plos One*, 8(12), 1-15.
- Aslan, Ö., Kanbay, Y., and Işık, E. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Humans and Antibiotic Resistance. *Microbiology Research Journal International*, 24(4), 1-6.

- Athira, G. K. and Jyothi, A. N. (2015). Cassava starch-poly (vinyl alcohol) nanocomposites for the controlled delivery of curcumin in cancer prevention and treatment. *Starch-Stärke*, 67(5-6), 549-558.
- Azambuja, P., Feder, D., and Garcia, E. S. (2004). Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Experimental Parasitology*, 107(1-2), 89-96.
- Bakar, M. ve Yuluğ, B. (2009). Hafif kognitif bozukluk. *Türkiye Klinikleri Journal of Neurology Special Topics*, 2(1), 88-93.
- Banerjee, A., Supakar, S., and Banerjee, R. (2014). Melanin from the nitrogen-fixing bacterium *Azotobacter chroococcum*: A spectroscopic characterization. *Plos One*, 9(1), 1-7.
- Barakat, K. M., Mattar, M. Z., Sabae, S. Z., Darwesh, O. M., and Hassan, S. H. (2015). Production and characterization of bioactive pyocyanin pigment by marine *Pseudomonas aeruginosa* OSh1. *Research Journal Of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, 6(5), 933-943.
- Becenen, N. (2017). Azo boyarmaddelerinin yasaklanması: bebek ve çocuk giysilerinde uygulanabilirliğinin araştırılması. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6(10), 1-6.
- Bennett, J. E., Dolin, R., and Blaser, M. J. (2014). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. (Eighth Eddition). Elsevier Health Sciences, 2518-2532.
- Bennett, J. W. and Bentley, R. (2000). Seeing red: The story of prodigiosin. *Advances Applied Microbiology*, 47, 1-32.
- Bilgehan H. (1992). *Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Sistemi*. Türkiye: Barış Yayınları, 64.
- Bilgehan, H. (2000). *Klinik mikrobiyoloji özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları*. İzmir: Barış Yayınları, 293-295.
- Birsk, J. S. (2006). Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1,1-19.
- Blankenfeldt, W. (2013). The biosynthesis of phenazines. *Microbial Phenazines*, Springer, Berlin, Heidelberg, 1-17.
- Boger, D. L. and Patel, M. (1988). Total synthesis of prodigiosin, prodigiosene, and desmethoxyprodigiosin: Diels-Alder reactions of heterocyclic azadienes and development of an effective palladium (II)-promoted 2, 2'-bipyrrrole coupling procedure. *The Journal of Organic Chemistry*, 53(7), 1405-1415.
- Bond, C. E., Patel, P., Crouch, L., Tetlow, N., Day, T., Abu-Hayyeh, S., Williamson, C., and Greenfield, S. A. (2006). Astroglia up-regulate transcription and secretion of 'readthrough'acetylcholinesterase following oxidative stress. *European Journal of Neuroscience*, 24(2), 381-386.

- Brooun, A., Liu, S., and Lewis, K. (2000). A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(3), 640-646.
- Büyüksırt, T. ve Kuleaşan, H. (2013). Farklı kaynaklardan doğal renk maddesi üreten mikroorganizmaların izolasyonu, tanısı ve elde edilen pigmentlerin karakterizasyonu. *Gıda*, 38(4), 199-206.
- Campas, C., Dalmau, M., Montaner, B., Barragán, M., Bellosillo, B., Colomer, D., Pons G., Perez-Tomas, R., and Gil, J. (2003). Prodigiosin induces apoptosis of B and T cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 17(4), 746-750.
- Cang, S., Sanada, M., Johdo, O., Ohta, S., Nagamatsu, Y., and Yoshimoto, A. (2000). High production of prodigiosin by *Serratia marcescens* grown on ethanol. *Biotechnology Letters*, 22(22), 1761-1765.
- Chadni, Z., Rahaman, M. H., Jerin, I., Hoque, K. M. F., and Reza, M. A. (2017). Extraction and optimisation of red pigment production as secondary metabolites from *Talaromyces verruculosus* and its potential use in textile industries. *Mycology*, 8(1), 48-57.
- Charkoudian, L. K., Fitzgerald, J. T., Khosla, C., and Champlin, A. (2010). In living color: Bacterial pigments as an untapped resource in the classroom and beyond. *Plos Biology*, 8(10), 1-6.
- Cheluvappa, R. (2014). Standardized chemical synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. *MethodsX*, 1(2014), 67-73.
- Chertkow, H. (2002). Mild cognitive impairment. *Current Opinion in Neurology*, 15(4), 401-407.
- Chung, K. T. (2016). Azo dyes and human health: A review. *Journal of Environmental Science and Health*, 34(4), 233-261.
- Cimmino, A., Andolfi, A., and Evidente, A. (2013). *Microbial Phenazines*, Springer, Berlin, Heidelberg, 217-243.
- Cody, W. L., Wilson, J. W., Hendrixson, D. R., McIver, K. S., Hagman, K. E., Ott, C. M., Nickerson C. A., and Schurr, M. J. (2008). Skim milk enhances the preservation of thawed -80°C bacterial stocks. *Journal of Microbiological Methods*, 75(1), 135-138.
- Cox, C. D. (1986). Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin. *Infection and Immunity*, 52(1), 263-270.
- Cragg, G. M., Grothaus, P. G., and Newman, D. J. (2009). Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemical Reviews*, 109(7), 3012-3043.
- Çakmak, Y. S., Zengin, G., Eskin, B., Yıldırım, K., Topal, M., Aydın, G. H. ve Erten, K. (2017). *Medicago rigidula* (L.) ALL.'nın antioksidan ve enzim inhibisyon aktiviteleri ve fenolik bileşiminin incelenmesi. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21(3), 522-529.

- Çufalı, D. (2011). Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antimikrobiyal ajanlara direnci, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyon, 2-25.
- Dahah, H., Djibaoui, R., and Nemmiche, S. (2016). Antimicrobial, antioxidant and hemolytic effects of Pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from saline soil of Mina river, Algeria. *International Journal of Biosciences*, 9(5), 134-143.
- Dai, C., Ciccotosto, G. D., Cappai, R., Tang, S., Li, D., Xie, S., and Velkov, T. (2018). Curcumin attenuates colistin-induced neurotoxicity in N2a cells via anti-inflammatory activity, suppression of oxidative stress, and apoptosis. *Molecular Neurobiology*, 55(1), 421-434.
- Daly, J. A., Boshard, R., and Matsen, J. M. (1984). Differential primary plating medium for enhancement of pigment production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 19(6), 742-743.
- Darshan, N. and Manonmani, H. K. (2015). Prodigiosin and its potential applications. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5393-5407.
- Das, P. K., Samal, S., Sahoo, R., and Sabat, P. K. (2018). Resistance of *Serratia marcescens* (SPKD15) to various environmental stress conditions: Effect on cell viability and prodigiosin production. *PharmaTutor*, 6(4), 18-26.
- Deorukhkar, A. A., Chander, R., Ghosh, S. B., and Sainis, K. B. (2007). Identification of a red-pigmented bacterium producing a potent anti-tumor N-alkylated prodigiosin as *Serratia marcescens*. *Research in Microbiology*, 158(5), 399-404.
- De Valdez, G. F., De Giori, G. S., De Ruiz Holgado, A. P., and Oliver, G. (1985). Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(2), 413-415.
- Deveoğlu, O. ve Karadağ, R. (2011). Genel bir bakış: doğal boyarmaddeler. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, 23(1), 21-32.
- Dhanve, R. S., Kalyani, D. C., Phugare, S. S., and Jadhav, J. P. (2009). Coordinate action of exiguobacterial oxidoreductive enzymes in biodegradation of reactive yellow 84A dye. *Biodegradation*, 20(2), 245-255.
- Dikshit, R. and Tallapragada, P. (2018). Comparative study of natural and artificial flavoring agents and dyes. *Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes*, 3, 83-111.
- Durmuş, A. S. ve Ünsaldı, E. (2005). Antioksidanlar ve Kırık İyileşmesi. *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları*, 3(3), 20-27.
- Elahian, F., Moghimi, B., Dinmohammadi, F., Ghamghami, M., Hamidi, M., and Mirzaei, S. A. (2013). The anticancer agent prodigiosin is not a multidrug resistance protein substrate. *DNA and Cell Biology*, 32(3), 90-97

- El-Batal, A. I., El-Hendawy, H. H., and Faraag, A. H. (2018). In silico and in vitro cytotoxic effect of prodigiosin-conjugated silver nanoparticles on liver cancer cells (HepG2). *BioTechnologia*, 98(3), 225-243.
- El-Fouly, M. Z., Sharaf, A. M., Shahin, A. A. M., El-Bialy, H. A., and Omara, A. M. A. (2015). Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(1), 36-48.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., and Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Elmenshawey, A., Abdelrazak, A., Mowafey, A. M., and Osman, Y. (2017). Optimization of bioreactor cultivation parameters by taguchi orthogonal array design for enhanced prodigiosin production. Switzerland: *Preprints*, 1-23.
- Erdal, P. ve Ökmen, G. (2013). Gıdalarda kullanılan mikrobiyal kaynaklı pigmentler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6(2), 56-68.
- Erkmen, O. (2010). Gıda kaynaklı tehlikeler ve güvenli gıda üretimi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 53(3), 220-235.
- Espona-Fiedler, M., Soto-Cerrato, V., Hosseini, A., Lizcano, J. M., Guallar, V., Quesada, R., Gao, T., and Pérez-Tomás, R. (2012). Identification of dual mTORC1 and mTORC2 inhibitors in melanoma cells: prodigiosin vs. obatoclast. *Biochemical Pharmacology*, 83(4), 489-496.
- Essar, D. W., Eberly, L. E. E., Hadero, A., and Crawford, I. P. (1990). Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *Journal of Bacteriology*, 172(2), 884-900.
- Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M., and Wilcock, G. K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's Disease: A review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 66(2), 137-147.
- Francisco, R., Pérez-Tomás, R., Giménez-Bonafé, P., Soto-Cerrato, V., Giménez-Xavier, P., and Ambrosio, S. (2007). Mechanisms of prodigiosin cytotoxicity in human neuroblastoma cell lines. *European Journal of Pharmacology*, 572(2-3), 111-119.
- Frank, L. H. and DeMoss, R. D. (1959). On the biosynthesis of pyocyanine. *Journal of Bacteriology*, 77(6), 776.
- Freimoser, F. M., Jakob, C. A., Aebi, M., and Tuor, U. (1999). The MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3727-3729.
- Fujikawa, H. and Akimoto, R. (2011). New blue pigment produced by *Pantoea agglomerans* and its production characteristics at various temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(1), 172-178.

- G. Ravelo, A., Estévez-Braun, A., Chávez-Orellana, H., Pérez-Sacau, E., and Mesa-Siverio, D. (2004). Recent studies on natural products as anticancer agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 4(2), 241-265.
- Gahlout, M., Prajapati, H., Chauhan, P., Patel, N., and Solanki, D. (2017). Isolation and screening of pyocyanin producing *Pseudomonas* spp. from soil. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 4(4), 147-152.
- Garcia-Ratés, S., Lewis, M., Worrall, R., and Greenfield, S. (2013). Additive toxicity of β -amyloid by a novel bioactive peptide *in vitro*: possible implications for Alzheimer's Disease. *Plos One*, 8(2), 54864.
- Geran, R. I. (1972). Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemotherapy Reports Journal*, 3, 17-27.
- Ghoreishi, S. and Sam, M. R. (2017). Treatment with 2-methyl-3-pentyl-6-methoxyprodiginine isolated from *Serratia marcescens* decreases cell viability and induces apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *The Journal of Urmia University of Medical Sciences*, 28(8), 17-24.
- Gong, J., Ren, Y., Fu, R., Li, Z., and Zhang, J. (2017). pH-mediated antibacterial dyeing of cotton with prodigiosins nanomicelles produced by microbial fermentation. *Polymers*, 9(10), 468.
- Gulani, C., Bhattacharya, S., and Das, A. (2012). Assessment of process parameters influencing the enhanced production of prodigiosin from *Serratia marcescens* and evaluation of its antimicrobial, antioxidant and dyeing potentials. *Malaysian Journal of Microbiology*, 8(2), 116-122.
- Gupta, C., Garg, A. P., Prakash, D., Goyal, S., and Gupta, S. (2011). Microbes as potential source of biocolours. *Newsletter*, 2, 1309-1318.
- Guryanov, I. D., Karamova, N. S., Yusupova, D. V., Gnezdilov, O. I., and Koshkarova, L. A. (2013). Bacterial pigment prodigiosin and its genotoxic effect. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 39(1), 106-111.
- Gündüz Balpetek, F. ve Gülümser, T. (2014). Tekstil ve konfeksiyon sektöründe ekolojik etiketler. *Electronic Journal of Vehicle Technologies/Tasit Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 8(2), 42-68.
- Gürcüm, B. H. ve Öneş, A. (2018). Bakteri ve mikroalglerin tekstil boyacılığında ve baskıcılığında kullanım olanakları. *İdil Dergisi*, 7(46), 701-709.
- Gürgün, V. ve Halkman, A. K. (1990). Mikrobiyolojide sayım yöntemleri. *Gıda Teknolojisi Derneği*, 7-20.
- Hadjiakhoondi, F., Ostad, S. N., Khanavi, M., Hadjiakhoondi, A., Farahanikia, B., and Salarytabar, A. (2013). Cytotoxicity of two species of *Glaucium* from Iran. *Journal of Medicinal Plants*, 1(45), 85-92.

- Hage-Hülsmann, J., Grünberger, A., Thies, S., Santiago-Schübel, B., Klein, A. S., Pietruszka, J., and Kohlheyer, D. (2018). Natural biocide cocktails: Combinatorial antibiotic effects of prodigiosin and biosurfactants. *Plos One*, 13(7), 1-23.
- Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A., Forbes, A., Perkins, A., Davey, A. K., Chess-Williams, R., Kiefel, M., J., Arora, D., and Grant, G. (2016). Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, 8(8), 1-14.
- Harris, A. K., Williamson, N. R., Slater, H., Cox, A., Abbasi, S., Foulds, I., Simonsen, H. T., Leeper, F. J., and 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.
- Harris, J. O. (1950). The relationship between stage of growth and pigment production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Transactions of the Kansas Academy of Science* (1903), 53(4), 494-499.
- Heinemann, B., Howard, A. J., and Palocz, H. J. (1970). Influence of dissolved oxygen levels on production of L-asparaginase and prodigiosin by *Serratia marcescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 19(5), 800-804.
- Hernandez, M. E., Kappler, A., and Newman, D. K. (2004). Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 921-928.
- Hizbullah, M. U., Farouq, A. A., Baki, A. S., Dabai, M. U., Nafi'u, A., Nata'ala, M. K., and Mustapha, G. (2018). Studies on bio-color production by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from soil. *Journal of Advances in Microbiology*, 12(1), 1-12.
- Hizbullahi, M. U., Farouq, A. A., Baki, A. S., Ibrahim, A. D., Hauwa, B. A., and Jumare, F. I. (2018). Biocolorants production by pigment-producing bacteria isolated from soil. *Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology*, 4(4), 1-16.
- Hussain, H., Specht, S., Sarite, S. R., Saeftel, M., Hoerauf, A., Schulz, B., and Krohn, K. (2011). A new class of phenazines with activity against a chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* strain and antimicrobial activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(13), 4913-4917.
- Imamura, N., Nishijima, M., Takadera, T., Adachi, K., Sakai, M., and Sano, H. (1997). New anticancer antibiotics pelagiomycins, produced by a new marine bacterium *Pelagibacter variabilis*. *The Journal of Antibiotics*, 50(1), 8-12.
- Jayaseelan, S., Ramaswamy, D., and Dharmaraj, S. (2014). Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(4), 1159-1168.
- Jiang, H., Zhang, J., Zhu, H., Li, H., and Zhang, X. (2007). Nerve growth factor prevents the apoptosis-associated increase in acetylcholinesterase activity after hydrogen

- peroxide treatment by activating Akt. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(1), 46-56.
- Joshi, C., Kothari, V., and 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.
- Karatuna, O. ve Yağcı, A. (2008). *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 38(1), 42-51.
- Keleş, Y. (2015). Antosiyanin pigmentlerin biyokimyası ve analizi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8(1), 19-25.
- Kerr, J. R., Taylor, G. W., Rutman, A., Høiby, N., Cole, P. J., and Wilson, R. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *Journal of Clinical Pathology*, 52(5), 385-387.
- Keskin, D. ve Ekmekçi, S. (2003). *Pseudomonas* türlerinin gıdalardan izolasyon ve tanımlanmasında kullanılan besiyerleri. *Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(8), 29-33.
- Khanafari, A., Assadi, M. M., and Fakhr, F. A. (2006). Review of prodigiosin, pigmentation in *Serratia marcescens*. *Online Journal of Biological Sciences*, 6(1), 1-13.
- Khanam, B. and Chandra, R. (2018). Comparative analysis of prodigiosin isolated from endophyte *Serratia marcescens*. *Letters in Applied Microbiology*, 66(3), 194-201.
- Khiralla, G., Salem, S., and El-Malky, W. (2015). Effect of natural and synthetic food coloring agents on the balance of some hormones in rats. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, 5(2), 88-95.
- Kim, D., Kim, J. F., Yim, J. H., Kwon, S. K., Lee, C. H., and Lee, H. K. (2008). Red to red-the marine bacterium *Hahella chejuensis* and its product prodigiosin for mitigation of harmful algal blooms. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(10), 1621-1629.
- Kim, J.K., Park, S.M., and Lee, S.J., (1995). Novel antimutagenic pigment produced by *Bacillus licheniformis* SSA3. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 5(1), 48-50.
- Kim, S. J., Sung, J. Y., Um, J. W., Hattori, N., Mizuno, Y., Tanaka, K., Paik, S.R., Kim, J., and Chung, K. C. (2003). Parkin cleaves intracellular α -synuclein inclusions via the activation of calpain. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 41890-41899.
- Kim, S. K., Kim, S. U., Park, I. H., Bang, J. H., Aboody, K. S., Wang, K. C., Cho, B. K., Kim, M., Menon, L. G., Black, P. M., and Carroll, R. S. (2006). Human neural stem cells target experimental intracranial medulloblastoma and deliver a therapeutic gene leading to tumor regression. *Clinical Cancer Research*, 12(18), 5550-5556.

- Kimata, S., Izawa, M., Kawasaki, T., and Hayakawa, Y. (2017). Identification of a prodigiosin cyclization gene in the roseophilin producer and production of a new cyclized prodigiosin in a heterologous host. *The Journal of Antibiotics*, 70(2), 196-199.
- Kirti, K., Amita, S., Priti, S., Mukesh Kumar, A., and Jyoti, S. (2014). Colorful world of microbes: carotenoids and their applications. *Advances in Biology*, 2014(2014), 1-13.
- Kisumi, M. A. S. A. H. I. K. O., Komatsubara, S. A. B. U. R. O., and Chibata, I. (1977). Enhancement of isoleucine hydroxamate-mediated growth inhibition and improvement of isoleucine-producing strains of *Serratia marcescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 34(6), 647-653.
- Knapp, L. T. and Klann, E. (2000). Superoxide-induced stimulation of protein kinase C via thiol modification and modulation of zinc content. *Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 24136-24145.
- Kobayashi, N. and Ichikawa, Y. (1991). Separation of the prodigiosin-localizing crude vesicles which retain the activity of protease and nuclease in *Serratia marcescens*. *Microbiology and Immunology*, 35(8), 607-614.
- Koçancı, F. G. and Aslım, B. (2016). Structure and functions of acetylcholinesterase and acetylcholinesterase inhibitory activity of plants. *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*, 6(1), 19-35.
- Köcher, S. and Müller, V. (2011). The nature and function of carotenoids in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*. *Halophiles and Hypersaline Environments*, 303-317.
- Krishna, J. G., Basheer, S. M., Beena, P. S., and Chandrasekaran, M. (2008). Marine bacteria as source of pigment for application as dye in textile industry. *Proceedings of the International Conference on Biodiversity Conservation Mgt*, (1), 743-4.
- Krishna, G. J., Basheer, S. M., Elyas, K. K., and Chandrasekaran, M. (2011). Prodigiosin from marine bacterium: production, characterization and application as dye in textile industry. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 7(1), 155-191.
- Kucharska, M. and Grabka, J. (2010). A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes. *Talanta*, 80(3), 1045-1051.
- Kumar, K., and Kumar, V. (2015). Prodigiosin alkaloids: recent advancements in total synthesis and their biological potential. *RSC Advances*, 5(15), 10899-10920.
- Kumaran, R. S., Kim, H. J., and Hur, B. K. (2010). Taxol promising fungal endophyte, *Pestalotiopsis* species isolated from *Taxus cuspidata*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(5), 541-546.
- Kurachi, M. (1958). Studies on the biosynthesis of pyocyanine(I): on the cultural condition for pyocyanine formation. *Bulletin of the Institute for Chemical Research*, 36(6), 163-173.

- Lapenda, J. C., Silva, P. A., Vicalvi, M. C., Sena, K. X. F. R., and Nascimento, S. C. (2015). Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(2), 399-406.
- Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., and Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine*, 10(12), 599-606.
- Laursen, J. B. and Nielsen, J. (2004). Phenazine natural products: Biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. *Chemical Reviews*, 104(3), 1663-1686.
- Laxmi, M., and Bhat, S. G. (2016). Characterization of pyocyanin with radical scavenging and antibiofilm properties isolated from *Pseudomonas aeruginosa* strain BTRY1. *Biotech*, 6(1), 27, 1-5.
- Lee, J. S., Kim, Y. S., Park, S., Kim, J., Kang, S. J., Lee, M. H., Ryu, S., Choi, J., M., Oh, T., K. and Yoon, J. H. (2011). A novel marine bacterial species *Zooshikella rubidus* S1-1 produces exceptionally both of prodigiosin and cycloprodigiosin as major metabolic constituents. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(15), 1-27.
- Li, C. and Jackson, R. M. (2002). Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 282(2), 227-241.
- Li, S., Mou, Q., Feng, N., and Leung, P. H. (2018). A Selective Medium for pyocyanin-dependent fast electrochemical detection of *Pseudomonas aeruginosa* in environmental microbial samples. *International Journal of Electrochemical Science*, 13(4), 3789-3798.
- Lin, C., Jia, X., Fang, Y., Chen, L., Zhang, H., Lin, R., and Chen, J. (2019). Enhanced production of prodigiosin by *Serratia marcescens* FZSF02 in the form of pigment pellets. *Electronic Journal of Biotechnology*, 40(2019), 58-64.
- Liu, E. Y., Xu, M. L., Jin, Y., Wu, Q., Dong, T. T., and Tsim, K. W. (2018b). Genistein, a Phytoestrogen in Soybean, Induces the Expression of acetylcholinesterase via G protein-coupled receptor 30 in PC12 cells. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11(59), 1-11.
- Liu, Y., Zhou, H., Ma, X., Lin, C., Lu, L., Liu, D., Ma, D., Gao, X., and Qian, X. Y. (2018a). Prodigiosin inhibits proliferation, migration, and invasion of nasopharyngeal cancer cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 48(4), 1556-1562.
- Maçin, S. (2014). Pigmentli and Pigmentsiz *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Virulans Faktörlerinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Karşılaştırılması. *Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Uzmanlık Tezi*, 1-84.
- Mahmood, H. M., Mohammed, A. K., and May, T. (2015). Purification and physiochemical characterization of pyomelanin pigment produced from local *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(10), 289-299.

- McFarland, A. J., Grant, G. D., Perkins, A. V., Flegg, C., Davey, A. K., Allsopp, T. J., Renshaw, G., Kavanagh, J., McDermott, C. M., and Anoopkumar-Dukie, S. (2013). Paradoxical role of 3-methyladenine in pyocyanin-induced toxicity in 1321N1 astrocytoma and SHSY-5Y neuroblastoma cells. *International Journal of Toxicology*, 32(3), 209-218.
- Meyer, J. M. (2000). Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Archives of Microbiology*, 174(3), 135-142.
- Moayedi, A., Nowroozi, J., and Sepahy, A. A. (2018). Cytotoxic effect of pyocyanin on human pancreatic cancer cell line (Panc-1). *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(8), 794.
- Molochkina, E. M., Zorina, O. M., Fatkullina, L. D., Goloschapov, A. N., and Burlakova, E. B. (2005). H₂O₂ modifies membrane structure and activity of acetylcholinesterase. *Chemico-Biological Interactions*, 157, 401-404.
- Montaner, B. and Prez-Toms, R. (2003). The prodigiosins: A new family of anticancer drugs. *Current Cancer Drug Targets*, 3(1), 57-65.
- Montenegro, M. F., Ruiz-Espejo, F., Campoy, F. J., Muñoz-Delgado, E., de la Cadena, M. P., Rodríguez-Berrocal, F. J., and Vidal, C. J. (2006). Cholinesterases are down-expressed in human colorectal carcinoma. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(18), 2175-2182.
- Moore, N. M. and Flaws, M. L. (2011). Epidemiology and pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clinical Laboratory Science*, 24(1), 43.
- Mufson, E. J., Counts, S. E., Perez, S. E., and Ginsberg, S. D. (2008). Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 8(11), 1703-1718.
- Murray, A. P., Faraoni, M. B., Castro, M. J., Alza, N. P., and Cavallaro, V. (2013). Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's Disease Therapy. *Current Neuropharmacology*, 11(4), 388-413.
- Nair, A. S., Kumar, B. P., and Geo, J. A. (2017). Microbial production of textile grade pigments. *African Journal of Microbiology Research*, 11(42), 1532-1537.
- Namazkar, S., and Ahmad, W. A. (2013). Spray-dried prodigiosin from *Serratia marcescens* as a colorant. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 10(1), 69-76.
- Nassif, N., Roux, C., Coradin, T., Bouvet, O. M., and Livage, J. (2004). Bacteria quorum sensing in silica matrices. *Journal of Materials Chemistry*, 14(14), 2264-2268.
- Neves-Pinto, C., Malta, V. R., Pinto, M. D. C. F., Santos, R. H., de Castro, S. L., and Pinto, A. V. (2002). A trypanocidal phenazine derived from β -lapachone. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(10), 2112-2115.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M. (2016). Drugs and drug candidates from marine sources: An assessment of the current "state of play". *Planta Medica*, 82(09/10), 775-789.

- Nguyen, M., Marcellus, R. C., Roulston, A., Watson, M., Serfass, L., Madiraju, S. M., and Acoca, S. (2007). Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19512-19517.
- Numan, M., Bashir, S., Mumtaz, R., Tayyab, S., Rehman, N. U., Khan, A. L., Shinwari, Z., K., and Al-Harrasi, A. (2018). Therapeutic applications of bacterial pigments: a review of current status and future opportunities. *3 Biotech*, 8(4), 1-18.
- Oh, E. J., Kwon, J. H., Kim, S. Y., In, S. J., Lee, D. G., Cha, M. Y., Kang, H. C., Hwang-Bo, J., Lee, Y. H., Chung, I. S., and Baek, N. I. (2016). Red pigment produced by *Zooshikella ganghwensis* inhibited the growth of human cancer cell lines and MMP-1 gene expression. *Applied Biological Chemistry*, 59(4), 567-571.
- Ohfuji, K., Sato, N., Hamada-Sato, N., Kobayashi, T., Imada, C., Okuma, H., and Watanabe, E. (2004). Construction of a glucose sensor based on a screen-printed electrode and a novel mediator pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(10), 1237-1244.
- O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Spitz, D. R., Denning, G. M., and Britigan, B. E. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 287(1), 94-103.
- Omaye, S. T. (2004). *Food and Nutritional Toxicology*. CRC Press: Boca Raton, FL, USA., 308.
- O'sullivan, A. M., O'Callaghan, Y. C., O'grady, M. N., Queguineur, B., Hanniffy, D., Troy, D. J., and O'Brien, N. M. (2011). *In vitro* and cellular antioxidant activities of seaweed extracts prepared from five brown seaweeds harvested in spring from the west coast of Ireland. *Food Chemistry*, 126(3), 1064-1070.
- Öğüt, S. ve Atay, E. (2012). Yaşlılıkta serbest radikaller ve oksidatif stres. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 19(2), 68-74.
- Ökmen, G. ve Türkcan, O. (2013). *Anabaena* sp.'nin Pigment İçerikleri Üzerine Glukozun Etkisi. *Gıda*, 38(4), 223-229.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G. ve Yönden, Z. (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3), 331-336.
- Özkay, Ü. D., Öztürk, Y., and Can, Ö. (2011). Yaşlanan dünyanın hastalığı: Alzheimer Hastalığı. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 18(1), 35-42.
- Pandey, R., Chander, R., and Sainis, K. B. (2007). Prodigiosins: a novel family of immunosuppressants with anti-cancer activity. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 44(5), 295-302.
- Pandey, R., Chander, R., and Sainis, K. B. (2009). Prodigiosins as anti cancer agents: living upto their name. *Current Pharmaceutical Design*, 15(7), 732-741.

- Pankaj, V. P. and Kumar, R. (2016). Microbial pigment as a potential natural colorant for contributing to mankind. *Research Trends in Molecular Biology*, 37(2), 85-98.
- Parlak, V., Uçar, A., Alak., G., and Atamanalp, M. (2019). Responses of Antioxidant in Rainbow Trout Exposed to Temephos. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(2), 1156-1163.
- Patil, C. D., Patil, S. V., Salunke, B. K., and Salunkhe, R. B. (2011). Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* NMCC46 as a mosquito larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Parasitology Research*, 109(4), 1179-1187.
- Patil, S., Nikam, M., Patil, H., Anokhina, T., Kochetkov, V., and Chaudhari, A. (2017). Bioactive pigment production by *Pseudomonas* spp. MCC 3145: Statistical media optimization, biochemical characterization, fungicidal and DNA intercalation-based cytostatic activity. *Process Biochemistry*, 58(2017), 298-305.
- Patil, S., Paradeshi, J., and Chaudhari, B. (2016). Anti-melanoma and UV-B protective effect of microbial pigment produced by marine *Pseudomonas aeruginosa* GS-33. *Natural Product Research*, 30(24), 2835-2839.
- Pérez-Tomás, R. and Vinas, M. (2010). New insights on the antitumoral properties of prodiginines. *Current Medicinal Chemistry*, 17(21), 2222-2231.
- Piemontese, L. (2017). New approaches for prevention and treatment of Alzheimer's disease: a fascinating challenge. *Neural Regeneration Research*, 12(3), 405-406.
- Plonka, P. M. and Grabacka, M. (2006). Melanin synthesis in microorganisms-biotechnological and medical aspects. *Acta Biochimica Polonica*, 53(3), 429-443.
- Post, S. G. (1999). Future scenarios for the prevention and delay of Alzheimer disease onset in high-risk groups: An ethical perspective. *American Journal of Preventive Medicine*, 16(2), 105-110.
- Priyaja, P., Jayesh, P., Philip, R., and Singh, I. B. (2016). Pyocyanin induced *in vitro* oxidative damage and its toxicity level in human, fish and insect cell lines for its selective biological applications. *Cytotechnology*, 68(1), 143-155.
- Qavi, H., and Al-Rajhi, A. A. (2009). Acetylcholinesterase and HHV-8 in squamous cell carcinoma and retinoblastoma. *In vivo*, 23(5), 679-683.
- Rana, N., and Chauhan, A. (2018). Evaluation and standardization of cultural conditions for maximum pigment production by *Pseudomonas* sp. from hot water springs. *The Pharma Innovation*, 7(5), 289.
- Rao, N., Prabhu, M., Xiao, M., and Li, W. J. (2017). Fungal and bacterial pigments: Secondary metabolites with wide applications. *Frontiers in Microbiology*, 8(1113), 1-13.
- Ravindran, A., Sunderrajan, S., and Pennathur, G. (2019). Phylogenetic studies on the prodigiosin biosynthetic operon. *Current Microbiology*, 76(5), 597-606.

- Ren, Y., Gong, J., Fu, R., Zhang, J., Fang, K., and Liu, X. (2018). Antibacterial dyeing of silk with prodigiosins suspension produced by liquid fermentation. *Journal of Cleaner Production*, 201(2), 648-656.
- Rewcastle, G. W., Denny, W. A., and Baguley, B. C. (1987). Potential antitumor agents. 51. Synthesis and antitumor activity of substituted phenazine-1-carboxamides. *Journal of Medicinal Chemistry*, 30(5), 843-851.
- Rokade, M. T. and Pethe, A. S. (2017). Isolation, molecular characterization and phylogenetic analysis of *Serratia marcescens* isolated from soil. *Bioscience Discovery*, 8(3), 388-396.
- Romanowski, E. G., Lehner, K. M., Martin, N. C., Patel, K. R., Callaghan, J. D., Stella, N. A., and Shanks, R. M. (2019). Thermoregulation of prodigiosin biosynthesis by *Serratia marcescens* is controlled at the transcriptional level and requires HexS. *Polish Journal of Microbiology*, 68(1), 43-50.
- Rovina, K., Siddiquee, S., and Shaarani, S. M. (2016). Extraction, analytical and advanced methods for detection of Allura Red AC (E129) in food and beverages products. *Frontiers in Microbiology*, 7(798), 1-13.
- Rovina, K., Siddiquee, S., and Shaarani, S. M. (2017). A review of extraction and analytical methods for the determination of tartrazine (E 102) in foodstuffs. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 47(4), 309-324.
- Rymbai, H., Sharma, R. R., and Srivastav, M. (2011). Bio-colorants and its implications in health and food industry—a review. *International Journal of PharmTech Research*, 3(4), 2228-2244.
- Sabbagh, P., and Namvar, A. E. (2017). The eminence status of bacterial pigments under different aspects. *Microbiologia Medica*, 32(4), 122-126.
- Saha, S., Thavasi, R., and Jayalakshmi, S. (2008). Phenazine pigments from *Pseudomonas aeruginosa* and their application as antibacterial agent and food colourants. *Research Journal of Microbiology*, 3(3), 122-128.
- Sakuraoka, R., Suzuki, T., and Morohoshi, T. (2019). Distribution and genetic diversity of genes involved in quorum sensing and prodigiosin biosynthesis in the complete genome sequences of *Serratia marcescens*. *Genome Biology and Evolution*, 11(3), 931-936.
- Saranya, R., Jayapriya, J., and Tamilselvi, A. (2012). Dyeing of silk fabric with phenazine from *Pseudomonas* species. *Coloration Technology*, 128(6), 440-445.
- Saricaoglu, F. T. and Turhan, S. (2013). Chemical composition, colour and textural properties of Akcaabat meatball: A traditional Turkish meat product. *Gıda*, 38(4), 191-198.
- Saritaş, N., Uyanik, F., and Hamurcu, Z. (2011). Effects of acute twelve minute run test on oxidative stress and antioxidant enzyme activities. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(9), 1218-1222.

- Schumacher, M., Camp, S., Maulet, Y., Newton, M., MacPhee-Quigley, K., Taylor, S. S., and Taylor, P. (1986). Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature*, 319(6052), 407-409.
- Schwartz, P. J., Blundon, J. A., and Adler, E. M. (2007). A biochemical assay for acetylcholinesterase activity in PC12 cells. *Science Signaling*, 2007(394), 1-8.
- Shahitha, S. and Poornima, K. (2012). Enhanced production of prodigiosin production in *Serratia marcescens*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(8), 138-140.
- Shaikh, Z. (2016). Biosynthesis of prodigiosin and its applications. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 11(6), 01-28.
- Sherwin, B. B. (2000). Mild cognitive impairment: Potential pharmacological treatment options. *Journal of the American Geriatrics Society*, 48(4), 431-441.
- Shinya, K. , Shimizu, S. , Kunigami, T. , Furihata, K. and Seto H. (1995). A new neuronal cell protecting substance, lavanduquinocin, produced by *Streptomyces viridochromogenes*. *The Journal of Antibiotics*, 48(7), 574-578.
- Shipley, M. M., Mangold, C. A., and Szpara, M. L. (2016). Differentiation of the SHSY-5Y human neuroblastoma cell line. *Journal of Visualized Experiments*, (108), 1-11.
- Sigurdson, G. T., Tang, P., and Giusti, M. M. (2017). Natural colorants: Food colorants from natural sources. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8, 261-280.
- Speert, D. P., Campbell, M. E., Davidson, A. G. F., and Wong, L. T. (1993). *Pseudomonas aeruginosa* colonization of the gastrointestinal tract in patients with cystic fibrosis. *Journal of Infectious Diseases*, 167(1), 226-229.
- Sriwiriyan, S., Ninpesh, T., Sukpondma, Y., Nasomyon, T., and Graidist, P. (2014). Cytotoxicity screening of plants of genus piper in breast cancer cell lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(6), 921-928.
- Stankovic, N., Senerovic, L., Ilic-Tomic, T., Vasiljevic, B., and Nikodinovic-Runic, J. (2014). Properties and applications of undecylprodigiosin and other bacterial prodigiosins. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(9), 3841-3858.
- Strasser, S., Neureiter, M., Geppl, M., Braun, R., and Danner, H. (2009). Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1), 167-177.
- Sudhakar, T., Karpagam, S., and Shiyama, S. (2013). Analysis of pyocyanin compound and its antagonistic activity against phytopathogens. *International Journal of ChemTech Research*, 5(3), 1101-1106.
- Sundaramoorthy, N., Yogesh, P., and Dhandapani, R. (2009). Production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *Indian Journal of Science and Technology*, 2(10), 32-34.

- Surwase, S. N., Jadhav, S. B., Phugare, S. S., and Jadhav, J. P. (2013). Optimization of melanin production by *Brevundimonas* sp. SGJ using response surface methodology. *3 Biotech*, 3(3), 187-194.
- Suryawanshi, R. K., Patil, C. D., Borase, H. P., Salunke, B. K., and Patil, S. V. (2014). Studies on production and biological potential of prodigiosin by *Serratia marcescens*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(5), 1209-1221.
- Szatrowski, T. P. and Nathan, C. F. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Research*, 51(3), 794-798.
- Şahin, H. A. (2002). Asetilkolin, kolinesterazlar ve alzheimer hastalığı. *Demans Dergisi*, 2(3), 69-73.
- Tang, L. L., Wang, R., and Tang, X. C. (2005). Effects of huperzine A on secretion of nerve growth factor in cultured rat cortical astrocytes and neurite outgrowth in rat PC12 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26(6), 673.
- Temiz, Ö. ve Kargın, F. (2019). Biyopestisit Emamektin Benzoat'ın *Oreochromis niloticus*'un Dokularında Toksik Etkilerinin Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesiyle Belirlenmesi. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 4(1), 34-38.
- Thomson, N. R., Crow, M. A., McGowan, S. J., Cox, A., and Salmond, G. P. C. (2000). Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Molecular Microbiology*, 36(3), 539-556.
- Tuli, H. S., Chaudhary, P., Beniwal, V., and 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.
- Turick, C. E., Knox, A. S., Becnel, J. M., Ekechukwu, A. A., and Milliken, C. E. (2010). Properties and function of pyomelanin. *Biopolymers*, 23, 449-472.
- Unagul, P., Wongsu, P., Kittakoop, P., Intamas, S., Srikitikulchai, P., and Tanticharoen, M. (2005). Production of red pigments by the insect pathogenic fungus *Cordyceps unilateralis* BCC 1869. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(4), 135-140.
- Ünyayar, A., Mazmancı, M. A., Erkurt, E. A., Atacag, H., and Gizir, A. M. (2005). Decolorization kinetics of the azo dye drimaren blue X3LR by laccase. *Reaction Kinetics and Catalysis Letters*, 86(1), 99-107.
- Venil, C. K. Zakaria, Z. A., and Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48(7), 1065-1079.
- Venil, C. K., and Lakshmanaperumalsamy, P. (2009). An insightful overview on microbial pigment, prodigiosin. *Electronic Journal of Biology*, 5(3), 49-61.
- Waldron, R. T., and Rozengurt, E. (2000). Oxidative stress induces protein kinase D activation in intact cells involvement of Src and dependence on protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, 275(22), 17114-17121.

- Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., and Howard-Jones, A. R. (2006). Biological formation of pyrroles: Nature's logic and enzymatic machinery. *Natural Product Reports*, 23(4), 517-531.
- Wang, S., Miller, W., Milton, J., Vicker, N., Stewart, A., Charlton, P., Mistry, P., Hardick, D., and Denny, W. A. (2002). Structure–activity relationships for analogues of the phenazine-based dual topoisomerase I/II inhibitor XR11576. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 12(3), 415-418.
- Wang, W., Préville, P., Morin, N., Mounir, S., Cai, W., and Siddiqui, M. A. (2000). Hepatitis C viral IRES inhibition by phenazine and phenazine-like molecules. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 10(11), 1151-1154.
- Watson, D., MacDermot, J., Wilson, R., Cole, P. J., and Taylor, G. W. (1986). Purification and structural analysis of pyocyanin and 1-hydroxyphenazine. *European Journal of Biochemistry*, 159(2), 309-313.
- Wenk, G. L. (2003). Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. *Journal of Clinical Psychiatry*, 64(9), 7-10.
- Whooley, M. A. and McLoughlin, A. J. (1982). The regulation of pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 15(3), 161-166.
- Williamson, N. R., Fineran, P. C., Leeper, F. J., and Salmond, G. P. (2006). The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nature Reviews Microbiology*, 4(12), 887-899.
- Williamson, N. R., Simonsen, H. T., Ahmed, R. A., Goldet, G., Slater, H., Woodley, L., Leeper, F. J., and Salmond, G. P. (2005). Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: Identification of a novel 2-methyl-3-n-amyI-pyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*. *Molecular Microbiology*, 56(4), 971-989.
- 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.
- Xu, F., Xia, S., and Yang, Q. (2011). *Strategy for obtaining inexpensive prodigiosin production by Serratia marcescens*. In 3rd International Conference on Chemical, Biological and Environmental Engineering, 20(2011), 32-36.
- Yan, Y., Li, Z., and Koffas, M. A. (2008). High-yield anthocyanin biosynthesis in engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(1), 126-140.
- Yeterian, E., Martin, L. W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I. L., and Schalk, I. J. (2010). Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids*, 38(5), 1447-1459.
- Yılmaz, İ. (2010). Karotenoidler. *Journal of Inonu University Medical Faculty*, 17(3), 223-231.

- Zhang, H., Zhan, J., Su, K., and Zhang, Y. (2006). A kind of potential food additive produced by *Streptomyces coelicolor*: characteristics of blue pigment and identification of a novel compound, λ -actinorhodin. *Food Chemistry*, 95(2), 186-192.
- Zhang, J. Y., Jiang, H., Gao, W., Wu, J., Peng, K., Shi, Y. F., and Zhang, X. J. (2008). The JNK/AP1/ATF2 pathway is involved in H₂O₂-induced acetylcholinesterase expression during apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(9), 1435-1445.
- Zhao, Y., Wang, X., Wang, T., Hu, X., Hui, X., Yan, M., and Wan, D. (2011). Acetylcholinesterase, a key prognostic predictor for hepatocellular carcinoma, suppresses cell growth and induces chemosensitization. *Hepatology*, 53(2), 493-503.
- Zhao, J., Wu, Y., Alfred, A. T., Wei, P., and Yang, S. (2014). Anticancer effects of pyocyanin on HepG 2 human hepatoma cells. *Letters in Applied Microbiology*, 58(6), 541-548.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : TUNCA, Merve
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 07.07.1993, Bursa
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : (0224) 247 84 43
 e-mail : mervetunca11@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Lisans	Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2015
Lise	Hasan Ali Yücel Lisesi	2011

İş Deneyimi

-

Yabancı Dil

İngilizce

Yayın

1. Tunca, M., Aslim, B. (2018, November 22-23). *Serratia marcescens'ten izole edilen prodigiosin pigmentinin alternatif doğal gıda boyası olarak antioksidan özelliğinin ve kolon kanserine karşı antikanser etkisinin araştırılması*, International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology (EURASIANSCIENTECH 2018), Ankara.
2. Tunca, M., Aslim, B. (2018, November 22-23). *Nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu etkisi bulunan mikrobiyal kaynaklı pyocyanin pigmentinin sentetik gıda renklendiricilerine alternatif olarak kullanımının araştırılması*, International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology (EURASIANSCIENTECH 2018), Ankara.

Hobiler

Edebiyat dergisi okumak, film izlemek, tarihi geziler, puzzle yapmak



GAZİ GELECEKTİR...