

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

***STREPTOMYCES* REKOMBİNANT SUŞLARIYLA BÜYÜK
ÖLÇEKLİ ANTİBİYOTİK ÜRETİMİ, ÜRÜNÜN İZOLASYONU
VE KUMAŞ BOYASI OLARAK KULLANIM POTANSİYELİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

ZEYNEP BEGÜM ÖZMAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

DANIŞMAN: PROF. DR. SEDEF TUNCA GEDİK

EKİM 2025

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

***STREPTOMYCES* REKOMBİNANT SUŞLARIYLA**
BÜYÜK ÖLÇEKLİ ANTİBİYOTİK ÜRETİMİ, ÜRÜNÜN
İZOLASYONU VE KUMAŞ BOYASI OLARAK
KULLANIM POTANSİYELİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

ZEYNEP BEGÜM ÖZMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM
DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. SEDEF TUNCA GEDİK

EKİM 2025

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL

**LARGE-SCALE ANTIBIOTIC PRODUCTION WITH
RECOMBINANT *STREPTOMYCES* STRAINS,
ISOLATION OF THE PRODUCT, AND EVALUATION
OF ITS POTENTIAL USE AS A FABRIC DYE**

ZEYNEP BEGÜM ÖZMAN

**A THESIS OF MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND
GENETICS**

ADVISOR: PROF. DR. SEDEF TUNCA GEDİK

OCTOBER 2025

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun 30/06/2025 tarih ve 2025/34 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 24/10/2025 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Zeynep Begüm ÖZMAN'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

ÜYE

: Doç. Dr. Fatma İnci ÖZDEMİR

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Handan EMİŞOĞLU KÜLAHLI

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Streptomyces cinsi bakteriler, yüksek antibiyotik üretim kapasiteleri ve sekonder metabolit üretme potansiyelleri nedeniyle biyoteknolojik açıdan önem taşımaktadır. Bu mikroorganizmalar, bilinen antibiyotiklerin yaklaşık %75'ini sentezleyebilmekte ve antifungal, antikanser ile immünosüpresif ajanların üretiminde rol oynamaktadır. Model organizma *Streptomyces coelicolor* A3(2), en az beş farklı antibiyotik üretme kapasitesine sahip olmasıyla dikkat çekmektedir. ATP'ye bağımlı Lon proteaz, bakteriler ve ökaryotlar da dahil olmak üzere çok çeşitli organizmalarda protein kalitesinin korunmasında merkezi bir rol üstlenmektedir. Yanlış katlanmış veya hasar görmüş proteinlerin yıkımını sağlayan bu enzim, hücre döngüsü, sporulasyon, metabolik düzenleme, patojenite ve stres tepkileri gibi yaşamsal süreçlere de katılmaktadır. Önceki çalışmalar, *S. coelicolor*'da Lon proteazın sekonder metabolit üretimi üzerinde belirgin etkiler oluşturduğunu göstermiştir.

Bu tez çalışmasında, laboratuvar stoklarımızda bulunan yüksek antibiyotik üreticisi iki rekombinant suş olan Sco-pRA_{lon} (genomunda fazladan 2 kopya *lon* geni taşıyan suş) ve Sco-pSPG_{lon} (*lon* genini çok kopyalı bir plazmidde ifade eden suş) suşlarının antibiyotik üretimlerinin optimizasyonu ve renkli antibiyotikğin kültür ortamından izolasyonunun ardından kumaş boyası olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Kültür koşullarının optimizasyonu sonucunda 96. saatte Sco-pRA_{lon} suşu yaban suşa göre yaklaşık 18–19 kat, Sco-pSPG_{lon} suşu ise yaklaşık 9 kat daha yüksek seviyede antibiyotik üretmiştir. Renkli antibiyotik olan aktinorhodin üretimi için en verimli suşun Sco-pRA_{lon} olduğu belirlendiğinden çalışmaya bu suş ile devam edilmiş ve kültür hacmi, inokulum miktarı ile çalkalama hızının antibiyotik üretimi üzerine etkileri belirlenmiştir. Artan kültür hacminin ve inokulum büyüklüğünün antibiyotik üretimini negatif yönde etkilediği bulunmuştur. Bu optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen veriler ile Sco-pRA_{lon} suşunun aktinorhodin üretimi büyük ölçekli fermentörde 1,5 litre hacminde gerçekleştirilmiştir. Fermentör şartlarında erlenmeyer koşullarından daha düşük bir verim elde edilmiş, büyük hacim çalışmalarında bütün parametrelerin fermentörde tekrar optimize edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu süreçte üretilen aktinorhodin kültür ortamından izole edilmiş ve pigmentin tekstil alanındaki kullanım potansiyeli değerlendirilmiştir. Doğal pigmentle boyanmış kumaş parçalarındaki boyanın sabitlenmesi için farklı yöntemler kullanılmıştır. Isı, NaCl ve asetik asit çözeltileri tek tek ve farklı kombinasyonlar halinde uygulanmış ve en uygun boya sabitleme işleminin asetik asit ile sağlandığı görülmüştür.

Elde edilen bulgular, Lon proteazın *Streptomyces*'lerde antibiyotik üretimini teşvik ettiğini teyit ederken, renkli bir antibiyotik olan aktinorhodinin biyoteknolojik üretimi ve sürdürülebilir boya teknolojilerindeki potansiyel kullanımına dair değerli veriler sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *S. coelicolor*, Lon proteaz, Aktinorhodin

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Streptomyces* are of great biotechnological importance due to their high antibiotic production capacity and potential for secondary metabolite synthesis. These microorganisms are capable of synthesizing approximately 75% of known antibiotics and play a role in the production of antifungal, anticancer, and immunosuppressive agents. The model organism *Streptomyces coelicolor* A3(2) stands out for its ability to produce at least five different antibiotics. The ATP-dependent Lon protease plays a central role in maintaining protein quality across a wide range of organisms, including both bacteria and eukaryotes. This enzyme, responsible for the degradation of misfolded or damaged proteins, is also involved in essential cellular processes such as cell cycle regulation, sporulation, metabolic control, pathogenicity, and stress responses. Previous studies have demonstrated that the Lon protease exerts significant effects on secondary metabolite production in *S. coelicolor*.

The objective of this thesis study is twofold: first, to optimize the antibiotic production of two recombinant strains, Sco-pRA_{lon} (a strain carrying two additional copies of the *lon* gene in its genome) and Sco-pSPG_{lon} (a strain expressing the *lon* gene from a multicopy plasmid), which are high antibiotic producers found in our laboratory stocks; and second, to evaluate them as fabric dyes following the isolation of colored antibiotics from the culture medium. As a result of culture optimization, the Sco-pRA_{lon} strain produced approximately 18–19 times higher levels of antibiotic than the wild-type strain at 96 hours, while the Sco-pSPG_{lon} strain showed approximately 9-fold higher production. Since the most efficient strain for the production of the colored antibiotic actinorhodin was determined to be Sco-pRA_{lon}, the study continued with this strain, and the effects of culture volume, inoculum size, and agitation speed on antibiotic production were determined. It was found that increasing the culture volume and inoculum size negatively affected antibiotic yield. Based on the optimization data obtained, actinorhodin production by the Sco-pRA_{lon} strain was carried out in a large-scale fermenter with a working volume of 1.5 liters. Under fermenter conditions, the yield was lower than that obtained in Erlenmeyer flasks, leading to the conclusion that all parameters must be re-optimized for larger-scale production. Actinorhodin produced during this process was isolated from the culture medium, and the pigment's potential for use in the textile industry was evaluated. To ensure color fixation on fabric samples dyed with the natural pigment, different fixation methods were tested. Heat, NaCl, and acetic acid solutions were applied individually and in various combinations, revealing that the most effective dye fixation was achieved using acetic acid.

The findings of this study confirm that the Lon protease promotes antibiotic production in *Streptomyces* species and provide valuable insights into the biotechnological production of the colored antibiotic actinorhodin, as well as its potential use in sustainable dye technologies.

Keywords: *S. coelicolor*, Lon protease, Actinorhodin

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren, akademik gelişimime büyük katkı sağlayan, her zaman anlayışını ve desteğini hissettiren, birlikte çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Aynı laboratuvarı paylaştığımız hocam Doç. Dr. İnci ÖZDEMİR'e imkanlarından yararlanmama izin verdiği ve güler yüzünü esirgemediği için teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında birlikte emek verdiğimiz, karşılıklı destekle zorlu süreçleri kolaylaştırdığımız hem akademik hem de sosyal hayatımda yanımda olan sevgili arkadaşlarım Eylül GÜVEN DALKÜREK, Gözde ŞÜKÜR ve Efe AKSOY'a birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım için teşekkür ederim.

Yüksek lisans sürecim boyunca akademik hayatımda yanımda olan değerli laboratuvar arkadaşlarım Halil YILMAZ, Sude KARA, Canan UYANIK, Aslı BAYRAKTAR KAVALCI, Emine YARADIR, Nagihan GENEL'e gönülden teşekkür ederim.

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında laboratuvar olanaklarını ve fermentörlerini kullanmama imkan sağlayan Gebze Enzim Tanıma Merkezi (GETM) ve Prof. Dr. Barış Binay'a teşekkür ederim. Ayrıca süreç boyunca bilgi ve deneyimleriyle katkıda bulunan, nazik desteği ve yardımlarıyla çalışmama değerli katkılar sunan Buse Çaloğlu'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Beni motive eden, hayatımı güzelleştiren ve her zaman olduğu gibi yüksek lisans eğitimim boyunca da desteklerini esirgemeyen yakın dostlarım Kahraman KÜPCÜK, Halil İbrahim Duman, Nagihan ÖZMAN'a, iyi ki varsınız demek istiyorum.

Hayatıma en değerli anlamı katan, en büyük şansım ve gücüm olan aileme; hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgmeden bana inanıp yanımda oldukları için sevgili annem Buket ÖZMAN'a, babam Recep ÖZMAN'a ve kardeşim Uluğ Aybek ÖZMAN'a teşekkür ederim. Artık aramızda olmasa da çiçeğini hiçbir zaman yalnız bırakmayacağını bildiğim canım dedem Erdoğan AKDENİZ'e teşekkür ederim. Sessiz varlığı bile hep yanımdaymış gibi, minnetle ve özlemle anıyorum.

Yüksek lisans öğrenimim süresince, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) tarafından 2210-A Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı 2023/2 kapsamında desteklenmiş bulunmaktayım. Sağladığı destek için TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLOLAR/ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. <i>STREPTOMYCES</i> 'LER	3
2.1. <i>Streptomyces coelicolor</i>	6
2.2. <i>S. coelicolor</i> 'un Sekonder Metabolit Biyosentezi	7
2.3. <i>Streptomyces</i> 'lerde Lon Proteaz ile Sekonder Metabolit Üretiminin İlişkisi	9
3. <i>S. COELICOLOR</i> İLE FERMENTÖRDE BÜYÜK ÖLÇEKLİ SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİ	11
4. ORGANİK TEKSTİL BOYALARI	13
4.1. Sekonder Metabolitlerin Tekstil Boyalarında Kullanımı	13
5. GEREÇLER	17
5.1. Kullanılan Kimyasallar	17
5.2. Kullanılan Bakteri Soyları	17
5.3. Kullanılan Cihazlar	17
5.4. Kullanılan Besiyerleri	18
5.5. Çözeltiler	19
5.6. Antibiyotikler	19
6. YÖNTEMLER	20
6.1. <i>Streptomyces coelicolor</i> Suşlarının Spor Stoklarının Hazırlanması	20
6.2. <i>Streptomyces coelicolor</i> Suşlarının Büyütülmesi	20
6.3. <i>Streptomyces coelicolor</i> Suşlarının Aktinorhodin Üretiminin Optimizasyonu	21
6.3.1. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	21
6.3.2. Optimum pH Değerinin Belirlenmesi	22
6.3.3. R2YE Yerine ISP-4 Besiyerinin Kullanılması	22
6.3.4. Antibiyotik Üretiminde Kültür Hacminin Etkisi	23
6.3.5. Antibiyotik Üretiminde İnokulum Miktarının Etkisi	23
6.3.6. Antibiyotik Üretiminde Çalkalama Hızının (rpm) Etkisi	23
6.4. Sco-pRA _{lon} Suşunun Fermentörde Büyütülmesi	24
6.5. Kuru Ağırlık ve Antibiyotik Aktivitesinin Kantitatif Olarak Belirlenmesi	25
6.6. Aktinorhodin Antibiyotiğinin Kültür Ortamından Ayırıştırılması	27
6.7. Aktinorhodinin Tekstil Boyası Olarak Kullanımı	28
7. BULGULAR	30
7.1. <i>S. coelicolor</i> A3(2) Rekombinant Suşlarının Aktinorhodin Üretiminin Optimizasyonları	30
7.1.1. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	30
7.1.2. Optimum pH'nın Belirlenmesi	36

7.1.3. <i>S. coelicolor</i> A3(2) Rekombinant Suşlarının ISP-4 Besiyerinde Büyütülmesi	44
7.1.4. Kültür Hacminin Sco-pRA _{lon} 'da Antibiyotik Üretimine Etkisi	47
7.1.5. İnokulum Miktarının Sco-pRA _{lon} 'da Aktinorhodin Üretimine Etkisi	48
7.1.6. Çalkalama Hızının (rpm) Sco-pRA _{lon} 'da Aktinorhodin Üretimine Etkisi	50
7.2. Sco-pRA _{lon} 'un Fermentörde Büyük Ölçekli Üretimi	51
7.3. Aktinorhodinin Kumaş Boyası Olarak Potansiyelinin Değerlendirilmesi	53
7.3.1. Sco-pRA _{lon} Tarafından Üretilen Aktinorhodinin İzolasyonu	53
7.3.2. Aktinorhodinin Kumaş Boyası Olarak Kullanımı	55
8. TARTIŞMA	58
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	72
TEZ METNİNDEN TÜRETİLEN SUNUMLAR	73

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

~	: Yaklaşık
Act	: Aktinorhodin
ATP	: Adenozin trifosfat
µl	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
rpm	: Dakika başına dönüş
Red	: Undesilprodigiosin
pppGpp	: Guanozin pentafoşfat
PPK	: Polifoşfat kinaz
ppGpp	: Guanozin tetrafoşfat
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
KOH	: Potasyum hidroksit
L	: Litre
HCl	: Hidroklorik asit
RNA	: Ribonükleik asit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
MnCl ₂	: Manganez (II) klorid
ml	: Mililitre
mg	: Miligram
PCD	: Programlı hücre ölümü

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: <i>Streptomyces</i> türlerinde yaşam döngüsünün şematik gösterimi.	4
Şekil 2.2: <i>Streptomyces</i> gelişim döngüsü ve miselyum farklılaşması.	5
Şekil 2.3: <i>Streptomyces</i> farklılaşmasını ve ikincil metabolit üretimini başlatan biyokimyasal yollar.	6
Şekil 2.4: <i>Streptomyces coelicolor</i> kolonisinin aktinorhodin pigmenti içeren damlacıklar salgılaması.	7
Şekil 4.1: <i>S. coelicolor</i> ile boyanmış küçük bir kumaş parçası	15
Şekil 7.1: <i>S. coelicolor</i> A3(2) yaban suş ve rekombinant suşların 25 °C’de büyüme grafiği.	31
Şekil 7.2: <i>S. coelicolor</i> A3(2) yaban suş ve rekombinant suşların 25 °C’de aktinorhodin üretimleri.	32
Şekil 7.3: <i>S. coelicolor</i> A3(2)’nin yaban suş ve rekombinant suşlarının 30 °C’de büyüme grafiği.	33
Şekil 7.4: <i>S. coelicolor</i> A3(2)’nin yaban suş ve rekombinant suşlarının 30 °C’de aktinorhodin üretme profillerinin karşılaştırılmalı grafiği.	34
Şekil 7.5: <i>S. coelicolor</i> A3(2)’nin yaban suş ve rekombinant suşlarının 35 °C’de büyüme grafiği.	35
Şekil 7.6: <i>S. coelicolor</i> A3(2)’nin yaban suş ve rekombinant suşlarının 35 °C’de aktinorhodin üretme profillerinin karşılaştırılmalı grafiği.	36
Şekil 7.7: <i>S. coelicolor</i> A3(2)’nin yaban suş ve rekombinant suşlarının pH=6’da büyüme grafiği.	37
Şekil 7.8: <i>S. coelicolor</i> A3(2)’nin yaban suş ve rekombinant suşlarının pH=6’da aktinorhodin üretme profillerinin karşılaştırılmalı grafiği.	38
Şekil 7.9: <i>S. coelicolor</i> A3(2)’nin yaban suş ve rekombinant suşların pH=6.30’da büyüme grafiği.	39
Şekil 7.10: <i>S. coelicolor</i> A3(2)’nin yaban suş ve rekombinant suşlarının pH=6.30’da aktinorhodin üretme profillerinin karşılaştırılmalı grafiği.	40
Şekil 7.11: <i>S. coelicolor</i> A3(2)’nin yaban suş ve rekombinant suşlarının pH=6.50’de büyüme grafiği.	41
Şekil 7.12: <i>S. coelicolor</i> A3(2)’nin yaban suş ve rekombinant suşlarının pH=6.50’de aktinorhodin üretme profillerinin karşılaştırılmalı grafiği.	42
Şekil 7.13: <i>S. coelicolor</i> A3(2)’nin yaban suş ve rekombinant suşlarının pH=7’de büyüme grafiği.	43
Şekil 7.14: <i>S. coelicolor</i> A3(2)’nin yaban suş ve rekombinant suşlarının pH=7’de aktinorhodin üretme profillerinin karşılaştırılmalı grafiği.	44
Şekil 7.15: <i>S. coelicolor</i> A3(2)’nin yaban suş ve rekombinant suşlarının ISP-4 besiyerinde büyüme grafiği.	45

Şekil 7.16: <i>S. coelicolor</i> A3(2)'nin yaban suş ve rekombinant suşlarının ISP-4 besiyerinde aktinorhodin üretme profillerinin karşılaştırılmalı grafiği.	46
Şekil 7.17: <i>S. coelicolor</i> A3(2)'nin yaban suş ve rekombinant suşlarının ISP-4 besiyerinde fermentasyon başlangıcında kültürlerin görüntüsü.	46
Şekil 7.18: <i>S. coelicolor</i> A3(2)'nin yaban suş ve rekombinant suşlarının ISP-4 besiyerinde 168. saatte fermentasyon sonunda kültürlerin görüntüsü.	47
Şekil 7.19: <i>S. coelicolor</i> A3(2)'nin yaban suş ve rekombinant suşlarının ISP-4 besiyerinde fermentasyonu sonrası antibiyotik ölçümüne hazırlanmış örnek bir Eppendorf görüntüsü.	47
Şekil 7.20: <i>S. coelicolor</i> A3(2)'nin yaban suş ve Sco-pRA _{lon} suşlarının farklı hacimlerde aktinorhodin antibiyotiği üretme profilleri.	48
Şekil 7.21: Sco-pRA _{lon} suşunun farklı inokulum miktarlarında büyüme grafiği.	49
Şekil 7.22: Sco-pRA _{lon} suşunun farklı inokulum miktarlarında aktinorhodin antibiyotiği üretme profilleri.	49
Şekil 7.23: Sco-pRA _{lon} suşunun farklı çalkalama hızında gerçekleştirilen fermentasyonlarda aktinorhodin üretme profilleri.	50
Şekil 7.24: Sco-pRA _{lon} suşunun biyoreaktör ve Erlenmeyerde aktinorhodin ve undesilprodigiosin antibiyotiklerini üretme profilleri.	52
Şekil 7.25: Farklı saatlerde Sco-pRA _{lon} kültürünün fermentördeki görünümü. Çepere yapışan biyokütlenin ürettiği ikincil metabolitler renk değişimiyle ayırt edilmektedir (72. ve 120. saatlerde).	53
Şekil 7.26: A) Asidik ortamda farklı sürelerde inkübe edilerek çöken aktinorhodinin ağırlıkları. B) Asidik ortamda farklı sürelerde inkübe edilerek çöken aktinorhodinin spektrofotometre ile ölçüm sonuçları	54
Şekil 7.27: Aktinorhodin ile kumaş boyama sonrası yapılan yıkama işleminde yıkama suyuna akan boyaların spektrofotometre ölçüm sonuçları.	56
Şekil 7.28: Aktinorhodin ile boyama ve yıkama işlemlerinden sonra boyanan kumaş gruplarının görüntüleri.	57
Şekil 7.29: Safılaştırılan aktinorhodinin farklı pH derecelerinde kullanıldığı kumaş boyama örnekleri.	57

TABLolar/ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 5.1: Çalışmada kullanılan <i>S. coelicolor</i> suşları.	17
Tablo 5.2: Kullanılan besiyerleri ve içerikleri.	18
Tablo 5.3: Kullanılan Çözeltiler.	19
Tablo 6.1: p-değerinin istatistiksel olarak anlamlılık değerleri.	26
Tablo 6.2: Kumaş boyama deneyinin gruplarının sınıflandırılması.	29

1. GİRİŞ

Antibiyotik ve diğer önemli ikincil metabolitleri üreten *Streptomyces* türleri, biyoteknolojik açıdan önemli organizmalar olup Actinomycetales sınıfına ait toprakta yaşayan Gram pozitif bakterilerdir [Chater vd., 1984; Vassallo A vd., 2020]. *Streptomyces* cinsi, bakteriler arasında nadir rastlanan özellikler olan %70'in üzerinde G+C içeriğine ve doğrusal yapıdaki, orta büyüklükte (8–10 Mb) bir genom organizasyonuna sahiptir [Hopwood, 2019]. Streptomisetler, bir sporun çimlenmesiyle başlayan ve daha sonra vejetatif hiflerden oluşan dallı bir miselyum oluşturmak üzere büyüyen karmaşık bir yaşam döngüsüne sahiptir [Chater vd., 1984]. Morfolojik farklılaşma başladığında, havaya doğru uzanan miseller gelişir ve bu hava hifleri sonunda spor zincirlerini oluşturur. *Streptomyces*'in aynı zamanda antikanser ajanları, büyüme faktörleri ve herbisitler gibi çeşitli biyoaktif sekonder metabolitleri sentezleme kapasitesine sahip olduğu birçok çalışmada ortaya konmuştur [Harir vd., 2018]. Sekonder metabolit üretimi, büyümenin durması ve sporülasyonun başlangıcıyla aynı zamana denk gelir ve bu aşamada bakterinin misel yapısı da değişir [Yagüe vd., 2013].

Karmaşık bir yaşam döngüsüne sahip olan *Streptomyces*'lerin ikincil metabolit üretimi biyoreaktörlerde gerçekleştirilirken, bu şartlardaki hücresel farklılaşması neredeyse hiç incelenmemiştir. Rioseras vd. 2014 yılında yayımladıkları çalışmada, Erlenmayerde büyütülen *Streptomyces* suşlarına göre biyoreaktör koşullarında misellerin daha fazla parçalandığını bildirmişlerdir [Rioseras vd., 2014]. Bunu önlemek için çalkalama hızı azaltılmış, pervaneler daha yumuşak (eğimli bıçaklı) olanlarla değiştirilmiş ancak hücrelerin parçalanması engellenememiştir. Kültür ortamına %1 köpük önleyici madde eklenmesiyle hücre parçalanmasının bir miktar önlendiği bildirilmiştir. Bunun nedeni olarak köpük önleyicinin hidrofobik kuvvetler aracılığıyla misel peletlerinin yüzeyini kaplaması olabileceğini öne sürmüşlerdir [Rioseras vd., 2014].

Lon proteaz bütün canlılarda bulunan ve hücresel farklılaşma, stres yanıtı, proteoliz gibi süreçlerde çok önemli görevleri olan bir enzimdir. *Escherichia coli*'de sınırlandırılmış yanıt mekanizmasında (p)ppGpp ve poliP birikimi, Lon proteazın aktivasyonu ile ribozomal proteinlerin yıkımını tetiklemektedir [Kuroda, 2001]. Lon

proteazın, sekonder metabolit üretimiyle ilişkili olabileceği önerilmiş [Tsilibaris vd., 2006], nitekim *S. coelicolor* bakterilerinde Lon proteaz ile ikincil metabolit üretimi arasındaki ilişki grubumuzca yapılan çalışmalarla ilk kez aydınlatılmıştır. *lon* genini yüksek miktarda ifade eden Sco-pRA_{lon} ve Sco-pSPG_{lon} suşlarının yaban suşa kıyasla belirgin şekilde daha yüksek düzeyde aktinorhodin ürettiği bildirilmiştir [Demir vd., 2019; Yılmaz, 2019]. Bu çalışmada, söz konusu rekombinant suşların antibiyotik üretimleri optimize edilerek büyük hacimde üretim verimleri denenmiş ve izole edilen renkli antibiyotiğin kumaş boyası olarak kullanımı değerlendirilmiştir.

1.1. Literatür Özeti, Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

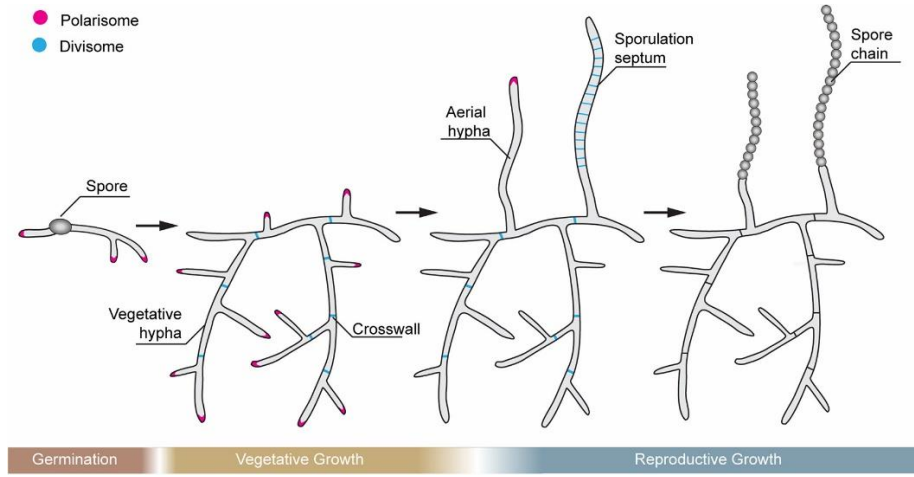
Laboratuvarımızdaki önceki çalışmalarda, Lon proteaz ve ikincil metabolit üretimi arasındaki ilişkiyi anlamak için *lon* genini yüksek düzeyde ifade eden iki *S. coelicolor* A3(2) rekombinant suşu, Sco-pRA_{lon} ve Sco-pSPG_{lon} oluşturulmuştur [Demir vd., 2019; Yılmaz, 2019]. Her iki suşun da yaban suştan çok daha fazla antibiyotik ürettiği bildirilmiştir [Demir vd., 2019; Yılmaz, 2019]. Bu çalışmanın amacı, rekombinant suşların (Sco-pRA_{lon} ve Sco-pSPG_{lon}) antibiyotik üretimlerini optimize etmek, fermentörde büyük ölçekli üretim gerçekleştirmek ve bu doğal ürünün kumaş boyası olarak kullanımını değerlendirmektir. Bu çalışma kapsamında *S. coelicolor* rekombinant suşları ile sıcaklık, pH, besiyeri içeriği, inokulum miktarı, besiyeri hacmi ve çalkalama hızı gibi parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirilmiş ve aktinorhodin üretimi açısından en verimli suş belirlenmiş ve fermentör koşullarında aktinorhodinin büyük ölçekli üretimi üzerine çalışmalar yürütülmüştür. Literatürde *S. coelicolor* tarafından üretilen aktinorhodinin kumaş boyası olarak kullanılabileceğine dair bilgiler yalnızca fikir aşamasında olup, daha önce Ginkgo Bioworks bünyesinde tasarımcı Natsai Audrey Chieza tarafından gerçekleştirilen deneme niteliğindeki boyama örnekleri dışında bilimsel olarak yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez kapsamında, laboratuvarımızda elde edilmiş yüksek antibiyotik üreticisi bir suş kullanılarak bu konunun ilk kez bilimsel olarak ele alınmış olması, sadece temel bilim için değil aynı zamanda biyoteknoloji ve tekstil endüstrileri için de değer taşımaktadır.

2. *STREPTOMYCES*'LER

Actinomycetales şubesine ait *Streptomyces*'ler antibiyotikler, immünosüpresanlar ve herbisitler gibi biyolojik bileşiklerin yaygın olarak çok verimli bir kaynağı olarak kabul edilmektedir [Vassallo A vd., 2020]. *Streptomyces* bakterileri çevrede bol miktarda bulunur, kolayca kültürlenebilir ve toprak bakterileri olarak bilinmelerine rağmen deniz tortularında ve tatlı su ekosistemlerinde de bulunabilirler [Jensen vd., 1991; Klausen vd., 2005]. *Streptomyces* türlerini çevresel yaygınlıklarının ötesinde bilimsel açıdan ilgi çekici kılan başlıca unsurlar, atipik genom yapıları, mantar benzeri büyüme özellikleri ve çeşitli biyoaktif doğal ürünleri sentezleyebilme kapasiteleridir [Schlimpert vd., 2023]. *Streptomyces*, Aktinobakteri sınıfının en geniş cinsi olup, Gram pozitif, spor oluşturan, filamentöz yapılı ve aerobik bir bakteri grubudur [Chater vd., 1984]. *Streptomyces* cinsi, bakteriler arasında nadir rastlanan özellikler olan %70'in üzerinde G+C içeriğine ve doğrusal yapıdaki, orta büyüklükte (8–10 Mb) bir genom organizasyonuna sahiptir [Hopwood, 2019]. Genomları, antimikrobiyal dirençle mücadelede önemli rol oynayan antibiyotikler de dahil olmak üzere, klinik açıdan değer taşıyan 20'den fazla sekonder metabolit biyosentez gen kümesi içermektedir [Hopwood vd., 2019]. Doğal antibiyotiklerin yaklaşık üçte ikisi aktinomiset kökenli olup, bunların %70'i *Streptomyces* türlerinden elde edilmekte ve bu bileşikler günümüzde klinikte kullanılan antibiyotiklerin yaklaşık %75'ini oluşturmaktadır [Watve vd., 2001; Sivalingam vd., 2019]. *Streptomyces*'in aynı zamanda antikanser ajanlar, büyüme faktörleri ve herbisitler gibi çeşitli biyoaktif sekonder metabolitleri sentezleme kapasitesine sahip olduğu birçok çalışmada ortaya konmuştur [Harir vd., 2018]. *Streptomyces* türleri, 16S rDNA dizilemesi ve DNA-DNA hibridizasyon analizleri ile diğer aktinobakteri üyelerinden ayırt edilebilmektedir [Khadayat vd., 2020].

Streptomyces türleri, çeşitli çevresel koşullara uyum sağlamak ve yaşamlarını sürdürebilmek için gelişmiş morfolojik ve fizyolojik mekanizmalara sahiptir. Filamentöz mantarların yaşam döngüsüne oldukça benzeyen ve yakınsak evrimin bir sonucu olduğu düşünülen klasik yaşam döngüleri (Şekil 2.1), uçtan uzayan hiflerin gelişimi ve bunu takip eden spor oluşum süreciyle tanımlanır [Talbot, 2003]. Hif uzaması, polarizom olarak adlandırılan biyosentetik bir kompleks tarafından yönlendirilir ve bu süreç filamentöz hücrelerin uç kısımlarında gerçekleşir (Şekil 2.1)

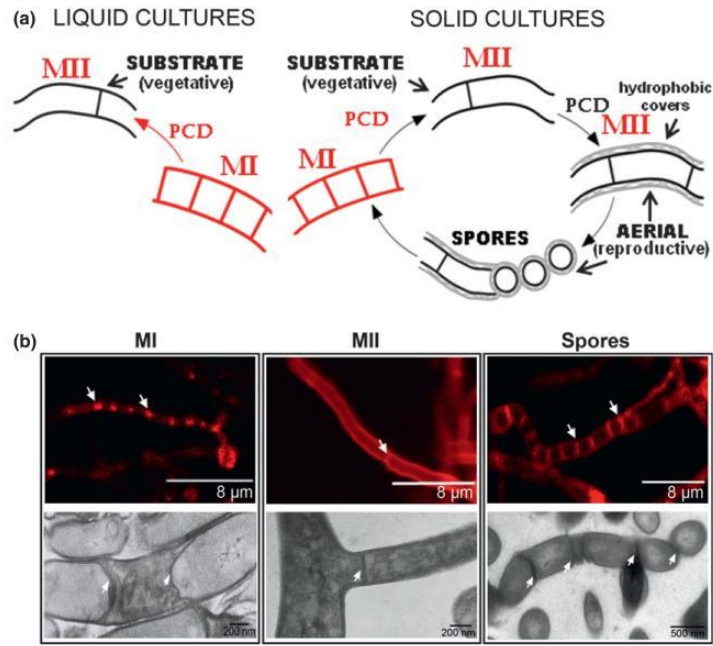
[Hempel vd., 2012]. Vejetatif hücrelerde sıkça gözlenen hif dallanmasına karşın, hücre bölünmesiyle septum oluşumu nadirdir ve bu durum, birden fazla kromozom taşıyan geniş vejetatif hif bölmelerinin oluşumuna yol açar [Schlimpert vd., 2023]. Üreme evresinde ise, yüzeyden yükselen ve hidrofobik proteinlerle kaplı, dallanmayan özel hava hifleri oluşur [Willey vd., 1991; Elliot vd., 2003]. Bu hiflerde kromozomlar düzenli aralıklarla ayrılır ve hücreler, senkronize bir bölünme süreci geçirerek tek genomlu spor öncesi bölmeler meydana getirir [Schlimpert vd., 2023]. Zamanla olgunlaşan bu yapılar, çevresel etkilere karşı dayanıklı spora dönüşerek yaşam döngüsünü tamamlar [Schlimpert vd., 2023].



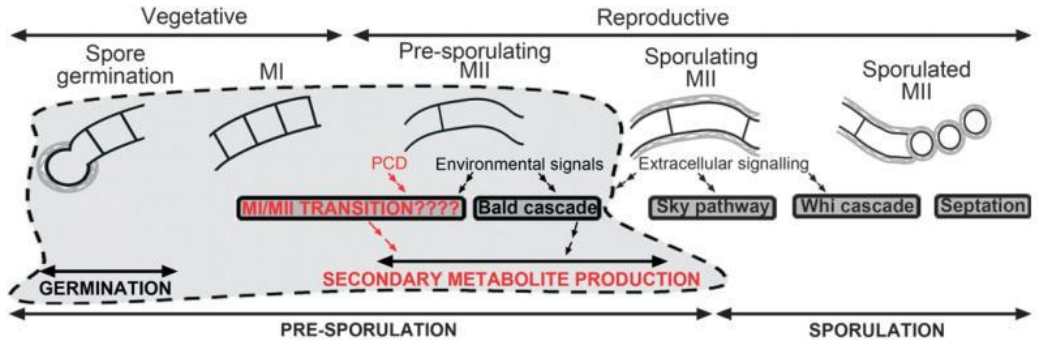
Şekil 2.1: *Streptomyces* türlerinde yaşam döngüsünün şematik gösterimi [Schlimpert vd., 2023].

Streptomyces, Şekil 2.2’de şematize edildiği gibi programlanmış hücre ölümü (PCD) ve sporulasyonu içeren karmaşık bir gelişim döngüsüne sahip miselyal mikroorganizmalardır [Claessen vd., 2006; Yagüe vd., 2013]. *Streptomyces*’in klasik gelişim döngüsü, uzun süre yalnızca katı ortamlarda gerçekleşen sporulasyon sürecine odaklanmış olsa da, daha sonraki çalışmalar bu modele hava miselyumu ve sporulasyon öncesi evreleri de dahil ederek genişletmiştir [Flärdh ve Buttner, 2009; Manteca vd., 2005, 2006a]. Gelişim, bölmeli yapıya sahip ilk miselyum (MI) ile başlar; bu yapı kalın hücre duvarından yoksun zarlarla sınırlandırılmış septalarla ayrılır [Yagüe vd., 2013]. MI evresinde bazı hücreler düzenli bir programlanmış hücre ölümüne (PCD) uğrarken, hayatta kalan hücreler çok nükleotidli ikinci miselyum (MII) formuna dönüşür [Rioseras vd., 2014]. MII, başlangıçta besiyerinin içinde

gelişirken, zamanla chaplin ve rodlin proteinlerini sentezleyerek yüzey hidrofobisitesi kazanır ve hava miselyumuna dönüşerek sporulasyonu başlatır [Claessen vd., 2006; Manteca vd., 2007]. Spor oluşumundan önce substrat ve hava miselyumunu etkileyen ikinci bir PCD evresi daha gözlenmiştir [Wildermuth, 1970; Mendez vd., 1985; Miguelez vd., 1999]. MI evresi *Streptomyces*'te vejetatif işlev görürken, MII evresi hem sporulasyonun hem de sekonder metabolit üretiminin gerçekleştiği gelişim aşamasını oluşturur (Şekil 2.3) [Yagüe vd., 2013]. Bu gelişimsel model, ilk olarak *Streptomyces antibioticus* ATCC11891 ve *Streptomyces coelicolor* M145 suşlarında tanımlanmış olup, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces cinereoruber* gibi farklı türlerin yanı sıra çok sayıda sınıflandırılmamış *Streptomyces* izolatında da benzer şekilde gözlemlenmiştir [Yagüe vd., 2013]. Ayrıca, sıvı kültürlerde spor oluşumu gerçekleşmese de, MI'dan MII'ye geçiş ve PCD gibi farklılaşma evrelerinin katı ortamlardaki gelişimle benzerlik gösterdiği ortaya konmuştur [Yagüe vd., 2013].



Şekil 2.2: *Streptomyces* gelişim döngüsü ve miselyum farklılaşması. (a) Sıvı (sol) ve katı (sağ) kültürlerde *Streptomyces* gelişim döngüsü. (b) Konfokal ve elektron mikroskopları ile farklı miselyum tiplerinin örnek görüntüleri. Solda, MI genç bölmeli hif, ortada MII çok nükleoidli hif, sağda sporlanmış hif [Yagüe vd., 2013].

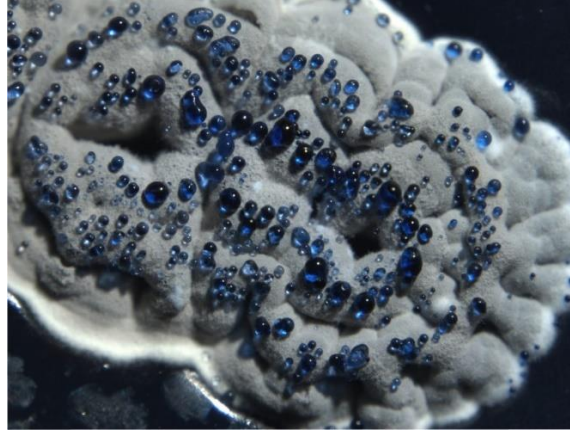


Şekil 2.3: *Streptomyces* farklılaşmasını ve ikincil metabolit üretimini başlatan biyokimyasal yollar [Yagüe vd., 2013].

2.1. *Streptomyces coelicolor*

Streptomyces cinsinin genetik çalışmalarında model organizma olarak kabul edilen *Streptomyces coelicolor* A3(2), bu alandaki pek çok gelişmenin temelini oluşturmuştur. Yaklaşık 8,6 Mb uzunluğunda, %72,1 GC içeriğine sahip doğrusal bir kromozoma sahip olan bu tür, yaklaşık 7800 gen kodlamaktadır [Bentley vd., 2002]. Genomuna ek olarak, biri doğrusal (SCP1, 356 kb; %69,1 GC) ve diğeri dairesel (SCP2, 31 kb; %72,1 GC) olmak üzere iki epizomal plazmit taşır [Bentley vd., 2004; Haug vd., 2003]. *S. coelicolor* A3(2), özel metabolit üretiminden sorumlu en az 27 biyosentetik gen kümesi ile dikkat çeker ve bu türde genetik rekombinasyonun keşfi genetik haritalamanın yanı sıra ileri tekniklerin geliştirilmesine de olanak sağlamıştır [Sermonti, 1955].

S. coelicolor'u model organizma olarak benimsenmesinde etkili olan faktörlerden biri görsel olarak ayırt edilebilir pigment üretim kapasitesidir. Tür adı "coelicolor" Latince "cennet renkli" veya "gök renkli" anlamına gelir, kültür ortamında sentezlenen ve kolonilere mavi renk veren aktinorhodin pigmentine atıfta bulunur (Şekil 2.4) [Bystrykh vd., 1996]. Ayrıca olgun sporlarla ilişkili gri pigmentin yanı sıra kırmızı (undesilprodigiosin) ve sarı (koelimsin) gibi diğer özel metabolitleri de üretir [Tsao vd., 1985; Pawlik vd., 2010]. Pigment sentez yollarındaki mutasyonlar, koloni renginde gözle görülür değişikliklere neden olduğu için, genetik analizlerde kolay tanımlanabilir fenotipler sunar [Schlimpert vd., 2023].



Şekil 2.4: *Streptomyces coelicolor* kolonisinin aktinorhodin pigmenti içeren damlacıklar salgılaması. Görüntü, Zeiss Axiozoom v.16 mikroskobu ve AxioCam 506 renkli kamera ile alınmıştır [Zacharia, 2016].

2.2. *S. coelicolor*'un Sekonder Metabolit Biyosentezi

Streptomyces cinsi, çok sayıda antibiyotik ve ilgili bileşiklerin kaynağı olup tıbbi olarak önemli antimikrobiyal ve antitümör ajanlarının yarısından fazlasının üreticisidir. Bu ajanlar, farmasötik ve biyoteknoloji endüstrilerinde önemli bir yere ve klinik çalışmalarda kullanılma potansiyeline sahiptir. Sekonder metabolit üretimi, *Streptomyces*'lerin yaşam döngülerinde programlanmış hücre ölümü (PCD) ve ikincil miselyum oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. Yaşam döngüsü boyunca iki kez programlanmış hücre ölümüne uğrayan *Streptomyces*, çevresel tehlikelere daha duyarlı olabilir. Hücre içi bölmelere sahip birincil miselyumların PCD yoluyla çok nükleoitidli ikincil miselyumlara dönüşümü, organizmaya besin taşınımı ve sinyal yolları açısından avantaj sağlar. Fakat hava hiflerinin hızlı büyümesi ve replikasyon hızının artması genetik hataların meydana gelmesine ve bu hataların tamamen yayılmasına yol açabilir. Ayrıca, PCD tarafından açığa çıkarılan hücre kalıntıları *Streptomyces* için bir besin kaynağı sağlarken, aynı zamanda diğer organizmalar için de besin kaynağı oluşturur. Farklılaşma sırasında daha savunmasız hale gelebilen koloninin, kendi avantajına kullanabileceği ikincil metabolitleri üretmesi diğer organizmalara karşı koruma sağlarken, aktinorhodin ve undesilprodigiosin gibi pigmentli ikincil metabolitlerin UV ışığına karşı koruduğu da düşünülmektedir.

Streptomyces türlerinde ikincil metabolit üretimi ve hücresel gelişim birbirine sıkı biçimde bağlı süreçlerdir. Bu ilişkide besinlerin tükenmesi, farklılaşmayı tetikleyen ve hücreleri sporulasyona yönlendiren temel etkenlerden biri olarak öne çıkmaktadır.

GntR ailesine ait küresel düzenleyicilerden DasR, actII-ORF4 ve redZ genlerinin transkripsiyonunu baskılamaktadır. Programlanmış hücre ölümü (PCD) sırasında hücre duvarlarının yıkımı sonucunda ortamın N-asetilglukozamin (GlcNAc) ile zenginleşmesi, özellikle besin kıtlığı koşullarında DasR'ın baskılayıcı etkisini ortadan kaldırarak antibiyotik biyosentetik gen kümelerinin aktive olmasına aracılık eder [Rigali vd., 2008]. GlcNAc'ye bağlı bu beslenme sinyalizasyonu, farklılaşma ile antibiyotik üretimi arasındaki bağlantının önemli kanıtlarından biri olarak değerlendirilmektedir.

Bu ilişkiye örnek teşkil eden bir diğer mekanizma sınırlandırılmış yanıttır. Açlık koşullarında yüksüz tRNA'ların uyardığı bu sistemde, RelA veya SpoT aracılığıyla GTP ve ATP'den alarmonlar, (p)ppGpp, sentezlenir. Hücrede (p)ppGpp birikimi, büyüme, adaptasyon, ikincil metabolizma, hayatta kalma, persiste olma, hücre bölünmesi, motilite, biyofilm oluşumu, gelişim, yetkinlik ve virülans gibi birçok süreci etkilemektedir [Potrykus & Cashel, 2008]. *relA* geni işlevsiz hale getirilmiş *S. coelicolor* mutantlarında ppGpp sentezlenememesi metabolik stresin ortaya çıkmasına ve farklılaşmanın bozulmasına yol açmaktadır [Hesketh vd., 2007]. Bunun yanında, polifosfat metabolizmasının düzenlenmesi de *Streptomyces* gelişimi için kritik öneme sahiptir. Örneğin, yaşam döngüsünün ana düzenleyicisi BldD'nin baskılayıcı aktivitesi, c-di-GMP ile oluşturduğu kompleks aracılığıyla sağlanırken sporlanma için gerekli transkripsiyonel aktivatör WhiG'nin işlevi de yine c-di-GMP tarafından kontrol edilmektedir. ppGpp ve c-di-GMP'nin üretimlerinin GTP metabolizmasına bağlı olması, polifosfat mekanizması, stres yanıtı ve gelişim süreçleri arasındaki etkileşimi açıkça ortaya koymaktadır [Sivapragasam & Grove, 2019].

Ayrıca, farklılaşmayı veya ikincil metabolit biyosentezini etkileyen genetik değişikliklerin, bu iki sürecin birbirini karşılıklı olarak düzenlediğini gösteren pek çok bulgu mevcuttur. *Streptomyces* cinsinde tanımlanmış bakteriyel hormonlar arasında en yaygın olanları γ -bütürolaktonlardır. Bu sinyal moleküllerinin sentezinden *S. coelicolor*'da ScbA enzimi sorumlu olup, SCB adı verilen butanolitlerin biyosentezini gerçekleştirir. Bir çalışmada *scbA* geninin mutasyonu sonucunda, antibiyotik gen kümelerinin yanı sıra gelişimle ilişkili genlerin ekspresyonunda da farklılıklar gözlenmiştir [D'Alia vd., 2011]. Başka bir çalışmada ise, farklılaşmanın negatif düzenlenmesinde görev alan bir ECF σ faktörü olan SigT'nin ClpP proteazı aracılığıyla yıkıldığını göstermiştir. Aynı çalışmada, *sigT* mutasyonunun antibiyotik

üretimi ve farklılaşmayı erken dönemde indüklediği, ancak genin aşırı ekspresyonunda her iki sürecin de geciktiği rapor edilmiştir [Mao vd., 2013]. Benzer şekilde, Sco4117 olarak adlandırılan bir başka ECF sigma faktörünün devre dışı bırakıldığı mutantlarda aktinorhodin ve CDA üretiminde azalma, hava miselyumu oluşumunda ve sporlanmada ise gecikmeler gözlenmiştir [López-García vd., 2018]. Ayrıca, lösin-duyarlı düzenleyici protein (Lrp) ailesine ait Sco2140 geninin bozulmasının, aktinorhodin ve CDA antibiyotiklerinin üretimini ciddi biçimde düşürdüğü ve hava miselyumlarının gelişimini geciktirdiği bildirilmiştir [Yu et vd., 2016].

2.3. *Streptomyces*'lerde Lon Proteaz ile Sekonder Metabolit Üretiminin İlişkisi

Streptomyces türlerinde ikincil metabolit üretimi pek çok genetik ve çevresel faktörle düzenlenmesine rağmen, bu faktörleri entegre eden düzenleyici ağlar hala yeterince aydınlatılamamıştır [Bibb, 2005; Liu vd., 2013]. Besin kaynaklarının azalması gibi stres koşulları, (p)ppGpp alarmonlarının sentezini tetiklemekte ve bu moleküller *Streptomyces*'lerde antibiyotik biyosentezini uyarmaktadır [Hesketh vd., 2007; Bibb, 2005; Martín ve Demain, 1980]. *relA* geninden yoksun mutantlarda bu alarmonların yokluğu, actII-ORF4 ve redD transkripsiyonunu baskılayarak ACT ve RED üretiminin azalmasına neden olmaktadır [Hesketh vd., 2007].

Sınırlı cevap koşullarında poliP birikimi, alarmon sentezi ile paralel olarak ortaya çıkan bir diğer stres göstergesidir [Kuroda vd., 1999]. PoliP metabolizmasındaki değişikliklerin, antibiyotik üretimini artırdığı gösterilmiştir. Örneğin, *ppk* geninin silindiği *S. lividans* ve *S. coelicolor* suşlarında ACT üretimi artmış, bu durum enerji dengesini sağlamak için antibiyotik üretime yönelimle ilişkilendirilmiştir [Chouayekh ve Virolle 2002; Ghorbel vd., 2006; Demir, 2018]. Ayrıca, poliP yıkımı sonucu oluşan inorganik fosfatın dış ortamda antibiyotik biyosentezini baskıladığı; PhoR-PhoB sisteminin delesyonuyla ise düşük fosfat koşullarında aktinorhodin (ACT) ve undesilprodigiosin (RED) üretiminin arttığı raporlanmıştır [Martín, 2004; Solalanda vd., 2003].

Escherichia coli'de (p)ppGpp ve poliP birikimi, Lon proteazın aktivasyonu ile ribozomal proteinlerin yıkımını tetiklemektedir [Kuroda, 2001]. Hücresel farklılaşma, stres yanıtı ve proteoliz süreçlerinde görev alan Lon proteazın, sekonder metabolit üretimiyle ilişkili olabileceği önerilmiştir [Tsilibaris vd., 2006]. Ancak bu bağlantıyı

gösteren sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 suşunda yapılan bir çalışmada, Lon proteazın antibiyotik üretimini negatif yönde düzenlediği bildirilmiştir [Whistler vd., 2000].

Laboratuvarımızda daha önce gerçekleştirilen çalışmalar kapsamında *S. coelicolor*'da Lon proteaz ve antibiyotik üretimi arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla, genomuna *lon* geni entegre edilen rekombinant bir suş oluşturulmuştur. Bu suşta, aktinorhodin üretimi 34 kat, undesilprodigiosin üretimi ise 9 kat artmıştır [Demir vd., 2019]. Benzer şekilde, poliP sentezinden sorumlu *ppk* geninin silindiği *S. coelicolor* M145 Δppk suşunda da aktinorhodin üretiminde 8,5 katlık bir artış gözlenmiştir [Demir, 2018]. Laboratuvarımızda yapılan başka bir çalışmada elde edilen Sco-pSPG*lon* suşunun ise yaban suştan yaklaşık 25 kat daha fazla aktinorodin ürettiği bildirilmiştir (Yılmaz, 2019). Ayrıca *relA* geninin aşırı ifade edildiği bir rekombinant suşta, (p)ppGpp düzeyinin artmasıyla sekonder metabolizmanın uyarıldığı ortaya konmuştur [Cesur, 2018].

3. *S. COELICOLOR* İLE FERMENTÖRDE BÜYÜK ÖLÇEKLİ SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİ

İkincil metabolit üretimi için çoğu işlem fermentörde gerçekleştirilir. Bununla birlikte, *Streptomyces*'in bu koşullar altında farklılaşması neredeyse hiç incelenmemiştir, bunun başlıca nedeni *Streptomyces* suşlarının çoğunun bu koşullar altında sporlanmamasıdır [Rioseras vd., 2014]. Bu kapsamda Rioseras ve diğerlerinin 2014'te yaptıkları *Streptomyces* fermentasyon analizi ve optimizasyonu odaklı çalışmalarında miselyal gruplama (peletler, kümeler), ortam bileşimi, oksijenasyon, pH, çalkalama, sıcaklık ve ikincil metabolit üretim seviyeleri gibi biyofiziksel parametrelerin analizi yapılmıştır [Rioseras vd., 2014]. Bu çalışma dışında, kültür ortamının optimum bileşimini test eden ve sekonder metabolit üretimi için en uygun morfolojinin (dağılmış hifler, kümeler veya peletler gibi) analiz edildiği çalışmalar bulunmaktadır [Wentzel vd., 2012; van Veluw vd., 2012; van Wezel vd., 2006]. Diğer çalışmalarda, biyoreaktör hidrodinamiğinin *Streptomyces* fizyolojisi üzerindeki etkileri analiz edilmiş ve üretken suşlar rastgele veya yönlendirilmiş mutagenезe göre optimize edilmiştir [Olmos vd., 2013; van Wezel vd., 2006]. Ancak, *Streptomyces*'in bu koşullar altındaki karmaşık gelişimi tam olarak anlaşılmamış ve bunun doğrudan bir sonucu olarak, morfolojinin ve diğer biyofiziksel parametrelerin sekonder metabolit üretimiyle nasıl ilişkili olduğu konusunda genel bir fikir birliği oluşturulamamış ve fermentasyon parametrelerinin her suş ve bileşik için ampirik olarak optimize edilmesi gerektiği bildirilmiştir [Rioseras vd., 2014]. Örneğin, pelet ve küme oluşumunun retamisin veya nikkomisin üretim için gerekli olduğu [Pamboukian ve Facciotti, 2004], ama virginiamisin üretimi için morfoloji ve sekonder metabolit üretimi arasında bir ilişki bulunmadığı gösterilmiştir [Yang ve ark., 1996]. Diğer yandan yüksek çözünmüş oksijen geriliminin (DOT) vankomisin üretimi için gerekliyken eritromisin üretimi için gerekli olmadığı bildirilmiştir [Dunstan ve ark., 2000; Clark ve ark., 1995].

Rioseras ve ark. (2014) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *Streptomyces coelicolor* M145 suşunun biyoreaktör koşullarında morfolojik farklılaşması ile sekonder metabolit üretimi arasındaki ilişki incelenmiştir [Rioseras vd., 2014]. Çalışma, laboratuvar şişeleri ile biyoreaktör fermentasyonları arasında gelişimsel ve fizyolojik

farkları ortaya koymayı ve bu farkların antibiyotik üretimi üzerindeki etkilerini değerlendirmeyi amaçlamıştır [Rioseras vd., 2014]. Biyoreaktörde yaklaşık 50. saatte gözlemlenen belirgin miselyal pelet parçalanması, hücre içi protein miktarında ciddi bir azalma ile ilişkilendirilmiş ve bu durumun laboratuvar şişelerinde gerçekleşmediği raporlanmıştır. Ayrıca, biyoreaktörde yaklaşık 70. saatte canlı hücrelerin %5'inde sporülasyon benzeri bir sürecin başladığı gözlemlenmiştir. Bu farklılaşmalar, sekonder metabolit sentezini de etkilemiş; undesilprodigiosin ve aktinorhodin üretimi biyoreaktörde daha erken başlamasına rağmen (50. saatte), toplam üretim düzeyleri laboratuvar şişelerine kıyasla belirgin şekilde düşük kalmıştır [Rioseras vd., 2014]. Biyoreaktör parametreleri (çözünmüş oksijen gerilimi (DOT), oksijen alım oranı – (OUR), çalkalama hızı) ile farklılaşma süreçleri arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur [Rioseras vd., 2014]. Mİ evresinde OUR maksimuma ulaşmış, ancak MII aşamasında pelet lizisi nedeniyle bu değerler elde edilememiştir. Ayrıca OUR değerleri OTR'nin altında kalarak oksijenin sınırlayıcı olmadığı gösterilmiştir [Rioseras vd., 2014]. Lizisi önlemeye yönelik olarak %1 oranında köpük önleyici madde (Biospumex 153K) eklenmesi, pelet bütünlüğünü korumuş ve hücre içi protein miktarını artırmıştır, bu koşullarda undesilprodigiosin üretimi artarken, aktinorhodin üretimi sınırlı kalmaya devam etmiştir. Sonuç olarak, Rioseras ve arkadaşlarının çalışması, *Streptomyces* fermentasyonlarında morfolojik gelişim süreçlerinin dikkatle izlenmesinin ve biyofiziksel parametrelerle birlikte değerlendirilmesinin, sekonder metabolit üretiminin optimizasyonu açısından kritik önem taşıdığını ve özellikle biyoreaktör koşullarına özgü lizis olgusunun, antibiyotik üretim potansiyelini sınırlandırabileceğini vurgulamıştır [Rioseras vd., 2014].

4. ORGANİK TEKSTİL BOYALARI

Sentetik boyalar, yenilenemeyen petrokimyasallardan elde edilmekte olup, karmaşık kimyasal yapılara sahiptir ve birçok endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılmaktadır [Health and Safety Executive (HSE), 2016]. Küresel olarak yılda 800.000 tondan fazla endüstriyel boya üretilmekte ve bu boyaların yaklaşık %75'i tekstil endüstrisinde tüketilmektedir [Hassaan ve Nemr, 2017]. Ancak, boyama işlemleri sırasında sentetik boyaların büyük bir kısmı tekstil ürünlerine bağlanmadan %70–90 oranında atık sulara geçmekte, bu durum ciddi çevresel kirlenmeye yol açmaktadır [Pizzicato vd., 2023]. Ayrıca, sentetik boyalara maruz kalmanın insan sağlığı üzerinde olumsuz etkiler yarattığı, özellikle solunum ve deri alerjilerine neden olabildiği bildirilmektedir [Çelik vd., 2023; Mouro vd., 2023]. Bu çevresel ve sağlık temelli endişeler, araştırmacıları çevre dostu, biyolojik olarak parçalanabilir ve yenilenebilir kaynaklardan elde edilen doğal boya alternatiflerine yönlendirmiştir [Affat 2021; Bahtiyari ve Yilmaz, 2018].

Doğal boyalar genellikle bitki, hayvan ve mikroorganizma kaynaklıdır ve geniş bir malzeme yelpazesine renk kazandırabilirler. Yüksek taleple birlikte boya endüstrisi, özellikle düşük maliyetli ve sürdürülebilir kaynaklara yönelmiş, bu kapsamda mikrobiyal pigmentler dikkat çekici bir alternatif olarak öne çıkmıştır [Che ve Yang, 2022; Lara vd., 2022]. Mikrobiyal kökenli boyaların üretimi, hızlı büyüme gösteren mikroorganizmalar, metabolit çeşitliliği, fermentasyon kontrol kolaylığı ve tarım-endüstri atıkları gibi uygun maliyetli substratlarla üretilme potansiyelleri sayesinde önem kazanmıştır [Bahtiyari ve Yilmaz, 2022].

4.1. Sekonder Metabolitlerin Tekstil Boyalarında Kullanımı

Mikroorganizmaların ürettiği pigmentler, su altı fermentasyonu ya da katı substrat fermentasyonu gibi yöntemlerle elde edilmekte olup, başta bakteriler, aktinomisetler, mantarlar, mayalar ve mikroalgler tarafından sentezlenmektedir [Bahtiyari ve Yilmaz, 2022]. Bakteriyel pigmentler arasında melanin, karotenoid, kinon, fenazin, tambjamine, viyolasin ve prodigiosin gibi yapılar yer almakta ve bu pigmentlerin antioksidan, UV koruyucu, antikanser, antimalaryal ve antimikrobiyal özellikleri sayesinde tıbbi uygulama potansiyelleri bulunmaktadır [Darwesh vd., 2019; Azman vd., 2018]. Aktinomisetlerde ise özellikle *Streptomyces* türleri melanin (siyah,

kahverengi, zeytin tonları), karotenoid (kırmızı, sarı, pembe, mor) ve aktinorodin gibi mavi pigmentler üretmektedir [Agarwal, 2023].

Son dönemde nanoteknoloji ile doğal pigmentlerin birleşimi de dikkat çekmektedir. Gümüş nanopartiküllerle işlem görmüş selülozik kumaşlar, antimikrobiyal özellikler kazanmakta ve estetik değeri artmaktadır [Siddiqua ve Zaib-un-Nisa, 2024; Zhang vd., 2009]. Örneğin, gümüşle modifiye edilmiş pamuklu kumaşlar, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* gibi bakterilere karşı %99'un üzerinde azalma göstermiştir ve bu antimikrobiyal etki, 20 evsel yıkama sonrası bile %98'in üzerinde korunmuştur [Van Der Kraan, 2007].

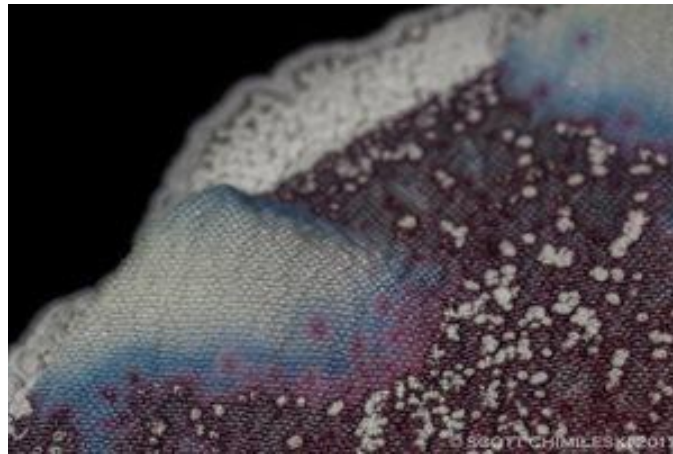
Bakteriyel pigmentlerin potansiyel antimikrobiyal etkileri, antibiyotik direncine karşı alternatif geliştirme çabalarında da ön plana çıkmaktadır. *Streptomyces* cinsine ait kırmızı pigmentlerin *Bacillus* ve *Micrococcus* türlerine karşı koruyucu etkiler gösterdiği saptanmıştır [Rahman vd., 2013]. Ayrıca, bu cins aktinorodin ve FDA onaylı antibakteriyel ajan tetrasiklin gibi pigmentleri de sentezlemektedir. Tetrasiklin, bakterilerde protein sentezini engelleyerek etkisini gösterir [Orylska-Ratynska vd., 2022].

Bununla birlikte, *Bacillus cereus* tarafından üretilen yeşil pigment cerein, aynı türe ait diğer suşlara karşı bakterisidal etki gösterirken, halofilik ortamlardan izole edilen bakteriyel pigmentlerin de yüksek antimikrobiyal potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir [Bidell vd., 2020]. Örneğin, piyosiyanın pigmenti hem Gram negatif hem de Gram pozitif pek çok patojen üzerinde antibakteriyel etkiye sahiptir [Darwesh vd., 2019; do Barreto vd., 2023].

Bu bağlamda, doğal kaynaklı boya ve pigmentlerin yalnızca çevresel sürdürülebilirliği değil, aynı zamanda insan sağlığını koruyucu potansiyeli de ön plana çıkmaktadır. Renk verici özellikleriyle birlikte antimikrobiyal, antikanserojen ve UV koruyucu etkilerinden dolayı bu doğal boyaların hastane tekstilleri gibi özel kullanım alanlarında değerlendirilmesi mümkündür [Darwesh vd., 2024]. Nitekim mevcut çalışmalar, doğal boya nanokompozitlerinin geliştirilmesi ve bu pigmentlerle kaplanan kumaşların patojenlerin büyümesini ve cilt kanseri hücrelerinin gelişimini engelleyecek potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır [Darwesh vd., 2024].

Streptomyces coelicolor tarafından üretilen aktinorodin, doğal pigment olarak tekstil boyamada kullanılabilirliğiyle özellikle Bacterial Dyes in Fashion başlıklı American

Society for Microbiology (ASM) yayınında ve Natsai Audrey Chieza'nın Project *Coelicolor* çalışmasında öne çıkmıştır [ASM, 2017; Chieza & Ginkgo Bioworks]. Bu pigment suda çözünebilir ve üretildiği ortamın pH değerine bağlı olarak farklı renk tonları sergileyebilir. Laboratuvar kültürlerinde tipik olarak mavi renk üretirken, asidik ortamlarda kırmızı-pembe tonlar oluşabilir. Natsai Audrey Chieza, moda endüstrisindeki kirliliği azaltmayı amaçlayarak yaptığı çalışmasında *Streptomyces coelicolor* bakterisinin çarpıcı bir kırmızı-mor pigment ürettiğini fark etti ve bunu geleneksel boyalara kıyasla su israfını ve kimyasal madde akışını azaltmak için bir kumaş boyası geliştirmek için kullandı. Boyama işlemi Şekil 4.1'de gösterildiği gibi *S. coelicolor* kültürünün seyreltilmiş sıvı ortamında kumaş parçalarının bekletilmesi ve ardından bakterilerin kumaş üzerine koloniler oluşturarak pigment üretmesi biçiminde gerçekleştirilmiştir [ASM, 2017]. Chieza'nın çalışmasında ipek şallar gibi ince tekstil lifleri kullanılarak, neredeyse hiç su ve kimyasal kullanılmadan, sürdürülebilir yöntemlerle renkli desenler elde edilmiştir [Design Indaba; Bacterial Dyes in Fashion].



Şekil 4.1: *S. coelicolor* ile boyanmış küçük bir kumaş parçası [ASM, 2017].

Mikrobiyal pigmentlerin tekstil boyamacılığında kullanımı çok aşamalı ve kontrollü bir süreci gerektirir. Öncelikle pigment etanol, metanol veya aseton gibi çözücüler yardımıyla boya çözeltisi hâline getirilir [Nuanjohn vd., 2023]. Boyama aşamasında pH, sıcaklık, daldırma süresi ve pigment derişimi gibi parametreler sistemli bir şekilde düzenlenir [Nuanjohn vd., 2023]. Selüloz liflerinin boyanmasında bazik pH, yün ve ipek gibi protein liflerinin boyanmasında ise asidik pH tercih edilir [Nuanjohn vd.,

2023]. Sıcaklık boyama hızını ve renk derinliğini doğrudan etkiler, pigment derişimi ise renk yoğunluğunu ve boyanın kalıcılığını belirler [Nuanjohn vd., 2023]. Pigmentlerin pH ve sıcaklık değişimlerine duyarlılığı, renk tonunda değişiklik veya pigment kaybı oluşturabileceğinden bu koşulların dikkatle yönetilmesi önemlidir [Nuanjohn vd., 2023]. Boyama sonrası pigmentin lif üzerinde sabitlenmesi için alüminyum, demir veya bakır tuzları gibi mordantlar kullanılır ve bu kimyasallar pigmentin lif üzerindeki tutunmasını sağlayarak yıkama dayanıklılığını artırır [Nuanjohn vd., 2023]. Mikrobiyal pigmentlerin çoğunun, kumaşa tutunmasını artırmak için mordant kullanımını gerektirdiğı bildirilmiştir [Nuanjohn vd., 2023].

Bu çalışmada, yüksek antibiyotik üreticisi *S. coelicolor* rekombinant suşlarının antibiyotik üretimleri optimize edilmiş, fermentörde büyük ölçekli üretimi gerçekleştirilmiş, renkli bir antibiyotik olan aktinorhodin, kültür ortamından izole edilmiş ve kumaş boyası olarak kullanım potansiyeli değerlendirilmiştir.

5. GEREÇLER

5.1. Kullanılan Kimyasallar

Sükroz (Caisson), K₂SO₄ (Merck), MgCl₂ (Merck), D (+) Glukoz (Merck), Maya Özütü (Bacto™), Bacto Kazamino Asit (BD), NaCl (Sigma-Aldrich), KH₂PO₄ (Merck), CaCl₂ (Merck), L-prolin (Caisson), TES Buffer (Applichem), NaOH (Merck), Triptik Soya Besiyeri (Merck), Agar (Merck), Asetik Asit (Riedel de Haen), Kloroform (Sigma Aldrich), %99 Gliserol (Sigma Aldrich), Metanol (Sigma Aldrich), %99,5 Etanol (Riedel de Haen), Hidroklorik Asit (Riedel de Haen), Potasyum Hidroksit (Riedel de Haen), Çözünebilir Nişasta (Merck), MgSO₄ (Sigma Aldrich), (NH₄)₂SO₄ (Merck), CaCO₃ (Beyanlab).

5.2. Kullanılan Bakteri Soyları

Tablo 5.1: Çalışmada kullanılan *S. coelicolor* suşları.

Kullanılan Bakteriler	Genotip Özellikleri	Kaynak
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	Yaban suş	Hopwood, 1999
<i>S. coelicolor</i> A3(2) + pRA (Sco-pRA)	pRA plazmidi taşıyan rekombinant suş	Demir, 2019
<i>S. coelicolor</i> A3(2) + pRALon (Sco-pRALon)	pRA/lon plazmidi taşıyan rekombinant suş	Demir, 2019
<i>S. coelicolor</i> A3(2) + pSPG (Sco-pSPG)	pSPG plazmidi taşıyan rekombinant suş	Yılmaz, 2019
<i>S. coelicolor</i> A3(2) + pSPGlon (Sco-pSPGlon)	pSPG/lon plazmidi taşıyan rekombinant suş	Yılmaz, 2019

5.3. Kullanılan Cihazlar

Steril Kabin (Heraeus, HP48), 4°C Buzdolabı (Samsung), -20°C Derin Dondurucu (Samsung), Etüv (BINDER, 9010-0078), İnkübatör (Heraeus, D-63450 Heraeus), -80°C Derin Dondurucu (Thermo, Forma -86 °C ULT Freezer), Buz Makinesi (BAR-LINE BF85), Masa Üstü Santrifüj (Heraeus, Labofuge 400R), Masa Üstü Santrifüj (BECKMAN COULTER, Microfuge 22R), Otoklav (HIRAYAMA, HICLAVE HVE-50) (Nüve, NC 90M), pH Metre (Hana Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter), Çalkalamalı İnkübatör (Edmund Bühler, KS-15), Su Banyosu (TECHNE, TE-

10A Tempette), Mikrodalga Fırın (Samsung), Spektrofotometre (Bio-rad, Smartspec 3000), UV Spektrofotometre (Beckman Coulter DU 530), Fermentör ((Eppendorf, Bioflo 120), (Applikon ez2-Control)), SciHiller Fermentöre Bağlı Su Banyosu (VWR), Hassas Terazi (Shimadzu), Terazi (Precisa).

5.4. Kullanılan Besiyerleri

Tablo 5.2: Kullanılan besiyerleri ve içerikleri.

Tripton Soya Agar (TSA) (1 L)	30 g Tripton Soya Besiyeri, 10 g Agar nihai hacim 1 L olacak şekilde dH ₂ O ile çözüldü. 121°C’de 20 dakika otoklavlandı.
Tripton Soya Besiyeri (TSB) (1 L)	30 g Tripton Soya Besiyeri dH ₂ O eklenerek nihai hacim 1 L olacak şekilde manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldü. 121°C’de 20 dakika steril edildi.
TBO Besiyeri (1 L)	20 g Salça, 20 g Yulaf, 25 g Agar dH ₂ O eklenerek nihai hacim 1 L olacak şekilde çözüldü ve 121°C’de 20 dakika steril edildi.
R2YE Besiyeri (1 L)	103 g sükroz, 0.25 g K ₂ SO ₄ , 10.12 g MgCl ₂ .6H ₂ O, 10 g glikoz ve 0,1 g kazaminoasit dH ₂ O eklenerek nihai hacim 800 ml olacak şekilde manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldü. 121°C’de 20 dakika steril edildi. Aşağıdaki solüsyonlar steril şekilde hazırlandı ve sırasıyla 800 ml besiyerine eklendi. -10 ml KH ₂ PO ₄ (%0,5), -80 ml CaCl ₂ .2H ₂ O (%3,68), -15 ml L-Prolin (%20), -100 ml TES Tamponu (%5,73), - 2 ml İz Element Solüsyonu, -5 ml NaOH (1N)
Uluslararası <i>Streptomyces</i> Projesi Besiyeri - 4 (ISP-4) (1 L)	10 g Çözünebilir Nişasta, 1 g MgSO ₄ .7H ₂ O, 1 g NaCl, 2 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2 g CaCO ₃ , 1 ml İz Element Solüsyonu içeren besiyeri hazırlanırken 10 g Çözünebilir Nişasta son hacim 500 ml olacak şekilde dH ₂ O ile manyetik karıştırıcıda düşük sıcaklık yardımı ile karıştırılarak çözüldü. 1 g MgSO ₄ .7H ₂ O, 1 g NaCl, 2 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2 g CaCO ₃ son hacim 500 ml olacak şekilde dH ₂ O ile çözüldü ve nişasta çözeltisi ile karıştırılarak 121°C’de 20 dakika otoklavlandı. Otoklav sonrası 1 ml İz Element Solüsyonu eklendi.

5.5. Çözeltiler

Tablo 5.3: Kullanılan Çözeltiler.

NaOH (1N)	Gliserol (%40)
L-Prolin (%20)	TES Tamponu (%5,73)
KH ₂ PO ₄ (%0,5)	CaCl ₂ .2H ₂ O (%3,68)
KOH (5 M)	HCl-Metanol (0,5 M)
FeSO ₄ (%1)	HCl (0,5 M)
Asetik Asit (%5)	NaCl (%10)
R2YE İz Element Solüsyonu (100 ml) •4 mg ZnCl₂ •20 mg FeCl₃.6H₂O •1 mg CuCl₂.2H₂O •1 mg MnCl₂.4H₂O •1 mg Na₂B₄O₇.10H₂O •1 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O	ISP-4 İz Element Solüsyonu (1 L) •0,1 g FeSO₄ x 7H₂O •0,1 g MnCl₂ x 4H₂O •0,1 g ZnSO₄ x 7H₂O •100 mL dH₂O

5.6. Antibiyotikler

Apramisin (Apr) antibiyotiği 50 mg/ml stok konsantrasyonunda dH₂O ile çözülerek hazırlandı ve filtreden geçirilerek steril edildi. Apramisin *Streptomyces* çalışmaları sırasında 50 µg/mL konsantrasyon unda kullanıldı.

6. YÖNTEMLER

6.1. *Streptomyces coelicolor* Suşlarının Spor Stoklarının Hazırlanması

S. coelicolor, Sco-pSPG, Sco-pSPGlon, Sco-pRA ve Sco-pRALon sporları 3 gün boyunca 30 °C'de 100 ml TSB besiyerinde rekombinant suşlar için apramisin (50 µg/ml) antibiyotiği eklenerek ön kültür olarak büyütüldü. İnkübasyonun sonunda kültürler 20 dakika boyunca +4 °C'de 4000 rpm'de santrifüj edildi. Bakteri peletini çözmek için yaklaşık 5-10 ml süpernatant bırakılıp geri kalanı uzaklaştırıldı ve bakteri peleti bu süpernatantta çözülerek toplandı. TBO besiyeri rekombinant suşlar için apramisin de eklenerek Petri kaplarına döküldü. Pelet çözeltisinin 300 µl'si TBO'ya yayıldı ve sporülasyon için 10 gün boyunca 30 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası agar yüzeyindeki sporları toplamak için Petri kaplarına steril %40'luk 5 ml gliserol eklendi ve steril pamuklu çubuk kullanılarak sporlar nazik bir biçimde agardan kaldırıldı. Gliserol içerisinde çözünen sporlar steril bir falkon içine toplandı ve daha sonra 4000 rpm'de +4 °C'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant sporları çözmek için 2-3 ml bırakılarak ortamdaki sporları uzaklaştırıldı ve pelet kalan üst sıvıda çözüldü. Eppendorf tüpler etiketlendi ve spor çözeltisi 200 µl olacak şekilde alıkotlandı ve -80 °C'de saklandı. Sporlar seri dilüsyon yapılarak TSA besiyerine ekildi, 3 gün büyütüldü ve koloniler sayılarak spor sayıları hesaplandı. İnkübasyondan sonra sporların kontamine olup olmadığı kontrol edildi ve büyüyen koloniler sayıldı. Spor Sayısı (cfu/ml) = (Koloni sayısı × Seyreltme faktörü) × (Toplam hacim / İnokülasyon hacmi) formülü kullanılarak hesaplandı.

6.2. *Streptomyces coelicolor* Suşlarının Büyütülmesi

Fermentasyon çalışmalarında kullanılacak *S. coelicolor* suşlarının aktif büyüme fazında olmalarını sağlamak amacıyla ön kültür hazırlanmıştır. Bu kapsamda, her bir suş için 500 ml'lik Erlenmeyer şişelerine 100 ml TSB besiyeri ve yaban suş için hazırlanan şişe dışındaki şişelere 100 µl apramisin (50 µg/ml) eklenmiştir. Sonra daha önce hazırlanmış spor süspansiyonlarından 100 µl inokülasyon yapılmıştır. Kültürler, 30 °C sıcaklıkta ve 180 rpm çalkalama hızında, 3 gün boyunca inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresinin sonunda, kültürler önceden etiketlenmiş ve tartılmış 50 mL'lik steril falcon tüplerine alınarak +4 °C'de, 4000 rpm'de 20 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmış ve her tüpte oluşan hücre peleti tartılmıştır. Bu tez kapsamındaki tüm deneysel koşullarda her suş için eşit hücre miktarı ile inokulasyon sağlanabilmesi amacıyla, peletlere belirli hacimlerde steril distile su ilave edilerek toplam hacim ve pelet ağırlığına göre hücre süspansiyonlarının konsantrasyonları hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar doğrultusunda, fermentasyon deneyleri için her örneğe 0,53 g bakteri içerecek şekilde inokulasyon gerçekleştirilmiştir. Tüm işlemler steril koşullar altında gerçekleştirilmiştir.

6.3. *Streptomyces coelicolor* Suşlarının Aktinorhodin Üretiminin Optimizasyonu

Biyoreaktör düzeyinde büyük ölçekli antibiyotik üretimine geçmeden önce *S. coelicolor* yaban ve rekombinant suşların antibiyotik üretimlerinin optimizasyonu için sıcaklık, pH, besiyeri tipi, kültür hacmi, inokulum miktarı ve çalkalama hızı (rpm) gibi değişkenlerle çalışılmıştır.

6.3.1. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

S. coelicolor A3(2) rekombinant suşlarında aktinorhodin üretimini etkileyen sıcaklık parametresinin belirlenmesi amacıyla farklı inkübasyon sıcaklıklarında fermentasyon deneyleri yürütülmüştür. Bu kapsamda, her suş için TSB'de ön kültürler hazırlanmış, daha önce anlatılan yöntemlerle her biri 500 ml hacminde olan ve 60 ml R2YE besiyeri içeren steril Erlenmeyer şişelerine 0,53 g ıslak ağırlıkta bakteri ekimleri yapılmıştır. Besiyerine, yalnızca rekombinant suşlara özgü olarak 60 µl apramisin ilave edilmiştir. Tüm besiyerlerine fermentasyon başlangıcında %0,5 oranında (v/v) gliserol ilave edilmiştir. Deney üç tekrarlı olacak şekilde kurulmuştur. Fermentasyonlar, 180 rpm çalkalama hızında olmak üzere sırasıyla 25 °C, 30 °C ve 35°C sıcaklıklarda yürütülmüştür. Fermentasyon süresince kültürlerden 72., 96. ve 120. saatlerde 5 ml örnek alınarak, 4 ml'si kuru ağırlık ölçümünde ve 1 ml'si ise aktinorhodin üretimi ölçümünde kullanılmıştır.

6.3.2. Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

S. coelicolor A3(2) rekombinant suşlarında aktinorhodin üretimini etkileyen başlangıç pH'sının belirlenmesi amacıyla, farklı pH değerlerinde fermentasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. R2YE besiyeri hazırlanıp otoklavlanmış ve solüsyonları eklendikten sonra steril koşullarda başlangıç pH ayarlamaları yapılmıştır. Her biri 500 ml hacmindeki steril Erlenmeyer şişelerindeki 60 ml R2YE besiyerine yaban suř hariç besiyerine 60 µl apramisin (50 µg/ml) eklenmiştir. Her örneğe TSB'de büyütölen ön költürden öktürölen 0,53 g ıslak ağırlıkta hücre içerecek şekilde inokulasyon yapılmıştır. Töüm besiyerlerine fermentasyon başlangıcında %0,5 oranında (v/v) gliserol ilave edilmiştir. Deneyler, başlangıç pH'sı 6.00, 6.30 6.50 ve 7.00 olarak ayarlanmış gruplar hâlinde, üç tekrarlı olacak şekilde yürütölmüştür. Fermentasyon süresince, 30 °C sıcaklıkta ve 180 rpm çalkalama hızında inkübasyon gerçekleştirilmiş. 72., 96. ve 120. saatlerde költürlerden 5 ml örneğ alınmıştır. Alınan örneğlerin 4 ml'si bakteri kuru ağırlığı öłümünde, 1 ml'si ise antibiyotik öłümünde kullanılmıştır.

6.3.3. R2YE Yerine ISP-4 Besiyerinin Kullanılması

Besiyeri bileşiminin aktinorhodin üretimine etkisini değerlendirmek amacıyla, *S. coelicolor* A3(2) yaban suřu ve rekombinant suşları, nişasta bazlı bir alternatif olan ISP-4 besiyerinde fermentasyona alınmıştır. Deneyde, ön költürleri hazırlanmış suşlar, her birinde 60 ml ISP-4 besiyeri olacak şekilde 500 ml hacmindeki steril Erlenmeyer şişelerine 0,53 g ıslak hücre ağırlığı içerecek şekilde inokule edilmiştir. Rekombinant suşlara, seleksiyonun korunması amacıyla 60 µl apramisin (50 µg/ml) ilave edilmiştir. Ayrıca, töüm besiyerlerine fermentasyon başlangıcında %0,5 oranında (v/v) gliserol ilave edilmiştir. Fermentasyonlar 30 °C sıcaklıkta, 180 rpm çalkalama hızında çalkalamalı inkübatörde yürütölmüş ve her suř üç tekrar olacak şekilde deneysel olarak tasarlanmıştir. ISP-4 kısıtlı karbon kaynağı içeriği ile büyömeyi geciktirdiğinden deneyin 96., 120., 144. ve 168. saatlerinde költürlerden 5 ml örneğ alınmış, bu örneğlerin 4 ml'si hücre kuru ağırlığı öłümünde, 1 ml'si ise aktinorhodin üretiminin öłümünde kullanılmıştır.

6.3.4. Antibiyotik Üretiminde Kültür Hacminin Etkisi

S. coelicolor rekombinant suşları içerisindeki kıyaslar sonucu Sco-pRA_{lon}'un aktinorhodin üretiminin daha yüksek verim gösterdiği görüldüğünden çalışma Sco-pRA_{lon} devam etmiştir. Biyoreaktörde büyük ölçekli üretime geçmeden önce Erlenmeyer'de kültür hacmi 60 ml'den 120 ml'ye çıkarılarak antibiyotik ölçümü yapılmıştır. Her biri 500 ml hacmindeki steril Erlenmeyer şişelerindeki 120 ml R2YE besiyerine, Sco-pRA_{lon} için 120 µl apramisin (50 µg/ml) eklenmiştir. Her örneğe TSB'de büyütülen ön kültürden hacimle orantılı olarak artırılmış miktarda çöktürülen 1,06 g ıslak ağırlıkta hücre inokule edilmiştir. Tüm besiyerlerine fermentasyon başlangıcında %0,5 oranında (v/v) gliserol ilave edilmiştir. Deney üç tekrarlı olacak şekilde kurulmuştur. Fermentasyonlar, 180 rpm çalkalama hızında olmak üzere sırasıyla 25 °C, 30 °C ve 35°C sıcaklıklarda yürütülmüştür. Fermentasyon süresince kültürlerden 72., 96. ve 120. saatlerde 5 ml örnek alınarak, 4 ml'si kuru ağırlık ölçümünde ve 1'si ml aktinorhodin ölçümünde kullanılmıştır.

6.3.5. Antibiyotik Üretiminde İnokulum Miktarının Etkisi

İnokulum miktarının aktinorhodin üretimine etkisini değerlendirmek amacıyla denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, ön kültürleri hazırlanmış Sco-pRA_{lon} her biri 500 ml hacminde olan ve 120 ml R2YE üretim besiyeri içeren steril Erlenmeyer şişelerine inokule edilmiştir. İnokulum miktarları, 1,06 g ıslak hücre peletinin sırasıyla 1, 2, 3, 4 ve 5 katı olacak şekilde 1,06 g, 2,12 g, 3,18 g, 4,24 g, 5,30 g olarak belirlenmiş ve her bir grup üç tekrar olacak şekilde çalışılmıştır. Kültürlere 120 µl apramisin eklenmiş ve tüm örnekler fermentasyon başlangıcında %0,5 (v/v) oranında gliserol ile indüklenmiştir. Fermentasyonlar, 30 °C sıcaklıkta ve 180 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilmiş; 72., 96. ve 120. saatlerde kültürlerden 5 ml örnek alınarak aktinorhodin üretimi ve hücre kuru ağırlığı ölçümleri yapılmıştır.

6.3.6. Antibiyotik Üretiminde Çalkalama Hızının (rpm) Etkisi

Çalkalama hızının (rpm) aktinorhodin üretimi üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla fermentasyon denemeleri farklı çalkalama hızlarında gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, üretim koşullarında yalnızca rpm parametresi değiştirilmiş, diğer tüm koşullar sabit tutulmuştur. Her biri 500 ml hacminde olan ve 120 ml R2YE besiyeri içeren steril Erlenmeyer şişelerine 1,06 g ıslak hücre peleti inokule edilmiş, 120 µl

apramisin eklenmiş. Tüm besiyerlerine fermentasyon başlangıcında %0,5 oranında (v/v) gliserol ilave edilmiştir. Denemeler, 30 °C sıcaklıkta olmak üzere 180, 200 ve 220 rpm çalkalama hızlarında üçer tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon süresince 72., 96. ve 120. saatlerde örnekler alınarak aktinorhodin üretimi ve hücre kuru ağırlığı tayinleri yapılmıştır.

6.4. Sco-pRA_{lon} Suşunun Fermentörde Büyütülmesi

Bu çalışma kapsamında, rekombinant Sco-pRA_{lon} suşu ile 2 litrelik fermentasyon denemesi Eppendorf BioFlo 120 tipi 5 litrelik fermentörde gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon ortamı olarak R2YE besiyeri kullanılmış, 800 ml'lik hacim biyoreaktörün kazanı içinde, kalan 800 ml ise ayrı bir şişede otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Sterilizasyonun ardından, besiyeri bileşenleri laminar akım kabini içinde steril koşullarda birleştirilmiş ve steril biyoreaktör sistemine pompa yardımıyla aktarılmıştır.

Ön kültür aşamasında elde edilen inokulum, daha önceki optimizasyon çalışmalarında kullanılan miktarla aynı oranda olacak şekilde 17,67 g ıslak ağırlıkta sisteme aktarılmıştır. Fermentasyonun başlangıcında ortama 2 ml apramisin (50 µg/ml) ve %0,5 gliserol ilave edilmiştir. Deney başlangıcında sisteme şırınga ile 3 damla steril köpük engelleyici eklenmiştir. Fermentasyon süresince pH=6.30 düzeyinde sabitlenmiş; sıcaklık 30 °C, çalkalama hızı 150–180 rpm ve çözünmüş oksijen oranı minimum %20 olacak şekilde ayarlanmıştır. Oksijen doygunluğunu sağlamak amacıyla fermentasyon süreci boyunca reaktöre periyodik olarak manuel kuru hava girişi yapılmıştır.

Fermentasyon sürecinde, kullanılan Eppendorf BioFlo 120 biyoreaktöründe oksijen kaskadı bulunmaması nedeniyle çözünmüş oksijen düzeylerinde dalgalanmalar meydana gelmiş, bu dalgalanmalar karıştırma hızındaki (150–250 rpm) değişimlerle birlikte misel parçalanmalarına yol açmıştır. Bu koşullar altında rekombinant Sco-pRA_{lon} suşu ile yürütülen fermentasyon tamamlanamamıştır. Çalışma, aynı besiyeri ve inokulum koşulları korunarak, parametreler (pH 6,30; 30 °C; %20 çözünmüş oksijen; %0,5 gliserol) sabit tutulmak suretiyle Applikon ez2-Control biyoreaktör sisteminde tekrar edilmiştir. Bu biyoreaktör 2 L kapasiteli olduğundan çalışma hacmi 1,5 L'ye düşürülmüştür.

6.5. Kuru Ağırlık ve Antibiyotik Aktivitesinin Kantitatif Olarak Belirlenmesi

6.5.1 Kuru Ağırlık Ölçümü

Rekombinant ve yaban tip *S. coelicolor* A3(2) suşlarının aktinorhodin ve undecylprodigiosin antibiyotik üretim kapasitelerinin karşılaştırılabilmesi amacıyla, antibiyotik üretimini nicel olarak değerlendirmeye yönelik fermentasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, ön kültürleri hazırlanmış suşlardan eşit ıslak hücre ağırlığında alınarak, üçer paralel olacak şekilde R2YE üretim besiyeri içeren steril Erlenmeyer şişelerinde fermentasyonları yapılmıştır. Rekombinant suşlara seleksiyonun devamlılığını sağlamak amacıyla 50 µg/ml konsantrasyonunda apramisin ilave edilmiştir. Tüm besiyerlerine fermentasyon başlangıcında %0,5 oranında (v/v) gliserol ilave edilmiştir.

Fermentasyon süresince 24 saat aralıklarla (72., 96., 120., 144., ve 168. saatlerde) her kültürden 5 mL örnek alınmıştır. Alınan örneklerin 1 ml'si antibiyotik analizleri için ayrılmış ve doğrudan -20 °C'de depolanmıştır. Kalan 4 ml'lik kısım ise kuru hücre ağırlığının tayininde kullanılmak üzere 4000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmiş, elde edilen peletler iki kez steril distile su ile yıkanarak -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Kuru ağırlık tayini için -20 °C'den çıkarılan peletler, 2 ml distile su ile çözülüp, önceden tartılmış kurutma kaplarına aktarılmıştır. Örnekler, 80 °C sıcaklıkta 3-4 gün süreyle kurutulduktan sonra yeniden tartılmış ve kap ağırlıkları çıkarılarak hücre kuru ağırlıkları (mg/ml) hesaplanmıştır.

6.5.2. Antibiyotik Ölçümü

Antibiyotik üretimi, Kieser ve arkadaşları tarafından tanımlanan spektrofotometrik yöntemle modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir [Kieser vd.,2000]. -20 °C'den alınan 1 ml örnekler 250 µL 5 M KOH eklenerek iyice karıştırılmış ve bu karışım +4 °C'de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben örnekler +4 °C'de, 13.000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmiş, elde edilen süpernatantlar spektrofotometre kuvvetlerine aktarılmıştır. Aktinorhodin antibiyotiği 640 nm dalga boyunda doğrudan süpernatant üzerinden ölçülmüş, blank olarak R2YE besiyeri kullanılmıştır. Ölçümler sırasında gerekli olması halinde örnekler R2YE ile seyreltilmiştir.

Undesilprodigiosin antibiyotiği ölçümleri için ise peletler 0,5 M HCl ile iki kez yıkanarak (4 °C, 13.000 rpm, 5 dk) ön işleminden geçirilmiş, ardından her bir örneğe 1 ml 0,5 M HCl-metanol karışımı eklenmiş ve karışım oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında 13.000 rpm’de, 4 °C’de 15 dakika santrifüjlenen örneklerin süpernatantlarında 530 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. Bu ölçümlerde blank olarak HCl-metanol çözeltisi kullanılmış ve gerek duyulan durumlarda dilüsyonlar da aynı solüsyonla hazırlanmıştır.

Antibiyotik konsantrasyonlarının hesaplanmasında $Abs=\epsilon \times [M]$ formülü kullanılmıştır.

Burada ϵ (molar absorptivite katsayısı), aktinorhodin için 25230 ve undesilprodigiosin için 100500 olarak alınmıştır. Elde edilen molar konsantrasyonlar 10^6 ile çarpılarak nM birimine çevrilmiş, ardından 1 ml’deki hücre kuru ağırlığına bölünerek her kültür için spesifik antibiyotik üretim aktiviteleri (nM/mg) hesaplanmıştır.

6.5.3. İstatistiksel Analiz

Farklı suşların antibiyotik üretim düzeyleri arasındaki farkların istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığını değerlendirmek amacıyla, elde edilen veriler GraphPad Prism yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Grafiklerin oluşturulması ve istatistiksel karşılaştırmalar bu program aracılığıyla gerçekleştirilmiş; veriler üzerinde iki yönlü varyans analizi (Two-Way ANOVA) uygulanmış ve istatistiksel anlamlılık, p değerine göre değerlendirilmiştir. Verilerin p-değerlerinin anlamlılık düzeylerine karşılık gelen yorumlamalar Tablo 6.1’de özetlenmiştir.

Tablo 6.1: p-değerinin istatistiksel olarak anlamlılık değerleri.

P-değeri	Yorum	Anlamlılık
$p > 0,05$	Fark istatistiksel olarak anlamlı değil	ns (not significant)
$p \leq 0,05$	Fark istatistiksel olarak anlamlı	*
$p \leq 0,01$	Fark daha güçlü biçimde anlamlı	**
$p \leq 0,001$	Yüksek düzeyde anlamlı	***
$p \leq 0,0001$	Çok yüksek düzeyde anlamlı	****

6.6. Aktinorhodin Antibiyotiğinin Kültür Ortamından Ayırıştırılması

Rekombinant Sco-pRA_{lon} suşu R2YE besiyerinde büyütülmüş ve 50 ml'lik falkon tüplerine alınarak 4000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenerek hücreler çöktürülmüştür. Süpernatant pH'sı aktinorhodinin çöktürülmesi amacıyla HCl ilavesiyle 2.0–3.0 aralığına düşürülmüştür. Sonrasında uygulanan santrifüjleme ile besiyeri içeren süpernatant uzaklaştırılmış ve çöken pigment içeren aktinorhodin toplanmıştır. Aktinorhodin içerikli pelete kloroform eklenerek faz-faz ayrımı uygulanmış, ayırım sonrası üstte kalan koyu renkli ve pigment açısından zengin faz mikropipet yardımıyla dikkatlice ayrılmıştır. Bu faz, çeker ocak içerisinde kontrollü koşullarda bekletilerek kloroformun buharlaşması sağlanmış, beher çeperinde biriken aktinorhodin kalıntısı, metanol ile çözülmüştür. Elde edilen çözelti, NaOH ilavesiyle pH 9.0–10.0 aralığına çıkarılarak stabilize edilmiş ve uygun koşullarda depolanmak üzere şişelenmiştir.

Ancak bu yöntemde yaşanan verim kayıpları nedeniyle, pigment izolasyonuna yönelik yeni bir protokol geliştirilmiştir. Bu ikinci yöntemde, hücrelerden arındırılmış süpernatanın pH'sı yine HCl kullanılarak 2.5'e düşürülmüş ve ardından elde edilen çözelti, hava ve ışıkla teması minimize edilecek şekilde alüminyum folyo ile sarılarak +4 °C'de bir saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürecin sonunda pigment fraksiyonu santrifüj ile çöktürülmüş ve çöken aktinorhodin %70 etanol çözeltisinde çözdürülmüştür. Elde edilen etanollü çözelti, 5 M KOH ilavesiyle pH=9.5 düzeyine getirilmiştir. Hazırlanan çözelti çalışma kapsamında kumaş boyası olarak kullanılmak üzere 50 ml falkon tüpte, ışık temasını engellemek için alüminyum folyo ile sarılarak ve ısıdan korumak amacıyla -20 derecede saklanmıştır.

Yeni yöntemin verimliliğini değerlendirmek amacıyla inkübasyon süresi parametresi optimize edilmiştir. Bu amaçla yapılan deneyde fermentasyon sonrası bakteri peletinden arındırılmış çözelti pH'sı 2.5'e indirildikten sonra önceden etiketlenip tartılan ve alüminyum folyo ile sarılı olan falkon tüplerine alınmıştır. +4 °C'de 1, 2, 4, 8 ve 20 saatlik inkübasyon süreleri uygulanmış, her grup inkübasyon sonrası +4 °C'de 4000 rpm ve 20 dk santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Her koşul için çöken aktinorhodin miktarı hassas terazi ile tartılmıştır. Eş zamanlı olarak her tüpe 2 ml 5 M KOH ilave edilerek elde edilen çözeltilerin absorpsiyon değerleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Absorbans ölçümlerinde blank olarak 5 M KOH

  zeltisi kullanılmış, gerekli durumlarda seyreltmeler aynı çözeltiden yapılmıştır. İnkübasyon sürelerinin karşılaştırıldığı deney her grup için 3 tekrarlı olarak y r t lm şt r. Elde edilen veriler ile grafikler hazırlanmış ve karşılaştırmalı olarak değerlendirmeler yapılmıştır.

6.7. Aktinorhodinin Tekstil Boyası Olarak Kullanımı

Fermentasyon sürecinin tamamlanmasının ardından, *S. coelicolor* A3(2) suşlarının üretmiş olduğu aktinorhodin pigmenti içeren R2YE besiyeri, 4000 rpm’de 20 dakika süreyle santrifüjlenmiş ve bakteri hücreleri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süpernatantın pH’sı, asetik asit ile 2–3 aralığına düşürülmüş ve ikinci bir santrifüj işlemi uygulanarak çöken aktinorhodin pigmenti elde edilmiştir. Bu   kelti, doğal boya kaynağı olarak değerlendirilmiş ve %100 pamuk içeren kumaş örnekleri ile boyama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Boyama işlemleri sırasında farklı uygulamalar içeren deney grupları oluşturularak, pigmentin kumaşa en iyi bağlandığı koşulların belirlenmesi hedeflenmiştir.

Boyama için kullanılacak kumaşlar 5 × 5 cm boyutlarında kesilerek eşit büyüklükte standart örnekler hazırlanmıştır. Mordant uygulaması yapılacak gruplar için mordant olarak %1 (w/v) demir (II) sülfat (FeSO₄)   zeltisi hazırlanmış ve bu örnekler hazırlanan çözeltide 1 saat bekletilmiştir. Ardından, dH₂O ile durulanıp oda sıcaklığında kurutulmuştur. Aktinorhodin içeren süpernatantlar, mordantlanmış ve mordantlanmamış örnekler için ayrı beherlere alınmış, etiketlenmiş ve yaklaşık 50  C’ye kadar ısıtılmıştır. Boyama sırasında ortamın ışık ve hava ile etkileşimini azaltmak amacıyla beherlerin hem çevresi hem de üst yüzeyi alüminyum folyo ile kapatılmıştır.

Sabitleme işlemleri için %10 (v/v) NaCl ve %5 (v/v) asetik asit çözeltileri hazırlanmış; her biri 50 ml’lik etiketli falkon tüplerine 10 ml olacak şekilde bölüştürülmüştür. 24., 48. ve 72. saatlerde boyadan çıkarılan kumaşlar, önceden hazırlanan sabitleme solüsyonlarına alınarak 1 saat sabitlenmiş, ardından oda sıcaklığında kurutulmuş ve ışık ile etkileşimleri  nlenecek şekilde muhafaza edilmiştir. Isı ile sabitleme yapılacak gruplar, alüminyum folyo ile kaplanmış ısıtmalı karıştırıcı yüzeyinde 50–60  C sıcaklıkta işlem görmüştür.

İkinci kez boyanacak örnekler, ilk boyama sonrası 72. saatte boyadan çıkarılarak sabitleme işlemine alınmış, kurutulmuş ve ardından yaklaşık 50 °C'ye ısıtılmış pigment içeriğine tekrar daldırılmıştır. Bu işlem sırasında kumaş örnekleri 2 saat boyunca pigment çözeltisinde bekletilmiştir.

Tüm işlemler boyunca her örnek için eşit hacimde sabitleme çözeltisi kullanılmış, grup ve işlem bilgileri titizlikle etiketlenmiştir. Boyama işlemleri tamamlandıktan sonra tüm örnekler, her biri 50 ml'lik etiketlenmiş falkon tüplerine 10 ml saf su dH₂O eklenerek yerleştirilmiş ve 2 saat boyunca belirli aralıklarla çalkalanarak yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama sularının absorbans değerleri spektrofotometrede 640 nm'de ölçülerek sabitleme yöntemlerinin karşılaştırılmasına olanak sağlayacak grafikler hazırlanmıştır. Son olarak, yıkama sonrası kurutulan kumaşlar görsel kayıt amacıyla fotoğraflanmış ve çalışmaya belge niteliğinde eklenmiştir. Uygulanan boyama ve sabitleme koşullarının detaylı şekilde özetlendiği gruplandırma Tablo 6.2'de sunulmuştur.

Tablo 6.2: Kumaş boyama deneyinin gruplarının sınıflandırılması.

Grup No	Boyama Süresi	Mordant Uygulaması	Sabitleme Yöntemi	Notlar
1	24 saat	Yok	Yok	—
2	24 saat	Yok	Yok	Sabitleme yapılmadan yıkandı
3	24 saat	Yok	Isı	
4	24 saat	Yok	NaCl	
5	24 saat	Yok	NaCl + Isı	
6	24 saat	Yok	Asetik asit	
7	24 saat	Yok	Asetik asit + Isı	
8	24 saat	Var	Yok	Sabitleme yapılmadan yıkandı
9	24 saat	Var	NaCl	
10	24 saat	Var	NaCl + Isı	
11	24 saat	Var	Asetik asit	
12	24 saat	Var	Asetik asit + Isı	
13	48 saat	Yok	Yok	—
14	48 saat	Yok	Yok	Sabitleme yapılmadan yıkandı
15	48 saat	Yok	Isı	
16	48 saat	Yok	NaCl	
17	48 saat	Yok	Asetik asit	
18	48 saat	Var	Yok	Sabitleme yapılmadan yıkandı
19	48 saat	Var	Asetik asit	
20	72 saat	Yok	Yok	—
21	72 saat	Yok	Yok	Sabitleme yapılmadan yıkandı
22	72 saat	Yok	Isı	
23	72 saat	Yok	NaCl	
24	72 saat	Yok	Asetik asit	
25	72 saat	Var	Yok	Sabitleme yapılmadan yıkandı
26	72 saat	Var	Asetik asit	
27	72 + yeniden	Yok	Yok	Kurutulup tekrar boyandı
28	72 + yeniden	Yok	Isı	Isı ile sabitlenip tekrar boyandı
29	72 + yeniden	Yok	NaCl	NaCl ile sabitlenip tekrar boyandı
30	72 + yeniden	Yok	Asetik asit	Asetik asit ile sabitlenip tekrar boyandı

7. BULGULAR

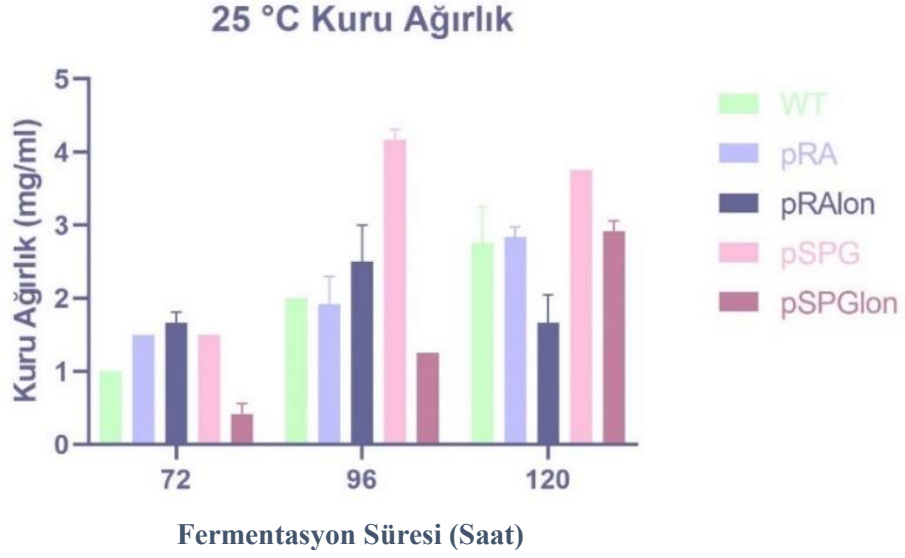
7.1. *S. coelicolor* A3(2) Rekombinant Suşlarının Aktinorhodin Üretiminin Optimizasyonları

Laboratuvarımızda daha önce yapılan farklı çalışmalarda *lon* genini farklı düzeylerde ifade eden *S. coelicolor* A3(2) rekombinant suşları elde edilmiştir. Sco-pRA*lon* suşu, bakterinin genomuna ekstra *lon* geni entegre edilerek oluşturulmuşken Sco-pSPG*lon* suşu, *lon* genini yüksek kopyalı bir plazmit üzerinde gliserol ile uyarılabilen bir promotor kontrolünde ifade edecek şekilde elde edilmiştir [Demir, 2019; Yılmaz, 2019]. Her iki rekombinant suş da aktinorhodin antibiyotigini yaban suşa göre yüksek düzeylerde üretmektedir [Demir, 2019; Yılmaz, 2019]. Tez çalışmasının bu bölümünde, öncelikle *S. coelicolor* yaban suş ve rekombinant suşlar için çeşitli kültür koşulları optimize edilmiştir. Bu kapsamda sıcaklık, pH, besiyeri çeşidi, kültür hacmi, inokulum miktarı ve çalkalama hızı (rpm) gibi parametreler sistematik olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, yaban suş ile rekombinant suşlar aktinorhodin üretimi açısından karşılaştırmalı olarak analiz edilmiş ve en uygun üretim koşulları belirlenmiştir.

7.1.1. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

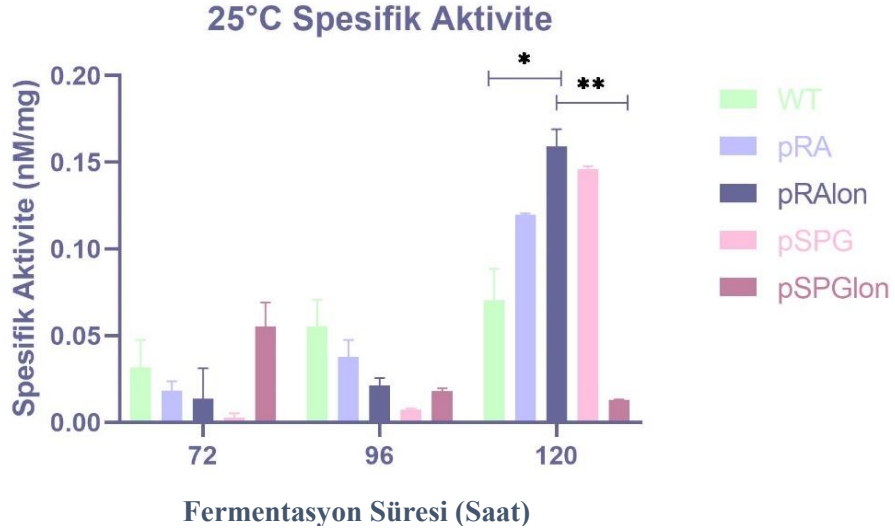
S. coelicolor yaban suş ve rekombinant suşların aktinorhodin üretim düzeylerinin karşılaştırılması ve antibiyotik üretimi için en uygun sıcaklık derecesinin belirlenmesi amacıyla bakteriler 25 °C, 30 °C ve 35 °C’de büyütülmüş ve fermentasyonun 72., 96. ve 120. saatlerinde örnek alınarak kuru ağırlık ve antibiyotik ölçümleri yapılarak spesifik aktiviteler hesaplanmıştır.

25 °C’de gerçekleştirilen fermentasyonda, 72. ve 96. saatlerde Sco-pSPG*lon* suşunun diğer suşlara göre daha az büyüdüğü, 120. saatte ise diğer suşları yakaladığı görülmektedir (Şekil 7.1). Kontrol suşunda (pSPG) böyle bir büyüme geriliği görülmediğinden bu durumun *lon* geninin fazla ifade edilmesinden kaynaklandığı çıkarımı yapılmıştır. Sco-pRA*lon* suşunda *lon* geninin kopya sayısı az olduğundan (2 kopya) büyüme çok fazla etkilenmemiştir.



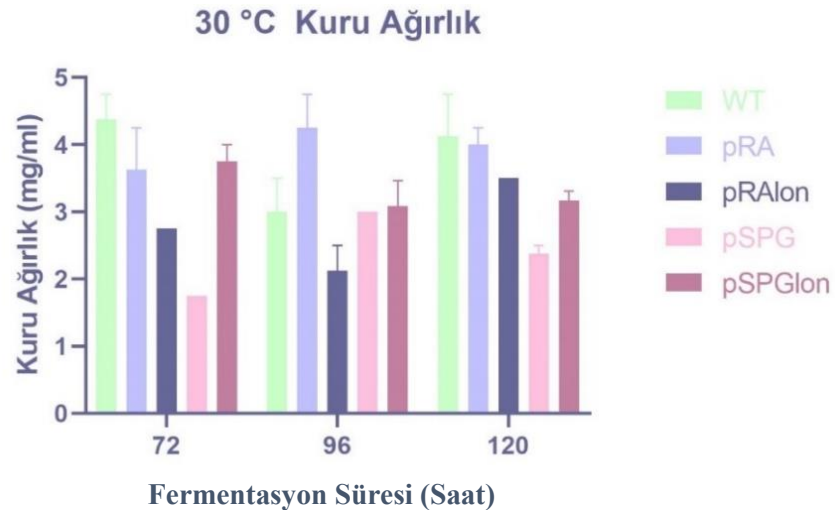
Şekil 7.1: *S. coelicolor* A3(2) yaban suş ve rekombinant suşların 25 °C’de büyüme grafiği.

Suşların 25 °C’de antibiyotik üretimleri karşılaştırıldığında Sco-pRA_{lon} ve Sco-pSPG_{lon} suşları ile yaban suş arasında 72. ve 96. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$) (Şekil 7.2). Bununla birlikte 120. saatte pRA_{lon} plazmiti taşıyan suşun yaban suştan 2 kat daha fazla antibiyotik ürettiği görülmüştür ($p \leq 0,05$). Sco-pSPG_{lon} suşu ise 120. saatte oldukça az antibiyotik üretmiş, Sco-pRA_{lon} suşuyla karşılaştırıldığında 8-9 kat daha az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 7.2).



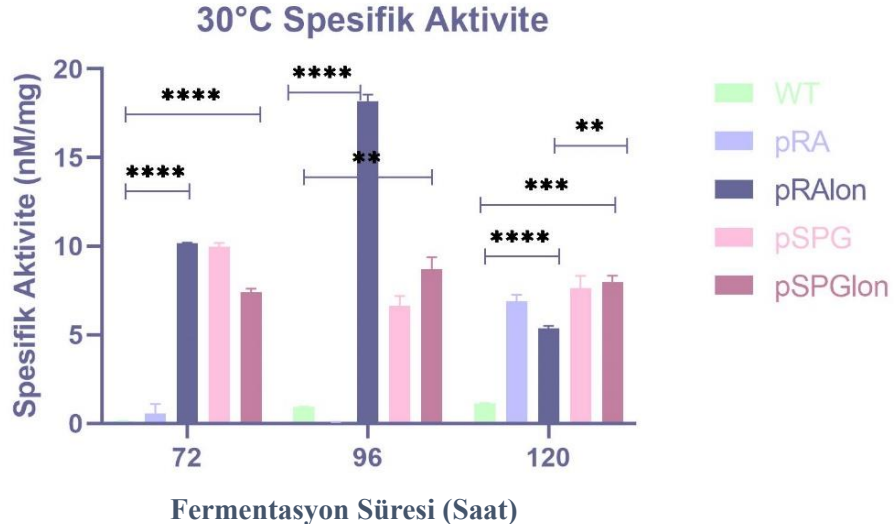
Şekil 7.2: *S. coelicolor* A3(2) yaban suş ve rekombinant suşların 25 °C’de aktinorhodin üretimleri. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri grafiklerde şu şekilde gösterilmiştir: $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**).

30 °C’de gerçekleştirilen fermentasyonda 72., 96. ve 120. saatlerde Sco-pRA_{lon} suşu yaban suş ve kontrol suşu olan pRA suşuna göre daha az büyümüştür (Şekil 7.3). Sco-pSPG_{lon} 72. ve 96. saatlerde yaban suşa yakın büyüme gösterirken 120. saatte yaban suşa göre daha az büyümüştür. Bununla birlikte Sco-pSPG_{lon}, kontrol grubu olan pSPG suşuna göre özellikle 72. ve 120. saatlerde çok daha fazla büyümüştür. *lon* geni taşıyan Sco-pRA_{lon} ve Sco-pSPG_{lon} suşları karşılaştırıldığında ise pRA_{lon} taşıyan suş 72. ve 96. saatlerde pSPG_{lon} taşıyan suşa göre az büyüme gösterirken 120. saatte onu geçerek daha fazla büyüme göstermiştir.



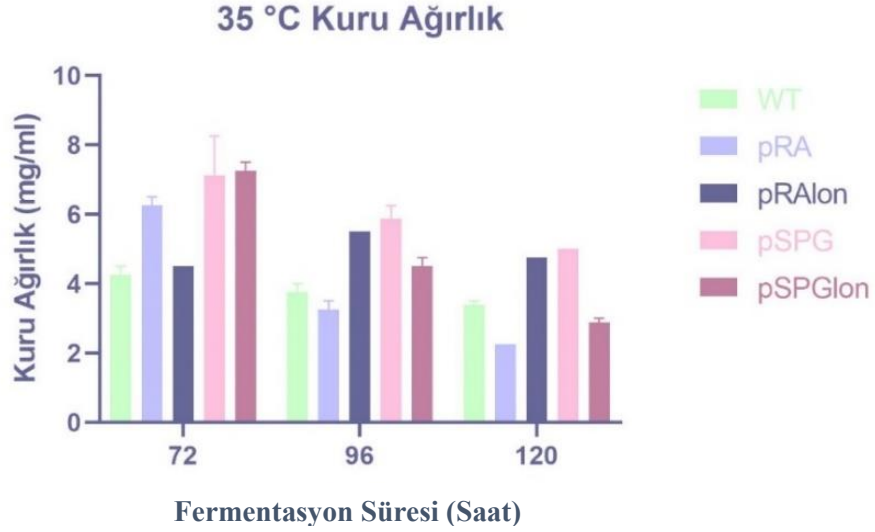
Şekil 7.3: *S. coelicolor* A3(2)'nin yaban suş ve rekombinant suşlarının 30 °C'de büyüme grafiği.

30 °C'de gerçekleştirilen fermentasyonda 72. saatte aktinorhodinin spesifik aktivitesi bakımından yaban suş ile Sco-pRA_{lon} ve Sco-pSPG_{lon} arasında istatistiksel olarak çok yüksek düzeyde fark olduğu ($p \leq 0,0001$) ve rekombinant suşların yaban suştan daha fazla antibiyotik ürettiği görülmüştür (Şekil 7.4). Fermentasyonun 96. saatinde Sco-pRA_{lon} yaban suştan 18-19 kat ($p \leq 0,001$), Sco-pSPG_{lon} suşu ise 9 kat ($p \leq 0,01$) daha fazla antibiyotik üretmiştir. 120. saatte pRA_{lon} taşıyan suşun hücre büyümesine bağlı olarak spesifik aktivitesinin düştüğü ancak yine de yaban suştan 5 kat fazla spesifik aktivite gösterdiği görülmüştür. Sco-pSPG_{lon} suşunun antibiyotik üretiminde ise önemli bir değişiklik olmamış, yaban suşa kıyasla 8 kat fazla spesifik aktivite göstermiştir.



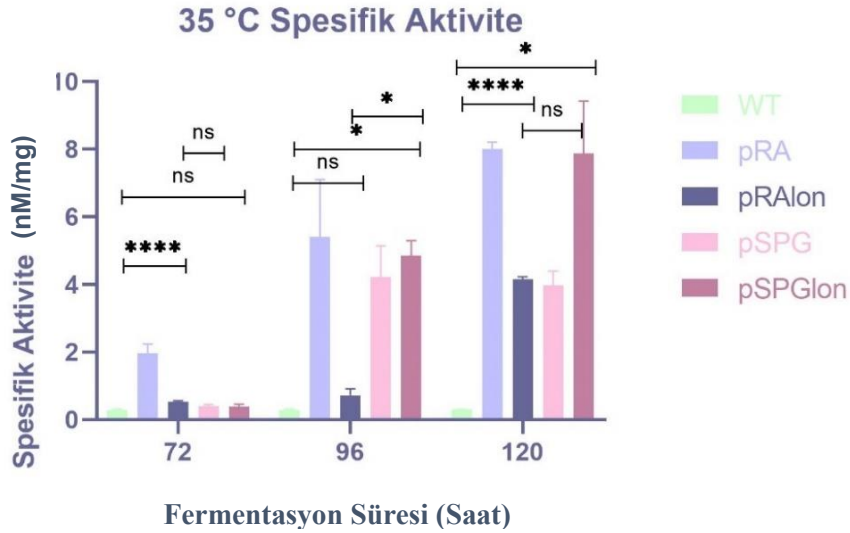
Şekil 7.4: *S. coelicolor* A3(2)'nin yaban suş ve rekombinant suşlarının 30 °C'de aktinorhodin üretme profillerinin karşılaştırılmalı grafiği. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri grafiklerde şu şekilde gösterilmiştir: $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***); $p \leq 0,0001$ (****).

35 °C'de gerçekleştirilen fermentasyonda 72. saatte Sco-pRALon kontrol suşu olan pRA suşuna göre daha az büyümüşken 96. ve 120. saatlerde kontrol grubu ve yaban suşa göre daha fazla büyüme göstermiştir (Şekil 7.5). Sco-pSPGlon 72. saatte yaban suşa göre çok fazla büyümüştür ancak 96. saatte büyüme miktarı giderek azalmış yaban suş 120. saatte Sco-pSPGlon suşunu geçmiştir. Bununla birlikte Sco-pSPGlon kontrol grubu olan pSPG suşuyla 72. saatte yakın büyüme gösterirken 96. ve 120. saatlerde kontrol suşu Sco-pSPGlon suşundan çok daha fazla büyüme göstermiştir. lon geni taşıyan Sco-pRALon ve Sco-pSPGlon suşları karşılaştırıldığında ise pRALon taşıyan suş 72. saatte pSPGlon taşıyan suşa göre az büyüme gösterirken 96. ve 120. saatte onu geçerek daha fazla büyüme göstermiştir.



Şekil 7.5: *S. coelicolor* A3(2)'nin yaban suş ve rekombinant suşlarının 35 °C'de büyüme grafiği.

S. coelicolor A3(2) suşları ile 35 °C'de gerçekleştirilen fermentasyon denemesi sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda, yaban suş ve rekombinant suşların aktinorhodin üretimleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar grafikleştirilmiştir (Şekil 7.6). 96. saatte Sco-pSPGlon yaban suşa göre 15-16 kat daha fazla aktinorhodin üretmiştir ve bu fark istatistiksel olarak da anlamlı bir farktır ($p \leq 0,05$). 120. saatte ise yaban tipe göre Sco-pSPGlon 26 kat Sco-pRAlon 13-14 kat fazla antibiyotik üretmiştir. Sco-pRAlon suşunun 35 °C'de antibiyotik üretimine daha geç başladığı (120. saat) Sco-pSPGlon suşunun ise daha erken ve daha fazla antibiyotik ürettiği gözlemlenmiştir.



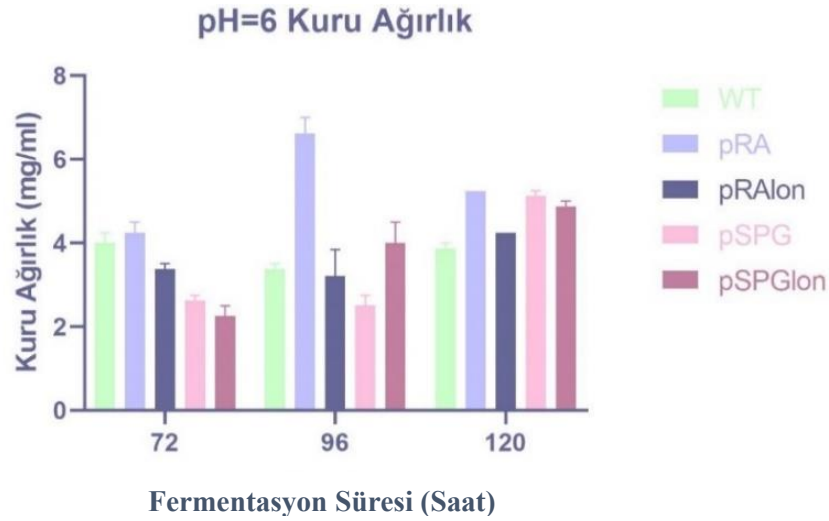
Şekil 7.6: *S. coelicolor* A3(2)'nin yaban suş ve rekombinant suşlarının 35 °C'de aktinorhodin üretme profillerinin karşılaştırılmalı grafiği. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri grafiklerde şu şekilde gösterilmiştir: $p > 0,05$ (ns); $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,0001$ (****).

7.1.2. Optimum pH'nın Belirlenmesi

S. coelicolor yaban suşu ve rekombinant suşları için optimum pH seviyesinin belirlenmesi ve aktinorhodin üretim düzeylerinin karşılaştırılması amacıyla diğer tüm parametreler sabit tutularak fermentasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Denemeler, daha önce belirlenmiş olan 30 °C sabit sıcaklık koşulunda yürütülmüş ve sadece ortam pH'sı değişken olarak ele alınmıştır. Bu çalışmada laboratuvarımızda R2YE besiyerinin otoklav sonrası solüsyonları ekledikten sonraki pH~ 6.30 değeri ölçülmüş ve optimizasyon deneylerinde de pH=6, pH=6.30, pH=6.5 ve pH=7 başlangıç değerleri kullanılmıştır. Her bir koşulda fermentasyon süreci 180 rpm'de çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiş, 72., 96. ve 120. saatlerde örnek alınarak kuru ağırlık ölçümleri ve aktinorhodin antibiyotik ölçümleri yapılarak spesifik aktivite hesaplanmış ve elde edilen veriler kullanılarak grafikler hazırlanmıştır.

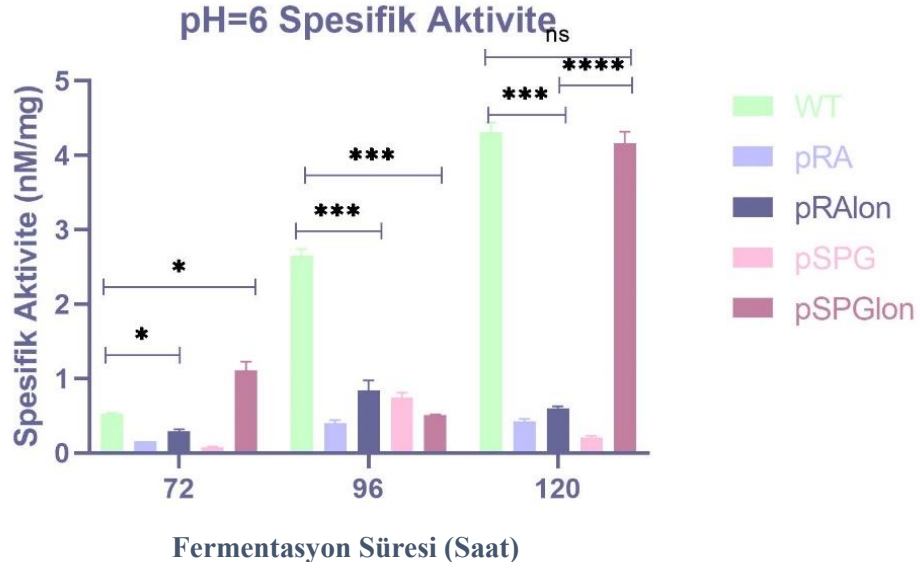
S. coelicolor suşlarıyla pH=6'da gerçekleştirilen deney sonuçlarına göre 72. saatte Sco-pRAlon ve Sco-pSPGlon suşları yaban suşa göre daha az büyüme göstermiştir ancak 96. ve 120. saatlerde yaban suşu yakalamış ve geçmişlerdir (Şekil 7.7). Bu koşullarda gerçekleştirilen deneylerde pRA plazmiti taşıyan kontrol suşunun Sco-pRAlon suşundan daha fazla büyüdüğü gözlemlenmiştir. 72. ve 120. saatlerde Sco-

pSPGlon suşu pSPG plazmiti taşıyan kontrol suşundan daha az büyüme gösterirken 96. saatte önemli ölçüde fazla büyüme göstermiştir.



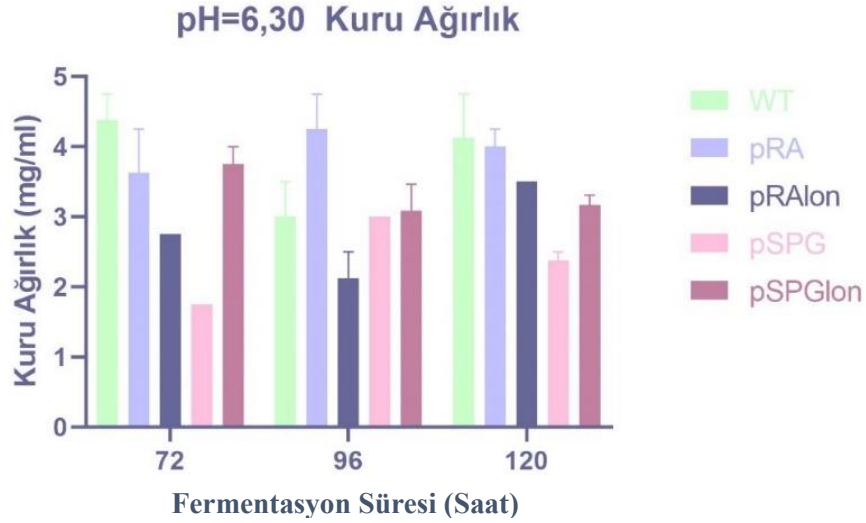
Şekil 7.7: *S. coelicolor* A3(2)'nin yaban suş ve rekombinant suşlarının pH=6'da büyüme grafiği.

S.coelicolor suşlarıyla pH=6'da gerçekleştirilen antibiyotik ölçüm sonuçlarına göre 72. saatte yaban suş ile rekombinant suşlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p \leq 0,05$) ve Sco-pSPGlon bu süreçte yaban suşa göre yaklaşık 2 kat fazla antibiyotik üretmiştir (Şekil 7.8). 96. saat sonuçlarında ise yaban suş ve rekombinant suşlar arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir fark olduğu görülmektedir ($p \leq 0,001$) ve yaban suşun özellikle 72. saatten sonra yüksek oranda antibiyotik üretmeye başladığı görülmüştür. 120. saat sonuçları R2YE'nin pH'sının düşürülmesi durumunda yaban suş ve Sco-pSPGlon'un Sco-pRAlon ile aralarında anlamlı bir fark olduğunu ve bu suşların Sco-pRAlon'a göre 4 kattan fazla aktinorhodin ürettiğini göstermiştir. 120. saat örneklerine göre pSPGlon taşıyan suş ile yaban suşun aktinorhodin üretimleri neredeyse aynıdır ve aralarında anlamlı bir fark yoktur ($p > 0,05$).



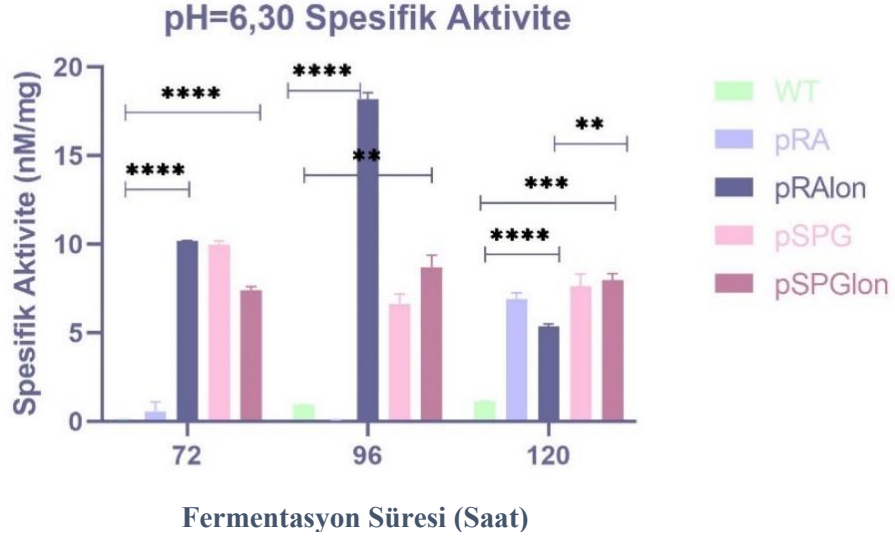
Şekil 7.8: *S. coelicolor* A3(2)'nin yaban suş ve rekombinant suşlarının pH=6'da aktinorhodin üretme profillerinin karşılaştırılmalı grafiği. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri grafiklerde şu şekilde gösterilmiştir: $p > 0,05$ (ns); $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,001$ (**); $p \leq 0,0001$ (****).

R2YE besiyerinin başlangıç pH'sı 6.30 olduğunda yaban suş tüm fermentasyon süresince Sco-pRA_{lon} suşuna göre çok daha fazla büyüme göstermiştir (Şekil 7.9). Sco-pSPG_{lon} 96. saatte yaban suşu yakalamasına rağmen 72. ve 120. saatlerde yaban suştan çok daha az büyüme göstermiştir. *lon* geni taşıyan suşlar karşılaştırıldığında Sco-pRA_{lon} 72. ve 96. saatlerde Sco-pSPG_{lon} suşuna göre görülebilir şekilde yavaş büyümesine rağmen 120. saatte daha fazla büyümüştür.



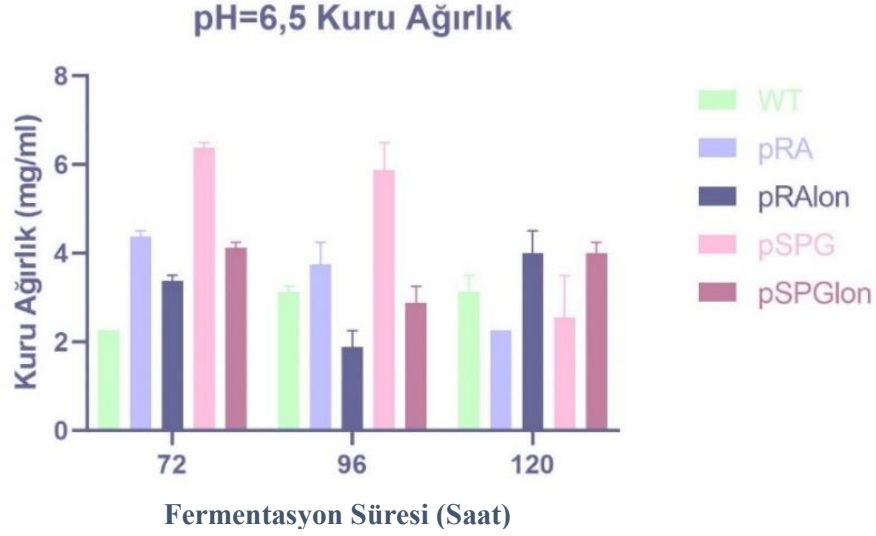
Şekil 7.9: *S. coelicolor* A3(2)'nin yaban suş ve rekombinant suşların pH=6.30'da büyüme grafiği.

pH 6.30'da *S. coelicolor* A3(2) yaban suşu ile rekombinant suşların aktinorhodin üretim düzeyleri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir (Şekil 7.10). Elde edilen sonuçlara göre, 72. saatte her iki rekombinant suşun antibiyotik üretiminin yaban suşa kıyasla çok yüksek olduğu bulunmuştur ($p \leq 0,0001$). 96. saatte Sco-pRA_{lon}'un, yaban suşa göre yaklaşık 18–19 kat daha yüksek spesifik aktiviteye ulaştığı ve bu farkın yüksek düzeyde anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p \leq 0,001$). Aynı zamanda Sco-pSPG_{lon} suşu da 96. saatte yaban suştan yaklaşık 9 kat daha fazla aktivite sergilemiş ve istatistiksel olarak güçlü bir fark ortaya koymuştur ($p \leq 0,01$). 120. saat analizinde Sco-pRA_{lon} suşunda büyümeye bağlı bir düşüş gözlemlenmekle birlikte, bu suş yine de yaban suşa kıyasla yaklaşık 5 kat daha fazla aktinorhodin üretmiştir ($p \leq 0,0001$). Diğer yandan, Sco-pSPG_{lon} suşu daha stabil bir üretim profili sergilemiş ve 120. saatte yaban suşa göre yaklaşık 8 kat daha fazla aktinorhodin üretmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,001$). 120. saat örnekleri değerlendirildiğinde Sco-pSPG_{lon}'un Sco-pRA_{lon}'dan fazla spesifik aktivite gösterdiği görülmüştür ancak tüm fermentasyon boyunca yapılan analizler aktinorhodin üretimi açısından en verimli suşun pRA_{lon} plazmiti taşıyan suş olduğunu göstermiştir.



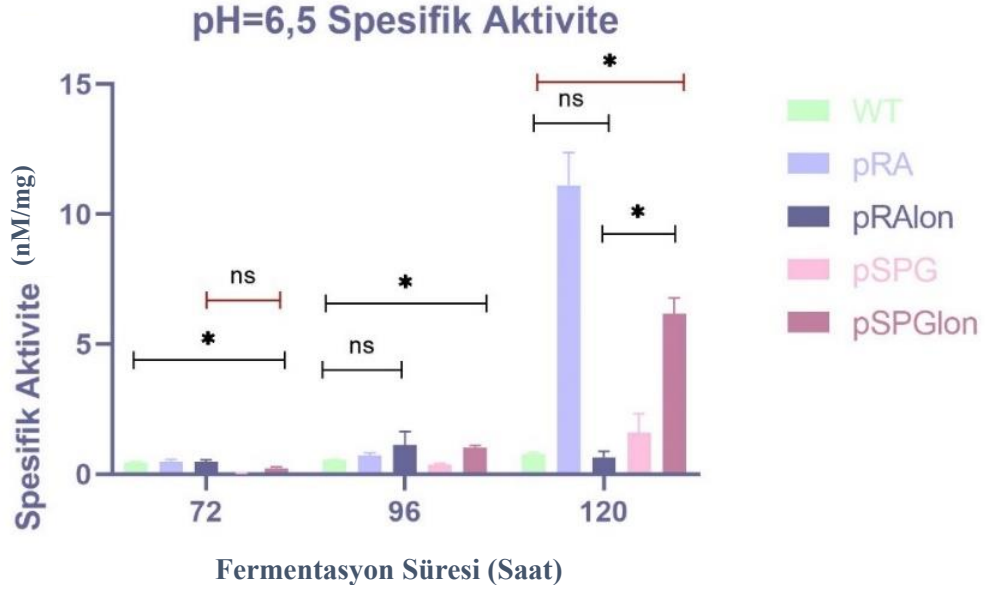
Şekil 7.10: *S. coelicolor* A3(2)'nin yaban suş ve rekombinant suşlarının pH=6.30'da aktinorhodin üretme profillerinin karşılaştırılmalı grafiği. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri grafiklerde şu şekilde gösterilmiştir: $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***); $p \leq 0,0001$ (****).

S.coelicolor suşlarıyla pH=6.5'da gerçekleştirilen deney sonuçlarına göre 72. saatte rekombinant suşların yaban suşa göre çok daha iyi büyüdüğü gözlenmiştir (Şekil 7.11). İlginç bir şekilde 72. ve 96. saatlerde kontrol grubu olan suşların *lon* geni taşıyan suşlardan daha fazla büyüdüğü, 120. saatte ise bu durumun tersine döndüğü yani rekombinant suşların kontrol suşlarından daha fazla büyüdüğü görülmüştür. Sco-pSPGlon suşu Sco-pRAlon suşuna göre 72. ve 96. saatlerde fazla büyüme göstermiş ancak 120. saatte büyüme oranları eşitlenmiştir.



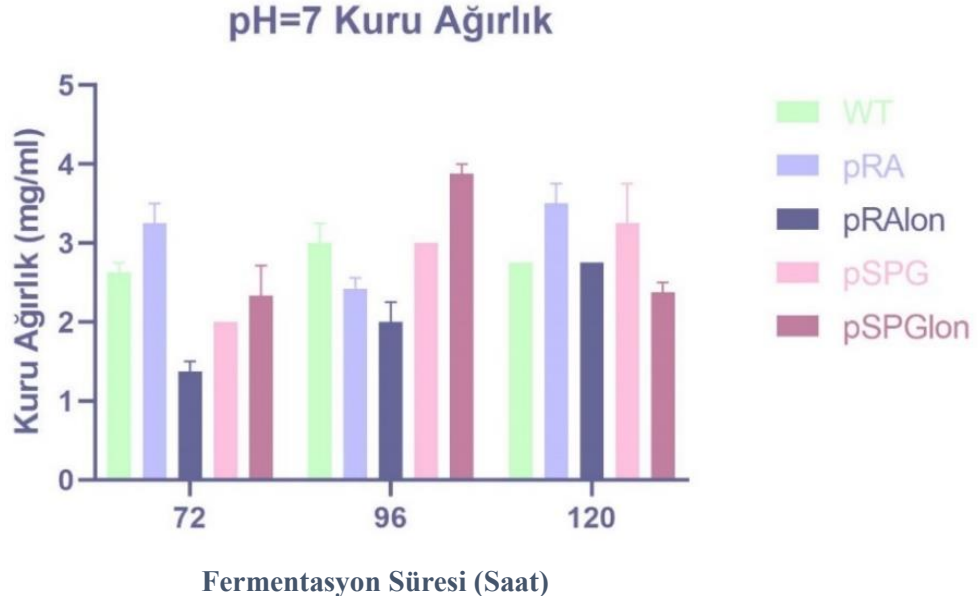
Şekil 7.11: *S. coelicolor* A3(2)'nin yaban suş ve rekombinant suşlarının pH=6.50'de büyüme grafiği.

Besiyeri başlangıç pH'sının 6.5'e ayarlanmasıyla yürütülen deneysel koşullarda, suşların aktinorhodin üretim kapasitesi belirgin bir şekilde değişiklik göstermiştir (Şekil 7.12). pRA plazmidini taşıyan kontrol suşun, özellikle 120. saatte ulaştığı yüksek spesifik aktivite değeri ilginç bulunmuştur. 72. saatte, Sco-pSPGlon suşunun, yaban suşa kıyasla anlamlı düzeyde daha düşük aktivite gösterdiği belirlenmişken ($p \leq 0,05$), rekombinant suşlar Sco-pRAlon ile Sco-pSPGlon arasında anlamlı fark görülmemiştir ($p > 0,05$). 96. saatte her iki rekombinant suş da yaban suştan daha fazla antibiyotik üretmiştir. 120. saatte ise genel olarak aktivite seviyeleri düşük kalmış fakat kontrol grubu olarak pRA plazmiti taşıyan ve pSPGlon plazmiti taşıyan suşların aktivitesi anlamlı şekilde artış göstermiştir ($p \leq 0,05$). Bu durum, bu pH koşulunda üretimin gecikmeli başladığını düşündürmektedir.



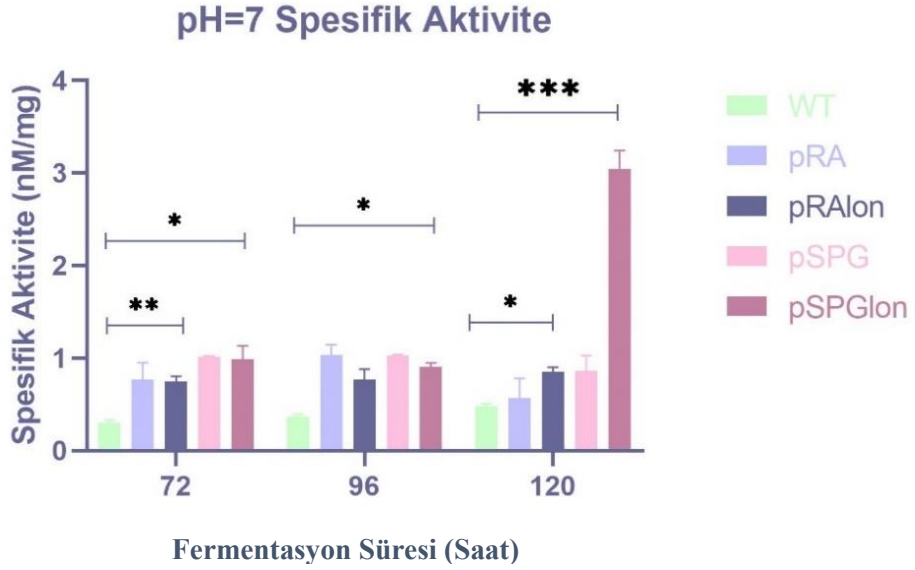
Şekil 7.12: *S. coelicolor* A3(2)'nin yaban suş ve rekombinant suşlarının pH=6.50'de aktinorhodin üretme profillerinin karşılaştırılmalı grafiği. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri grafiklerde şu şekilde gösterilmiştir: $p > 0,05$ (ns); $p \leq 0,05$ (*).

S. coelicolor suşlarıyla pH=7'de gerçekleştirilen deney sonuçlarına göre 72. ve 96. saatlerde yaban suş Sco-pRAlon'a göre daha fazla büyümüş ancak 120. saatte büyüme miktarı eşitlenmiştir (Şekil 7.13). Sco-pSPGlon suşu ise 72. ve 96. saatlerde Sco-pRAlon suşuna göre önemli ölçüde fazla büyüme göstermiştir ancak 120. saatte Sco-pRAlon daha fazla büyüme göstermiştir. 120 saatlik fermentasyon sonucunda en fazla büyümeyi 96. saatte Sco-pSPGlon suşu göstermiştir. Bu sonuçlar Sco-pRAlon suşunun pH=7'de daha yavaş büyüdüğünü göstermiştir.



Şekil 7.13: *S. coelicolor* A3(2)'nin yaban suş ve rekombinant suşlarının pH=7'de büyüme grafiği.

S.coelicolor suşlarıyla pH=7'de gerçekleştirilen deney sonuçlarına göre yaban suşu ile rekombinant suşlar arasında aktinorhodin üretimine ilişkin anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 7.14). Genel olarak tüm suşlar için üretim düzeylerinin düşük seyrettiği bu pH değerinde, özellikle Sco-pSPGlon'un 120. saatte anlamlı bir artış gösterdiği dikkat çekmektedir. 72. saatte yaban suşa göre istatistiksel olarak Sco-pRAlon güçlü derece anlamlı fark ($p \leq 0,01$) ile yaklaşık 2 kat fazla ve Sco-pSPGlon anlamlı fark ($p \leq 0,05$) göstererek yaklaşık 3 kat daha fazla spesifik aktiviteye sahiptir. 96. saatte pRAlon taşıyan suş yaban suşa göre daha fazla aktinorhodin üretmesine rağmen bu fark istatistiksel bir anlama sahip değildir ($p > 0,05$) fakat pSPGlon taşıyan suş anlamlı ölçüde ($p \leq 0,05$) yüksek spesifik aktivite göstermeye devam etmiştir. 120. saatte ise Sco-pSPGlon en yüksek aktinorhodin üretimine sahiptir ve yaban suşun 6 katı, Sco-pRAlon'un ise 3 katı değerdedir ve bu fark istatistiksel olarak güçlü derecede anlamlıdır ($p \leq 0,01$).

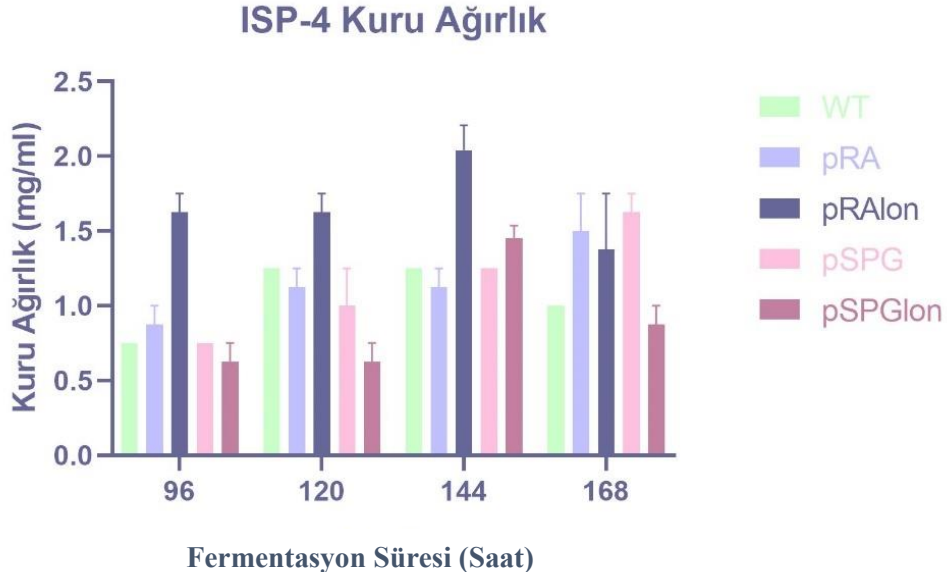


Şekil 7.14: *S. coelicolor* A3(2)'nin yaban suş ve rekombinant suşlarının pH=7'de aktinorhodin üretme profillerinin karşılaştırılmalı grafiği. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri grafiklerde şu şekilde gösterilmiştir: $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***)

7.1.3. *S. coelicolor* A3(2) Rekombinant Suşlarının ISP-4 Besiyerinde Büyütülmesi

R2YE dışında daha basit ve ucuz başka bir besiyerinin antibiyotik üretimindeki etkisini belirlemek için nişasta içerikli ISP-4 besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyerinde yürütülen deneylerde *S. coelicolor* suşlarının büyümesi ve antibiyotik üretimi R2YE besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonlardan daha geç başladığı için 96., 120., 144. ve 168. saatlerde örnekler toplanarak ölçümler yapılmıştır (Şekil 7.15, Şekil 7.16).

ISP-4 besiyerinde yürütülen deneyde Sco-pRA_{lon} suşu 168. saate kadar diğer suşlardan daha fazla büyüme göstermiş, ancak 168. saatte kontrol grubu olan pRA ve pSPG plazmiti taşıyan suşların büyümesi Sco-pRA_{lon} suşuna yaklaşmıştır. Yaban suş ve Sco-pSPG_{lon} suşları ise bu besiyerinde 120. saat hariç birbirlerine yakın derecede büyümüşür (Şekil 7.15).

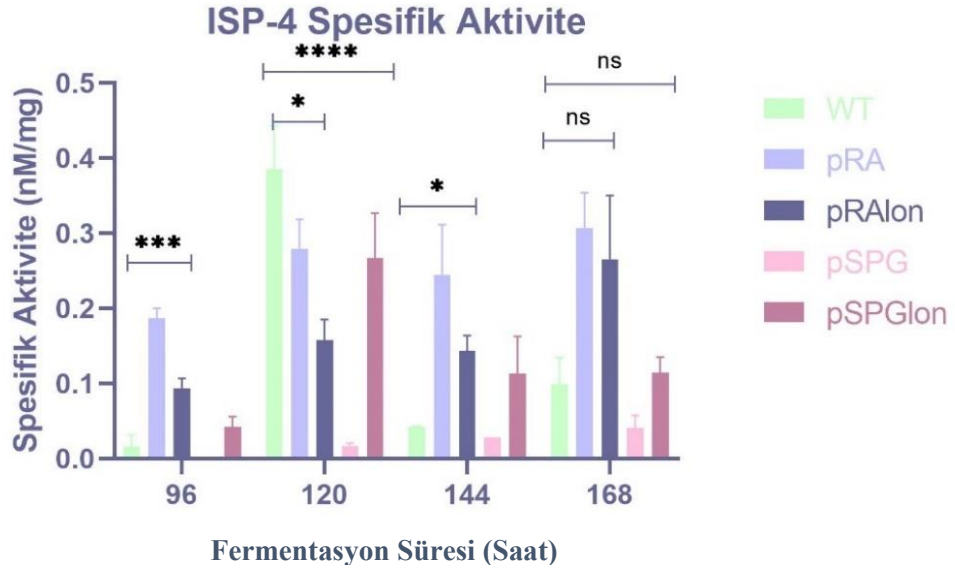


Şekil 7.15: *S. coelicolor* A3(2)'nin yaban suş ve rekombinant suşlarının ISP-4 besiyerinde büyüme grafiği.

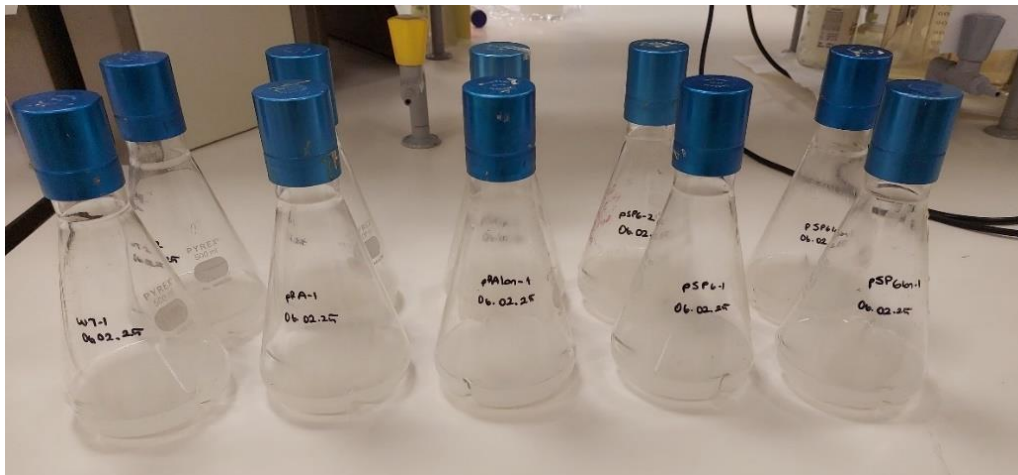
ISP-4 besiyerinde suşların aktinorhodin üretimleri spesifik aktivite hesaplanarak karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir (Şekil 7.16). 96. saatte pRA_{lon} taşıyan suşun spesifik aktivitesi yaban suşa göre yaklaşık 9 kat fazla bulunmuştur ($p \leq 0,001$). 120. saatte ise yaban suş bütün suşlardan daha fazla antibiyotik üretmiştir. Yaban suş ile Sco-pSPG_{lon} arasındaki fark çok yüksek düzeyde anlamlıyken ($p \leq 0,0001$), Sco-pRA_{lon} arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$). 144. saatte Sco-pRA_{lon}'un spesifik aktivitesi yaban suşa kıyasla belirgin şekilde daha yüksek bulunmuştur ($p \leq 0,05$). 168. saate gelindiğinde ise hem Sco-pRA_{lon} hem de Sco-pSPG_{lon} suşları arasında, hem de bu suşlarla yaban suş arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p > 0,05$). Sco-pRA_{lon}'un spesifik aktivitesinde 144. saatten sonra yüksek oranda artış görülmüşken Sco-pSPG_{lon} suşunun spesifik aktivitesi ise 120. saatten sonra düşmüştür.

ISP-4 besiyerinde yapılan fermentasyon deneyinin başında inokulum sonrası besiyerinin görüntüsü bulanık beyaz iken (Şekil 7.17) fermentasyonun 168. saatinde besiyeri renginin aktinorhodin üretimine bağlı olarak mavi renge döndüğü gözlenmiştir (Şekil 7.18). Bu renk değişimine rağmen spesifik aktivitenin oldukça düşük olması ise örneklerin bir gece 5 M KOH ile inkübasyonunun ardından yapılan santrifüj sonucunda mavi renkli aktinorhodinin süpernatantta kalmayıp hücre peleti ile

çökmesiyle ilişkilendirilmiştir (Şekil 7.19). Gözlemlenen bu duruma, aktinorhodinin besiyeri bileşikleri ile tepkimeye girmesinin neden olduğu düşünülmüştür. Bu sonuçlar, ISP-4 besiyerinin *Streptomyces* suşlarında aktinorhodin ölçümü için pek uygun olmadığını göstermiştir.



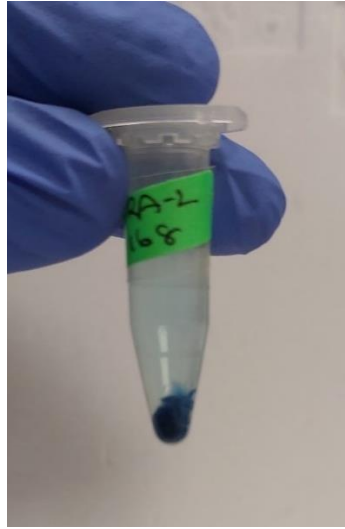
Şekil 7.16: *S. coelicolor* A3(2)'nin yaban suş ve rekombinant suşlarının ISP-4 besiyerinde aktinorhodin üretme profillerinin karşılaştırmalı grafiği. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri grafiklerde şu şekilde gösterilmiştir: $p > 0,05$ (ns); $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,001$ (***); $p \leq 0,0001$ (****).



Şekil 7.17: *S. coelicolor* A3(2)'nin yaban suş ve rekombinant suşlarının ISP-4 besiyerinde fermentasyon başlangıcında kültürlerin görüntüsü.



Şekil 7.18: *S. coelicolor* A3(2)'nin yaban suş ve rekombinant suşlarının ISP-4 besiyerinde 168. saatte fermentasyon sonunda kültürlerin görüntüsü.

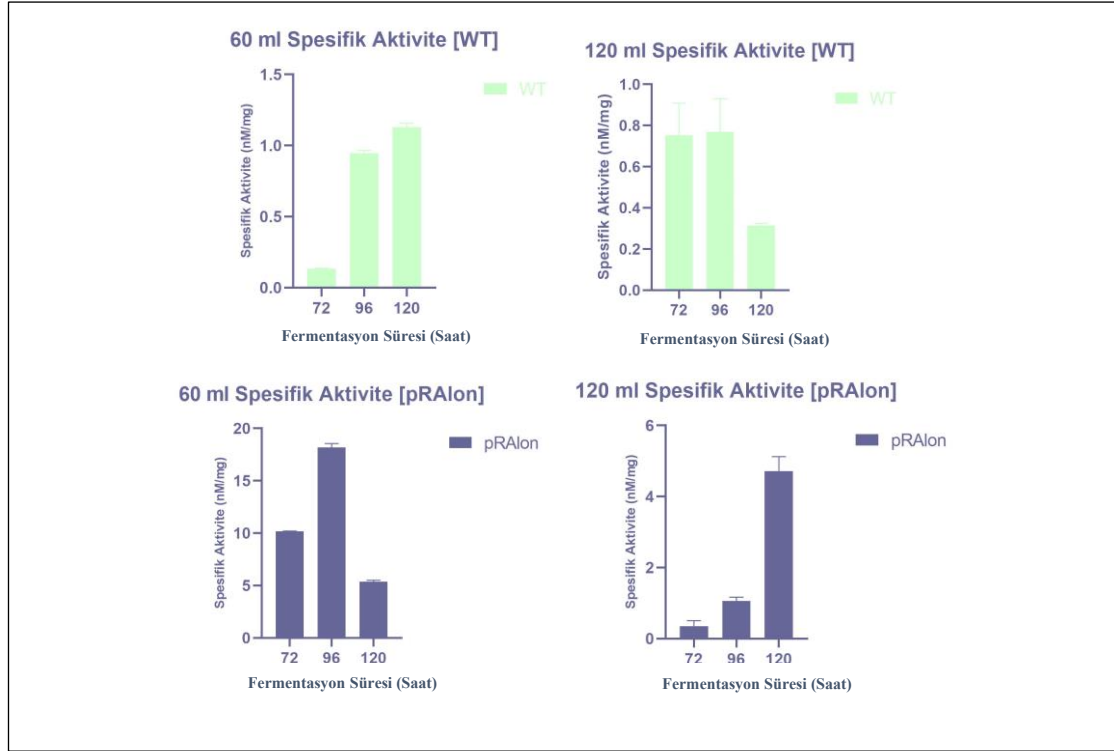


Şekil 7.19: *S. coelicolor* A3(2)'nin yaban suş ve rekombinant suşlarının ISP-4 besiyerinde fermentasyonu sonrası antibiyotik ölçümüne hazırlanmış örnek bir Eppendorf görüntüsü.

7.1.4. Kültür Hacminin Sco-pRA_{lon}'da Antibiyotik Üretimine Etkisi

Bu aşamaya kadar alınan bütün sonuçlar değerlendirildiğinde, Sco-pRA_{lon} suşunun yüksek aktinorhodin üretimi için en uygun suş olduğu görüldüğünden çalışmaya bu suş ile devam edilmiştir. Fermentörde büyük ölçekli üretime geçmeden önce Erlenmeyer şişesinde çalışma hacmi 2 katına çıkarılarak antibiyotik ölçümleri yapılmıştır. Deneyler üçer tekrarlı olarak yürütülmüş ve bakteriler Sco-pRA_{lon} suşu için belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilmiştir (Şekil 7.20). Çalışma hacminin 2 katına çıkarılması hem yaban suş hem de rekombinant suşta verim kaybına yol açmıştır. Bu bulgu, üretim ölçeğinin artırılmasının metabolit sentezi üzerindeki

potansiyel etkilerine işaret etmekte olup, büyük hacimli fermentasyonlara geçişte parametrelerin yeniden optimize edilmesi gerektiğini göstermektedir.

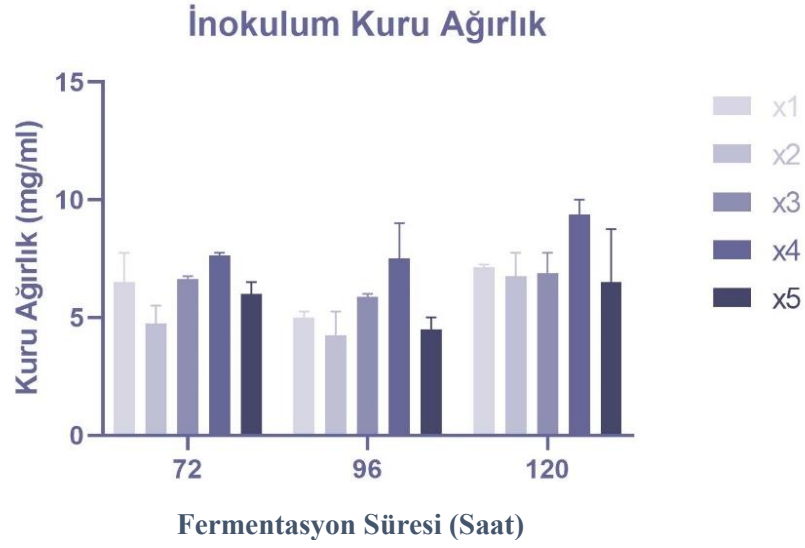


Şekil 7.20: *S. coelicolor* A3(2)'nin yaban suş ve Sco-pRALon suşlarının farklı hacimlerde aktinorhodin antibiyotigi üretme profilleri.

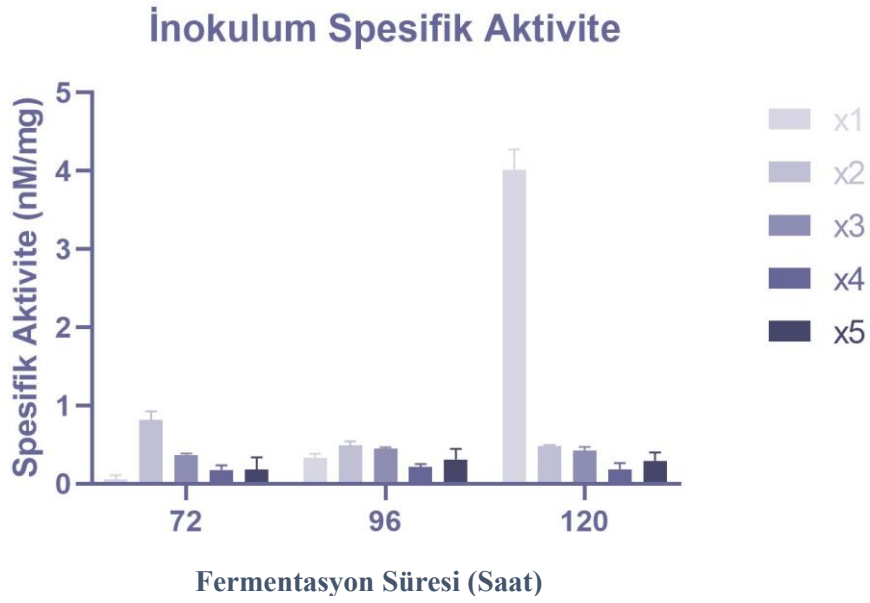
7.1.5. İnokulum Miktarının Sco-pRALon'da Aktinorhodin Üretimine Etkisi

İnokulum miktarının aktinorhodin üretimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, 120 ml'lik üretim hacminde Sco-pRALon ile farklı inokulum oranlarıyla fermentasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, başlangıç inokulum miktarı 1 kat için 1.06 g ıslak hücre olarak belirlenmiş ve deneyler 1, 2, 3, 4 ve 5 kat oranlarında, üçer tekrar olacak şekilde yürütülmüştür. 72., 96. ve 120. saatlerde örnekler toplanarak aktinorhodin üretimi ve kuru ağırlık ölçümleri gerçekleştirilmiş, elde edilen bulgulara göre grafikler oluşturulmuştur (Şekil 7.21, Şekil 7.22). Denemeler sonucunda, inokulum miktarındaki artışa bağlı olarak hücre yoğunluğunun yükseldiği gözlemlenmiştir. Ancak aktinorhodin üretiminin artan inokulum miktarından olumlu etkilenmediği görülmüştür. Özellikle 120. saatte, 1 kat inokulum ile diğer oranlar karşılaştırıldığında 9-10 kat daha fazla spesifik aktivite görülmüştür. Bu sonuçlar,

optimum üretim için uygun inokulum miktarının belirlenmesinin kritik olduğunu göstermektedir.



Şekil 7.21: Sco-pRA_{lon} suşunun farklı inokulum miktarlarında büyüme grafiği

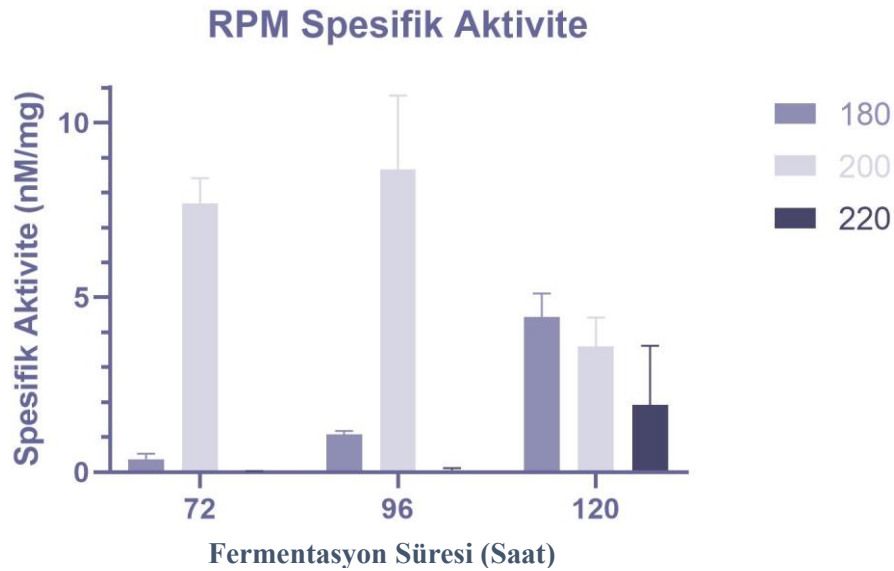


Şekil 7.22: Sco-pRA_{lon} suşunun farklı inokulum miktarlarında aktinorhodin antibiyotiği üretme profilleri.

7.1.6. Çalkalama Hızının (rpm) Sco-pRA_{lon}'da Aktinorhodin Üretimine Etkisi

Çalkalama hızının rekombinant suşta aktinorhodin üretimi üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla Sco-pRA_{lon} 180, 200 ve 220 rpm'de büyütülmüş ve 72., 96. ve 120. saatlerde alınan örnekler üzerinden aktinorhodin üretimi değerlendirilmiş ve sonuçlar spesifik aktivite değerleriyle grafiksel olarak sunulmuştur (Şekil 7.23).

Elde edilen veriler, çalkalama hızının aktinorhodin üretimi üzerinde belirgin bir etkisi olduğunu göstermektedir. Özellikle 200 rpm'de, 72. ve 96. saatlerde ölçülen spesifik aktivite değerleri, hem 180 rpm'ye hem de 220 rpm'ye göre daha verimli bulunmuştur. 96. saatte 200 rpm'de görülen üretim değeri 180 rpm'de görülenin yaklaşık 9 katıdır. Ancak 120. saatte bu hızda üretimde keskin bir düşüş gözlemlenmiştir. Öte yandan 180 rpm'de üretim geç başlayarak 120. saatte göreceli bir artış göstermiştir. 220 rpm'de ise tüm zaman noktalarında aktinorhodin üretiminin sınırlı kaldığı görülmektedir. Bu durum yüksek çalkalama hızına bağlı olarak oluşan mekanik stresin mikrobiyal hücre morfolojisi üzerinde baskılayıcı etkiler oluşturduğunu düşündürmektedir. Sonuç olarak 200 rpm çalkalama hızı bu koşullar altında en verimli aktinorhodin üretimini sağlayan hız olarak değerlendirilmiştir.



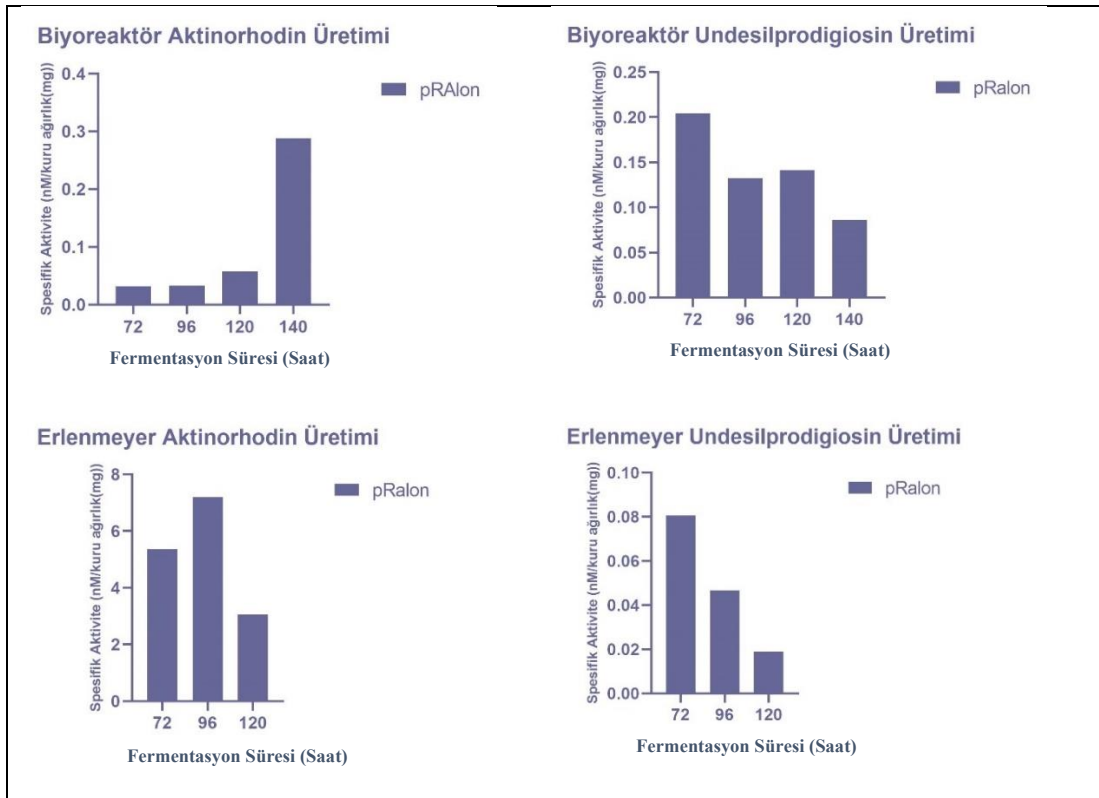
Şekil 7.23: Sco-pRA_{lon} suşunun farklı çalkalama hızında gerçekleştirilen fermentasyonlarda aktinorhodin üretme profilleri.

7.2. Sco-pRA_{lon}'un Fermentörde Büyük Ölçekli Üretimi

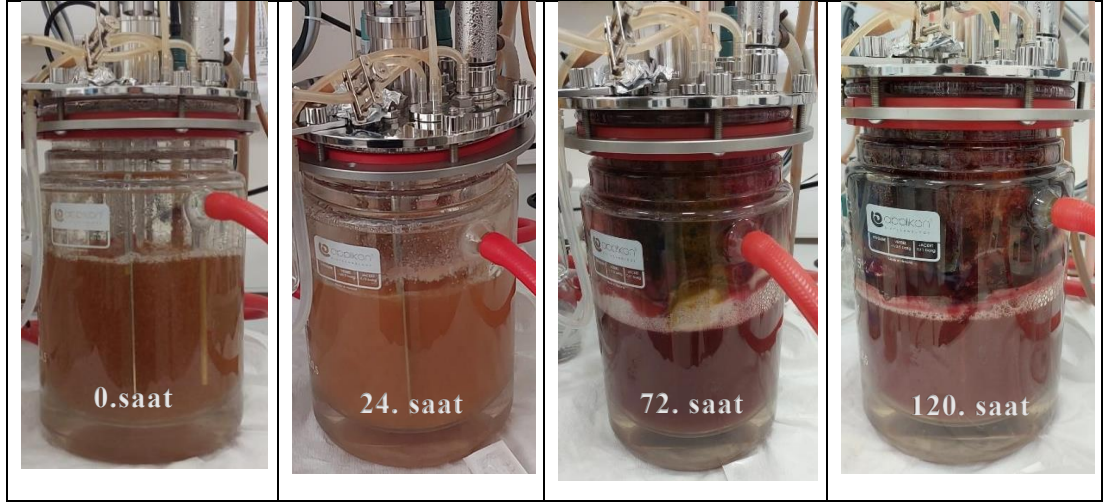
Eppendorf BioFlo 120 modeli biyoreaktörde yürütülen büyük ölçekli fermentasyon çalışmasında, rekombinant Sco-pRA_{lon} suşunun üretim performansı değerlendirilmiştir. 2 litrelik R2YE ortamında gerçekleştirilen bu denemede, pH=6.30, 30 °C sıcaklık, 150–180 rpm çalkalama hızı ve en az %20 çözünmüş oksijen düzeyi hedeflenmiştir. Fermentasyonun ilk 24 saatinde hücre büyümesi gözlemlenmiş ancak ilerleyen saatlerde büyüme durmuş ve besiyerinin bulanıklaştığı fark edilmiştir. 72. saatte alınan örneklerin mikroskopik incelenmesi sonucunda, beklenen peletleşme ve misel gelişimi yerine, hücresel yapının bozulduğu, misellerin parçalandığı ve hücrelerin lizise uğradığı tespit edilmiştir ve deney sonlandırılmıştır. Bu durum, fermentasyon süresince kontrol edilmekte zorlanılan çözünmüş oksijen seviyesindeki dalgalanmalar ve buna bağlı olarak artan çalkalama şiddetinin mikroorganizma üzerindeki olumsuz etkileriyle ilişkilendirilmiştir. Sonuçlar, *S. coelicolor* suşlarının biyoreaktör koşullarında oksijen transferi ve mekanik stres gibi faktörlere karşı hassasiyet gösterdiğini ve bu koşulların üretim sürecini olumsuz yönde etkileyebileceğini ortaya koymuştur.

Eppendorf BioFlo 120 fermentöründe gerçekleştirilen ilk denemede çözünmüş oksijen düzeylerinde dalgalanmalar ve buna bağlı misel parçalanmaları gözlenmiş, bu nedenle rekombinant Sco-pRA_{lon} suşu ile aynı besiyeri ve parametreler korunarak çalışma Applikon ez2-Control fermentöründe tekrar edilmiştir. Bu sistem 2 L toplam hacme sahip olduğundan optimum gaz değişimi ve karıştırma koşullarını sağlamak ve köpüklenme riskini azaltmak amacıyla çalışma hacmi 1,5 L olarak belirlenmiştir. Applikon ez2-Control biyoreaktöründe 72., 96., 120. ve 140. saatlerde aktinorhodin ve undesilprodigiosin üretimini izlemek amacı ile örnekler alınmıştır. Elde edilen sonuçlar Erlenmeyer koşullarında alınan sonuçlarla karşılaştırılmıştır (Şekil 7.24). Bu karşılaştırmada Erlenmeyer koşullarında aktinorhodin spesifik aktivitesinin aynı zaman noktalarında fermentörde ölçülen değerlerin yaklaşık 180 kat (72. saatte), 240 kat (96. saatte) ve 50 kat (120. saatte) üzerinde olduğu görülmüştür. Fermentörde aktinorhodin üretimi 120. saatte oldukça düşük seviyede iken 140. saatte yaklaşık 4,5 kat artış göstererek en yüksek değere ulaşmıştır. Undesilprodigiosin için ise fermentördeki değerler Erlenmeyerdekilerin tersine daha yüksektir; 72. saatte yaklaşık 2,5 kat ve 96. saatte yaklaşık 3 kat daha yüksek bulunurken, 120. saatte fermentörde ölçülen değer erlenmeyerdekinin yaklaşık 8 katı olmuştur. Bu bulgular, Applikon ez2-

Control sisteminde, aktinorhodin üretimi Erlenmeyer koşullarına göre başlangıçta sınırlı kalıp, süreç ilerledikçe özellikle 140. saatte belirgin bir artış göstermiş; undesilprodigiosin üretimi ise daha erken dönemde yüksek başlayıp zamanla azalmıştır. Fermentasyon süresince başlangıçta, 24., 72. ve 120. saatlerde kültürün fiziksel görünümündeki değişimleri belgelemek amacıyla fotoğraflar çekilmiş ve bu görseller ilgili zaman noktalarındaki morfolojik farklılıkları destekleyici nitelikte sunulmuştur (Şekil 7.25). Fermentasyon süreci boyunca 48. saatten itibaren özellikle fermentörde köpük oluşumunun belirgin şekilde arttığı, bu köpüğün fermentör çeperinde pelet ve misel kümelerinin yapışmasına yol açtığı gözlemlenmiştir. Çeperde yapışan bu biyokütlenin süspansiyon halindeki kültürden morfolojik olarak ayrıldığı ve bu durumun büyüme dinamiklerinde farklılık yarattığı görülmüştür. Şekil 7.25'te 72. saatte çekilen fotoğrafta da görüldüğü üzere çeperde tutunmuş bakterilerin süspansiyon içindeki kültürden farklı bir şekilde büyüdüğü ve renklendiği saptanmıştır. Bu durum, sistemin köpük ve yüzeye tutunma eğiliminin biyokütlenin dağılımını ve görünümünü etkileyerek üretim parametrelerinde değişikliğe yol açabileceğini göstermektedir.



Şekil 7.24: Sco-pRAlon suşunun biyoreaktör ve Erlenmeyerde aktinorhodin ve undesilprodigiosin antibiyotiklerini üretme profilleri



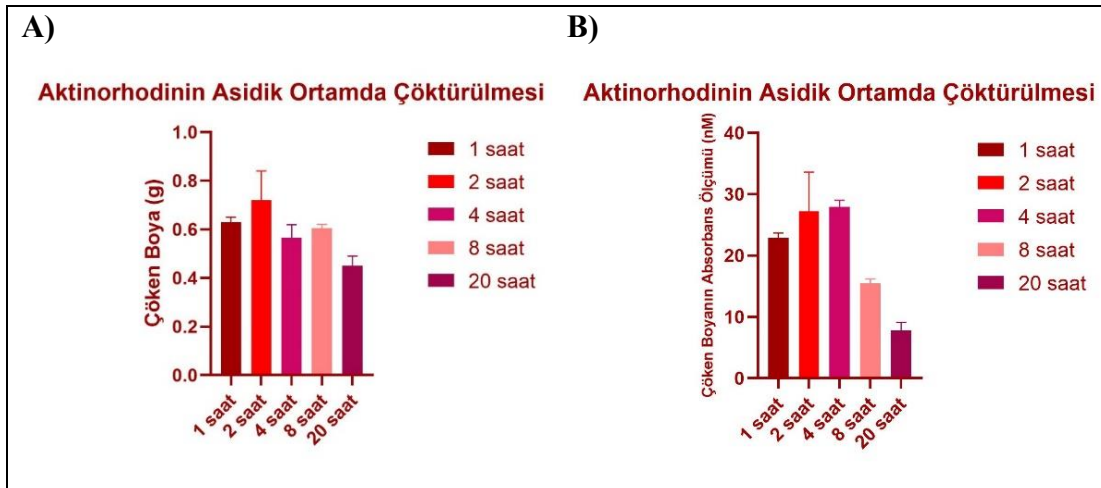
Şekil 7.25: Farklı saatlerde *Sco-pRA_{lon}* kültürünün fermentördeki görünümü. Çepere yapışan biyokütlenin ürettiği ikincil metabolitler renk değişimiyle ayırt edilmektedir (72. ve 120. saatlerde).

7.3. Aktinorhodinin Kumaş Boyası Olarak Potansiyelinin Değerlendirilmesi

7.3.1. *Sco-pRA_{lon}* Tarafından Üretilen Aktinorhodinin İzolasyonu

Daha önce Taher ve diğerleri, yürüttükleri çalışmada aktinorhodini kültür ortamından izole edebilmek için kültür santrifüj edildikten sonra üst fazın pH'sının 3'e ayarlandığını, bu işlem sonucunda oluşan ham aktinorhodin çöktürülmesinin kırmızı renkli olarak toplandığını, kurutulduktan sonra toz haline getirildiğini ve sonrasında dioksan kullanılarak saflaştırıldığını bildirmiştir [Taher vd., 2020]. Ancak bu yöntemle ilişkin detaylar verilmediğinden, bu çalışmada aktinorhodinin asidik ortamda çöktüğü bilgisi temel alınarak pigmentin fiziksel olarak ayrıştırılmasına yönelik bir izolasyon protokolü geliştirilmesi hedeflenmiştir. Fermentasyon sonrası aktinorhodinin izolasyonu için başlangıçta uygulanan protokolde çözeltinin pH'sı 2–3 aralığına düşürülerek pigment çöktürülmeye çalışılmış ancak bu yöntemde, asidik ortamın aktinorhodin çöktürülmesi için yeterli çökmeyi sağlayamadığı ve ciddi ürün kaybına yol açtığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle pigment verimini artırmak amacıyla yeni bir protokol geliştirilmiştir. Yeni yöntemde, pH=2.5'e indirildikten sonra ışık ve hava ile teması engellenerek alüminyum folyo ile sarılmış tüplerde +4 °C'de inkübasyona bırakılmış ve bu yöntemin verimi arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu yöntemin etkinliğini artırmak amacıyla +4 °C'de farklı inkübasyon süreleri denenmiştir. Optimizasyon

çalışması kapsamında asidik ortamda inkübasyon süresi için 1, 2, 4, 8 ve 20 saat denenmiş ve her grup için 3 tekrar yapılmıştır. İnkübasyon sonrası örneklerde çöken aktinorhodin ağırlığı ölçülmüş ve bu çökelti aynı koşullarda çözdürülerek spektrofotometre ölçümü gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler ile grafikler hazırlanmıştır (Şekil 7.26). İki farklı ölçüm yapılarak inkübasyon süresinin aktinorhodin çökmesi ve stabilitesi üzerine etkileri incelenmiştir. İnkübasyon süresinin çöken aktinorhodin ağırlığında çok ciddi bir değişime neden olmadığı fakat aktinorhodinin spektrofotometrik ölçümleri sonucuna göre absorbens değerinin 4. saatten sonra büyük ölçüde düştüğü görülmüştür (Şekil 7.26). Çöken pelet ağırlığına rağmen absorbens değerindeki düşüş asidik ortamda uzun süre bekletilmenin besiyerindeki aktinorhodin dışındaki bileşenlerin de çökmesi ya da aktinorhodinin yapısının süreye bağlı olarak stabilitesini kaybetmesiyle ilişkilendirilmiştir. 2 ve 4 saat bekletilen örneklerin absorbens değerinin yüksekliği aktinorhodin çöktürme yöntemi için en uygun süre olduklarını göstermiştir. 4 saat bekletilen örnekler için çökelti ağırlığının daha düşük olmasına rağmen absorbens değerinin yüksekliği daha yüksek saflıkta izolasyon sağlandığını göstermiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucu aktinorhodin saflaştırma yöntemi için asidik ortamda pigment çöktürme aşamasının optimum süresinin 4 saat olduğuna karar verilmiştir.



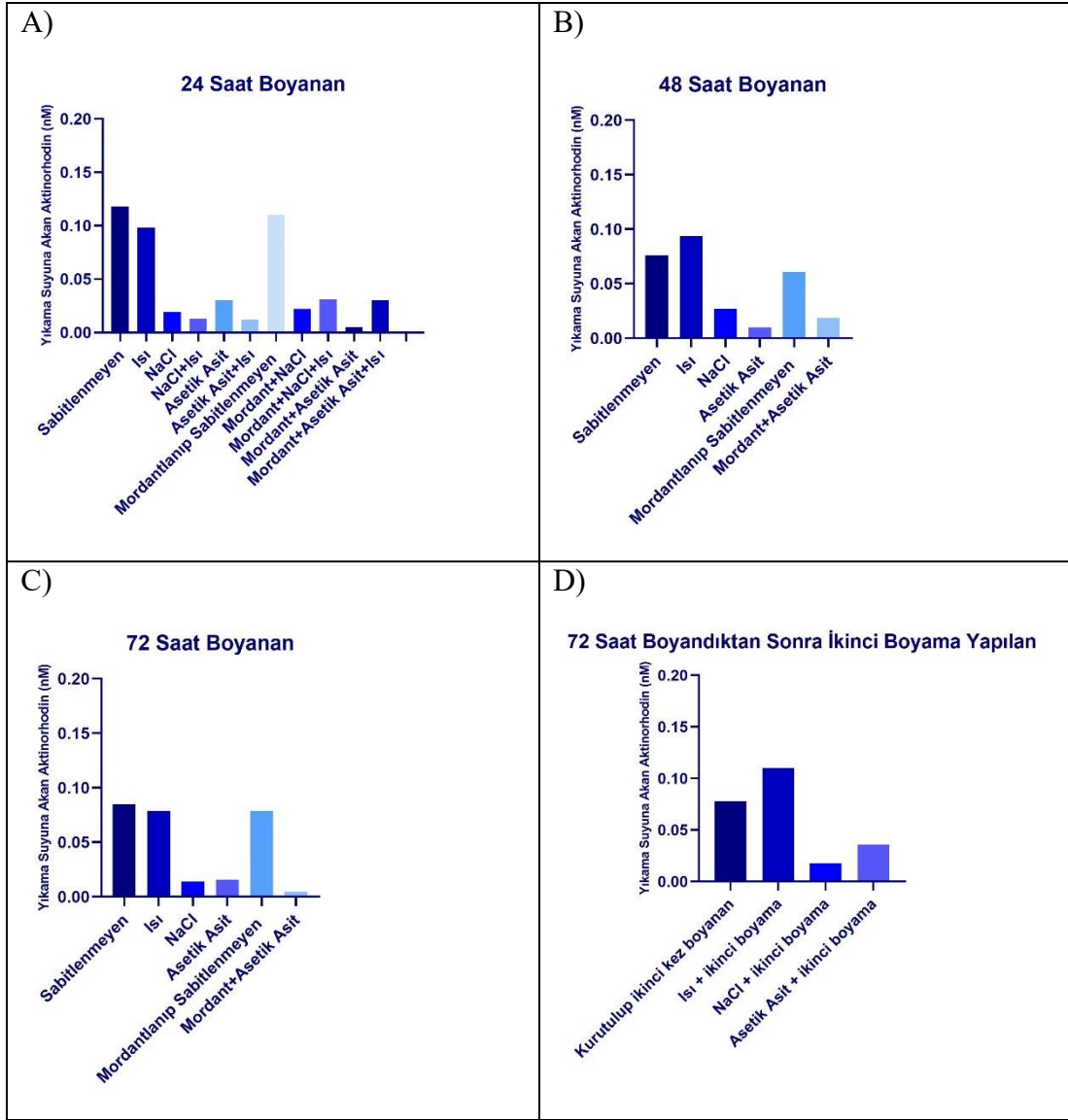
Şekil 7.26: A) Asidik ortamda farklı sürelerde inkübe edilerek çöken aktinorhodinin ağırlıkları. **B)** Asidik ortamda farklı sürelerde inkübe edilerek çöken aktinorhodinin spektrofotometre ile ölçüm sonuçları

7.3.2. Aktinorhodinin Kumaş Boyası Olarak Kullanımı

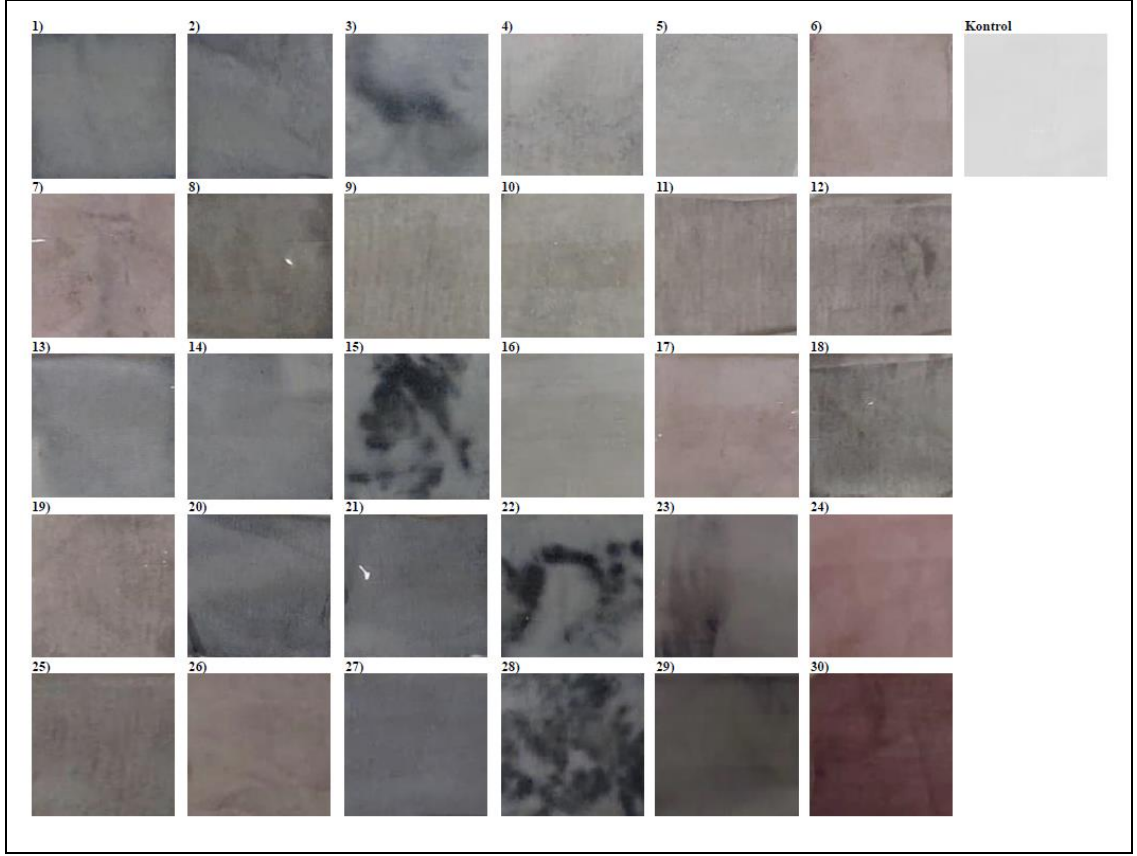
S. coelicolor A3(2) suşları tarafından üretilen mavi renkli aktinorhodinin doğal bir kumaş boyar maddesi olarak kullanılabilirliğini değerlendirmek amacıyla pamuk kumaşlar üzerinde çeşitli sabitleme protokolleri ile denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda hem mordant uygulanmış hem de uygulanmamış kumaşlar farklı sabitleme yöntemlerine (ısı, NaCl, asetik asit) tabi tutulmuş, ayrıca boyama süresi ve tekrar boyama gibi değişkenlerin renk tutuculuğu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Tüm bu koşullar altında elde edilen örneklerin renk stabilitesi, yıkama sonrası spektrofotometrik analizlerle değerlendirilmiş ve görsel karşılaştırmalarla desteklenmiştir (Şekil 7.27; Şekil 7.28).

İlk 24 saat örnekleri boyandıktan sonra sabitleme işlemleri uygulanarak kumaşların renk değişimleri gözlemlenmiş ve kumaşta boyanın en iyi tutunduğu gruplara karar verilmiştir. Bu bağlamda 48 ve 72 saat boyamalarına bu gruplar ile devam edilmiş ve verimsiz gruplar deneyden elenmiştir. 72 saat boyandıktan sonra ikinci boyamanın gerçekleşeceği gruplar için ise sabitleyicilerin kombinasyonlar halinde kullanıldığı gruplar elenerek sadece ısı, NaCl ve asetik asit yalnız olarak kullanılmıştır. Bu aşamada boyamalar sırasında mordantlanmış kumaşlardaki mordantın ilk boyama esnasında boyaya akabileceği düşünüldüğü için bu grupta elenmiştir (Şekil 7.27). Grafikler incelendiğinde yıkama suyuna en az aktinorhodinin salındığı grupların 24 ve 72 saat mordantlanarak boyanıp boyama işlemi sonrası asetik asit ile sabitlenen gruplar olduğu görülmüştür. Yıkama suyuna en çok boya bırakan gruplar ise sabitleme işlemi uygulanmayan ya da ısı ile sabitlenen gruplardır. Ancak kumaşlardaki renkler nitel olarak değerlendirildiğinde sonuçların bu veriler ile tam olarak örtüşmediği görülmüştür (Şekil 7.27, Şekil 7.28). Bu durumun nedenlerinden birinin, NaCl ve asetik asit çözeltileriyle sabitleme işlemi yapılan kumaşların, boyanın bir kısmını bu sabitleme solüsyonlarına akıtması olabileceği düşünülmüştür. Buna ek olarak en düşük absorbans değeri olan 0,005 nm ile ölçülen 24 ve 72 saat boyunca mordantlanarak boyanıp ardından asetik asit ile sabitlenen gruplarda, aktinorhodinin asidik ortamda pembe tonlara dönüşmesi nedeniyle 640 nm dalga boyunda yapılan ölçümlerin doğru sonuç vermemiş olabileceği değerlendirilmiştir. Bu çalışmaların sonucunda sabitleme ve kalıcılığa ilişkin kesin bir yargıya varılamamış; ancak ikinci kez boyama yapılan grupların (Şekil 7.28’de 27, 28, 29 ve 30 numaralarıyla gösterilen) daha yoğun bir renklenme sergilediği gözlemlenmiştir. Ayrıca, saflaştırılan aktinorhodinin tekstil

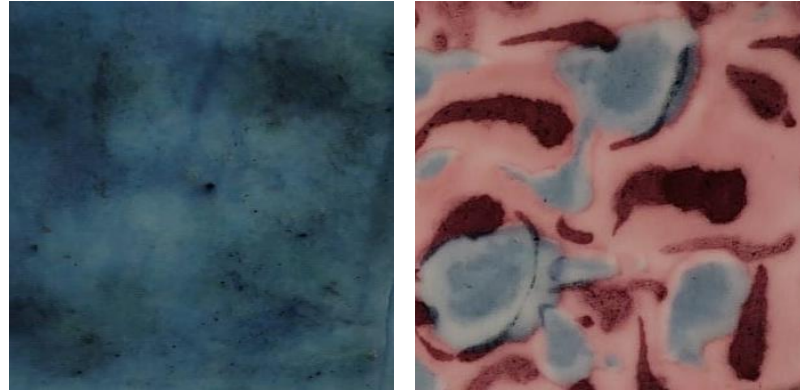
uygulamalarında boyar madde olarak kullanımı sırasında farklı derişim ve pH değerlerinde renk tonlarının değışiklik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 7.29).



Şekil 7.27: Aktinorhodin ile kumaş boyama sonrası yapılan yıkama işleminde yıkama suyuna akan boyaların spektrofotometre ölçüm sonuçları.



Şekil 7.28: Aktinorhodin ile boyama ve yıkama işlemlerinden sonra boyanan kumaş gruplarının görüntüleri (Grup özellikleri Tablo 6.2’de verilmiştir.).



Şekil 7.29: Saflaştırılan aktinorhodinin farklı pH derecelerinde kullanıldığı kumaş boyama örnekleri (Asidik ortamda kırmızımsı, bazik ortamda mavimsi tonlar gözlemlenmiştir).

8. TARTIŞMA

Streptomyces cinsi bakteriler, antiviral, immünosupresif ve antitümör etkili çeşitli sekonder metabolitler üretebilme potansiyeline sahip olmalarına rağmen, bu mikroorganizmalar esas olarak yüksek antibiyotik sentez kapasiteleri ile ön plana çıkmaktadır [de Lima Procópio vd., 2012]. ATP'ye bağımlı çalışan Lon proteaz enzimi, yalnızca bakterilerde değil, ökaryotlar da dahil olmak üzere çok çeşitli canlı gruplarında, yanlış katlanmış ya da hasar görmüş proteinlerin yıkımını gerçekleştirerek hücresel protein kalitesinin sürdürülmesinde merkezi bir rol üstlenmektedir [Wickner ve Maurizi, 1999; Gottesman vd., 1997]. Bu proteazın görevleri yalnızca bununla sınırlı kalmayıp; hücre döngüsünün düzenlenmesi, metabolik faaliyetlerin kontrolü, sporulasyon, patojenite gelişimi ve stres koşullarına verilen tepkiler gibi pek çok yaşamsal süreci de kapsamaktadır [Tsilibaris vd., 2006].

Daha önce yapılan çalışmalarla model organizma *S. coelicolor* A3(2)'de Lon proteazın sekonder metabolizma üzerindeki etkisi belirlenmiş ve yüksek seviyede ifade edildiğinde antibiyotik üretimini tetiklediği bulunmuştur [Demir vd., 2019; Yılmaz, 2019]. Bu çalışma kapsamında ise yüksek antibiyotik üreticisi Sco-pRA_{Lon} ve Sco-pSPG_{Lon} suşlarının yaban suşa kıyasla aktinorhodin üretim kapasiteleri incelenmiş ve kültür koşulları optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları doğrultusunda rekombinant suşlar farklı sıcaklıklarda, farklı pH'larda ve farklı bir besiyerinde büyütülmüş ve aktinorhodin üretim miktarları karşılaştırılmıştır. Fermentörde *S. coelicolor* fermentasyonu çalışılmadan önce yapılan bu deneyler sonucu aktinorhodin üretimi için en verimli suşun Sco-pRA_{Lon} olduğu gözlemlenmiştir. Büyük hacimde çalışılmadan önce aktinorhodin üretim verimini optimize etmek için kültür hacmi, inokulum miktarı ve çalkalama hızı optimizasyonları gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda Sco-pRA_{Lon} biyoreaktörde büyütülmüş ve aktinorhodinin büyük ölçekli üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen aktinorhodin kültür ortamından izole edilmiş ve elde edilen bu pigmentli antibiyotiğin kumaş boyası olarak kullanılması üzerine denemeler yapılmıştır.

Sıcaklık optimizasyon çalışmaları R2YE besiyerinde 25 °C, 30 °C ve 35 °C sıcaklıklarında diğer tüm parametreler sabit tutularak gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda en uygun sıcaklığın yaban suş, Sco-pRA_{Lon}, Sco-pSPG ve Sco-pSPG_{Lon} için 30 °C, Sco-pRA için ise 35 °C olduğu görüldü. Ancak bu koşullar altında en

yüksek aktinorhodin üretim miktarları 30 °C’de Sco-pRA_{lon} suşu için ölçülmüştür ve bu aşamada üretim miktarı 25 °C’de ölçülen en yüksek üretim miktarından 100 kat fazla, 35 °C’de ölçülen en yüksek üretim miktarından ise en az 2 kat fazla bulunmuştur.

pH optimizasyon çalışmaları R2YE besiyerinin otoklav sonrası solüsyonları ekledikten sonraki pH~ 6.30 değeri referans alınarak pH=6, pH=6.30, pH=6.50 ve pH=7 değerlerinde diğer parametreler sabit tutularak gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda en uygun başlangıç pH’si yaban suş için pH=6; Sco-pRA, Sco-pRA_{lon}, Sco-pSPG ve Sco-pSPG_{lon} için ise pH=6.30 olarak belirlenmiştir. En yüksek aktinorhodin üretimi Sco-pRA_{lon} ile pH=6.30’da gerçekleştirilen fermentasyonda ölçülmüştür. Tüm suşlar arasında pH=6.30’daki maksimum aktinorhodin üretim miktarı pH=6’daki maksimum üretim miktarının yaklaşık 4,5 ve pH=7’deki maksimum üretim miktarının yaklaşık 6 katıdır.

Sıcaklık ve kültür başlangıç pH çalışmaları aktinorhodin üretimi için en uygun koşulların 30 °C ve pH=6.30 olduğunu göstermiştir. Bu koşullarda gerçekleştirilen çalışmalarda 96. saatte yaban suşa göre Sco-pRA_{lon}’un yaklaşık 18–19 kat, Sco-pSPG_{lon} suşunun da yaklaşık 9 kat daha fazla spesifik aktivite sergilediğini göstermiştir. Bu çalışmada, literatürde daha önce aktinorodin üretiminde yaban tipe göre sırasıyla yaklaşık 34 kat (Sco-pRA_{lon}) ve 25 kat (Sco-pSPG_{lon}) artış gösterdiği bildirilen rekombinant suşlarla benzer üretim düzeylerine ulaşamamıştır [Demir vd., 2019; Yılmaz, 2019]. Farklı inokulum miktarları, farklı kültür hacmi gibi parametreler yüzünden bu değerlere ulaşılmamış olabilir. Bu çalışmada her iki parametredeki değişikliğin ikincil metabolit üretimini önemli ölçüde değiştirdiği görülmüştür. Ancak rekombinant suşların belli koşullarda yaban suştan çok daha fazla aktinorhodin ürettiği teyit edilmiştir.

R2YE besiyerine göre daha kolay hazırlanan ve ucuz olan nişasta içeren ISP-4 besiyeri kullanıldığında bütün suşların antibiyotik ürettiği renk değişimiyle görüldüğü halde, standard antibiyotik ölçüm yöntemine göre yapılan deneylerde, bu durum üretim sonuçlarına yansımamıştır (Şekil 7.16, Şekil 7.17). Ölçüm sonuçları ile gözlemler arasındaki bu tutarsızlık, kullanılan spektrofotometrik protokolün ISP-4 ortamı için uygun olmamasına bağlanmıştır. Bunun kanıtı olarak ISP-4 ortamından alınan örneklerin KOH ile bir gece inkübasyon sonrası santrifüj edilmesiyle pigmentin çöktüğü, görsel olarak da belgelenmiştir (Şekil 7.18). Bu durum, ortam bileşenlerinden

bir ya da birkaçının aktinorhodin ile etkileşime girerek pigmentin çözünürlüğünü azaltabileceğini düşündürmektedir.

Bütün optimizasyon çalışmaları sonucunda SCO-pRA_{lon} suşunun yüksek üretici olduğu tespit edildiğinden çalışma sadece bu suş ile sürdürülmüştür. Kültür hacmi iki katına çıkarıldığında SCO-pRA_{lon} suşunun daha az antibiyotik ürettiği gözlenmiştir. İnokulum miktarı optimizasyon deneylerinde ise Sco-pRA_{lon} suşu 1, 2, 3, 4 ve 5 kat inokulum seviyelerinde test edilmiştir. Bu çalışmalarda 1 kat inokulum ile yürütülen fermentasyon sonucunda üretilen aktinorhodin miktarı, 72. ve 96. saatlerde yüksek inokulum denemeleriyle benzer düzeyde seyretmiş, ancak 120. saatte diğer tüm gruplara kıyasla en az 10 kat daha yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde, Manteca ve diğerleri (2008) tarafından yürütülen çalışmada da düşük yoğunlukta inokulum ile başlatılan *S. coelicolor* kültürlerinde antibiyotik üretiminin başlangıçta daha yavaş ilerlediği, ancak ilerleyen saatlerde yüksek inokulum koşullarına göre daha fazla antibiyotik birikimi sağlandığı bildirilmiştir [Manteca vd., 2008]. Bu durum, Manteca ve diğerleri (2008) tarafından düşük yoğunluklu inokulumların *S. coelicolor*'da misel farklılaşmasını ve antibiyotik üretimiyle ilişkili fizyolojik süreçleri etkilediğine dair bulgularla da uyumludur [Manteca vd., 2008]. Bulgular birlikte değerlendirildiğinde, düşük inokulum koşullarının toplam antibiyotik verimini artırabileceğine işaret etmektedir.

Çalkalama hızı optimizasyonu deneylerinde ise Sco-pRA_{lon} ile fermentasyonlar 180, 200 ve 220 rpm'de yürütülmüştür. Sonuçlara göre, 200 rpm'de gerçekleştirilen fermentasyon, 96. saatte 180 rpm'deki fermentasyona göre yaklaşık 8 kat daha yüksek antibiyotik üretimi sağlamıştır. Bununla birlikte, 120. saatte 180 rpm'de yürütülen fermentasyonda üretilen antibiyotik miktarı 200 rpm'dekini aşmıştır. 220 rpm'de gerçekleştirilen deney ise 96. saate kadar oldukça düşük spesifik aktivite sergilemiş, 96. saatten sonra artış göstermeye başlamış ancak 180 ve 200 rpm'de elde edilen üretim seviyelerine ulaşamamıştır. Bu sonuçlar, çalkalama hızının aerobik bir organizma olan *S. coelicolor* üzerindeki olumlu etkilerini desteklerken, yüksek çalkalama hızında gözlemlenen pelet ve küme oluşumlarının dağılmasına bağlı miselyum farklılaşması ve sekonder metabolit üretimi arasındaki ilişki, Manteca ve diğerlerinin biyoreaktör ve laboratuvar şişelerinde yürüttüğü aktinorhodin üretimi çalışmalarında ortaya koydukları çalkalama hızının morfolojik gelişim süreçlerine

etkisi ve lizis ile aktinorhodin üretim aşaması arasındaki ilişkiye dayanan bulguları ile açıklanabilir niteliktedir [Manteca vd., 2019].

Fermentör olarak Eppendorf BioFlo 120 kullanıldığında, çözünmüş oksijen düzeylerinde dalgalanmalar ve çalkalama şiddeti nedeniyle Sco-pRA_{lon} misellerinin parçalandığı gözlenmiş ve aktinorhodin üretimi istenilen düzeye ulaşamamıştır. Bu nedenle aynı parametrelerle çalışma Applikon ez2-Control fermentöründe tekrar edilmiş ve toplam 2 L hacim yerine 1,5 L çalışma hacmi ile optimum gaz değişimi ve köpük kontrolü sağlanmıştır. Bu cihazda büyütülen suşun aktinorhodin üretiminin Erlenmeyer koşullarına kıyasla çok daha az olduğu bulunmuştur. Fermentörde aktinorhodin üretimi 120. saatte düşük seviyede başlarken, 140. saatte yaklaşık 4,5 kat artış göstermiştir ancak bu sırada ölçülen yüksek çözünmüş oksijen düzeyi, hücrelerin hızla ölüm sürecine girdiğini göstermektedir. Fermentasyon süresince, 48. saatten itibaren belirginleşen köpük oluşumu ve fermentör çeperine yapışan pelet ve misel kümeleri, biyokütlenin dağılımını ve morfolojik farklılıkları etkileyerek üretim parametrelerini değiştirmiştir. Özellikle 72. saatte çekilen fotoğraflar, çeperde tutunan bakterilerin kültürden farklı şekilde büyüyerek normalden farklı renklenme profili oluşturduğunu göstermiştir (Şekil 7.25). Applikon cihazında büyütülen suşun undesilprodigiosin üretimi de ölçülmüş ve Erlenmeyerde büyütülen suşa göre fermentörde daha fazla üretim sağlanmıştır.

Bu veriler, *Streptomyces*'lerin fermentör koşullarında büyütülmeleri için diğer bakteri gruplarından daha fazla optimizasyona gereksinim duyduklarını göstermektedir. Kompleks yaşam döngüleri ve ikincil metabolit üretimi için pellet ve topaklanma oluşumunun kritik derecede önemli olması gibi detaylar bu bakteri grubunun fermentör ortamındaki optimizasyonunu zorlaştırmaktadır. Bu bakterilerin yüksek oksijen gereksinimleri ve ikincil metabolit üretimi açısından biyoreaktör koşullarına duyarlılıkları, üretim dinamiklerinin hacim, çözünmüş oksijen, köpük oluşumu ve morfolojik değişimler gibi fiziksel faktörlerden doğrudan etkilendiğini göstermektedir. Rioseras ve diğerlerinin yaptığı çalışmada, köpük engelleyici eklenmeden biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyon sonucunda fizyolojik farklılaşmalar sebebi ile undesilprodigiosin ve aktinorhodin üretiminin biyoreaktörde daha erken başlamasına rağmen, toplam üretim düzeylerinin laboratuvar şişelerine kıyasla belirgin şekilde düşük kaldığı bildirilmiştir [Rioseras vd., 2014]. Bu fizyolojik farklılığı önlemeye yönelik köpük önleyici eklenmesi üzerine pelet bütünlüğünün

korunduğu ve hücre içi protein miktarının arttığı ve undesilprodigiosin üretimi artarken, aktinorhodin üretiminin sınırlı kalmaya devam ettiği bildirilmiştir [Rioseras vd., 2014]. Bu çalışmada eklenilen köpük önleyiciye rağmen köpük oluşumu çok fazla engellenemedi ve üretim de Erlenmeyer ile ulaşılan değerin altında kaldı. Her ne kadar fermentörde hedeflenen verime ulaşılmasa da *S. coelicolor* yaban suşu göre yüksek düzeyde aktinorhodin üreten Sco-pRA_{lon} suşunun büyük ölçekli aktinorhodin üretimi için potansiyeli bulunmaktadır. Ancak, fermentasyon parametrelerinin tek tek optimize edildiği, özellikle karıştırma hızı, oksijen konsantrasyonu ve pH gibi değişkenlerin optimizasyonunu içeren çalışmaların yanında morfolojik değişiklikler, hücresel farklılaşma ve sekonder metabolit üretimi arasındaki ilişkilerin sistematik biçimde incelenmesini de kapsayan bir çalışmaya ihtiyaç duyulduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmanın devamında aktinorhodinin kültür ortamından fiziksel yollarla ayrıştırılmasına yönelik bir yöntem uygulanmış ve optimizasyonu yapılmıştır. Pigment, pH farkı yardımıyla besiyerinden çöktürülerek ayrılmış; asidik ortamda farklı sürelerde inkübasyona tabi tutulmuştur. Dördüncü saatten itibaren çökelti miktarında belirgin bir değişiklik gözlenmezken, absorbans değerklerinde düşüş saptanmıştır. Bu durum, uzun süreli inkübasyonlarda çözeltideki diğer bileşenlerin de çökmesine ya da aktinorhodinin stabilitesinin bozulmasına bağlanmıştır. Literatürde verilen bilgilerde aktinorhodinin sıcaklık ve ışığa nispeten dirençli olmasına rağmen düşük pH'ye karşı hassas olduğu belirtilmiştir [Lu vd., 2002]. Yapılan çalışmada aktinorhodin ısı ve ışığa karşı korunmuş ancak asidik ortamda gerçekleştirilen izolasyon işlemi nedeni ile stabilitesinin bozulduğu görölmüştür. Bu nedenle, optimum inkübasyon süresinin 2–4 saat aralığında olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen aktinorhodin, kumaş boyası olarak kullanılmak üzere denenmiş ve pigmentin sabitlemesi için farklı çözeltiler test edilmiştir. Aktinorhodinin pH duyarlılığı nedeniyle sabitleme çözeltisine bağli olarak farklı renk tonlarında boyama elde edilmiştir. Ayrıca mordant çözeltileri pigmentin karakteristik renginden saparak (asidik ortamda kırmızı-pembe, bazik ortamda mavi-mor) farklı renklenme (grimsi tonlar) oluşturmuştur. Yapılan boyama ve sabitleme çalışmaları net olarak ölçülememiş olsa da, gözlemler 72 saat boyada bekletilen ve asetik asit ile sabitleme yapıldıktan sonra ikinci kez boyanan kumaş parçasının daha iyi renklendiğini göstermiştir (Şekil 7.28).

Mikrobiyal pigmentlerin tekstil boyamacılığında kullanılabilirliğine ilişkin çalışmalar giderek artmaktadır [Che ve Yang, 2022; Lara vd., 2022]. Bu bağlamda aktinorhodin, bakteriyel kaynaklı bir doğal pigment olarak dikkat çekmektedir. Daha önce aktinorhodinin tekstil boyamada kullanılabilirliği, American Society for Microbiology (ASM) tarafından yayımlanan “Bacterial Dyes in Fashion” başlıklı çalışmada bildirilmiştir. Ancak söz konusu çalışmada bu tezdeki gibi doğrudan bir boyama işlemi uygulanmamıştır. ASM’de yer alan çalışmada *S. coelicolor* doğrudan kumaş parçaları üzerinde kültürlenmiş ve bakterinin büyümesi sırasında salgıladığı aktinorhodin, kumaşta yerel renklenmeler oluşturmuştur (Şekil 4.1) [ASM, 2017].

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda ise kumaş üzerine doğrudan bakteri kültürü yapılmamış; bunun yerine aktinorhodin besiyerinden ayrıştırılarak kullanılmıştır. Bu yaklaşım, hem laboratuvar kökenli bakterilerin doğaya yayılım riskini ortadan kaldırmakta hem de sıvı kültürde büyük ölçekli aktinorhodin üretimiyle boyar madde izolasyonuna olanak tanımaktadır. Böylece pigmentin endüstriyel ölçekte güvenli ve sürdürülebilir biçimde kullanılmasına yönelik bir yöntem önerilmektedir. Bildiğimiz kadarıyla yöntemi bu şekilde uygulayarak aktinorhodini boyar madde olarak kullanan başka bir bilimsel kaynak yoktur. Bununla birlikte, ASM’deki çalışmadan ilham alınarak Ginkgo Bioworks bünyesindeki tasarımcı Natsai Audrey Chieza tarafından yürütülen Project *Coelicolor* projesinde aktinorhodin kullanılarak çeşitli kumaş boyamaları yapılmıştır [ASM, 2017; Chieza & Ginkgo Bioworks]. Chieza, moda endüstrisinde kimyasal ve su tüketimini azaltmayı hedefleyerek gerçekleştirdiği bu çalışmalarda, özellikle ipek gibi ince tekstil lifleri üzerinde neredeyse hiç su ve kimyasal madde kullanmadan renkli desenler elde etmiştir [Design Indaba; Bacterial Dyes in Fashion].

Bu tür yaklaşımlar yalnızca aktinorhodin için değil, benzer şekilde indigoidine, violacein veya prodigiosin gibi diğer bakteriyel pigmentlerin tekstil boyamacılığında kullanımına yönelik sürdürülebilir tasarımlar için de ilham kaynağı olmaktadır. Ancak bu çalışmalara ait deneysel detaylar ve boyama protokollerine ilişkin veriler literatürde sınırlıdır [ASM, 2017; Taher vd., 2020; Chieza & Ginkgo Bioworks].

Tez kapsamında elde edilen bulgular, aktinorhodin’in tekstil boyası olarak yüksek potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, pigment kaybının azaltılması, renk stabilitesinin artırılması ve izolasyon veriminin geliştirilmesi için

saflaştırma yöntemlerinin optimize edilmesi ve bu alandaki tekstil uygulamalarının derinleştirilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Agarwal, H., Bajpai, S., Mishra, A., Kohli, I., Varma, A., Fouillaud, M., Dufossé, L., & Joshi, N. C. (2023). Bacterial pigments and their multifaceted roles in contemporary biotechnology and pharmacological applications. *Microorganisms*, 11, 614. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030614>
- Azman, A. S., Mawang, C. I., & Abu, B. S. (2018). Bacterial pigments: The bioactivities and as an alternative for therapeutic applications. *Natural Product Communications*, 13, 1747–1754.
- Bahtiyari, M. İ., & Yilmaz, F. (2018). Evaluation of different natural dye sources in terms of metamerism. *AATCC Journal of Research*, 5(3), 21–27.
- Bentley, S. D., Brown, S., Murphy, L. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Parkhill, J., Barrell, B. G., McCormick, J. R., Santamaria, R. I., Losick, R., Yamasaki, M., Kinashi, H., Chen, C. W., Chandra, G., Jakimowicz, D., Kieser, H. M., Kieser, T., & Chater, K. F. (2004). SCP1, a 356,023 bp linear plasmid adapted to the ecology and developmental biology of its host, *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*, 51, 1615–1628.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., ... Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417, 141–147.
- Bidell, M. R., Pai, M. P., & Lodise, T. P. (2020). Use of oral tetracyclines in the treatment of adult patients with community-acquired bacterial pneumonia: A literature review on the often-overlooked antibiotic class. *Antibiotics*, 9(12), 905. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120905>
- Bibb, M. J. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 8(2), 208–215.
- Bystrykh, L. V., Fernández-Moreno, M. A., Herrema, J. K., Malpartida, F., Hopwood, D. A., & Dijkhuizen, L. (1996). Production of actinorhodin-related “blue pigments” by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 178, 2238–2244.
- Cesur, M. F. (2018). Sınırlandırılmış cevaptan sorumlu *RelA* geninin *Streptomyces coelicolor* suşunda antibiyotik üretimine etkisi [Yüksek lisans tezi, Gebze Teknik Üniversitesi].
- Chater, K. F. (1984). Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 16, 89–115.

Chater, K. F. (2001). Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2), a checkpoint multiplex? *Current Opinion in Microbiology*, 4, 667–673. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(01\)00267-3](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(01)00267-3)

Chimileski, S. (2017, November 4). *Bacterial dyes in fashion*. American Society for Microbiology. <https://asm.org/articles/2017/november/bacterial-dyes-in-fashion>

Chouayekh, H., & Viroille, M. J. (2002). The polyphosphate kinase plays a negative role in the control of antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Molecular Microbiology*, 43(4), 919–930.

Clark, G. J., Langley, D., & Bushell, M. E. (1995). Oxygen limitation can induce microbial secondary metabolite formation, investigations with miniature electrodes in shaker and bioreactor culture. *Microbiology*, 141, 663–669.

Claessen, D., de Jong, W., Dijkhuizen, L., & Wösten, H. A. (2006). Regulation of *Streptomyces* development: Reach for the sky! *Trends in Microbiology*, 14, 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.05.008>

D'Alia, D., Eggle, D., Nieselt, K., Hu, W. S., Breitling, R., & Takano, E. (2011). Deletion of the signalling molecule synthase ScbA has pleiotropic effects on secondary metabolite biosynthesis, morphological differentiation and primary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbial Biotechnology*, 4(2), 239–251. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00219.x>

Darwesh, O. M., Barakat, K. M., Mattar, M. Z., Sabae, S. Z., & Hassan, S. H. (2019). Production of antimicrobial blue green pigment Pyocyanin by marine *Pseudomonas aeruginosa*. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 9, 4334–4339.

Darwesh, O. M., Marzoog, A., Matter, I. A., et al. (2024). Natural dyes developed by microbial-nanosilver to produce antimicrobial and anticancer textiles. *Microbial Cell Factories*, 23, 189. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02457-3>

de Lima Procópio, R. E., da Silva, I. R., Martins, M. K., de Azevedo, J. L., & de Araújo, J. M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(5), 466–471.

Demir, Ğ. (2018). *Streptomyces coelicolor* M145 ve *Streptomyces coelicolor* A3(2)'nin Appk Mutantlarının Eldesi ve Karakterizasyonları [Yüksek lisans tezi, Gebze Teknik Üniversitesi].

Demir, Z., Bayraktar, A., & Tunca, S. (2019). One extra copy of *lon* gene causes a dramatic increase in actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Current Microbiology*, 1–10.

Design Indaba. (2019, August 6). *Natsai Audrey Chieza: Working with nature to help solve fashion's waste problem*. Design Indaba. <https://www.designindaba.com/articles/creative-work/natsai-audrey-chieza-working-nature-help-solve-fashions-waste-problem>

Gottesman, S., Wickner, S., & Maurizi, M. R. (1997). Protein quality control: Triage by chaperones and proteases. *Genes & Development*, 11(7), 815–823.

Harir, M., Bendif, H., Bellahcene, M., Fortas, Z., & Pogni, R. (2018). *Streptomyces* secondary metabolites. In: Dhanasekaran, D., & Jiang, Y. (Eds.), *Basic Biology and Applications of Actinobacteria* (pp. 99–122).

Hassaan, M. A., & Nemr, A. E. (2017). Health and environmental impacts of dyes: Mini review. *American Journal of Environmental Science and Engineering*, 1(3), 64–67.

Haug, I., Weissenborn, A., Brolle, D., Bentley, S., Kieser, T., & Altenbuchner, J. (2003). *Streptomyces coelicolor* A3(2) plasmid SCP2*: Deductions from the complete sequence. *Microbiology*, 149, 505–513.

Health and Safety Executive. (2016). *Dyes and chemicals in textile finishing: An introduction (Information Sheet No. 1)*. HSE.

Hempel, A. M., Cantlay, S., Molle, V., Wang, S.-B., Naldrett, M. J., Parker, J. L., Richards, D. M., Jung, Y.-G., Buttner, M. J., & Flärdh, K. (2012). The Ser/Thr protein kinase AfsK regulates polar growth and hyphal branching in the filamentous bacteria *Streptomyces*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), E2371–E2379.

Hesketh, A., Chen, W. J., Ryding, J., Chang, S., & Bibb, M. (2007). The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genome Biology*, 8(8), R161.

Hopwood, D. A. (2019). Highlights of *Streptomyces* genetics. *Heredity*, 123(1), 23–32. <https://doi.org/10.1038/s41437-019-0196-0>

Jensen, P. R., Dwight, R., & Fenical, W. (1991). Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4), 1102–1108.

Khadayat, K., Sherpa, D. D., Malla, K. P., Shrestha, S., Rana, N., Marasini, B. P., Khanal, S., Rayamajhee, B., Bhattarai, B. R., & Parajuli, N. (2020). Molecular identification and antimicrobial potential of *Streptomyces* species from Nepalese soil. *International Journal of Microbiology*, 2020, Article 8817467. <https://doi.org/10.1155/2020/8817467>

Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., & Hopwood, D. A. (2000). *Practical Streptomyces genetics*. The John Innes Foundation.

Klausen, C., Nicolaisen, M. H., Strobel, B. W., Warnecke, F., Nielsen, J. L., & Jørgensen, N. O. G. (2005). Abundance of actinobacteria and production of geosmin and 2-methylisoborneol in Danish streams and fish ponds. *FEMS Microbiology Ecology*, 52(2), 265–278.

Kuroda, A., Nomura, K., Ohtomo, R., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H., & Kornberg, A. (2001). Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *Escherichia coli*. *Science*, 293(5530), 705–708.

Kuroda, A., Tanaka, S., Ikeda, T., Kato, J., Takiguchi, N., & Ohtake, H. (1999). Inorganic polyphosphate kinase is required to stimulate protein degradation and for adaptation to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(25), 14264–14269.

López-García, M. T., Yagüe, P., González-Quinónez, N., Rioseras, B., & Manteca, A. (2018). The SCO4117 ECF sigma factor pleiotropically controls secondary metabolism and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3125. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03125>

Lu, L., Cui, H.L., Chen, Y.N. et al. Isolation and identification of *Streptomyces* sp. and assay of its exocellular water-soluble blue pigments. *Folia Microbiol* 47, 493–498 (2002). <https://doi.org/10.1007/BF02818787>

Manteca A, Alvarez R, Salazar N, Yagüe P, Sanchez J. (2008) Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol*. Jun;74(12):3877-86. doi: 10.1128/AEM.02715-07. Epub 2008 Apr 25. PMID: 18441105; PMCID: PMC2446541.

Manteca, A., Claessen, D., Lopez-Iglesias, C., & Sánchez, J. (2007). Aerial hyphae in solid cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. *FEMS Microbiology Letters*, 274(1), 118–125. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00825.x>

Manteca, A., Fernández, M., & Sánchez, J. (2005). A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent solid cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Microbiology*, 151(11), 3689–3697. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28045-0>

Manteca, A., Fernández, M., & Sánchez, J. (2006a). Cytological and biochemical evidence for an early cell dismantling event in solid cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Research in Microbiology*, 157(2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.07.003>

Manteca, A., Rioseras, B., González-Quinónez, N., Fernández-García, G., & Yagüe, P. (2019). Mycelium Differentiation and Development of *Streptomyces* in Liquid Nonsporulating Cultures: Programmed Cell Death, Differentiation, and Lysis Condition Secondary Metabolite Production. *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.84182

Martín, J. F. (2004). Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: An unfinished story. *Journal of Bacteriology*, 186(16), 5197–5201.

Martín, J. F., & Demain, A. L. (1980). Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiological Reviews*, 44(2), 230.

Mendez, C., Braña, A. F., Manzanal, M. B., & Hardisson, C. (1985). Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Canadian Journal of Microbiology*, 31(5), 446–450. <https://doi.org/10.1139/m85-083>

Miguelé, E. M., Hardisson, C., & Manzanal, M. B. (1999). Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: Morphological evidence for the existence of a process of cell deletion equivalent to apoptosis in a multicellular prokaryote. *Journal of Cell Biology*, 145(3), 515–525. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.3.515>

Nuanjohn, T., Suphrom, N., Nakaew, N., Pathom-Aree, W., Pensupa, N., Siangsuepchart, A., Dell, B., & Jumpathong, J. (2023). Actinomycins from Soil-Inhabiting *Streptomyces* as Sources of Antibacterial Pigments for Silk Dyeing. *Molecules*, 28(16), 5949. <https://doi.org/10.3390/molecules28165949>

Pamboukian, C. R. D., & Facciotti, M. C. R. (2004). Production of the antitumoral retamycin during continuous fermentations of *Streptomyces olindensis*. *Process Biochemistry*, 39(12), 2249–2255. <https://doi.org/10.1385/abab:112:2:111>

Pawlik, K., Kotowska, M., & Kolesiński, P. (2010). *Streptomyces coelicolor* A3(2) produces a new yellow pigment associated with the polyketide synthase Cpk. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 19(3), 147–151.

Pizzicato, B., Pacifico, S., Cayuela, D., Mijas, G., & Riba-Moliner, M. (2023). Advancements in sustainable natural dyes for textile applications: A review. *Molecules*, 28(14), 5954.

Potrykus, K., & Cashel, M. (2008). (p)ppGpp: Still magical? Annual Review of Microbiology, 62, 35–51. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162903>

Rahman, N. A., Tajuddin, R., & Tumin, S. (2013). Optimization of natural dyeing using ultrasonic method and biomordant. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 4(3), 161–164.

Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A. W., Hopwood, D. A., & van Wezel, G. P. (2008). Feast or famine: The global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Reports*, 9(7), 670–675. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.83>

Rioseras, B., López-García, M. T., Yagüe, P., Sánchez, J., & Manteca, A. (2014). Mycelium differentiation and development of *Streptomyces coelicolor* in lab-scale bioreactors: Programmed cell death, differentiation, and lysis are closely linked to undecylprodigiosin and actinorhodin production. *Bioresource Technology*, 151, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.068>

Rodríguez-García, A., Yagüe, P., López-García, M. T., Martín, J. F., Rioseras, B., Sánchez, J., & Manteca, A. (2013). Transcriptomic analysis of *Streptomyces*

coelicolor differentiation in solid sporulating cultures: First compartmentalized and second multinucleated mycelia have different and distinctive transcriptomes. *PLoS ONE*, 8(3), e60665. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060665>

Sermonti, G., & Spada-Sermonti, I. (1955). Genetic recombination in *Streptomyces*. *Nature*, 176(4470), 121.

Siddiqua, U. H., Zaib-un-Nisa, R. A., et al. (2024). Effect of silver nanoparticles finishing on dyeing properties of newly synthesized reactive dye applied on cellulosic fabric. *Fibers and Polymers*, 25(3), 987–995.

Sivalingam, P., Hong, K., Pote, J., & Prabakar, K. (2019). Extreme environment *Streptomyces*: Potential sources for new antibacterial and anticancer drug leads? *International Journal of Microbiology*, 2019, Article 5283948. <https://doi.org/10.1155/2019/5283948>

Sivapragasam, S., & Grove, A. (2019). The link between purine metabolism and production of antibiotics in *Streptomyces*. *Antibiotics*, 8(2), 76. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020076>

Sola-Landa, A., Moura, R., & Martín, J. F. (2003). The two-component PhoR–PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(10), 6133–6138.

Taher, N. A., Husen, A. S., Mahmood, Z. S., & Shanior, G. J. (2020). A study on actinorhodin-like substance production by *Streptomyces* IQ45. *Al-Mustansiriyah Journal of Science*, 31(3), 6–13. <https://doi.org/10.23851/mjs.v31i3.93>

Talbot, N. J. (2003). Aerial morphogenesis: Enter the chaplins. *Current Biology*, 13(18), R696–R698.

Tsao, S. W., Rudd, B. A., He, X. G., Chang, C. J., & Floss, H. G. (1985). Identification of a red pigment from *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a mixture of prodigiosin derivatives. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 38(1), 128–131.

Tsilibaris, V., Maenhaut-Michel, G., & Van Melderren, L. (2006). Biological roles of the Lon ATP-dependent protease. *Research in Microbiology*, 157(8), 701–713.

van Veluw, G. J., Petrus, M. L., Gubbens, J., de Graaf, R., de Jong, I. P., van Wezel, G. P., Wösten, H. A. B., & Claessen, D. (2012). Analysis of two distinct mycelial populations in liquid-grown *Streptomyces* cultures using a flow cytometry-based proteomics approach. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(5), 1301–1312. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4490-5>

van Wezel, G. P., Krabben, P., Traag, B. A., Keijser, B. J., Kerste, R., Vijgenboom, E., Heijnen, J. J., & Kraal, B. (2006). Unlocking *Streptomyces* spp. for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5283–5288. <https://doi.org/10.1128/AEM.00808-06>

Vassallo, A., Palazzotto, E., Renzone, G., Botta, L., Faddetta, T., Scaloni, A., Puglia, A. M., & Gallo, G. (2020). The *Streptomyces coelicolor* small ORF trpM stimulates growth and morphological development and exerts opposite effects on actinorhodin and calcium-dependent antibiotic production. *Frontiers in Microbiology*, 11, 224.

Wentzel, A., Bruheim, P., Øverby, A., Jakobsen, Ø. M., Sletta, H., Omara, W. A., Hodgson, D. A., & Ellingsen, T. E. (2012). Optimized submerged batch fermentation strategy for systems scale studies of metabolic switching in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *BMC Systems Biology*, 6, 59. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-6-59>

Wickner, S., & Maurizi, M. R. (1999). Here's the hook: Similar substrate binding sites in the chaperone domains of Clp and Lon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(15), 8318–8320.

Wildermuth, H. (1970). Development and organization of the aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of General Microbiology*, 60(1), 43–50. <https://doi.org/10.1099/00221287-60-1-43>

Wiley, J., Santamaria, R., Guijarro, J., Geistlich, M., & Losick, R. (1991). Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*. *Cell*, 65(4), 641–650.

Yagüe, P., Rodriguez-Garcia, A., Lopez-Garcia, M. T., Martin, J. F., Rioseras, B., Sanchez, J., & Manteca, A. (2013). Transcriptomic analysis of *Streptomyces coelicolor* differentiation in solid sporulating cultures: First compartmentalized and second multinucleated mycelia have different and distinctive transcriptomes. *PLoS ONE*, 8(3), e60665. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060665>

Yılmaz, H. (2019). *Lon proteaz geninin çoklu kopyalarının Streptomyces coelicolor A3(2)'de homolog ifadesi ve Escherichia coli'de heterolog ifadesi üzerine çalışmalar* (Yüksek lisans tezi). <https://acikbilim.yok.gov.tr/handle/20.500.12812/269390>

Yu, L., Pan, Y., & Liu, G. (2016). A regulatory gene SCO2140 is involved in antibiotic production and morphological differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Current Microbiology*, 73(2), 196–201. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1042-3>

ÖZGEÇMİŞ

Zeynep Begüm ÖZMAN, 2022 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimini tamamlamıştır. Aynı bölümde yüksek lisans eğitimine başlamış olup, Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK danışmanlığında yüksek lisans tez çalışmalarını sürdürmektedir.

TEZ METNİNDEN TÜRETİLEN SUNUMLAR

Özman Z.B., Yılmaz H., Tunca S., “Large Scale Antibiotic Production by *Streptomyces coelicolor* Recombinant Strains”, 8th GTU Graduate Research Symposium, Gebze Technical University, Kocaeli, 30–31 May.