



**METABOLİK MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMIYLA
LİKOPENİN MİKROBİYAL BİYOSENTEZİ**

Semra YILDIZ

Yüksek Lisans Tezi

Anabilim Dalı: Biyomühendislik

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Venhar ÇELİK ÖZGEN

TEMMUZ - 2019

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METABOLİK MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMIYLA LİKOPENİN MİKROBİYAL
BİYOSENTEZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Semra YILDIZ

161132107

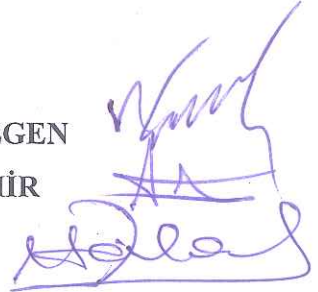
Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 09.07.2019

Tezin Savunulduğu Tarih: 31.07.2019

Tezin Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Venhar ÇELİK ÖZGEN

Diğer Jüri Üyeleri: Dr. Öğr. Üyesi Aykut TOPDEMİR

Doç. Dr. Hakan YILDIRIM



ÖNSÖZ

Tez süresi boyunca her türlü akademik bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Venhar ÇELİK ÖZGEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince yanımda olan ve bana yardımcı olan değerli arkadaşlarım Yasemin KUŞ, Nagehan KAN, Esra ÖZ ve Ivona POERNJA'a teşekkür ederim.

Tez aşamasında deneysel çalışmalar için Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP)'a MF.18.01 numaralı projeye, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a 117M051 numaralı projeye verdikleri desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Analizlerimde her türlü yardımda bulunan Prof. Dr. M.Şaban TANYILDIZ'ına, Prof. Dr. H. Soner ALTUNDOĞAN'a ve Dr. Öğr. Üyesi Veyis SELEN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bugünlere gelmemde en büyük emeğe sahip olan aileme sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Semra YILDIZ
ELAZIĞ-2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	IX
KISALTMALAR DİZİNİ	X
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Metabolik Mühendisliği	2
2.2. Karotenoidler.....	3
2.2.1. Karoteneoidlerin Biyoyararlanımı ve Tıptaki Önemi	8
2.2.2. Sentetik ve Doğal Karotenoid Kaynakları	12
2.2.3. Karoteneoidlerin Fonksiyonları	15
2.2.4. Bitkilerde Karotenoidlerin Biyosentezi	16
2.2.5. Metabolik Mühendisliği Yaklaşımıyla Karotenoid Üreten Mikroorganizmalar	18
2.3. Likopen	20
2.3.1. Likopenin Yapısı ve Özellikleri.....	20
2.3.2. Likopenin Biyosentezi	22
2.3.3. Likopenin Doğal ve Sentetik Üretimi	23
2.3.4. Likopenin İnsanda Absorbsiyonu, Taşınımı ve Dağılımı	25
2.3.5. Likopenin Sağlıktaki Yeri.....	27
2.3.6. Metabolik Mühendisliği Yaklaşımıyla Likopenin Mikrobiyal Biyosentezi	32
3. MATERYAL VE METOD	34
3.1. Materyal	34
3.1.1. Kullanılan bakteri suşları ve plazmidleri.....	34
3.1.2. Besiyerleri.....	35
3.1.3. Solüsyonlar ve Çözeltiler.....	38

3.2. Metod	38
3.2.1. Plazmid DNA'sının İzolasyonu	38
3.2.2. Restriksiyon Endonükleazları ile Plazmid DNA'sının Kesilmesi	38
3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi	39
3.2.4. Gibson Assembly Metodu.....	40
3.2.5. Plazmid Haritalarının Tasarlanması.....	41
3.2.6. Elektrokompotent Hücrelerin Hazırlanması	41
3.2.7. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması	42
3.2.8. Transformasyon	42
3.2.9. Stok Kültürlerin Hazırlanması	43
3.2.10. pAC-EHER-EBİdi Taşıyan <i>E. coli</i> Suşlarından Likopen Ekstraksiyonu İçin Başlangıç Kültürlerinin Hazırlanması.....	43
3.2.11. pAC-EHER-EBİdi Taşıyan <i>E. coli</i> Suşlarından Likopen Ekstraksiyonu...	43
3.2.12. pAC-EHER-EBİdi Taşıyan <i>E. coli</i> Suşlarından Ekstrakte Edilen Likopenin HPLC ile Analizi	44
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	45
4.1. pAC-EHER Plazmid DNA'sının Restriksiyon Endonükleazları ile Doğrulama.	45
4.2. pAC-EHER-EBİdi Plazmidinin İnşası	46
4.2.1. pAC-EHER-EBİdi Plazmidinin Gibson Reaksiyonu ile İnşası.....	50
4.2.2. pAC-EHER-EBİdi Plazmidinin Enzimatik Doğrulaması.....	51
4.3. pAC-EHER-EBİdi Plazmidi Taşıyan <i>E. coli</i> Suşlarında Likopen Üretiminin İncelenmesi	53
4.3.1. Başlangıç Kültürlerinin Kurulması	53
4.3.2. pAC-EHER-EBİdi Taşıyan <i>E. coli</i> Suşlarından Ekstrakte Edilen Likopenin Spektrofotometrik Analiz ve HPLC ile Ölçümleri	54
4.3.3. Likopenin Farklı Besiyerlerindeki Üretimi ve HPLC ile Ölçümleri	56
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
KAYNAKLAR	59
EKLER	76
ÖZGEÇMİŞ	80

ÖZET

İnsan serumunda bulunan birincil karotenoid olan likopen insan sağlığında kanser, kalp hastalığı, şeker hastalığı ve birçok hastalıkta önemli koruyucu rol oynamaktadır. Bitkilerde foto duyarlılığa karşı korumakla beraber, besleyici takviyeler, farmasötik, gıda renklendiricileri olarak kullanımı gittikçe önem kazanan karotenoid molekülüdür. Bu tez çalışmasında likopenin *Escherichia coli* bakterisinde metabolik mühendisliği yaklaşımı ile mikrobiyal üretimi amaçlanmıştır. Likopenin *E. coli*'de mikrobiyal üretimi için Gibson assembly metodu kullanılarak likopen sentezini gerçekleştiren enzimlerin anlatımını sağlayan genleri (*crtEBI*) içeren plazmidin (pAC-EHER-EBİdi) inşası gerçekleştirilmiştir. İnşa edilen plazmid farklı *E. coli* suşlarına (*E. coli* MG1655, *E. coli* NEB 10-beta, *E. coli* DH5 α , *E. coli* DH5 α -Pro, *E. coli* NEB-Turbo, *E. coli* XL1-Blue, *E. coli* TOP10, *E. coli* EPI300, *E. coli* DE3) aktarılmıştır ve plazmid aktarılan bu suşların sıvı kültürleri hazırlanmıştır. Hazırlanan sıvı kültürlerden zamana bağlı likopen üretimi 24 saatte bir asetonla likopen ekstraksiyonu ve ekstraksiyon ürünlerinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile analizi yapılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda *E.coli* EPI300 72. saatte $1,189 \pm 0,040305$ mg/l, *E. coli* NEB suşunda 72. saatte $1,168 \pm 0,073539$ mg/l, *E. coli* DH5 α -Turbo suşunda 72. saatte $1,002 \pm 0,25173$ mg/l ve *E. coli* TOP10 suşunda 72.saatte $0,918 \pm 0,018385$ mg/l likopen üretimleri maksimum bulunmuştur. Bu suşlardan pAC-EHER-EBİdi içeren *E. coli* MG1655, *E. coli* DE3, *E. coli* XL1-Blue, suşlarında daha yüksek miktarda likopen üretimi gözlenirken *E. coli* DH5 α , *E. coli* DH5 α -Pro suşlarında daha düşük miktarda üretim olduğu bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Likopen, *Escherichia coli*, mikrobiyal üretim, metabolik mühendisliği

SUMMARY

Microbial Biosynthesis of Lycopene with Metabolic Engineering Approach

Lycopene, which is the primary carotenoid in human serum, plays an important preventive role in cancer, heart disease, diabetes and many diseases in human health. Although it protects against photodynamicity in plants, it is the carotenoid molecule, which is becoming increasingly important as nutritional supplements, pharmaceutical, food colorants. In this thesis, microbial production of lycopene in *Escherichia coli* bacteria by metabolic engineering approach was aimed. For the microbial production of lycopene in *E. coli*, the plasmid (pAC-EHER-EBI_{lidi}) containing the expression of the enzymes that carry out the synthesis of lycopene using the Gibson assembly method (*crtEBI*) was carried out. The plasmid that was constructed had different *E. coli* strains (*E. coli* MG1655, *E. coli* NEB 10-beta, *E. coli* DH5 α , *E. coli* DH5 α -Pro, *E. coli* NEB-Turbo, *E. coli* XL1-Blue, *E. coli* TOP10, *E. coli* EPI300, *E. coli* DE3) was transferred and the liquid cultures of these strains transferred to the plasmid were prepared. The lycopene production from the prepared liquid cultures was carried out by means of acetone extraction with acetone and analysis of the extraction products by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). As a result of these analyses in 72.hour *E. coli* EPI300 $1,189 \pm 0,040305$ mg/l, 72.hour *E. coli* NEB-Turbo $1,168 \pm 0,073539$ mg/l, 72.hour *E. coli* DH5 α -Turbo $1,002 \pm 0,25173$ mg/l and 72.hour *E. coli* TOP10 $0,918 \pm 0,018385$ mg/l, maximum lycopene production was observed. While the pAC-EHER-EBI_{lidi} carrying *E. coli* MG1655, *E. coli* DE3, *E. coli* XL1-Blue strains showed to be more successful in lycopene production, the strains pAC-EHER-EBI_{lidi} carrying *E. coli* DH5 α -Pro, *E. coli* DH5 α were shown to produce lesser amount of lycopene.

Key words: Lycopene, *Escherichia coli*, microbial production, metabolic engineering

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. β - karoten	5
Şekil 2.2. Likopen	5
Şekil 2.3. Lutein	5
Şekil 2.4. Zeaksantin	5
Şekil 2.5. Karotenoidlerin özellikleri	8
Şekil 2.6. Doğal karotenoidler	12
Şekil 2.7. Bitkilerde karotenoidlerin biyosentezi	17
Şekil 2.8. Likopenin kimyasal özelliği	20
Şekil 2.9. Likopenin biyosentezi	22
Şekil 3.1. pAC-EHER plazmidinin haritası	41
Şekil 4.1. pAC-EHER plazmidinin haritası ve EcoRI, HindIII ve SalI enzimlerinin kesim bölgeleri.....	46
Şekil 4.2. pAC-EHER plazmidinin enzimatik doğrulamasına ait agaroz jel görüntüsü.....	46
Şekil 4.3. pAC-EHER-EBIidi plazmidinin Vector NTI ile tasarlanan haritası.....	47
Şekil 4.4. pAC-EHER plazmid DNA'sından 1001-5 ve 1001-6 primerleri ile 2566 bp bölgenin PCR ürününün agaroz jeldeki görüntüsü	48
Şekil 4.5. pAC-EHER plazmid DNA'sından 1001-3 ve 1001-8 primerleri ile 6547 bp bölgenin PCR ürününün agaroz jeldeki görüntüsü	49
Şekil 4.6. pAC-EHER plazmid DNA'sından 1001-2 ve 1001-7 primerleri ile 1771 bp bölgenin PCR ürününün agaroz jeldeki görüntüsü.....	50
Şekil 4.7. Gibson reaksiyonu ürününün <i>E. coli</i> NEB bakterisine transformasyonu	51
Şekil 4.8. pAC-EHER-EBIidi plazmidinin HindIII ve EcoRI kesim sonrası elde edilen bantlar..	52
Şekil 4.9. Gibson inşasında enzimatik doğrulama sonucunda pozitif kolonilerin fenotipik görüntülenmesi	52
Şekil 4.10. Likopen üreten <i>E.coli</i> kolonilerinin petri görüntüsü.....	53
Şekil 4.11. pAC-EHER-EBIidi plazmidi içeren <i>E. coli</i> suşlarına ait hücre peleti görüntüleri.....	54

Şekil 4.12. pAC-EHER-EBIidi içermeyen ve içeren <i>E. coli</i> MG1655 kültürlerine ait peletler.....	54
Şekil 4.13. 48 saatlik pAC-EHER-EBIidi içeren ve içermeyen <i>E. coli</i> MG1655 ve <i>E. coli</i> NEB 10-beta kültürlerine ait ekstraksiyon ürünlerinin spektrofotometrik ölçümüne ait grafik görüntüsü.....	55
Şekil 4.14. Suşların likopen konsantrasyonlarının zamana bağlı grafiği	55
Şekil 4.15. Suşların OD600 değerlerinin zamana bağlı grafiği	56
Şekil 4.16. <i>E.coli</i> EPI300 suşunun farklı besiyerlerdeki likopen yoğunluğunun zamana bağlı grafiği.....	57



TABLÖLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Karotenoidler için spesifik absorpsiyon katsayıları, solventler ve maksimum dalga boyları	6
Tablo 2.2. Karoten ve ksantofillerin antioksidan aktivitesi	7
Tablo 2.4. Bazı sebze ve meyvelerin içerdiği karotenoid çeşitleri ve miktarları.....	15
Tablo 2.5. Karotenoidlerin fonksiyonları	16
Tablo 2.6. Sentetik likopen izomer bileşimi	24
Tablo 2.7. Sentetik likopen kullanımı ve kullanım seviyeleri	25
Tablo 3.2. Likopen analizi için HPLC çalışma şartları.....	44
Tablo 4.1. Plazmid inşalarında kullanılacak olan primer dizileri, bağlanma sıcaklıkları, uzunlukları, çoğaltması beklenen fragment uzunlukları.....	47

KISALTMALAR DİZİNİ

<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>P.agglomerans</i>	: <i>Pantoea agglomerans</i>
<i>S. cerevisiae</i>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>H.pluvialis</i>	: <i>Haematococcus pluvialis</i>
sp.	: Tür
AMD	: Yaşa bağlı makula dejenerasyonu
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
DNA	: Deoksiribonükleik asit
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
OD	: Optik dansite
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
dNTP	: Deoksiribonükleotidtrifosfat
Cm	: Kloramfenikol
SOB	: Süper optimize besiyeri
SOC	: Süper optimize edilmiş katabolit represyonlu besiyeri
dH₂O	: Distile su
TAE	: Tris-asetat-EDTA
TEAC	: Trolox eşdeğer antioksidan kapasitesi
EtBr	: Etidyum bromür
LB	: Luria Bertani
UV	: Ultraviyole
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
Mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
ng	: Nanogram
ppm	: Milyonda bir
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
kg	: Kilogram
g	: Gram

μM	: Mikromolar
mM	: Milimolar
μmol	: Mikromol
v/v	: Hacim/Hacim
dk	: Dakika
rpm	: Rotorun dakikadaki dönme hızı
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
kb	: Kilobaz
bp	: Baz çifti



1. GİRİŞ

Bitkiler, ilaç katkı maddeleri, tıbbi değere sahip yeni ürünlerin keşfi ve diğer endüstriyel değerler için benzersiz bir kaynak olan ancak büyümeye doğrudan katkıda bulunmayan sekonder metabolit olarak bilinen çeşitli organik bileşikler üretirler. Bu organik bileşikler ticari olarak talebi karşılayamadığı için biyoteknolojik üretimini artırma ve daha karlı yöntemler arayışına neden olmuştur. Ürünlerin geri kazanımı, mikrobiyal sistemlerde metabolik yolları yeniden yapılandırması ikincil metabolitlerin yüksek verimi için hücre hatlarının seçimi kolay olması gibi avantajlara sahip olan mikrobiyal konaklarda biyoteknolojik üretim gerçekleşmiştir. Bitkiler sayısız iskelet yapısı ve fonksiyonel grup kombinasyonlarına dayanan bir dizi özel metabolit üretirler [1].

Sentetik biyoloji, geniş çapta yeni suni biyolojik yolların, organizmaların veya cihazların tasarımı veya yeniden tasarımı ve inşaatı olarak tanımlanabilen, heyecan verici ve hızla gelişen bir araştırma alanıdır. Mühendislik ilkelerini biyolojik bileşenlere uygulamaktır [2]. Sentetik biyolojinin temel amacı, biyolojik sistemlerin tasarlanması, inşa edilmesi, karakterize edilmesindeki kolaylık ve verimliliği arttırmaktır [3]. Günümüzün sentetik biyolojisinin hedefleri, ilaçların üretilmesinden hedeflenen doğum ve dozaja, biyolojik yakıtlara, doku mühendisliğine ve genetik olarak kodlanmış organizmalara kadar değişen bir alandır [4].

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Metabolik Mühendisliği

Metabolik mühendisliği, istenilen kimyasalları üretmek için canlı hücrelerdeki metabolik yolların yeniden düzenlemek amaçlı modifikasyonunu sağlayan; sistem biyolojisi, sentetik biyoloji ve evrim mühendisliğini bütünleştiren bir alandır [5]. Amaç, mikroorganizmaların doğal sentez yeteneğine bakılmaksızın hücrelerinde istenilen kimyasalların, farmasötik ürünlerin veya canlı-yakıtların üretimini iyileştirmek ve büyük miktarlarda üretilebilmesi için metabolik yollarının yeniden mühendislik tasarımıdır [6]. Metabolik mühendisliği şu an da yenilemez kaynaklardan veya bazı doğal kaynaklarda türetilen basit, kolay erişilebilir, ucuz malzemelerden çok sayıda kimyasallar üretme potansiyeline sahiptir. Metabolik mühendisliği, aminoasitler de dâhil olmak üzere kimyasalların gerinim iyileştirme ve biyolojik üretimini gerçekleştirmek için etkili ve gerekli bir yol haline gelmiştir [7]. Metabolik mühendisliği, rekombinant DNA teknolojisinin kullanımı ile spesifik biyokimyasal reaksiyonların modifikasyonu veya yeni biyokimyasal reaksiyonların getirilmesi yoluyla hücresel özelliklerin yönlendirilmesidir. Bu nedenle metabolik mühendisliği, metabolik yol bütünleşmesini vurgular; hücre fizyolojisinin ve metabolik kontrol önlemlerinin belirleyicileri olarak metabolik akılara dayanır [8]. Üretilmeleri zor olan bitki sekonder metabolitleri günümüzde çeşitli endüstri kollarında kullanıma sahiptir. Geleneksel üretim yöntemlerine göre metabolik mühendisliği çalışmaları ile daha verimli, uygun maliyetli, yüksek saflıkta elde edilebilmektedir [9].

Mikroorganizmaları biyokatalizler olarak kullanıp ucuz ham materyallerden çeşitli organik kimyasalları üretmeye son zamanlarda artan bir ilgi vardır. Bu üretim şeklinin kimyasal sentez yöntemlerine göre bazı doğal avantajları vardır. Bunlar; hammadde olarak yenilenebilir enerji kullanımı, düşük çevresel etki ve kendini kopyalayan mikroorganizmaların kullanımıdır [10]. Metabolik mühendisliği mevcut biyokimyasal yolların optimizasyonunu veya en yaygın olarak bakteriler, maya veya bitkilerde, özellikle metabolizma veya biyoteknoloji için spesifik metabolitlerin yüksek verimli üretimini hedefleyen yol bileşenlerinin dâhil edilmesini içerebilir. Bakteriler nispeten basittir ve böylece manipüle etmek daha kolaydır.

Ayrıca bakteriler çok hızlı bir şekilde çoğalırlar ve ürün oluşumu için gereken substratların geniş bir yelpazesini kullanırlar [11]. Bununla birlikte bakteriler endüstriyel amaçlara uygun şekilde doğal olarak tasarlanmamışlardır ve bakterilerin tercihi, ham materyaller ve istenilen ürünü yüksek verim, titre ve üretkenlikle elde etmek için ihtiyaç duyulan modifikasyonlarla ilgili yapılması gereken rasyonel kararlara ihtiyaç duyulur [12]. Bu nedenledir ki mevcut konak organizmalar arasında bakteriler biyokatalizörler olarak en uygun ve doğal tercih olarak görülmektedir.

Konak seçimi metabolik mühendisliğinde ilk basamaktır. Verimi artırmak için doğal üreticinin genetik manipülasyonu endüstride uzun bir geçmişe sahiptir. Yeni bir konağa bütün bir metabolik yolağın yeniden inşa edilmesi sekonder metabolik mühendisliğinde önemli bir stratejidir. Birçok doğal üretici organizmanın kültürü veya transformasyonu zor olmakla birlikte heterolog ekspresyon genetik olarak manipüle edilebilen, kültüre alınması güvenli ve ucuz olan geleneksel bir konağın kullanımını sağlar. Dolayısıyla bütün metabolik yolağın heterolog bir konağa transferi doğal üretici kullanımına giderek artan bir şekilde alternatif olarak tanımlanmaktadır [13]. Metabolik mühendisliğinde verimi artırmak için birkaç yol kullanılabilir. İlk olarak istenilen ürüne doğru karbon akışı artırılabilir. Metabolik yolaktaki hız sınırlayıcı adımların halledilip, rekabetçi yolları kapatarak ve ilgili ürünün katabolizmasını kapatarak veya azaltarak bu yapılabilir [14-16]. İkinci olarak, çoklu biyosentez genlerini kontrol eden regülatör genlerin ekspresyonu değiştirilebilir [14].

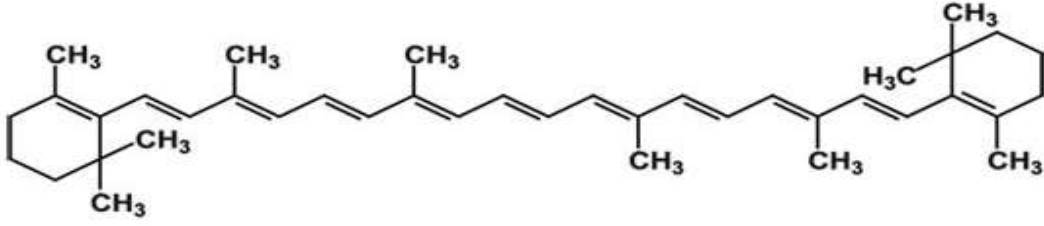
2.2. Karotenoidler

Karotenoidler tipik olarak lipofilik içeren bitki pigmentleridir. Oksidatif bölünmeye karşı karotenoidleri duyarlı hale getiren yapısında bulunan konjuge çift bağlardır. 700'den fazla üyesi ile tüm fotosentetik (bitki, bakteri, alg) organizmalar, bazı fotosentetik olmayan bakteri ve mantarlar tarafından sentezlenen terpenoid pigmentlerdir. Tetraterpenoid olan karotenoidler, C₄₀ yapısına sahiptir ve merkezi iskeleti 8 izopren ünitesinin yan yana dizilmesi ile oluşmaktadır [17]. Karotenoidlerin pek çok fizyolojik işlevi vardır. Yapıları gereği serbest radikalleri etkili bir şekilde bertaraf ederler ve bağışıklık sistemini güçlendirirler. Hayvanlar karotenoidleri sentezleyemezler ve onları beslenme yoluyla elde etmek zorundadırlar [17]. Bitki yaşamı için vazgeçilmez olan karotenoidler birçok meyve, çiçek ve sebzede renksizden sarıya, turuncuya, kırmızıya kadar uzanan çeşitlilikte renk oluşumunu ve ayrıca bitki

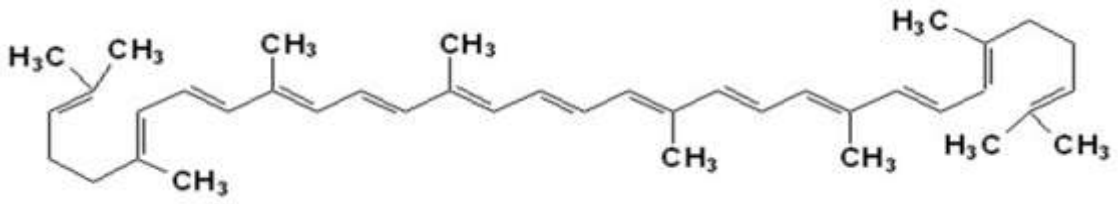
hormonu absisik asit sentezi için öncül molekülüleri sağlar [18]. Karotenoidler fotosentetik sistemlerde fotosentetik tepkime merkezinde enerji transferine katılarak veya reaksiyon merkezini oto-oksidasyondan koruyarak önemli bir rol oynarlar [19]. Fotosentez yapmayan organizmalarda karotenoidlerin oksidasyonu koruma mekanizmalarıyla ilişkilidirler [20]. Karotenoidler endüstriyel alanda genellikle gıda renklendiricileri olarak gıdalarda, ilaçlarda, kozmetikte, hayvan besinlerinde kullanılmaktadır. Bu nedenle birçok karotenoid molekülünün modern biyoteknolojik yöntemlerle üretimine yönelik çalışmalar gittikçe artmaktadır [21].

Karotenoidler genel olarak karotenler, ksantofiller, karotenoid ketonlar ve karotenoid asitler olarak dört ana grupta toplanmaktadır. Karoten yapısında eğer karbon bulunduruyorsa karotenoid, oksijen bulunduruyorsa ksantofil adı verilmektedir [22]. Karotenoidler, bitkiler, mantarlar, algler ve bakteriler tarafından sentezlenen sarıdan kırmızıya renkli pigment olma özelliklerinden ve insan sağlığı üzerindeki yararlı etkilerinden dolayı dikkat çekmektedir. Doğada hemen her yerde bulunurlar [21]. Endüstriyel olarak, hayvan yemi katkı maddelerinde kozmetik ve gıdalardaki renklendiricilerde, ilaçlarda ve nötrasötiklerde de kullanılır [23]. Karotenoidlerin çoğu, 40 karbon atomu ve iki uç halkası içeren hidrokarbonlardır. Karotenoidler sarıdan kırmızıya renkli pigment olma özellikleri gösterdikleri için çeşitlilik arz eder ve çeşitli meyve, çiçek ve sebzelerin hem görüntü hem de ekonomik değerlerine katkıda bulunur [24]. Hayvanlar karotenoid sentezleyemez ve bu bileşikleri elde etmek için diyetlerine güvenirler. Astaksantin gibi karotenoidlerin besin alımı, bazı deniz hayvanlarının (örn. Somon, alabalık, karides ve ıstakoz) ve kuşların (örn. Flamingo ve bıldırcın) dokularına pigmentasyon sağlayarak bağışıklık sistemini geliştirir. Ayrıca provitamin A karotenoidleri, retinoid, retinol (vitamin A), retinal (ana görsel pigment) ve retinoik asit (morfogenezisi kontrol eden) sentezinin öncül maddesi olarak hayvanlarda hayati rol oynar [25, 26]. Karotenoidler kırmızı, sarı ve turuncu renkli meyve sebzelerin yanı sıra tüm yeşil yapraklı sebzelerde de bulunmaktadır. Ancak, yeşil yapraklı sebzelerde bulunan karotenoidlerin rengi klorofil tarafından baskılanmıştır. Karotenoidler, ikincil bitki pigmentleridir. Karotenoidlere renklerini veren konjuge çift bağ sistemi ve metil grupları bağlanmış alifatik bir zincirden oluşmaktadır. Ve konjuge bağ sayısı arttıkça renk yoğunluğu da artmaktadır. Karotenoidler, birbirine kovalent olarak bağlanmış izopiren ünitelerinden oluşmaktadır [27]. Karotenoidler yapılarına göre “hidrokarbon karotenoidler” ve “ksantofiller” olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Apolar özellikte

olup ve “Karotenler” olarak da adlandırılan hidrokarbon karotenoidlerin başlıcaları; α -karoten, β -karoten (Şekil 2.1) ve likopendir (Şekil 2.2).

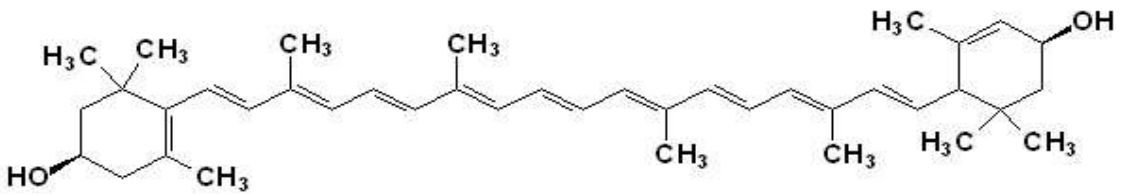


Şekil 2.1. β - karoten [19]

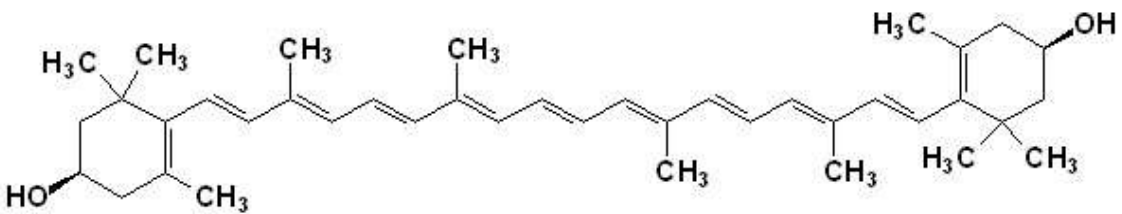


Şekil 2.2. Likopen [19]

Daha polar özellikte olup yapısında, hidroksi, keto metoksi, karboksi ve epoksi formunda oksijen içeren Ksantofillere örnek ise, β -kriptoksantin, lutein (Şekil 2.3) ve zeaksantin (Şekil 2.4) verilebilir.



Şekil 2.3. Lutein [19]



Şekil 2.4. Zeaksantin [19]

Karotenoidler ayrıca siklik (halkalı) ve asiklik (halkasız) karotenoidler olarak da sınıflandırılmaktadır. Likopen, fitoen, fitofluen ve ζ -karoten asiklik; α -karoten, β -karoten, δ -karoten ve γ -karoten siklik yapıdaki karotenoidlerdir [28]. Karotenoidler; bitkisel dokularda serbest halde (kristal veya amorf) veya yağlı ortamda çözünmüş olarak bulunurlar. Ayrıca yağ asitleriyle esterleşmiş halde veya şeker ve proteinlerle kompleks halde de bulunabilirler [28, 29]. Kaynama noktaları yüksek olup 130-220 °C arasında değişmektedir. Karotenoidler yaklaşık 430-480 nm dalga boylarında maksimum absorpsiyon göstermektedirler [28]. Karotenoidlerin belirlendiği dalga boyları ve absorpsiyon katsayıları Tablo 2.1’de gösterilmiştir [30].

Tablo 2.1. Karotenoidler için spesifik absorpsiyon katsayıları ($A_{1cm} \% 1$), solventler ve maksimum dalga boyları (λ_{max}) [30]

Karotenoid	Solvent	λ_{max} (nm)	$A_{1cm} \% 1$
Lutein	Etanol	445	2550
α -karoten	Hekzan	444	2800
β -karoten	Hekzan	450	2560
Zeaksantin	Hekzan	451	2480
β -kriptoksantin	Hekzan	451	2460
Likopen	Hekzan	472	3450

Karotenoidlerin konjuge çift bağ yapısı, fotosentez sırasında ışığı absorbe etme, enerji transferi, bileşiklerin karakteristik rengini belirleme ve hücreleri ışığın zararlı etkilerinden koruma gibi biyolojik fonksiyonlarını belirlemektedir [31]. Karotenoidler lipofilik bileşiklerdir ve bu özelliklerinden ötürü apolar organik çözücülerde çözünmekte, alkolde çözünmemektedir. Çoklu doymamış bir yapıya sahip olan karotenoidler, ısı kararlılığına sahip olmakla birlikte proses ve depolama sırasında izomerizasyona uğramaktadır. Karotenoidlerin çift bağ sisteminde meydana gelen izomerizasyonlar renk yoğunluğunda azalmaya neden olmaktadır [32]. Bu çift bağ sebebiyle karotenoidler kolaylıkla okside olmaktadır. Çok az miktarda oksijen varlığında bile depolandıkları vakit hızlı bir şekilde parçalanmaktadır. Doku içerisinde proteinler ve diğer bazı moleküller tarafından oksidasyondan korunan pigmentler, serbest radikallerin etkisiyle oksidatif zarara uğrayabilmektedir. Bu oksidatif sonucu birçok degradasyon ürünleri oluşmaktadır. Oksidasyon sırasında öncelikle epoksitler ve karbonil bileşikler, daha ileri aşamada ise epoksi- β -iyonon içeren mono ve dioksijene

bileşikler oluşmaktadır. Sülfid ve metal iyonları varlığında, enzimatik aktivite, özellikle de lipoksigenaz aktivitesi karotenoidlerin oksidatif parçalanmasını hızlandırmaktadır. Lipoksigenaz, doymamış ve çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu katalizleyerek peroksitleri oluşturmakta, bunlar da dönüşümlü olarak karotenoidlerle reaksiyona girmektedir [28].

Endüstriyel olarak kullanılan karotenoidler kimyasal olarak sentezlenir, ancak küçük bir kısmı bitkilerden veya alglerden ekstraksiyon yoluyla elde edilir. Karotenoidler, vücudun ihtiyaç duyduğu şekilde A vitaminine dönüştürülür. Provitamin A karoten formları koyu yeşil ve sarı-turuncu yapraklılarda bulunur. Daha koyu renkler bu provitamin düzeyleri ile ilişkilidir [33].

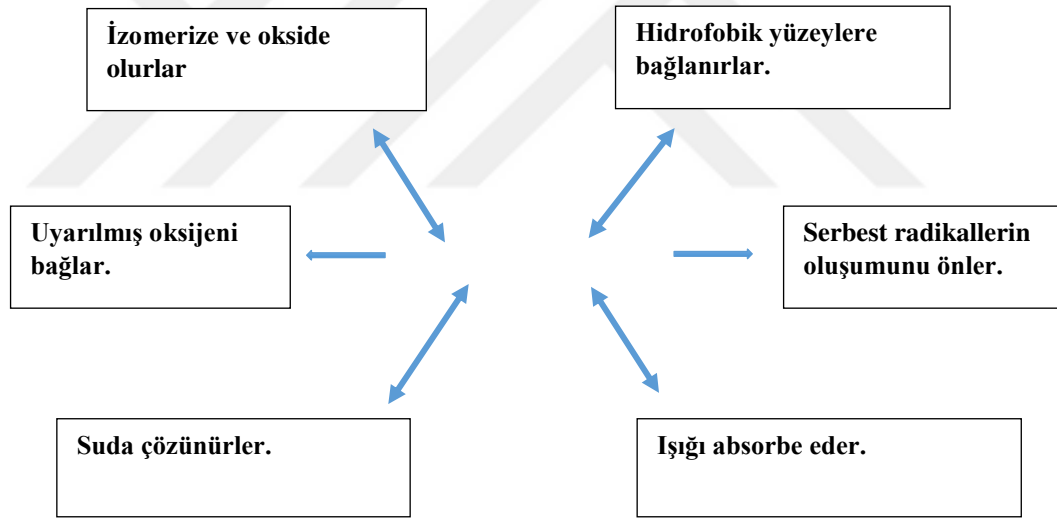
Karotenoidler, vitaminlerin yanı sıra biyolojik sistemlerde antioksidan olarak görev yapan kemopreventif ajanlar olarak en çok araştırılan maddelerdir [34]. Çalışmalar, karotenoidlerden zengin gıdaların artan tüketimi ile çeşitli hastalıkların azaltılması arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Olson'a [35] göre, karotenoidler singlet oksijeni söndürür, peroksi radikalleri çıkarır, kanserojen metabolizmasını modüle eder, hücre proliferasyonunu inhibe eder, hücreler arasındaki iletişimi uyarır ve bağışıklık yanıtını artırır. Testler *in vitro* ve *in vivo* olarak, karotenoidlerin mükemmel antioksidanlar olduğunu, serbest radikalleri temizlediğini ve inaktive ettiğini düşündürmektedir [36]. Karoten ve ksantofillerin antioksidan aktivitesi Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Karoten ve ksantofillerin antioksidan aktivitesi [36]

Karotenoid	TEAC(mM)
Likopen	2.9 ± 0.15
β-karoten	1.9 ± 0.10
α-karoten	1.3 ± 0.04
β -kriptoksantin	2.0 ± 0.02
Zeaksantin	1.4 ± 0.04
Lutein	1.5 ± 0.10
Astaksantin	0.03 ± 0.03
Kantaksantin	0.02 ± 0.02

Karotenoidler gıda endüstrilerinde, doğal renklerinin bir bölümünü kaybetmiş ürünlerde örneğin; meyve suları, makarnalar, içecekler, şekerler, margarinler, peynirler ve sosislerde renk vericilerinin geri kazanımı için kullanılmaktadır. Aynı zamanda

alkaloidler ve uçucu bileşikler gibi bazı yiyeceklerin lezzetinden sorumlu olan birçok önemli kimyasal bileşiğin ve bazı çiçeklerin kokularının öncüleridir [37]. Dolayısıyla, bu pigmentler yemdeki uygulamaları sayesinde yumurta sarısı, tavuk derisi, balık ve süt renklerini yoğunlaştırır [38]. Günümüzde karotenoidlerin gıda endüstrisinde de kullanılması doğal ürünlerle sağlığın korunması konusundaki artan ilgiyle birlikte, gıda ürününü zenginleştirmek içindir. Ayrıca, kozmetik ve farmasötik endüstrilerinde, sadece tıp kapsüllerini, takviyelerini ve kozmetik ürünlerini boyamak amacıyla kullanılabilirler [38]. Endüstriyel ölçekte doğal pigmentlerin üretimi ve ürünlerin yüksek değeri, karotenoidlerin biyoteknolojik prosesini yoğun bir çalışma alanı haline getirmektedir. Verilen bir sistemdeki biyoproses üretkenliği mikroorganizmanın beslenme ve fiziksel koşullarına bağlıdır ve yalnızca pigment üretimi olarak hücre büyümesini etkiler. Bu nedenle, mikroorganizmalar çevresel koşulların stresine yanıt olarak farklı karotenoidler biriktirir [39].



Şekil 2.5. Karotenoidlerin özellikleri [31]

2.2.1. Karoteneoidlerin Biyoyararlanımı ve Tıptaki Önemi

Karotenoidler, yağda çözünür olduklarından bağırsakta absorbe edilmektedir. Karotenoidlerin ince bağırsak mukozası tarafından pasif difüzyon ile absorbe edildiği düşünülmektedir. Karotenoidler, ince bağırsak mukozası tarafından alınmakta ve şilomikronlara taşınmaktadır. Retinol (alkol), retinal (aldehit) ve retinoik asit; A vitamininin ön maddesi olarak bilinmektedir. Retinal, vücutta; gen transkripsiyonunu etkileyen A vitamininin retinoik asit formuna dönüşmektedir. Retinol, retinal, retinoik

asit ve bunlarla ilgili bileşikler retinoidler olarak bilinmektedir. β -karoten ve diğer karotenoidler vücutta retinole dönüşmektedir ve provitamin A karotenoidi olarak adlandırılmaktadır. A vitaminine metabolize olan yaklaşık 50 farklı karotenoidten β -karoten, en yüksek provitamin A aktivitesine sahiptir. Bunun nedeni yapısında bulunan 2 adet β -iyonon halkası ile açıklanmaktadır [40]. Vitamin A ve β -karoten ince bağırsaktan emilir ve çoğunlukla karaciğerde depolanır. Sindirim sürecinde gıdalardan serbest bırakıldıktan sonra bileşik safra asitleriyle ince bağırsak tarafından emilir. Karotenoidlerin bazıları, özellikle de küçük bağırsak mukozal hücrelerinin sitoplazmasında beta-karoten retinolden ayrılır. İnce bağırsak mukozasındaki retinol, yağ asitleri ile reaksiyona girerek ester oluşturur ve küçük bağırsak villöz villusların hücrelerindeki safra sıvılarının yardımıyla kilomikron tarafından lenf sistemi yoluyla karaciğere kan dolaşımıyla taşınır. Vücut isterse, A vitamini karaciğerden sentezlenen Retinol Bağlayıcı-Protein (RBP) ile taşınan retinol formunda karaciğerden harekete geçirilir. Çeşitli vücut hücreleri tarafından alınan retinol, RBP'ye özgü membran yüzeylerindeki reseptörlere bağlıdır. Retinol daha sonra hücre zarı yoluyla taşınır ve Hücrel Retinol Bağlayıcı Protein'e (CRBP) bağlanır ve sonra RBP salınır. Retinol göz hücrelerinde retina ve epitel hücrelerinde retinoik asit olarak işlev görür [41]. β -karotenin, vücutta retinole dönüşümünün gıdadan gıdaya değişim gösterdiği belirtilmektedir. β -karotenin retinoid bileşiklere dönüşümünde 2 ayrı basamak bulunmaktadır. Bunlardan ilki; 15,15'-dioksigenaz enziminin etkisiyle β -karotenin 15,15' çift bağının parçalanması ve retinalin oluşmasıdır. Retinal de daha sonra retinole indirgenmekte veya retinoik aside okside olmaktadır. Diğer bir yol ise β -karotenin β -apokarotenollere parçalanması ve bu aldehitlerin önce β -apokarotenoik aside daha sonra da retinoik aside okside olmalarıdır [42].

Karotenoid kimyasında biyotik (oksidasyon, degradasyon gibi) ve abiyotik (sıcaklık gibi) faktörler tarafından yapılan değişimler biyoyararlılığı etkileyebilmektedir. Karotenoidlerin biyoyararlılığını; biyotik ve abiyotik faktörler, gıda matriksi, intraselüler yerleşim, fizikokimyasal özellikler, diğer karotenoidlerle interaksiyon, diyet yağı varlığı, proses, ısı uygulaması, bağırsaklarda tüketilen ve emilen miktar, besleme konağının beslenme durumu gibi pek çok faktöre göre değişkenlik göstermektedir [43]. Bitkisel ürünlerde karotenoid birikimi, bir bitki türünün fizyolojik, genetik ve biyokimyasal özelliklerinin yanı sıra çevresel büyüme faktörleri gibi ışık, sıcaklık, doğurganlık, işleme derecesi, absorpsiyon ve emilim

sırasında ve sonrasında izomerizasyon derecesi, bağırsakta geçiş süresi ve beslenme durumu biyoyararlılığı etkilemektedir. Örneğin diyet yağı, parçalama ve pişirme, biyo yararlılığı arttırmaktadır. Moleküler konumlandırımadaki farklılıkların, karoten ve ksantofil karotenoidlerin bitki dokularının matriksinden salınımını etkilemesi ve dolayısıyla biyoyararlanımı etkilemesi beklenebilir [44].

Karotenoid biyoyararlanımındaki ilk aşama, gıda matrisinden salınımdır. Karotenoidlerin emilim miktarları gıdaların pişirilmesi sırasında yapısının bozulması ile orantılı olarak artmaktadır. Karotenoidler yağ dokuda çok sayıda depolanabilir ve doymamış yapıya sahip olduklarından oksidasyona maruz kalabilirler. Pişirme sırasında uygulanan fazla ısı, ortamın ısısı, ışığı, pH'ı, nemi, depolama süresi gibi faktörler gıdalardaki karotenoid miktar ve yapısını değiştirebilmektedir. İşleme aktiviteleri genellikle, besin matrisinden bağlı karotenoidlerin daha fazla salınması yoluyla biyoyararlanımı artırır [45].

Karotenoidlerin tıp alanındaki önemi, A vitamini eksikliğini tedavi etmektir. Yüksek miktarda karotenoid alımı ile sağlık yararları arasındaki ilişki 1970'lerde ortaya çıkmıştır. Meyve ve sebzelerde yüksek diyetler düşük kanser oranları ve koroner kalp hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. Aynı zamanda T-lenfosit hücre dizilerinde apoptozu indükler ve genom istikrarını koruyabilir [46]. A vitamini eksikliği göz mukozasının kurumasına neden olur. Diyetteki provitamin A karotenoidleri, bu kurumayı önleyebilir [47]. AMD gibi gözle ilgili hastalıklar diyetteki karotenoidlerin aktif oksijen türlerini söndürerek bu hastalıkların görülme oranını azaltabilmektedir. İnsan lens epitel hücreleri (HLEC) üzerindeki *in vitro* çalışmalar, likopenin hücre kültürlerine eklenmesinin HLEC'de hücreler içinde veya bazal membran zonunda sıvı dolu vakuollerin oluşmasını önemli ölçüde önlediğini göstermiştir. Lutein ve zeaksantin erkeklerde katarakt riskini % 19 azalttığı görülmüştür [48]. Karotenoidlerin (özellikle β -karoten) kardiyovasküler hastalıkların gelişimi üzerindeki rolü hakkında yapılan çalışmalar, karotenoidlerin koruyucu etkisini ortaya koymuştur [49]. İşlenmiş domates ürünlerinin tüketimi oksidatif hasara karşı lipoprotein duyarlılığını azaltır. Böylelikle plak oluşumu ve stres oluşumu azalır [50, 51]. Bununla birlikte, Finlandiyalı sigara içen insanlar üzerinde β -karoten araştırılması yapılmış ancak akciğer kanserinin yükseldiğini ve β -karotenin kardiyovasküler hastalıklarının ölüm hızını azaltmada, felç oranlarının düşürülmesinde yetersiz olduğu tespit edilmiştir [52]. Ve burada gösterilen meyve ve sebzelerden gelen karotenoidlerin ve diğer antioksidanların bir kombinasyonunun tek

bileşenli diyet takviyelerine göre daha etkili olduğudur. Tekli oksijenin söndürülmesi, lipid peroksidasyonunun sonlandırılması, hücre-hücre iletişimleri, lipoksigenaz aktivitesinin modülasyonu, fotosensitiv önleme, membran modülatörleri, akışkanlık kontrolü vb. işlevleri vardır. Karotenoidlerin hücre çoğalmasını, transformasyonu ve mikronukleus oluşumunu ve bazı genlerin modülasyonunu inhibe ettiği anlaşılmıştır. Bu özellikler karsinogeneze karşı koruyucu bir etki ile tutarlıdır. Bu açıdan ilk keşiflerden biri, bazı karotenoidlerin, *in vitro* olarak, boşluğa bağlantılı iletişimin doz bağımlı bir biçimde artmasıdır [53]. Karotenoidlerin kanserler üzerindeki etkileri hakkında çok zengin bir araştırma yapılmıştır. 1960 ve 1970'lerdeki gözlemsel epidemiyolojik çalışmalar, meyve ve sebze alımı ile akciğer kanseri ve diğer kanserler üzerindeki etkileri görülmüştür. Daha yakınlarda, çok çeşitli sebzelerin tüketiminin, herhangi bir spesifik karotenoid veya toplam karotenoid alımından çok akciğer kanseri üzerinde etkili olduğunu bildirmiştir. Karotenoid bileşiklerden likopenin kandaki miktarının artışı ile kardiyovasküler hastalık (CVD) riskinin azaldığı belirtilmektedir. Hücre kültürü ile yapılan çalışmalar ve hayvan modellemelerinden elde edilen sonuçlara göre de likopenin *in vitro* ve *in vivo*'da antikanserojenik ve damar sertliğini önleyici etkisinin bulunduğu kanıtlanmıştır. Bunun yanında, birçok epidemiyolojik çalışma likopeni içeren domates ve domates ürünlerinin fazla miktarda tüketiminin CVD'ye karşı koruyucu olabileceğini ve başta prostat, mide, meme, akciğer ve sindirim bölgesi olmak üzere birçok kanser türünün oluşumunu azaltabileceğini göstermiştir. Ayrıca, düzenli olarak düşük miktarda domates ürünleri tüketiminin hücreyi oksidan bileşiklerin neden olduğu DNA zararından koruduğu bilinmektedir. 1995 yılında Giovannucci ve arkadaşları, yüksek likopen gıdalarının, düşük prostat kanseri riski ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir [54]. Diyetin domates sosuyla eklenmesinin, serum ve prostatta toplam likopenin önemli bir artışa neden olduğu bilinmektedir [55]. Diyetle alınan karotenoidler kolorektal kanser riskini azalmıştır [56]. β -karotenin UV ışınlarına karşı koruyucu etkileri üzerine bir takım çalışmalar yapılmış β -karoten takviyesi (β -karoten ve E vitamini kombinasyonu) ile koruyucu etkinin görülebileceği sonucuna varılmıştır [57]. Ve bu karışımın tek başına β -karotenden daha etkili olduğu ve bu bileşiklerin antioksidan özelliklerinden kaynaklandığı öne sürülmüştür. β -karoten takviyeleri yaygın olarak 'oral güneş koruyucuları' olarak kullanılır. Biyolojik sistemlerde, ışık maruziyeti, biyomoleküllere zarar veren ve subselüler yapıların, hücrelerin ve dokuların

bütünlüğünü ve stabilitesini etkileyen reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olur [58].

Lutein ve zeaksantin, insan kan serumu içinde bulunan bununla birlikte, retina ve göz merceğinde yer alan tek karotenoidlerdir [59]. Retinada, lutein ve zeaksantin seçici olarak biriktirilir ve esas olarak sarı pigmentasyondan sorumludurlar [60]. Lutein ve zeaksantin, insan retina ve lens dokularında ve uzun zincirli çoklu doymamış yağ konsantrasyonlarının gözlemlendiği diğer alanlarda bulunmuştur. Retinal karotenoidlerin foto-koruma için olası etki şekilleri, zararlı kısa dalga UV ışığını ve bunların antioksidanlar olarak işlevlerini filtrelemeyi içerir [61, 62].

2.2.2. Sentetik ve Doğal Karotenoid Kaynakları

Kimyasal yollarla elde edilen sentetik ve doğal karotenoid kaynakları kullanılmaktadır. Sentetik karotenoid kaynakları çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Yemlere katılarak yem maliyetini önemli ölçüde arttırmaktadır. Aynı zamanda balık etinin doğal rengi olan pembe rengi sağlamak adına ticari olarak alınan ve sentetik karotenoid kaynağı olarak astaksantin kullanılmaktadır. Ancak sentetik karotenoidler ithal edildiği için dışa bağımlılık ve maliyeti olduğu için günümüzde doğal karotenoidlere yönelim söz konusudur. Beta-karoten, beta-apo-8 karotenal ve kantaksantin gibi karotenoidler sentetik karotenoidlerdir.



Şekil 2.6. Doğal karotenoidler [63]

Doğal karotenoidler arasında α -karoten, β -karoten, lutein, zeaksantin ve likopen yer almaktadır [63]. Bazı karotenoidlerin besin kaynakları, fonksiyonları ve etkileri Tablo 2.3’de gösterilmiştir.

Tablo 2.3: Bazı karotenoidlerin besin kaynakları, fonksiyonları ve etkileri[63]

Karotenoidler	Besin Kaynakları	Fonksiyonları	Etkileri
α -karoten	Sarı portakal sebzeler (havuç,kabak), koyu yeşil sebzeler (brokoli, ıspanak, yeşil fasülye)	Provitamin A aktivitesi, Antioksidan etki	Bağışıklık sisteminde artış, Hücre iletişimi, Bazı kanser risklerinde azalma
β -karoten	Yeşil lifli sebzeler ve portakal sarı meyveler ve sebzeler, havuç, ıspanak, taze patates, kabak, biber,kayısı, kavun	Provitamin A aktivitesi, Antioksidan etki	Bağışıklık sisteminde artış, Bazı kanser risklerinde azalma, Yüksek doz takviyesi sigara içenler arasında akciğer kanseri riskini artırabilir.
Likopen	Domates, karpuz, kayısı, şeftali	Antioksidan	Bazı kanser, diyabet ve osteoporoz risklerinde azalma
Lutein-Zeaxanthin	Koyu yeşil lifli sebzeler, (ıspanak), kırmızıbiber, domates, mısır, yumurta sarısı	Fotosentetik pigment, antioksidan	Yaşa bağlı makula dejenerasyonunda, katarakt, kardiovaskular hastalıklarda, bazı kanser türlerinde azalma
Astaksantin	Yeşil algler, salmon, alabalık, kabuklular	Antioksidan; Renklenme	Bazı kanser, katarakt ve diyabetin önlenmesi

β -karoten, turuncu bir pigment olup hafif ve oksijene duyarlıdır. Kan ve dokularda yer almaktadır. Böbrek üstü bezi, testis, karaciğer, yumurtalık, böbrek, pankreas, akciğer, deri ve kalın bağırsakta bulunmaktadır. Kalp hastalığına ve kansere karşı koruma ile ilişkilidir. β -karoten bağırsak epitel hücrelerinde A vitamini dönüştürülmekte ve karaciğerde palmitat esteri olarak depolanmaktadır. LDL-kolesterolün oksidasyonu ateroskleroz gelişiminde önemli bir faktördür ve β -karoten, lipoprotein oksidasyonunu inhibe ederek etki eder. β -karoten; fotosentez sırasında zararlı ışığa karşı fotokoruma, antioksidan, kansere karşı koruma, immün cevabı artırma, tümör gelişimini inhibe etme gibi özelliklere sahip olduğu belirtilmektedir. Ayrıca bazı peynir ürünleri ve margarinlerin yapısına katılmaktadır. Kanatlı hayvanların yemlerinde ve bazen et ve yumurta sarısının rengini iyileştirilmesinde kullanılmaktadır [64-66]. Doğada en yaygın olarak bulunan β -karoten, en çok havuçta bulunur ve bununla beraber maydanoz, tatlı patates, hindiba, kırmızıbiber, tatlı kabak, kıvırcık, ıspanak, marul ve pazı gibi sebzeler mango ve kayısı gibi meyvelerde yer almaktadır [67].

Lutein ve lutein özleri, önemli karotenoid kaynaklarıdır. Vücudumuzda retina ve lens gözlerinde depolanan karotenoidlerdir. Serumda en fazla bulunan lutein yeşil yapraklı sebzelerde çokça bulunmaktadır: Kıvırcık, marul, maydanoz, ıspanak, marul, brokoli, tatlı mısır, fasulye, yeşilbiber, hindiba, kivi, avakado, erik vb [68]. Lutein, tatlı su balıklarında en yaygın karotenoidlerden biridir ve alabalığa sarı bir renk katar. Etkili yumurta sarısı pigmentasyonu için bazik bir lutein pigmenti gereklidir. Ketokarotenoidlerde rengi geliştirir [69]. Yonca unu, mısır gluteni unu ve kümes hayvancılığı pigmentleri için ticari olarak temin edilebilir. Luteinin başka bir ticari kaynağı ise renksizleştirmek için susuzlaştırılmış, öğütülmüş ve pazarlanmış olan marigold yapraklarıdır [70]. Lutein üretimi için mikrobiyolojik süreçler araştırılmıştır. Lutein üretimi için patentler mevcuttur. *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Chlamydomonas* ve *Sponoiococcal* mikroalglarıdır. *Spongiococcum excentrum*, tavuk yeminde kullanım için ticarileşmiştir fakat artık mevcut değildir [71].

Zeaksantin bazı bitkiler, bakteriler ve algler tarafından sentezlenen ksantofil sınıfı, sarı renkli, bir karotenoid molekülüdür [72]. Zeaksantin pigmenti sahip olduğu özellikleri nedeniyle gıda, tıp, kozmetik alanlarında gittikçe artan bir ilgiye sahiptir [73]. Zeaksantin pigmenti antioksidan, antikanserojen özelliklere sahip ayrıca kardiyovasküler ve oftalmolojik hastalıkları önlemede etkili olduğu bilinen bir moleküldür [74]. Zeaksantin, gıda maddeleri ve kozmetik ürünlerin renklendirilmesinde kullanılabilen, toksik ve mutajenik olmayan doğal bir pigmenttir [75]. Su kültürü desteğiyle yüksek ekonomik değere sahip bir ketokarotenoid olan astaksantin, deniz bakterileri ve mikroalglerde bulunur ve zeaksantin'den 4-ketolaz ile sentezlenir. Salmonidlerde ve karideslerde birincil pigmenttir ve bu pigment, hayvanlar tarafından sentezlenmediğinden tüketicilere cazip bir renk kazandırmak için diyetlerine eklenir [76-78]. Şu anda, astaksantin çoğu, kimyasal sentez ile elde edilir. Bununla birlikte, astaksantin, kompleks bir moleküldür ve sentezi zor olabilmektedir. Su ürünleri yetiştiriciliğinde potansiyel pazar olması nedeniyle, rekabetçi biyolojik astaksantin kaynaklarının geliştirilmesinde büyük bir endüstriyel ilgi vardır. Astaksantin, besin katkı maddesi olarak kullanılır. Yemlerde yüksek astaksantin seviyeleri önerilir [79]. Astaksantin, serbest bulunan, kısa zincirli yağ asitlerine esterlenmiş veya kovalent olarak protein ile bağlantılı olmayan en yaygın karotenoid maddedir. Ayrıca gözlerde, kanda, yumurtada ve kabuklu hayvanlarda en çok bulunan karotenoidlerdir [80].

Yüksek bitki olan *Adonis aestivalis* türleri, büyük miktarda pigment kaybı olmaksızın kurutulup öğütülebilen çiçek yapraklarında astaksantin üretir [81]. Antitümör özellikleri ve serbest radikallere karşı koruma, lipid peroksidasyonu, LDL-kolestrole oksidatif hasar, çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ve hücre zarlarında UV ışığı etkisi ile bazı hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde önem taşımaktadır [82].

Tablo 2.4. Bazı sebze ve meyvelerin içerdiği karotenoid çeşitleri ve miktarları [83].

Meyve-sebze	β -Karoten*	α - Karoten*	Likopen*	Kriptoksantin*	Lutein, Zeaksantin*
Elma (taze)	26	-	-	-	45
Kayısı (taze)	3,5	-	5	-	-
Kuşkonmaz	449	9	-	-	640
Yeşil pancar	2.6	3	-	-	7.700
Marul (taze)	700	1	-	-	1.900
Kırmızı lahana	15	1	-	-	26
Havuç (taze)	8	3.6	-	-	260
Karnıbahar	8	-	-	-	33
Kereviz	710	-	-	-	3.6
Sarı mısır	51	50	-	-	780
Yeşil fasulye	630	44	-	-	740
Portakal	39	20	-	149	14
Kırmızı biber	2.200	60	6.8	-	-
İspanak	4.100	-	-	-	12.6
Mandalina	38	20	-	106	20
Domates	520	-	3.100	-	100

*=($\mu\text{g}/100$)

2.2.3. Karoteneoidlerin Fonksiyonları

Karotenoid fonksiyonlarının başında hayvanlarda A vitamini ön maddesi olarak rol oynamasıdır. Aynı zamanda gıda boyalarında kullanılmaktadır. Doğal renk pigmentleri; anatto, paprika ekstraktları, domates ve havuç ekstraktlarıdır. Yine sarı kırmızı rengi veren beta karoten gıda boyalarında kullanılmaktadır. Bu ve bunun gibi özellikte olan karotenoidler hayvan yemlerine katıldığından hayvanın vücut dokularından tutun da sütüne, peynirine kadar etkilemektedir [84].

Aerobik ortamlara adapte edilen organizmalar olarak, karotenoidler aşırı ışık ve oksijenin bir sonucu olarak oluşan singlet oksijeni söndürerek oksidatif hasara karşı koruma sağlayabilirler. Diğer işlevler arasında, karotenoidler bitkilerde fitohormonlara ve aroma bileşenlerine öncü olarak hizmet edebilir. Radyasyon, yüksek sıcaklığa, az miktarda oksijen ve amonyak gerilimine karşı etkili aynı zamanda çevresel etkilere karşı

korurlar. Kısacası, karotenoidler muhtemelen dar biyolojik fonksiyonlara sahip moleküller olarak ortaya çıkmışlardır, fakat şimdi doğada çok sayıda rolleri vardır, bunların bir kısmı henüz keşfedilmemiştir [85]. Karotenoidlerin fonksiyonları Tablo 2.5’de verilmiştir.

Tablo 2.5. Karotenoidlerin fonksiyonları [86]

Provitamin A aktivitesi	β -karoten, α -karoten, β -cryptoxanthin
Antioksidant etki	Tüm karotenoidler
Hücre iletişimi	β -karoten, canthaxanthin, cryptoxanthin
Bağışıklık sistemini arttırıcı etki	β -karoten
UV cilt koruyucu	β -karoten, lycopene
Göz koruyucu	Lutein, zeaxanthin

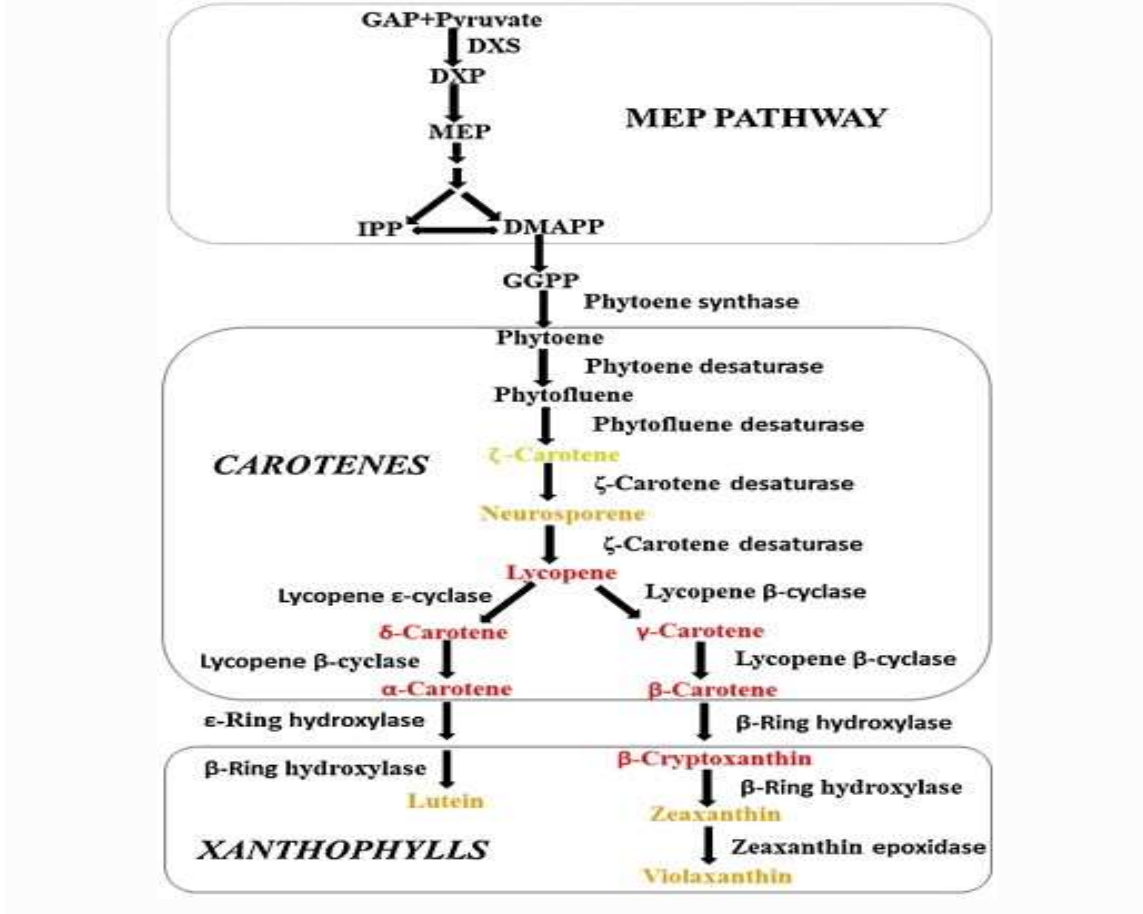
2.2.4. Bitkilerde Karotenoidlerin Biyosentezi

Karotenoidler; bitkiler, algler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilen ancak hayvanlar tarafından sentezlenmeyen pigmentlerdir. Karotenoid oluşumunun biyosentez yolağı 1950 ve 1960’lı yıllarda aydınlatılmıştır. 1970’li yılların başlarında, biyosentetik enzimlerin çalışılmasına olanak sağlayan *in vitro* sistemler geliştirilmiştir. Modern moleküler genetik tekniklerinin gen izolasyonuna imkan sağlaması sonucunda çalışmalar daha detaylı hale gelmiştir ve karotenoid biyosentezinin düzeni ile süreçte yer alan enzimler hakkında bilgiler artmıştır.

İzopentenil Difosfat Oluşumu

Yüksek bitkilerde karotenoidler plastitlerde sentezlenir ve lokalize olur ve üretimleri nükleusta kodlanan çeşitli enzimler yardımıyla kontrol edilir. Bunlar biyosentetik olarak gibberelinler, tokoferoller ve klorofiller gibi diğer izoprenoidlere beş karbon atomlu (C5) izopentenil difosfat (IPP) bileşiği ile bağlanırlar. Yolağının ilk basamağı, piruvattan türevlendirilmiş tiamin’in D-gliseraldehit-3-fosfat’ın (G3P) DXS enzimi ile kafa kafaya kondensasyonu sonucu 1-deoksi-D-xiluloz 5-fosfat (DXP) bileşiğinin oluşumudur. Bu transketolaz reaksiyonu DXP sentetaz enzimi ile katalizlenmektedir. DXP bileşiği de DXP redüktoizomeraz enzimi vasıtasıyla redüksiyon sonucu 2-C-metil-D-eritritol 4-

fosfat (MEP) bileşiğine dönüşür. Takip eden reaksiyonlar sonucunda MEP bileşiği, IPP ve DMAPP yapılarını meydana getirir [87-89]. Bitkilerde karotenoidlerin biyosentezi Şekil 2.7’de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Bitkilerde karotenoidlerin biyosentezi [90].

İzopentenil Difosfat’tan Fitoen Oluşumu

Geranil geranil pirofosfat (GGPP), farnesil pirofosfatın biyosentezinde organizmalar tarafından kullanılan HMG-CoA redüktaz yolağında bir ara maddedir. Zincir uzamasının başlatılması amacı ile IPP allilik izomeri olan DMAPP’ye dönüşür. IPP ve DMAPP’nin kondensasyonu sonucu geranil pirofosfat (GPP) meydana gelir. IPP’nin GPP’ye eklenmesi ile farnesil pirofosfat (FPP) oluşur. Bu yolağın ilk substratıdır. Bu substratın kullanımı ile GGPP bileşiği meydana gelir. İki molekül GGPP kondanse olarak ara ürün olan pirofosfatın oluşumunu sağlar. Bunu takiben difosfat grubunun eliminasyonu ve stereospesifik protonun yapıdan ayrılması sonucu fitoen bileşiği oluşur [91].

Desatürasyon ve İzomerizasyon Reaksiyonları

Bir seri konjuge karbon-karbon çift bağları, karotenoit pigmentlerinin kromofor gruplarını oluşturmaktadır. Bu çift bağlar fitoen yapısına bir dizi desaturasyon reaksiyonu sonucu yerleşmektedir ve dört desatürasyon ürünü oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla, fitofluen, ξ -karoten, neurosporen ve likopen'dir. Genişlemiş kromofor grupları renksiz fitoen bileşiğini kırmızı likopen bileşiğine dönüştürmektedir [92].

Siklizasyon

Karotenoid siklizasyonu, likopenden sonra uç kısımlarda altı üyeli halka oluşumudur. Bunun sonucunda da monosiklik ve bisiklik yapıdaki karotenoidler oluşmaktadır [92].

Ksantofil Oluşumu

Hidroksilasyon, epoksidasyon ve de-epoksidasyon basamakları ile yürümektedir [93].

2.2.5. Metabolik Mühendisliği Yaklaşımıyla Karotenoid Üreten Mikroorganizmalar

Mikrobiyal biyosentez karmaşık yapılara sahip olan, kimyasal sentezi zor olan karotenoidler için ekonomik bir öneme sahiptir. Karotenoidlerin çoğu sentetik kaynaklardan elde edilebilir. Bununla birlikte, sentetik pigmentlerin yüksek doz aralıklarında insan sağlığına zararlı etkilere neden olduğu Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmıştır. Şu anda β -karoten ve astaksantin endüstriyel olarak mikrobiyal kaynaklardan üretilmekte, gıda ve yem endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Uygun suş iyileştirme stratejileri ve fermantasyon teknolojileri sayesinde saf ve izomer içermeyen karotenoidlerin mikrobiyal olarak yüksek seviyelerde üretilmeleri mümkündür. Mikrobiyal karotenoidler son yıllarda birçok nedenden dolayı ilgi çekmiştir. Birincil nedenlerden biri şu anda tarımın en hızlı büyüyen sektörü olan akuakültür yetiştiriciliğinin büyümesidir. Mikrobiyal kullanımındaki başlıca sıkıntılar ticari üretim sistemleri, kimyasal sentez ile karşılaştırıldığında, düşük verim, yavaş büyüme ve yüksek üretim maliyeti olduğudur. Ancak, büyüme koşullarının optimizasyonu ve metabolik mühendisliği teknikleri ile birlikte mutantların hazırlanması gibi zorlanma gelişme stratejileri, karotenoid

verimliliği artırabilir. Mikrobiyal olarak üretilen karotenoidler, mikroorganizmanın çevresel özelliklerinin biyokimyasal yapısına bağlı olan iyi düzenlenmiş bir mekanizmadır [94].

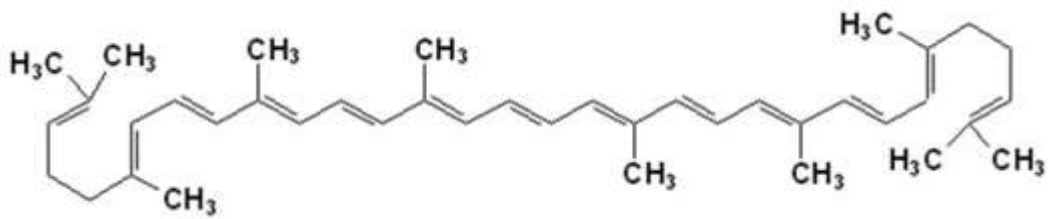
Astaksantin deniz ve suda yaşayan hayvanlarda en sık görülen kırmızı karotenoiddir. Somonun pembe renginden sorumludur ve aynı zamanda kabukluların renklenmesini sağlar. Serbest radikalleri süpürmek ve singlet oksijeni bastırmakla bilinir. Bağışıklık sistemini güçlendirir ve cildi radyasyondan korur. Astaksantin üretimi için ticari olarak kullanılan mikroalg *H.pluvialis* ve heterobasidiomycetous mayası olan *Xanthophyllomyces dendrorhous*nd'dur. Alternatif olarak, tatlı su türü ve tek hücreli olan *H.pluvialis*, stresli kondisyonlar altında aptaosantinlerinde astaksantin biriktirir ve bu karotenoidin en zengin kaynaklarından biri olarak kabul edilir [95]. Bu iki büyük karotenoid üreten mikroorganizmanın dışında, *Brevibacterium linens*, *Agrobacterium aurantiacum*, deniz bakterisi olan *Paracoccus haeundaensis* ve *Mycobacterium laktikola* da astaksantin üretmektedir [96-98]. Bazı izoprenoid biyosentetik genlerin merkezi karbon metabolizmasının modifikasyonlarıyla birlikte aşırı miktarda ekspresyonu, karotenoid üretiminde ilave bir artışa neden olmuştur. Gram-negatif bakteri *E. coli* hem doğal hem de yeni karotenoidlerin mikrobiyal üretimi için uygun bir konakçıdır [99]. Metabolik mühendisliğin gelişimine yardımcı genetik araçları vardır, solvent toleranslıdır ve fermantörlerde endüstriyel ölçeklendirme için gerekli olan yüksek hücre yoğunluklu kültürlerle uygundur [100]. Yapılan araştırmalar sonucu konakta karotenojenik enzimlerin özgülüğünün farklı olabileceği ve diğer heterolog enzimler ile kombinasyon halinde görünebileceği ve böylece *E. coli*'de yeni karotenoidler üretmenin mümkün olduğu gözlenmiştir. β -karoten öncelikle mikroalg, mantar, maya ve bunun yanı sıra bazı bakteri ve liken türleri tarafından üretilir. Ticari olarak temin edilebilen β -karoten, esas olarak *Dunaliella* cinsinden üretilir. 1980'den beri *Dunaliella* tozu ve ekstraktları İsrail, Çin, ABD, Avustralya ve Meksika'da mevcuttur [101]. *Dunaliella*'nın yanı sıra, *Blakeslea trispora*'nın (+) ve (-) suşlarının çiftleşmesiyle elde edilen verim kimyasal işlemeden elde edilen verimden daha yüksektir. Lutein doğal ticari kaynağı marigold yapraklarıdır. Siyanobakterilerde ve bazı fotosentetik olmayan bakterilerde bulunan zeaksantin mikrobiyal kaynakları arasında *Flavobacterium* ve *Microcystis aeruginosa* bulunur.

2.3. Likopen

2.3.1. Likopenin Yapısı ve Özellikleri

Likopen, hayvanlar ve insanlar tarafından sentezlenmeyen, bitki ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenen doğal bir pigmenttir. Likopen, 11 konjuge ve 2 konjuge çift bağ içeren yüksek oranda doymamış bir hidrokarbondur. Bir polien olarak, ışık, termal enerji ve kimyasal reaksiyonlarla indüklenen cis-trans izomerizasyona uğrar [102]. Likopen, insan serumunda bulunan birincil karotenoiddir. Bu sayede çok büyük ilgi görmüştür. Domates, karpuz, pembe greyfurt, pembe guava ve kuşburnu yüksek likopen içeren sebze ve meyvelerdir [103].

Likopen rengini konjuge karbon çift bağına borçludur. Her bir çift bağ, elektronların daha yüksek enerji durumlarına geçişi için gereken enerjiyi azaltır ve böylece molekülün giderek daha uzun dalga boylarındaki görünür ışığı emmesini sağlar. Likopen görünür spektrumun çoğunu emer, dolayısıyla kırmızı görünür. Ayrıca fotosentez sırasında ışığı emme özelliğine sahip olan likopen bitkileri foto duyarlılığa karşı korumaktadır. Likopen okside edilirse (örneğin, ağartıcılarla veya asitlerle reaksiyona girerek), karbon atomları arasındaki çift bağlar kırılacak ve molekülü her biri bir oksijen atomuna çift bağlanan daha küçük moleküllere ayıracaktır [104]. Tekli oksijen ve çeşitli radikal katyonları ile reaksiyona girer ve tüm karotenoidlerin en yüksek TEAC değerine sahiptir. Likopenin yapısı Şekil 2.8’de gösterilmiştir [105].



Moleküler Ağırlığı: 536.89

Moleküler Formülü: C₄₀H₅₆

Kesin Kütle: 536

Moleküler Bileşimi: C % 89.49, H % 10.51

Şekil 2.8. Likopenin kimyasal özelliği [105]

Likopen bitkisel yağda az miktarda çözünen ve suda ise hiç çözünemeyen lipofilik bir karotenoiddir [106]. Isı, ışık, belirli kimyasal reaksiyon, pro-oksidan gibi farklı

faktörlerden etkilenir. Saf likopen standardının termal stabilitesi: 60 dakikalık süre sonunda 100 °C’de, 20 dakika sonra 125 °C ve 10 dakikadan kısa bir süre sonra 150 °C’de likopenin % 50’si bozulmaktadır. Likopen, insan serumunda bulunan birincil karotenoiddir ve bu nedenle insan vücudunda daha önemli rolleri vardır. İnsan sağlığı üzerindeki yararlı etkisi nedeniyle, örneğin, kanser ve tümör önleme, kardiyovasküler koruma, antiproliferatif ve antioksidan aktivitelerinden ötürü dikkat çekmektedir [107]. Likopen emilimi konsantrasyon, matriks, genetik ve diğer moleküller ile konjugasyon gibi çeşitli faktörlere bağlıdır [108]. Likopenin biyolojik özellikleri nedeniyle alternatif biyoteknolojik daha yüksek ve daha kararlı bir likopen üretmek için metodolojiler geliştirilmiştir. Bazı mantarlar, mayalar, algler ve mühendislik bakterileri içeren mikroorganizmaların kullanımı örnek gösterilebilir. Likopenin erime sıcaklığı 172-175°C olup uzun, kırmızı, iğne yapılı kristal formundadır. Kloroform, hekzan, benzen, karbondisülfür, aseton, petrol eterde çözünür; su, etanol, metanolde çözünmez. Işık, oksijen, yüksek sıcaklık, asitlere karşı duyarlı olmasına karşın bazı metal iyonları da, Cu^{2+} , Fe^{3+} gibi, likopen oksidasyonunu katalizlerler.

Likopen, provitamin-A aktivitesi yoktur çünkü β -iyonin halka yapısına sahip değildir. Reaktif oksijen türleri (ROS), serbest radikal üretme potansiyeline sahip olan oksijen içeren moleküllerdir. ROS’un aşırı üretimi ile oksidatif strese neden olmaktadır. Bu da hem kanser hem de kardiyovasküler hastalığa zemin hazırlamaktadır. Likopen güçlü bir antioksidan moleküldür ve özellikle ROS singlet oksijeni süpürmede etkilidir. Karotenoidlerden likopen *in vitro*da en etkili tekli oksijen tutucudur. Buda karotenoidlerin potansiyel sağlık yararları için bir mekanizma olarak önerilmiştir [109]. Son zamanlarda, bu antioksidan mekanizma, vücuttaki düşük konsantrasyonlu likopenin E vitamini gibi diğer antioksidan moleküllere verilmesi sorgulanmıştır. Bu, sağlık yararlarının, likopen veya oksidatif metabolitlerin gen ekspresyonu üzerindeki etkisinden kaynaklanabileceği yönünde spekülasyonlara yol açmıştır [110].

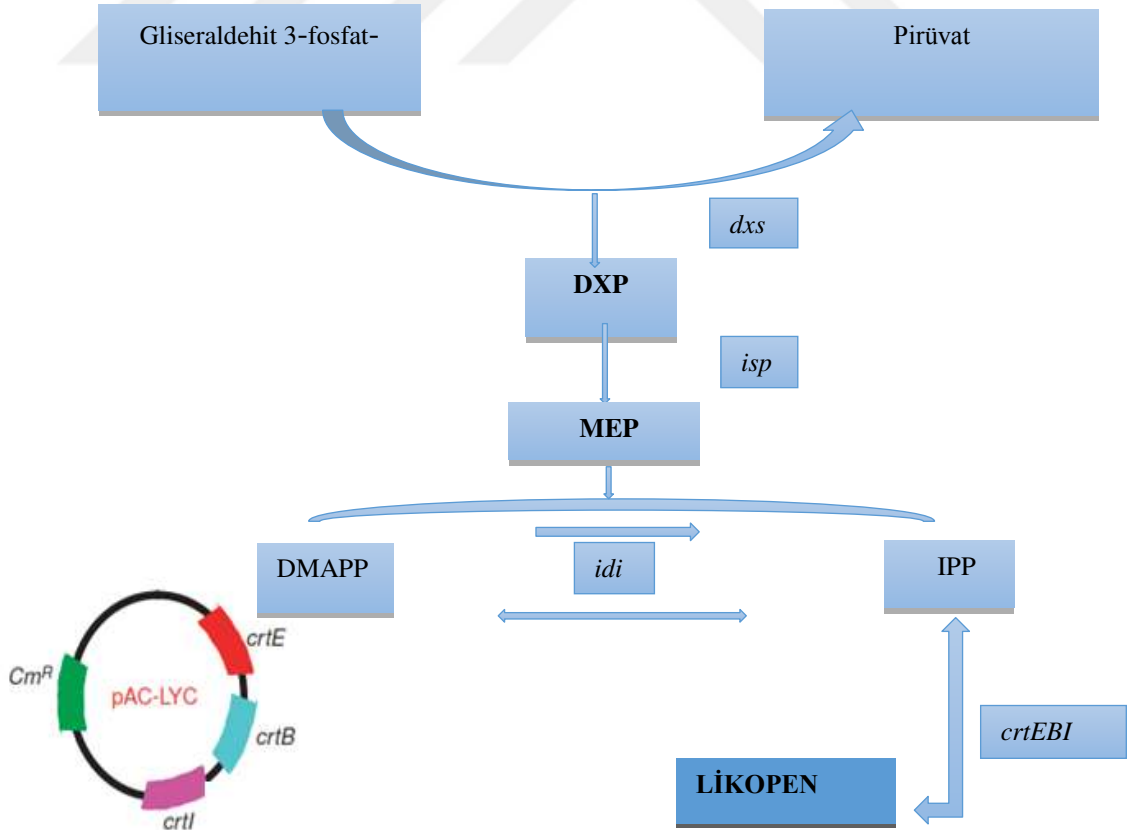
Likopen açık zincirli doymamış karotenoid olup, oksijene karşı daha reaktiftir. Dengesizliğine rağmen, likopen, fonksiyonel gıdalar, yemler, nutrasötikler, farmasötikler ve kozmetikte bir katkı maddesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [111]. Likopenin toplam kaybı; ısıtmanın sıcaklığına ve matrisin ısınma yöntemine, ayrıca oksijen veya ışığın varlığına bağlı olarak değişebilir. Bununla birlikte, kapsülleme, nano-kapsülleme ve stabilizeyi teşvik eden diğer teknikler geliştirilebilir.

2.3.2. Likopenin Biyosentezi

Likopenin mikrobiyal biyosentezinde, isoprenoid öncüleri izopentenil difosfat (IPP) ve dimetilasilil difosfat (DMAPP)'tır. *İn vivo* izoprenoid öncüllerinin biyosentezi iki yolla gerçekleşir. Bunlar mevalonat (MEP) ve 2-C-metil-d-eritritol 4-fosfat (MVA) yolağıdır. İki doğal likopen biyosentez yolağından MEP yolağı esas olarak prokaryotik hücrelerde bulunur ve MVA yolağı bilinen tüm ökaryotik hücrelerde bulunur. Bu iki yolağın da, bir dizi enzim asetil-CoA, piruvat, gliseraldehit 3-fosfatın (G3P), IPP ve DMAPP'ye dönüşümünü katalize eder.

Geranil difosfat (GPP) ve farnesil pirofosfat (FPP), IPP ve DMAPP'nin yoğunlaştırılması yoluyla sentezlenir, daha sonra FPP, GGPP sentaz, fitoen sentaz ve fitoen desatülat tarafından dönüştürülür, sırasıyla *crtE*, *crtB* ve *crtI* genleri eklenerek likopen sentezi gerçekleşmektedir. Likopenin biyosentezi şematik olarak Şekil 2.9'da gösterilmektedir.

Kromozom tabanlı genler



Şekil 2.9. Likopenin biyosentezi [92]

2.3.3. Likopenin Doğal ve Sentetik Üretimi

Likopen, belirli meyve, sebze, alg ve mantarlarda doğal olarak oluşan kırmızı bir pigmenttir. Karotenoidler olarak bilinen büyük bir pigment grubuna aittir, bununla birlikte provitamin A aktivitesi yoktur. Domates ve domates bazlı ürünler, doğal likopenin başlıca kaynaklarıdır. Diğer önemli doğal likopen kaynakları arasında karpuz, pembe greyfurt, pembe guava, papaya ve kayısı bulunur [112]. Doğal likopen yüksek oranda yoğunlaşıp, % 50-60 oranında saflığa sahiptir, insan tüketiminde olduğu gibi kullanılamaz. Aslında, doğal likopen suda çözünmez, çok düşük biyoyararlanımı vardır. Havaya ve ışığa maruz kaldığında çok kararsızdır. Diyet takviyeleri, bitkisel yağlar, koruyucular ve diğer katkı maddeleri ile % 1-10'a kadar doğal likopen seyreltilerek elde edilir. Sentetik likopen, kırmızı ile koyu mor kristal toz halinde bulunur. Su, metanol ve etanol içinde neredeyse hiç çözünmez, ancak kloroform ve tetrahidrofuran içinde serbestçe çözünür. Likopen eter, hekzan ve bitkisel yağlarda az çözünür. Kloroformda % 1'lik bir likopen çözeltisi açık ve yoğun turuncu-kırmızı renklidir. Hekzan içindeki bir çözelti, yaklaşık olarak 470 nm'de bir maksimum emme gösterir.

Sentetik likopen, sentetik reaktiflerden başlayıp kimyasal çözücülerin kullanıldığı bir dizi reaksiyonun nihai ürünüdür ve gıdada kullanılan diğer karotenoidlerin sentezinde yaygın olarak kullanılan sentetik ara ürünlerden hazırlanmıştır [113]. Likopen oksijen ve ışığa maruz kaldığında kararsızdır. Yeterli stabiliteyi sağlamak için, sentetik likopen, ışığa dayanıklı kaplarda azot veya başka bir inert gaz altında depolanır.

Gıdada kullanılmak üzere tasarlanan ticari likopen preparatları, yenilebilir yağlarda veya suda dağılılabılır. Süspansiyon halinde formüle edilir ve antioksidanlar ile stabilize edilir. Likopen, insan kan plazmasında, 0.2-1 $\mu\text{mol litre}^{-1}$ arasında değişen seviyelerde ortaya çıkar. İnsan kan plazmasındaki mevcut likopenin izomerik bileşimi, baskın cis izomeri olan 5-cis-likopen ile cis izomerlerine doğru kaydırılır. Aşağıdaki Tablo 2.6'da kırmızı domates meyvelerinde, çeşitli domates ürünlerinde ve insan kan plazmasındaki likopen izomer bileşimini göstermektedir [114,115].

Tablo 2.6. Sentetik likopen izomer bileşimi (toplam likopen %'si olarak) [114, 115]

Numune	All-trans likopen	5-cis likopen	9-cis likopen	13,15-cis likopen	Diğer cis izomerleri likopen
İnsan kanı plazma	32 – 46	20 – 31	1 – 4	8 – 19	11 – 28
Sentetik likopen beslenme ürünleri	>70	<23	<1	<1	<3
Çiğ kırmızı domates	94 – 96	3 – 5	0 – 1	1	<1
Pişmiş domates bazlı gıdalar	35 – 96	4 – 27	<1– 14	<1 – 7	<1 – 22

Likopen ışık, ısı ve oksijene maruz kaldığında kararsızdır. Işık ve ısıya maruz kalma trans'dan cis konfigürasyonlarına izomerleştirmeyi tetikler. Likopenin cis-izomerleri all-trans-likopenden farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir [112]. Bu farklılıkların bazıları daha düşük erime noktaları, daha düşük özgül emilim ve maksimum emilimdeki bir kaymayı içerir. Likopen, birçok farklı oksidasyon ürününün oluşumuyla oksijene maruz kaldığında oksidasyona uğrayabilir. İzomerizasyon ve oksidasyonu önlemek için, sentetik likopen ışık geçirmez kaplarda inert gaz altında tutulur ve serin bir yerde saklanır.

Sentetik likopen suda çözünmez ve gıdada kullanılmadan önce çözülemez ürünler formüle edilir. Formüle edilmiş ürünler, yenebilir yağlar ve yağlar, emülsiyonlar ve proteinler veya karbonhidratlar gibi suda çözünür gıda bileşenlerini içeren suda dağılılabılır tozlar içindeki likopen çözeltileri veya süspansiyonlarını içerir. Likopen oksidasyonunu önlemek için, formüle edilmiş preparatlara antioksidanlar ilave edilir [116]. Likopen formülasyonları, sıkıca kapatılmış, ışık geçirmeyen ambalajlarda paketlenir. Sentetik likopen üretiminde yapılan çalışmalar sonucu toplam likopen oranı % 96'dan az olmaması ve all-trans likopen % 70'den az olmaması sonucuna varılmıştır. Bu limitler, gıdada kullanılan likopen miktarının buna eşdeğer olmasını sağlamayı amaçlamaktadır.

Sentetik likopen, gıda rengi ve gıda katkı maddesi olarak kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Likopenin kullanılacağı gıda kategorileri arasında fırınlanmış ürünler, kahvaltılık gevrekler, dondurulmuş sütü tatlılar dâhil süt ürünleri, süt ürünleri analogları, yayılır ürünler, şişelenmiş sular, karbonatlı içecekler, meyve ve sebze suları, soya içecekleri, şeker, çorbalar, salata sosları ve diğer yiyecekler ve içecekler. Likopenin kullanım seviyeleri amaçlanan işlevine bağlıdır. Genel olarak, likopen bir

gıda katkı maddesinden çok daha düşük seviyelerde kullanılır. Sentetik likopen ayrıca multi-vitamin ve multi-mineral tabletlerde kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Likopen kullanımları ve kullanım seviyeleri de Tablo 2.7’de verilmiştir [117].

Tablo 2.7 Sentetik likopen kullanımı ve kullanım seviyeleri [117]

Gıda	Kullanım seviyesi (mg/kg)
Aromalı süt ve sütü içecekler	30
Fermente sütü içecekler	30
Süt tozu	30
Soya sütleri	30
Yoğurt	20-40
Donmuş yoğurt	20-40
Margarin benzeri yağlar	20
Meyve aparatifleri	15
Sert Şeker	20-70
Hazır yem	30-130
Düzenli sıcak tahıllar	9-20
Krakerler ve gevrek ekmekler	60
Pastalar, kurabiyeler	30
Yumurta bazlı tatlılar	20
Çorbalar	30
Salata sosları	30
Domates bazlı soslar	30
Meyve suyu	4-20
Sebze suyu	4-20
Nektarlar	4-20
Enerji, spor ve izotonik içecekler	4-15
Gazlı içecekler	4-20
Meyveli aromalı içecekler	9-15
Tahıl ve enerji çubukları	40-80
Çay ve Hazır içecekler	3-15

2.3.4. Likopenin İnsanda Absorbsiyonu, Taşınımı ve Dağılımı

İnsanlarda, domates veya domates bazlı gıda ürünlerinin alınmasından sonra plazmada bulunan likopen seviyeleri önemli ölçüde artmaktadır. Vücuttaki likopenin çoğunluğu yağ dokusunda bulunur, kalan likopenin bir kısmı karaciğerde (% 17-23) ve diğer bir kısmı ise plazmada bulunmaktadır (% 5-% 6) [118]. Likopen, çok lipofilik bir moleküldür ve bu nedenle, bir gıdadan emilmek üzere çözülmesi gerekir. Yağda çözünen bir bileşik olarak, likopen, diyet yağı olarak benzer bir absorpsiyona sahiptir. Mide ve duodenumda likopen besin matriksinden ayrılacak ve daha sonra lipid fazında çözünmektedir [119]. Emilimden önce, lipid faz safra tuzları ve pankreatik lipazlarla reaksiyondan kaynaklanan damlacıklar oluşturmaktadır. Daha sonra duodenuma girmekte ve çok lamelli lipid veziküller olarak ortaya çıkmaktadır [120]. Son olarak,

lipid veziküller pasif difüzyon prosesi ile ince bağırsağa emilmektedir [119]. Ek olarak, *in vitro*  alışmalar, likopenin spesifik bir epitelyal transporterin katılımıyla bağırsak emilimine yardımcı olduğunu ileri sürmektedir [121, 122]. Likopen emilimini etkileyebilecek birçok faktör vardır. Sindirilebilen fraksiyon arttığında gıda matriksinden sindirim kanalına likopen salınımının derecesi düşmektedir [123]. Yüksek lifli diyetler, likopen alımını ve likopen adsorpsiyonunu azaltacak, böylece farklı diyet lifleri ile takviye edilen likopenin, plazmada % 40'dan fazla azalmasına neden olacaktır [124]. Likopenin bağırsakta biyolojik olarak kullanılabilirliği likopen salınımının ince bağırsakta % 40, kalın bağırsakta ise % 57 olduğu, fakat kalın bağırsakta emilen likopenin potansiyeli ihmal edilebilir. Ayrıca, cis izomerleri tüm trans-izomerlerden daha yüksek biyoyararlanıma sahiptir [125]. Gıda işleme, likopenin biyoyararlanımını etkilemekte ve dolayısıyla emilimi artıran faktörlerden biridir. Ayrıca, *in vitro*  alışmalarda, güneşte kurutulmuş domateslerin, taze ve konserve domateslerle karşılaştırıldığında, likopenin en yüksek biyoyararlanımını sağladığı gösterilmiştir [126]. Likopenin yağ ile birlikte yutulması da biyoyararlanımını artırmaya yardımcı olmaktadır [127]. Ayrıca likopenin biyoyararlanımı yaşın ilerlemesi ile azalmaktadır [128].

Bağırsak mukozası tarafından alındıktan sonra, likopen triasilgliserol açısından zengin şilomikron'a ayrılıp lenf transport sistemine salgılanacak ve son olarak da karaciğere aktarılacaktır [129]. Likopen, membran veya lipoproteinlerin lipofilik bölümlerinde birikmeye eğilimlidir [130]. Plazmada lipoproteinler ile taşınır ve dağılımı kimyasal yapısına bağlıdır. Hidrofobik bir bileşik olarak, lipoproteinlerin çekirdeği olan lipoproteinlerin lipofilik kısmında likopen bulunur [120], diğer polar karotenoidler ise lipoproteinlerin yüzeyinde bulunabilir. Bu nedenle, likopen çoğunlukla düşük yoğunluklu lipoproteinler tarafından taşınırken, diğer oksijenlenmiş karotenoidler hem düşük yoğunluklu hem de yüksek yoğunluklu lipoprotein ile taşınmaktadır [120].

Karaciğer, adrenal ve üreme dokularında diğer dokulardan on kat daha yüksek likopen konsantrasyonları bulunur. Konsantrasyonlar 0.2-21.4 nmol/g doku aralığında değişmektedir [131]. Likopen yoğunluğunun insan testislerinde en yüksek olduğu, ardından adrenal bez, karaciğer, prostat, meme, pankreas, cilt, kolon, yumurtalık, akciğer, mide, böbrek, yağ dokusu gelmektedir [132]. Ayrıca adipoz dokuda, dalakta ve adrenal dokuda yüksek likopen içeriği bulunmaktadır. Dışkı ve idrar yoluyla likopen atılımı da mevcuttur [133].

2.3.5. Likopenin Sağlıktaki Yeri

Likopen bitki ve hayvanlarda önemli rol oynayan kırmızı bir pigmenttir. İnsan sağlığında, likopen açısından zengin gıdaların tüketilmesinin dejeneratif hastalıkların önlenmesine yardımcı olabileceğini göstermektedir. Likopenin diğer aktif bileşiklerle etkileşimi, insan sağlığında optimal işlevini elde etmek için çok önemlidir.

Likopen, yağda çözünen kırmızı bir pigmenttir. β -karoten ve α - tokoferolün çok ötesine geçen önemli antioksidan aktivitesi nedeniyle özellikle ilgi çekicidir. Bu bakımdan, ciltte likopeninin UV ışık stresine β -karoten'den daha duyarlı olduğu bildirilmiştir.

Resveratrol ve DNA hasarını ve tümör oluşumunu azaltan kurkumine benzer şekilde, hipokolesterolemik ve kardiyoprotektif etkilerden, anti-inme ve anti-mutajenik aktiviteye ve dikkat çekici bir anti-kanser potansiyeline kadar değişen etkileyici bir sağlık yararı özelliklerine sahiptir [134]. Bunun yanı sıra, yüksek bir likopen serum seviyesi yaşa bağlı maküler dejenerasyon için daha düşük bir risk ile bağlantılı olabilir [135].

Sinyal yollarının ve likopen tarafından etkilenen hücre içi sinyal bileşenlerinin tanımlanması, bireysel kanserlerin önlenmesi ve tedavisi için yeni stratejilerin geliştirilmesi için son derece önemlidir. Son zamanlarda, endoprial [136], akciğer [136], kolon [134], prostat [135, 136] ve meme kanseri hücreleri [137-139] 'de, likopenin büyüme faktörü sinyalleme, hücre döngüsü ilerlemesi ve sinyalleme yollarının modülasyonu yoluyla hücre sağkalımı/apoptozu üzerindeki doğrudan etkileri bildirilmiştir. Bu biyolojik aktivitelerin likopen bakımından zengin bir diyet alan insanlarda fizyolojik olarak elde edilebilir yoğunlukta sergilendiği gösterilmiştir. Bu nedenle, likopen çeşitli kanserli hastalarda yararlı etkilere sahip olabilir ve prostat kanserli hastalarda bazı klinik yararları olan birkaç klinik çalışma yapılmıştır [140-141].

Epidemiyolojik ve klinik çalışmalardan elde edilen veriler, yüksek miktarda domates ürünü tüketimi ile düşük kanser riski arasında bir ilişki olduğunu ortaya koydu [136-138]. Likopen, özellikle gelişmiş ve agresif formlara karşı prostat kanserine karşı güçlü bir anti-kanser aktivitesi sergiler [137]. Bu, testislerde en yüksek likopen doku seviyesinin bulunabileceği gerçeğiyle açıklanabilir, bunu adrenals ve karaciğer izlemektedir [139]. Karotenoidler arasında, likopen özel bir öneme sahiptir, çünkü bu

sınıfın, bir besin takviyesi olarak uzun süreli kullanımı ile akciğer kanseri riski yüksek düzeyde kullanımı arasında bir ilişki bulunmadığı tek bileşiktir [142].

Yüksek lipofilik yapısı nedeniyle, likopen hücresel membranlar seviyesindeki maksimum antioksidan aktivitesi ve lipid bileşenleri ile etkileşime girer. Membranların lipid peroksidasyonundan korunması sayesinde tümör başlatılmasını önler. Birkaç çalışma, likopenin, azot dioksit kaynaklı lipid membranların oksidasyonunu ve daha sonra hücre ölümünü β -karotenden daha etkili bir şekilde önlediğini göstermiştir [143-145]. Likopenin kemopreventif etkileri temel olarak antioksidan aktivitesine dayanmakla birlikte, likopen, hücre döngüsü ilerlemesi ve sinyal iletim yollarının modülasyonu dâhil olmak üzere çeşitli hücresel işlemlere müdahale ederek karsinogenez oluşumunu önler [146]. Bu bakımdan, likopenin ammatoryum kademesini etkilediği bildirilmiştir. LNCaP prostat karsinom hücrelerinde, düşük likopen yoğunlukları sadece lipid oksidasyonunu etkilerken, daha yüksek yoğunluklar DNA hasarına neden olmuş ve G2/M fazındaki LNCaP hücrelerini tutuklamıştır [147]. Bu etki, yüksek likopen yoğunluklarının pro-oksidan aktivitesinden kaynaklanıyor olabilir [148, 149]. Kanser ve kardiyovasküler hastalıklar dâhil olmak üzere kronik hastalıklar, ölümün ana nedenleridir. Genetik faktörler ve yaş ile birlikte, yaşam tarzı ve diyet de önemli risk faktörleri olarak kabul edilir. Tüm kanserlerin yaklaşık % 50'si diyetle bağlanmıştır. Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif stres, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar ile ilgili son araştırmaların ana odaklarından biridir [150]. Reaktif oksijen türleri, düzenli metabolik aktivite, yaşam tarzı aktivitesi ve diyet yoluyla endojen olarak üretilen yüksek oranda reaktif oksidan moleküllerdir. Hücresel bileşenlerle reaksiyona girerek lipidler, proteinler ve DNA gibi kritik hücresel biyomoleküllerde oksidatif hasara neden olurlar [151]. Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerini inaktive eden ve bu nedenle oksidatif hasarı önemli ölçüde geciktiren veya önleyen koruyucu ajanlardır. Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidanlar insan hücrelerinde doğal olarak bulunur. Yakın zamanda likopenin antikanser özelliklerine olan ilgi, yalnızca sağlam bir bilimsel temele değil, aynı zamanda dünyanın dört bir yanından epidemiyolojik verilere de dayanmaktadır. Kanıt olarak, ABD Natl. Bilimler Akademisi Araştırma Konseyi (1989), NCI (1987) ve Dünya Kanser Araştırma Fonu, The American Inst. Kanser Araştırması için (1997), turunçgiller, baklagiller sebzeler, yeşil ve sarı sebzeler, meyve ve sebzelerin yüksek

olduğu meyve alımını artırmayı önerdi. A ve C vitaminleri kanser riskini azaltır. Benzer tavsiyeler UKDH (1999) ve WHO (1990) tarafından da yapılmıştır.

Likopen, yakın geçmişte çok fazla ilgi görmüştür, çünkü daha fazla kanıt önerilmeye devam edilmiştir. Kanser ve koroner kalp hastalığı gibi serbest radikal reaksiyonlardan etkilenen dejeneratif hastalıklara karşı koruma sağlayabildiği [152], likopenin, α -karoten veya β -karoten'den daha güçlü bir insan kanser hücresi proliferasyonunun inhibitörü olduğunu göstermiştir. Başka vaka-kontrol çalışması, yüksek miktarda taze domates alımı, sindirim sisteminin kanser riskine karşı koruyucu etkisine bağlanmıştır [153]. Yaşlı bir Amerikan populasyonunda yüksek bir domates alımı, benzer şekilde tüm bölgelerdeki kanserden ölüm oranlarında % 50'lik bir azalma ile ilişkilendirilmiştir [154]. Domates likopen ekstresi desteği, kolon kanseri hastalarında insülin benzeri büyüme faktörü-I düzeylerini azaltır. Epidemiyolojik çalışmalar, yüksek serum insülin benzeri büyüme faktörü-I seviyeleri ile artmış kolon ve diğer kanser türleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir [155]. Likopen; DNA, protein ve oksidatif hasara karşı güçlü bir koruyucu, hücre-hücre iletişiminin modülasyonu hücre çoğalmasının inhibisyonu ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı direnç sağlama gibi etkileri de bulunmaktadır. Aynı zamanda likopenin pıhtılaşma süresini arttırdığı ve böylelikle anti-enflamatuar ve antikoagülan aktiviteleri ile likopenin sağlığın destekleyici rollerini ortaya koymaktadır. Yapılan bir çalışmada, kolorektal adenomlu hastalarda, kolorektal kanserlerin çoğunun öncüsü olan bir polip türünün, polipsiz çalışma deneklerine kıyasla, likopen kan seviyelerinin % 35 daha düşük olduğunu ortaya koymuştur. Araştırmacılara göre bu farkın anlamlı olmadığı düşünülmesine rağmen β -karoten seviyeleri de % 25.5 daha düşük olma eğilimindeydi. Nihai çoklu lojistik regresyon analizlerinde, sadece plazmada düşük seviyelerde likopen ($70 \mu\text{g/l}$ 'den az) ve sigara içme, kolorektal adenom olasılığını arttırmıştır, ancak riskteki artış oldukça önemlidir, düşük likopen riski, % 230 kadar arttırırken, sigara içme % 302 arttırmakta olduğu görülmüştür [156].

Likopen sadece oksijensiz radikal türlerini temizlemekle kalmaz, peroksil radikalleri, hidrojen peroksit ve azot dioksit gibi reaktif oksijen türleriyle de etkileşime girer ve bu şekilde hücreleri oksidatif hasardan korurlar. İlginç bir şekilde, likopen azot dioksit için süpürme işleminde β -karotenden iki kat daha etkili olduğu bulunmuştur [157]. Likopenin, özellikle hücre içi iletişim ve modüller arası hücre içi sinyal yollarındaki değişiklikler ile ilgili diğer antikanser özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir [158]. Bunlar arasında hücreler arası boşluk bağlantılarında bir yukarı düzenleme, hücresel

farklılaşmada bir artış ve bazı düzenleyici proteinlerin fosforilasyonundaki değişiklikler bulunmaktadır [159]. Bununla birlikte, likopen, IGF tarafından indüklenen bir dizi tümör hücresi çizgisinin proliferasyonunun inhibe edilmesinde ve hayvan modellerinde hem kendiliğinden hem de kimyasal olarak indüklenen meme tümörlerinin oluşumunu azaltır [160, 161]. Özellikle prostat kanserinde, bir çalışma, a-tokoferol ile kombinasyon halinde, fizyolojik olarak likopen konsantrasyonlarının varlığında hücre çizgisi çoğalmasının inhibe edildiğini göstermiştir. Meme kanseri, kadınlar arasında en sık görülen malignite ve dünya çapında kanser ölümünün önde gelen nedenidir [162]. Meme kanseri, ER, progesteron reseptörü (PR) ve HER2 ekspresyonuna bağlı olarak farklı alt tiplere sınıflandırılmış heterojen bir hastalıktır. Meyve ve sebze alımının kanser [163, 164] ve ER negatif meme kanseri riskini azalttığı iyi bilinmektedir [165, 166]. Daha yakın zamanlarda yapılan geniş kapsamlı analizler, yüksek sebze tüketiminin ER negatif, ER pozitif meme kanseri riski ile ilişkilendirilebileceğini göstermektedir [167]. Likopen, meme kanseri riskini diğer karotenoidlerden ziyade daha belirgin bir şekilde azalttığı ve önemli olmamakla birlikte ER negatif, ER pozitif olmayan meme kanseri riskini azaltma eğiliminde olduğu gösterilmiştir [168]. Akciğer kanseri, dünya çapında kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir. Erken tanı ve standart tedavideki ilerlemelere rağmen, akciğer kanseri sıklıkla ileri bir aşamada teşhis edilir ve oldukça invaziv ve metastatik potansiyele bağlı olarak kötü bir prognoza sahiptir [169]. Bu nedenle, akciğer kanserinin önlenmesi son derece önemlidir. Likopen içeren fitokimyasallar, akciğer kanseri için olası kanseri önleyici bileşikler olarak kabul edilir. Likopenin büyüme inhibe edici etkileri, birkaç akciğer kanseri hücre hattında gösterilmiştir [170-172].

Likopenin, antioksidan, antienflamatuar, antiproliferatif ve apoptozis azaltıcı aktiviteler dâhil olmak üzere birçok mekanizma yoluyla insan kanserlerinin önlenmesine ve tedavisine katkıda bulunabileceği yapılan çeşitli araştırmalar sonucunda görülmüştür. Likopenin ayrıca antianjiyogenik, anti-invaziv ve antimetastatik aktiviteler gösterdiği de gösterilmiştir. En ölümcül kanserlerden biri olan pankreas kanseri o kadar hızlı ilerlemektedir ki, araştırmalara katılan hastalıkları olan bireyler, görüşmelerinin tamamlanmasından önce sıklıkla ölmektedir. Yapılan üç yıllık bir Kanada çalışmasında, pankreas kanseri olan 462 kişiden en çok likopen tüketen, erkeklerin pankreas kanseri risklerinde % 31 oranında azalma olduğunu göstermiştir [173]. Likopen kansere karşı korur: Kanser önleyici faz II enzimlerini aktive eder. Araştırmacılar, meme ve karaciğer

kanseri hücrelerini likopen ile inkübe ettiğinde Faz II detoksifikasyon enzimlerinin [NAD (P) H: kinon oksidoredüktaz (NQO1) ve glutamilsistein sentetaz (GCS)] 'nın üretimi ve aktivitesini tetiklediğini görmüşlerdir. Likopen, bu koruyucu enzimlerin üretimini ve aktivitesini, lusiferaz adı verilen raportör bir genin ekspresyonuna neden olarak daha sonra enzimleri kodlayan diğer genlerde "antioksidan tepki elemanı"nı aktive ederek, genlerin artan enzim üretimini yönlendirmelerini sağlayıp çoğalmasına neden olmuştur. Buna karşılık, β -karoten, astaksantin ve fitoen gibi diğer karotenoidler bu etkiye sahip değildir.

Likopen DNA ve düşük yoğunluklu lipoproteinlere oksidatif hasar ile pasif olarak müdahale ettiğinden koroner kalp hastalıkları riskini azaltmaktadır. Araştırmacılar, çeşitli kanser ile ters ilişkisine ek olarak, yüksek bir diyet likopen tüketiminin kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde rol oynayabileceğini öne sürmektedir. Her iki kardiyovasküler hastalığı olmayan orta yaşlı ve yaşlı kadınlar üzerinde yapılan yedi aydan daha fazla takipte, haftada 7-10 porsiyon likopen bakımından zengin gıdalar (domates, domates suyu, domates sosu ve pizza dahil domates bazlı ürünler) tüketenlerin haftada 1,5 porsiyondan az domates ürünü yiyen kadınlara kıyasla % 29 oranında daha düşük CVD riski olduğu bulunmuştur. Avrupa'da yapılan bu araştırmada, ham domateslerin çiğ ya da domates sosu ya da macun şeklinde haftada birkaç kez tüketmenin, kardiyovasküler sisteminizi korumanın lezzetli bir yolu olduğunu öne sürmektedir. Yine başka bir çalışmada, 12 sağlıklı kadından oluşan bir grup, 3 hafta süreyle günlük 8 mg likopen sağlayacak kadar domates ürünü yediğinde, LDL kolesterollerinin serbest radikal oksidasyona karşı daha az duyarlı olduğunu bildirmiştir. Bu,therosklerotik plak oluşumunda ilk adım ve kardiyovasküler hastalık için majör bir risk faktörüdür. Domates içerisinde yer alan lipofilik bileşikler, okside düşük yoğunluklu lipoproteinlerin aracılık ettiği vasküler endotelde aterojenik süreçleri modüle ederek kardiyovasküler hastalıkları önleyebilir [174].

Başka bir araştırmada, a-tokoferol veya domates lipofilik özleri ile birlikte likopenin endotel hücrelerinde açıl trombosit aktive edici faktör biyosentezini oksidatif stres sırasında arttırdığı araştırılmıştır. Likopen'in oksidatif strese karşı koruyucu etkileri, insan cildi UV ışığı ile aydınlatıldığında da gösterilmiştir. 12 haftalık bir başka çalışmada, günlük 8–16 mg likopen alımının, besinlerden veya takviyelerden alınması, UV ışınlarına maruz kalmanın ardından kızarıklık yoğunluğunun % 40-50 oranında azaltılmasına yardımcı olduğu görülmüştür [176].

Likopenin kandaki miktarının artışı ile kardiyovasküler hastalık riskinin azaldığı belirtilmektedir. Hücre kültürü ile yapılan çalışmalar ve hayvan modellemelerinden elde edilen sonuçlara göre de likopenin *in vitro* ve *in vivo*'da antikanserojenik ve damar sertliğini önleyici etkisinin bulunduğu, dejeneratif bozukluklarda da koruyucu etki yaptığı kanıtlanmıştır. Düzenli olarak düşük miktarda domates ürünleri tüketiminin hücreyi oksidan bileşiklerin neden olduğu DNA zararından koruduğu bilinmektedir [177]. Yapılan çalışmalarda gözlemlenen şudur: Likopen görmeye yardımcı katarakt oluşumunu geciktiren veya engelleyen maküler dejenerasyon riskinizi azaltabilir. Likopen, sinir ve doku hasarının neden olduğu bir tür ağrı olan nöropatik ağrının azaltılmasına yardımcı olabilir [178, 179]. Likopenin antioksidan özellikleri, Alzheimer gibi yaşa bağlı hastalıklarda ortaya çıkan nöbetleri ve hafıza kaybını önlemeye yardımcı olabilir ve beynimizi koruyabilir, kemiklere katkıda bulunabilir. Likopenin antioksidan etkisi kemik hücrelerinin ölümünü yavaşlatabilir, kemik yapısını güçlendirebilir ve kemiklerin sağlıklı ve güçlü kalmasına yardımcı olabilir [180-182].

2.3.6. Metabolik Mühendisliği Yaklaşımıyla Likopenin Mikrobiyal Biyosentezi

Metabolik mühendisliği yaklaşımıyla likopenin mikrobiyal biyosentezi ve bu yaklaşımının ürün verimine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Likopenin mikrobiyal üretimindeki amacımız; katma değeri yüksek bileşikler elde etmek, toksik organik çözücüler kullanılmadan insan tüketimi için uygun olan saf bir likopenin üretilmesi, büyük ölçüde saf bir likopen üretmek, ekonomik ve büyük bir ticari ölçekte gerçekleştirilmesi kolay olmasıdır.

Likopeni *Escherichia coli*'de heterolog olarak üretmek için karotenogenik bir bakteri olan *P. agglomerans* bakterisinin karotenoid yolağına ait *CrtE*, *CrtB*, *CrtI* ve *idi* genleri *E. coli* bakterisine aktarılmıştır ve likopenin üretilmesi hedeflenmiştir.

Karotenoidler bitki, fungus, alglerin yanı sıra bazı bakterilerde bulunan endüstriyel olarak önemli doğal pigmentlerdir. *E. coli* karoten üretmeyen bir bakteri olmakla birlikte likopen, beta-karoten, zeaksantin, astaksantin gibi çeşitli karotenoidleri üretmek için karotenogenik genlerin heterolog ekspresyonu için uygundur. Bu projede, izoprenoid yolağının öncü molekülü olan likopeni *E. coli*'de heterolog olarak üretmek için karotenogenik bir bakteri olan *Pantoea agglomerans* karotenoid biyosentetik yolak genleri olan *CrtE*, *CrtB*, *CrtI* ve *idi* genleri *E. coli* bakterisine aktarılmıştır. Karotenogenik *P.agglomerans* bakterisinin doğal karotenoid biyosentetik yolağın

endojenik olarak üretilmesi avantaj gibi görünse de GRAS (Generally Recognized as Safe) kategorisinde olmayan bu türe göre karotenogenik olmayan *E. coli*'nin büyüme hızı, genetik yatkınlığı, iyi anlaşılmış metabolizması, çeşitli substratlarda büyüme yeteneği, basit büyüme ortamı, metabolizmasının esnekliği, yüksek teorik verim özellikleri ve patojen olmayan suşunun kullanılacak olması karotenoid biyosentetik yolağın heterolog ekspresyonu için avantaj sağlamaktadır.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan bakteri suşları ve plazmidleri

Bu tez çalışmasında kullanılan suşlar Fırat Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Sentetik Biyoloji ve Metabolik Mühendisliği Laboratuvarı arşivinden temin edilmiştir. Kullanılan suşlar Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan suşlar ve genotipleri [183-185]

Suş Adı	Suşun Genotipi	Suşun Özelliği
<i>E. coli</i> NEB 10-beta	$\Delta(ara-leu)$ 7697 $araD139$ $fhuA$ $\Delta lacX74$ $galK16$ $galE15$ $e14-\phi80dlacZ\Delta M15$ $recA1$ $relA1$ $endA1$ $nupG$ $rpsL$ (<i>StrR</i>) rph $spoT1$ $\Delta(mrrhsdRMS-mcrBC)$	Elektrokompetent hücre olarak transformasyon deneylerinde kullanılmaktadır. DH10B suşunun bir türevidir. Büyük plazmidlerin ve BAC plazmidlerin transformasyonu için uygundur. T1 faja dirençlilik taşımaktadır.
<i>E. coli</i> MG1655	$F-\lambda-$ $ilvG-$ $rfb-50$ $rph-1$	Mutasyon etkisi çok az olan ve hızlı büyüme özelliğine sahiptir. Galaktoz ve laktoz metabolizması arasında gen ekspresyonunun belirgin bir şekilde düzenler. Genom çapında ekspresyon çalışmalarında kullanılmaktadır.
<i>E. coli</i> DH5 α	$F-$ $endA1$ $glnV44$ $thi-1$ $recA1$ $relA1$ $gyrA96$ $deoR$ $nupG$ $\Phi80dlacZ\Delta M15$ $\Delta(lacZYA-argF)U169$, $hsdR17(rK- mK+)$, $\lambda-$	Patojen değildir ve laboratuvar klonlama kullanımı için geliştirilmiştir. Bu suş, D. Hanahan tarafından, yüksek verimli transformasyonlar sağlayan çoklu mutasyonlara sahip bir klonlama suşu olarak geliştirilmiştir. Bu suş ayrıca plazmidler içerir ve son derece iyi plazmid yerleştirme kabiliyetine sahiptir.
<i>E. coli</i> DH5 α -Pro	$deoR$, $endA1$, $gyrA96$, $hsdR17(rK- mK+)$, $recA1$, $relA1$, $supE44$, $thi-1$, $\Delta(lacZYA-argFV)U169$, $\phi80lacZ\Delta M15$, $F-\lambda-$, $PN25/tetR$, $Placiq/placI$, SpR	Bir LacR ve TetR baskılayıcı üreticisidir. Rekombinantlar antibiyotik taraması için kullanılmaktadır.
<i>E. coli</i> DH5 α - Turbo	$glnV44$ $thi-1$ $\Delta(lac-proAB)$ $galE15$ $galK16$ $R(zgb$ $210::Tn10)TetS$ $endA1$ $fhuA2$ $\Delta(mcrB-hsdSM)5,(rK-mK-)$ $F'[traD36 proAB+ lacIq lacZ\Delta M15]$	Çok benzer genotipe ve çok hızlı büyümeye dayanan TG1 türevidir ve T1 faj dayanıklıdır.
<i>E. coli</i> XL1-Blue	$endA1$ $gyrA96$ ($nal R$) $thi-1$ $recA1$ $relA1$ lac $glnV44$ $F'[:$ $TN10 proAB + lacI q \Delta(lacZ) M15]$ $hsdR17$ ($rK- mK +$)	Lambda faj enfeksiyonunda, amplifikasyonunda, ekspresyonda kullanılır. Nalidiksik asit dayanıklı tetrasiklin dirençlidir (F plazmidinde taşınan).
<i>E. coli</i> TOP10	$F-mcrA$ $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ $nupG$ $recA1$ $araD139$ $\Delta(ara-leu)7697$ $galE15$ $galK16$ $rpsL(StrR)$ $endA1$ $\lambda-$	Transformasyon verimi sağlar. Plazmid DNA ve yüksek verimli klonlanması ve plazmid yayılması için idealdir. Çok sayıda kopya plazmidin kararlı bir şekilde çoğaltılmasını sağlar.

Tablo 3.1. 'in devamı

<i>E. coli</i> <i>EPI300</i>	<i>F</i> – λ – <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ (<i>lac</i>) <i>X74 recA1 endA1 araD139</i> Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (<i>StrR</i>) <i>nupG' trfA dhfr</i>	Elektrokompetent hücre olarak kullanılmaktadır. Streptomisin antibiyotigine karşı dirençli olması; arabinoz, galaktoz ve laktoz ile indüklenme yapılabilir ve losin oksotroftur.
<i>E. coli</i> <i>BL21</i> (<i>DE3</i>)	<i>F</i> – <i>ompT gal dcm lon hsdSB(rB–mB–)</i> λ (<i>DE3[lacI lacUV5 T7p07 ind1 sam7 nin5]</i>) [<i>malB+</i>] <i>K-12</i> (λ <i>S</i>)	Yüksek mRNA stabilitesini ve protein verimini destekleyen bir genotip içerir. Düşük kopya sayısı, T7 promotor tabanlı plazmidler ile kullanım için optimize edilmiştir.

pAC-EHER plazmidi (Katalog No. 53262) Addgene'den bakteri içerisinde agar stab halinde ticari olarak alınıp gen kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu plazmid *Erwinia herbicola* (*P. agglomerans*) Eho10'in (Genbank: M87280.1) karotenoid yolak kümesine ait *crtE*, *idi*, *crtI*, *crtB* genlerini endojen promotor altında içeren 9.34 kb BglII-BglII genomik fragmanın pPL376 plazmidinden kesilmesiyle ve ileri yönde oryantasyonu ile pACYC184'ün BamHI bölgesine eklenmesiyle oluşturulmuştur. Bu plazmid likopen üretimini sağlamak ve kloramfenikol antibiyotigine direnç geni (CmR) ve p15A replikasyon orijini taşımaktadır [186].

3.1.2. Besiyerleri

LB Broth Besiyeri

Luria-Bertani (LB), bakterileri kültürlemek için yaygın olarak kullanılan, besin açısından zengin bir besiyeridir. İlk olarak 1951 yılında Giuseppe Bertani tarafından açıklanan 1 litrelik bir ortam, 10 gram tripton, 5 gram maya özütü ve 10 gram sodyum klorürden oluşur. LB besiyeri, plazmid saflaştırmasında ve protein ekspresyonunda kullanılmak üzere rekombinant *E. coli*'nin büyümesi için moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılır. Kullanım kolaylığı için, ticari LB tozu ve sıvı formülasyonlar mevcuttur, zaten karıştırılmıştır ve kullanıma hazırdır [187].

İstenen bir hacimde besiyeri için gerekli miktarlarda bileşenler tartılır, dH₂O ile istenen hacme tamamlanır ve otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilizasyonu gerçekleştirilir.

LB Agar Besiyeri

LB agar besiyeri, katı formda olup besinsel olarak zengindir. LB broth besiyerinden farklı olarak LB agar besiyerinin içeriğine agar girmektedir ve agardan dolayı katılaşmaktadır [188].

Trypton	10 g/l
Maya ekstraktı	5 g/l
Sodyum klorür	10 g/l
Agar	15 g/l

İstenen bir hacimde besiyeri için gerekli miktarlarda bileşenler tartılır, dH₂O ile istenen hacme tamamlanır ve otoklavda 121 °C’de 15 dk sterilizasyonu gerçekleştirilir.

NaCl İçermeyen LB Broth

Trypton	10 g/l
Maya ekstraktı	5 g/l

İstenen bir hacimde besiyeri için gerekli miktarlarda bileşenler tartılır, dH₂O ile istenen hacme tamamlanır ve otoklavda 121 °C’de 15 dk. sterilizasyonu gerçekleştirilir.

LB Broth+Cm₂₅ ve LB Agar+Cm₂₅

Bu çalışmada kloramfenikol (Cm) antibiyotiğine karşı dirençlilik sağlayan plazmidler kullanıldı ve bu nedenle besiyerlerinde Cm seçici antibiyotik olarak kullanılmıştır. 34 mg/ml stok solüsyonu için toz formdaki kloramfenikol (Sigma, C0378) gerekli miktarda tartılmıştır, ethanol ile istenen hacme tamamlanarak hazırlanmıştır ve besiyerinde 25 µg/ml çalışma yoğunluğunda kullanılmıştır.

SOB Besiyeri

SOB (süper optimized broth) medyum, genel olarak transformasyon deneyinde kompetent *E. coli* hücrelerin büyütmesi için kullanılan zengin bir besiyeridir [189]. SOB medyum, hazır bir karışım olarak satın alınmaktadır. Bu karışım 1 litre için 20 g tripton, 5 g maya ekstraktı, 0,5 g NaCl, 0,186 g KCl, 2,4 g MgSO₄ içermektedir. 1 L dH₂O içerisinde çözdürülüp, 121 °C derecede 15 dk boyunca otoklavlanır.

SOC Besiyeri (SOB+ Glukoz)

SOC besi yeri, hücrelerin elektroşoktan sonra toparlanmalarını (recovery) ve ilk büyüme aşamalarında antibiyotik dirençlik geni üretmelerini sağlayan zengin bir besi yeridir. SOC besi yeri, SOB yerine glukozun eklenmesi halidir. 1 litre SOB besiyerine 20 ml steril % 20 glukoz çözeltisi eklenerek SOC besiyeri hazırlanmıştır [186].

TB Besiyeri (Terrific Broth)

Bakteri yetiştiriciliği için kullanılan oldukça zenginleştirilmiş bir ortamdır. Bileşenleri;

1.2 %	tripton 12 g/l
2.4 %	maya ekstraktı 24 g/l
0.5 %	gliserol 5 g/l

Çözünmüş tripton, maya ekstraktı ve gliserol, 900 ml'lik bir nihai hacme kadar su içinde çözülür ve 121 °C'de 15 dakika boyunca otoklavlanır. 10X TB tuzları eklemenden önce oda sıcaklığına soğumaya bırakılır. Daha sonra 10X TB tuzundan 100 ml kadar eklenir.

10X TB salts	0.17 M	KH ₂ PO ₄	23.1 g/l
	0.72 M	K ₂ HPO ₄	125.4 g/l

23.1 g KH₂PO₄ ve 125.4 g K₂HPO₄'ü 1 l'lik bir nihai hacme kadar suda çözülür ve 121 °C'de 15 dakika boyunca otoklavlanır.

2XYT Besiyeri

Escherichia coli'nin rekombinant suşlarının yetiştirilmesinde kullanılır. Mükemmel bir büyüme ortamıdır. Suyu, büyümesi için besin açısından zengin bir ortamdır. Tripton ve maya özütleri gibi bileşenler bu ortam içinde fazla miktarlarda bulunur. *Escherichia coli*, bu ortamda, hücrenin büyüme ve gelişme sırasında ihtiyaç duyduğu ilave amino asitler, nükleotit öncüleri, vitaminler ve diğer temel metabolitler nedeniyle gelişecektir. Sodyum klorür besiyerinde bulunur ve çoğalan bakteriler için uygun bir ozmotik ortam sağlar. Bileşenleri;

- Tripton = 16 g/l
- Maya ekstraktı = 10 g/l
- Sodyum klorür = 5 g/l

Çözünmüş tripton, maya ekstraktı ve sodyum klorür, 1 l'lik bir nihai hacme kadar su içinde çözülür ve 121 °C'de 15 dakika boyunca otoklavlanır.

3.1.3. Solüsyonlar ve Çözeltiler

% 10'luk gliserol çözeltisi: 10 ml gliserol üzerine 90 ml dH₂O eklenmiştir, otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

% 20'lik glukoz çözeltisi: 20 g glukoz (Wisent, 600-035-EG) 100 ml dH₂O'da çözündürülmüştür, 0.22 µm selülöz asetat membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir ve +4 °C'de saklanmıştır.

1xTAE çözeltisi: 50x TAE çözeltisi (Fischer, BP13324) dH₂O ile 1:49 oranında seyreltilerek 1xTAE çözeltisi hazırlanmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Plazmid DNA'sının İzolasyonu

Plazmid taşıyan bakteri öze yardımıyla LB Agar +Cm₂₅ besiyerine ekilmiştir ve 37 °C'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. 16 saatlik inkübasyon sonrasında katı besiyerinden steril bir kürdan yardımıyla seçilen bir koloni 5 ml LB Broth+Cm₂₅ sıvı besiyerine ekilmiştir ve 37 °C-225 rpm'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. 16 saatlik inkübasyondan alınan sıvı kültürden plazmid DNA'sı izolasyonu Qiagen QIAprep Spin Mini Prep kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir [190].

3.2.2. Restriksiyon Endonükleazları ile Plazmid DNA'sının Kesilmesi

Ticari olarak satın alınan plazmidin EcoRI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu yapılmıştır. Reaksiyon şartları:

pAC-EHER DNA	X µl
10X CutSmart Tamponu	2,5 µl (Enzim ile birlikte verilmiştir.)
EcoRI-HF	1 µl (20000 u/ml)
HindIII-HF	1 µl (20000 u/ml)

pAC-EHER DNA'sına ait X miktarı reaksiyonda 700 ng olacak şekilde eklenerek reaksiyon karışımı hazırlanmıştır ve reaksiyon thermal cycler cihazında 37 °C'de 1 saat inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir.

Gibson reaksiyonu ile inşaa edilen plazmidin SalI restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonları yapılmıştır. Reaksiyon şartları:

Plazmid DNA'sı	X µl
----------------	------

10X CutSmart Tamponu 2,5 µl (Enzim ile birlikte verilmiştir.)

SalI-HF 1 µl (20000 u/ml)

Gibson reaksiyonu ile inşa edilen dört örneğe ait plazmid DNA'sının X miktarı reaksiyonda 500 ng olacak şekilde eklenerek reaksiyon karışımları hazırlanmıştır ve reaksiyonlar thermal cycler cihazında 37 °C'de 1 saat inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforez, görselleştirme ve saflaştırma için DNA'yı boyuta göre ayıran bir analiz yöntemidir. Agaroz jel elektroforezi kullanarak DNA'yı ayırmak için, DNA jelde önceden oyulmuş oyuklara yüklenir ve bir akım uygulanır. DNA ve RNA molekülünün fosfat omurgası negatif olarak yüklenmiştir, bu nedenle bir elektrik alana yerleştirildiğinde, DNA fragmanları pozitif yüklü anotlara taşınır. Çünkü DNA düzgün bir kütle/yük oranına sahiptir. Bir DNA molekülünün jelden geçiş hızını; DNA molekülünün büyüklüğü, agaroz yoğunluğu, DNA uygunluğu etidyum bromür varlığı, agaroz türü ve elektroforez tamponu etkilemektedir. Elektroforezde, elektriksel bir alan ile daha kısa DNA parçaları jelden daha uzun olanlardan daha hızlı bir şekilde geçer. Böylece, bir DNA parçasının yaklaşık uzunluğunu, bir DNA merdiveni boyunca bir agaroz jeli üzerinde çalıştırarak anlayabiliriz [189].

Çalışmada,% 1 yoğunluğunda agaroz jel hazırlanmaktadır. % 1 agaroz içeren 1xTAE çözeltisi kaynatıldıktan sonra, oda sıcaklığında soğuması için biraz bekletilmektedir. Çözelti, yaklaşık 55-65 °C dereceye geldikten sonra, son yoğunluk 0.5 µg/ml olacak şekilde EtBr eklenmektedir. Etidyum Bromür, jelin UV ışığın altında görüntülenmesini sağlamaktadır. Hazırlanan jel tepsiye dökülmüştür ve tepsideki jelin katılaşması beklenmiştir ve jel katılaştıktan sonra tarak kuyuların yapısını bozmamaya dikkat edilerek yavaşça çıkarılmıştır. Hazırlanan jel örneklerin yüklenmesi için elektroforez tankına alınmıştır ve jelin üzerini kapatacak kadar 1xTAE tampon çözeltisi tanka eklenmiştir. DNA örnekleri kuyuya yüklenmeden önce elektroforez tankında hareketin ilerleyişini gözlemlemeyi sağlayan boya maddesi ve DNA'nın kuyuya çökmesini sağlayan yoğun madde içeren 6X Loading Dye ile karıştırılmıştır, örnekler ve Hibrigen 1 kb DNA Marker ladder kuyulara yüklenmiştir. Elektoroforez işlemi 70 volt altında 2 saat olacak gerçekleştirilmiştir. Jelin görüntüsü Sygene GBox sistemi ve Genesys programı kullanılarak alınmıştır [189].

3.2.4. Gibson Assembly Metodu

Gibson Assembly, parça uzunluğu veya uç uyumluluğundan bağımsız olarak birden fazla DNA parçasının başarılı bir şekilde birleştirilmesine izin verir. Verimi yüksek olan bir klonlama metodudur. İlk olarak 2008 yılında Daniel Gibson ve meslektaşları tarafından yayınlanmış olup hem basit hem de karmaşık yapılar oluşturmaya yönelik yenilikçi bir yaklaşımdır. Kullanımı kolay olduğundan *in vitro* montaj yöntemlerinin en yaygın kullanılanı haline gelmiştir.

Gibson Assembly, uygun DNA'lar ve üç enzimin uygun bir karışımı (Gibson Assembly Master Mix) gerekmektedir. T5 enzimi, 5' ucunun kesimi ile uçların açılmasını sağlamaktadır ve dolayısıyla yapışkan uçları oluşturmaktadır. Ortamda dNTPler mevcut olduğundan, baz eşleştirmesi yer almaktadır ve Phusion DNA Polimeraz enzimi ile yeni oluşan plazmidin boşlukları doldurulmaktadır. Son olarak, Taq Ligaz enzimi plazmiddeki boşlukları kapatmaktadır.

Gibson Master mix için gerekli olanlar:

- 320 µl 5X ISO tamponu
- 0.64 µl 10 U/µl T5 ekzonukleaz
- 20 µl 2 U/µl Phusion polimeraz
- 160 µl 40 U/µl Taq ligaz
- 1.2 ml'ye tamamlamak için nukleaz-free dH₂O

15 µl'ye bölünür ve -20 °C'de bir yıl kadar saklanabilmektedir.

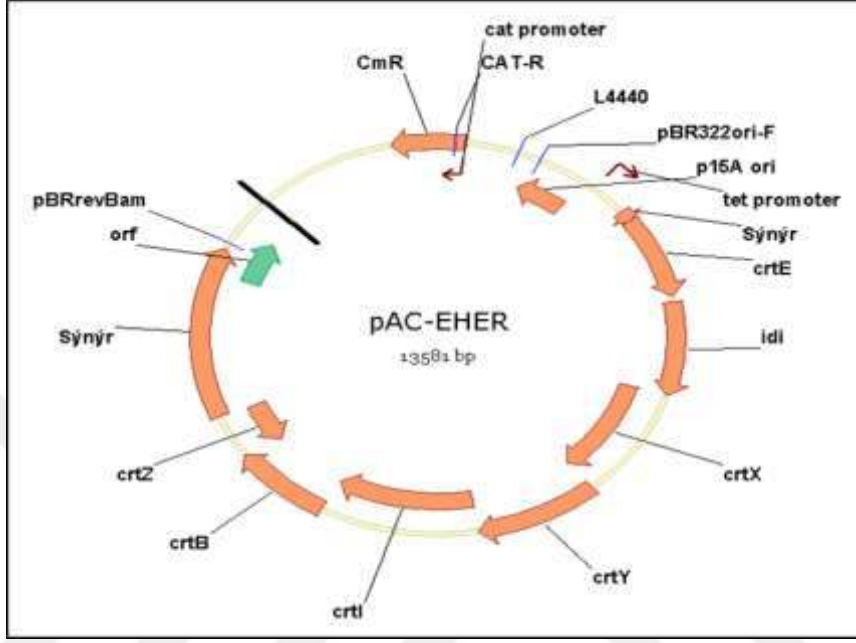
ISO tamponu hazırlamak için:

- 3 ml 1 M Tris-HCl (pH 7.5)
- 60 µl 100 mM dGTP
- 150 µl 2 M MgCl₂
- 60 µl 100 mM dATP
- 60 µl 100 mM dTTP
- 60 µl 100 mM dCTP
- 300 µl 1 M DTT
- 1.5 g PEG-8000
- 300 µl 100 mM NAD

6 ml'ye tamamlamak için nukleaz-free dH₂O eklenir.

3.2.5. Plazmid Haritalarının Tasarlanması

pAC-EHER plazmid DNA'sının dizi bilgisine Addgene'den ulaşıp elde edilmiştir [191].



Şekil 3.1. pAC-EHER plazmidinin haritası [191]

3.2.6. Elektrokompotent Hücrelerin Hazırlanması

Kompetent hücre satın alınabilir veya laboratuvar ortamında da kolayca hazırlanabilir. Öncelikle konak olarak kullanılacak suş LB agar besiyerine öze ile çizilerek ekimi yapılmıştır ve 37 °C'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. 16 saatlik inkübasyon sonrası LB agar besiyerinden seçilen tek koloni steril bir kürdan yardımıyla 5 ml LB Broth besiyerine ekilmiştir ve 37 °C-225 rpm'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sıvı kültürden 500 µl alınarak daha önceden hazırlanan 100 ml NaCl içermeyen LB Broth besiyerine inoküle edilmiştir ve değer 0,35-0,4 aralığına ulaşana kadar 37 °C-225 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı kültür beklenen aralığına ulaştığında ise steril 50 ml'lik falkona alınmıştır ve falkon 20-25 dk buz içerisinde bekletilmiştir ve bundan sonraki aşamalarda santrifüj dışındaki işlemler buz içerisinde gerçekleştirilmiştir. Kompetent hücreleri hazırlama sürecinde, bütün malzemeler buzda gömülü olmalıdır. Buzdan alınan falkonlar 0 °C-4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir, süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelet 40 ml steril ve soğuk dH₂O'da çözülür. Tekrardan

4000 rpm’de 10 dk boyunca santrifüjlenir. Süpernatant atılır ve pelet 20 ml steril ve soğuk dH₂O’da çözülür. Tekrardan 4000 rpm’de 10 dk boyunca santrifüjlenir. Süpernatant atılır ve pelet 10 ml steril % 10 gliserol solüsyonunda çözülür. Çözöldükten sonra, 10 dk boyunca 4000 rpm’de santrifüjlenir. Süpernatant atılır ve pelet, % 10 gliserol solüsyonunda 300 µl olacak şekilde çözölür. Hazır olan elektrokompotent hücreleri, Eppendorf tüplerine 100 µl olacak şekilde yerleştirilir. Kompetent hücreler, - 80 °C dolabında saklanmalıdır [192].

3.2.7. PCR Ürünlerinin AgaroZ Jelden Saflaştırılması

Elektroforez işlemi sonrasında UV transüliminatörde görüntölen jelden beklenen büyüklükteki DNA bantları bistüri ile kesilerek daha önceden ağırlığı tartılan 2 ml’lik mikrosantrifüj tüpü içërisine alınmıştır ve QIAquick Gel Extraction Kit kullanılarak saflaştırılmıştır [193].

3.2.8. Transformasyon

Transformasyon öncesi, elektroporasyon ile plazmid DNA’sı veya Gibson Assembly reaksiyonu ürünü, 100 µl kompetent hücre ve elektroporator küveti buzda gömölü olmalı ve mikrosantrifüj tüpte bulunan 930 µl SOC besiyeri ve steril cam tüpü 37 °C derecede 10 dk kadar bekletilmelidir.

Gibson ürünü veya plazmid DNA’sını 100 µl kompetent hücrelere eklenmektedir. Hafifçe karıştırılmaktadır ve elektroporator küvetine eklenmektedir. Küvet, elektroporator cihazına yerleştirilir ve 1.8 kV altında hücrelere çok kısa bir şok uygulanır. Şok verildikten sonra küvet hemen çıkarılır ve hazır olarak bekletilen 900 µl SOC besi yeri beklemezsizin eklenir. Küvetin, birkaç kez ters düz çevrilmesiyle, SOC besiyerin ve hücrelerin karışması sağlanmaktadır. Karışım hemen kültür tüpüne eklenmektedir ve 1 saat kadar 37 °C derecesinde inkübasyona bırakılmaktadır.

İnkübasyon sonrası, hazırlanan iki tane LB agar + uygun antibiyotik içëren petri kutusu çıkarılır. Bir tane petriye 100 µl kültür ortasına damlatılıp drigalski spatölü yardımı ile yayılır. Kalan kültür ise, bir eppendorf tüpüne alınır ve 5000 rpm’de 3 dk boyunca santrifüjlenir. Süpernatant, peletin üstünde 100 µl kalacak şekilde atılmaktadır ve pelet hafifçe çözdürölüp ikinci petriye ekimi yapılır. Burdaki amaç hücrelerin konsantrasyonu yüksek olan bir karışım elde etmektir. Petri kutuları, 37 °C derecelik

etüvde 16 saatlik inkübasyona bırakılmaktadır. Daha sonra 16 saatlik inkübasyon sonrası petride koloni görülürse transformasyonun gerçekleştiği anlaşılmaktadır. Tek kolonilerden alınıp seçici antibiyotik içeren 5 ml LB Broth besiyerine ekilmiştir ve 37 °C-200 rpm’de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyondan alınan kültürlerin stok kültürleri hazırlanmıştır.

3.2.9. Stok Kültürlerin Hazırlanması

Daha önce otoklavda 121 °C-15 dk steril edilmiş % 100 gliserolden 700 µl alınarak steril mikrosantrifüj tüpüne bırakılmıştır ve üzerine 300 µl bakteri kültürü eklenmiştir. Kültür ve gliserolün karışması için mikrosantrifüj tüpü vortekslenmiştir. Hazırlanan stok kültürler -80 °C’de saklanmıştır.

3.2.10. pAC-EHER-EBlidi Taşıyan *E. coli* Suşlarından Likopen Ekstraksiyonu İçin Başlangıç Kültürlerinin Hazırlanması

Stok kültürlerden steril öze yardımıyla 10 ml sıvı besiyerine ekimler yapılmıştır, 37 °C’de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra bu kültürlerin OD600 ölçümleri yapılmıştır. 50 ml’de OD=0,1 olacak şekilde gerekli miktarda besiyerleri ve inokülasyon hacimleri hesaplanmıştır:

$$OD600.X=0,1.V$$

X=Kültürden alınması gereken hacim

V=Toplam son hacim

250 ml’lik erlenlerde hazırlanan ve seçici antibiyotik içeren 50 ml OD 0,1 başlangıç kültürleri 30 °C-200 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. Belirlenen zaman aralıklarında alınan örneklerde OD ölçümü ve ekstraksiyon işlemi yapılmıştır.

3.2.11. pAC-EHER-EBlidi Taşıyan *E. coli* Suşlarından Likopen Ekstraksiyonu

1 ml sıvı kültür ependorfa alınır. 14,000 rpm’de 1 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant atılır ve 1 ml distile su ile pelet çözündükten sonra tekrar 14,000 rpm’de 1 dk santrifüj yapılır. Aynı işlemler tekrar edildikten sonra ve 1 ml asetonda süspanse edilip, 50 °C’lik su banyosunda 10 dk tutulur. Daha sonra 12,000 rpm’de 10 dk soğutmalı santrifüjde santrifüjlendikten sonra süpernatant yeni tüpe alınır ve likopen

miktarı tayini gerçekleştirilir. Likopen ışığa duyarlı bir karotenoid olduğu için işlemler az ışıklı-karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

3.2.12. pAC-EHER-EBİdi Taşıyan *E. coli* Suşlarından Ekstrakte Edilen Likopenin HPLC ile Analizi

Likopen ekstraksiyonu sonucu elde edilen numuneler 0.45 µm PTFE (politetrafloroetilen) filtreden (Isolab, 094.01.002) geçirilmiştir, vorteks cihazı ile karıştırıldıktan sonra HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Analizler Tablo 3.2’de verilen şartlarda gerçekleştirilmiştir. Numuneler -20 °C’de saklanmıştır. Numunelerdeki likopen tayini, standart olarak kullanılan likopen maddesinin alıkonma süresi ve yoğunluklarına bağlı olarak elde edilen standart eğriden faydalanılarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.2. Likopen analizi için HPLC çalışma şartları

Marka	Shimadzu
Dedektör	PDA
Kolon	InertSustain C18 (5 µm, 4.6x150 mm)
Kolon Fırını	CTO-10AS
Mobil Faz	Asetonitril-metanol (65:35 v/v)
Dalga Boyu	470 nm
Akış Hızı	1 ml/dk
Kolon Sıcaklığı	30°C
Akış Süresi	40 dk
Enjeksiyon Hacmi	20 µl

Standart Maddenin Hazırlanması

Likopenin HPLC ile tanımlanması için likopen standartı kullanılmıştır. 10 mg likopen standardı 500 ppm olacak şekilde kloroformla çözündürülmüştür daha sonra kloroform uçurulup ve gerekli miktarlarda aseton ile çözündürülmüştür. 1-10 ppm aralığında ara standart çözeltileri hazırlanmıştır ve HPLC cihazında ölçümleri yapılarak kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır.

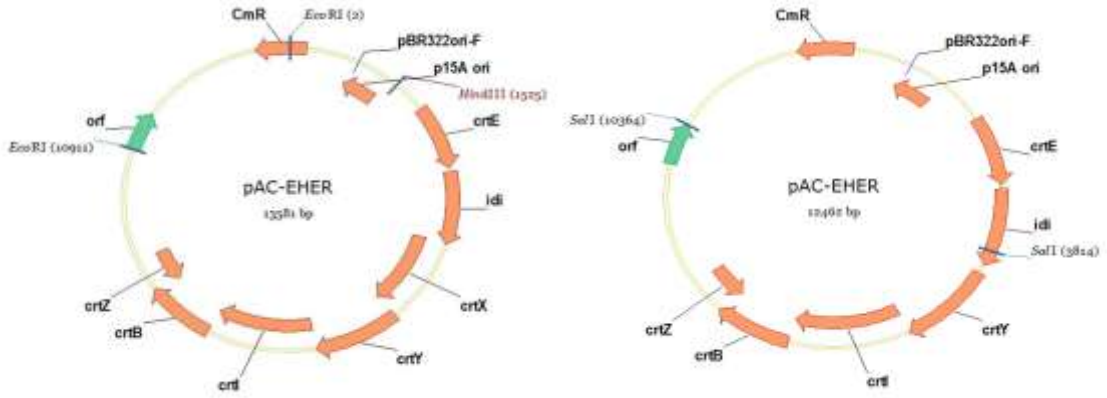
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada *P. agglomerans* bakterisinin karotenoid yolak genlerini taşıyan pAC-EHER plazmidi kullanılarak *E. coli*'de likopen biyosentezi için gerekli genleri taşıyan pAC-EHER-EBIidi plazmidi Gibson assembly metodu ile başarılı bir şekilde inşa edilmiştir. İnşa edilen plazmid elektrokompotent hücreleri hazırlanan farklı *E. coli* suşlarına (*E. coli* XL1-Blue, *E. coli* DH5 α , *E. coli* DH5 α -Pro, *E. coli* NEB 10-beta, *E. coli* MG1655, *E. coli* DH5 α -Turbo, *E. coli* TOP10, *E. coli* EPI300, *E. coli* DE3) elektroporasyonla aktarılmıştır. Bu suşlardaki likopen üretiminin incelenmesi için her suşun başlangıç OD'si 0,1 olan 50 ml'lik kültürleri hazırlanmıştır ve 30 °C'de ve 200 rpm'de 96 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyon süresinde her 24 saatte bir kültürlerden 1 ml numune çekilerek asetonla likopen ekstraksiyonu metodu uygulanmıştır ve HPLC ile ekstraksiyon ürünlerinin analizi gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda *E. coli* EPI300 72. saatte $1,189 \pm 0,040305$ mg/l, *E. coli* NEB-Turbo suşunda 72. saatte $1,168 \pm 0,073539$ mg/l, *E. coli* DH5 α -Turbo suşunda 72. saatte $1,002 \pm 0,25173$ mg/l ve *E. coli* TOP10 suşunda 72.saatte $0,918 \pm 0,018385$ mg/l likopen maksimum üretimleri bulunmuştur. Bu suşlardan pAC-EHER-EBIidi içeren *E. coli* MG1655, *E. coli* DE3, *E. coli* XL1-Blue suşlarında daha yüksek miktarda likopen üretimi gözlenirken *E. coli* DH5 α , *E. coli* DH5 α -Pro suşlarında daha düşük miktarda üretim olduğu bulunmuştur.

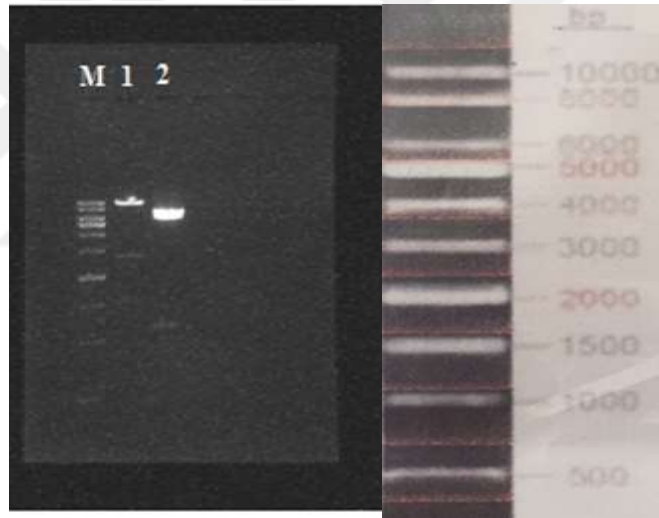
4.1. pAC-EHER Plazmid DNA'sının Restriksiyon Endonükleazları ile Doğrulanması

Ticari olarak satın alınan pAC-EHER plazmidi 25 μ g/ml kloramfenikol içeren LB agar katı besiyerine ekilir ve 37 °C'de 16 saat inkübasyona bırakılır. Katı besiyerinden seçilen tek kolonilerden bir tanesi steril bir kürdan yardımıyla 25 μ g/ml kloramfenikol içeren LB Broth sıvı besiyerine ekilir, 37 °C, 225 rpm'de 16 saat inkübe edilir. Sıvı kültürden plazmid DNA'sı, Qiagen QIAprep® Spin Mini Prep kit kullanılarak 50 ng/ μ l konsantrasyonda izole edilmiştir. New England Biolabs (NEB) firmasından ticari olarak satın alınan EcoRI ve HindIII restriksiyon enzimleri, 13581 bp uzunluğundaki plazmid DNA'sını 9386, 2672, 1523 bp uzunluğunda üç fragmente ayırır. SaII enzimi plazmidi 6566, 5912, 1103 bp uzunluğunda üç fragmente ayırır (Şekil 4.1). Enzimatik kesim

reaksiyonunu agaroz jel elektroforez ile kontrol edilir. Elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



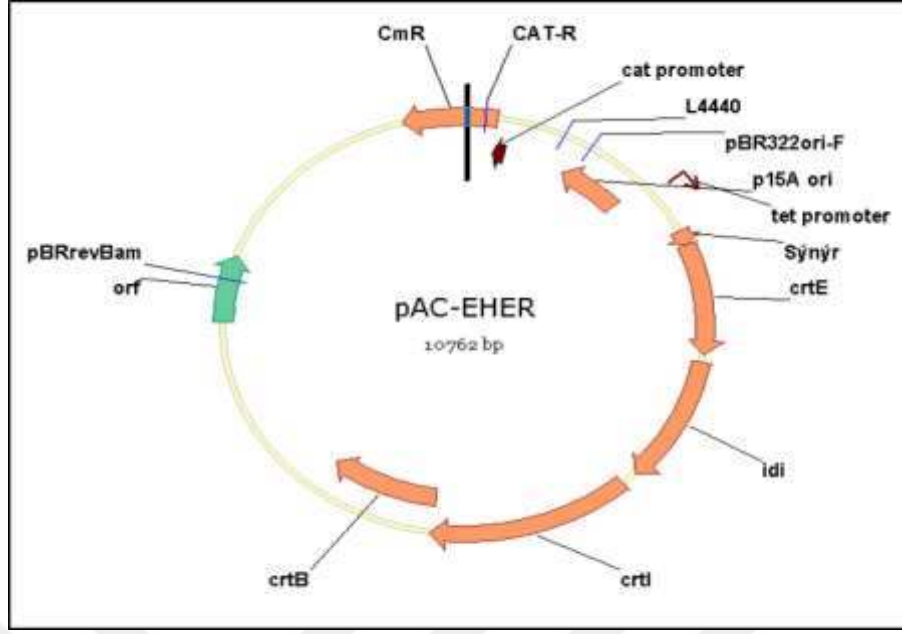
Şekil 4.1. pAC-EHER plazmidinin haritası ve EcoRI, HindIII ve SalI enzimlerinin kesim bölgeleri



Şekil 4.2. pAC-EHER plazmidinin enzimatik doğrulamasına ait agaroz jel görüntüsü(1)EcoRI ve HindIII enzimleriyle kesim sonrası elde edilen bantlar 9386, 2672, 1523 (2) SalI enzimiyle kesim sonrası elde edilen bantlar 6566, 5912, 1103 (M: Marker: HibriGen 1 kb ladder)

4.2. pAC-EHER-EBIidi Plazmidinin İnşası

Plazmidlere ait haritaların tasarlanması Vector NTI programı ile gerçekleştirilmiştir. pAC-EHER-EBIidi plazmidinin Vector NTI ile tasarlanan haritası Şekil 4.3’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. pAC-EHER-EBIdi plazmidinin Vector NTI ile tasarlanan haritası

Plazmid inşaları Gibson Assembly metodu kullanılarak gerçekleştirileceği için primer tasarımları metoda uygun olarak yapılmıştır. Primerler ticari olarak sentezletilmiştir. Plazmid inşalarında kullanılacak olan primer dizileri, bağlanma sıcaklıkları, uzunlukları ve çoğaltması beklenen fragment uzunlukları Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Plazmid inşalarında kullanılacak olan primer dizileri, bağlanma sıcaklıkları, uzunlukları, çoğaltması beklenen fragment uzunlukları

Primer	Primer Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı	Baz Uzunluğu
1001-1	atgtgcgggatacgccatgaatgagacgtgcatcagcgtctgg	71.3	44
1001-2	cgcctggcagaggagacgccgggtgcttactatattgatc	69.1	40
1001-3	gatcaatatagtaagcaccggcgtctcctctgccagcg	69.1	40
1001-4	acgctgatgcagcgtctcattcatggcgtatcccgacatagcg	71.3	44
1001-5	atgtgcgggatacgccatgattacgggtcggtctctctctt	71.5	44
1001-6	aggctctggcctgataccgatctaagggacgctgccaagacc	71.5	45
1001-7	ctttggcagcgtccggttagatcggtatcaggccagcgtctg	71.5	46
1001-8	gagagagccgaccggcgtaatcatggcgtatcccgacatagc	71.2	43

- pAC-EHER Plazmidinden 2566 Bp Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu

pAC-EHER plazmid DNA'sı ve 1001-5, 1001-6 primerleri kullanılarak 2566 bp'lik bölgenin amplifikasyonu için PCR yapıldı. PCR şartları:

dH₂O: 33 µl

5xHF Buffer: 10 µl

dNTPs: 1 µl

1001-5 Forward Primer: 2,5 µl

1001- 6 Reverse Primer: 2,5 µl

pAC-EHER DNA: 0,5 µl

DNA Polimeraz: 0,5 µl

Toplam Hacim: 50 µl

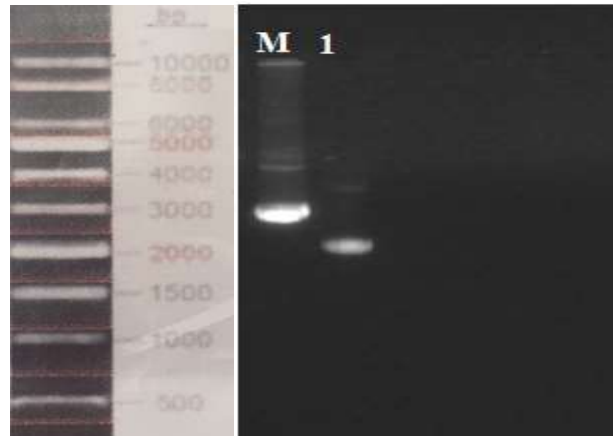
Thermocycler Döngü Şartları:

Başlangıç Denatürasyonu: 98 °C-30 sn

Denatürasyon, Bağlanma ve Uzama: 98 °C-10 sn, 70 °C- 25 sn, 72 °C-1 dk (30 Döngü),

Final Uzama: 72 °C-2 dk

PCR ürünü % 1'lik agaroz jelde yürütüldü. Elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. pAC-EHER plazmid DNA'sından 1001-5 ve 1001-6 primerleri ile 2566 bp bölgenin PCR ürününün agaroz jeldeki görüntüsü (1), (M:Marker: Hibrigen 1 kb ladder)

- **pAC-EHER Plazmidinden 6547 Bp Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu**

pAC-EHER plazmid DNA'sı ve 1001-3, 1001-8 primerleri kullanılarak 6547 bp'lik bölgenin amplifikasyonu için PCR yapıldı. PCR şartları:

dH₂O: 33 µl

5xHF Buffer: 10 µl

dNTPs: 1 µl

1001-3 Forward Primer: 2,5 µl

1001-8 Reverse Primer: 2,5 µl

pAC-EHER DNA: 0,5 µl

DNA Polimeraz: 0,5 µl

Toplam Hacim: 50 µl

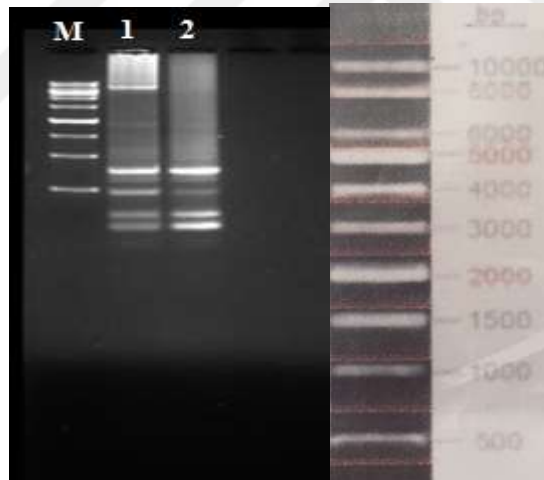
Thermocycler Döngü Şartları:

Başlangıç Denatürasyonu: 98 °C-30 sn

Denatürasyon, Bağlanma ve Uzama: 98 °C-10 sn, 68 °C- 20 sn (35 Döngü), 72 °C-130 sn

Final Uzama: 72 °C-5 dk

PCR ürünü % 1'lik agaroz jelde yürütüldü. Elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.5'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. pAC-EHER plazmid DNA'sından 1001-3 ve 1001-8 primerleri ile 6547 bp bölgenin PCR ürününün agaroz jeldeki görüntüsü (1,2), (M:Marker: Hibrişen 1 kb ladder)

- **pAC-EHER Plazmidinden 1771 Bp Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu**

pAC-EHER plazmid DNA'sı ile (50 ng/µl) ve 1001-2, 1001-7 primerleri kullanılarak 1771 bp'lik *crtEidi* genlerini içeren bölgenin amplifikasyonu için PCR yapıldı. PCR şartları:

dH₂O: 6.6 µl

5xHF Buffer: 2 µl

dNTPs: 0.2 µl
1001-2 Forward Primer: 0,5 µl
1001-7 Reverse Primer: 0,5 µl
pAC-EHER DNA: 0,1 µl
DNA Polimeraz: 0,1 µl
Toplam Hacim: 10 µl

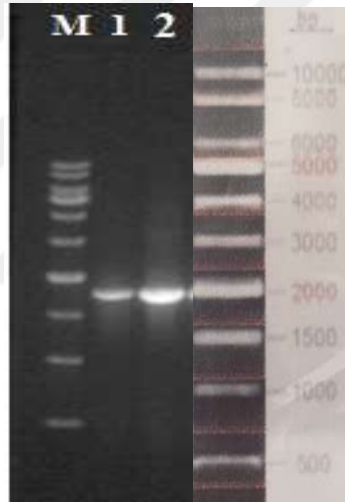
Thermocycler Döngü Şartları:

Başlangıç Denatürasyonu: 98 °C-30 sn

Denatürasyon, Bağlanma ve Uzama: 98 °C-10 sn, 70 °C-20 sn, 72 °C- 40 sn (35 Döngü)

Final Uzama: 72 °C-3 dk

PCR ürünü % 1'lik agaroz jelde yürütüldü. Elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. pAC-EHER plazmid DNA'sından 1001-2 ve 1001-7 primerleri ile 1771 bp bölgenin PCR ürününün agaroz jeldeki görüntüsü (1), (M:Marker: Hibriden 1 kb ladder)

4.2.1. pAC-EHER-EBIidi Plazmidinin Gibson Reaksiyonu ile İnşası

pAC-EHER plazmidi ile 6547 bp, 2566 bp ve 1771 bp için üçer tüp PCR reaksiyonu belirtilen şartlarda kurulmuştur. 6547 bp PCR ürünü DpnI enzimi ile 37 °C'de 1 saat muamele edilmiştir. PCR ürünleri % 1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra jelden saflaştırılarak fragmentler elde edilmiştir.

2566 bp jel saflaştırma konsantrasyonu: 298,559 ng/µl

6547 bp jel saflaştırma konsantrasyonu: 146,603 ng/µl

1771 bp jel saflaştırma konsantrasyonu: 54,874ng/µl

Gibson Reaksiyonu Şartları:

2566 bp 0,5 µl
6547 bp 3,5 µl
1771 bp 1 µl
Gibson mix 15 µl
Toplam Hacim: 20 µl

Thermocycler Şartları:

50 °C-1 Saat

12 °C- ∞

Gibson reaksiyonu ürününün *E. coli* NEB bakterisine transformasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.7). LBA+Cm₂₅ besiyerine ekilen transformasyon ürünü 37 °C-16 saat inkübasyona bırakılmıştır.

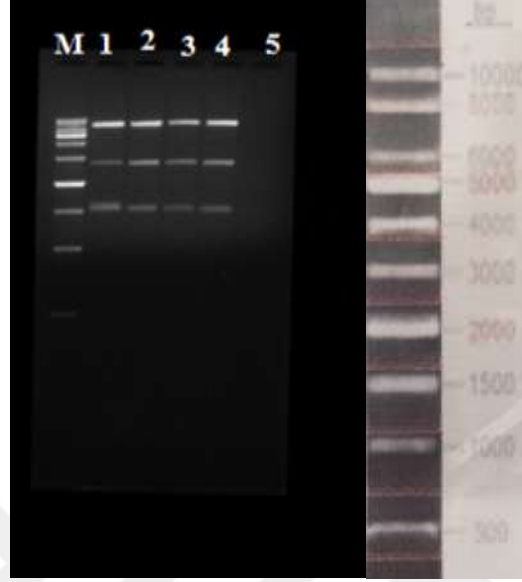


Şekil 4.7. Gibson reaksiyonu ürününün *E. coli* NEB bakterisine transformasyonu

4.2.2. pAC-EHER-EBIidi Plazmidinin Enzimatik Doğrulaması

Gibson transformasyonuna ait petrilerden fenotipik olarak sarı renkli kolonilerden dört adet seçilerek Cm₂₅içeren LB besiyerine ekilmiştir ve 37 °C-16 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan alınan kolonilerin miniprep ile plazmid DNA'sı izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA'ların HindIII ve EcoRI enzimi ile kesim reaksiyonu gerçekleştirilmiştir HindIII ve EcoRI enzimi plazmidi 6567, 2672, 1523 bp

uzunluğunda üç fragmente ayırır. Enzimatik kesim reaksiyonunu agaroz jel elektroforez ile kontrol edilir. Elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. pAC-EHER-EBI plazmidinin HindIII ve EcoRI kesim sonrası elde edilen bantlar. Beklenen bant büyüklükleri: 6567, 2672, 1523 bp. (M:Marker: Hibrigen 1 kb ladder MG-LDR-1000).

Seçilen dört koloni ile HindIII ve EcoRI kesim sonucu beklenen fragmentleri verdiğiinden stok alınmıştır. Gibson inşasında enzimatik doğrulama sonucunda pozitif kolonilerin fenotipik görüntülenmesi Şekil 4.9’da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Gibson inşasında enzimatik doğrulama sonucunda pozitif kolonilerin fenotipik görüntülenmesi

4.3. pAC-EHER-EBIidi Plazmidi Taşıyan *E. coli* Suşlarında Likopen Üretiminin İncelenmesi

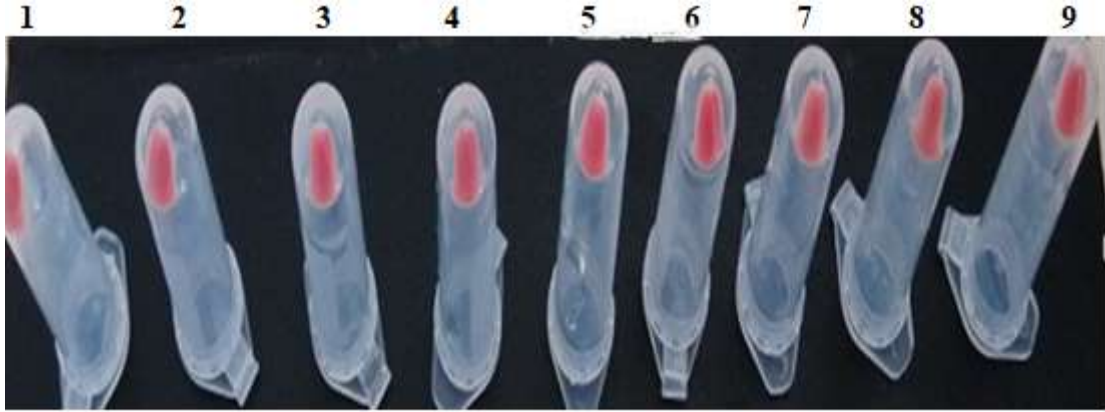
Kolonilerden jelde 2. kuyuda doğrulanan plazmid DNA kaynağı seçilerek elektrokompotent hücreleri hazırlanan farklı *E. coli* suşlarına (*E. coli* NEB 10-beta, *E. coli* MG1655, *E. coli* DH5 α , *E. coli* DH5 α -Pro, *E. coli* NEB-Turbo, *E. coli* XL1-Blue, *E. coli* TOP10, *E. coli* EPI300, *E. coli* DE3) elektroporasyon ile transformasyonu gerçekleştirilmiştir ve likopen üretiminin incelenmesi için seçici antibiyotik içeren 50 ml LB başlangıç kültürleri 250 ml'lik erlenlerde hazırlanarak 30 °C-200 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır.

4.3.1. Başlangıç Kültürlerinin Kurulması

Başlangıç kültürlerinin kurulması için pAC-EHER-EBIidi plazmidi içeren *E. coli* suşlarına (*E. coli* MG1655, *E. coli* NEB 10-beta, *E. coli* DH5 α , *E. coli* DH5 α -Pro, *E. coli* NEB-Turbo, *E. coli* XL1-Blue, *E. coli* TOP10, *E. coli* EPI300, *E. coli* DE3) ait stok kültürlerden öze yardımıyla seçici antibiyotik içeren 10 ml sıvı besiyerine ekimler yapılmıştır, 37 °C-200 rpm'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan alınan kültürlerin OD600 ölçümleri yapılmıştır. 50 ml'de OD 0,1 olacak şekilde besiyerlerine inokülasyonlar yapılmıştır. 30 °C-200 rpm'de 96 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondaki kültürlerle ait pellet görüntüsü Şekil 4.11'de verilmiştir. Likopen üreten *E. coli* kolonilerinin petri görüntüsü Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Likopen üreten *E. coli* kolonilerinin petri görüntüsü



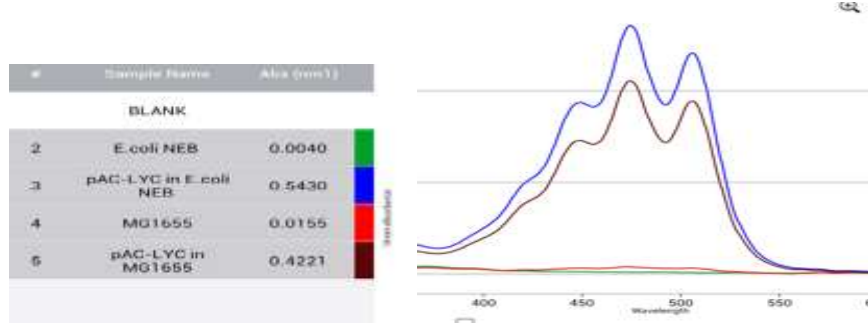
Şekil 4.11. pAC-EHER-EBIldi plazmidi içeren *E. coli* suşlarına (1-*E. coli* MG1655, 2-*E. coli* NEB 10-beta, 3-*E. coli* DH5α, 4-*E. coli* DH5α-Pro, 5-*E. coli* NEB-Turbo, 6-*E. coli* XL1-Blue, 7-*E. coli* TOP10, 8-*E. coli* EPI300, 9-*E. coli* DE3) ait hücre pelleti görüntüleri

4.3.2. pAC-EHER-EBIldi Taşıyan *E. coli* Suşlarından Ekstrakte Edilen Likopenin Spektrofotometrik Analiz ve HPLC ile Ölçümleri

Karotenoidlere renk veren ve karotenoidlerin tanımlanması, miktar tayinleri için işlev gören görünür bölge ışık emici kromoforunu sağlayan konjuge çift bağ sistemidir. Likopen aseton çözütüsünde 470 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon göstermektedir. Şekil 4.12’de pAC-EHER-EBIldi içeren ve içermeyen *E. coli* MG1655 suşlarının 48 saatlik sıvı kültürlerinden alınan 1 ml kültürün likopen ekstraksiyonu için santrifüj edilmesiyle elde edilen hücre pelletlerinin görüntüsü verilmiştir ve bu pelletlerden ekstrakte edilen bu numunelerin Denovix-DS-11 FX+ ile 470 nm’de yapılan spektrofotometrik ölçümü Şekil 4.13’te verilmiştir, şekilde maksimum pik 474 nm civarında görülmektedir.



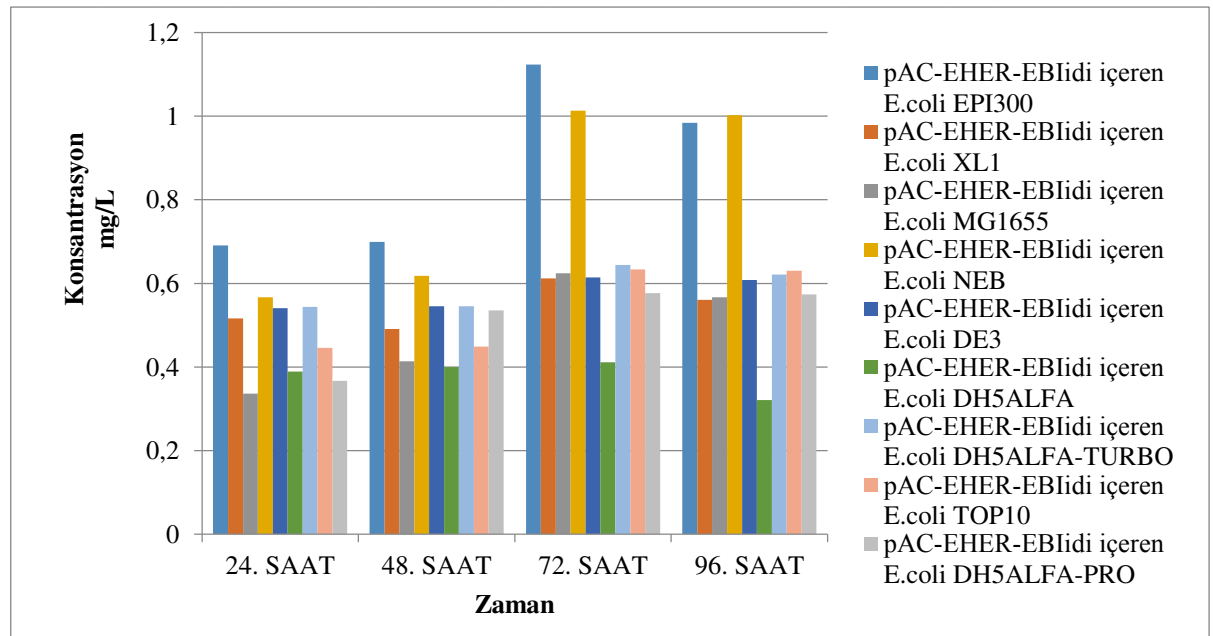
Şekil 4.12. pAC-EHER-EBIldi içermeyen ve içeren *E. coli* MG1655 kültürlerine ait pelletler



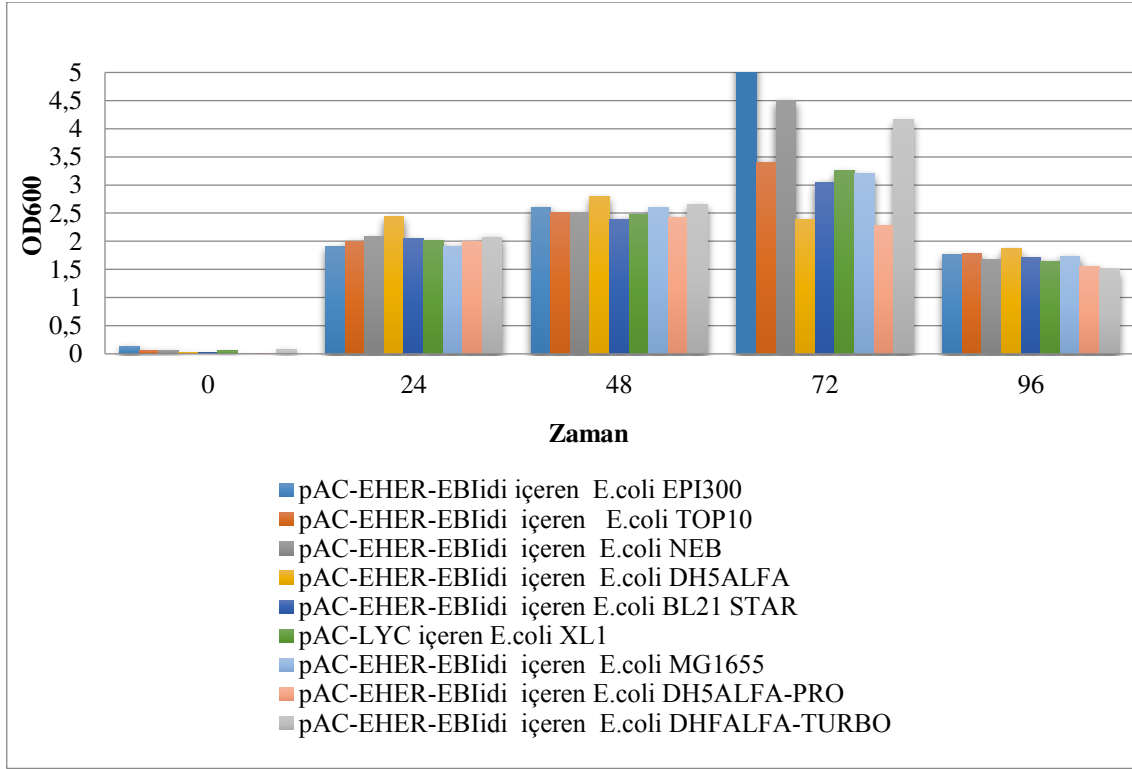
Şekil 4.13. 48 saatlik pAC-EHER-EBLidi içeren ve içermeyen *E. coli* MG1655 ve *E. coli* NEB 10-beta kültürlerine ait ekstraksiyon ürünlerinin spektrofotometrik ölçümüne ait grafik görüntüsü

HPLC Analizleri

E. coli kültür örneklerinden likopenin ekstraksiyonu başlangıç kültürlerinin kurulmasıyla başlangıcından itibaren 24 saatte bir asetonla gerçekleştirilmiştir. Ölçümler 3 tekrarlı 2 paralel deney halinde yapılmıştır ve HPLC ile ölçümler sonucunda elde edilen likopen yoğunluklarının zamana bağlı grafiği Şekil 4.14'te ve kültürlerin ortalama OD600 değerlerinin zamana bağlı grafiği Şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.14. Suşların likopen konsantrasyonlarının zamana bağlı grafiği

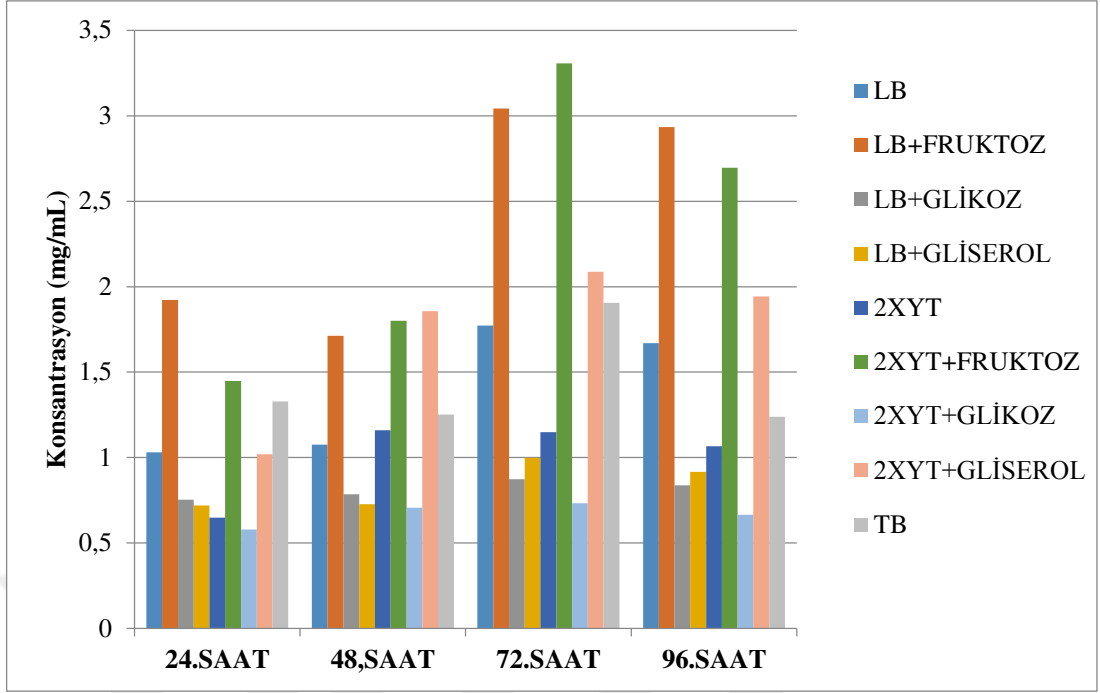


Şekil 4.15. Suşların OD600 değerlerinin zamana bağlı grafiği

Şekil 4.14'te elde edilen sonuçlar doğrultusunda suşlar arasında dört suşun (*E. coli* EPI300, *E. coli* NEB 10-beta, *E. coli* DH5α-Turbo, *E. coli* TOP10) daha iyi likopen ürettiği görülürken beş suşun (*E. coli* DE3, *E. coli* XL1, *E. coli* MG1655, *E. coli* DH5α-Pro, *E. coli* DH5α) diğer suşlara nazaran daha az likopen ürettiği görülmüştür. Bu duruma suşların farklı kullanım amaçlarına uygun olarak tasarlanması sebebiyle sahip oldukları genetik farklılıklar neden olabilmektedir. Yapılan analizler incelendiğinde *E. coli* EPI300, *E. coli* NEB 10-beta, *E. coli* DH5α-Turbo, *E. coli* TOP10 suşlarının daha dengeli ve verimli bir likopen üreticisi olduğu gözlemlenmektedir.

4.3.3. Likopenin Farklı Besiyerlerindeki Üretimi ve HPLC ile Ölçümleri

Daha önceki yapılan suş taramasında en yüksek likopen üretimini gerçekleştiren *E. coli* EPI300 suşu farklı besi ortamlarına ekimi yapıldı ve ekstraksiyon işlemi 24 saatte bir asetonla gerçekleştirilmiştir. HPLC ile ölçümler sonucunda elde edilen likopen yoğunluğunun zamana bağlı grafiği Şekil 4.16'da gösterilmektedir.



Şekil 4.16. *E.coli* EPI300 suşunun farklı besiyerlerdeki likopen yoğunluğunun zamana bağlı grafiği

Farklı besiyeri ortamları olarak TB, 2XYT, LB broth, 2XYT+ 6 gr/l Fruktoz, 2XYT+6 gr/l Glukoz, 2XYT+6 gr/l Gliserol, LB broth+6 gr/l Fruktoz, LB broth+6 gr/l Glukoz ve LB broth+6 gr/l Gliserol olarak denenmiştir. Analizler sonucu 72. saatte en yüksek verimi sağlayan besi ortamları; 2XYT+Fruktoz, LB broth+Fruktoz, 2XYT+Gliserol, TB ve LB broth olduğu görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Likopenin önemli bir antioksidan olduğunu, bu özelliğini hem bitki yapısında hem de insan vücudunda gösterdiği bilinmektedir. Likopenin insan sağlığı üzerine etkileri gerçekleştirilen bilimsel çalışmalarla kanıtlanmış bulunmaktadır. Likopenin mikrobiyal üretimiyle katma değeri yüksek bileşik elde etmek ve toksik organik çözücüler kullanılmadan insan tüketimi için uygun olan saf bir likopenin üretilmesi amaçlanmaktadır. Bu doğrultuda karotenogenik olmayan bir bakteri olan *E. coli*'de likopen karotenoidinin üretiminin amaçlandığı bu çalışmada likopen üretimini sağlayan pAC-EHER plazmidi DNA kaynağı olarak kullanılmıştır ve bu plazmidten likopen üreten pAC-EHER-EBIidi plazmidi restriksiyon endonükleazları aracılı klonlamaya alternatif olarak oldukça kullanışlı bir metod olan Gibson assembly metodu ile başarıyla oluşturulmuştur. pAC-EHER-EBIidi plazmidinin aktarıldığı *E. coli* suşlarında likopenin pembe renginden dolayı fenotipik olarak pembe renkli koloniler olduğu görülmüştür. pAC-EHER-EBIidi plazmidinin aktarıldığı *E. coli* suşlarından likopenin ekstraksiyonu asetonla yapılmıştır ve ekstraksiyon sonucu likopen miktarları HPLC ile analiz edilmiştir. pAC-EHER-EBIidi plazmidinin aktarıldığı *E. coli* suşları arasında en yüksek üretim HPLC analizleri sonucunda *E. coli* EPI300 suşunda 72. saatte 1.189 mg/l, *E. coli* NEB 10-beta suşunda 72. saatte $1,168 \pm 0,073539$ mg/l, *E. coli* DH5 α -Turbo $1,002 \pm 0,25173$ mg/l, *E. coli* TOP10 $0,918 \pm 0,018385$ mg/l olarak bulunmuştur. Diğer suşlarda ise daha düşük likopen üretimi olduğu görülmüştür. Kültürlerin ortam şartları ve plazmidin gen düzeni optimize edilerek likopen üretimi artırılabilir. Endüstrinin farklı alanlarında bu pigmentin özellikle tıp alanında ne kadar değerli olduğunu göz önünde bulunduracak olursak, daha büyük çaplı üretimi için ve endüstri uygulamalarında daha kolay ulaşılabilir hale gelmesi için ilerideki çalışmalarda gerekli adımlar atılabilir.

KAYNAKLAR

- [1]. **Tiwari, R., & Rana, C. S.** (2015). Plant secondary metabolites: a review. *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3(5), 661-670.
- [2]. **Chen, Y. Y., Galloway, K. E., & Smolke, C. D.** (2012). Synthetic biology: advancing biological frontiers by building synthetic systems. *Genome biology*, 13(2), 240
- [3]. **Hays, S. G., Patrick, W. G., Ziesack, M., Oxman, N., & Silver, P. A.** (2015). Better together: engineering and application of microbial symbioses. *Current opinion in biotechnology*, 36, 40-49
- [4]. **Schug, K. A., & Lindner, W.** (2005). Noncovalent binding between guanidinium and anionic groups: focus on biological-and synthetic-based arginine/guanidinium interactions with phosph [on] ate and sulf [on] ate residues. *Chemical reviews*, 105(1), 67-114.
- [5]. **Bailey, J. E.** (1991, June). Toward a science of metabolic engineering. *American Association for the Advancement of Science*.
- [6]. **Thiele, I., Swainston, N., Fleming, R. M., Hoppe, A., Sahoo, S., Aurich, M. K. & Thorleifsson, S. G.** (2013). A community-driven global reconstruction of human metabolism. *Nature biotechnology*, 31(5), 419-425.
- [7]. **Stephanopoulos, G.** (1999). Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metabolic engineering*, 1(1), 1-11.
- [8]. **Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., & He, X.** (2014). Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 377-392
- [9]. **O'Connor, S. E.** (2015). Engineering of secondary metabolism. *Annual review of genetics*, 49, 71-94.
- [10]. **Verpoorte, R., Van Der Heijden, R., Ten Hoopen, H. J. G., & Memelink, J.** (1999). Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology letters*, 21(6), 467-479.

- [11]. **Misawa, N., & Shimada, H.** (1998). Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. *Journal of Biotechnology*, 59(3), 169-181.
- [12]. **Koffas, M., Roberge, C., Lee, K., & Stephanopoulos, G.** (1999). Metabolic engineering. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 1(1), 535-557..
- [13]. **Gonzalez, R.** (2006). Metabolic engineering of bacteria for food ingredients. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 148, 111.
- [14]. **Dellomonaco, C.** (2011). Novel approaches for the production of fuels and chemicals in *Escherichia coli* (Doctoral dissertation, Rice University).
- [15]. **Chen, X., Zhou, L., Tian, K., Kumar, A., Singh, S., Prior, B. A., & Wang, Z.** (2013). Metabolic engineering of *Escherichia coli*: a sustainable industrial platform for bio-based chemical production. *Biotechnology advances*, 31(8), 1200-1223.
- [16]. **Stephanopoulos, G.** (1999). Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metabolic engineering*, 1(1), 1-11.
- [17]. **Mezzomo, N., & Ferreira, S. R.** (2016). Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: A review. *Journal of Chemistry*, 2016.
- [18]. **Lagarde, D., Beuf, L., & Vermaas, W.** (2000). Increased production of zeaxanthin and other pigments by application of genetic engineering techniques to *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Applied and environmental microbiology*, 66(1), 64-72.
- [19]. **NISAR, Nazia, et al.** Carotenoid metabolism in plants. *Molecular plant*, 2015,8.1:68-82.
- [20]. **Botella-Pavía, P., & Rodríguez-Concepción, M.** (2006). Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiologia Plantarum*, 126(3), 369-381.
- [21]. **Zhang, W., Hu, X., Wang, L., & Wang, X.** (2014). Reconstruction of the carotenoid biosynthetic pathway of *Cronobacter sakazakii* BAA894 in *Escherichia coli*. *PloS one*, 9(1), e86739.
- [22]. **Bağdathoğlu N, Demirbükür B.** 1999. Gıda İşlemede Karotenoidlerde Meydana Gelen Gelişmeler. *Gıda*. 9:4851.

- [23]. **Sandmann, G.** (2001). Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Archives of biochemistry and biophysics*, 385(1), 4-12.,
- [24]. **Das, A., Yoon, S. H., Lee, S. H., Kim, J. Y., Oh, D. K., & Kim, S. W.** (2007). An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. *Applied microbiology and biotechnology*, 77(3), 505.
- [25]. **Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N. C., & Pogson, B. J.** (2015). Carotenoid metabolism in plants. *Molecular plant*, 8(1), 68-82
- [26]. **Enfissi, E., Fraser, P. D., Lois, L. M., Boronat, A., Schuch, W., & Bramley, P. M.** (2005). Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 3(1), 17-27.).
- [27]. **Lindqvist, A., & Andersson, S.** (2002). Biochemical properties of purified recombinant human β -carotene 15, 15'-monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(26), 23942-2394.
- [28]. **Leavitt, PR, & Hodgson, DA** (2002). Sedimanter pigmentler. *Gelen göl tortuları kullanarak İzleme çevresel değişim* (s. 295-325). Springer Hollanda
- [29]. **Parker, R. S.** (1996). Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *The FASEB Journal*, 10(5), 542-551. 2. Pfander, H. (1992). [1] Carotenoids: An overview. *Methods in enzymology*, 213, 3-13.
- [30]. **Hart, D. J., & Scott, K. J.** (1995). Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chemistry*, 54(1), 101-111.
- [31]. **Deming, D. M., & Erdman, J. W.** (1999). Mammalian carotenoid absorption and metabolism. *Pure and Applied Chemistry*, 71(12), 2213-2223.
- [32]. **Schieber, A., & Carle, R.** (2005). Occurrence of carotenoid cis-isomers in food: technological, analytical, and nutritional implications. *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 416-422.
- [33]. **De Carvalho, P. G., Machado, C. M. M., Moretti, C. L., & FONSECA, M. D. N.** (2006). Hortaliças como alimentos funcionais. Embrapa Hortaliças-Artigo em periódico indexado (ALICE).

- [34]. **Pool-Zobel, B. L., Bub, A., Müller, H., Wollowski, I., & Rechkemmer, G.** (1997). Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*, 18(9), 1847-1850.
- [35]. **Olson, J. A.** (1999). Carotenoids and human health. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 49(3 Suppl 1), 7S-11S.
- [36]. **Erdman, J. W.** (1999). Variable bioavailability of carotenoids from vegetables. *The American journal of clinical nutrition*, 70(2), 179-180.
- [37]. **Marasco, E., & Schmidt-Dannert, C.** (2003). Towards the biotechnological production of aroma and flavour compounds in engineered microorganisms. *Applied Biotechnology Food Science and Policy*, 1, 145-158.
- [38]. **Klaui, H., & Bauernfeind, J. C.** (1981). Carotenoids as food colors [Natural and artificial colorants, includes vitamin studies]. *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors: Technological and nutritional applications*.
- [39]. **Bhosale, P.** (2004). Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(4), 351-361.
- [40]. **Von Elbe, J.H. and Schwartz, S.J.** (1996). Colorants. In: *Food Chemistry*, O. R. Fennema (ed), Marcel Dekker, pp. 651-765, New York
- [41]. **Mahan LK, Stump SE.** 2002. Krause's food, nutrition and diet therapy. 9th ed. WB Saunders Company 1002, hlm 72 dalam Almatier.
- [42]. **Woutersen, R.A., Wolterbeek, A.P.M., Appel, M.J., Van der Berg, H., Goldbohm, R.A. and Feron, V.J.** (1999). Safety evaluation of synthetic J-carotene. *Crit. Rev. Toxicol.*, 29; 515-542
- [43]. **Castenmiller, J. J., & West, C. E.** (1998). Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annual review of nutrition*, 18(1), 19-38.
- [44]. **Krinsky, N. I., & Johnson, E. J.** (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular aspects of medicine*, 26(6), 459-516. Rao AV, Rao LG. Carotenoids and human health. *Pharmacol Res* 2007; 55: 207–16.
- [45]. **Müller, K., Carpenter, K. L., Challis, I. R., Skepper, J. N., & Arends, M. J.** (2002). Carotenoids induce apoptosis in the T-lymphoblast cell line Jurkat E6. 1. *Free radical research*, 36(7), 791-802.
- [46]. **N.G Congdon, K.P West Jr.** *Curr Opin Ophthalmol*, 10 (1999), pp. 467–473

- [47]. **Brown, L., Rimm, E. B., Seddon, J. M., Giovannucci, E. L., Chasan-Taber, L., Spiegelman, D., ... & Hankinson, S. E.** (1999). A prospective study of carotenoid intake and risk of cataract extraction in US men. *The American journal of clinical nutrition*, 70(4), 517-524
- [48]. **L Kohlmeier, S.B Hastings** *Am. J. Clin. Nutr.*, **62** (1995), pp. 1370S–1376S
- [49]. **C.W Hadley, S.K Clinton, S.J Schwartz** *J. Nutr.*, **133** (2003), pp. 727–732
- [50]. **T Rissanen, S Voutilainen, K Nyyssonen, J.T Salonen** *Exp Biol Med.*, **227** (2002), pp. 900–907
- [51]. **Alfa-Tokoferol , β -Karoten Kanseri Önleme Çalışma Grubu.** *N Müh J Med.* (1994); 330: 1029-1035
- [52]. **L.-X Zhang, R.V Cooney, J.S Bertram** *Carcinogenesis*, **12** (1991), pp. 2109–2114
- [53]. **Giovannucci, E., Leitzmann, M., Spiegelman, D., Rimm, E. B., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., & Willett, W. C.** (1998). A prospective study of physical activity and prostate cancer in male health professionals. *Cancer Research*, 58(22), 5117-5122.
- [54]. **Van Breemen, R. B., Xu, X., Viana, M. A., Chen, L., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Duncan, C., & Sharifi, R.** (2002). Liquid chromatography– mass spectrometry of cis-and all-trans-lycopene in human serum and prostate tissue after dietary supplementation with tomato sauce. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(8), 2214-2219.
- [55]. **P Terry, M Jain, A.B Miller, G.R Howe, T.E Rohan** *Nutr Cancer*, **42** (2002), pp. 167–172
- [56]. **Stahl, W., & Sies, H.** (2005). Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1740(2), 101-107
- [57]. **Stahl, W., & Sies, H.** (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular aspects of medicine*, 24(6), 345-351
- [58]. **Bone, R. A., Landrum, J. T., Friedes, L. M., Gomez,C. M., Kilburn, M. D., Menendez, E., Vidal, I., & Wang, W. L.** (1997). Distribution of lutein and zeaxan-thin stereoisomers in the human retina. *Experimental Eye Research*, 64, 211–218.

- [59]. **Khachik, F., Bernstein, P. S., & Garland, D. L.** (1997). Identification of lutein and zeaxanthin oxidation products in human and monkey retinas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 38, 1082–1811.
- [60]. **Mares-Perlman, J. A., & Klein, R.** (1999). Diet and age-related macular degeneration. In A. Taylor, (Ed.), *Nutritional and Environmental Influences on the Eye* (pp.181–214). Boca Raton, FL: CRC Press.
- [61]. **Wooten, B. R., Hammond, B. R., Land, R. I., & Snodderly, D. M.** (1999). A practical method for measuring macular pigment optical density. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40, 2481–2489.
- [62]. **Yağcılar, Ç.** (2012). Bitkisel kaynaklı karotenoidlerin (kırmızıbiber, ham hurma yağı, havuç) japon balığının pigmentasyonu ve büyümesi üzerine etkileri.
- [63]. **Thane, C., & Reddy, S.** (1997). Processing of fruit and vegetables: effect on carotenoids. *Nutrition & Food Science*, 97(2), 58-65.
- [64]. **Gale, C. R., Ashurst, H. E., Powers, H. J., & Martyn, C. N.** (2001). Antioxidant vitamin status and carotid atherosclerosis in the elderly. *The American journal of clinical nutrition*, 74(3), 402-408.
- [65]. **Osganian, S. K., Stampfer, M. J., Rimm, E., Spiegelman, D., Manson, J. E., & Willett, W. C.** (2003). Dietary carotenoids and risk of coronary artery disease in women. *The American journal of clinical nutrition*, 77(6), 1390-1399.]
- [66]. **Erge K, Karadeniz F** (2010). Gıdalardaki karotenoidlerin önemi ve dağılımı. *Gıda Mühendisleri Dergisi* sayı:33: 23-32.
- [67]. **Thane, C., & Reddy, S.** (1997). Processing of fruit and vegetables: effect on carotenoids. *Nutrition & Food Science*, 97(2), 58-65
- [68]. **Simpson KL, Katayama T, Chichester CO** (1981) In: Bauernfeld JC (ed) *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors*. Academic Press, London, p 463
- [69]. **Anon.** (1962) *Feeds Illus* Nov: 24
- [70]. **Nelis H J, DeLeenher AP** (1991) *J Appl Bacteriol* 70:181
- [71]. **Prabhu, S. U. D. H. A. R. S. H. A. N., Rekha, P. D., & Arun, A. B.** (2014). Zeaxanthin biosynthesis by members of the genus *Muricauda*. *Pol. J. Microbiol*, 63, 115-119

- [72]. **Li, X. R., Tian, G. Q., Shen, H. J., & Liu, J. Z.** (2015). Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce zeaxanthin. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 42(4), 627-636
- [73]. **Wu, N. L., Chiang, Y. C., Huang, C. C., Fang, J. Y., Chen, D. F., & Hung, C. F.** (2010). Zeaxanthin inhibits PDGF-BB-induced migration in human dermal fibroblasts. *Experimental dermatology*, 19(8).
- [74]. **Venil, C. K., Zakaria, Z. A., & Ahmad, W. A.** (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48(7), 1065-1079
- [75]. **Omara-Alwala, T. R., Chen, H. M., Ito, Y., Simpson, K. L., & Meyers, S. P.** (1985). Carotenoid pigment and fatty acid analyses of crawfish oil extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(2), 260-263
- [76]. **Guillou, A., Khalil, M., & Adambounou, L.** (1995). Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acid profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste. *Aquaculture*, 130(4), 351-360.
- [77]. **Wathne, E., Bjerkeng, B., Storebakken, T., Vassvik, V., & Odland, A. B.** (1998). Pigmentation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed astaxanthin in all meals or in alternating meals. *Aquaculture*, 159(3), 217-231.
- [78]. **Simpson KL, Katayama T, Chichester CO** (1981) In: Bauernfeld JC (ed) Carotenoids as colorants and vitamin A precursors. Academic Press, London, p 463]
- [79]. **Davies BH, Hsu W-J, Chichester CO** (1965) *Biochem J* 94:26]
- [80]. **Neamtu G, Tamas V, Bodea C** (1966) *Rev Roum Biochim* 3:305
- [81]. **Hu, Z. C., Zheng, Y. G., Wang, Z., & Shen, Y. C.** (2006). pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 586-590.
- [82]. **Gürbüz Y, Kamalak A, Çiçek T, et al.** (2010) Doğal karotenoid kaynakları ve yumurta sarı rengi. 325 - 329, http://4uzbk.sdu.edu.tr/4UZBK/POSTER/HBP/4UZBKP_060.pdf
- [83]. **Ötleş, S., & Yeşim, A. T. L. I.** (1997). KAROTENOİDLERİN İNSAN SAĞLIĞI AÇISINDAN ÖNEMİ. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 3(1), 249-254
- [84]. **Miranda, M.S., Cintra, R.G., Barros, S.B.M., Mancini-Filho, J.** (1998) Antioxidant Activity of The Microalga *Spirulina maxima* FAPESP

- [85]. **Wilska J, Jeszka** (2007). 9 Food colorants, Chemical and functional properties of food components, by Taylor, Francis Group, LLC: 245-274
- [86]. **Fraser, P. D., & Bramley, P. M.** (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in lipid research*, 43(3), 228-265.
- [87]. **Eisenreich, W., Rohdich, F., & Bacher, A.** (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in plant science*, 6(2), 78-84.
- [88]. **Rodríguez-Concepción, M., & Boronat, A.** (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiology*, 130(3), 1079-1089.
- [89]. **Isaacson, T., Ohad, I., Beyer, P., & Hirschberg, J.** (2004). Analysis *in vitro* of the enzyme CRTISO establishes a poly-cis-carotenoid biosynthesis pathway in plants. *Plant Physiology*, 136(4), 4246-4255.
- [90]. **Than, A., Bramley, P. M., Davies, B. H., & Rees, A. F.** (1972). Stereochemistry of phytoene. *Phytochemistry*, 11(11), 3187-3192.
- [91]. **Beyer, P., Kröncke, U., & Nievelstein, V.** (1991). On the mechanism of the lycopene isomerase/cyclase reaction in *Narcissus pseudonarcissus* L. chromoplasts. *Journal of Biological Chemistry*, 266(26), 17072-17078.
- [92]. **Bouvier, F., Keller, Y., d'Harlingue, A., & Camara, B.** (1998). Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1391(3), 320-328.
- [93]. **Vachali, P., Bhosale, P., & Bernstein, P. S.** (2012). Microbial carotenoids. In *Microbial carotenoids from fungi* (pp. 41-59). Humana Press, Totowa, NJ.
- [94]. **Ranjbar R et al** (2008) High efficiency production of astaxanthin by autotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis* in a bubble column photobioreactor. *Biochem Eng J* 39:575–580
- [95]. **Krubasik P, Sandmann G** (2000) A carotenogenic gene cluster from *Brevibacterium linens* with novel lycopene cyclase genes involved in the synthesis of aromatic carotenoids. *Mol Gen Genet* 263:423–432
- [96]. **Misawa N et al** (1990) Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli* *J Bacteriol* 172:6704–6712

- [97]. **Lee JH et al** (2003) Isolation of cDNAs for gonadotropin-II of flounder (*Paralichthys olivaceus*) and its expressions in adult tissues. *J Microbiol Biotechnol* 13:710–716
- [98]. **Cheng, X., Ruyter-Spira, C., & Bouwmeester, H.** (2013). The interaction between strigolactones and other plant hormones in the regulation of plant development. *Frontiers in Plant Science*, 4.
- [99]. **Kim, S. H., Park, Y. H., Schmidt-Dannert, C., & Lee, P. C.** (2010). Redesign, reconstruction, and directed extension of the *Brevibacterium linens* C40 carotenoid pathway in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 76(15), 5199-5206.
- [100]. **Ye Z et al** (2008) Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella* : progresses and prospects. *Biotechnol Adv* 26:352–360
- [101]. **Zechmeister L, Le Rosen AL, Went FW, Pauling L.** (1941). Polycopene, a naturally occurring stereoisomer of lycopene. *Proc Natl Acad Sci USA* 27(10):468–74
- [102]. **Giovannucci, E.** (1999). Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *Journal of the national cancer institute*, 91(4), 317-331
- [103]. **Nguyen ML, Schwartz SJ.** (1999). Lycopene: chemical and biological properties. *Food Technol* 53(1):38–45
- [104]. **Singh, P. & Goyal, G. K.** (2008). Dietary lycopene: Its properties and anticarcinogenic effects. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(3), 255-270
- [105]. **Mayer-Miebach, E., Behsnillian, D., Regier, M. and Schuchmann, H.P.,** 2005. Thermal processing of carrots: Lycopene stability and isomerisation with regard to antioxidant potential, *Food Research International*, 38:1103-1108.
- [106]. **Heber & Lu, 2002; Hsiao et al., 2004; X.-J. L. Wang, Xue-Gang; Wang, Peng; Hu, Guang; Zhang, Tong-Cun., 2014a,b) (Marova et al., 2012; Wenli, 2001)**
- [107]. **Srivastava, S., & Srivastava, A.** (2015). Lycopene; chemistry, biosynthesis, metabolism and degradation under various abiotic parameters. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 41e53. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-012-0918-2>.

- [108]. Agarwal S, Rao AV. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ*. 2000; 163 (6): 739-44
- [109]. Erdman JW, Jr, Ford NA, Lindshield BL. Are the health attributes of lycopene related to its antioxidant function? *Arch Biochem Biophys*. 2009;483(2):229–35
- [110]. Y. Chen, H. Shen, Y. Cui, S. Chen, Z. Weng, M. Zhao, et al. Chromosomal evolution of *Escherichia coli* for the efficient production of lycopene *BMC Biotechnology*, 13 (1) (2013), p. 6
- [111]. Nguyen, M.L., and Schwartz, S.J., 1999. Lycopene: Chemical and biological properties. *Food Technol.*, 53, 38-45
- [112]. Paust, J., 1996. Part VII: Technical Syntheses. In “Carotenoids, Volume 2: Synthesis.” Britton, G., Liaaen, S., and Pfander, H., eds. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin
- [113]. Schierle, J., Bretzel, W., Bühler, I., Faccin, N., Hess, D., Steiner, K., and Schüep, W., 1997. Content and isomeric ratio of lycopene in food and human blood plasma. *Food Chem*. 59, 459- 465
- [114]. Olempska-Beer, Z. (2006). Lycopene (Synthetic) Chemical and Technical Assessment (CTA). Submitted to the Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) Rome.
- [115]. McClain, R.M., and Bausch, J., 2003. Summary of safety studies conducted with synthetic lycopene. *Regul. Toxicol. Pharmacol*. 37, 274-285
- [116]. Olempska-Beer, Z. (2006). Lycopene (synthetic): Chemical and Technical Assessment (CTA). Office of Food Additive Safety, Center for Food Safety and Applied Nutrition US Food and Drug Administration
- [117]. Moran, NE, Erdman Jr, JW ve Clinton, SK (2013). Diyet ve genetik faktörler arasındaki karmaşık etkileşimler likopen metabolizmasını ve dağılımını etkiler. *Biyokimya ve biyofizik arşivleri* , 539 (2), 171-180
- [118]. Krinsky, N. I., & Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular aspects of medicine*, 26(6), 459-516.
- [119]. Clinton, S. K. (1998). Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutrition reviews*, 56(2), 35-51.

- [120]. **During, A., & Harrison, E. H.** (2004). Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. *Archives of biochemistry and biophysics*, 430(1), 77-88.
- [121]. **During, A., & Harrison, E. H.** (2005). An *in vitro* model to study the intestinal absorption of carotenoids. *Food Research International*, 38(8-9), 1001-1008.
- [122]. **Goñi, I., Serrano, J., & Saura-Calixto, F.** (2006). Bioaccessibility of β -carotene, lutein, and lycopene from fruits and vegetables. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(15), 5382-5387.
- [123]. **Riedl, J., Linseisen, J., Hoffmann, J., & Wolfram, G.** (1999). Some dietary fibers reduce the absorption of carotenoids in women. *The Journal of nutrition*, 129(12), 2170-2176.
- [124]. **Failla, M. L., Chitchumroonchokchai, C., & Ishida, B. K.** (2008). *In vitro* micellarization and intestinal cell uptake of cis isomers of lycopene exceed those of all-trans lycopene. *The Journal of nutrition*, 138(3), 482-486.
- [125]. **Karakaya, S., & Yilmaz, N.** (2007). Lycopene content and antioxidant activity of fresh and processed tomatoes and *in vitro* bioavailability of lycopene. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(12), 2342-2347.
- [126]. **Ahuja, K. D., Pittaway, J. K., & Ball, M. J.** (2006). Effects of olive oil and tomato lycopene combination on serum lycopene, lipid profile, and lipid oxidation. *Nutrition*, 22(3), 259-265.
- [127]. **Cardinault, N., Tyssandier, V., Grolier, P., Winklhofer-Roob, B. M., Ribalta, J., Bouteloup-Demange, C., ... & Borel, P.** (2003). Comparison of the postprandial chylomicron carotenoid responses in young and older subjects. *European journal of nutrition*, 42(6), 315-323.
- [128]. **Stahl, W., & Sies, H.** (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular aspects of medicine*, 24(6), 345-351.
- [129]. **Boileau, T. W. M., Boileau, A. C., & Erdman Jr, J. W.** (2002). Bioavailability of all-trans and cis-Isomers of Lycopene. *Experimental Biology and Medicine*, 227(10), 914-919.
- [130]. **Erdman Jr, J. W.** (2005). How do nutritional and hormonal status modify the bioavailability, uptake, and distribution of different isomers of lycopene?. *The Journal of nutrition*, 135(8), 2046S-2047S.

- [131]. **Erdman Jr, J. W.** (2005). How do nutritional and hormonal status modify the bioavailability, uptake, and distribution of different isomers of lycopene?. *The Journal of nutrition*, 135(8), 2046S-2047S.
- [132]. **Goralczyk, R., & Siler, U.** (2004). The role of lycopene in human health. In *Phytochemicals in health and disease* (pp. 273-293). CRC Press.
- [133]. **Zaripheh, S., Boileau, T. W. M., Lila, M. A., & Erdman Jr, J. W.** (2003). [14C]-lycopene and [14C]-labeled polar products are differentially distributed in tissues of F344 rats prefed lycopene. *The Journal of nutrition*, 133(12), 4189-4195.
- [134]. **Levy, J., Bosin, E., Feldman, B., Giat, Y., Miinster, A., Danilenko, M., & Sharoni, Y.** (1995). Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either α - carotene or β - carotene.
- [135]. **Tang, F. Y., Shih, C. J., Cheng, L. H., Ho, H. J., & Chen, H. J.** (2008). Lycopene inhibits growth of human colon cancer cells via suppression of the Akt signaling pathway. *Molecular nutrition & food research*, 52(6), 646-654.
- [136]. **Ivanov, N. I., Cowell, S. P., Brown, P., Rennie, P. S., Guns, E. S., & Cox, M. E.** (2007). Lycopene differentially induces quiescence and apoptosis in androgen-responsive and-independent prostate cancer cell lines. *Clinical Nutrition*, 26(2), 252-263.
- [137]. **Hantz, H. L., Young, L. F., & Martin, K. R.** (2005). Physiologically attainable concentrations of lycopene induce mitochondrial apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. *Experimental biology and medicine*, 230(3), 171-179.
- [138]. **Nahum, A., Hirsch, K., Danilenko, M., Watts, C. K., Prall, O. W., Levy, J., & Sharoni, Y.** (2001). Lycopene inhibition of cell cycle progression in breast and endometrial cancer cells is associated with reduction in cyclin D levels and retention of p27 Kip1 in the cyclin E-cdk2 complexes. *Oncogene*, 20(26), 3428.
- [139]. **Teodoro, A. J., Oliveira, F. L., Martins, N. B., de Azevedo Maia, G., Martucci, R. B., & Borojevic, R.** (2012). Effect of lycopene on cell viability and cell cycle progression in human cancer cell lines. *Cancer cell international*, 12(1), 36.
- [140]. **Ansari, M. S., & Gupta, N. P.** (2004, September). Lycopene: a novel drug therapy in hormone refractory metastatic prostate cancer. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (Vol. 22, No. 5, pp. 415-420). Elsevier.

- [141]. **Jatoi, A., Burch, P., Hillman, D., Vanyo, J. M., Dakhil, S., Nikceovich, D., ... & Tan, W.** (2007). A tomato-based, lycopene-containing intervention for androgen-independent prostate cancer: results of a Phase II study from the North Central Cancer Treatment Group. *Urology*, 69(2), 289-294.
- [142]. **Vaishampayan, U., Hussain, M., Banerjee, M., Seren, S., Sarkar, F. H., Fontana, J., ... & Kucuk, O.** (2007). Lycopene and soy isoflavones in the treatment of prostate cancer. *Nutrition and cancer*, 59(1), 1-7.
- [143]. **Tinkler, J. H., Böhm, F., Schalch, W., & Truscott, T. G.** (1994). Dietary carotenoids protect human cells from damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 26(3), 283-285.
- [144]. **Böhm, F., Tinkler, J. H., & Truscott, T. G.** (1995). Carotenoids protect against cell membrane damage by the nitrogen dioxide radical. *Nature medicine*, 1(2), 98.
- [145]. **Rao, A. V., & Agarwal, S.** (1998). Bioavailability and *in vivo* antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer.
- [146]. **Heber, D., & Lu, Q. Y.** (2002). Overview of mechanisms of action of lycopene. *Experimental biology and medicine*, 227(10), 920-923.
- [147]. **Bhuvaneswari, V., & Nagini, S.** (2005). Lycopene: a review of its potential as an anticancer agent. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 5(6), 627-635.
- [148]. **Ravindran, J., Subbaraju, G. V., Ramani, M. V., Sung, B., & Aggarwal, B. B.** (2010). Bisdemethylcurcumin and structurally related hispolon analogues of curcumin exhibit enhanced prooxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities *in vitro*. *Biochemical pharmacology*, 79(11), 1658-1666.
- [149]. **Salman, H., Bergman, M., Djaldetti, M., & Bessler, H.** (2007). Lycopene affects proliferation and apoptosis of four malignant cell lines. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 61(6), 366-369.
- [150]. **Rao LG, Guns E, Rao AV.** 2003. Lycopene: its role in human health and disease. *Agro Food* 7–8:25–30.
- [151]. **Halliwell B.** 1994. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet* 344(8924):721–4.

- [152]. **Kun Y, Lule US, Xiao-Lin D.** 2006. Lycopene: its properties and relationship to human health. *Food Rev Int* 22: 309–33.
- [153]. **Franceschi S, Bidoli E, La Vecchia G, Talamini R, D’Avanzo B, Negri E.** 1994. Tomatoes and risk of digestive-tract cancers. *Int J Cancer* 59(3):181–4.
- [154]. **Colditz GA, Branch LG, Lipnick RJ.** 1985. Increased green and yellow vegetable intake and lowered cancer deaths in an elderly population. *Am J Clin Nutr* 41(1):32–6.
- [155]. **Walfisch S, Walfisch Y, Kirilov E, Linde N, Mintentag H, Agbaria R, Sharoni Y, Levy J.** 2007. Tomato lycopene extract supplementation decreases insulin-like growth factor-I levels in colon cancer patients. *Eur J Cancer Prev* 16(4):298–303.
- [156]. **Erhardt JG, Meisner C, Bode JC, Bode C.** 2003. Lycopene, β -carotene, and colorectal adenomas. *Am J Clin Nutr* 78(6):1219–24.
- [157]. **Tinkler JH, Boehm F, Schalch W, Truscott TG.** 1994. Dietary carotenoids protect human cells from damage. *J Photochem Photobiol* 26:283–5.
- [158]. **Stahl W, Sies H.** 1996. Lycopene: a biologically important carotenoid for human. *Arch Physiol Biochem* 336(1):1–9.
- [159]. **Matsushima-Nishiwaki.** 1995. Suppression by carotenoids of microcystin-induced morphological changes in mouse hepatocytes. *Lipids* 30(4):1029–34.
- [160]. **Nagasawa H, Mitamura T, Sakamoto S, Yamamoto K.** 1997. Effects of lycopene on spontaneous mammary tumor development in SHN virgin mice. *Anticancer Res* 15(1): 118–23.
- [161]. **Sharoni Y, Giron E, Rise M, Levy J.** 1997. Effects of lycopene-enriched oleoresin on 7,12-dimethyl-benz[a]anthracene-induced rat mammary tumors. *Cancer Detect Prev* 21(2):118–23.
- [162]. **L.A. Torre, et al., Global cancer statistics, 2012, CA Cancer J. Clin. 2 (2015)** 97–108.
- [163]. **Aune, D., Chan, D. S. M., Vieira, A. R., Rosenblatt, D. N., Vieira, R., Greenwood, D. C., & Norat, T. (2012).** Fruits, vegetables and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Breast cancer research and treatment*, 134(2), 479-493.

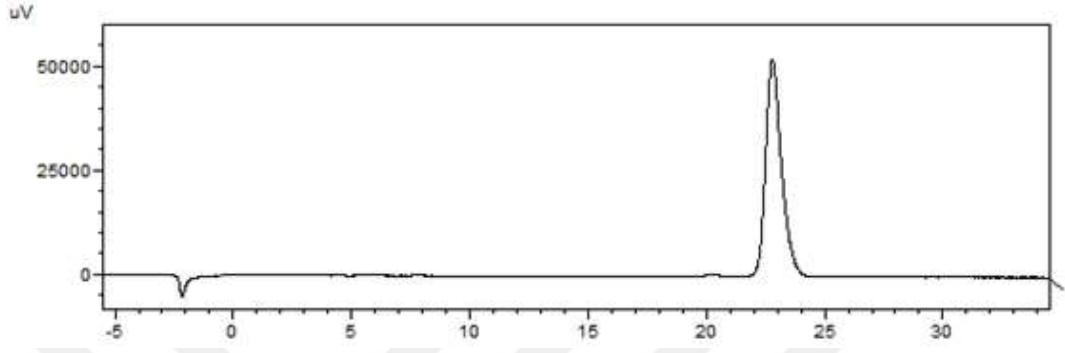
- [164]. Masala, G., Assedi, M., Bendinelli, B., Ermini, I., Sieri, S., Grioni, S., ... & Tumino, R. (2012). Fruit and vegetables consumption and breast cancer risk: the EPIC Italy study. *Breast cancer research and treatment*, 132(3), 1127-1136.
- [165]. Fung, T. T., Hu, F. B., McCullough, M. L., Newby, P. K., Willett, W. C., & Holmes, M. D. (2006). Diet quality is associated with the risk of estrogen receptor–negative breast cancer in postmenopausal women. *The Journal of nutrition*, 136(2), 466-472.
- [166]. Olsen, A., Tjønneland, A., Thomsen, B. L., Loft, S., Stripp, C., Overvad, K., ... & Olsen, J. H. (2003). Fruits and vegetables intake differentially affects estrogen receptor negative and positive breast cancer incidence rates. *The Journal of nutrition*, 133(7), 2342-2347.
- [167]. Jung, S., Spiegelman, D., Baglietto, L., Bernstein, L., Boggs, D. A., Van Den Brandt, P. A., ... & Goodman, G. (2013). Fruit and vegetable intake and risk of breast cancer by hormone receptor status. *Journal of the national Cancer Institute*, 105(3), 219-236.
- [168]. Eliassen, A. H., Hendrickson, S. J., Brinton, L. A., Buring, J. E., Campos, H., Dai, Q., ... & Hallmans, G. (2012). Circulating carotenoids and risk of breast cancer: pooled analysis of eight prospective studies. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(24), 1905-1916.
- [169]. Paoletti, L., Pastis, N. J., Denlinger, C. E., & Silvestri, G. A. (2011). A decade of advances in treatment of early-stage lung cancer. *Clinics in chest medicine*, 32(4), 827-838.
- [170]. Levy, J., Bosin, E., Feldman, B., Giat, Y., Miinster, A., Danilenko, M., & Sharoni, Y. (1995). Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either α - carotene or β - carotene.
- [171]. Teodoro, A. J., Oliveira, F. L., Martins, N. B., de Azevedo Maia, G., Martucci, R. B., & Borojevic, R. (2012). Effect of lycopene on cell viability and cell cycle progression in human cancer cell lines. *Cancer cell international*, 12(1), 36.
- [172]. Palozza, P., Colangelo, M., Simone, R., Catalano, A., Boninsegna, A., Lanza, P., ... & Ranelletti, F. O. (2010). Lycopene induces cell growth inhibition by altering mevalonate pathway and Ras signaling in cancer cell lines. *Carcinogenesis*, 31(10), 1813-1821.

- [173]. **Nkondjock A, Ghadirian P, Johnson KC, Krewski D.** 2005. Dietary intake of lycopene is associated with reduced pancreatic cancer risk. *J Nutr* 135(3):592–7.
- [174]. **Visioli F, Riso P, Grande S, Galli C, Porrini M.** 2003. Protective activity of tomato products on *in vivo* markers of lipid oxidation. *Eur J Nutr* 42(1):201–6.
- [175]. **Balestrieri ML, Prisco RD, Nicolaus B, Pari P, Schiano Moriello V, Strazzullo G, Iorio EL, Servillo L, Balestrieri C.** 2004. Lycopene in association with α -tocopherol or tomato lipophilic extracts enhances acyl-platelet-activating factor biosynthesis in endothelial cells during oxidative stress. *Free Radical Biol Med* 36(8):1058–67.
- [176]. **Stahl, W., Heinrich, U., Aust, O., Tronnier, H., & Sies, H.** (2006). Lycopene-rich products and dietary photoprotection. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 5(2), 238-242.
- [177]. **Singh, P., & Goyal, G. K.** (2008). Dietary lycopene: Its properties and anticarcinogenic effects. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(3), 255-270.
- [178]. **Zhang, F. F., Morioka, N., Kitamura, T., Fujii, S., Miyauchi, K., Nakamura, Y. & Nakata, Y.** (2016). Lycopene ameliorates neuropathic pain by upregulating spinal astrocytic connexin 43 expression. *Life sciences*, 155, 116-122.
- [179]. **Kuhad, A., Sharma, S., & Chopra, K.** (2008). Lycopene attenuates thermal hyperalgesia in a diabetic mouse model of neuropathic pain. *European journal of pain*, 12(5), 624-632.
- [180]. **Bhardwaj, M., & Kumar, A.** (2016). Neuroprotective Effect of Lycopene Against PTZ-induced Kindling Seizures in Mice: Possible Behavioural, Biochemical and Mitochondrial Dysfunction. *Phytotherapy research*, 30(2), 306-313.
- [181]. **Qu, M., Jiang, Z., Liao, Y., Song, Z., & Nan, X.** (2016). Lycopene prevents amyloid [beta]-induced mitochondrial oxidative stress and dysfunctions in cultured rat cortical neurons. *Neurochemical research*, 41(6), 1354-1364.
- [182]. **Ardawi, M. S. M., Badawoud, M. H., Hassan, S. M., Rouzi, A. A., Ardawi, J. M., AlNosani, N. M., ... & Mousa, S. A.** (2016). Lycopene treatment against loss of bone mass, microarchitecture and strength in relation to regulatory mechanisms in a postmenopausal osteoporosis model. *Bone*, 83, 127-140.

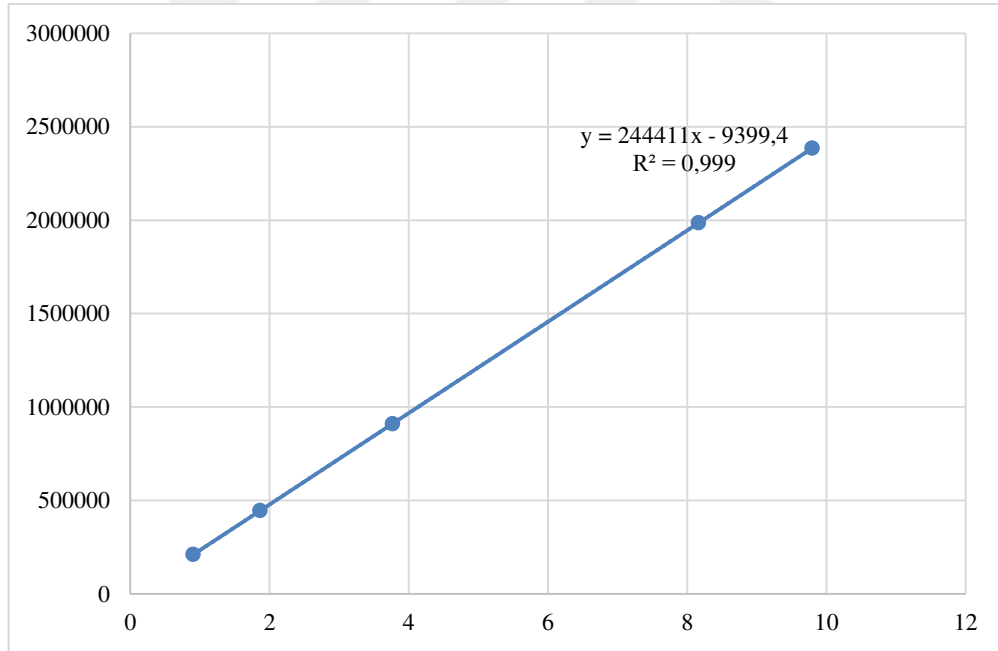
- [183]. Češka, M., & Šafránek, D. (Eds.), 2018. Computational Methods in Systems Biology: 16th International Conference, CMSB 2018, Brno, Czech Republic, September 12-14, 2018, Proceedings (Vol. 11095). Springer.
- [184]. Matthew F., 2018. Plasmids 101: Common Lab *E. coli* Strains. <https://blog.addgene.org/plasmids-101-common-lab-e-coli-strains>.
- [185]. https://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes, 2018.
- [186]. http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/244310.pdf, 2018
- [187]. Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8746–8749. <http://doi.org/10.1128/JB.01368-07>
- [188]. <https://www.addgene.org/protocols/pouring-lb-agar-plates/>
- [189]. Sambrook, J. and D. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* . 2001.
- [190]. QIAGEN, QIAprep® Miniprep Handbook, 2015, Cat. No: 27104-27106, Germany, 20p
- [191]. <https://www.addgene.org/53262/sequences> 2018.
- [192]. Sambrook, J., & Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring.
- [193]. QIAGEN, QIAquick® Spin Handbook, Cat. No: 28506, Germany, Sambrook, J. Russell, D.W., 2001, *Molecular Cloning A Laboratory Manual I-II-III*, Third Edition, CSHL Press, New York.

EKLER

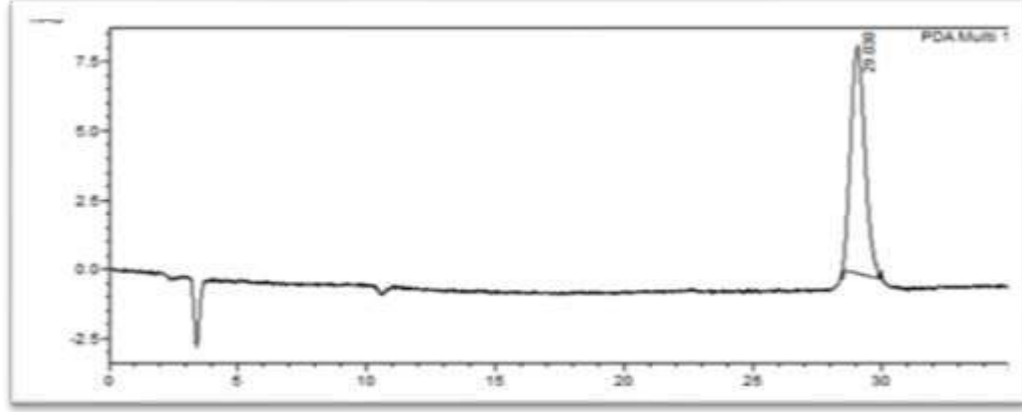
EK Şekil 1. 10 ppm likopen standardına ait HPLC kromatogramı



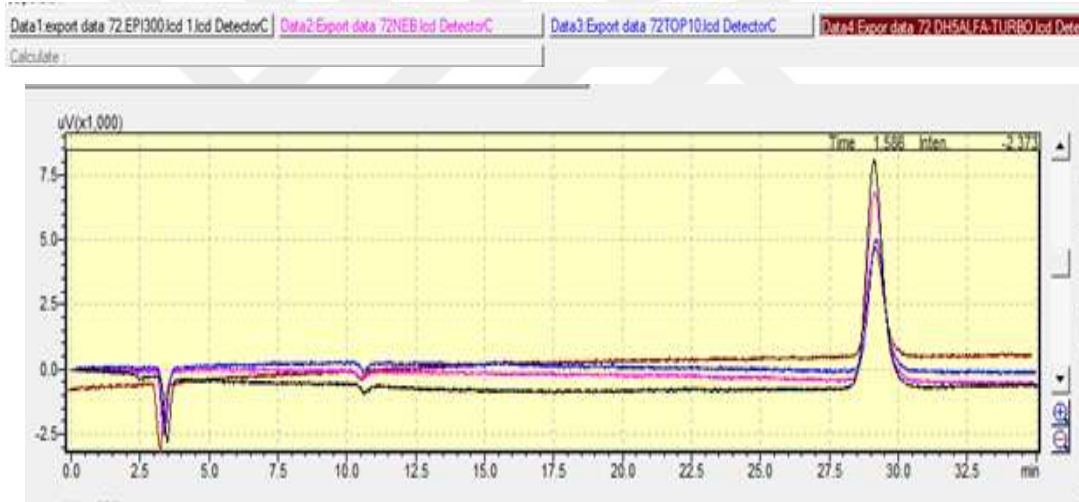
EK Şekil 2. Likopen standardı ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi



EK Şekil 3. pAC-EHER-EBLidi içeren *E. coli* EPI300 suşundan ekstrakte edilen likopene ait kromatogram



EK Şekil 4. pAC-EHER-EBLidi içeren *E. coli* EPI300, *E. coli* DH5 ALFA-TURBO, *E. coli* NEB ve *E. coli* TOP 10 suşlarının 72.saatte ekstrakte edilen likopene ait kromatogram



EK Şekil 5. pAC-EHER-EBLidi içeren *E. coli* EPI300 suşunun farklı besiyerlerindeki 72.saatte ekstrakte edilen likopene ait kromatogram



EK Tablo 1. pAC-EHER-EBIidi içeren *E. coli* suşlarının OD600 değerleri

pAC-EHER-EBIidi Aktarılan Suşlar	Saate bağlı OD600 değerleri			
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat
<i>E. coli</i> DE3	2,045	2,3956	3,0471	1,7123
<i>E. coli</i> DH5α	2,4357	2,7968	2,800	1.8668
<i>E. coli</i> DH5α-Turbo	2,0754	2,6545	4,1599	1,4937
<i>E. coli</i> DH5α-Pro	1,9907	2,4162	2,2788	1,5454
<i>E. coli</i> XL1-Blue	2,0124	2,4716	3,2532	1,6477
<i>E. coli</i> MG1655	1,9143	2,5976	3,1978	1,736
<i>E. coli</i> EPI300	1,9049	2,6008	4,416	1,7643
<i>E. coli</i> NEB 10-beta	2,0819	2,5135	4,00	1,6739
<i>E. coli</i> TOP10	2,0042	2,5135	3,00	1,7847

EK Tablo 2. HPLC ile ölçümler sonucunda elde edilen likopen konsantrasyonu değerleri

pAC-EHER-EBIidi aktarılan Suşlar	Zamana bağlı likopen konsantrasyonları			
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat
<i>E. coli</i> XL1-Blue	0,516	0,491	0,612	0,561
<i>E. coli</i> DH5α	0,389	0,4	0,411	0,321
<i>E. coli</i> DH5α-Pro	0,367	0,535	0,577	0,574
<i>E. coli</i> DH5α-Turbo	0,544	0,545	0,644	0,621
<i>E. coli</i> DE3	0,541	0,545	0,614	0,608
<i>E. coli</i> EPI300	0,691	0,699	1,123	0,984
<i>E. coli</i> MG1655	0,336	0,414	0,624	0,567
<i>E. coli</i> NEB 10-beta	0,567	0,618	1,013	1,002
<i>E. coli</i> TOP10	0,915	0,726	0,915	0,740

Ek Tablo 2’de pAC-EHER EBIldi içeren dokuz *E.coli* suşu HPLC ile analiz edilmiştir. Sürenin uzunluğundan dolayı bu analiz sonucunda yüksek çıkan dört suş ile iki tekrarlı olacak şekilde analizler yapıldı ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Ek Tablo 3’de gösterilmiştir.

EK Tablo 3. HPLC ile ölçümler sonucunda elde edilen ortalama likopen konsantrasyonu değerleri

pAC-EHER-EBIldi aktarılan Suşlar	Zamana bağlı likopen konsantrasyonları $\pm$ standart sapma (mg/l)			
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat
<i>E. coli</i> DH5 α -Turbo	0,776 $\pm$ 0,17112	0,883 $\pm$ 0,296985	1,002 $\pm$ 0,25173	0,773 $\pm$ 0,229103
<i>E. coli</i> EPI300	1,294 $\pm$ 0,226274	1,334 $\pm$ 0,091924	1,189 $\pm$ 0,040305	1,023 $\pm$ 0,111016
<i>E. coli</i> NEB 10-beta	1,079 $\pm$ 0,064347	1,127 $\pm$ 0,136472	1,168 $\pm$ 0,073539	1,018 $\pm$ 0,013435
<i>E. coli</i> TOP10	0,747 $\pm$ 0,050912	0,769 $\pm$ 0,030406	0,918 $\pm$ 0,018385	0,750 $\pm$ 0,006364

EK Tablo 4. Farklı besiyerlerinin HPLC ile ölçümler sonucunda elde edilen likopen konsantrasyonu değerleri

pAC-EHER- <i>E. coli</i> EPI300 suşunun üretildiği besi ortamları	Zamana bağlı likopen konsantrasyonları			
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat
LB Broth	1,03	1,075	1,773	1,67
LB Broth+ Fruktoz	1,712	1,923	3,042	2,933
LB Broth+ Glikoz	0,754	0,785	0,873	0,837
LB Broth+ Gliserol	0,719	0,727	0,999	0,916
2XYT	0,648	1,16	1,149	1,067
2XYT+ Fruktoz	1,448	1,8	3,306	2,695
2XYT+ Glukoz	0,58	0,706	0,733	0,666
2XYT+ Gliserol	1,02	1,856	2,088	1,942
TB	1,328	1,905	1,251	1,238

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Semra YILDIZ

Adres: Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik
Bölümü Elazığ/Türkiye

E-posta: semra.safara_2323@hotmail.com

Kişisel bilgiler

Doğum Tarihi :29.09.1993

Doğum Yeri : Elazığ

Ehliyet :B Sınıfı

Eğitim bilgileri

2008-2012 75. Yıl Lisesi

2012-2016 Fırat Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü

2016-2019 Fırat Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Tezli Yüksek Lisans

Yüksek Lisans Tez Konusu: Metabolik Mühendisliği Yaklaşımıyla Likopenin
Mikrobiyal Biyosentezi

Staj deneyimi

Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı (20 İŞ GÜNÜ)

Elazığ Şeker Fabrikası (20 İŞ GÜNÜ)

Projeler

117M051 No'lu Metabolik Mühendisliği Yaklaşımıyla Biyosentetik Bir Alternatif
Olarak Safran Apokarotenoidlerinin Mikrobiyal Biyosentezi Ve Biyoreaktörde Üretimi
başlıklı TÜBİTAK projesinde bursiyer,

MF.1801 No'lu Metabolik Mühendisliği Yaklaşımıyla Likopenin Mikrobiyal
Biyosentezi başlıklı FÜBAP projesinde araştırmacı,

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Venhar CELİK OZGEN* , Semra YILDIZ, Microbial Production Of Vegetable
Lycopene is an Alternative, 1. International GAP Agriculture & Livestock
Congress, 2018

Bilgisayar Bilgileri

- Autocad
- Vector NTI
- Microsoft Office Programları

Sertifika Bilgileri

HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Bilgisayar İşletmeni Sertifikası

