



***Scolecobasidium musae* FUNGUSDAN MELANİN
ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU VE UV
KORUYUCU FİLM ÜRETİMİ**

Fatma Meryem BOZHÜYÜK

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Murat ÖZDAL

2023

(Her hakkı saklıdır.)

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

***Scolecobasidium musae* FUNGUSDAN MELANİN ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU
VE UV KORUYUCU FİLM ÜRETİMİ**

(Optimization of Melanin Production from *Scolecobasidium musae* Fungus and Production
of UV Protective Film)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatma Meryem BOZHÜYÜK

Danışman: Doç. Dr. Murat ÖZDAL

Erzurum
Ocak, 2023

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Fatma Meryem BOZHÜYÜK tarafından hazırlanan “*Scolecobasidium musae* Fungusdan Melanın Üretiminin Optimizasyonu ve UV Korumucu Film Üretimi” başlıklı çalışması 13 / 01 / 2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Biyoloji Ana Bilim Dalı, Biyoloji Bilim Dalında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Doç. Dr. Furkan ORHAN
Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi

Aslı Islak İmzalıdır

Danışman: Doç. Dr. Murat ÖZDAL
Atatürk Üniversitesi

Aslı Islak İmzalıdır

Jüri Üyesi: Dr. Öğr. Üyesi Sümeyra GÜRKÖK
Atatürk Üniversitesi

Aslı Islak İmzalıdır

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

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

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: FLY-2021-9668

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

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak *Doç. Dr. Murat ÖZDAL* danışmanlığında sunulan “*Scolecobasidium musae Fungusdan Melanin Üretiminin Optimizasyonu ve UV Koruyucu Film Üretimi*” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	0	30
Kuramsal Temeller	5	30
Materyal ve Yöntem	7	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	2	20
Sonuç ve Öneriler	0	20
Tezin Geneli	7	25

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

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

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Fatma Meryem Bozhüyük	Doç. Dr. Murat ÖZDAL
13.1.2023	13.1.2023
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

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

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

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

TEŞEKKÜR

Oldukça yoğun ve güzel bir süreci tamamlayabilmenin sevinç ve mutluluğunu yaşamaktayım. Tez çalışmamın her aşamasında bana her konuda sağladığı desteklerinden ve yardımlarından dolayı özellikle danışman hocam Sayın Doç. Dr. Murat ÖZDAL'a en derin teşekkürlerimi sunarım. Bilim insanının iyi bir gözlemci olma, sabırlı olma, gayretli olma, çalışkan olma, etik değerlere bağlı olma gibi belki de sayamayacağım birçok özelliği ile örnek olduğu için danışman hocam Sayın Doç. Dr. Murat ÖZDAL'ı ayrıca takdir ve kendisine teşekkür ediyorum. Atatürk Üniversitesi Fen Edabiyat Fakültesi Fizik Bölümü hocalarından özellikle Prof. Dr. Ali GÜROL, Doç. Dr. Esra KAVAZ, Dr. Öğr. Üyesi Melek FİDAN ve Dr. Öğr. Üyesi Sevdâ SARITAŞ hocalarıma çok teşekkür ediyorum. Hepsini tanımaktan ve deneyimlerinden faydalanmaktan çok mutlu olduğumu belirtmek isterim. Ayrıca DAYTAM'da yaptırdığımız testler için yardımcı olan herkese teşekkür ediyorum. Hayatımın en büyük gurur kaynağı canım babam Prof. Dr. Mehmet Emin BOZHÜYÜK'e ve canım annem Nevim BOZHÜYÜK'e en derin teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, bu tez çalışmasını destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (Proje No: FYL-2021-9668) teşekkürlerimi sunarım.

Fatma Meryem BOZHÜYÜK

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Scolecobasidium musae TÜRÜ FUNGUSDAN MELANİN ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU VE UV KORUYUCU FİLM ÜRETİMİ

Fatma Meryem BOZHÜYÜK

Danışman: Doç. Dr. Murat ÖZDAL

Amaç: Bu tez çalışmasında *Scolecobasidium musae*'den melanin pigmentinin üretimi, optimizasyonu, saflaştırılması, karakterizasyonu, pigment sentez yolunun belirlenmesi, antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi, kimyasal yapısının aydınlatılması ve anti-UV koruyucu film üretimi ve filmin yapısının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Melanin üreten fungusun moleküler analizi yapılmıştır. Melanin üretimi için farklı fiziksel ve kimyasal ortamlarda optimum koşullar belirlenmiştir. Saflaştırılan melanin pigmentinin kimyasal yapısının aydınlatılması için FTIR, XRD, NMR, elemental analizleri yapılmıştır. Melaninin antioksidan, antimikrobiyal ve polimer film olarak UV koruyucu özelliği araştırılmıştır.

Bulgular: İzole edilen ve çalışmada kullanılan MO-7 izolatının 18S rRNA gen analizi ile tür teşhisi yapılarak *S. musae* (GenBank Erişim No: OP437997.1) olduğu belirlenmiştir. En yüksek melanin pigment üretim ortamı 30 °C, pH 7, %1,5 glikoz, %1 kazein ve 100 mg/L Cu ilavesiyle 18 günlük inkübasyon süresi sonunda (980 mg/L) elde edilmiştir. Saflaştırılan melaninin spektrofotometrik analizinde en yüksek absorbands 220 nm'de ölçülmüştür. Üretilen melanin organik çözücülerde iyi çözünmezken alkali çözücülerde iyi çözünmüştür. Saflaştırılan melaninin antioksidan ve antibakteriyal özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Kimyasal karakterizasyonu sonucu *S. musae* melanininin türü piyomelanin olabileceği öne sürülmüştür. Üretilen PVA/glisero1 melanin katkılı filmin kimyasal karakterizasyon analizleri ile filmin yapısı ortaya konulmuş ve filmin UV koruyucu özellikte olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Bu tez çalışmasında, ilk kez *S. musae* fungusundan melanin üretimi ve karakterizasyonu yapılmıştır. Bu melaninin antioksidan, antibakteriyal özelliklerinin yanısıra UV koruyucu özelliklerinden dolayı birçok alanda kullanılabilme potansiyeli ortaya çıkarılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Scolecobasidium musae*, melanin, fungus, optimizasyon, karakterizasyon, antioksidan, antimikrobiyal aktivitesi, UV koruyucu film

Ocak 2023, 90 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

OPTIMIZATION OF MELANIN PRODUCTION FROM *Scolecobasidium musae* FUNGUS AND PRODUCTION OF UV PROTECTIVE FILM

Fatma Meryem BOZHÜYÜK

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat ÖZDAL

Purpose: In this thesis, it was aimed to produce, optimize, purify, characterize the melanin pigment from *Scolecobasidium musae*, determine the pigment synthesis pathway, determine its antimicrobial and antioxidant activities, elucidate its chemical structure, and to produce anti-UV protective film and determine the structure of the film.

Method: Molecular analysis of melanin producing fungus was performed. Optimum conditions for melanin production were determined in different physical and chemical environments. FTIR, XRD, NMR, elemental analyzes were performed to elucidate the chemical structure of the purified melanin pigment. The UV protective property of melanin as an antioxidant, antimicrobial and polymer film has been investigated.

Results: The MO-7 isolate, which was isolated and used in the study, was identified as *S. musae* (GenBank Accession Number: OP437997.1) by identifying the species by 18S rRNA gene analysis. The highest melanin pigment production medium was obtained after an 18-day incubation period (980 mg/L) at 30 °C, pH 7, 1.5% glucose, 1% casein, and 100 mg/L Cu addition. In the spectrophotometric analysis of the purified melanin, the highest absorbance was measured at 220 nm. While the produced melanin is not soluble in organic solvents, it dissolves well in alkaline solvents. It has been determined that the purified melanin has antioxidant and antibacterial properties. As a result of the chemical characterization of melanin, it has been suggested that the type of melanin in *S. musae* may be pyomelanin. The structure of the film was revealed by the chemical characterization analyzes of the produced PVA/glycerol melanin added film and it was determined that the film had UV protective properties.

Conclusion: In this thesis, the production and characterization of melanin from the fungus *S. musae* was performed for the first time. The potential of this melanin to be used in many areas has been revealed due to its antioxidant and antibacterial properties as well as its UV protective properties.

Keywords: *Scolecobasidium musae*, melanin, fungus, optimization, characterization, antioxidant, antimicrobial activity, UV protective film

January 2023, 90 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR DİZİNİ	xii
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	3
Pigment Nedir?.....	3
Fungal Pigmentler	4
Melanin pigmentinin genel özellikleri	5
Melaninin mantara sağladığı avantajlar	6
Mikrobiyal Melanin Uygulama Alanları ve Kullanımı.....	8
Melanin Çeşitleri.....	10
Melanin Biyosentez Yolları	11
Melanin İnhibitörleri	12
Melaninlerin Lokalizasyonu.....	13
Mikrobiyal melanin üretimini etkileyen faktörler.....	14
Radyasyon ve Çeşitleri.....	15
Ultraviyole Radyasyon Çeşitleri ve Özellikleri	16
Ultraviyole radyasyonun canlılar üzerindeki etkisi.....	17
Polimerler ve Film Üretimi	18
<i>Scolecobasidium musae</i> türünün genel özellikleri	19
Melanin İle İlgili Yapılan Çalışmalar	20
MATERYAL VE YÖNTEM	25
Materyal	25
Araştırmada Kullanılan alet ve cihazlar	25
Araştırmada kullanılan kimyasallar	25
Araştırmada kullanılan mikroorganizma.....	25

Yöntem.....	26
Melanin pigment üretimi.....	26
Melanin pigment üretiminin optimizasyonu	26
Melanin pigmentinin ekstraksiyonu ve saflaştırılması.....	27
Melanin pigmentinin karakterizasyonu.....	27
Mantar pigmentinin spektroskopik analizi.....	27
Saf melanin pigmentinin ve üretilen filmlerin kimyasal analizleri.....	28
FTIR analizi	28
LC-MS analizi.....	28
Elemental analiz.....	28
XRD	28
NMR.....	28
Saflaştırılan pigmentin biyoaktiviteleri.....	29
İnhibitörler kullanılarak fungal melanin sentez yolunun belirlenmesi	29
Melanin içeren UV koruyucu film üretimi.....	30
Melanin içeren PVA-gliserol filmlerin analizleri	31
İstatistiksel analiz.....	31
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	32
Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma	32
Melanin Pigment Üretiminin Optimizasyonu	33
Pigment üretimine sıcaklığın etkisi.....	33
pH'ın pigment üretimine etkisi	34
Pigment üretimine karbon kaynaklarının etkisi	35
Pigment üretimine azot kaynaklarının etkisi.....	37
Pigment üretimine metal tuzlarının etkisi	39
Pigment üretimine inkübasyon süresinin etkisi.....	39
Melanin Pigmentinin Saflaştırılması.....	41
Melanin Pigmentinin Çözünürlüğü	42
Mantar Pigmentinin Tespiti ve Miktar Tayini	43
Spektroskopik analiz	43
Saf Melaninin Standart Çalışması.....	44
FT-IR analizi	45
Elemental analiz.....	47
NMR.....	47
Saflaştırılan Pigmentin Biyoaktiviteleri	48

Melaninin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi	48
Melaninin antioksidan aktivitesi	49
İnhibitörler kullanılarak fungal melanin sentez yolunun belirlenmesi	50
Uv Koruyucu Film Özellikleri	51
Üretilen melanin ve PVA-Glyseol XRD analizi	52
Üretilen melanin ve PVA-Glyseol Filmlerinin FTIR analizi	53
Üretilen melanin ve PVA-Gliserol SEM analizi	55
UV-Vis absorpsiyon spektrumları.....	55
SONUÇLAR.....	60
Öneriler	60
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	75

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Melanin İçeren Mikroorganizmaların İzole Edildiği Farklı Koşullar	7
Tablo 2. Melanin Çeşitleri	11
Tablo 3. Radyasyon Çeşitleri	16
Tablo 4. Araştırmada Kullanılan Alet ve Cihazlar	25
Tablo 5. Saflaştırılan Melaninin Çözünürlülüğü	43
Tablo 6. Melaninlerin Elemental Bileşenleri	47
Table 7. <i>S. musae</i> Melanin'inin Antimikrobiyal Aktivitesi	48
Tablo 8. Numunelerin Optik Özellikleri	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Pigmentlerin sınıflandırılması.....	3
Şekil 2. Melaninin kullanım alanları	10
Şekil 3. <i>S. musae</i> 'nin petri ve mikroskop görüntüsü.....	32
Şekil 4. MO- 7 izolatının 18s rDNA dizilerine dayalı filogenetik ağacı.....	33
Şekil 5. Sıcaklığın melanin üretimi, biyomas ve son pH'a etkisi	34
Şekil 6. pH'ın melanin üretimi, biyomas ve son pH'a etkisi	35
Şekil 7. Karbon kaynaklarının melanin, biyomas ve son pH üzerine etkisi.....	36
Şekil 8. Glukoz konsantrasyonlarının melanin, biyomas ve son pH'a etkisi	37
Şekil 9. Azot kaynaklarının melanin üretimi, biyomas ve son pH üzerine etkisi	38
Şekil 10. Kazein konsantrasyonlarının melanin üretimi, biyomas ve son pH üzerine etkisi ...	38
Şekil 11. Metal Tuzlarının melanin üretimi, biyomas ve son pH'a etkisi.....	39
Şekil 12. Farklı zamanların melanin üretimi, biyomas ve son pH'a etkisi	40
Şekil 13. Melanin pigmentinin saflaştırılması a) Fermentasyon sıvısı, b) HCl ile çöeltme, c) Kloroform ile yağların uzaklaştırılması, d) Etanol ile ayırma	42
Şekil 14. Saflaştırılan melaninin spektroskopik analizi	43
Şekil 15. Saflaştırılan melaninin spektrofotometrik sonuçları	44
Şekil 16. Saflaştırılan melaninin standart çalışması	45
Şekil 17. Melaninlerin FTIR analizi.....	46
Şekil 18. <i>S. musae</i> 'den saflaştırılan melaninin NMR analizi	48
Şekil 19. <i>S. musae</i> melaninin DPPH serbest radikal süpürücü aktivitesi.....	49
Şekil 20. Melanin inhibitörleri uygulaması.....	50
Şekil 21. <i>S. musae</i> fermentasyon sıvısında homogensitik asit varlığının LC-MS ile belirlenmesi.....	51
Şekil 22. PVA/Gliserol- melanin film görüntüleri a) Kontrol, b) %0,5 melanin, c) %1 melanin, d) %2 melanin, e) %4 melanin	52
Şekil 23. Melanin kontrol ve film kontrol numunesinin XRD kırınım desenleri	52
Şekil 24. a) Melanin pigmentlerinin farklı oranlarda film numunesine katkılanması sonucunda elde edilen XRD kırınım desenleri b) ayrıntılı XRD sonuçları	53
Şekil 25. Melanin katkılı PVA-Glyseol filmlerinin FTIR analizi	54

Şekil 26. SEM tarafından gözlemlenen PVA-gliserol/melanin kompozit filmlerin mikro yapısı. a) Kontrol, b) %0,5 melanin, c) %1 melanin, d) %2 melanin, e) %4 melanin	55
Şekil 27. Üretilen örneklerin UV-Vis absorpsiyon spektrumları	56
Şekil 28. Hazırlanan numunelerin $\lambda(\text{nm})$ 'nin bir fonksiyonu olarak soğurma katsayısının karesinin $\alpha(\nu)^2$ değişimi	57
Şekil 29. Hazırlanan numunelerin $(h\nu)$ 'nin bir fonksiyonu olarak soğurma katsayısının karesinin $(\alpha h\nu)^2$ değişimi.....	58
Şekil 30. Hazırlanan numunelerin $(h\nu)$ 'nin bir fonksiyonu olarak soğurma katsayısının karesinin $(\alpha h\nu)^{1/2}$ değişimi.....	58



KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat Derece
dk	: Dakika
g	: Gram
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
nm	: Nanometre

Kısaltmalar

AA	: Antioksidan Aktivite
A	: Absorbans
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DPPH	: Diphenyl-1-picrylhydrazyl: 1,1- difenil 2- pikril hidrazil
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HCl	: Hidroklorik Asit
IC50	: Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyon
KH_2PO_4	: Potasyum Dihidrojen Fosfat
KOH	: Potasyum Hidroksit
LC-MS	: Sıvı Kromatografi- Kütle Spektrometrisi
MgSO_4	: Magnezyum Sülfat
NaCl	: Sodyum Klorür
NaNO_3	: Sodyum Nitrat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NH_4Cl	: Amonyum Klorür
NH_4SO_4	: Amonyum Sülfat
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
PDA	: Patates Dekstroz Agar

PVA	: Polivinil Alkol
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
UV	: Ultraviyole
XRD	: X-Işıını Difraksiyonu
YGC	: Maya Ekstraktı Glikoz Kloramfenikol



GİRİŞ

Sanayi devrimi sonrasında yüksek üretkenlik, yüksek kararlılık, düşük üretim maliyeti ve çeşitli uygulamalar nedeniyle sentetik pigmentlerin pazar taleplerinde önemli bir artış olmuştur (Padhan et al., 2021). Bu pigmentler, çevre ve halk sağlığını doğrudan etkilemektedir. Mutajenik, alerjik ve kanserojenik aktiviteleri gibi birçok zararlı etkileri nedeniyle sentetik pigmentlerin kullanımı ile ilgili birçok yasak ve kısıtlamalar getirilmiştir (Bakthavachalu et al., 2020).

Mevcut küresel pigment kullanımı yaklaşık 9,7 milyon tondur (Sánchez-Muñoz et al., 2020). Pigmentlere ve boyalara olan talebin artışından dolayı, 2020- 2027 döneminde yıllık %5'lik bir artış göstererek yaklaşık 33,20 milyar ABD doları pazar payına sahip olacaktır (Padhan et al., 2021). Çok miktarda kimyasal boya kullanan endüstriler, daha fazla miktarda pigmente ihtiyaç duyulmasından sonra (Dufossé, 2018; Lagashetti et al., 2019) bu sorun, çevre dostu ve güvenli mikrobiyal pigment üretiminin endüstrileşmesine yol açmıştır. Ticari mikrobiyal pigment sayısı oldukça azdır ve yeni izolatlardan yüksek verimle pigment üretiminin gerçekleştirilmesi önem arz etmektedir.

Mikrobiyal pigment üretimi kolay, ekonomik, güvenilir ve iklim koşullarına bağlı kalmadan istenildiği kadar üretilebilir ve farklı parametrelerle verimi artırmak mümkündür. Mikrobiyal pigmentler hastalıklara neden olmadığı gibi antimikrobiyal ve antikanser özelliklere sahiptir (Lagashetti et al., 2019; Venil et al., 2020).

Önemli mikrobiyal pigmentlerden biri melanindir. Mikrobiyal melanin gıda, tekstil, biyotıp, kozmetik, nanoteknoloji ve malzeme bilimi için sentetik boyalardan daha güvenli ve daha çevre dostu olarak görülmektedir ve endüstriyel boya olarak önemli bir potansiyele sahiptir (Shahid et al., 2013; Araújo et al., 2014).

Tüm bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında yeni bir melanin üreticisinin izolasyonu sağlanmıştır. Bu tez çalışmasında yukarıda sayılan birçok önemli gerekçe ile 18S rRNA analizine göre *Scolecobasidium musae* olarak tespit edilen fungusun melanin pigmenti üretimi, optimizasyonu, saflaştırılması, karakterizasyonu, pigment sentez yolunun belirlenmesi, antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi, kimyasal yapısının aydınlatılması ve son olarak saflaştırılan pigment ile anti-UV koruyucu film üretimi ve filmin yapısının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Araştırmanın özgün değerini aşağıda belirtilen çalışmalar oluşturmuştur.

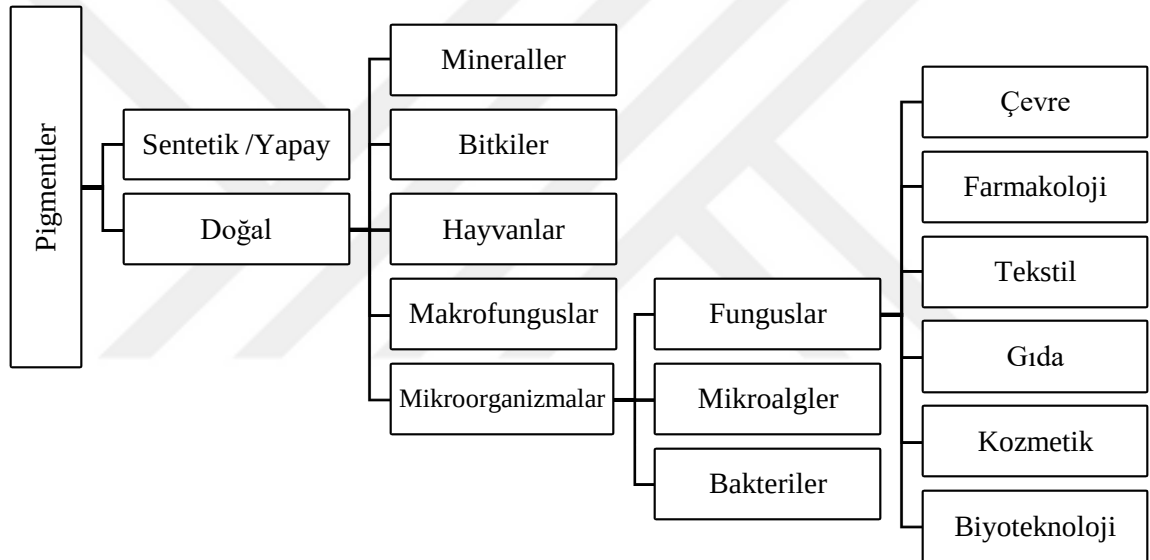
Mikrobiyal pigment üretimi popüler bir konu olmaya devam etse de üretim verimi hala düşüktür. Verimi artırıcı yeni substrat ve besiyeri formülasyonlarına ihtiyaç vardır. Bu nedenle melanin verimini etkileyen farklı fiziksel (sıcaklık, pH, inkübasyon süresi ve çalkalama hızı) ve kimyasal (karbon ve azot kaynakları ile mineral madde ilavesi gibi) parametrelerin etkisi araştırılmıştır. Maksimum pigment üretimi için optimal değerler belirlenmiştir. Stres şartlarının bazı mikroorganizmalarda pigmentlerin üretim verimini artırdığı literatürde belirtilmektedir. Bu çalışmada da çinko, kalsiyum, demir, bakır, nikel, mangan gibi tuzların besiyerine eklenmesiyle ekstrem stres şartlarının verimi artırması sağlanmaya çalışılmıştır.

Fungusun melanin pigmentinin üretim mekanizması belirlenerek, literatüre yeni bilgiler sağlanmıştır. Saflaştırılan melanin pigmentinin antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri belirlenmiştir. Melanin pigmentinin eşsiz UV koruyucu özelliğinden yola çıkarak UV koruyucu film üretimi gerçekleştirilmiştir.

KURAMSAL TEMELLER

Pigment Nedir?

Pigmentler, ışığın belirli bir dalga boyunu (380-750 nm) absorbe ettikten sonra görünür spektrumun geri kalanını yansıtan moleküllerdir (Ramesh et al., 2019). Pigmentler, sentetik veya bitkisel, hayvansal, inorganik ve mikrobiyal bir kaynaktan ekstraksiyon, izolasyon, sentez veya benzeri işlemlerle elde edilen boyar maddelerdir (Yıldırım, 2014). Pigmentler genel olarak stres koşulları altında üretilen ikincil metabolitlerdir (Yenilmez, 2017). Pigmentler Şekil 1’de görüldüğü gibi sınıflandırılmaktadır (Özdal, 2019).



Şekil 1. Pigmentlerin sınıflandırılması

Pigmentler kimyasal bileşimlerine, fonksiyonel aktivitelerine ve flavonoidlerin, pirollerin, karotenoidlerin vb. türevleri gibi doğal oluşumlarına dayalı olarak farklı kategorilere ayrılabilir. Riboflavin, beta-karoten, kantaksantin, prodigiosin, fikosiyanın, melanin, viyolasin, astaksantin ve likopen gibi maddeler renklendirici olarak kullanılan ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilen başlıca pigmentlerdir (Özdal, 2019; Sen et al., 2019). *Xanthophyllomyces dendrorhous*’tan astaksantin, *Penicillium oxalicum*’dan arpink kırmızısı, *Ashbya gossypii*’den riboflavin ve *Blakeslea trisporatrispora*’dan karoten gibi mikrobiyal gıda sınıfı pigmentlere örnektir (Venil et al., 2013).

Pigmentler ve boyalar, yiyecek ve içecek, tekstil, deri, kozmetik, ilaç, kâğıt, boyaya duyarlı güneş pilleri gibi çok çeşitli endüstrilerde sık kullanılan maddelerdir. Pigmentler sadece

ürünün estetiğini arttırmak için değil, aynı zamanda lezzetini, kalitesini ve dayanıklılığını da arttırmak amacıyla kullanılmaktadır (Bisht et al., 2020).

Düşük üretim maliyeti ve yüksek miktarlarda üretilebilirliği nedeniyle çeşitli uygulamalar için sentetik pigmentlerin üretiminde artışa neden olmuştur (Padhan et al., 2021). Bu pigmentlere mutajenik, alerjik ve kanserojenik aktiviteleri nedeniyle yasaklar veya kısıtlamalar getirilmiştir (Bakthavachalu et al., 2020). Tekstil, deri, ilaç gibi çeşitli sektörlerden kaynaklanan pigment ve boyalar atık sularda birikerek sucul ortamları kirletmektedir. Örneğin, farklı endüstriyel atık sularda biriken yaklaşık 10.000 farklı sentetik tekstil boyası mikrokirleticiler olarak belirlenmiştir (Orooji et al., 2020; Tkaczyk et al., 2020).

Çok miktarda kimyasal boya kullanan endüstriler, daha fazla biyopigmente ihtiyaç duymaktadır (Dufossé, 2018; Lagashetti et al., 2019) ve bu sorun, çevre dostu ve güvenli mikrobiyal renklendiricilerin üretiminin endüstrileşmesine yol açmıştır.

Mikrobiyal pigmentler bitki ve hayvanlardan elde edilen doğal pigmentlere göre daha ekonomik ve güvenilirdir. Mikrobiyal pigmentler hastalıklara neden olmadığı gibi antimikrobiyal ve anti-kanser özelliklere sahiptir. Mikroorganizmaların üretilmesi kolay ve ekonomiktir, ticari olarak istendiği kadar üretilebilir (Bechtold et al., 2003). Mikrobiyal pigmentler iklim koşullarından bağımsız ucuz kültür ortamlarında mikroorganizmaların kolay ve hızlı gelişmesi, çok çeşitli karbon ve azot kaynaklarını kullanabilmeleri, pH, sıcaklık, mineral değişimine karşı daha toleranslı olmaları, yüksek pigment verimi, biyomasdan kolayca ayrılabilmesi ve genlerine daha kolay müdahale edilerek farklı renk elde edilmeleri ile pigment üretiminde öne çıkmıştır (Lagashetti et al., 2019; Venil et al., 2020). Ayrıca pigment üretimi için mikrobiyal kültürün aşırı kullanılmasının biyolojik çeşitliliğe ve çevreye zarar vermesi olası değildir. Şu anda, piyasada fermantasyon işlemleriyle üretilen çeşitli farklı gıda boyası katkı maddeleri mevcuttur (Venil et al., 2013).

Mikroorganizmalar arasında bakteri, mikroalg, mantarların farklı kimyasal bileşimler, işlev, kararlılık ve çözünürlükte belirgin farklılıklara sahip bir dizi doğal pigmentli madde ürettikleri bilinmektedir (Narsing Rao et al., 2017). Bunlar arasından fungal pigmentler önemli bir yer teşkil etmektedir.

Fungal Pigmentler

Mantarlar, yeryüzünde çok çeşitli ve bol miktarda bulunan ökaryotik organizmalardır ve ekstrem ekosistemlerde bile bulunmaları, onların yeni ikincil metabolitler üretmelerini mümkün kılar. Mantarlar kutuplardan tropik bölgelere ve havadan derin deniz ortamlarına kadar çeşitli bölgelere yayılmışlardır (Ramesh et al., 2019). Son çalışmalar, deniz ortamından

yeni pigmentlerde dahil farklı moleküllerin üretimi üzerine yönelmektedir (Zain ul Arifeen et al., 2019). Monascaceae, Trichocomaceae, Nectriaceae, Hypocreaceae, Pleosporaceae, Cordycipitaceae, Xylariaceae, Chaetomiaceae, Sordariaceae, Chlorociboriaceae, Hyaloscyphaceae, Hymenochaetaceae, Polyporaceae, Ophiostomataceae, Tremellaceae, Herpotrichiellaceae ve Tuberaceae familyalarına ait mantarlar, güçlü pigment üreticileri olarak tanımlanmıştır (Mapari et al., 2009; Hernandez et al., 2016; Avalos et al., 2017; Chadni et al., 2017; Gmoser et al., 2017; Soumya et al., 2018; Heo et al., 2018; Lagashetti et al., 2019). Bu mantarların ikincil metabolitler olarak çeşitli pigmentleri sentezlediği bilinmektedir. Mantarlar karotenoidler, melaninler, azafilonlar, flavinler, fenazinler, kinonlar, monassin, viyolasin, çivit vb. gibi çeşitli kimyasal sınıflara ait pigmentlerin verimli üreticileridir.

Araştırmacılar ekstrem (aşırı) koşullarda pigmentli mantarların pigmentsiz mantarlara göre hidrasyon/dehidrasyon döngülerini ve yüksek radyasyonu daha iyi tolere edebildiğini bulmuşlardır (Olaizola, 2012). Evrimsel adaptasyon yoluyla, UV radyasyonuna maruz kalan birçok organizma, bunun etkilerini azaltmak için çeşitli yollar geliştirmiştir. Bu mekanizmaların en iyilerinden ve en yaygın olanlarından biri UV'yi filtreleyen bileşiklerinin sentezidir. Bir bileşiğin absorbansı, yapısal özelliklerine bağlıdır ve çoğu durumda, daha büyük moleküller daha uzun dalga boylarını emer. Bu bileşikler arasında melaninlerde bulunmaktadır. Melanin pigmentine birçok rol atfedilmiş olsa da, doğadaki ana rolü canlıyı UV radyasyon hasarından korumaktır (Olaizola, 2012). Bu nedenlerden dolayı mantar melaninleri iyi bir alternatif kaynaktır.

Melanin pigmentinin genel özellikleri

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

Melaninler, fenolik ve indolik bileşiklerin oksidatif polimerizasyonu ile oluşan, azot içeren veya içermeyen tipik olarak siyah veya koyu kahverengi olmak üzere çeşitli moleküler yapıya sahip karmaşık biyopolimerlerdir (Almeida-Paes et al., 2012).

Katekol ve 1,8-dihidroksinaftalin (DHN), DOPA (ömelaninler), sisteinil-DOPA (feomelaninler) ve piyomelaninler gibi fenolik bileşiklerin oksidatif polimerizasyonu, melanin oluşumuna yol açar. Bazı mantarlarda melanin, ya hücre duvarı ile iç içe geçmiştir ya da en dış katman olarak bulunmaktadır. Mantar hücrelerinin dışında bulunan melanin, hücre içi melaninden farklıdır ve ortama salgılanır. Bu, iki şekilde oluşturulabilir: Mikroorganizmaların kültür ortamına lakkaz salgılanması, bazı ortam bileşenlerini melaninlere oksitleyebilir veya

kültür ortamına salgılanan fenolik bileşikler, melanin oluşturmak üzere yavaş yavaş kendini okside edebilir (Pal et al., 2013).

Melanin organizmaların tüm filogenetik seviyelerinde (Bakteriler, Arkeler ve Ökaryotlar) bulunur (Olaizola, 2012). Melaninler yüksek kimyasal karmaşıklığı ve en yaygın çözücülerdeki zayıf çözünürlüğü, yapı-fonksiyon ilişkilerini anlamayı zorlaştırmıştır. Bu fikir, malzemelerin değişken bağlantıya sahip çapraz bağlı polimerlerden oluşan moleküler ağırlığının yüksek olması gerçeğiyle daha da kuvvetlenir (Cao et al., 2021). Melaninler, asit, alkali ve güçlü oksitleyici çözeltilerde bozunmaya oldukça dirençlidirler. Melaninler ayrıca hidrofobik ve negatif yüklüdür. Melaninler aseton, benzen, metanol, heksan ve petrol eteri gibi organik çözücülerle ekstrakte edilemezler (Selvakumar et al., 2008).

Melanin, genellikle kısıtlayıcı besin koşulları altında salgılanan ikincil bir metabolittir ve ayrıca melanin birikimi, havalandırma ve beslenme gibi bu çevresel faktörlerden de etkilenebilir (Sun et al., 2016). Melanin, görünür ışık ve UV radyasyonundan X-ışını bölgesine kadar geniş bir yelpazedeki elektromanyetik radyasyonu emme yeteneğine sahiptir. Birçok kozmetik krem, UV radyasyonuna karşı koruma için filtre görevi gören aktif bir bileşen olarak melanin içerir. Melaninin tüm bu özellikleri, onu farklı uygulamalarda kullanım için çekici bir biyomateryal haline getirir (Ganesh Kumar et al., 2013).

Hayvanların derisi ve retinası, güneş ışığının UV ışınlarının zararlı etkilerine karşı koruyan melanin içerir. Koyu tendeki melanozomlar, lizozomal enzimlerden etkilenmezler ve cildi UV hasarından korumak için temel işlevleri sağlarlar. Günümüzde melanin, UV radyasyonunun zararlı etkilerini koruma konusundaki mükemmel yeteneği nedeniyle dikkatleri üzerine çekmiştir (Singh et al., 2021).

Melaninin mantara sağladığı avantajlar

Mantarların tüm şubelerinde melanizasyon gözlenmektedir. Bazı mantar türleri yapısal olarak melanize olurken, diğerleri çevresel koşullara göre melanin sentezlerler. Melanotik mantarlar filogenetik olarak çeşitlidir, dünya çapında bir dağılıma sahiptir ve genel olarak çoğu uygun olmayan zor çevresel ortamlarda kolonize olurlar (Tablo 1). Bu tür ortamlar, yüksek sıcaklık dalgalanmaları, yüksek radyasyona maruz kalma, yüksek ozmotik basınç, oksidatif stresler, düşük su aktivitesi ve besin mevcudiyeti gibi çeşitli koşullarla karakterize edilir (Cordero, 2017). Melanizasyon, bu mikroorganizmaların çevrelerinden gelen çeşitli fiziksel ve kimyasal stresleri tolere etmelerini sağlar.

Melaninler, mantarların büyümesi ve gelişmesi için gerekli değildir; ancak yüksek tuzluluk, aşırı sıcaklıklar, oksitleyici ajanlar ve iyonlaştırıcı veya iyonlaştırıcı olmayan ışınlar

gibi farklı stres koşulları altında hayatta kalma şanslarını arttırır (Jiang et al., 2016). Çeşitli araştırmalar, melaninin uzayda ve nükleer patlamaların yakınındaki habitatlar için radyo koruyucu bir pigment olarak işlevini tartışmaktadır (El-Bialy et al., 2019).

Melanin, mikroorganizmaları çok çeşitli toksik saldırılara karşı koruma yeteneğinden dolayı mantar zırhı olarak bilinir. Melanin, UV, X-ışını, gama-ışını ve partikül radyasyon dahil olmak üzere iyonlaştırıcı radyasyona karşı koruma sağlayabilir. Mantar melaninleri UV ışımasına, enzimatik parçalanmaya, oksidanlara ve bazı durumlarda aşırı sıcaklıklara karşı koruma sağlar (Jacobson, 2000). Melaninlerin metalleri bağladığı, fizyolojik bir redoks tamponu olarak işlev gördüğü, elektronlar için bir havuz görevi gördüğü, hücre duvarlarına yapısal sertlik sağladığı su ve iyonları depolayarak kurumayı önlemeye yardımcı olduğu gösterilmiştir (Langfelder et al., 2003; Selvakumar et al., 2008; Heinekamp et al., 2013; Pal et al., 2013; Geib et al., 2016). Melanin termoregülasyonda hem sıcak hem de soğuk şokuna karşı korumada da rol oynayabilir (Singh et al., 2018).

Tablo 1. Melanin İçeren Mikroorganizmaların İzole Edildiği Farklı Koşullar

Ortam	Kaynakça
Dünya kutupları	Kochkina et al., 2019; Silva et al., 2019; Pacelli et al., 2020
Dünya dışı koşullar (Uzay İstasyonu)	Onofri et al., 2012
Radyoaktif kirli alanlar	Liu et al., 2020
Organik ve metal kirliliği olan alanlar	Hayat et al., 2022
Aşırı tuzlu sular	Elsayis et al., 2022
Kuru çöller ve yarı çöl	Santiago et al., 2018
Ev tipi çamaşır makineleri ve duşlar	Kulesza et al., 2021

DHN-melaninin önemli bir virülans belirleyicisi olduğu gösterilmiştir (Langfelder et al., 2003). Melanin mantar virülansı ile ilişkilidir ve fungusun patojenitesini artırmaktadır (Selvakumar et al., 2008; Mattoon et al., 2021). Melaninin yokluğu, patojenitenin azalmasına veya tamamen ortadan kalkmasına neden olur. Ayrıca melanin antimikrobiyal ilaçlardan da mikroorganizmayı korumaktadır (Pal et al., 2013).

Melaninin mantarı reaktif azot türlerinden koruduğu ve melanize hücrelerin reaktif oksijen türleri tarafından öldürülmeye daha az duyarlı olduğu gösterilmiştir (Langfelder et al., 2003). Melanin, serbest radikallerin süpürücüleri olarak, mantar hücrelerini konakçı bağışıklık sisteminden korumaktadır. DOPA-melanin, hücreleri, konakçı bağışıklık tepkisinin bir parçası olan hipoklorit veya hidrojen peroksit tarafından verilen hasardan korur (Langfelder et al., 2003).

Melanin hücre duvarlarının yapısal sertliğine katkıda bulunmaktadır (Langfelder et al., 2003). Melanin, hücre duvarının gözenekliliğini azaltarak mantar hücresinin gliserol tutmasında sağlar (Howard and Ferrari, 1989). Melanize hücrelerin enzimatik veya mikrobiyal parçalanmaya karşı daha dirençli olduğu bulunmuştur (Casadevall et al., 2000).

Mikrobiyal Melanin Uygulama Alanları ve Kullanımı

Mikrobiyal melanin gıda, tekstil, biyotıp, kozmetik, nanoteknoloji ve malzeme bilimi (Şekil 2) için sentetik boyalardan daha güvenli ve daha çevre dostu olarak görülmektedir ve endüstriyel boya olarak önemli bir potansiyele sahiptir (Shahid et al., 2013; Araújo et al., 2014).

Optik ve elektronik özellikleri nedeniyle, ince sentetik melanin filmleri, pil, kimyasal sensör ve dedektör gibi biyoelektronik cihazların yapımında kullanılmıştır (Mostert et al., 2012).

Geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip melanin içerikli yapılar, mikrobiyal koruyucu gıda paketlenme ürünleri üretmek için uygundur (El-Bialy et al., 2019). Melaninin, su ve besinler gibi temel hücresel malzemelerin geçmesine izin verirken zararlı malzemeleri bağlama yeteneğine sahip olması kullanımını artırmaktadır (McCallum et al., 2021).

Fungal melaninin farklı iyonlaştırıcı radyasyon türlerine karşı zayıflatma ve koruma yeteneği melaninin radyasyona karşı koruma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir. Bu özelliği ile astronotlar için koruyucu uzay elbisesi olarak uygun bir malzemedir (Cordero, 2017).

Melaninin sağlık alanında kullanımıyla ilgili çalışmalarda oldukça ilgi çekicidir. Yapay pigmentler insan sağlığını tehlikeye atmakta ve karaciğer, mesane ve cilt kanseri riskini artırmaktadır (Ghattavi et al., 2022). Ayrıca kullanılan bileşenler ve üretim sürecinde ortaya çıkan atıklar da çevreye zararlıdır (Ghattavi et al., 2022). Melanin gibi biyo-pigmentler hem çevre dostudur hem de kanser için etkili bir tedavi seçeneği sunmaktadır. Melaninin serbest radikal süpürücü aktivitesi, antikanser ajanı olarak kullanılmasını sağlamıştır. Kanser tedavisi sırasında, melanin hem bir kanser ilacı olarak hem de radyasyon alan hastaları gama ışınlarının zararlı etkilerine karşı korumak içinde kullanılır (El-Naggar and El-Ewasy, 2017). *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen ömelaninin meme kanseri hücre hattına (MCF-7), insan hepatoselüler karsinom hücre hattına (HepG2) ve kolon karsinoma hücre hattına (HCT116) karşı antikanser özellik göstermiştir (Gamal Shalaby et al., 2019). *In vitro* olarak, melaninin HFB4 cilt kanseri hücre hattına karşı güçlü sitotoksik aktivite sergilediği ve normal kanserli olmayan hücrelere karşı çok az sitotoksitenin olması melanin pigmentlerinin umut verici anti-malign tümör tedavisinde kullanılabileceğini desteklemektedir (El-Naggar and El-Ewasy,

2017). Ayrıca farelerin gastrointestinal sistemini koruyacağı ve hücrel apoptozu önleyeceği öne sürülmüştür (Revskaia et al., 2012).

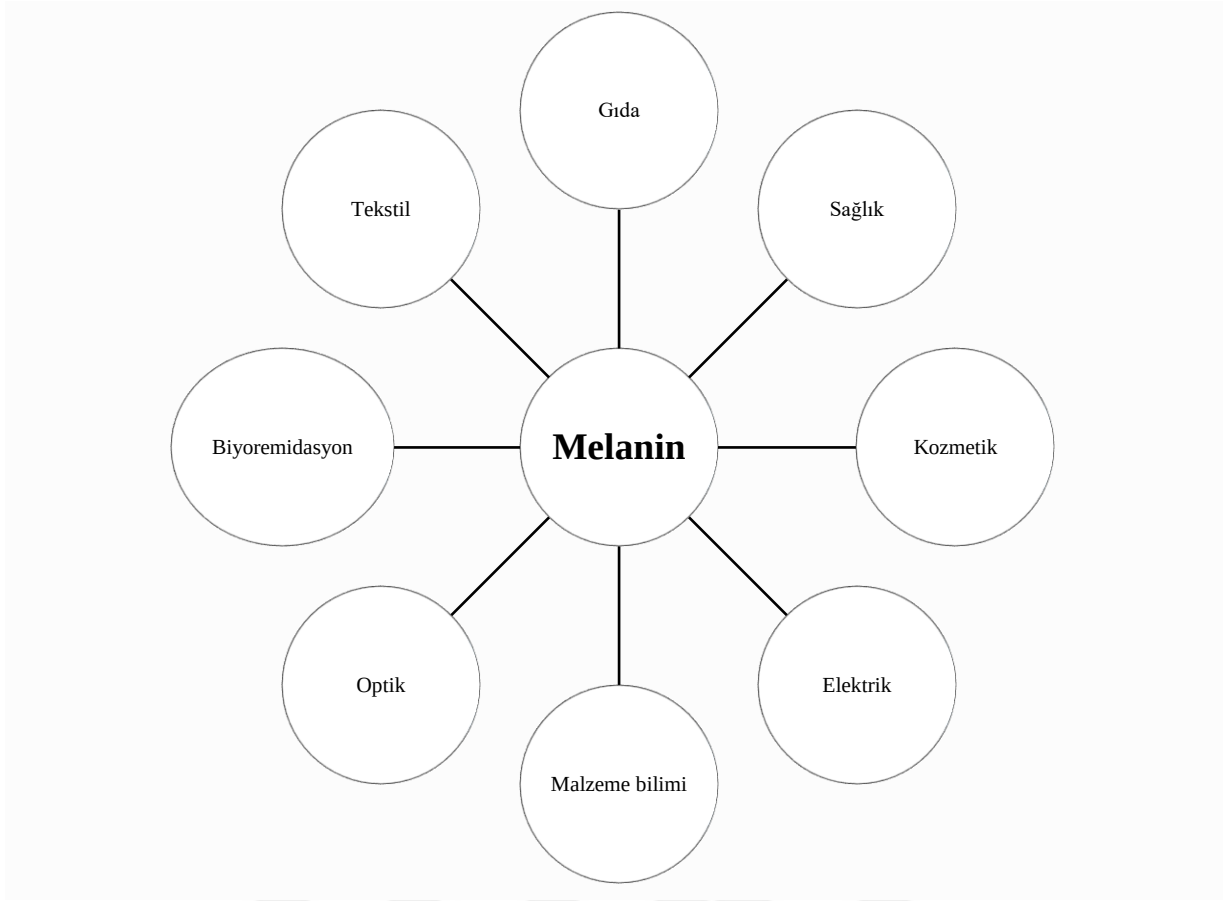
Melanin, serbest radikallerle kolayca etkileşime giren molekül içi kovalent olmayan elektronları nedeniyle güçlü bir antioksidandır. Ömelaninler, antioksidan ve elektriksel özelliklerinden dolayı kök hücre uygulaması için de önerilmiştir (Cavallini et al., 2020).

Melanize tıbbi mantar *Inonotus obliquus* 'un, tümör büyümesi ve diyabetes mellitusa karşı *in vitro* etkileri belirlenmiştir (Lin and Xu, 2020). *Inonotus obliquus* 'dan elde edilen suda çözünür melanin, insülin duyarlılaştırıcı aktivite göstermiştir. Ayrıca melanin uygulaması, yüksek yağlı obez farelerde yağlanmayı azaltmıştır (Lee and Hyun, 2014).

Melaninin yılan zehirlerine karşı antivenom özelliğide bulunmaktadır. Melaninin antivenom aktivitesi, kalsiyum ve fosfolipaz A2'ye (yılan zehirinin önemli bir bileşeni) spesifik olmayan bir bağla bağlanmasından kaynaklanmaktadır (Hung et al., 2004). Melaninin düşük toksik özelliği ve yılan zehirlerine karşı antagonistik etkisi, yılan ısırıkları için başarılı hayat kurtarıcı tedaviyi mümkün kılabilir.

Melanin biyoremediasyon çalışmalarında da kullanılmaktadır. Melanize mantarlar ve fungal melanin, kirli bir ortamdan çeşitli toksinlerin uzaklaştırılması için önerilmektedir (Mattoon et al., 2021). Melaninin ayrıca ağır metallerin (Hg, Cr, Cu, Pb, Cd, Zn) emilimini kolaylaştıran özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Manirethan et al., 2018; Oh et al., 2021). Bu bakımdan melanin su ve doğadaki ağır metal kirliliği ile mücadelede önemlidir (Coelho et al., 2020).

Melaninli mantarlar, radyasyona karşı dirençleri göz önüne alındığında, nükleer kirliliğin emiliminde de önemli bir rol oynayabilir. Çernobil Nükleer Santrali içinde ve çevresinde mantar büyümesi tespit edilmiş ve melaninli mantarların bir tür radyotropizm içinde radyasyon kaynaklarına doğru büyüdüğü belirlenmiştir (Dighton et al., 2008).



Şekil 2. Melaninin kullanım alanları

Melanin Çeşitleri

Melaninler, doğada yaygın olarak bulunan bir grup polimerik pigmentlerdir (d’Ischia et al., 2015). Melaninler, doğada bulunan en eski pigmentlerden biri olarak kabul edilir. Bu pigmentler kuş ve dinozor fosillerinde de tespit edilmiştir (Zhang et al., 2010). Bu nedenle, melanin, evrimi incelemek için bir biyobelirteç olarak önerilmektedir (Wogelius et al., 2011). Melanin ana türleri ömelanin, feomelanin, allomelaninler ve piyomelanindir (Tablo 2).

Ömelanin, tirozinaz enzimi tarafından L-tirozin amino asiti ve/veya L-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) oksidasyonunun ürünüdür. Ortaya çıkan polimer, kahverengi veya siyah bir renk gösterir ve azot içerirler (Cao et al., 2021). DOPA yolağıyla melanin sentezi, DOPA-melanin veya ömelanin olarak adlandırılır.

Kırmızı-sarı pigment olan feomelanin, L-tirozin ve/veya L-DOPA ile L-sistein kombinasyonundan oluşur (Martínez et al., 2019; Tran-Ly et al., 2020) ve yapısal olarak benzotiazin alt birimlerini içerir (Napolitano et al., 2013). Feomelanin, öncüsü L-sistein amino asidi olduğu için bileşimde kükürt bulunmasıyla ömelaninden farklıdır (Tran-Ly et al., 2020).

Allomelanin, azot içermeyen heterojen bir polimerdir. Birçok bakteri, mantar ve bitkide bulunan siyah/kahverengi renkli bir pigmenttir. Allomelaninler, katekol, 1,8-

dihidroksinaftalen, γ -glutaminil-3,4-dihidroksibenzen, protokatekuik aldehit ve kafeik asit gibi difenollerin oksidasyonu ile elde edilir (Martínez et al., 2019). Kullanılan öncül maddelere bağlı olarak bakteri ve funguslarda DHN melanin (Funa et al., 2005; Tran-Ly et al., 2020) veya bitkilerde katekol melanin (Chen et al., 2015) olarak alt tiplere ayrılırlar.

Piyomelanin, tirozinin deaminasyon ve oksidasyonu ile oluşan homogentisik asidin polimerizasyonundan elde edilir (Ahmad et al., 2017; Singh et al., 2021). Bu melanin türü bakteriler, mantarlar, memeliler ve bitkiler tarafından sentezlenen siyah/kahve renkli heterojen bir pigmenttir (Lorquin et al., 2021).

Tablo 2. Melanin Çeşitleri

Melanin Tipi	Üretim Kaynakları	Öncü Maddesi	Renk
Ömelanin (Dopa Melanin)	Hayvanlar, bakteriler ve mantarlar	Tirozin ya da L-Dopa	Koyu kahverengi
Allomelanin			
Feomelanin	Hayvanlar	5-S-cys-Dopa	
Katekol Melanin	Bitkiler	Katekol	
DHN Melanin	Mantarlar, bakteriler	1,8-dihidroksinaftalen (DHN)	Yeşil-Siyah
Pyomelanin	Bakteriler, mantarlar, memeliler ve bitkiler	Homogentisik asit	Kahverengi-Siyah

Çoğu bakteri ve Basidiomycetous mantar, melanini DOPA yolağıyla sentezlerken Ascomycetous melanin üretmek için DHN yolağını kullanır. Allomelaninler, mantar hücre duvarlarının iç tarafına birikmekte ve buda ekstraksiyon işlemlerini zorlaştırdığından dolayı çok tercih edilmezler. Hücre dışı ekstrakte edilmesi kolay olduğu için ömelaninler üretimde sıklıkla tercih edilir (Tran-Ly et al., 2020). Yüksek verimli melanin üretimi ile ilgili olarak, endojen olarak üretilen ve hücre duvarının iç tarafına sıkıca bağlı olan DHN yolağını kullanan mikroorganizmalar çok tercih edilmez (Toledo et al., 2017).

Melanin Biyosentez Yolları

Melanin sentezi için birçok farklı yol vardır; ancak hepsi hidroksillenmiş aromatik bileşiklerin oksidasyonunu içerir. Bu bileşiklerin bazıları, özel düzenlemeye tabi olarak biyosentetik yollarda tirozinaz (EC 1.14.18.1), lakkaz (EC 1.10.3.2) veya poliketid sentazlar tarafından sentezlenir. Diğer hidroksillenmiş aromatik bileşikler, tirozinin bozunması gibi katabolik yollardaki ara maddelerdir ve bozunma yollarındaki dengesizlikler veya kesintilerin bir sonucu olarak birikebilir (Pavan et al., 2020).

Genel olarak, çoğu mikrobiyal melanin, farklı enzim setleri tarafından tirozin (DOPA yolağı) veya malonil-koenzim A'nın (DHN yolu) dönüşümü yoluyla üretilir.

İlk yol, memeli melanin sentezine çok benzer. Bu yolda, melanin öncüsü olan tirozin, L-DOPA'ya, ardından tirozinaz ve lakkaz tarafından dopakinona dönüştürülür. Dopakinonlar oldukça aktiftir ve kendiliğinden oksitlenir ve melanin oluşturmak üzere otopolimerize olur. DOPA yolağıyla melanin sentezi, DOPA-melanin veya ömelanin olarak adlandırılır. Bununla birlikte, katabolik süreç sırasında, homogentisik asit gibi diğer hidroksillenmiş aromatik bileşikler, enzimatik dengesizlikler veya kesintiler nedeniyle birikebilir ve bu da farklı melanin türleri ile sonuçlanabilir (Claus and Decker, 2006; Płonka et al., 2006; Singh et al., 2021).

Tirozinazlar, tirozinin L-DOPA'ya hidroksilasyonunu ve ardından o-dopakinona oksidasyonunu katalize eden polifenol oksidazları içerir (Claus and Decker, 2006). Bu basamakta kinon, indol kinona spontan siklizasyona uğrar ve son olarak, bu bileşik veya karboksilatlanmış formu, ömelaninler olarak da bilinen kahverengi ile siyah DOPA melaninlerini oluşturmak üzere kendiliğinden polimerize olur (Płonka et al., 2006). Sistein varlığında, L-DOPA, polimerizasyondan önce, melaninler sülfürden kaynaklanan sisteinilasyona uğrayarak farklı tipte melanin oluşabilir (Zaidi et al., 2014).

İkinci yolda, karşılık gelen öncül malonil-koenzim A endojen olarak üretilir. Poliketid sentazlar tarafından veya bazı durumlarda lakkaz ile reaksiyona girdiğinde, beş molekül malonil-koenzim A'nın sıralı dekarboksilatif yoğunlaşmasıyla 1,3,6,8-tetrahidroksinaftalin (THN) oluşturur. THN daha sonra 1,8-dihidroksinaftalin (DHN) oluşturmak için bir dizi indirgeme ve dehidrasyon reaksiyonuna girer. DHN'nin polimerizasyonu, nihai ürün olarak DHN-melanin ile sonuçlanır (Płonka et al., 2006; Eisenman and Casadevall, 2012; Pavan et al., 2020; Singh et al., 2021). Bahsedilen her iki yolak da bakteri ve mantarlarda bulunabilir. Bununla birlikte, çoğu bakteri ve Basidiomycetes mantarları melanini DOPA yolağıyla sentezler; oysa Ascomycetes ve mikroskopik olmayan mantarlar melanin üretmek için DHN yolağını kullanırlar (Pavan et al., 2020; Singh et al., 2021).

Melanin İnhibitörleri

Spesifik inhibitörlerin melanin sentez yolu üzerindeki etkisi, mikroorganizmalardaki melanin sentez yolağını (DOPA veya DHN) belirlemek için kullanılmaktadır (Rizner and Wheeler, 2003; Surendrakumar et al., 2022).

Kojik asit, tropolon, 2-dietilditiyokarbamat ve merkaptobenzimidazol gibi inhibitör bileşikler, DOPA melanin yolağını inhibe ederken, klobentiyazon, pirokilon, talid ve trisiklazol DHN yolağı yoluyla melanin sentezini inhibe eder. Kojik asit ve tropolon, DOPA yolağının ilk

iki adımını (tirozin oksidasyonu-DOPA-dopakinon) katalize eden enzim olan tirozinazın aktivitesini inhibe eder. Diğer taraftan, trisiklazol melanin sentezinde yer alan DHN melanin biyosentetik enzimlerini (tetra- ve tri-hidroksinaftalin redüktaz) inhibe etmektedir (Suwannarach et al., 2019; Salazar-García et al., 2022).

Tirozinaz, melanogenez yolağındaki anahtar enzim olduğundan, daha önceki çalışmaların çoğu, melanogenezi kontrol etmek için bu enzimin aktivitesini inhibe etmeye odaklanmıştır. Tirozinaz, melanozom zarında bulunan bakır içeren ve zara bağlı bir glikoproteindir (Kumari et al., 2018). Umut verici bir hedef olarak, tirozinaz inhibitörleri cilt beyazlatma ajanları ve gıda koruyucuları olarak da kullanılabilir. Böylece tirozinaz inhibitörleri gıda, kozmetik, tarım ve tıp alanlarında geniş bir potansiyele sahiptir (Liu et al., 2021). Ayrıca yaşlanmayla birlikte artan tirozinaz, Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı ile de ilişkilidir. Beynin substantia nigra bölgesindeki nöromelanin sentezinde tirozinazın rol oynadığı bilinmektedir (Li et al., 2021). Bitkilerden elde edilen fenolik bileşikler, terpenler, steroidler, flavonoidler, alkaloidler, uzun zincirli yağ asitleri ve kumarinler gibi birçok molekülün tirozinaz inhibitörü özelliği bulunmaktadır (Loizzo et al., 2012; Panzella and Napolitano, 2019).

Melanin, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* gibi çok çeşitli insan patojenlerinin ve *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides* spp., *Coccidioides immitis* ve *Blastomyces dermatitidis* gibi dimorfik mantarların patogeneğinde önemli bir rol oynar (Liu et al., 2021). Melanin, çeşitli yollarla fagositik hücrelerin, hücre dışı enzimlerin ve antifungallerin etkinliğini azaltır (Soliman et al., 2020). Bu nedenle melanin biyosentezini önleyen maddelerin belirlenmesi önemlidir (Rižner and Wheeler, 2003; Surendrakumar et al., 2022).

Melaninlerin Lokalizasyonu

Fungal melanin tipik olarak hücre duvarı içinde bulunur; ancak dağılım ve miktar türler arasında büyük farklılıklar gösterir (Kalra et al., 2020). Hücre duvarının bir parçası olarak bulunan melaninlere hücre duvarına bağlı melanin denir. Hücre dışı melanin mantar hücresinin dışında bulunur ve hücre duvarına bağlı melaninden farklıdır. Mantar tarafından kültür sıvısına salınan fenoloksidaz, bazı kültür bileşenlerini melaninlere oksitleyebilir. Kültür ortamına salgılanan fenolik bileşikler, hücre duvarında oluşan melaninleri sentezlemek üzere okside olabilir. Bazı mantar melaninleri kültür sıvılarında hücre duvarından bağımsız ve genellikle granüller şeklinde bulunarak hücre zarı ve hücre duvarının içinde bir melanin tabakasının oluşmasına neden olur. İnsanlarda melanin, özelleşmiş hücrelerde (melanositlerde) bulunur (Langfelder et al., 2003).

Mikrobiyal melanin üretimini etkileyen faktörler

Sentetik melaninlerin doğal melaninlere kıyasla yapısal ve işlevsel özellikleri değişebilir (Bridelli and Crippa, 2010). Bazı araştırmalar, biyoteknolojik uygulamalarda doğal melaninlerin sentetik melaninlerden daha iyi performansa sahip olduğunu göstermiştir. Örneğin, sepya melanin sulu sodyum-iyon pillerde polidopamin ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir özgül kapasite göstermiştir (Kim et al., 2013).

Mikrobiyal melanin üretimi, çok sayıda beslenme faktörü ve fizikokimyasal koşullara büyük ölçüde bağlıdır. pH, sıcaklık, inkübasyon süresi, spesifik ortam bileşenleri ve tirozin gibi melanin öncü maddesi bileşenleri kullanılan melanojenik suşlara bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Choi, 2021; Singh et al., 2021). Melanin üretimi için glikoz, pepton ve maya ekstraktı yaygın olarak karbon ve azot kaynağı olarak kullanılmaktadır. Son araştırmalarda melaninin yüksek üretim verimi sağlamanın yanı sıra üretim maliyetini düşürmek için meyve atığı, buğday kepeği ekstresi ve gıda artıkları da kullanılmaktadır (Zou and Tian, 2017; Eskandari and Etemadifar, 2021; Mujdeci, 2021; Aghajanyan et al., 2022).

Bakır, lakkaz ve tirozinazlar için kofaktör rolü nedeniyle melanin üretimi için önemli bir elementtir (Reiss et al., 2013; Yang et al., 2017). Eklenecek bakır miktarındaki değişiklik, farklı mantar ve bakteri türlerinde düzensiz pigmentasyona yol açmaktadır (Griffith et al., 2007). Bakırın dışında diğer metaller de melanin oluşumunu artırabilir. Demir ve nikel ilavesiyle tirozinaz aktivitesinde ve melanin üretiminde önemli bir artış gösterdiği belirlenmiştir (Wang et al., 2019). Metallerin varlığı mikroorganizmalarda stres tepkilerini tetikleyerek melanin oluşumuna neden olmaktadır (Gowri and Srivastava, 1996). Yüksek sıcaklık, besin açısından zayıf büyüme ortamı, hiperozmotik basınç, vb. farklı stres faktörleri tarafından melanin sentezi desteklenir (Coyne and Al-Harthi, 1992; Fogarty and Tobin, 1996; Cordero and Casadevall, 2017).

Melanin biyosentezini etkileyen çoklu ve çeşitli faktörler nedeniyle, melanojenik mikroorganizmalar için evrensel bir kültür ortamı veya büyüme koşulu yoktur. Bunun yerine her bileşenin konsantrasyonu ve oranı mikroorganizmaya bağlı olarak tanımlanmalıdır. Bu nedenle, geliştirme sırasında sıcaklık, pH, oksijen, ışık, stres ve ışınlama gibi çevresel faktörler hücre büyümesini ve pigment biyosentezini büyük ölçüde etkileyebilir ve dikkatle değerlendirilmesi gerekmektedir.

Mikrobiyal melanin üretimi, bazı organizmaların doğal melanojenik kapasitesini artırmak için genetik mühendislik teknikleri uygulanarak yeni mutantlar ile daha da geliştirilebilir. Bir üretim suşunu geliştirmek/üretmek için en yaygın genetik modifikasyon,

melanin oluşumunda yer alan enzimleri, çoğunlukla tirozinazları kodlayan genlerin ekspresyonunu hedeflemektedir (Martínez et al., 2019).

Radyasyon ve Çeşitleri

Doğal veya yapay radyoaktif çekirdeklerin daha kararlı yapıya ulaşması için hızlı parçacıklar ve elektromanyetik dalga olarak dışarı verdikleri fazla ve hareketli enerjilere radyasyon denir (Çıracı, 2019).

Güneş gezegenimiz için ana enerji kaynağıdır. Yeryüzüne ulaşan bu ışıma enerjisi tüm canlılar için gereklidir (Barman et al., 2021). Güneş spektrumunun üç ana bandı vardır; ultraviyole ışıma enerjisi (UV), görünür (VIS) ve kızılötesi (IR). Dünya yüzeyine gelen radyasyonun yaklaşık %5'ini UV, %43'ünü görünür ışık ve %52'sini kızılötesi ışık oluşturur (Podhaisky et al., 2002).

Sağlıksız olan sadece UV ışığı değildir. Görünür ışığın büyük bir kısmı, 400 ila 450 nm arasında değişen yüksek enerjili mavi ışıktır. Bu ışığın insan sağlığı üzerinde de zararlı etkileri olabilir. Gözlerimize zarar verir, uyku ve uyanma döngülerimizi etkileyebilir, sirkadiyen ritmi bozabilir ve diyabet, kalp hastalığı ve ruh sağlığımızı bile etkileyebilir (Downie et al., 2018; Park et al., 2019). En önemlisi, kalıcı göz hasarına ve yaşa bağlı makula dejenerasyonuna (sarı nokta hastalığı) neden olarak görme kaybına neden olabilir (Ide et al., 2015; Yuda et al., 2020). Son yıllarda, akıllı telefonlar, tabletler ve düz panel ekran, kompakt flüoresan lambalar ve ışık yayan diyotlar gibi elektronik cihazlarda çarpıcı gelişmeler kaydedildi. Bu cihazlar yüksek enerjili mavi ışık ve az miktarda UV yayar. Bu da bizim her zamankinden daha fazla miktarda zararlı ışıklara maruz kaldığımız anlamına gelmektedir.

Sağlığımızı bu tehlikeli ışık kaynaklarından korumak için görünür ışık şeffaflığı yüksek ayarlanabilir filtreler ile tüm UV ve yüksek enerjili mavi ışığı engellemek önemlidir. Bu nedenle, yüksek performanslı UV ve yüksek enerjili mavi ışık koruyucu filmlerin geliştirilmesine ve iyileştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. İnsan kullanımı için güvenli, cilt kanseri gelişimini azaltmaya yarayacak yeterli UV koruması sağlayan ve fotokoruyucu bileşiklerin araştırılması önemli bir adımdır (Olaizola, 2012).

Melanin, görünür ışık ve UV radyasyonundan X-ışını bölgesine kadar geniş bir yelpazedeki elektromanyetik radyasyonu emme yeteneğine sahiptir (Tablo 3). Fungal melanin UV, X-ışını, gama-ışını ve partikül radyasyon dahil olmak üzere iyonlaştırıcı radyasyona karşı koruma sağlayabilir. Strese karşı bir dizi koruyucu rol oynar. Melanin termoregülasyonda ve hem sıcak hem de soğuk şokuna karşı korumada rol oynayabilir. Melanizasyonun mantar

hücrelerini ağır metal stresinden ve hidrolitik enzimlerden koruduğu da gösterilmiştir (Mattoon et al., 2021).

Tablo 3. Radyasyon Çeşitleri

RADYASYON							
İyonlaştırıcı olmayan radyasyonlar					İyonlaştırıcı radyasyon		
Radyo frekans 1 m. - 1km.	Görünür Işık 400 -700 nm	Kızıl ötesi (İnfra-red) 700 nm - 1 mm.	Mikrodalga 1 mm. - 1 m.	Ultraviyole 200- 400 nm	Elektroman yetik (X, Gama)	Parçacıklı (Alfa, Beta)	
				UVA (320–400 nm)	UVB (280–320 nm)	UVC (220–280 nm)	

Ultraviyole Radyasyon Çeşitleri ve Özellikleri

UV ışınları, 100- 400 nm arasında dalga boyuna sahip güneş kaynaklı radyasyonun yaklaşık %5'ini oluşturan iyonlaştırıcı özelliği olmayan radyasyondur (Tekbaş and Evci, 2005). UV radyasyonu, iyonlaştırıcı radyasyondan, düşük enerjiye sahip olması ve dalga boyuna bağlı olarak, soğurma özelliği nedeni ile ayrılır (Çıracı, 2019). UV radyasyonu, güneş spektrumunun en zararlı ve mutajenik dalga bandıdır (Braga et al., 2015).

Ultraviyole A radyasyonu (UV-A) (320–400 nm): UV-A'nın yaklaşık %90-99'u yeryüzüne ulaşır, ozon tabakası tarafından filtrelenmez, camdan geçer, uzun dalga boyu ve düşük enerji derinin daha derinlerine geçerek dokulara ulaşabilir. UV-A aşırı ve uzun süreli maruz kalma durumunda zararlıdır (Narayanan et al., 2010). UV-A gün ışığında UV-B bandına göre 500 kat kadar daha fazla bulunur ve piyasadaki güneş koruyucular UV-A korumasında etkisiz kalmaktadırlar. Güneş koruyucular daha çok UV-B bandı için etki gösterirler. Sadece UV-A ve UV-B radyasyonu dünya yüzeyine ulaşır; çünkü atmosferik ozon, 320 nm'den daha kısa dalga boylarına sahip radyasyonu ulaşmasını büyük ölçüde azaltır.

UV-A ışınları doza bağlı olarak eritem, bronzlaşma, yaşlanma ve kanser oluşumuna neden olmaktadır (Tekbaş and Evci, 2005; Narayanan et al., 2010). UV-A güzellik salonlarında sıklıkla kullanılırlar.

Ultraviyole B radyasyonu (UV-B) (280–320 nm): UV-B'nin yaklaşık %1-10'u yeryüzüne ulaşır, ozon tabakası tarafından filtrelenir, camdan geçmez, kısa dalga boyu ve yüksek enerji epiderminin üst katmanlarına nüfuz edebilir (Narayanan et al., 2010). UV-B güneş yanığı, bronzlaşma, buruşma, yaşlanma, cilt kanseri ve katarakta neden olmaktan sorumludur.

UV-B bitkilerin gelişimini yavaşlatır, doğal yaşam ve diğer hayvanların yaşamını etkiler (Tekbaş and Evci, 2005). Radyasyonun zararlı etkileri DNA ile sınırlı değildir, proteinler ve lipidler de zarar görür (Braga et al., 2015).

UV-B, dünya yüzeyi üzerinde önemli ölçüde değişiklik gösterir, daha düşük enlemlerde, daha yüksek rakımlarda ve daha az bulutlu alanlarda daha yoğundur (Braga et al., 2015). UV-B ışınları vitamin D aktivitesi bakımından yararlıdır (Çıracı, 2019).

Ultraviyole C radyasyonu (UV-C) (220–280 nm): UV spektrumu içinde UV-C aralığı, DNA, RNA ve proteinler tarafından kolayca emilen en güçlü UV radyasyonu olarak kabul edilir ve sağlık açısından en tehlikeli etkilere sahip UV radyasyonudur. UV-C en kısa dalga boyuna sahiptir, ozon tabakası tarafından filtrelenerek tamamen emilir, bakterilere ve virüslere karşı yüksek sterilizasyon sağlar, cilde zarar vererek cilt kanserine neden olur. UV-C'nin %4-7'lik kısmı epiderminin en üst tabakasında tutunur. Bu ışıktan en çok etkilenen organ gözdür. Göz aşırı doza maruz kaldıktan 1-12 saat sonra kum varmış hissi ile gözden yaş gelmeye başlar (Tekbaş and Evci, 2005; Çıracı, 2019; Narayanan et al., 2010) .

Ultraviyole radyasyonun canlılar üzerindeki etkisi

Güneş spektrumunun UV bölgesi, dünya yüzeyine ulaşan güneş ışığının sadece küçük bir bölümünü oluşturur. UV fotonları birçok biyomolekül tarafından absorbe edilebildiği için etkileri orantısız olarak büyüktür ve bu da hücresel hasarla sonuçlanır. UV radyasyonunun neden olduğu DNA hasarının doğası, gelen fotonların dalga boyuna büyük ölçüde bağlıdır (Braga et al., 2015).

Nükleik asitler ve proteinler, UV-B dalga boyu aralığında radyasyonu emen hücresel elemanlardır. UV-B, DNA tarafından doğrudan emilir ve yapısal DNA hasarına neden olur. UV-A, DNA'da kırılmalar oluşturan reaktif oksijen türlerinin oluşumu yoluyla dolaylı DNA hasarına neden olur (Narayanan et al., 2010). Uzun dalga boylu UV-A ışınları UV-B ışınımına eklendiğinde kanser oluşumu artar. UV-B ve UV-C DNA'yı etkileyerek hücre ölümü, mutasyon ve transformasyona neden olur (Narayanan et al., 2010).

Üst deri bozulmalarından UV-B, alt derideki bozulmalardan hem UV-B hem de UV-A sorumludur (Tekbaş and Evci, 2005). Kronik UV maruziyetin bir sonucu olarak yaşlanma, kırışıklıklar, düzensiz cilt pigmentasyonu, cilt elastikiyetinin kaybı, cilt bariyer fonksiyonlarının bozulması ve cilt kanseri ortaya çıkar (Narayanan et al., 2010).

Güneş ışığındaki UV ışınlarının D vitamini sentezi için önemli bir faktördür (Passeron et al., 2019). Güneş ışığı, fotosentez için bol miktarda enerji sağlamanın yanında ısı enerjisi ile buharlaşmayı artırarak su döngüsüne katkıda bulunur.

Çoğu mantar türü hem UV-A hem de UV-B radyasyonu tarafından etkisiz hale getirilebilir ve UV mantarın konidyal çimlenme hızını ve virülansını azaltır. Mantarlar UV radyasyonundan korunmak için hücre duvarında bulunan melaninler ve melanin benzeri pigmentler, güneşten koruyucu olarak hareket eden sitoplazmik UV emici hücre metabolitler, reaktif oksijen türlerini inaktive edebilen enzimler (katalazlar, peroksidaz), antioksidanlar, hasarı onarabilen DNA onarım sistemleri gibi bir dizi korunma mekanizması geliştirmiştir (Braga et al., 2015).

Polimerler ve Film Üretimi

‘Polimer’ terimi, bir veya daha fazla birimin (monomerler) bir dizi özellik sağlamak için yeterli miktarda birleştirilmiş çoklu tekrarları ile karakterize edilen makromolekülleri tanımlamak için kullanılır. Kökenlerine göre doğal ve sentetik olarak gruplandırılırlar. Doğal polimerler kategorisinde selüloz, karragenan (kırmızı deniz yosunlarından elde edilen bir polisakkarit), nişasta, gum arabik, alginat, jelatin, dekstran, kitosan vb. bulunur. Sentetik polimerlere örnek olarak polietilen, polilaktit, polivinil klorür, melamin, üre formaldehit, (polivinil alkol) PVA vb. bulunmaktadır (Umoren and Solomon, 2019). İstenilen özelliklere sahip yeni malzeme elde etmek için en etkili yöntemlerden biri polimerlerin kullanılmasıdır. Sentetik polimerler kolayca elde edildiğinden ve üretim maliyeti düşük olduğundan, doğal veya sentetik polimerlerin karışımı, elde edilen filmlerin maliyet-performans oranını iyileştirir (Kanatt et al., 2012).

Bu polimerler arasında en dikkat çekici polimerlerden biri PVA’dır. PVA hidrofilik bir polimerdir ve çok sayıda hidroksil grubunun varlığından dolayı suda kolayca çözünür (Timofiychuk et al., 2009). Mükemmel film oluşturma yeteneği, kolay işlenebilirliği, iyi kimyasal direnci, biyolojik olarak parçalanabilirliği ve mükemmel mekanik özellikleri nedeniyle PVA en çok tercih edilen polimerlerdendir (Srivastava et al., 2021). Polimerlerin kullanımı ile farklı amaçlara uygun fiziksel ve mekanik özelliklerle sonuçlanır.

Son yıllarda, birçok organik UV emici ve inorganik oksitlerin polimerlerin UV koruma performansını iyileştirdiği rapor edilmiştir. Benzofenon veya triazinler gibi organik UV emiciler, UV ışığını dağıtabilir. İnorganik oksitler (titanyum dioksit, çinko oksit, silikon dioksit ve alüminyum oksit) emilim ve ışığın saçılması yoluyla UV ışığını azaltır. Bununla birlikte, organik emiciler, polimer matrislere gömüldüklerinde her zaman fotodegradasyon veya agregasyondan dolayı olumsuz etkilenmektedir. İnorganik oksitlerin çoğunluğu genellikle, aynı anda polimer matrislerin fotodegradasyonunu indükleyebilen UV ışık absorpsiyonu üzerinde fotokatalitik özellik gibi yan etkiler gösterir (Calvo et al., 2012; Wang et al., 2018).

Melanin, doğada yaygın olarak bulunan ve UV radyasyonunun adsorpsiyonu (foto koruma), renklendirme, fototermal dönüşüm ve serbest radikal yakalama özellikleri gibi birçok faydalı özellik gösteren özel bir biyomakromolekül türüdür (Roy and Rhim, 2021). Genel olarak melanin, -NH- ve -OH gibi birçok reaktif gruba sahiptir. Aslında, diğer malzemelerin özelliklerini artırmak için melaninin birçok arzu edilen işlevsel özelliğinden yararlanmak hala büyük ölçüde keşfedilmemiş durumdadır (Roy and Rhim, 2021).

Melaninin UV korumasının nedeni, yıkıcı fotobozunmayı önlemek için UV ışığından foton enerjisini hızla ısıya çevirebilmesidir (Forest and Simon, 1998). UV ve görünür ışığı engelleme özelliğinden dolayı melanin katkılı kitosan (Roy et al., 2020), polilaktik asit (Łopusiewicz et al., 2018), jelatin (Shankar et al., 2019) ve agar (Roy and Rhim, 2019) gibi polimer bazlı filmler elde edilmiştir.

***Scolecobasidium musae* türünün genel özellikleri**

Sympoventuriaceae geniş coğrafi dağılıma ve zengin tür çeşitliliğine sahip büyük bir familyadır (Shen et al., 2020). Sympoventuriaceae yaklaşık 164 tür içerir, morfolojik ve ekolojik olarak çeşitlilik gösteren, farklı yaşam tarzları ve beslenme biçimleri olan bir mantar grubudur (Mycobank, Nisan 2022). Saprofit canlılardan, hayvan ve bitki patojenlerine, ekstremofilik türlere (termofilik mantarlar) kadar ekolojik habitatları çeşitlilik göstermektedir (Murata et al., 2022; Samerpitak et al., 2019). Bu mantarlar çevrelerinden en iyi şekilde yararlanmak için farklı yaşam tarzları geliştirmiştir.

Scolecobasidium (= *Ochroconis*) ve *Verruconis*, sympodial konidili hücrelere ve T-veya Y-şekilli ile silindirik veya klavat konidiye sahip çok benzer cinslerdir (De Hoog and Von Arx, 1973). Morfolojik ve ekolojik karakterlerin alışılmadık bir kombinasyonu nedeniyle, sistematik konumları tarihsel olarak tartışmalı olmuştur. *Scolecobasidium*, *S. terreum* ve *S. constrictum*'a dayalı olarak tanıtılmış ve *S. terreum* jenerik tip olarak kullanılmıştır (Abbott, 1927; Barron and Busch, 1962). Daha koyu, dallanmamış konidialı *Scolecobasidium* türleri *S. terreum* ile aynı türden sayılmıştır. Buna rağmen, bu görüş von Arx tarafından desteklenmemiş ve bu nedenle de Hoog (1973) ayrı bir cins olarak *Ochroconis*'u sunmuştur. *Ochroconis*, elipsoidal konidiya sahip türler için *O. constricta* ile belirtilir. *Ochroconis*'in, bazıları ara sıra bitki çöpü, insan veya balıklar üzerinde yetişen saprotrofik toprak hipomisetlerinin oldukça yaygın bir cinsi olduğu kanıtlanmıştır (Samerpitak et al., 2014).

Gams (2015), *Ochroconis*'i *Scolecobasidium* ile eşanlamlı olarak kabul etmiştir. Hem *S. terreum* (CBS 203.27) hem de *O. constricta* (CBS 202.27), *Ochroconis* ve *Scolecobasidium* türleri ile birlikte, *Scolecobasidium* soyunda sınıflandırılırlar. Bu sonuçlara dayanarak, eski

genel adı *Scolecobasidium* yeniden gündeme getirilmiş ve *Ochroconis*'un eşanlamlısı olarak kullanılmıştır (Shen et al., 2020).

Melanin İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Melanin pigmenti üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Aşağıda melanin pigmenti ile ilgili yapılan bazı çalışmalar özetlenmiştir.

Mantar melaninlerinin biyosentezi ve insan patojenik mantarları için önemi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bazı patojenik mantarlarda melaninin yokluğunun virulansta bir azalmaya yol açtığını belirlenmiştir. DOPA ve DHN melaninlerin serbest radikalleri azaltma özelliğinin virulansta önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir (Langfelder et al., 2003).

Phyllosticta capitalensis'den melanin saflaştırılmış ve melanin biyosentezi inhibitörü olan trisikazolün, pigment sentezini inhibe ettiği belirlenmiştir. *P. capitalensis*'in melaninin mantarın stresli ortamlarda hayatta kalma kabiliyetini arttırdığı bildirmişlerdir. Bu çalışma *Phyllosticta capitalensis*'den elde edilen melaninin ilk raporudur (Suryanarayanan et al., 2004).

Pleurotus cistidiosus formosensis yenilebilir mantarında DOPA melaninin karakterizasyonuna ilişkin ilk çalışma Selvakumar et al., (2008) tarafından sunulmuştur.

Tibet Platosu'nda endemik olan entomojen bir mantar olan *Ophiocordyceps sinensis*'in fermantasyon sıvısından melanin pigmenti elde edilmiştir. Elde edilen pigmentin antioksidan ve demir şelatlama özellikleri belirlenmiştir (Dong and Yao, 2012).

Sporothrix schenckii, dünya çapında dağılım gösteren önemli bir kutanöz mikoz olan sporotrikoza neden olan bir insan patojenidir. Melaninin *S. schenckii*'yi belirli oksidatif antimikrobiyal bileşiklere ve makrofajların saldırısına karşı koruduğu gösterilmiştir (Romero-Martinez et al., 2000). *S. schenckii* izolatlarının (26 farklı izolat) melanizasyonunun belirlendiği çalışmada suşların çoğu (%88) 37 °C'de az miktarlarda melanin üretirken, bazik pH'ta hiçbirinin melanin üretmediği belirlenmiştir (Almeida-Paes et al., 2009). Pyomelanin üreten *S. schenckii*'nin azot türevli oksidantlara ve UV ışığına karşı daha dirençli olduğu belirlenmiştir (Almeida-Paes et al., 2012).

Fransa'da Lascaux Mağarası'ndaki kaya resimlerini tehdit eden siyah lekelerin kimyasal bileşimini araştırmak için yüzeyle güçlendirilmiş Raman spektroskopisini kullanarak lekelerin esas olarak *Ochroconis sp.* mantar melanini olabileceği gösterilmiştir (Martin-Sanchez et al., 2012). Daha sonra bu mağarada yapılan çalışmalar *Ochroconis* cinsinin melanin üreten iki yeni türü, *O. lascauxensis* ve *O. anomala* olduğu belirlenmiştir (De la Rosa et al., 2017).

Actinoalloteichus sp.'den DOPA melaninin üretimi ve karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmada melaninin antibakteriyel, antioksidan ve metal şelatlama aktiviteleri *in vitro* deneylerle ortaya konmuştur. Farklı karbon ve azot kaynaklarının belirlendiği bu çalışmada karbon kaynağı olarak glukozun ve azot kaynağı olarak kazeinin en yüksek melanin üretimini sağladığı belirlenmiştir (Manivasagan et al., 2013).

Pseudomonas stutzeri melanini UV-Vis, FT-IR, EPR ve XRD analizleriyle biyofiziksel karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen melaninin ayrıca antioksidan özellikte olduğu gösterilmiştir (Ganesh Kumar et al., 2013).

Aspergillus cinsine ait 6 farklı türün melanin üretim mekanizmalarının araştırıldığı çalışmada *A. tamarii* ve *A. flavus* için melanin sadece biyokütleden elde edilirken, *A. terreus* için melanin sadece kültür süzüntüsünde bulunmuştur. *A. sydowii*'de ihmal edilebilir miktarda melanin belirlenmiştir. Kültür filtratı ve mantar biyokütlesinden maksimum melanin miktarı sırasıyla *A. niger* ve *A. tamarii*'de bulunmuştur. *A. niger*, *A. tamarii* ve *A. flavus* DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin) yolu ile melanin üretirken, *A. tubingensis* ve *A. terreus*'un DHN (1,8-dihidroksinaftalin) yolu melanin ürettiği belirlenmiştir. *Aspergilli*'deki melanin miktarının ve çeşidinin türden türe büyük ölçüde farklılık gösterdiği sonucuna varılmıştır (Pal et al., 2013).

Aspergillus terreus'un melanin sentezinde yer alan enzimlerinin ve ara ürünlerin neler olduğunun belirlendiği ve karakterizasyonunun gerçekleştirildiği çalışmada melaninin UV stresi ve asitli ortamdan konidyumları koruduğu ve amip tarafından fagositozu azalttığı belirlenmiştir (Geib et al., 2016).

Deriden izole edilen *Ochroconis mirabilis*'in genom analizi yapılmıştır. Bu mantar melanin ve çeşitli enzimler sentezleyerek farklı habitatlarda mantarların hayatta kalma taktiklerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır (Yew et al., 2016).

Auricularia auricula tarafından melanin üretimi ve yapısı detaylı olarak belirlenmiş ve analiz edilmiştir. Düşük azot ve azotsuz ortamda melanin veriminin çok düşük olduğu ve ayrıca tirozin eksikliğinin melanin üretiminin azalmasına neden olduğu bildirilmiştir. Melaninin yapısal formülü UV-Vis, FTIR, NMR ve elemental analizi ile ömelanin olduğu ve ayrıca 5,6-dihidroksiindol ve 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asidin makromoleküler bir polimer olduğu belirlenmiştir (Sun et al., 2016).

Wang et al., (2017), PVA/dopamin-melanin nanokompozit filmlerin tüm UV bölgesini (200–400 nm) tamamen bloke edebildiğini ve görünür spektrumda yüksek şeffaflığını koruyabildiğini göstermiştir. Bu çalışmada ışığa duyarlı maddeler için önemli bir UV koruması ve şeffaf malzeme üretimi gerçekleştirilmiştir.

Termitomyces albuminosus'tan elde edilen melanin pigmentinin UV-Vis, FTIR, NMR ve elemental analizleri sonucunda %54,6 C, %3,5 H, %2,4 N, %26,9 O ve %12 S yapısında feomelanin olduğunu belirlenmiştir (De Souza et al., 2018).

Tirozin (3 g/L) varlığında *Klebsiella pneumoniae* S-1, *Alcaligenes faecalis* PBI ve *Enterobacter* sp. ABI bakterilerinin homogenisik asit öncülüğünde piyomelanin ürettiği rapor edilmiştir (Singh et al., 2018).

Auricularia auricula'da %1 metanol, %0,25 fıstık yağı, %1,0 stearik asit veya %0,5 palmitik asidin melanin biyosentezine yardımcı olduğu, Tween 80'in ise melanin oluşumunu önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. İnhibitör testi ve taramalı elektron mikroskobu analizi, melaninin ömelaninden oluştuğunu göstermiştir. Melaninin güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Wu et al., 2018).

A. auricula melaninin kimyasal antioksidan aktivitesi ve H₂O₂'nin neden olduğu hücre oksidatif hasarı üzerindeki koruyucu etkisi araştırılmıştır. Hücre morfolojisi gözlemi, melaninin oksidatif stres tarafından indüklenen hücrelerin morfolojik değişikliklerini iyileştirdiğini belirlemişlerdir (Liu et al., 2019).

Suwannarach et al., (2019) tarafından ilk kez *Spissiomycetes endophytica* SDBR-CMU319 türünden melaninin saflaştırılması, karakterizasyonu ve optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Pigmentin fiziksel ve kimyasal olarak asitte çökeltme, alkali de çözünürlük, oksitleyici ajanlarla renk giderme ve çoğu organik çözücüde ve suda çözünmezlik özelliklerini gözlemlemişlerdir. Pigmentin UV-Vis, FTIR ve EPR analizlerine dayalı olarak melanin olduğunu doğrulamışlardır. En yüksek mantar pigmenti verimini, glikoz, maya özütü ve pepton ortamında, 6,0'lık başlangıç pH değerinde ve üç haftalık kültivasyon sonunda 25 °C'de bulmuşlardır (Suwannarach et al., 2019).

Mürekkep balığından elde edilen melanin kullanılarak agar bazlı fonksiyonel filmler hazırlanmıştır. Melanin ilavesinin, agar filmin UV engelleme, hidrofobiklik, mekanik ve su buharı bariyeri özelliklerini geliştirdiği belirlenmiştir. Ayrıca, agar/melanin kompozit filmler antioksidan aktivite göstermiştir. Sepya mürekkebinden elde edilen melaninin, gıda paketlenme ve biyomedikal uygulamalar için antioksidan biyopolimer filmler geliştirmek için fonksiyonel bir dolgu maddesi olarak kullanılabilir olduğunu göstermişlerdir (Roy and Rhim, 2019a).

Aureobasidium pullulans'ı melanize veya albino maya formunu, tuzluluk ve antifungaller (flukonazol, itrakonazol ve terbinafin) ve ayrıca gama ışınlaması gibi farklı streslere maruz bırakmışlardır. Melaninin, terbinafin stresi sırasında L-DOPA'dan bağımsız bir yolda sentezlendiği belirlenmiştir. Ayrıca, melanize maya hücreleri, albino hücrelere göre gama

ışınlanmasına karşı daha fazla canlı stabilite ve pigment üretkenliği göstermiştir. Bu çalışmada araştırmacılar ayrıca koruyucu malzeme olarak kullanılmak üzere yeni kompozitler oluşturmuştur. Bizmut, kurşun ve gümüş nanoparçacıkları ile fungal melaninin şelatlama aktivitesine dayanan bu kompozitlerin nanoteknoloji ile birleştirilmesi, yeni radyasyon kalkanı malzemeleri üretmek için umut verici özelliğini belirtmişlerdir (El-Bialy et al., 2019).

PVA/sentetik melanin ile şeffaf film elde edilmiş ve melanin içerikli UV koruyucu filmin şeffaf kondansatör olarak kullanılabileceğini belirtilmiştir (Albano et al., 2019).

Kalamar mürekkebinden izole edilen melanin farklı konsantrasyonlarda (%0, 0.25, 0.5 ve 1.0) jelatin filmlerin hazırlanması için kullanılmıştır. Melanin ilavesi filmin şeffaflığını azaltmıştır. UV engelleme, mekanik kararlılık, termal kararlılık ve su buharı bariyeri özellikleri melanin ilavesiyle iyileştirilmiştir. Jelatin/melanin nanokompozit filmlerin tüm film özellikleri, melanin konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir. Ayrıca, jelatin/melanin nanokompozit filmler, gıda paketlenme ve biyomedikal uygulamalar için büyük bir potansiyele sahip olan yüksek bir antioksidan aktivite sergilemiştir (Shankar et al., 2019).

Lachnum YM30'dan izole edilen bir hücre içi melanin yapısal formülü, fungal ömelaninin tipik özelliğini gösteren UV analizi, IR analizi, elemental analiz, NMR ve ESI-MS analizine dayalı olarak sonuçlandırılmıştır. Saflaştırılan melaninin enflamatuvar etkiyi azalttığını rapor edilmiştir (Xu et al., 2020).

Aspergillus fumigatus 'un 1,8-dihidroksinaftalin (DHN) melanini ürettiği bildirilmiştir. *Myristica fragrans*'ın hekzan ekstraktlarının *A. fumigatus* melanin üretimini %77 oranında azalttığını belirlenmiştir (Hoda et al., 2020).

Süpernatanda melanin üretme yetenekleri açısından 102 mantar izolatu taranmış ve gelecek vaat eden aday olarak *Amorphotheca resinae* seçilmiştir. Pepton maya özütü glikoz besiyerinde *A. Resinae*'nin 14. günde 4,5 g/L melanin ürettiği belirlenmiştir. *A. resinae*'den saflaştırılan melaninin yapısal karakterizasyonu, standart melaninlerle karşılaştırmalı olarak elemental analizi, EPR, NMR, LS-MS, piroliz-gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) kullanılarak geniş bir endüstriyel kullanım alanına sahip olan ömelanine benzer olduğunu belirlenmiştir. *A. resinae*'den saflaştırılmış melanin, serbest radikal yakalama deneylerinin bir sonucu olarak güçlü antioksidan olduğu gösterilmiştir (Oh et al., 2020).

Cetraria islandica ve *Pseudevernia furfuracea* likenlerinden ekstrakte edilen melaninin elementel bileşimini, ana fonksiyonel grupları ve fizikokimyasal özelliklerini çalışarak allomelanin olduğunu belirlenmiştir. Melaninin fotokoruyucu ve antioksidan özelliklerini belirleyen fonksiyonel grupları belirlenmiştir (Rassabina et al., 2020).

Halofit *Salicornia brachiata*'dan endofitik *B. subtilis*'den melanin üretimi gerçekleştirilmiştir. Melaninin, elemental analizi, UV-Vis, FT-IR, SEM, EPR ve NMR analizleri ile ömelanin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca saflaştırılmış melaninin, antioksidan aktivitesi ve *Xanthomonas campestris* ve *Alteromonas macleodii* patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle, bu çalışma ayrıca, melanin üreten endofitlerin, konakçı bitkinin çevresel stres ve diğer patojenlerden korunmasına yardımcı olmada olası bir rolünü belirlemiştir (Ghadge et al., 2020).

Piroliz verileri ışığında *Ochroconis* türlerinin 3,4- DOPA veya DHN tipte melanin sentezlemediği belirlenmiştir. Üretilen melaninin homogentisik asit ve diğer fenolik bileşiklerin polimerizasyonuna dayalı bir tür piyomelanin olabileceği öne sürülmüştür (Saiz-Jimenez et al., 2021).

Pseudomonas sp. türünün ürettiği ömelanini UV-B radyasyonlarına karşı *in vitro* sitotoksitesi ve foto-koruyucu etkisi fare fibroblastları NIH3 T3 hücre hatları üzerinde değerlendirilmiştir. Saflaştırılan pigmentin antioksidan özelliği sayesinde fare fibroblast hücrelerini UV-B ışımından etkin bir şekilde koruyarak fotokoruyucu potansiyeli ortaya konulmuştur (Seelam et al., 2021).

Dietzia kuraklığa ve ultraviyole dirençli bir aktinobakteridir. Bu bakterinin L-tirozin varlığında koyu kahverengi melanin pigmenti üretme potansiyeli ortaya konmuştur. Melanin, serbest radikalleri temizleme ve güneşin ultraviyole ışınlarına karşı koruma gibi çeşitli biyolojik özellikler sergilemiştir. *Dietzia* NM3'ten elde edilen melanin ayrıca adsorpsiyon yoluyla krom iyonlarını uzaklaştırma kabiliyetine sahip olduğu belirlenmiştir (Sahar Eskandari and Etemadifar, 2021).

Havuç kabuğu özleri kullanılarak *A. pullulans* NBRC 100716 tarafından hücre içi ve hücre dışı melanin üretimi rapor edilmiştir (Mujdeci, 2021; 2022).

Endofit mantar *Phoma* sp. tarafından üretilen melanin pigmentinin DHN ailesinin bir üyesi olduğu belirlenmiştir. Saflaştırılmış melanin ayrıca önemli antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser aktiviteler sergilediği belirlenmiştir (Surendirakumar et al., 2022).

Melanin pigmenti halotolerant siyah maya *Hortaea werneckii* AS1'den elde edilmiştir. UV-Vis spektroskopisi, FTIR, elemental analiz ve SEM kullanılarak ekstrakte edilen pigmentin fizyokimyasal karakterizasyonu ve analitik analizleri ile bunun bir ömelanin pigmenti olduğu belirlenmiştir. Optimal kombinasyon (kalsiyum klorür, 1,125 g/L; eser element, 0,25 mL/L ve kültür hacmi 225 mL/500 mL) elde edilmiş ve maksimum melanin verimi 0,938 g/L olarak rapor edilmiştir (Elsayis et al., 2022).

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Araştırmada Kullanılan alet ve cihazlar

Bu araştırmada Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na ait alet ve cihazlar Tablo 4'te belirtilmiştir.

Tablo 4. Araştırmada Kullanılan Alet ve Cihazlar

Mevcut Altyapı/Ekipman Türü, Modeli (Laboratuvar, Araç, Makine-Teçhizat vb.)	Kullanım Amacı
Otoklav / HMC Hirayama Hiclava HV-50L, JAPAN	Besiyerlerini ve cam malzemelerin sterilizasyonu
Derin Dondurucu (-18 °C): Arçelik	İzolatların uzun süreli saklanması
Buzdolabı / Arçelik, TÜRKİYE	Mikroorganizmaların saklanması ve ürünlerin analiz edilinceye kadar saklanması
Saf Su Cihazı / GFL 2004, GERMANY	Besiyeri hazırlanması ve tamponların hazırlanması distile su ihtiyacını karşılama
Soğutmalı Masa Santrifüj / Zentrifugen D-78532, GERMANY	Fungusların fermantasyon sıvısından ayırımı
Çalkalamalı İnkübatör / Zhicheng ZHWY-200B, CHINA	Mikroorganizmaların sıvı kültürde üretimi ve fungal pigment üretimi
Magnetik Karıştırıcı / Daihan Scientific MSH 20A, KOREA	Besiyeri hazırlanması besiyerlerinin çözündürülmesi
Hassas terazi / Denver Instrument	Gerekli kimyasalların tartılması
Mikrosantrifüj (Sigma)	Pigmentlerin saflaştırılmasında
Vorteks karıştırıcı (Zhicheng ZHWY-200B)	Gerekli homojenizasyonun sağlanması
pH metre (Ohaus Starter ST210)	Çözeltilerin ve besiyerlerinin pH'larının ayarlanması

Araştırmada kullanılan kimyasallar

Araştırmada kullanılan besiyerleri ve kimyasallar Sigma-Aldrich, Oxoid, Biokar ve Tokyo Chemical Industry firmalarından sağlanmıştır.

Araştırmada kullanılan mikroorganizma

Araştırmada kullanılan fungus çamaşır makinasından izole edilmiştir. Çamaşır makinasından steril svap ile alınan örnek YGC (Yeast extract glucose chloramphenicol) agar

besiyeri kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu besiyerinde gelişen örneğin PDA (Potato Dextrose Agar) besiyerine alınarak saf şekilde gelişimi sağlanmıştır.

İzolatin moleküler karakterizasyonu 18S rDNA sekans analizleri ile yapılmıştır. Fungal izolatin elde edilen DNA dizileri FASTA formatında National Center for Biotechnology Information (NCBI) websitesinde Nucleotid Blast programı kullanılarak GenBank veritabanı ile karşılaştırılmış ve tür seviyesinde tanılanması yapılmıştır.

Yöntem

Melanin pigment üretimi

İki hafta boyunca 25 °C’de PDA üzerinde büyüyen fungus kolonisinden elde edilen mantar miselyal kesitleri (5 mm çapında) melanin pigment sıvı üretim ortamına eklendi. Sıvı kültürde gelişim sağlandıktan sonra çalışılmak istenen her özellik için hazırlanan erlenlere 3 mL inokulum yapıldı. Pigment üretim ortamı 100 mL besiyeri içeren 250 mL’lik erlenmayerlerde 121 °C’de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 15 gün boyunca 30 °C’de 150 rpm’de çalkalamalı inkübatörde çalışıldı.

Pigment üretim ortamı için 10 g/L glikoz, 10 g/L peptone (tripton), 1 g/L maya ekstraktı (yeast extract), 1 g/L KH_2PO_4 , 0,2 g/L MgSO_4 kullanıldı. Besiyerinin başlangıç pH’ı 6’ya ayarlandı. İnkübasyondan sonra kültürler, mantar misellerini hasat etmek için 5000 rpm’de 15 dakika süreyle santrifüjlendi ve biyomas ile sıvı kısım ayrıldı. Elde edilen biyomas 48 saat 60 °C’de kurutulduktan sonra toz haline getirildi. Toz haline getirilen örnekler kuru fungal biyomas ağırlığının belirlenmesi ve intraselüler pigment analizi için kullanıldı.

Melanin pigment üretiminin optimizasyonu

Melanin pigmentinin üretiminde farklı karbon kaynakları, azot kaynakları, metal tuzları, başlangıç fermentasyon pH’sı, fermentasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresi çalışıldı.

Sıcaklık, pH ve inkübasyon süresinin pigment üretimi üzerine etkisi

Fermentasyon başlangıç pH’ı 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 olarak çalışıldı. Standart besiyeri hazırlandıktan sonra her 250 mL erlenlerdeki 100 mL besiyeri istenen pH’ya 1M HCl ve NaOH kullanılarak ayarlandı. Fermentasyonun 15. gününde melanin pigment ölçümleri yapıldı. Fermentasyon sıcaklığı olarak 20, 25, 30 ve 35 °C’lerde çalışıldı. İnkübasyon süresi olarak 5 günde bir gelişim izlendi. Toplamda mantarın pigment üretimi için 30 günlük gelişime bakıldı.

Karbon ve azot kaynaklarının pigment üretimi üzerine etkisi

Melanin pigment üretimi için karbon kaynakları olarak 10 g/L gliserol, glikoz, nişasta, laktoz, fruktoz, sükroz ve mannitol kullanıldı. Azot kaynakları olarak 10 g/L üre, bakto pepton, kazein peptonu, NaNO_3 , NH_4SO_4 , tripton ve NH_4Cl kullanıldı.

Metal iyonlarının pigment üretimi üzerine etkisi

Metal tuzları olarak bakır, nikel, mangan, kobalt, çinko, demir, kalsiyum tuzları çalışıldı. Melanin üretim ortamına 100 ve 200 mg/L konsantrasyonlarında metal iyonları eklenmiştir.

Melanin pigmentinin ekstraksiyonu ve saflaştırılması

Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş 0.1 g mantar biyokütlesi 5 mL 1 mol/L KOH içinde çözülerek, 48 saat bekletildikten sonra otoklavlandı (121 °C'de 15 dakika). Bu işlem üç kez tekrarlandı. Daha sonra karışım, 5000 rpm'de santrifüjlendi ve nihai süpernatant, 2 mol/L HCl ile pH 2'ye düşürüldü ve 24 saat 4 °C'de bekletildi. Daha sonra, çökteltiyi toplamak için 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Çökteltideki karbonhidratları ve proteinleri uzaklaştırmak için 2 saat boyunca 100°C'de 6 M HCl kullanılarak hidrolizi edildi. Deiyonize su ile pH 7'ye gelinceye kadar saf su ile yıkandıktan sonra lipitleri uzaklaştırmak için kloroform, etil asetat ve etanol organik çözücüler ile yıkandı. Elde edilen melanin oda sıcaklığında kurutuldu. Saflaştırılan pigment kimyasal karakterizasyon çalışmalarında kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

Melanin pigmentinin karakterizasyonu

Ekstrakte edilmiş mantar pigmentinin ve sentetik melanin (Sigma) standardının çözünürlüğü, damıtılmış saf su, 1 mol/L KOH, 1 mol/L NaOH, 100 mmol/L borat tamponu (pH 8.0), 1 mol/L NaCl, etanol, aseton, etil asetat, kloroform ve DMSO ile test edilmiştir.

Mantar pigmentinin spektroskopik analizi

Saflaştırılan pigmentin standart eğrisini oluşturmak için 0.1 N KOH içinde melanin (0.1-10 mg/L) çözülerek UV-Vis spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. Saflaştırmadan sonra elde edilen mantar pigmenti absorpsiyon spektrumu 340, 400, 650 nm dalga boylarında ölçüldü. Ayrıca sentetik bir DOPA-melanin standardı ile de karşılaştırılarak tarandı. Ölçümlerde 0.1 N KOH solüsyonu kontrol olarak kullanıldı. Mantar pigmentinin üretim miktarı (λ_{max}), sentetik melanin standardı belirlendi (Pacelli et al., 2020).

Saf melanin pigmentinin ve üretilen filmlerin kimyasal analizleri

Çalışmada gerçekleştirilen analizler DAYTAM'da hizmet alımı ile yapılmıştır.

FTIR analizi

FTIR, bilinmeyen herhangi bir karışımda bulunan fonksiyonel grup tiplerini tanımlamak için en kullanışlı, bilgilendirici ve iyi çözümlenmiş yöntem olarak kabul edilir. Pigmentin doğasını ortaya çıkarmak amacıyla, pigmentte bulunan fonksiyonel grup tiplerini belirlemek için kullanılır (Singh *et al.*, 2018). Saflaştırılmış mantar pigmenti, sentetik DOPA-melanin standardı ve saflaştırılan melanin ile üretilen filmler Thermo Fisher Scientific Nicolet iS10 FT-IR Spektrometresi (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile 500–4000 cm⁻¹ dalga sayısı bölgesinde çalışılmıştır.

LC-MS analizi

Homogensitik asit varlığı LC-MS ile belirlendi. Fungus 10 gün boyunca sıvı besiyerinde geliştirildi ve süre sonunda 5 ml kültür süzüldü ve santrifüj edildi. Süpernatant, konsantre HCl ile pH 3'e ayarlandı ve iki kez etil asetat ile ekstrakte edildi. Organik fazlar birleştirilip kuruyana kadar buharlaştırıldıktan sonra metanol içinde çözülerek doğrudan LC-MS analizi yapıldı (Liebgott *et al.*, 2008). Kimyasal yapılar, negatif modda elektrosprey iyonizasyon ve dört kutuplu analizör ile donatılmış bir Perkin-Elmer API150EX aparatı (Perkin-Elmer Applied Biosystems) kullanılarak LC-kütle spektrometresi (LC-MS) ile de doğrulandı.

Elemental analiz

Sentezlenen melaninin organik yapısındaki karbon, hidrojen, nitrojen ve sülfürün tespiti, LECO CHNS 932 Element Analiz Cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

XRD

Saflaştırılan melanin toz numuneleri, 1 cm çapında ve 1 mm kalınlığında diskler halinde preslendi. Saflaştırılan melanin Bruker D2 Phaser cihazda Cu(K α) kaynağı ışınması ile gerçekleştirilmiştir.

NMR

Saflaştırılan melaninin NMR analizi Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'ne yaptırılmıştır.

Saflaştırılan pigmentin biyoaktiviteleri

Antibakteriyal aktivitenin belirlenmesi

Antibakteriyal aktivitenin belirlenmesi *B. cereus* BC6830, *Staphylococcus aureus* BC7231, *P. aeruginosa* ATCC 9070, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729, *Escherichia coli* BC1402 patojen bakterilerine karşı gerçekleştirildi.

Stok mikroorganizmalardan alınan suşlar sıvı Nutrient Broth (NB) besiyeri içerisinde süspanse edildi. 16-18 saat boyunca 37 °C’de çalkalamalı inkübatörde geliştirildi. Süre sonunda petri yüzeyine mikroorganizma (0.5 Mc Farland) suşlarının steril swap yardımıyla ekimleri yapıldı. Kuyucuk yöntemiyle antibakteriyal test yapıldı. Pigment %15’lik DMSO çözeltisinde çözüldü. Steril koşullar altında 125- 1000 µg/mL arasında 4 farklı pigment konsantrasyonu hazırlandı. Kontrol olarak %15’lik DMSO kullanıldı. Hazırlanan konsantrasyonlar petride açılan her bir kuyucuğa 100 µL pigment çözeltisi konuldu. Pigmentin antimikrobiyal aktivitelerini incelemek için bakteriler 37 °C’de 24 saat süreyle etüve bırakıldı. Süre sonunda diskler etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çapları cetvel yardımıyla ölçüldü.

Pigmentin antioksidan aktivitesi

Saflaştırılmış pigmentin antioksidan aktivitesi, 0.1 mM DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) çözeltisi ile test edildi. %0,002 gr DPPH 100 ml metanolde çözüldü. 1000 µL pigment çözeltisi üzerine 250 µL pigment çözeltisi eklendi ve 25 dk karanlıkta bekletildi. Reaksiyon karışımının optik yoğunluğu, süre sonunda 517 nm’de UV-Vis spektrofotometre ile ölçüldü. Çalışmada askorbik ve gallik asit kontrol olarak kullanıldı. Çalışma konsantrasyonu olarak 12,5- 200 µg/mL kullanıldı. Aşağıdaki formülle, DPPH süpürme etkisinin yüzdesi hesaplandı.

$$\text{DPPH süpürme etkisi (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A₀ = kontrol OD’si, A₁ = numunenin OD’si

İnhibitörler kullanılarak fungal melanin sentez yolunun belirlenmesi

Sentetik inhibitörlerin saflaştırılmış melanin üzerindeki etkisi, melanin sentezi inhibitörlerinin etkisi incelenerek belirlendi.

Otoklavlanmış PDA ortamına 50 µg/mL konsantrasyonunda 22 µm steril filtreden geçirilen DOPA yolunu inhibe eden kojik asit (Sigma, ABD) ve tropolon (Tokyo Chemical Industry Co. Ltd., Japonya) ve DHN melanin yolunu inhibe eden trisiklazol (Tokyo Chemical Industry Co. Ltd., Japonya) ve ftalit (Tokyo Chemical Industry Co. Ltd) eklendi. Ortam, aktif olarak büyüyen bir koloninin kenarlarından kesilmiş 5 mm çapında bir miselyum yerleştirildi.

Petriler, 25°C’de 10 gün süreyle inkübe edildi ve büyüme ve pigmentasyon açısından gözlemlendi (Pal et al., 2013; Surendirakumar et al., 2022).

Ayrıca, melanin sentez yolunu belirlemek için 10 günlük kültür sıvısı alınarak QTOF LC-MS ile melanin pigmentinin öncül maddeleri belirlenmiştir. Bu amaç için, hücresiz kültür süpernatantı 1 N HCl ile pH 3 indirilmiş ve etil asetat ile 2 kez ekstrakte edilmiştir. Organik faz evaporatörle uzaklaştırılmış ve metanol içinde çözülerek analiz edilmiştir.

Melanin içeren UV koruyucu film üretimi

Polivinil alkol (PVA) ultra saf deiyonize su içinde 60 mg/mL konsantrasyonda çözüldü. PVA solüsyonu 1 saat 60°C’de karıştırıldı ve %1,5 gliserol ilave edildi. 0,045 g melanin 4000 µL pH 8 Tris tamponu çözeltisinde çözüldü. PVA çözeltisine melanin eklenerek ve 1 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Eklenen melaninin ağırlık yüzdeleri PVA konsantrasyonlarına göre %0,5, %1, %2 ve %4 olarak hazırlandı. Hazırlanan çözelti 60 °C fırında ince film haline gelinceye bekletildi.

İlgili numunelerin optik özelliklerini anlamak için 200 ile 1100 nm arasında UV-Vis Spektrometresi kullanılarak absorbans spektrumlarını elde edildi. Absorbans grafiklerine dayalı olarak, doğrudan ve dolaylı enerji bant aralığını (E_g) tespit etmek için aşağıda verilen Davis–Mott bağıntısı (Mott and Davis, 1971) kullanıldı.

$$(\alpha h\nu)^n = A(h\nu - E_g) \quad (1)$$

Burada A bir sabit, α soğurma katsayısı’dır. Numuneler için hesaplanan bant aralığı enerjileri, doğrudan geçişler için $n = 2$ ve dolaylı geçişler için $n = 1/2$ alınarak incelendi.

Numunelerdeki yapısal düzensizliği belirlemek için Urbach enerjisi, bant çizgilerinin genişliğini tanımlayan aşağıdaki bağıntı (2) kullanılarak elde edildi (Urbach, 1953)

$$\ln(\alpha) = \ln(\alpha_0) + \frac{h\nu}{E_U} \quad (2)$$

Burada α_0 bir sabit ve E_U Urbach enerjisidir. E_U değerleri $h\nu$ ’nin yanına $\ln(\alpha)$ çizilerek çıkarılacaktır ve elde edilen eğriler için eğimin tersi hesaplanarak E_U değerleri elde edildi. Numunelerin kırılma indisi (n) yansıma ve geçirgenlik ölçümleri ile elde edilen sonuçların aşağıdaki bağıntıda kullanılması ile hesaplandı (Abeles, 1972).

$$n = \left(\frac{1 + R}{1 - R} \right) + \left(\frac{4R}{(1 - R)^2} - K^2 \right)^{1/2} \quad (3)$$

Burada k, extinction katsayısını and R ise yansıma verisini göstermektedir.

Kırılma indisinin (E_d) enerji dağılım parametresi ve tek osilatör enerjisinin (E_o) ortalaması denklem 4 (Wemple and DiDomenico, 1971) kullanılarak hesaplandı.

$$(n^2 - 1)^{-1} = \frac{E_o}{E_d} - \left(\frac{1}{E_o E_d}\right)(h\nu)^2 \quad (4)$$

Melanin içeren PVA-gliserol filmlerin analizleri

Elde edilen filmin yüzey görüntüsü ve yapısı FTIR, SEM ve XRD cihazlarıyla belirlendi.

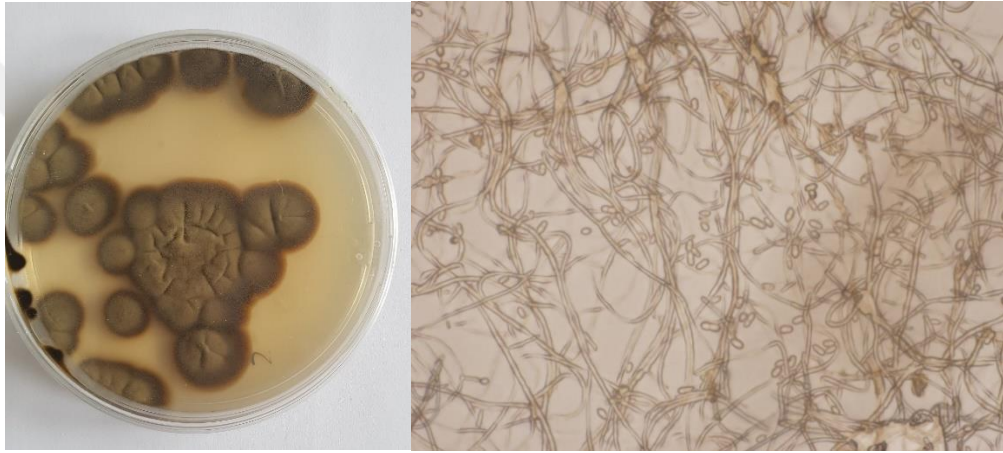
İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler, Windows için SPSS programının 16.0 sürümü kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile gerçekleştirildi. Her çalışmanın ortalama değerleri arasındaki önemli farklılıkları ($P < 0.05$) belirlemek için Tukey aralığı testi kullanıldı.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma

İzole edilen ve çalışmada kullanılan MO-7 izolatının 18S rRNA gen analizi ile *Scolecobasidium musae* olarak tanımlanmıştır. Analiz sonucunda %99,86 benzerlikle (726 bp) MO-7 izolatının *Scolecobasidium musae* olduğu tespit edilmiştir. GenBank'ta *S. musae* MO-7 izolatı OP437997.1 erişim numarası ile kayıtlıdır. PDA besiyerinde 10 gün geliştirilen fungusun misel ve spor yapısı Olympus DF71 mikroskobu ile görüntülenmiştir (Şekil 3).

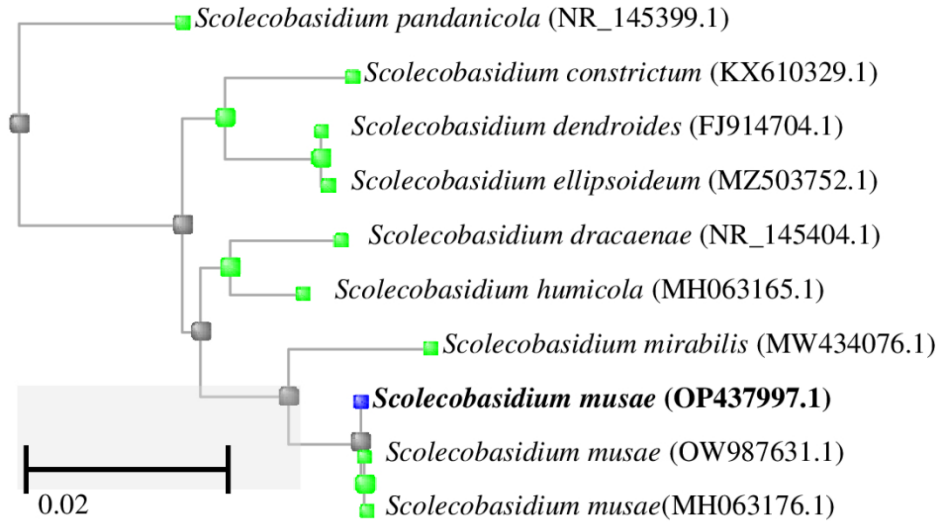


Şekil 3. *S. musae*'nin petri ve mikroskop görüntüsü

İzole edilen fungus PDA besiyerinde yavaş gelişim göstermekte ve koyu kahverengi renktedir. Şekil 4'de, filogenetik ağaçta *S. musae* MO-7 ile yakından ilişkili türler gösterilmiştir.

Scolecobasidium türleri çok çeşitli substratlar üzerinde kolonize olabilirler (Samerpitak et al., 2014). Çalışmada kullanılan mikroorganizma çamaşır makinasından izole edilmiştir. Bu çalışmaya benzer olarak *O. musae*, *Exophiala dermatitidis*, *Cyphellophora europaea*, *Cyphellophora pluriseptata*, *C. laciniata*, *Knufia epidermidis*, *Cladosporium halatolerans*, *C. sphaerospermum*, *O. constricta*, *O. humicola*, *Phialophora verrucosa* ve *K. perforans* gibi birçok fungus çamaşır makinasından izole edilmiştir (Hashimoto et al., 2019). Başka bir çalışmada sodyum oleat ve polioksietilen-9- lauril eter içeren deterjanları parçalayabilen funguslar (*S. humicola*, *S. constricta*, *S. terreum* ve *S. gallapova*) izole edilmiştir (Abe and Hamada, 2011). Ayrıca bulaşık makinesi bulunan mutfaklarda *Exophiala*, *Aureobasidium*, *Cladophialophora*, *Fonsecaea* ve *Ochroconis* cinslerine ait siyah maya benzeri mantarlar tespit edilmiştir. Zupančič et al., (2016) ve Tischner et al., (2019)'da çamaşır makinalarından 32

maya ve 39 fungus (*Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Scolecobasidium* ve *Trichoderma*) izole edilerek tanımlanmıştır.



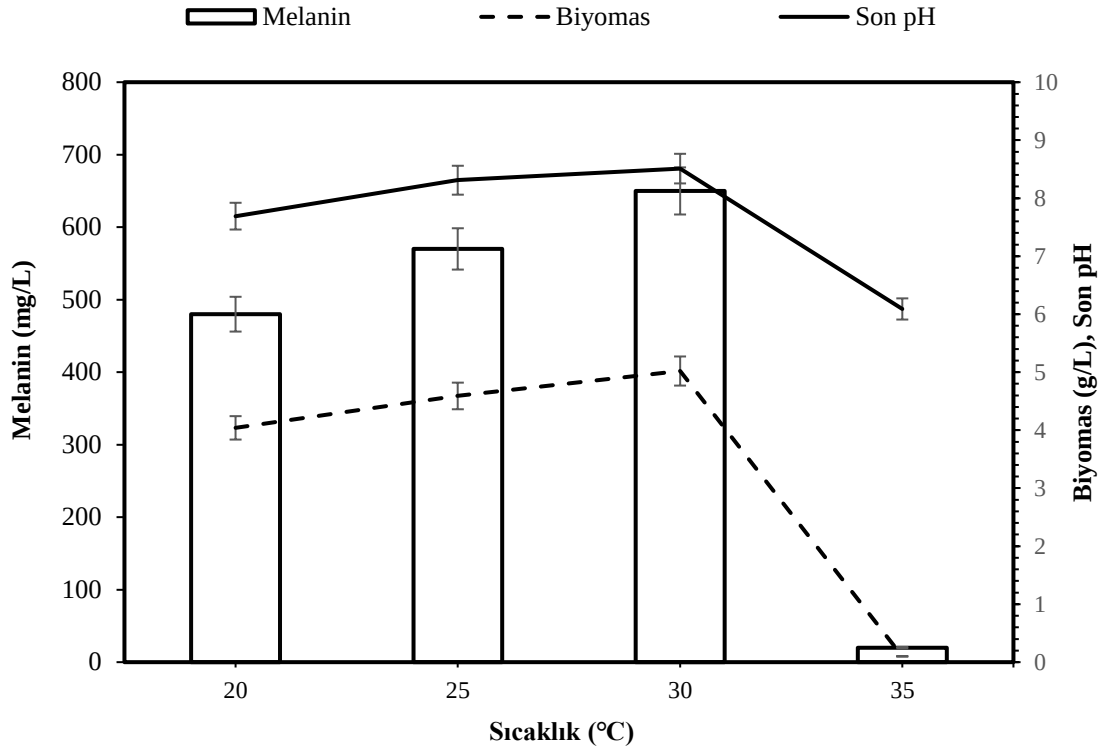
Şekil 4. MO- 7 izolatının 18s rDNA dizilerine dayalı filogenetik ağacı

Melanin Pigment Üretiminin Optimizasyonu

Pigment üretimine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık pigment üretiminde önemli bir parametredir. Şekil 5’de görüldüğü gibi en iyi melanin pigment üretimi 30 °C’de 650 mg/L iken en düşük melanin üretimi 35 °C’de 20 mg/L olarak ölçülmüştür. En iyi biyomas üretimi 30°C’de (5,02 g/L) gözlenmiştir. 35 °C’de pigment üretimi olumsuz etkilenmiştir. Son pH ölçümlerinde ise en yüksek mealanın üretimi 30 °C’de 8,52 mg/L iken 35 °C’de 6,09 olarak ölçülmüştür.

Nocardiosis alba ile Box-Behnken tasarımı ile optimum melanin üretimi, sıvı fermentasyon koşulları altında pH 7,5, sıcaklık 35°C, tuz %2,5, sakaroz 25 g/L ve tirozin 12,5 g/L ile 3,4 mg/mL melanin elde edilmiştir (Kiran et al., 2014). Ayçiçeğinde ciddi patojen olan *Alternaria helianthi*’nin büyümesi ve melanin üretimi pH 6,5’de ve 30 °C’de optimum iken 30°C’nin üzerinde biyomas ve melaninin üretimi inhibe olmuştur (Anitha and Murugesan, 2008). *Spissiomycetes endophytica* ile yapılan çalışmada optimum melanin üretimi 25 °C’de elde edilirken daha yüksek sıcaklıklarda (30, 35 ve 40 °C) melanin üretimi gerçekleşmemiştir (Suwannarach et al., 2019). *P. stutzeri*’den melanin üretimi üzerine yapılan çalışmada pH 6,7’nin optimal olduğu bulunmuştur. Farklı sıcaklıklarda (20- 45 °C) melanin üretimine bakıldığında 37 °C’de maksimum melanin üretimi gözlemiştir. 45 °C’ye kadar sıcaklık artışında büyüme ve melanin üretiminde kademeli ve eşit bir düşüş olmuştur. 150 rpm’lik çalkalama hızı iyi büyümeyi ve melanin üretimini desteklemiştir. Yüksek çalkalama hızlarında, melanin üretiminin kademeli olarak düştüğünde belirlenmiştir (Ganesh Kumar et al., 2013).

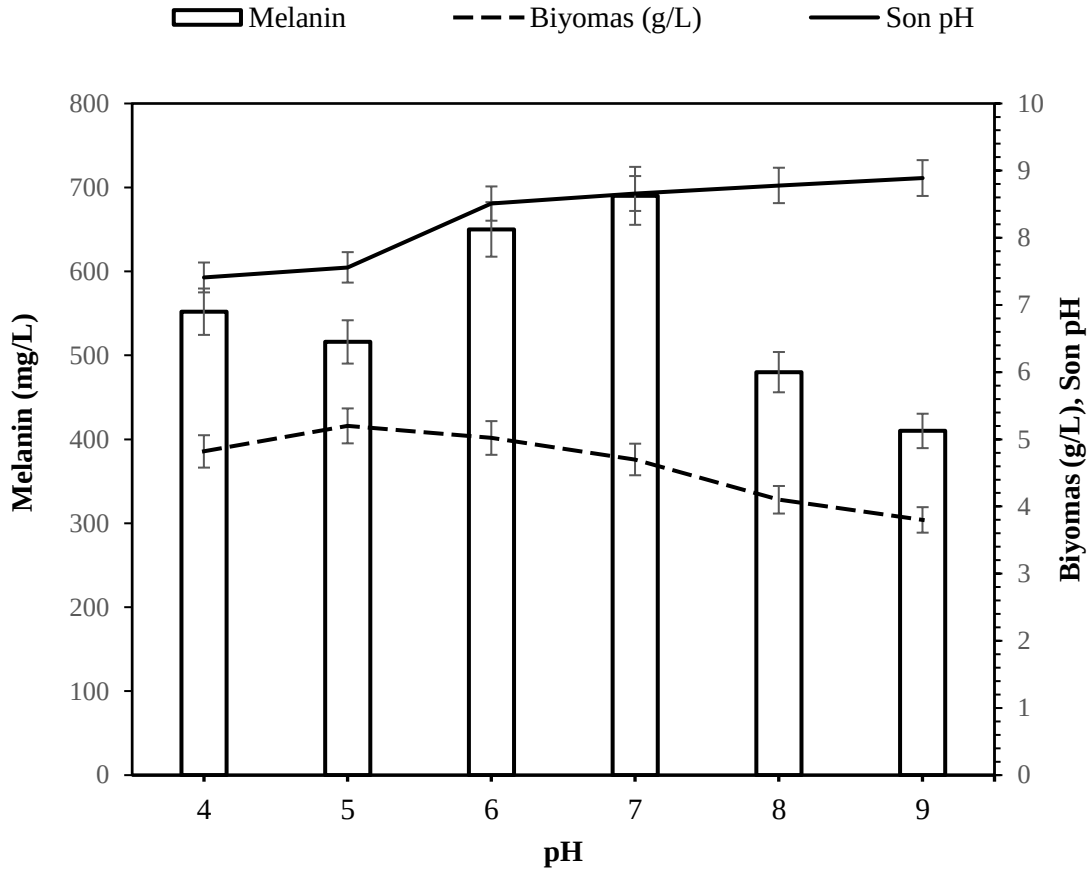


Şekil 5. Sıcaklığın melanin üretimi, biyomas ve son pH'a etkisi

pH'ın pigment üretimine etkisi

pH fungus gelişiminde ve pigment üretiminde önemli bir faktördür. Şekil 6'da görüldüğü gibi en iyi melanin pigment üretimi 690 mg/L ile pH 7'de ölçülmüştür. En az pigment üretimi pH 9'da (410 mg/L) elde edilmiştir. En fazla biyomas oluşumu pH 5'te (5,02 g/L) elde edilirken, en düşük biyomas üretimi pH 9'da (3,8 g/L) elde edilmiştir. Son pH ölçümlerinde ortamın başlangıç pH'ı arttıkça arttığı belirlenmiştir.

Fermentasyon ortamının başlangıç pH'ı fungus metabolizmasını etkilemektedir (Ozdal and Kurbanoglu, 2019). *Spissiomycetes endophytica* ile yapılan çalışmada optimum melanin üretimi pH 6'da elde edilirken daha yüksek pH'larda melanin üretimi kademeli olarak azalmıştır (Suwannarach et al., 2019). Optimum melanin üretimleri *Streptomyces glaucescens* (El-Naggar and El-Ewasy, 2017) ve *A. pullulans* (El-Gamal et al., 2017) için pH 7, *A. helianthi* (Anitha and Murugesan, 2008) için pH 6,5, *Auricularia auricula* (Sun et al., 2016) için pH 6 olarak belirlenmiştir.



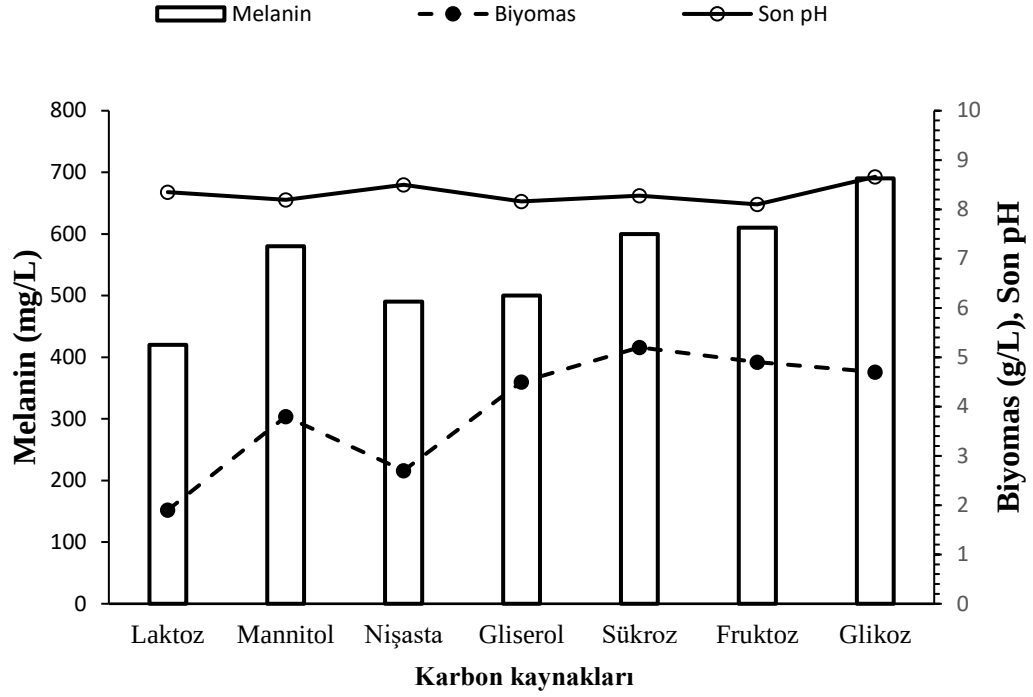
Şekil 6. pH'nın melanin üretimi, biyomas ve son pH'a etkisi

Pigment üretimine karbon kaynaklarının etkisi

Karbon kaynakları melanin üretiminde önemli bir parametredir. Şekil 7' de görüldüğü gibi en yüksek melanin üretimi karbon kaynağı olarak glukoz kullanıldığında (690 mg/L) elde edilmiştir. En fazla biyomas oluşumu sükroz ortamında (5,2 g/L) elde edilirken en düşük biyomas nişasta kullanıldığında (2,7 g/L) elde edilmiştir. Ortam pH'sı genel olarak artmıştır. Dolayısıyla çalışmanın bundan sonraki bölümlerinde karbon kaynağı olarak glukoz kullanılarak devam edilmiştir. Karbon kaynağının kullanıldığı tüm ortamlarda melanin oluşumu gözlenmiştir (Şekil 9).

Melanin üretiminde kullanılan karbon kaynağı ve konsantrasyonu doğrudan pigment üretimini etkilemektedir. Bu nedenle birçok çalışmada melanin üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi çalışılmıştır.

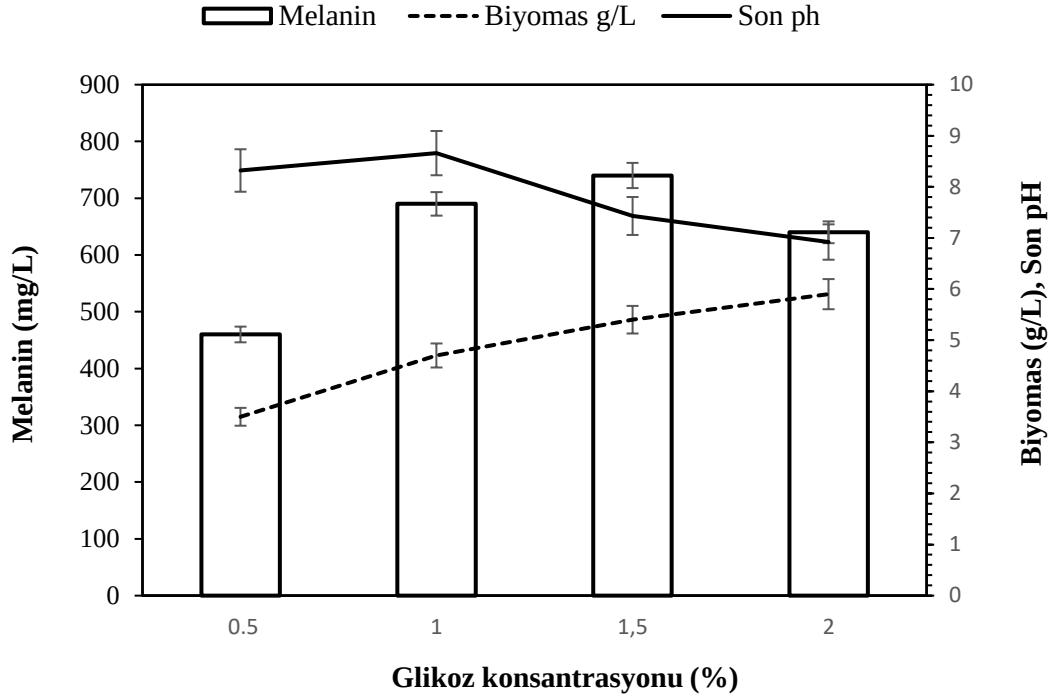
Melanin üretiminde en uygun karbon kaynakları *A. pullulans* (El-Gamal et al., 2017), *A. fumigatus* (Raman et al., 2015) ve *Beijerinckia fluminensis* (Joshi et al., 2021) için glukoz iken *Actinoalloteichus* sp. (Manivasagan et al., 2013) için gliserol olarak belirlenmiştir.



Şekil 7. Karbon kaynaklarının melanin, biyomas ve son pH üzerine etkisi

Glukoz konsantrasyonu melanin üretiminde önemlidir. Şekil 8’ da görüldüğü gibi en yüksek melanin üretimi %1,5 glukoz kullanıldığında (740 mg/L) elde edilmiştir. En fazla biyomas oluşumu %2 glukoz ortamında (5,9 g/L) elde edilirken en düşük biyomas %0,5 glukoz kullanıldığında (3,5 g/L) elde edilmiştir. Ortam pH’ı yüksek glukoz konsantrasyonlarında düşmüştür. Glukozun kullanıldığı her konsantrasyonda melanin oluşumu belirlenmiştir (Şekil 7).

Karbon kaynağının seçimi, sekonder metabolitleri ve dolayısıyla enzim ve pigment oluşumunu önemli ölçüde etkilemektedir. *Penicillium chrysogenum* kültürünün patates nişastası, sakkaroz, glukoz, fruktoz, laktoz ve gliserol gibi karbon kaynaklarının %2,0 konsantrasyonunda çalışıldığında en yüksek melanin üretimi sırasıyla patates nişastası, glukoz, fruktoz, sükroz, laktoz ve gliserol ortamlarında elde edilmiştir (El-Batal et al., 2017). *Auricularia auricula* ile sıvı kültürde melanin üretiminde %1 metanol, %0,25 fıstık yağı, %1,0 stearik asit veya %0,5 palmitik asidin melanin biyosentezini artırdığı; ancak Tween 80’in ise melanin oluşumunu önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir (Wu et al., 2018). *Actinoalloteichus* sp. MA-32 ile melanin üretiminde %1 nişasta, glukoz, fruktoz, maltoz, sukroz, laktoz gibi karbon kaynaklarının varlığında en yüksek melanin üretimi nişasta kullanıldığında (125,04 ug/mL) elde edilmiştir (Manivasagan et al., 2013). *B. subtilis* 4NP-BL ile 1 g/L tirozin içeren ISP-4 ortamında melanin üretiminde nişasta, glukoz, fruktoz ve maltoz gibi karbon kaynaklarının varlığında en yüksek melanin üretimi maltoz kullanıldığında (664,4 ug/mL) elde edilmiştir (Ghadge et al., 2020).



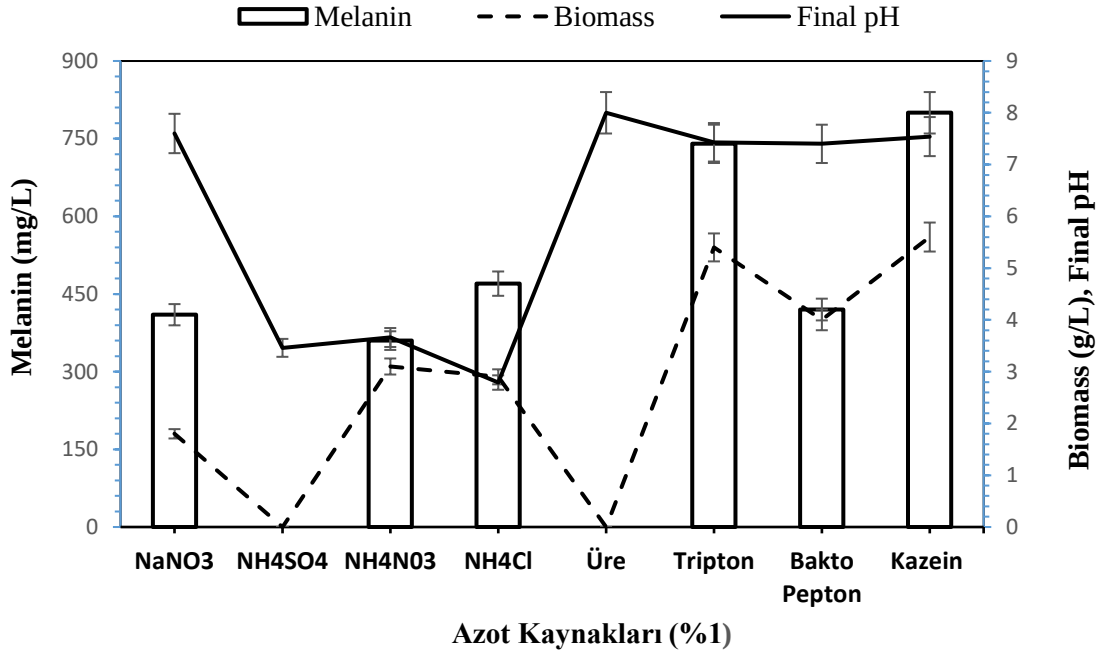
Şekil 8. Glukoz konsantrasyonlarının melanin, biyomas ve son pH'a etkisi

Pigment üretimine azot kaynaklarının etkisi

Şekil 9'da görüldüğü gibi en yüksek melanin üretimi azot kaynağı olarak kazein kullanıldığında (800 mg/L) elde edilmiştir. En fazla biyomas oluşumu kazein varlığında (5,6 g/L) elde edilmiştir. Çalışmanın bundan sonraki bölümlerinde azot kaynağı olarak kazein kullanılmıştır. Üre ve NH_4SO_4 kullanıldığında çok az biyomas elde edilmiştir ve fungusun büyümesine engelleyici bir etki göstermiştir. Ortam pH'ı farklı azot kaynaklarında 2,8 ile 8,0 arasında değişkenlik göstermiştir. En yüksek pH ürenin olduğu besiyerinde, en düşük pH NH_4Cl olduğu besiyerinde ölçülmüştür.

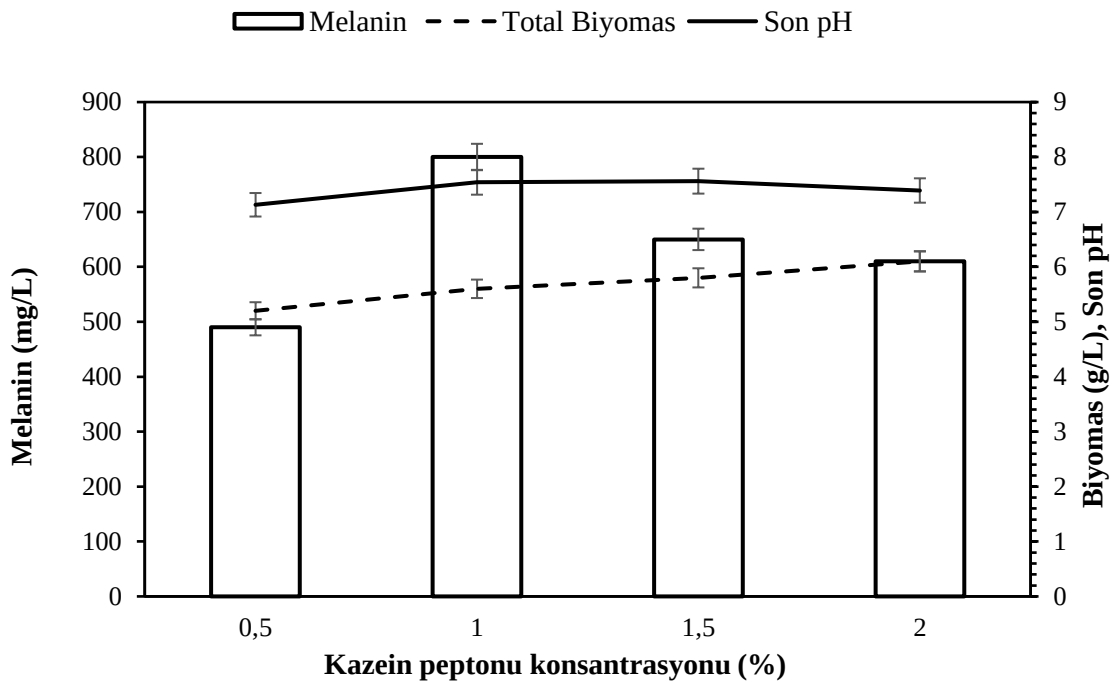
P. chrysogenum ile melanin üretiminde %2,0 konsantrasyonunda pepton, maya özütü, sodyum nitrat, amonyum sülfat ve amonyum nitrat gibi çeşitli organik ve inorganik azot kaynakları kullanıldığında optimum melanin üretimi maya özütü kullanıldığında elde edilmiştir (El-Batal et al., 2017). *Actinoalloteichus* sp. MA-32 ile melanin üretiminde %1 pepton, maya özütü, kazein, malt ekstrakt, KNO_3 gibi azo kaynaklarının varlığında en yüksek melanin üretimi kazein kullanıldığında (128,68 $\mu\text{g/mL}$) elde edilmiştir (Manivasagan et al., 2013). *B. subtilis* 4NP-BL ile 1 g/L tirozin içeren ISP-4 ortamında melanin üretiminde sodyum nitrat, KNO_3 , amonyum sülfat, et ekstraktı, beef ekstrakt, peptone, kazein varlığında en yüksek melanin üretimi sodyum nitrat kullanıldığında (902 $\mu\text{g/mL}$) elde edilmiştir (Ghadge et al., 2020). *A. pullulans* ile yapılan melanin üretimi çalışmasında optimum şartlar pH 7, 30 °C, %3 sükröz, %

3,5 peptone ve 7. günün sonunda 550 mM melanin üretimi gerçekleşmiştir (El-Gamal et al., 2017).



Şekil 9. Azot kaynaklarının melanin üretimi, biyomas ve son pH üzerine etkisi

Şekil 10'da görüldüğü gibi en yüksek melanin üretimi %1 kazein kullanıldığında (800 mg/L) elde edilmiştir. En fazla biyomas oluşumu %2 kazein konsantrasyonunda (6,1 g/L) elde edilirken en düşük biyomas %0,5 kazein kullanıldığında (5,6 g/L) elde edilmiştir. En yüksek son pH, %1 kazein konsantrasyonunda 7,54 olarak ölçülmüştür.

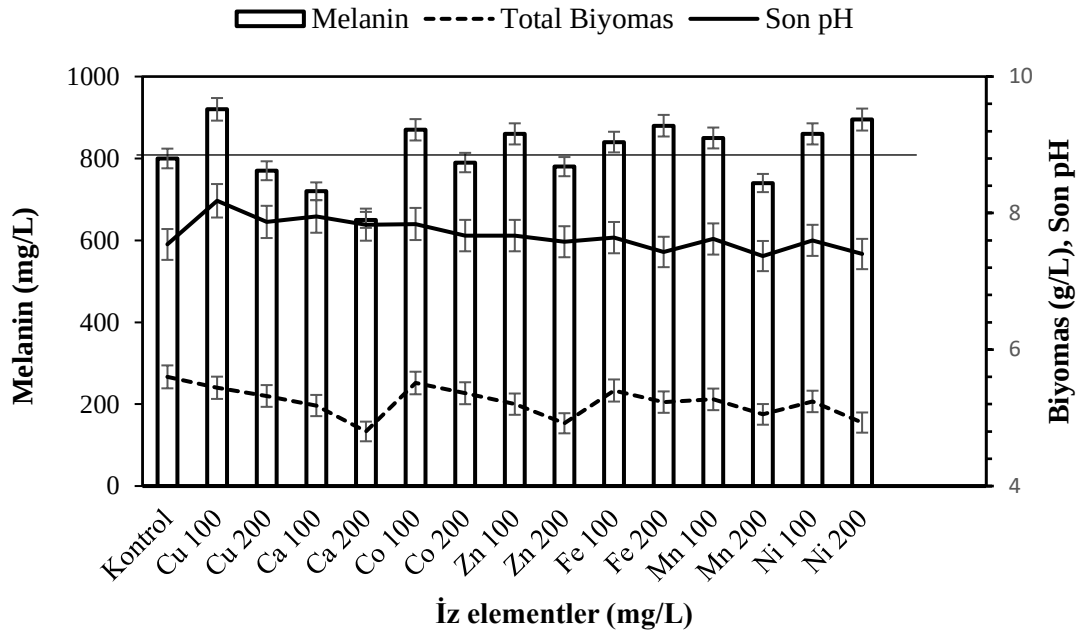


Şekil 10. Kazein konsantrasyonlarının melanin üretimi, biyomas ve son pH üzerine etkisi

Pigment üretimine metal tuzlarının etkisi

Şekil 11’de görüldüğü gibi en yüksek melanin üretimi 100 mg/L Cu kullanıldığında (900 mg/L) elde edilmiştir. Bunun yanında Cu, Fe, Co, Ni, Mn ve Zn tuzlarının melanin pigment üretimini teşvik ettiği belirlenmiştir. Ca tuzunun ise melanin üretimini kontrol grubuna göre azalttığı belirlenmiştir. Kullanılan tuzlar içerisinde en düşük biyomas (4,8 g/L) 200 mg/L Ca varlığında tespit edilmiştir. Bu ortamlarda pH değişimleri 7,37-8,1 arasında olduğu görülmüştür.

Ortama 50-350 mg/L Cd(II) eklenmesi *Exophiala pisciphila*’da melanin üretimini artırmıştır (Zhan et al., 2011). Ayrıca mantar melanin içeriğinin Pb(II) ilavesiyle arttığı da belirlenmiştir (Ban et al., 2012) CuSO₄, FeSO₄, ZnSO₄ ve MnSO₄ gibi metal tuzlarının 0,2 mM konsantrasyonunda sırasıyla Cu⁺², Fe⁺², Mn⁺² ve Zn⁺²’nin *P. chrysogenium* melanin üretimini artırmıştır (El-Batal et al., 2017). *Auricularia auricula* fungusu ile yüzey yanıt metoduyla yapılan çalışmada optimal ortam bileşiminin %26,80 (v/v) buğday kepeği ekstresi, 1,59 g/L L-tirozin ve 0,11 g/L CuSO₄ olduğu ve maksimum melanin veriminin 519,54 mg/L olduğu bulunmuştur (Zou and Hou, 2017). Bu çalışmada da Cu, Co, Zn, Fe, Mn ve Ni’nin melanin üretimini artırdığı belirlenmiştir. Çalışılan heriki konsantrasyonda da Ca’nın melanin üretimi üzerine olumlu bir katkısı olmadığı belirlenmiştir.

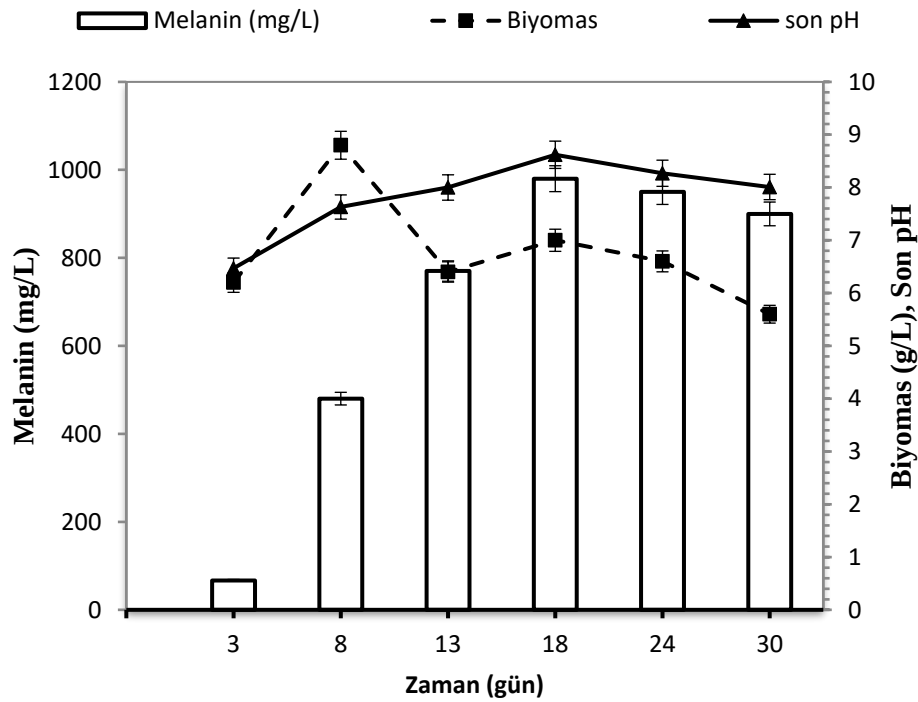


Şekil 11. Metal Tuzlarının melanin üretimi, biyomas ve son pH’a etkisi

Pigment üretimine inkübasyon süresinin etkisi

Şekil 12’de zamanın pigment üretimine etkisi belirlenmiştir. En iyi melanin pigment üretimi 18. günde 980 mg/L olmuştur. 18. günden sonra pigment üretimi, son pH ve biyomas azalmaya başlamıştır.

En yüksek melanin üretimi için optimum inkübasyon süresi, bakteri, maya ve fungus türlerine göre farklılık göstermektedir. *Nocardiopsis alba* ile optimum melanin üretimi 144. saatte elde edilmiştir (Kiran et al., 2014). *Actinoalloteichus sp.* MA-32 ile melanin üretimi 120. saatte gerçekleşmiştir (Manivasagan et al., 2013). Ali et al., (2011), *Streptomyces virginiae* tarafından melanin oluşumunun inkübasyon periyodunun 10. gününde maksimum pigment oluşumu seviyesine ulaşıldığını ve ardından yavaş yavaş azaldığını ölçmüştür. Benzer şekilde Rani et al., (2013), *Hortaea werneckii*'nin inkübasyon süresinin 8. gününde maksimum melanin üretimi elde etmişlerdir. Bir endofitik mantar olan *Spissiomycetes endophytica* ile en yüksek melanin üretimi glukoz maya özütü pepton ortamında, 6,0'lık bir başlangıç pH değerinde ve üç haftalık inkübasyonda 25 °C'de gözlenmiştir (Suwannarach et al., 2019). *Amorphotheca resinae* KUC3009 ile pepton maya ekstraktı glikoz (PYG) sıvı besiyerinde (20 g/L glikoz, 10 g/L pepton ve 5 g/L maya ekstraktı) maksimum melanin üretimi 14. günde elde edilmiştir (Oh et al., 2020). Bu çalışmada da maksimum melanin üretimi 18. günde elde edilmiştir.



Şekil 12. Farklı zamanların melanin üretimi, biyomas ve son pH'a etkisi

Spissiomycetes endophytica ile yapılan çalışmada en yüksek mantar pigmenti verimi, 25°C'de, glukoz maya özü pepton ortamında, 6,0'lık bir başlangıç pH değerinde ve üç haftalık kültivasyon boyunca gözlenmiştir. Sonuçlar, sıvı ortamın, başlangıç pH'sının ve sıcaklığın mantar melanin üretimini etkilediğini ortaya koymuştur (Suwannarach et al., 2019).

Actinoalloteichus sp.'den melaninin izolasyonu ve karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmada melanin optimum olarak pH 7-9'da ve 45 - 60 °C sıcaklıkta en iyi üretimi

gerçekleştirilmiştir. *Actinoalloteichus* sp. MA- 32 ile melanin üretimi nişasta içeren ortamda (125,04 µg/mL) glukoza (113,29 µg/mL) göre daha fazladır. Melanin üretimini kazein ve pepton gibi nitrojen kaynakları da önemli ölçüde etkilenmiştir. Kazeinin, melanin üretimi için iyi bir nitrojen kaynağı olduğu belirlenmiştir (128,68 µg/mL). Test edilen çeşitli karbon ve azot kaynakları arasında nişasta ve kazeinin melanin üretimi için en uygun substratlar olduğu bulunmuştur. Optimize edilmiş ortamda 180 saate kadar inceleme yapılmış 120 saatlik inkübasyonda 97 µg/mL'lik maksimum melanin üretimine ulaşılmıştır (Manivasagan et al., 2013).

Ophiocordyceps sinensis'ten üretilen melaninin karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmada maksimum misel kuru ağırlığı 25. günde 23,45 g/L olarak ölçülmüştür. Durağan faz sadece 2 gün sürmüş ve yakında ölüm aşamasına dönülmüştür. Ortamdaki melanin 15. günde tespit edilebilmiş ve ardından melanin üretimi 35. güne kadar artmış ve sonra melanin üretimi sabit kalmıştır. Ortamın başlangıç pH değeri 7,8'e yükselmiştir. (Dong and Yao, 2012).

Melanin Pigmentinin Saflaştırılması

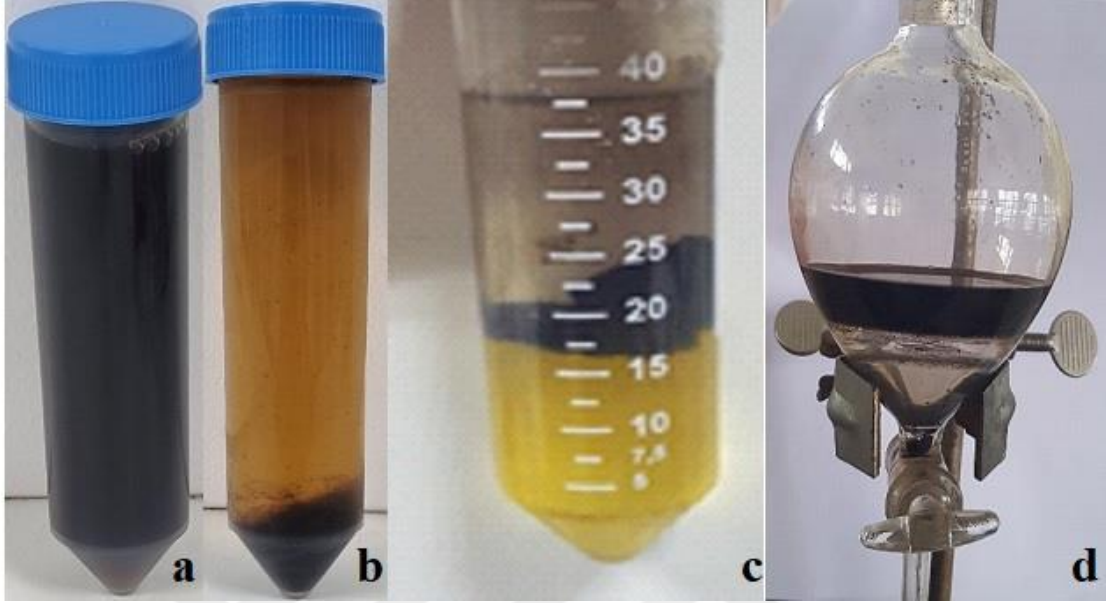
Bu çalışmada KOH ile pigmentin çözünürlüğü sağlanmış ve HCl ile pigmentin çöktürülerek geri kazanılması sağlanmıştır. Geri kazanılan melanin HCl ortamında kaynatılarak içeriğindeki istenmeyen bileşiklerin yapıtaşlarına parçalanması sağlanmış ve organik çözücüler kullanılarak melanin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.

Melanin ekstraksiyonu ve saflaştırma prosedürlerinin seçimi, büyük ölçüde melanin kaynağına (mantar, bakteri, hayvan veya insan kılı), lokalizasyona (hücre içi/hücre dışı) ve çalışmanın nihai amacına bağlıdır (Pralea et al., 2019).

Melaninler genellikle diğer hücresel bileşenlere sıkı sıkıya bağlı olduklarından, melaninin saflaştırılması zor olabilir. Melanin ekstraksiyonlarının çoğu, 1 M NaOH (Selvakumar et al., 2008; Wang and Rhim, 2019), 1 M KOH veya 0,5 M NH₄OH (Ye et al., 2014) ile su banyosunda veya otoklavda geri akışla alkaline muamelesini içerir.

Çok sayıda çalışma sert hidrolitik ekstraksiyonlar melaninlerin asit muamelesinde, özellikle de geniş dekarboksilasyon yoluyla önemli ölçüde ayrıştığını göstermiştir. Proteinlerin, karbonhidratların, lipidlerin ve diğer biyolojik bileşenlerin melanin ile yakın ilişkisinin yok edilmesi, birkaç saat boyunca kaynayan asitler veya bazlar ve ardından çöktürünün ardışık yıkama aşamaları kullanılarak gerçekleştirilir. Melanin saflaştırması 2 saat kadar 2M HCl ile kaynatıldıktan sonra sırasıyla kloroform, etil asetat, aseton veya mutlak etanol (Hu et al., 2015; Xin et al., 2015; Sun et al., 2016) gibi organik çözücüler ile ardışık yıkama aşamaları ile gerçekleştirilir.

Bu çalışmada biyomastan KOH ile pigmentin çözünürlüğü sağlanmış ve HCl ile pigmentin çökeltilerek geri kazanılması gerçekleştirilmiştir. Geri kazanılan melanin HCl ortamında kaynatılarak içeriğindeki bileşiklerin yapıtaşlarına parçalanması sağlanmış ve organik çözücüler kullanılarak melanin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir (Şekil 13).



Şekil 13. Melanin pigmentinin saflaştırılması a) Fermentasyon sıvısı, b) HCl ile çöeltme, c) Kloroform ile yağların uzaklaştırılması, d) Etanol ile ayırma

Melanin Pigmentinin Çözünürlüğü

Elde edilen saf melanin kloroform, etanol, etil asetat, aseton, su, NaOH, KOH, DMSO (Dimetil sülfoksit), Tris tamponu gibi çözücülerde test edildiğinde NaOH, KOH, DMSO, Tris tamponunda çözünmüştür. Kloroform, etanol, etil asetat, aseton ve suda çözünmediği belirlenmiştir (Tablo 5). Pigment alkali ortamlarda çözünürken (pH 8 ve üzerinde), asidik ortamda (pH 2 ve aşağısında) çökelindiği gözlenmiştir. Birçok çalışmada benzer sonuçlar belirtilmiştir (Suwannarach et al., 2019; Dullah et al., 2021; Mujdeci, 2021). Melaninler, dirençli kimyasal özelliklere sahiptir. Yapısındaki heterojenlik ve birçok farklı monomerlerden oluşması karakterizasyonunu zorlaştırır. Yüksek çözünmezliği ve karmaşık kimyasal yapıları melanin araştırmalarındaki ilerlemenin önündeki iki engeldir (Selvakumar et al., 2008).

Tablo 5. Saflaştırılan Melaninin Çözünürlülüğü

Çözücü	Çözünürlük	Çözücü	Çözünürlük
Kloroform	-	Tris tamponu (pH 8)	+
Etanol	-	KOH (1M)	+
Etil asetat	-	NaOH (1M)	+
Aseton	-	HCl (1N)	-
DMSO	+	Saf su	-

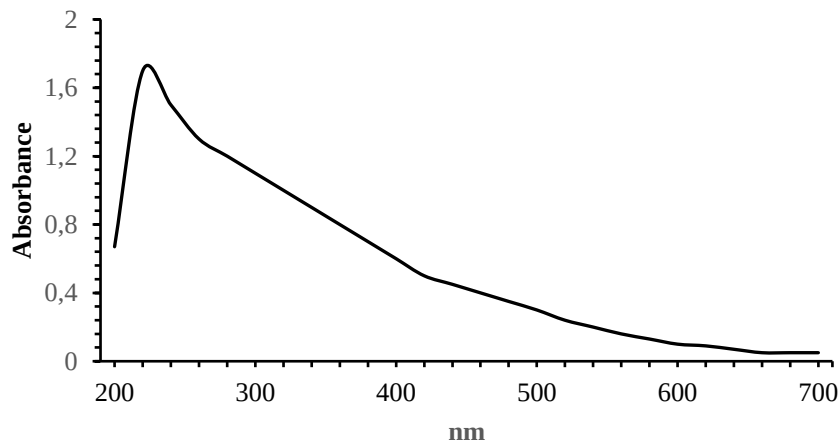
Mantar Pigmentinin Tespiti ve Miktar Tayini

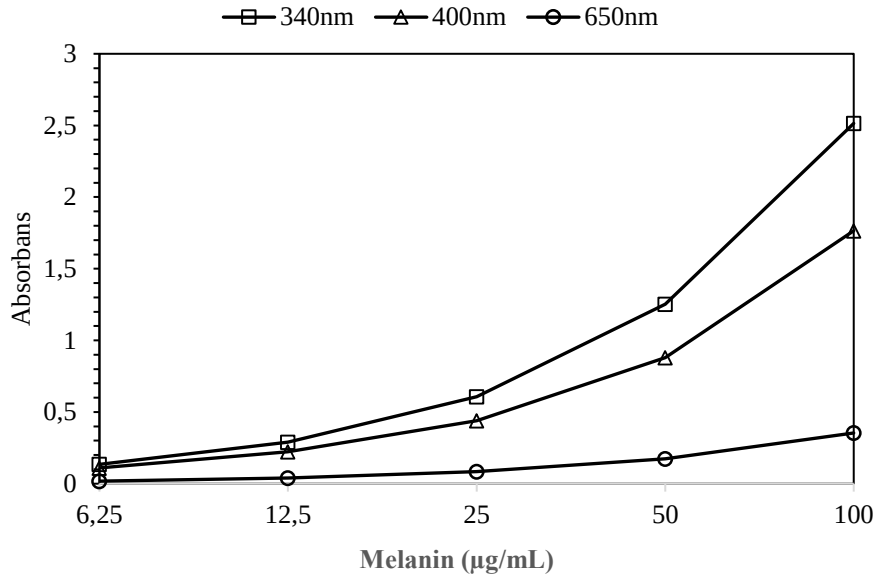
Spektroskopik analiz

S. musae'den elde edilen melanin pigmenti 190-700 nm arasında taranmış ve en yüksek absorbans 220 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 14). Farklı mantar kaynaklardan ekstrakte edilen melaninlerin UV-Vis spektrumları *Auricularia auricula* için 215 nm (Zhang et al., 2015), *Boletus griseus* için 214 nm (Liu et al., 2018), *Inonotus hispidus* için 212 nm (Hou et al., 2019) ve *Pleurotus cystidiosus* var. *formosensis* için 280 nm (Selvakumar et al., 2008) olarak belirlenmiştir.

Melaninin UV-görünür absorpsiyon spektrumu, esas olarak, bir ön aşamada ekstrakte edilen pigmenti tanımlamak ve karakterize etmek için kullanılmıştır.

Çoğu melanin türü için, alkali çözeltilerin maksimum absorpsiyon dalga boyu, melanin kaynağına bağlı olarak 196- 300 nm arasında değişir. Alkali melanin çözeltileri, UV bölgesinde, daha uzun dalga boylarına doğru kademeli olarak azalan güçlü bir optik absorbans sergiler. Melaninin yüksek UV ışığı absorpsiyonu yapısındaki kompleks konjuge moleküllerden kaynaklanmaktadır (El-Naggar and El-Ewasy, 2017; Hou et al., 2019).

**Şekil 14.** Saflaştırılan melaninin spektroskopik analizi

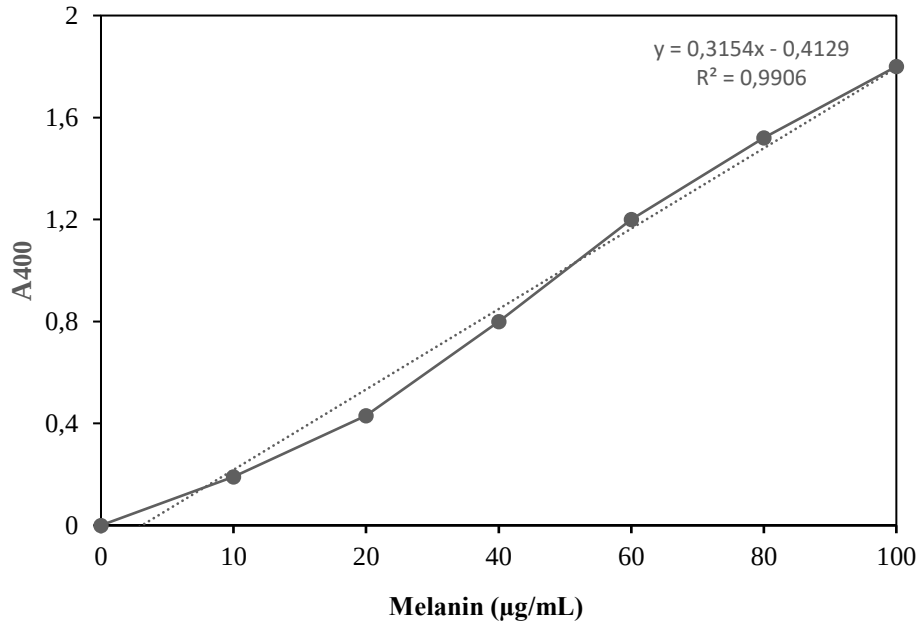


Şekil 15. Saflaştırılan melaninin spektrofotometrik sonuçları

Saflaştırmadan sonra elde edilen mantar pigmenti UV ile görülebilen absorpsiyon spektrumu, 340, 400 ve 650 nm dalga boylarında bir UV-görünür spektrofotometre ile 1 mol/L KOH çözeltisinde ölçüldü (Şekil 15). Daha önceki çalışmalarda da 400 nm melanin konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılmıştır (Wu et al., 2018; Ghadge et al., 2020; Liu et al., 2021).

Saf Melaninin Standart Çalışması

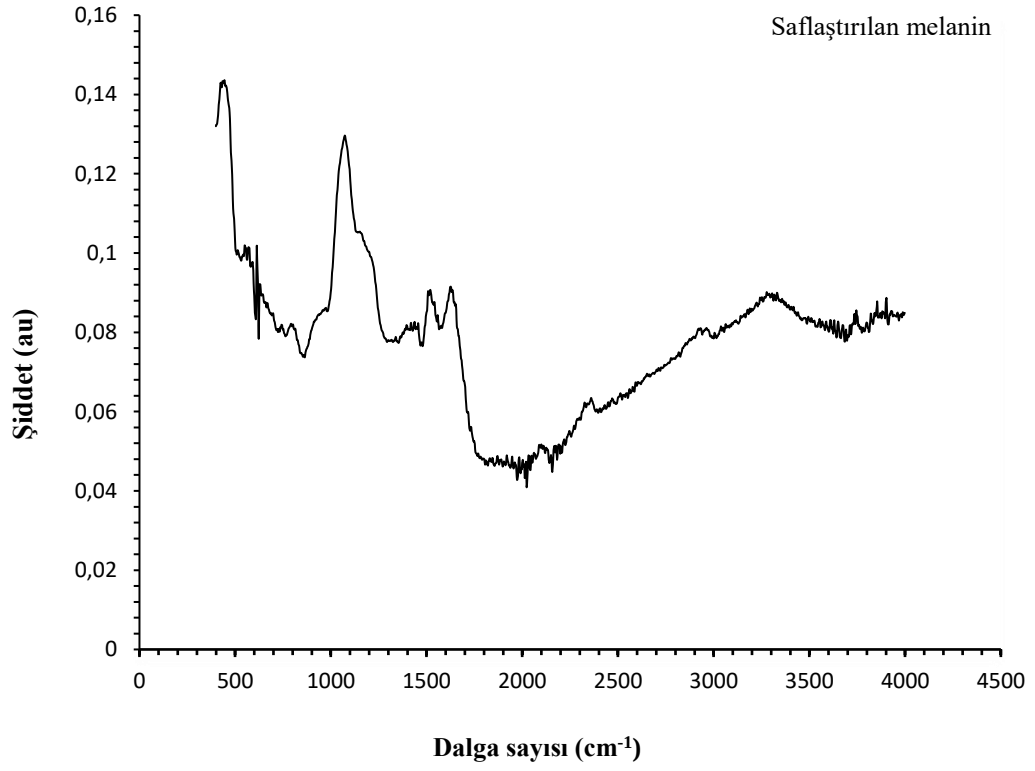
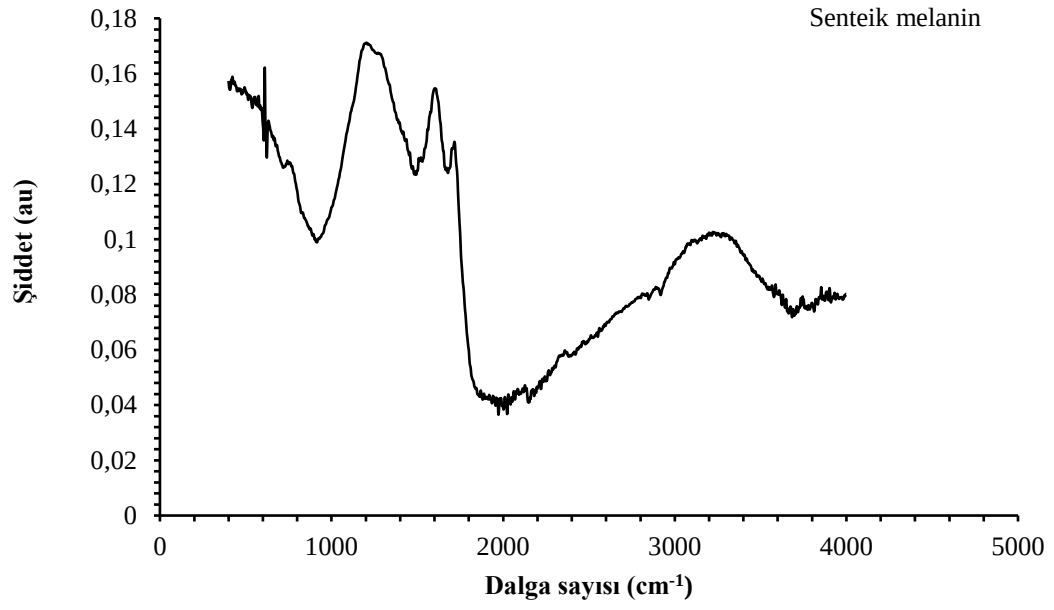
Sentetik melaninin (10-100 µg/mL) 6 seri dilüsyonunun 400 nm absorbansına dayalı olarak, kantifikasyonu için doğrusal bir standart eğri ($y = 0,3154x - 0,4129$, $R^2 = 0,9906$) elde edilmiştir (Şekil 16).



Şekil 16. Saflaştırılan melaninin standart çalışması

FT-IR analizi

FT-IR, bileşikteki ana fonksiyonel gruplar hakkında bilgi sağlar. Sentetik ve saflaştırılan melanin pigmentinin analizi Şekil 17’de gösterilmiştir. $873,72\text{ cm}^{-1}$ civarındaki pik, aromatik C-H grubundan kaynaklanmaktadır. $1,225\text{--}950\text{ cm}^{-1}$ ve $900\text{--}670\text{ cm}^{-1}$ arasında birkaç bandın oluşması, sırasıyla düzlemde ve düzlem dışı bükülmede aromatik CH ile ilişkilidir. $1,420$ ile $1,310\text{ cm}^{-1}$ arasındaki bantlar, 1207 cm^{-1} ’deki bandın yanı sıra fenol grubuna da karşılık gelebilir. $3600 - 3200\text{ cm}^{-1}$ spektral bölgeler arasında geniş bir absorpsiyonun, karboksilik asidin O-H ve N-H germe titreşimlerine ve indolik ve pirolük sistemlerde bulunan fenolik ve aromatik amino fonksiyonlarına atfedilir. $1631,73\text{ cm}^{-1}$ ‘de ve $1451,14$ ile $1315,41\text{ cm}^{-1}$ arasında gözlenen pikler, C=O ve/veya COO– grupları ve OH fenolik grupları ile konjuge aromatik C=C halkasının titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 3400 cm^{-1} civarında geniş absorbans görünümü –OH ve –NH₂ gruplarının varlığına işaret ederken, $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ bölgesindeki pik alkil grubunun varlığına işaret eder. $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ ve $\sim 1538\text{ cm}^{-1}$ pikler, asimetrik ve simetrik gerilmeye sahip karboksilik grubun (–COOH) göstergesidir (Amin et al., 2018; Ben Tahar et al., 2020; Ghadge et al., 2020).



Şekil 17. Melaninlerin FTIR analizi

Elemental analiz

Sentezlenen melaninin elemental analizi ile C, H, N ve S miktarları sırasıyla %4,18, %5,977, %7,045 ve %0,075 olarak belirlenmiştir (Tablo 6). Saflaştırılmış melaninin yüksek C/H oranından dolayı birçok aromatik yapılar içerdiği söylenebilir (Ghadge et al., 2020).

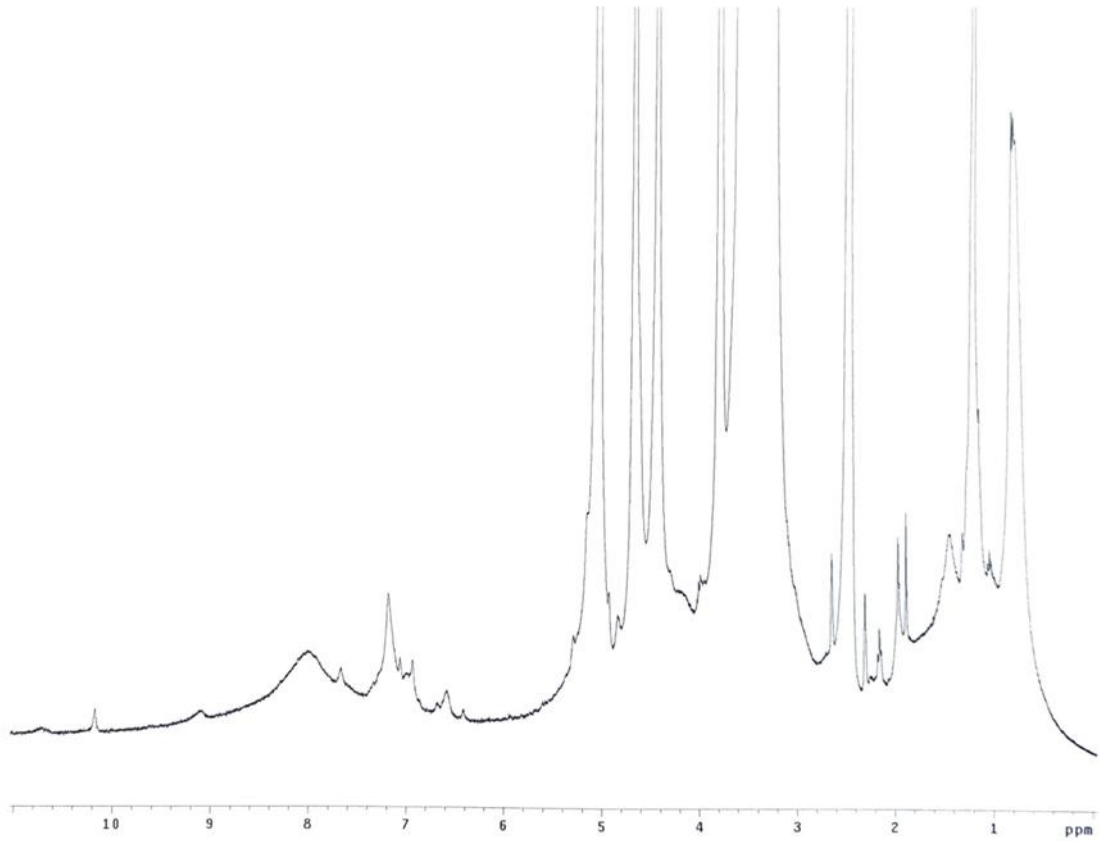
Tablo 6. Melaninlerin Elemental Bileşenleri

Mikroorganizma	C	H	N	S	Kaynak
<i>B. subtilis</i> 4NP-BL	41,7	6,56	8,57	0,98	(Ghadge et al., 2020)
<i>Klebsiella</i> sp. GSK	47,9	6,9	12,0	0,9	(Sajjan, 2010)
<i>Auricularia polytricha</i>	42,12	7,14	8,70	-	(Zheng et al., 2019)
<i>Amorphotheca resinae</i>	52,7	4,6	6,9	0,8	(Oh et al., 2020)
<i>Phoma</i> sp	56,71	5,15	0,62	-	(Surendrakumar et al., 2022)
<i>Lachnum</i> sp.	50,79	3,832	-	0,778	(Xu et al., 2020)
<i>Auricularia auricula</i>	44,29	4,63	8,49	0,94	(Sun et al., 2016)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	60,37	3,44	7,68	0,69	(Kurian and Bhat, 2018)
<i>Ochroconis lascauxensis</i>	55,2 ± 1,4	6,2 ± 0,2	5,7 ± 0,3	0,5 ± 0,1	(De la Rosa et al., 2017)
<i>Ochroconis tshawytschae</i>	54,6 ± 1,2	6,2 ± 0,1	6,9 ± 0,5	0,5 ± 0,1	
<i>Ochroconis anomala</i>	56,5 ± 1,5	n.d.	5,6 ± 0,4	n.d.	
<i>Scolecobasidium (Ochroconis) musae</i>	48,18	5,977	7,045	0,075	Bu çalışma

n.d.: belirtilmemiş

NMR

Melanin içinde yapısal düzenlemenin varlığını doğrulamak için ¹H-NMR kullanılmıştır. (Şekil 18) 0,8 ve 1,00 ppm arasındaki rezonanslar CH₂CH₃ ve CH(CH₃)₂ gibi alkil fragmanlarına atanabilir. 1,0 ile 3,00 ppm arasındaki rezonanslar, indol ile bağlantılı bir NH-grubunun varlığına atanabilir. 2,2 ve 2,8 ppm'deki sinyaller metilen gruplarına atanır. 3,4 ve 4,4 ppm arasındaki pikler, nitrojen ve/veya oksijen atomlarına bağlı metil veya metilen gruplarına bağlı protonlara atanabilir. 4,5 ve 5,2 ppm arasındaki rezonanslar, melanin polimerlerindeki C=C gruplarının anomerik protonlarına atanmıştır. 8,0 ve 6,0 ppm arasındaki rezonanslar, melaninin aromatik fonksiyonel gruplarından kaynaklanır ve özellikle aromatik bölgedeki 7,286 ve 7,21'deki rezonanslar, indolün aromatik hidrojenine ve/veya melanin polimer zincirlerinin pirol halkalarına bağlanabilir. Melanin parçasının 8,00 ppm'de singlet piki -NH gruplarının varlığını ispatlamaktadır (Katritzky et al., 2002; Amin et al., 2018; Wang et al., 2019).



Şekil 18. *S. musae*’den saflaştırılan melaninin NMR analizi

Saflaştırılan Pigmentin Biyoaktiviteleri

Melaninin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi

Doğal ürünler yeni antibiyotik ajanlarının önemli kaynağı olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada saflaştırılan melaninin 3 Gram negatif ve 2 Gram pozitif bakteriye karşı antibakteriyal aktivitesi çalışılmıştır. En fazla antibakteriyal aktivite *B. cereus*’a karşı elde edilmiştir (Tablo 7).

Table 7. *S. musae* Melanin’inin Antimikrobiyal Aktivitesi

Konsantrasyon (µg/mL)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
100	1,6	1,2	1,4	1,3	1,7
50	1,2	1,1	1,2	1,2	1,5
25	0,9	0,8	0,9	0,7	1,2
12,5	-	-	-	-	1
Gentamisin	1,8	2,0	1,9	2,1	2,0

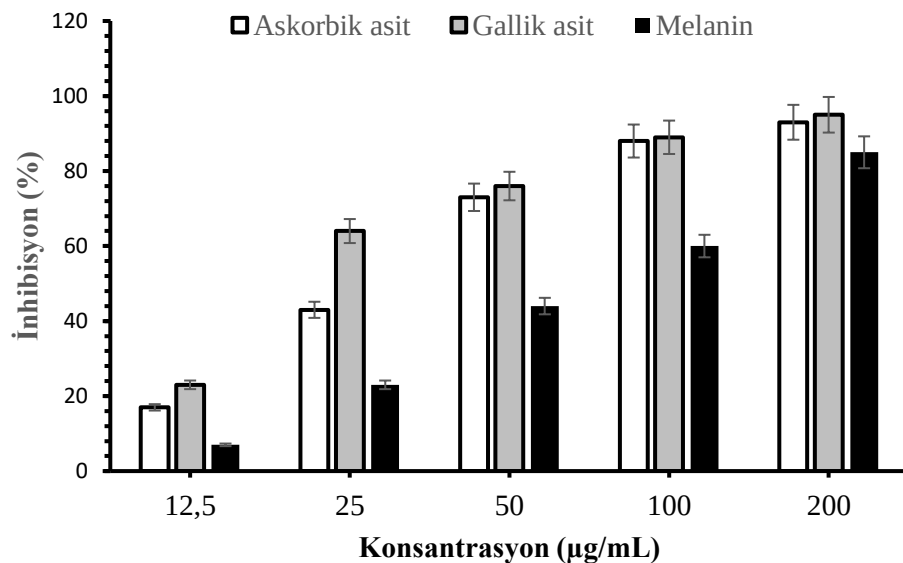
Daha önceki çalışmalarda da melaninin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Ghadge et al., 2020). Disk difüzyon yöntemiyle yapılan çalışmada *B. subtilis*’ten elde edilen melaninin *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Mycobacterium*

smegmatis, *Xanthomonas campestris* ve *Alteromonas macleodii* bakterilerine karşı melaninin antibakteriyal aktivitesi gösterilmiştir. Barretto and Vootla (2020), agar kuyucuk difüzyon yöntemiyle yaptıkları çalışmada *Cryptococcus rajasthanensis*'den elde edilen melaninin *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal aktivitelerini göstermişlerdir. Başka bir çalışmada *P. balearica*'dan elde edilen melaninin *S. aureus*, *E. chrysanthemi*, *E. carotovora*, *E. coli* ve *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir (Zerrad et al., 2014). *Streptomyces sp.* (MVCS13) melaninin balık patojenlerine (*Aeromonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Vibrio*) karşı etkili olduğu bulunmuştur (Sivaperumal et al., 2014).

Melaninin antioksidan aktivitesi

Saflaştırılan melaninin DPPH inhibisyonu standart gallik asit ve askorbik asit ile karşılaştırılmıştır. IC₅₀ değeri standart gallik asit için %32,9, askorbik asit için %34,2 ve melanin için %83,3 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Gallik asit ve askorbik asit konsantrasyonlarına benzer olarak artan melanin konsantrasyonlarında da DPPH süpürme etkisi artmıştır (Şekil 19).

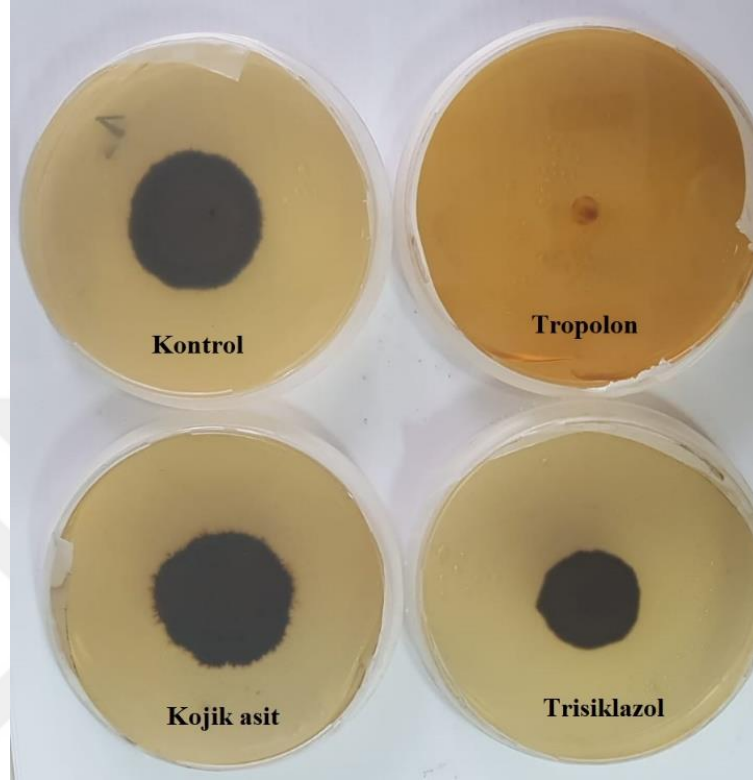
B. subtilis 4NP-BL'den saflaştırılan melaninin IC₅₀ değeri 37,17 µg/mL iken askorbik asitin IC₅₀ değeri 38,83 µg/mL olarak belirlenmiştir (Ghadge et al., 2020). *A. bridgeri*'den elde edilen melaninin IC₅₀ değeri 54,12 µg/mL iken askorbik asidin IC₅₀ değeri 40,28 µg/mL olarak belirlenmiştir (Kumar et al., 2011). *Ophiocordyceps sinensis*'den elde edilen melaninin IC₅₀ değeri 18,51 µg/mL iken α-tocopherol ün IC₅₀ değeri 40 µg/mL olarak belirlenmiştir (Dong and Yao, 2012). *Phoma sp.*'den saflaştırılan melaninin IC₅₀ değeri 69 µg/mL iken askorbik asitin IC₅₀ değeri 41 µg/mL olarak belirlenmiştir (Surendirakumar et al., 2022).



Şekil 19. *S. musae* melaninin DPPH serbest radikal süpürücü aktivitesi

İnhibitörler kullanılarak fungal melanin sentez yolunun belirlenmesi

Çalışmada DOPA yolunu inhibe eden kojik asit ve tropolon ile DHN melanin yolunu inhibe eden trisiklazol ve ftalit PDA besiyerine 50 µg/mL konsantrasyonda ilave edilerek melanin inhibisyonuna bakılmıştır (Şekil 20).



Şekil 20. Melanin inhibitörleri uygulaması

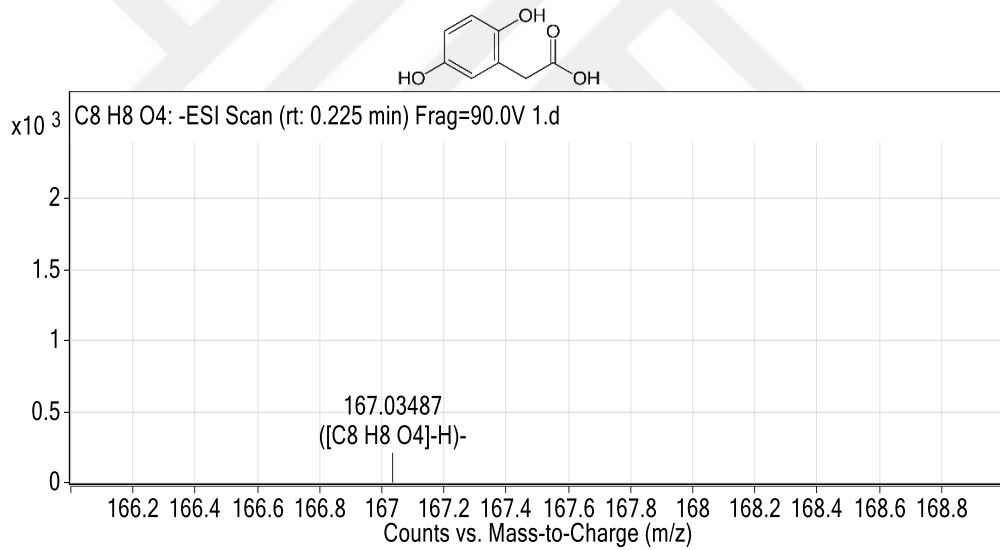
Enzim inhibitörü analizi, bileşiklerin doğal biyosentezinde yer alan bilinmeyen yolları veya anahtar enzimleri keşfetmek için dolaylı; fakat faydalı bir yaklaşımdır. Farklı mantarlardaki melanin sentez yollarını incelemek için, farklı mantarlarda melanin biyosentezini inhibe etmek için çeşitli bileşikler kullanılmıştır. Örneğin, kojik asit ve tropolon, *Aspergillus niger*, *A. tamarii* ve *A. flavus* tarafından melanin sentezinin L-DOPA melanin yolunu inhibe etmek için kullanılmıştır. Trisiklazol ve ftalid, sırasıyla *A. terreus* ve *A. tubingensis* tarafından melanin sentezinin DHN melanin yolunu inhibe etmek için kullanılmıştır (Pal et al., 2013). *Spissiomycetes endophytica* ile yapılan melanin inhibisyon çalışmasında tricyclazole and phtalide'in melanin oluşumunu etkili bir şekilde baskıladığı ve sentez yolunun 1,8-DHN yolu olduğu belirlenmiştir (Suwannarach et al., 2019).

Bu çalışmada da inhibitörler *S. musae*'daki melaninin biyosentetik yollarını incelemek için kullanıldı. Kojik asit, trisiklazol ve ftalit melanin sentezini engelleyememesi gerçeği, *Scolecobasidium (Ochroconis)* melaninin DOPA ve DHN öncülerine dayalı olmadığını göstermektedir. Bildiğimiz kadarıyla, *S. musae*'daki bu tip melanin biyosentez yolları daha önce bildirilmemiştir. Benzer şekilde *O. lascauxensis* ve *O. tshawytschae*'ninde kojik asit ve

trisikloazol gibi melanin inhibitörleri varlığında melanin ürettikleri belirlenmiştir (De la Rosa et al., 2017).

Bu sonuç, Ascomycetes'in ağırlıklı olarak DHN yolu aracılığıyla melanin ürettiği; ancak Basidiomycetes'in DOPA yoluyla melanin ürettiğini bulan önceki çalışmalara benzerdir (Huang et al., 2018; Hou et al., 2019). *Auricularia auricula*'da melanin biyosentezi Raper-Mason (ömelanin ve feomelanin) ve DHN yollarını kullanarak sentezlendiği belirlenmiştir (Ma et al., 2022).

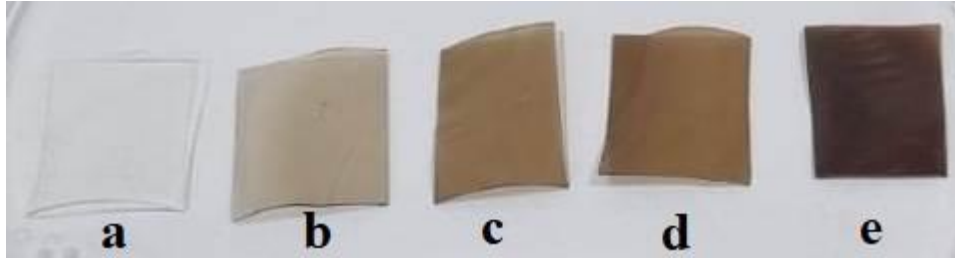
Ayrıca *S. musae* fermentasyon sıvısının ekstraksiyonu sonucunda LC-MS ile ortamda homogensitik asit varlığında belirlenmiştir (Şekil 21). Verilerinin ışığında, *Ochroconis* (*Scolecobasidium*) cinsinin melanin üretiminin 3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA) veya 1,8-dihidroksinaftalin (DHN) yollarıyla olmadığı belirlenmiştir. Homogentisik asit ve diğer fenolik bileşiklerin polimerizasyonuna dayanan bir çeşit piyomelanin olabileceği ileri sürülmektedir (Saiz-Jimenez et al., 2021). Bu verilere dayanarak *S. musae* melaninin piyomelanin tipte olabileceği öne sürülmüştür.



Şekil 21. *S. musae* fermentasyon sıvısında homogensitik asit varlığının LC-MS ile belirlenmesi

Uv Koruyucu Film Özellikleri

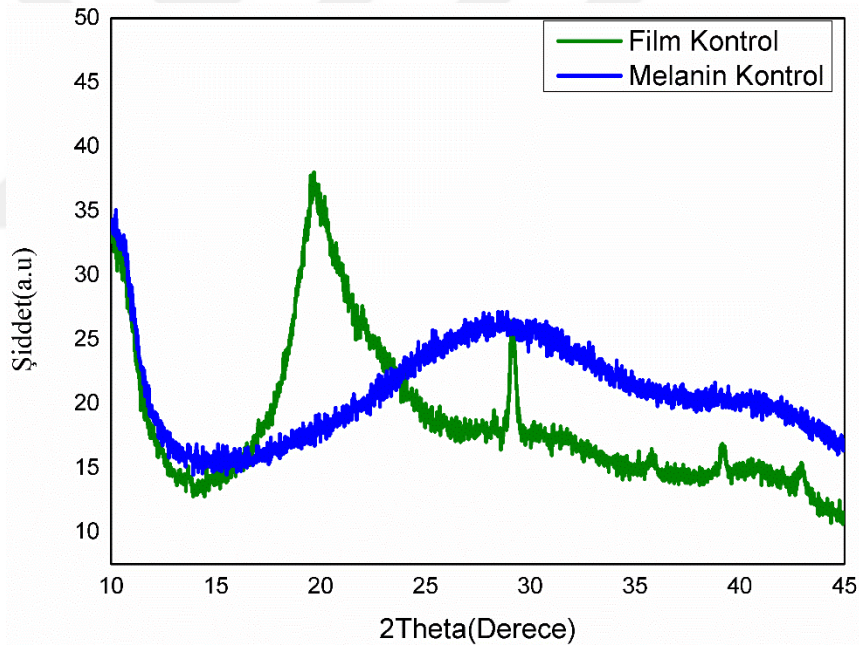
Melanin içermeyen PVA/gliserol film renksiz şeffaf iken melanin eklenmiş filmler melanin konsantrasyonuna bağlı olarak koyulaştığı görülmüştür. Ağırlıkça %4 melanin içeren film daha koyu renkte elde edilmiştir (Şekil 22). Elde edilen filmlerin aynı zamanda esnek yapıda olduğu belirlenmiştir.



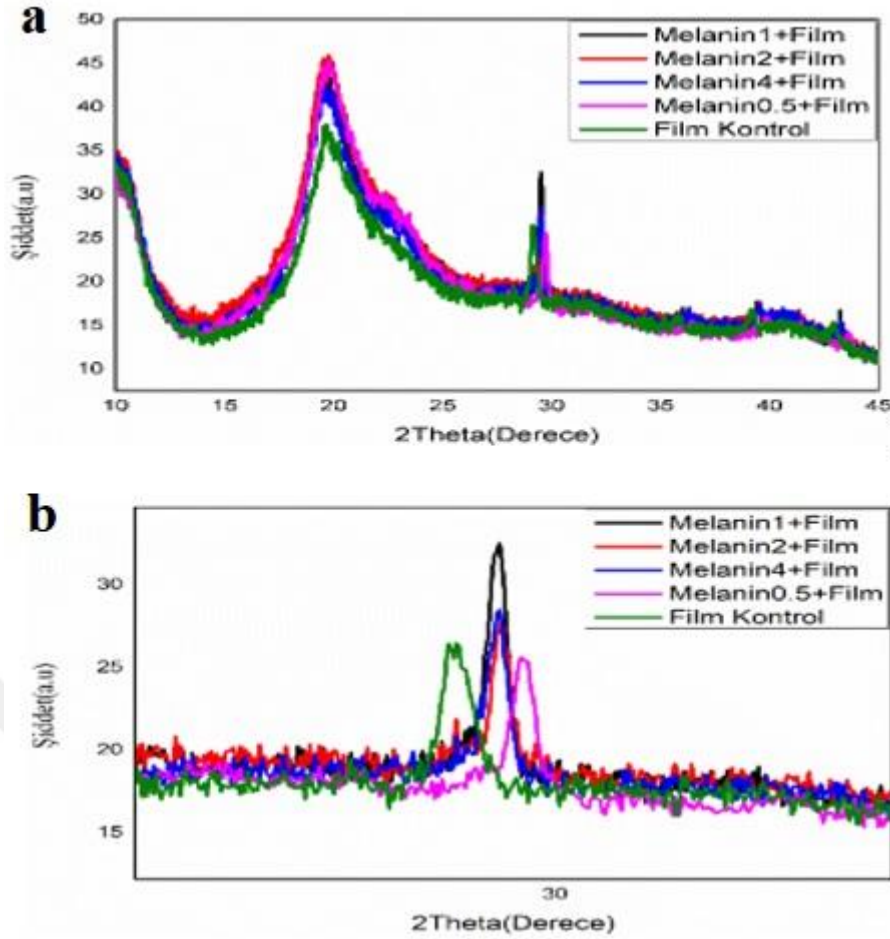
Şekil 22. PVA/Gliserol- melanin film görüntüleri a) Kontrol, b) %0,5 melanin, c) %1 melanin, d) %2 melanin, e) %4 melanin

Üretilen melanin ve PVA-Glyseol XRD analizi

Şekil 23’de melanin kontrol ve film kontrol numunesinin XRD kırınım desenlerinden görüleceği üzere melanin pigment yapısının 28.95 derecede yayvan bir pike sahip olduğu görülmektedir, bu pik nanopartikül oluşumunu göstermektedir. Film kontrol numunesi ise 19.74 de yayvan bir pik 29,25 derecede küçük FWHM (tam genişlik yarı yükseklik) değerine sahip bir pik vermiştir. Ayrıca 35, 39 ve 42 derecede görece küçük pikler mevcuttur. XRD kırınım deseninden anlaşılabacağı üzere düzgün yapısal kristal oluşumları mevcuttur.



Şekil 23. Melanin kontrol ve film kontrol numunesinin XRD kırınım desenleri



Şekil 24. a) Melanin pigmentlerinin farklı oranlarda film numunesine katkılanması sonucunda elde edilen XRD kırınım desenleri b) ayrıntılı XRD sonuçları

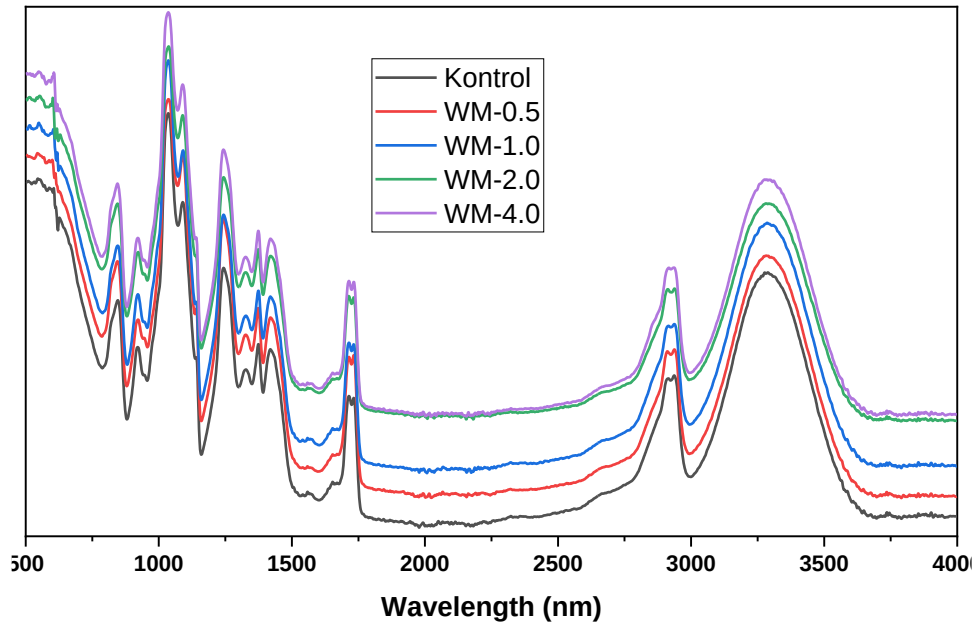
Şekil 24a'da melanin nanopartikül pigmentlerinin farklı oranlarda film kontrol numunesine katkılanması sonucunda elde edilen XRD kırınım desenleri görülmektedir. Şekil 24b'de katkılamanın daha ayrıntılı XRD deseni görülmekte olup yapıya katılan melanin pigmentine yüzdelik oranına göre yapıdaki değişimler daha net görülmektedir. Özellikle 28,25 derecede görülen pikte katkı oranına göre pik daha büyük açılara kaymıştır. Özellikle %0,5 ve %1 oranında katkılama hem pik küçük açılara kaymış hem pik şiddeti artmıştır. Ayrıca %2 ve %4 oranında katkılama pik büyük açılara kaymıştır; fakat iki katkı oranında aynı yapısal değişimi göstermiş olup katkıda doyuma ulaşmıştır. $D = (k \lambda / \beta \cos \theta)$ (k ; sabit, β ; FWHM radyan değeri, θ ; kırınım açısı, $\lambda=1.54 \text{ \AA}$, gelen ışığın dalga boyu) Debye–Scherrer denkleminde göre daha büyük açılara kayan piklerin kristal boyutlarının küçüldüğünü söylemek mümkündür. Tane boyutlarının küçülmesi yüzey aktivitesinin artması olarak da değerlendirilebilir. Daha önceki çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Wang et al., 2015; Zhang et al., 2020).

Üretilen melanin ve PVA-Glyseol Filmlerinin FTIR analizi

Farklı PVA filmlerinin FTIR analizi ($4000\text{-}500 \text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında) gerçekleştirilmiştir (Şekil 25). C–H asimetric ve C–H simetric esneme titreşimleri, sırasıyla

2937,87 cm^{-1} ve 2912,76 cm^{-1} 'deki bantlarla temsil edilir. C=C grubu esneme titreşimleri 1574,88 cm^{-1} bandına atanmıştır. Hazırlanan filmde normal alkanın C—H gerilmesi ve bükülmesi 2925 cm^{-1} ve 1403 cm^{-1} 'e kaymıştır. Gliserol spektrumlarından, 1234 ve 1337 cm^{-1} 'deki tepe frekansları, ikincil alkolün C—H deformasyon titreşiminin özellikleridir. 1086 ve 1024 cm^{-1} 'de gözlemlenen bantlar, C-O esneme titreşimine atıfta bulunan kristalleşmeye duyarlı bantlar olarak tanındı. 2955, 1264 ve 668 ve 1096 cm^{-1} 'de görülen pikler sırasıyla PVA'nın C—H esneme, C—H esneme ve C—O esneme bantlarına atfedilir (Roy and Rhim, 2019; Łopusiewicz et al., 2021).

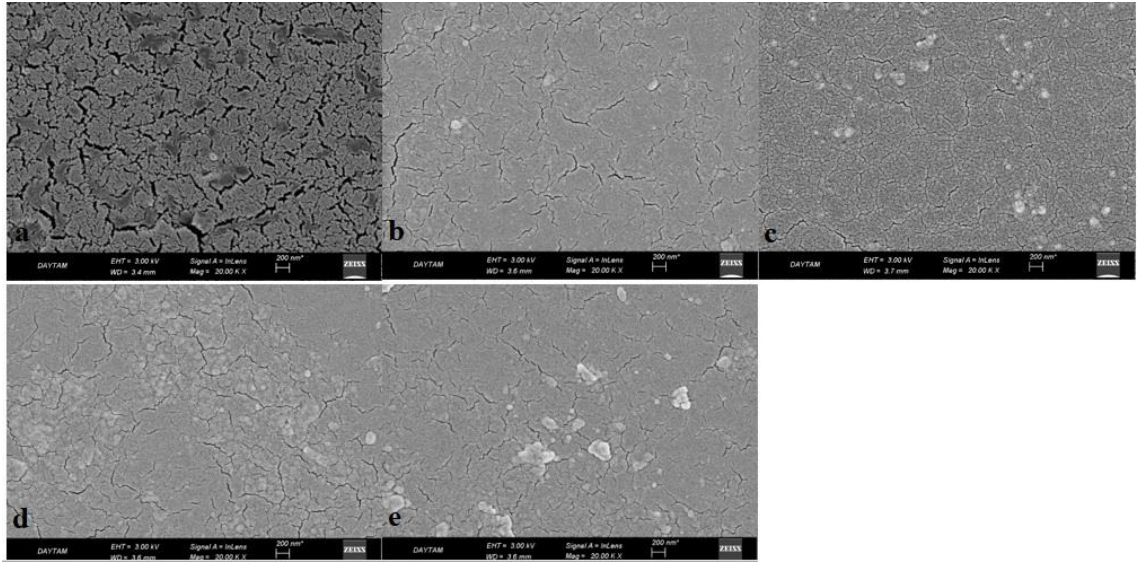
Kompozit filmlerde, düzgün PVA-gliserol filme kıyasla daha yüksek veya daha düşük yoğunluklarda benzer tepe ve tepe konumlarında hafif değişiklikler gözlemlendi. Piklerin yoğunluğundaki değişiklik ve piklerdeki bazı kaymalar, melanin ile PVA-gliserol arasındaki fiziksel etkileşimlerden kaynaklanıyor olabilir. Genel olarak, melanin içeren kompozit filmde fonksiyonel gruplarda bir değişiklik olmamıştır, bu da melanin ilavesiyle PVA-gliserolün yapısının değişmediği anlamına gelmektedir. Benzer olarak da FTIR spektrumunun tepe konumunda değişiklik olmayan sonuçlar, karagenanın kimyasal bileşiminin melanin ile karıştırılarak değişmediğini; ancak melanin ile karagenan arasındaki fiziksel etkileşime bağlı olarak yoğunlukta bir değişiklik gözlemlenmiştir (Roy and Rhim, 2019).



Şekil 25. Melanin katkılı PVA-Glyseol filmlerinin FTIR analizi

Üretilen melanin ve PVA-Gliserol SEM analizi

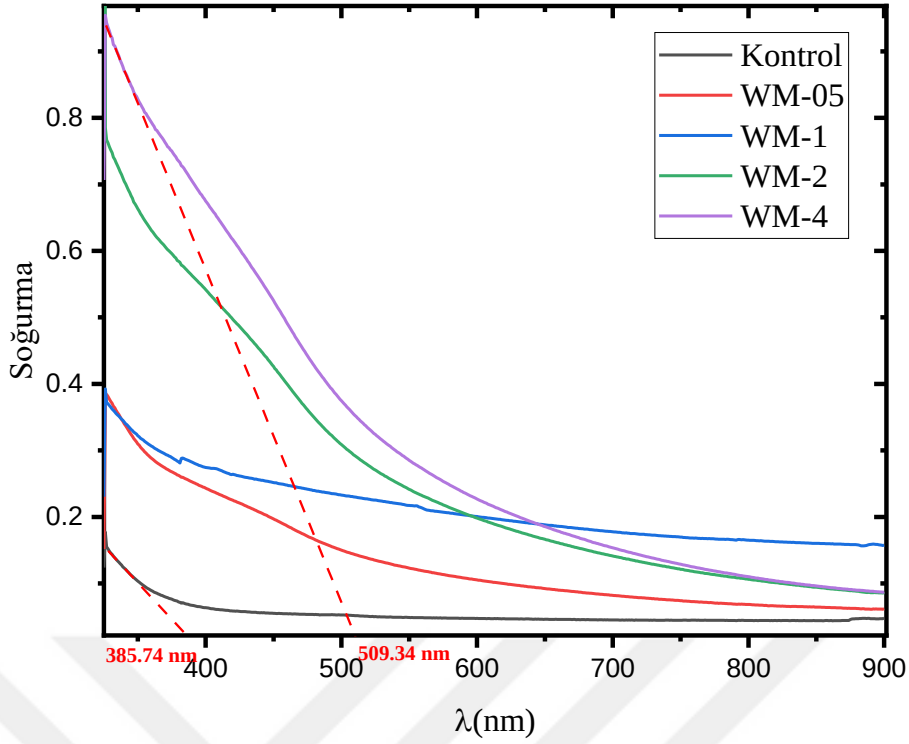
SEM tarafından görüntülenen PVA-gliserol/melanin kompozit filmlerin nano yapısı, Şekil 26'da gösterilmektedir. Üretilen kompozit filmleri sağlam ve herhangi bir belirgin kusur olmadan pürüzsüz yüzeylidir. Temiz kompozit filmin yüzeyi pürüzsüz; ancak yer yer çatlaklar mevcuttur. Düşük konsantrasyonda melanin (ağırlıkça %0,5) eklendiğinde polimer matrisinde topaklanma olmadan iyi dağılmaktadır; ancak yüksek melanin konsantrasyonunda (%4,0) eklenen melanin miktarı ile orantılı olarak topaklanmalar oluşmaktadır. Genel olarak, biyo-nanokompozit filmlerde, melanin nano yapısı polimer matrisindeki yapısal boşlukları yüksek düzeyde doldurma özelliğine sahip olduğundan dolayı, polimer matriste nano doldurucu agregatları oluşturur (Roy and Rhim, 2019; Liang et al., 2023).



Şekil 26. SEM tarafından gözlemlenen PVA-gliserol/melanin kompozit filmlerin mikro yapısı. a) Kontrol, b) %0,5 melanin, c) %1 melanin, d) %2 melanin, e) %4 melanin

UV-Vis absorpsiyon spektrumları

Üretilen numunelerin UV-Vis absorpsiyon spektrumları Şekil 27'de gösterilmektedir ve yaklaşık $\lambda=326,05$ nm merkezli asimetrik görünüme yakın bant ortaya koymaktadır. Pigment konsantrasyonu arttıkça, numunelerin görünür aralıktaki absorpsiyonlarının arttığı gözlenmiştir. Pigment konsantrasyonunun artışıyla, yaklaşık 385.74 nm'lik bir kesme dalga boyuna sahip olan geniş görünür bant, Tablo 8'de gösterildiği gibi daha büyük bir dalgaboyuna, 509,34 nm'ye artmaktadır. Pigment konsantrasyonu arttıkça kırmızıya kayma gözlenmektedir.

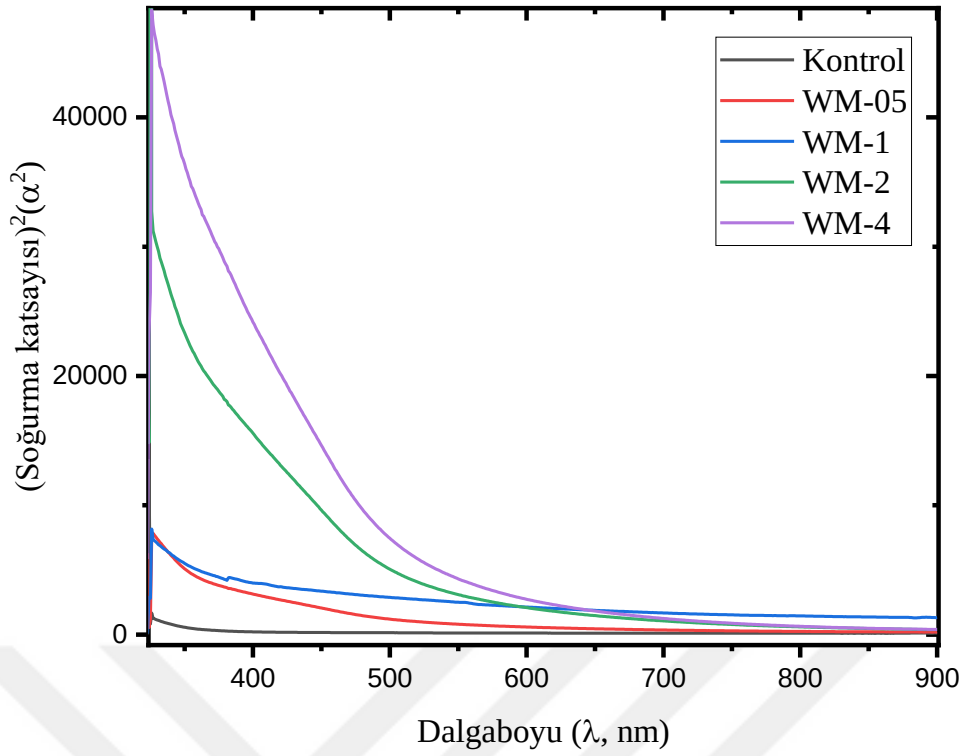


Şekil 27. Üretilen örneklerin UV-Vis absorpsiyon spektrumları

İncelenmekte olan pigment katkılı numuneler için optik enerji bandı boşlukları, Tauc yöntemi (Kavaz et al., 2020) kullanılarak hesaplanmıştır ve optik absorpsiyon katsayısı $\alpha(\nu)$, aşağıdaki denklem kullanılarak elde edilmiştir (Abouhaswa et al., 2019);

$$\alpha(\nu) = 2.303 \left(\frac{A}{d} \right) \quad (5)$$

Burada A ve d, sırasıyla absorbans ve cm cinsinden numune kalınlığına karşılık gelmektedir. Şekil 28’de $\alpha(\nu)^2$ ’nin artan pigment konsantrasyonu ile arttığını ve artan pigment içeriği ile daha uzun dalga boylarına (kırmızıya kayma) doğru kaydığı görüldüğü gibi, absorpsiyon katsayısının karesini $\alpha(\nu)^2 \cdot \lambda \text{nm}$ ’nin bir fonksiyonu olarak ortaya koymaktadır.



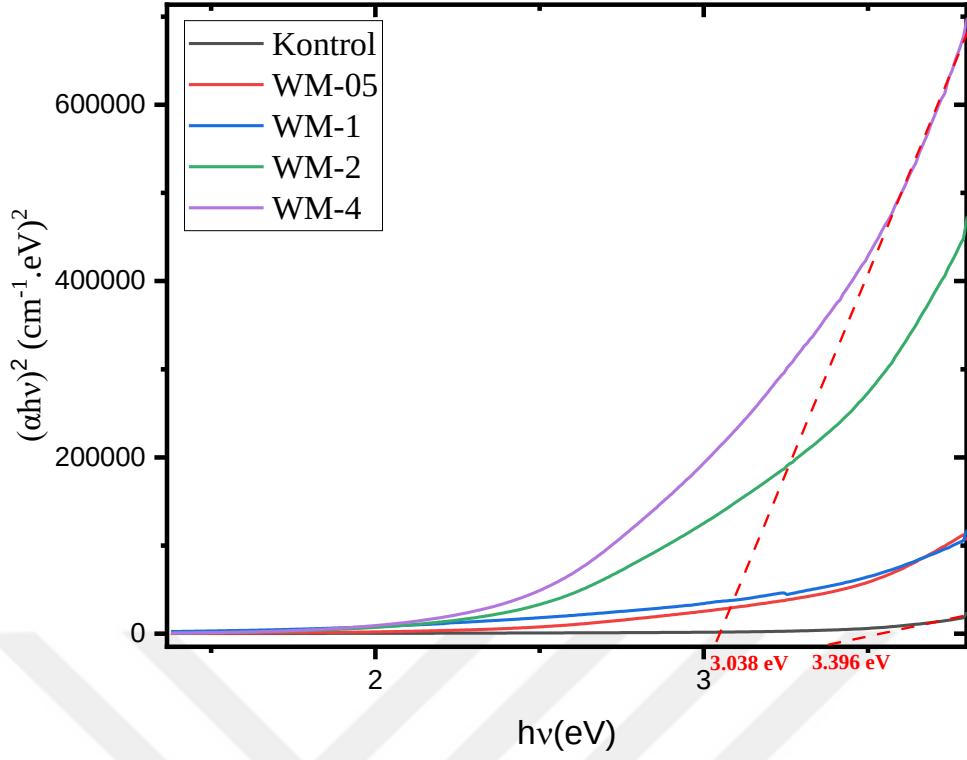
Şekil 28. Hazırlanan numunelerin $\lambda(\text{nm})$ 'nin bir fonksiyonu olarak soğurma katsayısının karesinin $\alpha(v)^2$ değişimi

Mott ve Davis, optik enerji bant aralığını tahmin etmek için aşağıda verilen denklemi kullanmışlardır. Bu çalışmada da bant aralıkları aynı denklemle hesaplanmıştır (Choi, 2021; Davis and Mott, 1970; Abouhaswa et al., 2019).

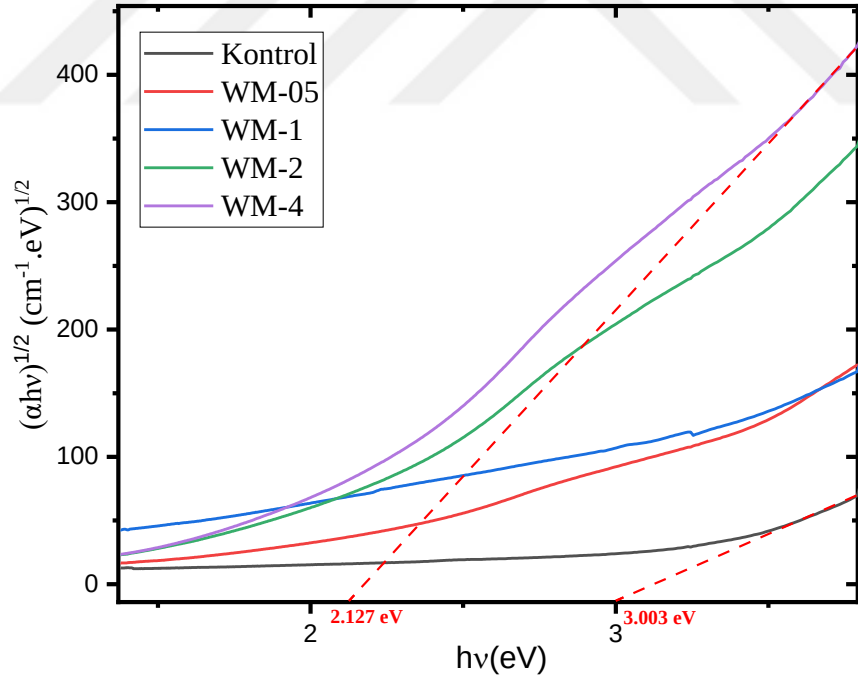
$$(\alpha(v)hv)^m = C(hv - E_{\text{optical}}) \quad (6)$$

Burada hv gelen fotonun enerjisidir ve C bir sabittir. Elektronik geçişin doğası, güç (m) ile gösterilir; burada, doğrudan izin verilen geçiş için $m=2$ ve dolaylı izin verilen geçiş için $m=0.5$ 'dir.

İncelenen numuneler için doğrudan ve dolaylı izin verilen geçiş için $(\alpha hv)^2$ ve $(\alpha hv)^{1/2}$ 'nin (hv) 'ye bağımlılığı Şekil 29 ve 30'da gösterilmektedir. Artan pigment ikame oranı ile Tablo 8'de görüldüğü gibi, optik enerji aralığının E_{opt} doğrudan izinli geçiş durumunda 3,396'dan 3,038 eV'ye ve dolaylı izinli geçiş durumunda 3.003'den 2,127 eV'ye düşmektedir. Şekil 29'da gösterilen absorpsiyon grafiğindeki kırmızıya kayma her geçişte azalan optik enerji aralığının nedeni olabilir.



Şekil 29. Hazırlanan numunelerin (hv) 'nin bir fonksiyonu olarak soğurma katsayısının karesinin $(\alpha hv)^2$ değişimi



Şekil 30. Hazırlanan numunelerin (hv) 'nin bir fonksiyonu olarak soğurma katsayısının karesinin $(\alpha hv)^{1/2}$ değişimi

Tablo 8. Numunelerin Optik Özellikleri

Numune	λ_{cutoff} (nm)	E_g direct (eV)	E_g indirect (eV)
Kontrol	385.74	3.396	3.003
WM-05	422.03	3.158	2.608
WM-1	482.65	3.122	2.235
WM-2	488.04	3.100	2.170
WM-4	509.34	3.038	2.127

Daha önceki çalışmalrda da melanin pigment içerikli filmler UV koruyucu olarak değerlendirilmiştir (Wang et al., 2018; Roy et al., 2020; Yang et al., 2020)

SONUÇLAR

1. Araştırmada çamaşır makinasından izole edilen MO-7 izolatının 18S rRNA gen analizi ile tür teşhisi yapılarak %99,86 benzerlikle *Scolecobasidium musae* olduğu tespit edildi.
2. En yüksek melanin pigment üretim ortamı karbon kaynağı olarak %1,5 glikoz, azot kaynağı olarak %1 kazein ve 100 mg/L Cu eklenmesiyle belirlendi ve 30 °C, pH 7'de 18 günlük inkübasyon süresi sonunda 980 mg/L melanin elde edildi.
3. *S. musae*'den elde edilen melanin pigmenti 190-700 nm arasında taranmış ve en yüksek absorbans 220 nm olarak belirlendi.
4. Saflaştırılan melaninin organik çözücülerde iyi çözünmezken alkali çözücülerde iyi çözüldüğü tespit edildi.
5. Saflaştırılan melaninin antioksidan ve antibakteriyal özelliklere sahip olduğu belirlendi.
6. *S. musae* melanin pigmentinin bir tür piyomelanin olabileceği ön görüldü.
7. Sentezlenen melaninin kimyasal karakterizasyonu FTIR, XRD, NMR ve elemental analizleri yapılarak yapısı belirlendi. Sentezlenen melaninin elemental analizi sonucu C, H, N ve S miktarları sırasıyla %4,18, %5,977, %7,045 ve %0,075 olarak tespit edildi.
8. Üretilen PVA/glisero1 melanin katkı1 filmin FTIR, XRD ve SEM analizleri ile filmin yapısı ortaya konuldu. Üretilen filmin UV koruyucu özellikte olduğu belirlendi.

Öneriler

1. Bu mantarın iyi pigment üretebilmesi için ortam koşullarına dikkat edilmelidir.
2. Toplam biyomas ile ilgili kayıp olmaması için santrifüj işlemlerine dikkat edilmelidir. Saflaştırma basamaklarına dikkat edilmeli ve işlem basamakları sırasıyla yapılmalıdır.
3. Saflaştırılan melanin ile farklı polimerler kullanılarak UV koruyucu filmler elde edilebilir.

KAYNAKLAR

- Abbott, E. V., 1927. *Scolecobasidium*, A New Genus of Soil Fungi. *Mycologia*, 19, 29–31.
- ABE, N., Hamada, N., 2011. Molecular Characterization and Surfactant Utilization of *Scolecobasidium* Isolates from Detergent-Rich Indoor Environments. *Biocontrol Science*, 16, 139–147.
- Abouhaswa, A.S., Rammah, Y.S., Ibrahim, S.E., El-Mallawany, R., 2019. Optical and Electrical Properties of Lead Borate Glasses. *Journal of Electronic Materials*, 48, 5624–5631.
- Aghajanyan, A.E., Hambardzumyan, A.A., Minasyan, E. V., Tsaturyan, A.H., Paloyan, A.M., Avetisyan, S. V., Hovsepyan, A.S., Saghyan, A.S., 2022. Development of the technology for producing water-soluble melanin from waste of vinary production and the study of its physicochemical properties. *European Food Research and Technology*, 248, 485–495.
- Ahmad, S., Lee, S.Y., Khan, R., Kong, H.G., Son, G.J., Roy, N., Choi, K., Lee, S.-W., 2017. Identification of a Gene Involved in the Negative Regulation of Pyomelanin Production in *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 1692–1700.
- Albano, L.G.S., Paulin, J.V., Trino, L.D., Fernandes, S.L., Graeff, C.F. de O., 2019. Ultraviolet-protective thin film based on PVA–melanin/rod-coated silver nanowires and its application as a transparent capacitor. *Journal of Applied Polymer Science*, 136, 47805.
- Almeida-Paes, R., Frases, S., Araújo, G. de S., de Oliveira, M.M.E., Gerfen, G.J., Nosanchuk, J.D., Zancopé-Oliveira, R.M., 2012. Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the *Sporothrix* complex in the presence of L-tyrosine. *applied and environmental microbiology*, 78, 8623–8630.
- Almeida-Paes, R., Frases, S., Fialho Monteiro, P.C., Gutierrez-Galhardo, M.C., Zancopé-Oliveira, R.M., Nosanchuk, J.D., 2009. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. *Microbes and Infection*, 11, 554–562.
- Amin, S., Rastogi, R.P., Sonani, R.R., Ray, A., Sharma, R., Madamwar, D., 2018. Bioproduction and characterization of extracellular melanin-like pigment from industrially polluted metagenomic library equipped *Escherichia coli*. *Science of The Total Environment*, 635, 323–332.
- Anitha, R., Murugesan, K., 2008. Melanin production in *Alternaria helianthi*. *Archives Of Phytopathology and Plant Protection*, 41, 360–364.
- Araújo, M., Viveiros, R., Correia, T.R., Correia, I.J., Bonifácio, V.D.B., Casimiro, T., Aguiar-Ricardo, A., 2014. Natural melanin: A potential pH-responsive drug release device. *International Journal of Pharmaceutics*, 469, 140–145.
- Avalos, J., Pardo-Medina, J., Parra-Rivero, O., Ruger-Herreros, M., Rodríguez-Ortiz, R., Hornero-Méndez, D., Limón, M., 2017. Carotenoid Biosynthesis in *Fusarium*. *Journal of Fungi*, 3, 39.
- Bakthavachalu, P., Kannan, S.M., Qoronfleh, M.W., 2020. Food Color and Autism: A Meta-Analysis, pp. 481–504.

- Ban, Y., Tang, M., Chen, H., Xu, Z., Zhang, H., Yang, Y., 2012. The Response of Dark Septate Endophytes (DSE) to Heavy Metals in Pure Culture. *Plos one*, 7, e47968.
- Barman, B.K., Sele Handegård, Ø., Hashimoto, A., Nagao, T., 2021. Carbon Dot/Cellulose-Based Transparent Films for Efficient UV and High-Energy Blue Light Screening. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9, 9879–9890.
- Barron, G.L., Busch, L. V., 1962. Studies on the soil hyphomycete *Scolecobasidium*. *Canadian Journal of Botany*, 40, 77–84.
- Bechtold, T., Turcanu, A., Ganglberger, E., Geissler, S., 2003. Natural dyes in modern textile dyehouses — how to combine experiences of two centuries to meet the demands of the future? *Journal of Cleaner Production*, 11, 499–509.
- Ben Tahar, I., Kus-Liśkiewicz, M., Lara, Y., Javaux, E., Fickers, P., 2020. Characterization of a nontoxic pyomelanin pigment produced by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Progress*, 36.
- Bisht, G., Srivastava, S., Kulshreshtha, R., Sourirajan, A., Baumler, D.J., Dev, K., 2020. Applications of red pigments from psychrophilic *Rhodonellum psychrophilum* GL8 in health, food and antimicrobial finishes on textiles. *Process Biochemistry*, 94, 15–29.
- Braga, G.U.L., Rangel, D.E.N., Fernandes, É.K.K., Flint, S.D., Roberts, D.W., 2015. Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. *Current Genetics*, 61, 405–425.
- Bridelli, M.G., Crippa, P.R., 2010. Infrared and Water Sorption Studies of the Hydration Structure and Mechanism in Natural and Synthetic Melanin. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114, 9381–9390.
- Calvo, M.E., Castro Smirnov, J.R., Míguez, H., 2012. Novel approaches to flexible visible transparent hybrid films for ultraviolet protection. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 50, 945–956.
- Cao, W., Zhou, X., McCallum, N.C., Hu, Z., Ni, Q.Z., Kapoor, U., Heil, C.M., Cay, K.S., Zand, T., Mantanona, A.J., Jayaraman, A., Dhinojwala, A., Deheyn, D.D., Shawkey, M.D., Burkart, M.D., Rinehart, J.D., Gianneschi, N.C., 2021. Unraveling the Structure and Function of Melanin through Synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 143, 2622–2637.
- Casadevall, A., Rosas, A.L., Nosanchuk, J.D., 2000. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current Opinion in Microbiology*, 3, 354–358.
- Cavallini, C., Vitiello, G., Adinolfi, B., Silvestri, B., Armanetti, P., Manini, P., Pezzella, A., D'Ischia, M., Luciani, G., Menichetti, L., 2020. Melanin and Melanin-Like Hybrid Materials in Regenerative Medicine. *Nanomaterials*, 10, 1518.
- Chadni, Z., Rahaman, M.H., Jerin, I., Hoque, K.M., 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, 48–57.
- Chen, J., Wang, C., Shu, C., Zhu, M., Zhou, E., 2015. Isolation and characterization of a melanin from *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight. *European Journal of Plant Pathology*, 142, 281–290.
- Choi, K.-Y., 2021. Bioprocess of Microbial Melanin Production and Isolation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9.
- Çıracı, 2019. *Xanthoria parietina* (L.) th. fr. liken ekstraktının fare deri fibroblast hücre kültürlerinde uv ışınlarına karşı önleyici etkilerinin araştırılması. Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Claus, H., Decker, H., 2006. Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 3–14.
- Coelho, E., Reis, T.A., Cotrim, M., Mullan, T.K., Corrêa, B., 2020. Resistant fungi isolated from contaminated uranium mine in Brazil shows a high capacity to uptake uranium from water, *Chemosphere*, 248, 126068.
- Cordero, R.J.B., 2017. Melanin for space travel radioprotection. *Environmental Microbiology*, 19, 2529–2532.
- Cordero, R.J.B., Casadevall, A., 2017. Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biology Reviews*, 31, 99–112.
- Coyne, V.E., Al-Harthi, L., 1992. Induction of melanin biosynthesis in *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2861–2865.
- d’Ischia, M., Wakamatsu, K., Ciccoira, F., Di Mauro, E., Garcia-Borron, J.C., Commo, S., Galván, I., Ghanem, G., Kenzo, K., Meredith, P., Pezzella, A., Santato, C., Sarna, T., Simon, J.D., Zecca, L., Zucca, F.A., Napolitano, A., Ito, S., 2015. Melanins and melanogenesis: from pigment cells to human health and technological applications. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 28, 520–544.
- Davis, E.A., Mott, N.F., 1970. Conduction in non-crystalline systems V. Conductivity, optical absorption and photoconductivity in amorphous semiconductors. *Philosophical Magazine*, 22, 0903–0922.
- de Hoog, G. S., and J.A. von A., 1973. Revision of *Scolecobasidium* and *Pleurophragmium*. *Kavaka*, 1, 55–60.
- De la Rosa, J.M., Martin-Sanchez, P.M., Sanchez-Cortes, S., Hermosin, B., Knicker, H., Saiz-Jimenez, C., 2017. Structure of melanins from the fungi *Ochroconis lascauxensis* and *Ochroconis anomala* contaminating rock art in the Lascaux Cave. *Scientific Reports*, 7, 13441.
- De Souza, R.A., Kamat, N.M., Nadkarni, V.S., 2018. Purification and characterisation of a sulphur rich melanin from edible mushroom *Termitomyces albuminosus* Heim. *Mycology*, 9, 296–306.
- Dighton, J., Tugay, T., Zhdanova, N., 2008. Fungi and ionizing radiation from radionuclides. *FEMS Microbiology Letters*, 281, 109–120.
- Dong, C., Yao, Y., 2012. Isolation, characterization of melanin derived from *Ophiocordyceps sinensis*, an entomogenous fungus endemic to the Tibetan Plateau. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113, 474–479.
- Downie, L.E., Busija, L., Keller, P.R., 2018. Blue-light filtering intraocular lenses (IOLs) for protecting macular health. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2018.
- Dufossé, L., 2018. Red colourants from filamentous fungi: Are they ready for the food industry? *Journal of Food Composition and Analysis*, 69, 156–161.
- Dullah, S., Hazarika, D.J., Goswami, G., Borgohain, T., Ghosh, A., Barooah, M., Bhattacharyya, A., Boro, R.C., 2021. Melanin production and laccase mediated oxidative stress alleviation during fungal-fungal interaction among basidiomycete fungi. *IMA Fungus*, 12, 33.
- Eisenman, H.C., Casadevall, A., 2012. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 931–940.

- El-Batal, A.I., El-Sayyad, G.S., El-Ghamry, A., Agaypi, K.M., Elsayed, M.A., Gobara, M., 2017. Melanin-gamma rays assistants for bismuth oxide nanoparticles synthesis at room temperature for enhancing antimicrobial, and photocatalytic activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 173, 120–139.
- El-Bialy, H.A., El-Gamal, M.S., Elsayed, M.A., Saudi, H.A., Khalifa, M.A., 2019. Microbial melanin physiology under stress conditions and gamma radiation protection studies. *Radiation Physics and Chemistry*, 162, 178–186.
- El-Gamal; El-Bialy, H.A.; Elsayed, M.A. and Khalifa, M.A., 2017. Isolation and Characterization of melanized yeast form of *Aureobasidium pullulans* and physiological studies on the melanization process. *Nuclear Technology in Applied Science*, 5, 57 : 72.
- El-Naggar, N.E.-A., El-Ewasy, S.M., 2017. Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. *Scientific Reports*, 7, 42129.
- Elsayis, A., Hassan, S.W.M., Ghanem, K.M., Khairy, H., 2022. Optimization of melanin pigment production from the halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* AS1 isolated from solar salter in Alexandria. *BMC Microbiology*, 22, 92.
- Eskandari, S., Etemadifar, Z., 2021. Melanin biopolymers from newly isolated *Pseudomonas koreensis* strain UIS 19 with potential for cosmetics application, and optimization on molasses waste medium. *Journal of Applied Microbiology*, 131, 1331–1343.
- Eskandari, Sahar, Etemadifar, Z., 2021. Biocompatibility and radioprotection by newly characterized melanin pigment and its production from *Dietzia schimae* NM3 in optimized whey medium by response surface methodology. *Annals of Microbiology*, 71, 17.
- Fogarty, R. V., Tobin, J.M., 1996. Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 311–317.
- Forest, S.E., Simon, J.D., 1998. Wavelength-dependent Photoacoustic Calorimetry Study of Melanin. *Photochemistry and Photobiology*, 68, 296–298.
- Funa, N., Funabashi, M., Ohnishi, Y., Horinouchi, S., 2005. Biosynthesis of Hexahydroxyperylenequinone Melanin via Oxidative Aryl Coupling by Cytochrome P-450 in *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology*, 187, 8149–8155.
- Gamal Shalaby, A.S., Ragab, T.I.M., Helal, M.M.I., Esawy, M.A., 2019. Optimization of *Bacillus licheniformis* MAL tyrosinase: in vitro anticancer activity for brown and black eumelanin. *Heliyon*, 5, e01657.
- Gams, W., 2015. An ex-type culture cannot always tell the ultimate truth. *IMA Fungus*, 6, A69–A69.
- Ganesh Kumar, C., Sahu, N., Narender Reddy, G., Prasad, R.B.N., Nagesh, N., Kamal, A., 2013. Production of melanin pigment from *Pseudomonas stutzeri* isolated from red seaweed *Hypnea musciformis*. *Letters in Applied Microbiology*, 57, 295–302.
- Geib, E., Gressler, M., Viedernikova, I., Hillmann, F., Jacobsen, I.D., Nietzsche, S., Hertweck, C., Brock, M., 2016. A Non-canonical Melanin Biosynthesis Pathway Protects *Aspergillus terreus* Conidia from Environmental Stress. *Cell Chemical Biology*, 23, 587–597.

- Ghadge, V., Kumar, P., Singh, S., Mathew, D.E., Bhattacharya, S., Nimse, S.B., Shinde, P.B., 2020. Natural Melanin Produced by the Endophytic *Bacillus subtilis* 4NP-BL Associated with the Halophyte *Salicornia brachiata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 6854–6863.
- Ghattavi, K., Homaei, A., Kamrani, E., Kim, S.-K., 2022. Melanin pigment derived from marine organisms and its industrial applications. *Dyes and Pigments*, 201, 110214.
- Gmoser, R., Ferreira, J.A., Lennartsson, P.R., Taherzadeh, M.J., 2017. Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. *Fungal Biology and Biotechnology*, 4, 4.
- Gowri, P.M., Srivastava, S., 1996. Encapsulation as a response of *Azospirillum brasilense* sp7 to zinc stress. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 12, 319–322.
- Griffith, G.W., Easton, G.L., Detheridge, A., Roderick, K., Edwards, A., Worgan, H.J., Nicholson, J., Perkins, W.T., 2007. Copper deficiency in potato dextrose agar causes reduced pigmentation in cultures of various fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 276, 165–171.
- Hashimoto, K., Fujii, H., Kawakami, Y., 2019. Genetic Identification of Dematiaceous Fungi Isolated from Washing Machine in Japan, and Considering of Fungal Removal Methods. *Biocontrol Science*, 24, 89–96.
- Hayat, R., Din, G., Farooqi, A., Haleem, A., ud Din, S., Hasan, F., Badshah, M., Khan, S., Shah, A.A., 2022. Characterization of melanin pigment from *Aspergillus terreus* LCM8 and its role in cadmium remediation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1-10.
- Heinekamp, T., Thywißen, A., Macheleidt, J., Keller, S., Valiante, V., Brakhage, A.A., 2013. *Aspergillus fumigatus* melanins: interference with the host endocytosis pathway and impact on virulence. *Frontiers in Microbiology*, 3.
- Heo, Y.M., Kim, K., Kwon, S.L., Na, J., Lee, H., Jang, S., Kim, C.H., Jung, J., Kim, J.-J., 2018. Investigation of filamentous fungi producing safe, functional water-soluble pigments. *Mycobiology*, 46, 269–277.
- Hernandez, V.A., Galleguillos, F., Robinson, S., 2016. Fungal pigments from spalting fungi attenuating blue stain in *Pinus* spp. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 107, 154–157.
- Hoda, S., Vermani, M., Joshi, R.K., Shankar, J., Vijayaraghavan, P., 2020. Anti-melanogenic activity of *Myristica fragrans* extract against *Aspergillus fumigatus* using phenotypic based screening. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20, 67.
- Hou, R., Liu, X., Xiang, K., Chen, L., Wu, X., Lin, W., Zheng, M., Fu, J., 2019. Characterization of the physicochemical properties and extraction optimization of natural melanin from *Inonotus hispidus* mushroom. *Food Chemistry*, 277, 533–542.
- Howard, R.J., Ferrari, M.A., 1989. Role of melanin in appressorium function. *Experimental Mycology*, 13, 403–418.
- Hu, W.L., Dai, D.H., Huang, G.R., Zhang, Z.D., 2015. Isolation and Characterization of Extracellular Melanin Produced by *Chroogomphus rutilus* D447. *American Journal of Food Technology*, 10, 68–77.
- Huang, L., Liu, M., Huang, H., Wen, Y., Zhang, X., Wei, Y., 2018. Recent Advances and Progress on melanin-like materials and their biomedical applications. *Biomacromolecules*, 19, 1858–1868.

- Hung, Y.-C., Sava, V., Hong, M.-Y., Huang, G.S., 2004. Inhibitory effects on phospholipase A2 and antivenin activity of melanin extracted from *Thea sinensis* Linn. Life Sciences, 74, 2037–2047.
- Ide, T., Toda, I., Miki, E., Tsubota, K., 2015. Effect of blue light–reducing eye glasses on critical flicker frequency. Asia-Pacific Journal of Ophthalmology, 4, 80–85.
- Jacobson, E.S., 2000. Pathogenic roles for fungal melanins. Clinical Microbiology Reviews, 13, 708–717.
- Jiang, H., Liu, N.-N., Liu, G.-L., Chi, Z., Wang, J.-M., Zhang, L.-L., Chi, Z.-M., 2016. Melanin production by a yeast strain XJ5-1 of *Aureobasidium melanogenum* isolated from the Taklimakan desert and its role in the yeast survival in stress environments. Extremophiles, 20, 567–577.
- Joshi, M. H., Patil, A. A., Adivarekar, R. V., 2021. Characterization of brown-black pigment isolated from soil bacteria, *Beijerinckia fluminensis*, 1-22.
- Kalra, R., Conlan, X.A., Goel, M., 2020. Fungi as a Potential source of pigments: harnessing filamentous fungi. Frontiers in Chemistry, 8.
- Kanatt, S.R., Rao, M.S., Chawla, S.P., Sharma, A., 2012. Active chitosan–polyvinyl alcohol films with natural extracts. Food Hydrocolloids, 29, 290–297.
- Katritzky, A.R., Akhmedov, N.G., Denisenko, S.N., Denisko, O. V., 2002. ¹ H NMR Spectroscopic characterization of solutions of sepia melanin, sepia melanin free acid and human hair melanin. Pigment Cell Research, 15, 93–97.
- Kavaz, E., Ghanim, E.H., Abouhaswa, A.S., 2020. Optical, structural and nuclear radiation security properties of newly fabricated V₂O₅–SrO–PbO glass system. Journal of Non-Crystalline Solids, 538, 120045.
- Kim, Y.J., Wu, W., Chun, S.-E., Whitacre, J.F., Bettinger, C.J., 2013. Biologically derived melanin electrodes in aqueous sodium-ion energy storage devices. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110, 20912–20917.
- Kiran, G.S., Dhasayan, A., Lipton, A.N., Selvin, J., Arasu, M.V., Al-Dhabi, N.A., 2014. Melanin-templated rapid synthesis of silver nanostructures. Journal of Nanobiotechnology, 12, 18.
- Kochkina, G.A., Ivanushkina, N.E., Lupachev, A. V., Starodumova, I.P., Vasilenko, O. V., Ozerskaya, S.M., 2019. Diversity of mycelial fungi in natural and human-affected Antarctic soils. Polar Biology, 42, 47–64.
- Kulesza, K., Biedunkiewicz, A., Nowacka, K., Dynowska, M., Urbaniak, M., Stępień, Ł., 2021. Dishwashers as an extreme environment of potentially pathogenic yeast species. Pathogens, 10, 446.
- Kumar, C.G., Mongolla, P., Pombala, S., Kamle, A., Joseph, J., 2011. Physicochemical characterization and antioxidant activity of melanin from a novel strain of *Aspergillus bridgeri* ICTF-201. Letters in Applied Microbiology, 53, 350–358.
- Kumari, S., Thng, S., Verma, N., Gautam, H., 2018. Melanogenesis Inhibitors. Acta Dermato Venereologica, 98, 924–931.
- Kurian, N.K., Bhat, S.G., 2018. Food, cosmetic and biological applications of characterized DOPA-melanin from *Vibrio alginolyticus* strain BTKKS3. Applied Biological Chemistry, 61, 163–171.
- Lagashetti, A.C., Dufossé, L., Singh, S.K., Singh, P.N., 2019. Fungal pigments and their prospects in different industries. Microorganisms, 7, 604.

- Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G., Brakhage, A.A., 2003. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 38, 143–158.
- Lee, J.-H., Hyun, C.-K., 2014. Insulin-Sensitizing and Beneficial Lipid-Metabolic Effects of the Water-Soluble Melanin Complex Extracted from *Inonotus obliquus*. *Phytotherapy Research*, 28, 1320–1328.
- Li, J., Feng, L., Liu, L., Wang, F., Ouyang, L., Zhang, L., Hu, X., Wang, G., 2021. Recent advances in the design and discovery of synthetic tyrosinase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 224, 113744.
- Liang, Y., Zhao, Y., Sun, H., Dan, J., Kang, Y., Zhang, Q., Su, Z., Ni, Y., Shi, S., Wang, J., Zhang, W., 2023. Natural melanin nanoparticle-based photothermal film for edible antibacterial food packaging. *Food Chemistry*, 401, 134117.
- Liebgoat, P.-P., Labat, M., Amouric, A., Tholozan, J.-L., Lorquin, J., 2008. Tyrosol degradation via the homogentisic acid pathway in a newly isolated *Halomonas strain* from olive processing effluents. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 2084–2095.
- Lin, L., Xu, J., 2020. Fungal Pigments and Their Roles Associated with Human Health. *Journal of Fungi*, 6, 280.
- Liu, F., Zhang, J., Zhang, L., Diao, M., Ling, P., Wang, F., 2021. Correlation between the synthesis of pullulan and melanin in *Aureobasidium pullulans*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 177, 252–260.
- Liu, Q., Xiao, J., Liu, B., Zhuang, Y., Sun, L., 2018. Study on the Preparation and Chemical Structure Characterization of Melanin from *Boletus griseus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 3736.
- Liu, S., Youngchim, S., Zamith-Miranda, D., Nosanchuk, J.D., 2021. Fungal Melanin and the Mammalian Immune System. *Journal of Fungi*, 7, 264.
- Liu, T., Liu, X., Zhu, J., Tang, Q., Wang, W., Zhu, L., Zhang, Z., Zhang, Z., Jiang, L., Huang, H., 2020. Characterization of Radiation-Resistant Yeast Isolated from Radiation-Polluted Areas and Its Potential Application in Bioremediation. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 56, 553–562.
- Liu, X., Hou, R., Wang, D., Mai, M., Wu, X., Zheng, M., Fu, J., 2019. Comprehensive utilization of edible mushroom *Auricularia auricula* waste residue—Extraction, physicochemical properties of melanin and its antioxidant activity. *Food Science & Nutrition*, 7, 3774–3783.
- Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F., 2012. Natural and synthetic tyrosinase inhibitors as antibrowning agents: an update. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 378–398.
- Łopusiewicz, Ł., Jędra, F., Mizielińska, M., 2018. New poly(lactic acid) active packaging composite films incorporated with fungal melanin. *Polymers*, 10, 386.
- Łopusiewicz, Ł., Kwiatkowski, P., Drożłowska, E., Trocer, P., Kostek, M., Śliwiński, M., Polak-Śliwińska, M., Kowalczyk, E., Sienkiewicz, M., 2021. Preparation and characterization of carboxymethyl cellulose-based bioactive composite films modified with fungal melanin and carvacrol. *Polymers*, 13, 499.
- Lorquin, F., Ziarelli, F., Amouric, A., Di Giorgio, C., Robin, M., Piccerelle, P., Lorquin, J., 2021. Production and properties of non-cytotoxic pyomelanin by laccase and comparison to bacterial and synthetic pigments. *Scientific Reports*, 11, 8538.

- Ma, Z., Liu, X., Liu, Y., Chen, W., Wang, C., 2022. Studies on the biosynthetic pathways of melanin in *Auricularia auricula*. *Journal of Basic Microbiology*, 62, 843–856.
- Manirethan, V., Raval, K., Rajan, R., Thairra, H., Balakrishnan, R.M., 2018. Kinetic and thermodynamic studies on the adsorption of heavy metals from aqueous solution by melanin nanopigment obtained from marine source: *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of Environmental Management*, 214, 315–324.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Senthilkumar, K., Sivakumar, K., Kim, S.-K., 2013. Isolation and characterization of biologically active melanin from *Actinoalloteichus* sp. MA-32. *International Journal of Biological Macromolecules*, 58, 263–274.
- Mapari, S.A., Meyer, A.S., Thrane, U., Frisvad, J.C., 2009. Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale. *Microbial Cell Factories*, 8, 24.
- Martin-Sanchez, P.M., Sanchez-Cortes, S., Lopez-Tobar, E., Jurado, V., Bastian, F., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C., 2012. The nature of black stains in Lascaux Cave, France, as revealed by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 43, 464–467.
- Martínez, L.M., Martinez, A., Gosset, G., 2019. Production of melanins with recombinant microorganisms. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7.
- Mattoon, E.R., Cordero, R.J.B., Casadevall, A., 2021. Fungal melanins and applications in healthcare, bioremediation and industry. *Journal of Fungi*, 7, 488.
- McCallum, N.C., Son, F.A., Clemons, T.D., Weigand, S.J., Gnanasekaran, K., Battistella, C., Barnes, B.E., Abeyratne-Perera, H., Siwicka, Z.E., Forman, C.J., Zhou, X., Moore, M.H., Savin, D.A., Stupp, S.I., Wang, Z., Vora, G.J., Johnson, B.J., Farha, O.K., Gianneschi, N.C., 2021. Allomelanin: A biopolymer of intrinsic microporosity. *Journal of the American Chemical Society*, 143, 4005–4016.
- Mostert, A.B., Powell, B.J., Pratt, F.L., Hanson, G.R., Sarna, T., Gentle, I.R., Meredith, P., 2012. Role of semiconductivity and ion transport in the electrical conduction of melanin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 8943–8947.
- Mujdeci, G.N., 2021. Natural melanin synthesized by *Aureobasidium pullulans* using food wastes and its characterization. In: *Applied Food Biotechnology* 8.4. pp, 307–318.
- Müjdeci, G.N., 2022. Experimental modeling and optimization of melanin production by *Aureobasidium pullulans* NBRC 100716 in carrot peel extract. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 41.
- Murata, K., Ogawa, Y., Kusama, K., Yasuhara, Y., 2022. Disseminated *Verruconis gallopava* infection in a patient with systemic lupus erythematosus in Japan: A case report, literature review, and autopsy case. *Medical Mycology Case Reports*, 35, 35–38.
- N.F.Mott, E.A. Davis, 1971. *Electronics Process in Noncrystalline Materials*.
- Napolitano, A., Panzella, L., Leone, L., D’Ischia, M., 2013. Red hair benzothiazines and benzothiazoles: mutation-inspired chemistry in the quest for functionality. *Accounts of Chemical Research*, 46, 519–528.
- Narayanan, D.L., Saladi, R.N., Fox, J.L., 2010. Review: Ultraviolet radiation and skin cancer. *International Journal of Dermatology*, 49, 978–986.
- Narsing Rao, M.P., Xiao, M., Li, W.-J., 2017. Fungal and bacterial pigments: secondary metabolites with wide applications. *Frontiers in Microbiology*, 8.

- Oh, J.-J., Kim, J.Y., Kim, Y.J., Kim, S., Kim, G.-H., 2021. Utilization of extracellular fungal melanin as an eco-friendly biosorbent for treatment of metal-contaminated effluents. *Chemosphere*, 272, 129884.
- Oh, J.-J., Kim, J.Y., Kwon, S.L., Hwang, D.-H., Choi, Y.-E., Kim, G.-H., 2020. Production and characterization of melanin pigments derived from *Amorphotheca resinae*. *Journal of Microbiology*, 58, 648–656.
- Olaizola, C., 2012. Isolation, characterization and assessment of the photoprotective effect of two fungal melanins. The University of British Columbia.
- Onofri, S., de la Torre, R., de Vera, J.-P., Ott, S., Zucconi, L., Selbmann, L., Scalzi, G., Venkateswaran, K.J., Rabbow, E., Sánchez Iñigo, F.J., Horneck, G., 2012. Survival of Rock-Colonizing Organisms After 1.5 Years in Outer Space. *Astrobiology*, 12, 508–516.
- Orooji, Y., Ghanbari, M., Amiri, O., Salavati-Niasari, M., 2020. Facile fabrication of silver iodide/graphitic carbon nitride nanocomposites by notable photo-catalytic performance through sunlight and antimicrobial activity. *Journal of Hazardous Materials*, 389, 122079.
- Özdal M., 2019. Bakteriyel pigmentlerin üretimi ve farmakolojik kullanım alanları. *Fen Bilimleri ve Matematik Alanında Yeni Ufuklar Dergisi*, 155-139.
- Ozdal, M., Kurbanoglu, E.B., 2019. Citric Acid Production by *Aspergillus niger* from Agro-Industrial By-Products: Molasses and Chicken Feather Peptone. *Waste and Biomass Valorization*, 10, 631–640.
- Pacelli, C., Cassaro, A., Maturilli, A., Timperio, A.M., Gevi, F., Cavalazzi, B., Stefan, M., Ghica, D., Onofri, S., 2020. Multidisciplinary characterization of melanin pigments from the black fungus *Cryomyces antarcticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 6385–6395.
- Padhan, B., Poddar, K., Sarkar, D., Sarkar, A., 2021. Production, purification, and process optimization of intracellular pigment from novel psychrotolerant *Paenibacillus* sp. BPW19. *Biotechnology Reports*, 29, e00592.
- Pal, A.K., Gajjar, D.U., Vasavada, A.R., 2013. DOPA and DHN pathway orchestrate melanin synthesis in *Aspergillus* species. *Medical Mycology*, 1–9.
- Panzella, L., Napolitano, A., 2019. Natural and Bioinspired Phenolic Compounds as Tyrosinase Inhibitors for the Treatment of Skin Hyperpigmentation: Recent Advances. *Cosmetics*, 6, 57.
- Park, S.J., Yang, H.K., Moon, B.K., 2019. Ultraviolet to blue blocking and wavelength convertible films using carbon dots for interrupting eye damage caused by general lighting. *Nano Energy*, 60, 87–94.
- Passeron, T., Bouillon, R., Callender, V., Cestari, T., Diepgen, T.L., Green, A.C., van der Pols, J.C., Bernard, B.A., Ly, F., Bernerd, F., Marrot, L., Nielsen, M., Verschoore, M., Jablonski, N.G., Young, A.R., 2019. Sunscreen photoprotection and vitamin D status. *British Journal of Dermatology*, 181, 916–931.
- Pavan, M.E., López, N.I., Pettinari, M.J., 2020. Melanin biosynthesis in bacteria, regulation and production perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 1357–1370.
- Płonka, Przemysław; Grabacka, M., 2006. *Acta Biochimica Polonica*. *Acta Biochimica Polonica*, 53, 429–443.
- Podhaisky, H. P.; Riemschneider, S.; Wohlrab, W., 2002. UV light and oxidative damage of the skin. *Pharmazie*, 1, 30–33.

- Pralea, I.-E., Moldovan, R.-C., Petrache, A.-M., Ilieș, M., Hegheș, S.-C., Ielciu, I., Nicoară, R., Moldovan, M., Ene, M., Radu, M., Uifălean, A., Iuga, C.-A., 2019. From Extraction to Advanced Analytical Methods: The Challenges of Melanin Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 3943.
- Raman, N.M., Shah, P.H., Mohan, M., Ramasamy, S., 2015. Improved production of melanin from *Aspergillus fumigatus* AFGRD105 by optimization of media factors. *AMB Express*, 5, 72.
- Ramesh, Vinithkumar, Kirubakaran, Venil, Dufossé, 2019. Multifaceted applications of microbial pigments: current knowledge, challenges and future directions for public health implications. *Microorganisms*, 7, 186.
- Rani, M. H. S., Ramesh, T., Subramanian, J., Kalaiselvam, M., 2013. Production and characterization of melanin pigment from halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2, 9–17.
- Rassabina, A.E., Gurjanov, O.P., Beckett, R.P., Minibayeva, F. V., 2020. Melanin from the Lichens *Cetraria islandica* and *Pseudevernia furfuracea*: structural features and physicochemical properties. *Biochemistry (Moscow)*, 85, 623–628.
- Reiss, R., Ihssen, J., Richter, M., Eichhorn, E., Schilling, B., Thöny-Meyer, L., 2013. Laccase versus laccase-like multi-copper oxidase: a comparative study of similar enzymes with diverse substrate spectra. *Plos one*, e65633.
- Revskeya, E., Chu, P., Howell, R.C., Schweitzer, A.D., Bryan, R.A., Harris, M., Gerfen, G., Jiang, Z., Jandl, T., Kim, K., Ting, L.-M., Sellers, R.S., Dadachova, E., Casadevall, A., 2012. Compton scattering by internal shields based on melanin-containing mushrooms provides protection of gastrointestinal tract from ionizing radiation. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 27, 570–576.
- Rižner, T.L., Wheeler, M.H., 2003. Melanin biosynthesis in the fungus *Curvularia lunata* (teleomorph: *Cochliobolus lunatus*). *Canadian Journal of Microbiology*, 49, 110–119.
- Roberts, J.E., 2011. Ultraviolet radiation as a risk factor for cataract and macular degeneration. *eye and contact lens: Science & Clinical Practice*, 37, 246–249.
- Romero-Martinez, R., Wheeler, M., Guerrero-Plata, A., Rico, G., Torres-Guerrero, H., 2000. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infection and Immunity*, 68, 3696–3703.
- Roy, S., Rhim, J.-W., 2019a. Agar-based antioxidant composite films incorporated with melanin nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 94, 391–398.
- Roy, S., Rhim, J.-W., 2019b. Preparation of carrageenan-based functional nanocomposite films incorporated with melanin nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 176, 317–324.
- Roy, S., Rhim, J.-W., 2021. Fabrication of pectin/agar blended functional film: Effect of reinforcement of melanin nanoparticles and grapefruit seed extract. *Food Hydrocolloids*, 118, 106823.
- Roy, S., Van Hai, L., Kim, H.C., Zhai, L., Kim, J., 2020. Preparation and characterization of synthetic melanin-like nanoparticles reinforced chitosan nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, 231, 115729.
- Saiz-Jimenez, C., Martin-Sanchez, P.M., Gonzalez-Perez, J.A., Hermosin, B., 2021. Analytical Pyrolysis of the Fungal Melanins from *Ochroconis* spp. Isolated from Lascaux Cave, France. *Applied Sciences*, 11, 1198.

- Sajjan, S., 2010. Purification and Physiochemical Characterization of Melanin Pigment from *Klebsiella* sp. GSK. Journal of Microbiology and Biotechnology, 20, 1513–1520.
- Salazar-García, L.M., Ortega-Cuevas, R.I., Martínez-Álvarez, J.A., González-Hernández, S.E., Martínez-Álvarez, R.A., Mendoza-Olivares, D., Vázquez, M.Á., Flores-Martínez, A., Ponce-Noyola, P., 2022. Melanin pathway determination in *sclerotium cepivorum* berk using spectrophotometric assays, inhibition compound, and protein validation. Microbiology Research, 13, 152–166.
- Samerpitak, K., Alfjorden, A., Seyedmousavi, S., Rijs, A.J.M.M., Gerrits van den Ende, A.H.G., Hoog, G.S., 2019. *Ochroconis globalis* infecting Atlantic salmon (*Salmo salar*), with a review of *Ochroconis* species in cold-blooded animals. Journal of Fish Diseases, 42, 947–957.
- Samerpitak, K., Van der Linde, E., Choi, H.-J., Gerrits van den Ende, A.H.G., Machouart, M., Gueidan, C., de Hoog, G.S., 2014. Taxonomy of *Ochroconis*, genus including opportunistic pathogens on humans and animals. Fungal Diversity, 65, 89–126.
- Sánchez-Muñoz, S., Mariano-Silva, G., Leite, M.O., Mura, F.B., Verma, M.L., da Silva, S.S., Chandel, A.K., 2020. Production of fungal and bacterial pigments and their applications. In: Biotechnological Production of Bioactive Compounds. Elsevier, pp, 327–361.
- Santiago, I.F., Gonçalves, V.N., Gómez-Silva, B., Galetovic, A., Rosa, L.H., 2018. Fungal diversity in the Atacama Desert. Antonie van Leeuwenhoek, 111, 1345–1360.
- Seelam, S.D., Agsar, D., Halmuthur M., S.K., Reddy Shetty, P., Vemireddy, S., Reddy, K.M., Umesh, M.K., Rajitha, C., 2021. Characterization and photoprotective potentiality of lime dwelling *Pseudomonas* mediated melanin as sunscreen agent against UV-B radiations. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 216, 112126.
- Selvakumar, P., Rajasekar, S., Periasamy, K., Raaman, N., 2008. Isolation and characterization of melanin pigment from *Pleurotus cystidiosus* (telomorph of *Antromycopsis macrocarpa*). World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24, 2125–2131.
- Sen, T., Barrow, C.J., Deshmukh, S.K., 2019. Microbial Pigments in the Food Industry—Challenges and the Way Forward. Frontiers in Nutrition, 6.
- Shahid, M., Shahid-ul-Islam, Mohammad, F., 2013. Recent advancements in natural dye applications: a review. Journal of Cleaner Production, 53, 310–331.
- Shankar, S., Wang, L.F., Rhim, J.W., 2019. Effect of melanin nanoparticles on the mechanical, water vapor barrier, and antioxidant properties of gelatin-based films for food packaging application. Food Packaging and Shelf Life, 21, 100363.
- Shen, M., Zhang, J.Q., Zhao, L.L., Groenewald, J.Z., Crous, P.W., Zhang, Y., 2020. Venturiales. Studies in Mycology, 96, 185–308.
- Silva, C., Santos, A., Salazar, R., Lamilla, C., Pavez, B., Meza, P., Hunter, R., Barrientos, L., 2019. Evaluation of dye sensitized solar cells based on a pigment obtained from Antarctic *Streptomyces fildesensis*. Solar Energy, 181, 379–385.
- Singh, D., Kumar, J., Kumar, A., 2018. Isolation of pyomelanin from bacteria and evidences showing its synthesis by 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase enzyme encoded by *hppD* gene. International Journal of Biological Macromolecules, 119, 864–873.
- Singh, S., Nimse, S.B., Mathew, D.E., Dhimmarr, A., Sahastrabudhe, H., Gajjar, A., Ghadge, V.A., Kumar, P., Shinde, P.B., 2021. Microbial melanin: Recent advances in biosynthesis, extraction, characterization, and applications. Biotechnology Advances, 53, 107773.

- Sivaperumal, P., Kamala, K., Rajaram, R., Mishra, S.S., 2014. Melanin from marine *Streptomyces* sp. (MVCS13) with potential effect against ornamental fish pathogens of *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3, 134–141.
- Soliman, S.S.M., Hamdy, R., Elseginy, S.A., Gebremariam, T., Hamoda, A.M., Madkour, M., Venkatachalam, T., Ershaid, M.N., Mohammad, M.G., Chamilos, G., Ibrahim, A.S., 2020. Selective inhibition of *Rhizopus* eumelanin biosynthesis by novel natural product scaffold-based designs caused significant inhibition of fungal pathogenesis. *Biochemical Journal*, 477, 2489–2507.
- Soumya, K., Narasimha Murthy, K., Sreelatha, G.L., Tirumale, S., 2018. Characterization of a red pigment from *Fusarium chlamydosporum* exhibiting selective cytotoxicity against human breast cancer MCF-7 cell lines. *Journal of Applied Microbiology*, 125, 148–158.
- Srivastava, K.R., Dixit, S., Pal, D.B., Mishra, P.K., Srivastava, P., Srivastava, N., Hashem, A., Alqarawi, A.A., Abd_Allah, E.F., 2021. Effect of nanocellulose on mechanical and barrier properties of PVA–banana pseudostem fiber composite films. *Environmental Technology and Innovation*, 21, 101312.
- Sun, Shujing, Zhang, X., Sun, Shiwei, Zhang, L., Shan, S., Zhu, H., 2016. Production of natural melanin by *Auricularia auricula* and study on its molecular structure. *Food Chemistry*, 190, 801–807.
- Surendirakumar, K., Pandey, R.R., Muthukumar, T., Sathiyaseelan, A., Loushambam, S., Seth, A., 2022. Characterization and biological activities of melanin pigment from root endophytic fungus, *Phoma* sp. RDSE17. *Archives of Microbiology*, 204, 171.
- Suryanarayanan, T.S., Ravishankar, J.P., Venkatesan, G., Murali, T.S., 2004. Characterization of the melanin pigment of a cosmopolitan fungal endophyte. *Mycological Research*, 108, 974–978.
- Suwannarach, N., Kumla, J., Watanabe, B., Matsui, K., Lumyong, S., 2019. Characterization of melanin and optimal conditions for pigment production by an endophytic fungus, *Spissiomycetes endophytica* SDBR-CMU319. *Plos One*, 14, e0222187.
- Tekbaş Ö. F., Evci D., Ö.U., 2005. Bir, yaklaşan yaz mevsimi ile artan ultraviyole, tehlike: güneş kaynaklı ışınları. *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 4/2, 98–107.
- Timofiychuk, O.A., Prudnicova, T.I., Mishurov, D.O., Avramenko, V.L., Shevcova, R.G., 2009. Decomposition of biodegradable films developed on the basis of polyvinyl alcohol in the natural environment. *Facta universitatis - series: Physics, Chemistry and Technology*, 7, 61–67.
- Tischner, Z., Kredics, L., Marik, T., Vörös, K., Kriszt, B., Péter, B., Magyar, D., 2019. Environmental characteristics and taxonomy of microscopic fungi isolated from washing machines. *Fungal Biology*, 123, 650–659.
- Tkaczyk, A., Mitrowska, K., Posyniak, A., 2020. Synthetic organic dyes as contaminants of the aquatic environment and their implications for ecosystems: A review. *Science of The Total Environment*, 717, 137222.
- Toledo, A.V., Franco, M.E.E., Yanil Lopez, S.M., Troncozo, M.I., Saparrat, M.C.N., Balatti, P.A., 2017. Melanins in fungi: Types, localization and putative biological roles. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 99, 2–6.
- Tran-Ly, A.N., Reyes, C., Schwarze, F.W.M.R., Ribera, J., 2020. Microbial production of melanin and its various applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36, 170.

- Umoren, S.A., Solomon, M.M., 2019. Protective polymeric films for industrial substrates: A critical review on past and recent applications with conducting polymers and polymer composites/nanocomposites. *Progress in Materials Science*, 104, 380–450.
- Urbach, F., 1953. The long-wavelength edge of photographic sensitivity and of the electronic Absorption of Solids. *Physical Review*, 92, 5, 1324.
- Venil, C.K., Velmurugan, P., Dufossé, L., Renuka Devi, P., Veera Ravi, A., 2020. Fungal pigments: potential coloring compounds for wide ranging applications in textile dyeing. *Journal of Fungi*, 6, 68.
- Venil, C.K., Zakaria, Z.A., Ahmad, W.A., 2013. Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48, 1065–1079.
- Wang, L.F., Rhim, J.W., 2019. Isolation and characterization of melanin from black garlic and sepia ink, *LWT*, 99, 17–23.
- Wang, L., Li, Yumei, Li, Yamei, 2019. Metal ions driven production, characterization and bioactivity of extracellular melanin from *Streptomyces* sp. ZL-24. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 521–530.
- Wang, Y., Wang, X., Li, T., Ma, P., Zhang, S., Du, M., Dong, W., Xie, Y., Chen, M., 2018. Effects of Melanin on Optical Behavior of Polymer: From Natural Pigment to Materials Applications. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10, 13100–13106.
- Wang, Y., Wang, Z., Ma, P., Bai, H., Dong, W., Xie, Y., Chen, M., 2015. Strong nanocomposite reinforcement effects in poly(vinyl alcohol) with melanin nanoparticles. *RSC Advances*, 5, 72691–72698.
- Wogelius, R.A., Manning, P.L., Barden, H.E., Edwards, N.P., Webb, S.M., Sellers, W.I., Taylor, K.G., Larson, P.L., Dodson, P., You, H., Da-qing, L., Bergmann, U., 2011. Trace Metals as biomarkers for eumelanin pigment in the fossil record. *Science*, 333, 1622–1626.
- Wu, Z., Zhang, M., Yang, Huandong, Zhou, H., Yang, Hailong, 2018. Production, physico-chemical characterization and antioxidant activity of natural melanin from submerged cultures of the mushroom *Auricularia auricula*. *Food Bioscience*, 26, 49–56.
- Xin, C., Ma, J., Tan, C., Yang, Z., Ye, F., Long, C., Ye, S., Hou, D., 2015. Preparation of melanin from *Catharsius molossus* L. and preliminary study on its chemical structure. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119, 446–454.
- Xu, C., Chen, T., Li, J., Jin, M., Ye, M., 2020. The structural analysis and its hepatoprotective activity of melanin isolated from *Lachnum* sp. *Process Biochemistry*, 90, 249–256.
- Yang, J., Li, W., Ng, T.B., Deng, X., Lin, J., Ye, X., 2017. Laccases: Production, expression regulation, and applications in pharmaceutical biodegradation. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Yang, M., Li, L., Yu, S., Liu, J., Shi, J., 2020. High performance of alginate/polyvinyl alcohol composite film based on natural original melanin nanoparticles used as food thermal insulating and UV–Vis block. *Carbohydrate Polymers*, 233, 115884.
- Ye, M., Guo, G., Lu, Y., Song, S., Wang, H., Yang, L., 2014. Purification, structure and anti-radiation activity of melanin from *Lachnum* YM404. *International Journal of Biological Macromolecules*, 63, 170–176.
- Yenilmez, A., 2017. Fungal biyopreparatların ticari formülasyonlarında kullanılabilecek UV koruyucu pigment üreten fungusların izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu. *Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum.

- Yew, S.M., Chan, C.L., Kuan, C.S., Toh, Y.F., Ngeow, Y.F., Na, S.L., Lee, K.W., Hoh, C.-C., Yee, W.Y., Ng, K.P., 2016. The genome of newly classified *Ochroconis mirabilis*: Insights into fungal adaptation to different living conditions. *BMC Genomics*, 17, 91.
- Yıldırım, S., 2014. Hidrokarbonla Kirlenmiş Topraklardan İzole Edilen Bakterilerden Pigment Üretimi. Eskişehir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Yuda, E., Yoshida, Y., Ueda, N., Hayano, J., 2020. Difference in autonomic nervous effect of blue light depending on the angle of incidence on the eye. *BMC Research Notes*, 13, 141.
- Zaidi, K.U., Ali, A.S., Ali, S.A., 2014. Purification and characterization of melanogenic enzyme tyrosinase from button mushroom. *Enzyme Research*, 2014, 1–6.
- Zain ul Arifeen, M., Ma, Y.-N., Xue, Y.-R., Liu, C.-H., 2019. Deep-sea fungi could be the new arsenal for bioactive molecules. *Marine Drugs*, 18, 9.
- Zhan, F., He, Y., Zu, Y., Li, T., Zhao, Z., 2011. Characterization of melanin isolated from a dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 2483–2489.
- Zhang, F., Kearns, S.L., Orr, P.J., Benton, M.J., Zhou, Z., Johnson, D., Xu, X., Wang, X., 2010. Fossilized melanosomes and the colour of *Cretaceous dinosaurs* and birds. *Nature*, 463, 1075–1078.
- Zhang, M., Xiao, G., Thring, R.W., Chen, W., Zhou, H., Yang, H., 2015. Production and characterization of melanin by submerged culture of culinary and medicinal fungi *Auricularia auricula*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176, 253–266.
- Zhang, Y., Remadevi, R., Hinestroza, J.P., Wang, X., Naebe, M., 2020. Transparent Ultraviolet (UV)-Shielding Films Made from Waste Hemp Hurd and Polyvinyl Alcohol (PVA). *Polymers*, 12, 1190.
- Zheng, M., Fu, J., Liu, X., Hou, R., Huang, Y., Xu, K., Wu, X., Lin, W., 2019. Physicochemical properties and the extraction process of natural melanin from *Auricularia polytricha*. *SDRP Journal of Food Science and Technology*, 4, 1–12.
- Zou, Y., Hou, X., 2017. Optimization of culture medium for production of melanin by *Auricularia auricula*. *Food Science and Technology*, 37, 153–157.
- Zou, Y., Tian, M., 2017. Fermentative Production of Melanin by *Auricularia auricula*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41, e12909.
- Zupančič, J., Novak Babič, M., Zalar, P., Gunde-Cimerman, N., 2016. The Black yeast *Exophiala dermatitidis* and other selected opportunistic human fungal pathogens spread from dishwashers to kitchens. *Plos one*, 11, e0148166.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	: Fatma Meryem BOZHÜYÜK
Doğum tarihi	:
Doğum Yeri	:
Uyruğu	:
Adres	:
Tel	:
E-mail	:
Eğitim	
Lise	:
Lisans	:
Yüksek lisans	:
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	