



**METABOLİK MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMIYLA
ZEAKSANTİN ÜRETİMİ**

Yasemin KUŞ

Yüksek Lisans Tezi

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Venhar ÇELİK ÖZGEN

OCAK-2019

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METABOLİK MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMIYLA ZEAKSANTİN ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

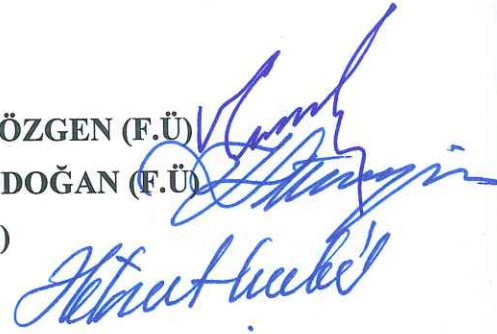
Yasemin KUŞ

151132107

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 11 Aralık 2018

Tezin Savunulduğu Tarih : 7 Ocak 2019

Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Venhar ÇELİK ÖZGEN (F.Ü)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Hamdi Soner ALTUNDOĞAN (F.Ü)
Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL (İ.Ü)



OCAK-2019

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim sürecinde yardımlarını, bilimsel katkı ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Venhar ÇELİK ÖZGEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Muhammed Şaban TANYILDIZI'na destekleri için teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecimde bilgilerini paylaşan değerli çalışma arkadaşlarım Nagehan KAN, Semra YILDIZ, Esra ÖZ, Ivona POGRNJA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Manevi desteklerini her zaman hissettiren ve tez sürecimde yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Nazife TOLAY, Kader ÇİÇEK ve İlaha MUSAYEVA'ya teşekkürlerimi sunarım.

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

Tez aşamasında deneysel çalışmalar için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a 117M051 numaralı projeye, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP)'a MF.17.40 numaralı projeye verdikleri desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Yasemin KUŞ

ELAZIĞ-2018

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	IX
SEMBOLLER LİSTESİ	X
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Karotenoidler	2
1.1.1. Likopen.....	4
1.1.2. Beta-karoten.....	6
1.1.3. Zeaksantin.....	8
1.2. Metabolik Mühendisliği	11
1.2.1. Mikrobiyal Metabolik Mühendisliğinde Tasarımsal Süreçler.....	12
1.3. Mikrobiyal Metabolik Mühendisliği Yaklaşımıyla Karotenoid Üretimi.....	19
1.4. Metabolik Mühendisliği Yaklaşımıyla Zeaksantin Üretimi	26
2. MATERYAL ve METOT	28
2.1. Materyal.....	28
2.1.1. <i>E. coli</i> Suşları.....	28
2.1.2. Plazmidler.....	29
2.1.3. Çözeltiler	30
2.1.4. Suş Gelişiminde Kullanılan Besiyerleri ve Antibiyotikler	30
2.2. Metot.....	32
2.2.1. Plazmid DNA'sının İzolasyonu.....	32
2.2.2. Restriksiyon Endonükleazları ile Plazmid DNA'sının Kesilmesi.....	32
2.2.3. AgaroZ Jel Elektroforezi	33
2.2.4. Gibson Assembly Metodu	34
2.2.5. Plazmid Haritalarının Tasarlanması	36
2.2.6. Primerlerin Tasarlanması ve PCR Reaksiyonları	36
2.2.7. PCR Ürünlerinin AgaroZ Jelden Saflaştırılması.....	38

2.2.8. Elektrokompotent Hücrelerin Hazırlanması	38
2.2.9. Transformasyon	39
2.2.10. Stok Kültürlerin Hazırlanması	40
2.2.11. pAC-EHER-EBLidiYZ İçeren <i>E. coli</i> Suşlarından Zeaksantin Ekstraksiyonu İçin Başlangıç Kültürlerinin Hazırlanması	40
2.2.12. pAC-EHER-EBLidiYZ İçeren <i>E. coli</i> Suşlarından Zeaksantin Ekstraksiyonu.....	40
2.2.13. pAC-EHER-EBLidiYZ İçeren <i>E. coli</i> Suşlarından Ekstrakte Edilen Zeaksantin HPLC ile Analizi	41
3. BULGULAR ve TARTIŞMA	43
3.1. pAC-EHER Plazmid DNA'sının Restriksiyon Endonükleazları ile Doğrulanması.....	43
3.2. pAC-EHER-EBLidiYZ Plazmidinin İnşası	45
3.2.1. Fragmentlerin Elde Edilmesi ve Gibson Assembly Reaksiyonu	45
3.2.2. Gibson Assembly Ürününün Transformasyonu ve Enzimatik Kesim Reaksiyonu ile Doğrulanması	48
3.3. pAC-EHER-EBLidiYZ Plazmidi İçeren <i>E. coli</i> Suşlarında Zeaksantin Üretiminin İncelenmesi	50
3.3.1. Başlangıç Kültürlerinin Kurulması.....	51
3.3.2. Zeaksantin Ekstraksiyonu ve HPLC ile Ölçümleri.....	52
4. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	56
KAYNAKLAR.....	57
EKLER	67
ÖZGEÇMİŞ	71

ÖZET

Zeaksantin besleyici takviyeler, farmasötik, gıda renklendiricileri ve hayvan yemi katkı maddesi olarak kullanımı gittikçe önem kazanan karotenoid moleküldür. Bu tez çalışmasında zeaksantin *Escherichia coli* bakterisinde metabolik mühendisliği yaklaşımı ile heterolog üretimi amaçlanmıştır. Zeaksantin *E. coli*’de heterolog üretimi için Gibson Assembly metodu kullanılarak zeaksantin sentezini gerçekleştiren enzimlerin anlatımını sağlayan genleri (*crtEBIYZ*) içeren plazmidin (pAC-EHER-EBIidiYZ) 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 zeaksantin üretimi zamana bağlı zeaksantin ekstraksiyonu ve ekstraksiyon ürünlerinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile analizi yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, pAC-EHER-EBIidiYZ plazmidinin aktarıldığı *E. coli* suşları arasında 72 saatlik inkübasyon süresinde HPLC analizleri yapılmıştır ve en yüksek zeaksantin üretimi *E. coli* MG1655 suşunda $2,786 \pm 0,145$ mg/l, *E. coli* NEB 10-beta suşunda $2,757 \pm 0,102$ mg/l, *E. coli* DH5 α suşunda $2,669 \pm 0,104$ mg/l olarak 24. saatte bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Zeaksantin, *Escherichia coli*, Heterolog Üretim, Metabolik Mühendisliği

SUMMARY

Zeaxanthin Production by Metabolic Engineering Approach

Zeaxanthin is a carotenoid molecule which, with time, gained particular importance in pharmaceutical industries, as well as in food industries as food supplement, colorant and animal food additive. The aim of this thesis was to make heterologous expression of zeaxanthin in *Escherichia coli* by using metabolic engineering principles. In order to ensure the heterologous zeaxanthin production in *E. coli*, the plasmid (pAC-EHER-EBIidiYZ) carrying the genes (*crtEBIYZ*) which are responsible for expression of enzymes involved in zeaxanthin biosynthesis, was assembled using the Gibson Assembly Method. This newly constructed plasmid was transformed into 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) and their liquid cultures were prepared. From bacterial cultures which were prepared in the above manner, time-related zeaxanthin production was measured by zeaxanthin extraction and analyzing the extraction products with the HPLC (High Pressure Liquid Chromotography). In this study, zeaxanthin analyses was done by HPLC in *E. coli* strains which were transformed with pAC-EHER-EBIidiYZ plasmid during 72 hours incubation and at the 24th hour the highest zeaxanthin production was found as $2,786 \pm 0,145$ mg/l for *E. coli* MG1655 strain, $2,757 \pm 0,102$ mg/l for *E. coli* NEB 10-beta strain, $2,669 \pm 0,104$ mg/l for *E. coli* DH5 α strain.

Key words: Zeaxanthin, *Escherichia coli*, Heterolog Production, Metabolic Engineering

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Likopen molekülünün kimyasal yapısı	5
Şekil 1.2. Beta-karoten molekülünün kimyasal yapısı	7
Şekil 1.3. Zeaksantin molekülünün kimyasal yapısı	10
Şekil 1.4. Yolak akışının optimizasyonu için metabolik mühendisliği stratejileri.....	17
Şekil 1.5. Metabolik mühendisliği için protein kodlayan gen içerisindeki olası hedef bileşenler.....	18
Şekil 1.6. <i>E. coli</i> 'de doğal DXP yolağı ve heterolog MVA yolağı	20
Şekil 1.7. Çok değişkenli modüler mühendislik uygulamasıyla taksadien üretiminin optimizasyonu.....	22
Şekil 1.8. Mevalonat yolağı aracılığı ile amorfadien üretimi	23
Şekil 1.9. <i>Pantoea agglomerans</i> Eho10 karotenoid yolağına ait gen kümesi.....	24
Şekil 1.10. <i>Pantoea</i> karotenoid yolağı	25
Şekil 1.11. <i>E. coli</i> 'de metabolik mühendisliği yaklaşımıyla zeaksantin üretimi	27
Şekil 3.1. pAC-EHER plazmidinin haritası ve EcoRI, HindIII enzimlerinin kesim bölgeleri	44
Şekil 3.2. pAC-EHER plazmidinin enzimatik doğrulamasına ait agaroz jel görüntüsü, EcoRI, HindIII enzimleriyle kesim sonrası elde edilen bantlar.....	44
Şekil 3.3. pAC-EHER-EBLidiYZ plazmidinin tasarımı	45
Şekil 3.4. pAC-EHER plazmid DNA'sından F2 ve R2 primerleri ile 5995 bp fragmentin PCR ürününün agaroz jeldeki görüntüsü.....	46
Şekil 3.5. pAC-EHER plazmid DNA'sından F1 ve R1 primerleri ile 6547 bp fragmentin PCR ürününün agaroz jeldeki görüntüsü.....	47
Şekil 3.6. pAC-EHER-EBLidiYZ plazmidinin Gibson Assembly reaksiyonu ürününün transformasyonuna ait petri görüntüsü	48
Şekil 3.7. pAC-EHER-EBLidiYZ plazmidinin haritası ve SalI enziminin kesim bölgeleri	49
Şekil 3.8. pAC-EHER-EBLidiYZ plazmidinin SalI kesimi sonrası elde edilen bantlar	49
Şekil 3.9. pAC-EHER-EBLidiYZ plazmidinin enzimatik doğrulamasında görülen pozitif kolonilerin petrideki görüntüleri.....	50
Şekil 3.10. pAC-EHER-EBLidiYZ plazmidi içeren <i>E. coli</i> suşlarına ait hücre peleti görüntüleri	51

Şekil 3.11. pAC-EHER-EBLidiYZ içeren ve içermeyen <i>E. coli</i> MG1655 kültürlerine ait peletler	52
Şekil 3.12. 24 saatlik pAC-EHER-EBLidiYZ içeren ve içermeyen <i>E. coli</i> MG1655 kültürlerine ait ekstraksiyon ürünlerinin spektrofotometrik ölçümüne ait grafik görüntüsü	53
Şekil 3.13. Suşların ortalama zeaksantin konsantrasyonlarının zamana bağlı grafiği	54
Şekil 3.14. Suşların ortalama OD ₆₀₀ değerlerinin zamana bağlı grafiği.....	54



TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1.1. Metabolik mühendisliğinde kullanılan bazı konak mikroorganizmalar ve özellikleri.....	15
Tablo 1.2. Metabolik mühendisliği yaklaşımı ile <i>S. cerevisiae</i> ve <i>E. coli</i> 'de sentezi gerçekleştirilen bazı sekonder metabolit örnekleri.....	21
Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan suşlar ve genotipleri.....	29
Tablo 2.2. 5X ISO tamponu bileşenleri	35
Tablo 2.3. Gibson Assembly Master karışımı bileşenleri.....	35
Tablo 2.4. pAC-EHER-EBIidiYZ plazmidinin inşası için kullanılan primerler, bağlanma sıcaklıkları ve baz uzunlukları.....	36
Tablo 2.5. HPLC çalışma koşulları.....	42

SEMBOLLER LİSTESİ

<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>P. agglomerans</i>	: <i>Pantoea agglomerans</i>
<i>P. ananatis</i>	: <i>Pantoea ananatis</i>
<i>S. cerevisiae</i>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>sp.</i>	: Tür
ROT	: Reaktif oksijen türleri
T2DM	: Tip 2 diyabetes mellitus
AMD	: Yaşa bağlı makula dejenerasyonu
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
NF-KB	: Nükleer faktör-kappa B
AP-1	: Aktivatör protein-1
STAT3	: Sinyal iletimi ve transkripsiyon protein 3 aktivatör
TNF-α	: Tümör nekroz faktör- α
DNA	: Deoksiribonükleik asit
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
OD	: Optik dansite
RBS	: Ribozom bağlanma bölgesi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
dNTP	: Deoksiribonükleotidtrifosfat
NAD⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid
DTT	: Ditiotreitol
Cm	: Kloramfenikol
SOB	: Super optimal broth-Süper optimize besiyeri
SOC	: Super optimal broth with catabolite repression-Süper optimize edilmiş katabolit represyonlu besiyeri
dH₂O	: Distile su
TAE	: Tris-Asetat-EDTA

EtBr	: Etidyum bromür
DMSO	: Dimetil sülfoksit
LB	: Luria Bertani
ISO	: İzotermal reaksiyon
UV	: Ultraviyole
UV-Vis	: Ultraviyole-görünür alan
PTFE	: Politetrafloroetilen
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
kg	: Kilogram
g	: Gram
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
ng	: Nanogram
ppm	: Milyonda bir
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
l	: Litre
µM	: Mikromolar
mM	: Milimolar
µmol	: Mikromol
v/v	: Hacim/Hacim
sn	: Saniye
dk	: Dakika
u	: Enzim ünitesi
rpm	: Revolutions per minute-Rotorun dakikadaki dönme hızı
°C	: Santigrat derece
nm	: Nanometre
kb	: Kilobaz
bp	: Baz çifti

1. GİRİŞ

Karotenoidler, açık sarıdan turuncuya ve koyu kırmızıya kadar farklı renk skalası barındırmaktadır ve yapısal olarak oldukça çeşitli doğal pigment sınıflarından birini temsil etmektedir. Dikkat çekici örnekleri domateste bulunan kırmızı renkli likopen, havuçta bulunan turuncu renkli β -karoten, marigoldlarda bulunan sarı renkli lutein ve zeaksantin olarak verilebilir. Fotosentetik organizmalarda sentezlerinin yanında bazı bakteri ve mantarlarda da karotenoidler sentezlenmektedir. Birçok çalışma ile kanserin önlenmesi, bağışıklık yanıtlarının artırılması ve göz fonksiyonunun iyileştirilmesi dahil olmak üzere karotenoidlerin çeşitli sağlık yararları bildirilmiştir. Günümüzde, karotenoidler besin takviyeleri, farmasötikler, gıda renklendiricileri ve hayvan yemi katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır [1].

Zeaksantin; kırmızı biber (*Capsicum annuum*), mısır (*Zea mays*) gibi birçok sebze ve meyvede, *Pantoea ananatis* gibi bazı bakterilerde doğal olarak oluşan bir ksantofildir. Ksantofiller farmasötikler için önemli bileşenlerdir, ayrıca gıda ve yem katkı maddeleridir. Zeaksantin, kümes hayvanlarının pigmentasyonunda yem katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Zeaksantin yaşı bağli makula dejenerasyonunu önlediğı bildirilmiştir. Piyasada 2:1 oranında (sağlıklı bir makulada bulunduğı gibi) zeaksantin ve lutein içeren ticari diyet ürünü bulunmaktadır. Zeaksantin antikanserojen aktivitesi gösterilmiştir ve kanserin önlenmesi için kullanımı araştırılmaktadır [2].

1950’de β -karotenin ilk kimyasal sentezi yayınlanmıştır. Bununla birlikte, zeaksantin aseton, bütadien, izopren gibi kolay erişilebilir ucuz kimyasal maddelerden başlayarak kimyasal sentezi 11 adımda gerçekleşen 20 aşama gerektirmektedir ve sonuç olarak bu durum yüksek üretim maliyetlerine neden olmaktadır [2]. Karmaşık yapıları nedeniyle kimyasal sentez ile üretimleri zor olan bu moleküller, metabolik mühendisliğı ve sentetik biyolojinin son zamanlardaki gelişmeleriyle mikrobiyal konaklarda etkin bir şekilde sentez edilmeye başlanmıştır. Rekombinant mikrobiyal suşları kullanan mikrobiyal biyosentez, kimyasal senteze çevre dostu bir alternatifi temsil etmektedir. *Escherichia coli*, temel ve uygulamalı bir seviyede kapsamlı şekilde çalışılmış ve endüstriyel uygulamalar için baskın bir konak mikroorganizma haline gelmiştir. *E. coli*’de metabolik mühendisliğı sistem

biyolojisi, sentetik biyoloji ve evrim mühendisliği alanındaki son gelişmelerin entegre kullanımıyla önemli ölçüde desteklenmiştir [3].

Karotenogenik mikroorganizmalar arasında *Pantoea* (eski adı *Enterobacter*), zeaksantin ve türevlerini üreten, iyi bilinen bir karotenogen bakteridir. *Pantoea*'nın karotenoid biyosentetik yolağı karotenogenik olmayan *E. coli*'de yapılandırılarak çeşitli karotenoidlerin sentezi için kullanılmıştır [4].

Bu tez çalışmasında *Pantoea agglomerans* bakterisine ait karotenoid yolak genleri kullanılarak *E. coli*'de zeaksantin heterolog üretimi için gerekli yolağın plazmid aracılı oluşturulmasıyla zeaksantin üretimi incelenmiştir.

1.1. Karotenoidler

Karotenoidler 700'den fazla sayıda üyesi ile tüm fotosentetik organizmalar, bazı fotosentetik olmayan bakteriler ve mantarlar tarafından sentezlenen genel olarak sarı ila kırmızı aralığındaki karakteristik renklerinden dolayı pigment olarak kabul edilen lipofilik yapıda izoprenoid molekülü grubudur. Herhangi bir karotenoid molekülünün temel kimyasal yapısı, molekülün absorpsiyon spektrumunu ve dolayısıyla rengini belirleyen bir kromofor olarak rol alan 3 ila 15 konjuge çift bağdan oluşmuş uzun polien zinciridir. Bu temel yapı, genellikle karotenler (hidrokarbon karotenoidler) ve ksantofiller (oksijenlenmiş türevler) olarak iki alt gruba bölünmüş oldukça geniş bir molekül grubunu siklizasyon ve oksijenasyon gibi çeşitli reaksiyonlarla oluşturmaktadır [5]. Karotenler, β -karoten ve α -karoten gibi molekülün bir ucunda veya her iki ucunda siklize olabilen doğrusal hidrokarbon içeren karotenoidlerdir; lutein, zeaksantin gibi ksantofil grubu karotenoidler ise karotenlerin oksijenlenmiş türevleridir [6].

İnsanlar da dahil olmak üzere hayvanlar tarafından karotenoidler *de novo* sentezlenememektedir, bu nedenle karotenoid kaynağı olarak bitkisel gıdalardan faydalanılmaktadır [7]. Karotenoidler ve vitaminler, biyolojik sistemlerde antioksidanlar olarak hareket eden, kanser önleyici ajanlar olarak en çok araştırılan maddelerdendir. İnsan kanı örneklerinde 30–40 karotenoid bulunmuş olup bunlar genellikle likopen, lutein, zeaksantin, β -kriptoksin ve β -karoten içermektedir. The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) çalışmasıyla 3043 kişide altı karotenoidin

plazma düzeyleri ölçülmüş ve belirtilen ortalama seviyeleri bulunmuştur: Likopen 0,43–1,32 µmol/l, lutein 0,26–0,70 µmol/l, β-karoten 0,21–0,68 µmol/l, β-kriptoksantin 0,11–0,52 µmol/l, α-karoten 0,06–0,32 µmol/l, zeaksantin 0,05–0,13 µmol/l [8]. Karotenoidlerin birçok biyolojik işlevi bulunmaktadır. Karotenoidler serbest radikalleri giderir, karsinojen metabolizmasını modüle eder, hücre proliferasyonunu inhibe eder, hücreler arasındaki iletişimi uyarır ve bağışıklık yanıtını artırır [9].

15 yıllık bir zaman dilimi boyunca, karotenoidlerin serum konsantrasyonları ile tip 2 diyabetes mellitus (T2DM) insidansı arasındaki etkileşimleri araştıran bir çalışmada T2DM insidansının sigara içmeyenlerde serum karotenoid konsantrasyonları ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir [10]. Benzer bir sonuç lutein, zeaksantin, likopen, α-karoten ve β-karotenin serum konsantrasyonlarının diyabetik deneklerde anlamlı olarak daha düşük olduğunun gösterildiği çalışmada bulunmuştur [11]. Bu çalışmaların çoğu, karotenoid alımı ile T2DM gelişme riskinin azalması arasında bir ilişki olduğunu bildirmektedir [12]. Cilt, reaktif oksijen türlerinin (ROT) etkilerini engelleyen, hücre bozulmasını ve hasarını önleyebilen doğal olarak bulunan antioksidan maddelere sahiptir, fakat ultraviyole (UV) ile yüksek seviyede ROT üretildiğinde bu savunmalar yeterli koruma sağlayamayabilir [12, 13]. Hücrelerde ROT birikimine bağlı olarak hücre ölümleri meydana gelebilir, aşırı hücre ölümü kırıksıklık ve cildin kurumasıyla sonuçlanabilir. ROT birikimi aynı zamanda kutanöz enflamasyon, melanom ve cilt kanseri gibi foto-yaşlanma koşullarında da önemli bir rol oynamaktadır. Doğal pigmentler, bu problemlerin üstesinden gelmek için terapötik maddeler olarak kullanılabilir. Birçok tüketici kozmetiklerinde doğal olarak üretilmiş bileşikler tercih ettiğinden kimyasal olarak sentezlenenlerden ziyade doğal olarak üretilmiş karotenoidler için artan bir küresel talep mevcuttur. Bu talep nedeniyle, alglerden izole edilen doğal pigmentlerin fiyatı, sentetik ürünlerin kabaca iki katıdır [13]. Karotenoidler hakkında uzun yıllar süren araştırmalar kanser, kardiyovasküler hastalıklar, katarakt ve yaşa bağlı maküler dejenerasyon dahil olmak üzere yaşlanma ile ilişkili hastalıklara karşı koruyucu bir rol oynayan bu pigmentlerin rolünün anlaşılmasını sağlamıştır [14].

Yaşam tarzındaki değişimler ve nüfusun artan sağlık bilincinden kaynaklı sağlık açısından zengin besin takviyelerinin (protein ve vitamin bakımından zengin bağışıklık güçlendiricileri) talebi artmıştır. Doğal ürünler yoluyla sağlığın korunmasına olan ilginin artmasıyla karotenoidler sağlık ve nutrasötik endüstrisinde geniş bir uygulama alanına

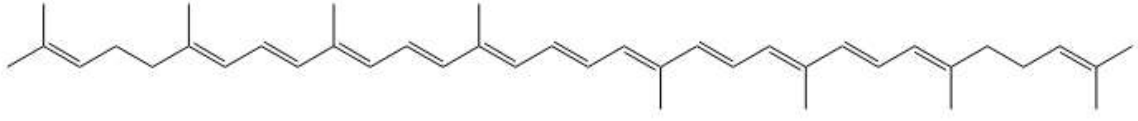
sahip olmaya başlamıştır. Karotenoid kullanımının gıda kalitesini iyileştirmedeki artan önemi, küresel pazardaki karotenoidlere olan talebin de artmasına neden olmuştur. Küresel karotenoid pazarının 2016 yılında yaklaşık 1,24 milyar ABD doları olacağı tahmin edilirken 2016'dan 2021 yılına kadar % 3'lük bir bileşik büyüme hızında ~1,53 milyar dolara yükseleceği tahmin edilmektedir [12].

β -karoten, lutein, zeaksantin, likopen, astaksantin ve kantaksantin dahil olmak üzere çeşitli karotenoidler endüstriyel ölçekte üretilmektedir ve gıdalarda takviye olarak kullanılmaktadır. Karotenoidler ayrıca renklendirme özelliklerinden dolayı gıda, ilaç, kozmetik ve hayvan yemi endüstrilerinde kullanılmaktadır; yiyeceklerde ve yumurta sarısı, kabuklular, alabalık, somon, karides gibi hayvansal ürünlerde gıda renklendirici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kuş tüylerinin pigmentasyonuna katkıda bulunmaktadır [15]. Karotenoidler hakkındaki çalışmalar oldukça kapsamlı olmasına rağmen biyoyararlanımı, metabolizması, biyolojik fonksiyonları ve üretimleri hakkındaki bilgilerin artışına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle karotenoidler hakkında yapılan çalışmalar gittikçe artmaktadır.

1.1.1. Likopen

Likopen, 11 konjuge çift bağ içeren ve simetrik bir yapı ile karakterize edilen $C_{40}H_{56}$ formülünde oksijenlenmemiş karotenoidlerin alt grubuna ait lipofilik yapıda bir moleküldür (Şekil 1.1). Kimyasal yapısı nedeniyle likopen, serbest radikallerin en iyi biyolojik baskılayıcılarından biridir [9]. Özellikle domates (bileşiminin yüzde sekseni), pembe greyfurt, karpuz, papaya, guava gibi kırmızı renkli meyve ve sebzelerde bulunan likopen pigmenti 70 yılı aşkın bir süredir kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Likopen hakkında 2000'den fazla makale hakemli dergilerde ve 4000 diğer yayın (bilimsel ve başka şekilde) yayımlanmıştır [16].

Likopen, potansiyel sağlık yararlarına göre en çok çalışılan karotenoidlerden biridir; bunun nedeni diğer karotenoidlerin çoğundan daha yüksek anti-kanser potansiyeli sergilemesidir. Domates ve domates ürünlerinin tüketimi özellikle prostat, akciğer ve mide gibi bir dizi farklı tipte kanserin insidansında azalma ile ilişkilendirilmiştir. Tümör hücre hatları kullanılarak *in vivo* ve *in vitro* yapılan bazı çalışmalarda, likopenin tümör hücresi büyümesini önemli ölçüde azaltabildiği gösterilmiştir [16].



Şekil 1.1. Likopen molekülünün kimyasal yapısı [9].

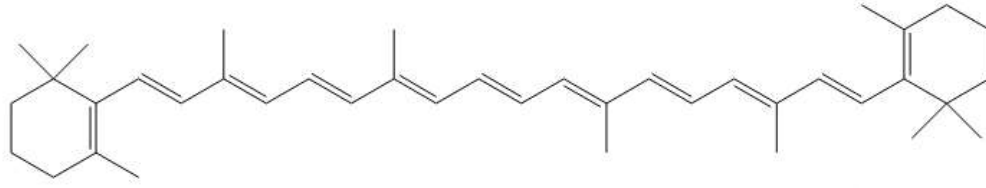
Genel olarak, likopenin tümör büyümesi veya karsinogenez üzerindeki inhibitör etkilerine dahil olan mekanizmalar detoksifikasyon sistemlerinin yukarı-regülasyonu, ROT temizlemesi, hücre proliferasyonuna müdahale, hücre döngüsü ilerlemesinin inhibisyonu ve sinyal transdüksiyonunun modülasyonunu içermektedir. Likopenin antienflamatuar aktivitesinin karsinogenezin başlaması ve ilerlemesi üzerindeki baskılayıcı etkisinde önemli bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Hücrelerin likopen ile 24 saat inkübasyonu, bu karotenoidin endometriyal ve meme kanseri hücreleri için güçlü otokrin mitojenler olan insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ile indüklenmiş hücre çoğalmasının inhibisyonu aracılığıyla insan endometriyal, akciğer ve meme kanseri hücrelerinin büyümesini engellemede α - ve β -karotenden daha etkili olduğunu göstermiştir [17].

Likopen üretimi bitkisel kaynaklardan (örn. domates) ve kimyasal sentezden sağlanmakla birlikte bu moleküle artan ilgiye bağlı olarak daha yüksek miktarlarda üretim için alternatif metodlar geliştirilmektedir [18]. Likopenin ticari üretimi için filamentli mantar olan *Blakeslea trispora*'da kullanılmaktadır. Mantarlardan elde edilen karotenoidlerin büyük ölçekli sanayi üretimi metabolik uyarıcılara ve inhibitörlere yanıtları ile misel büyüme oranından dolayı avantajlıdır, fakat son yıllarda heterolog üretim ile karotenoidlerin biyoteknolojik üretimi daha cazip hale gelmiştir [19]. Çeşitli avantajları nedeniyle *Saccharomyces cerevisiae* ve *E. coli*'de likopenin heterolog üretimi için başarılı çalışmalar gerçekleştirilmiştir [20, 21].

1.1.2. Beta-karoten

$C_{40}H_{56}$ kimyasal formülüne sahip ve molekül ağırlığı 536.88 olan β -karoten oldukça önemli biyoaktif özelliklere sahip karotenlerden biridir (Şekil 1.2) [22]. β -karoten insan beslenmesinde bol miktarda ve kan dahil tüm insan dokularında bulunan karotenoid bileşiğidir. Yüksek biyoaktivitesi nedeniyle tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. β -karotenin insan vücudundaki sayısız fonksiyonları arasında en önemlilerinden biri embriyonik gelişmeyi, doğru büyümeyi ve görmeyi etkileyen provitamin A kaynağı ile ilgilidir [23]. Provitamin A karotenoidlerinden olan β -karoten gibi karotenoidler göz fonksiyonu için önemli olan retinoidin öncülleridir ve provitamin A karotenoidler, A vitamininin ana besin kaynağıdır. Vitamin A eksikliği çocuklukta körlüğe yol açmakta ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde çocuklarda morbiditeyi artırmaktadır [24]. B-karoten, antikanser ve antioksidan özellikler de sergilemektedir. Yüksek biyoaktivitesiyle β -karoten, değerli bir gıda katkı maddesi olmasının yanında renklendirme özelliği sayesinde endüstriyel öneme de sahip olmaktadır. β -karoten gıda endüstrisinde birçok üründe turuncu-kırmızı bir pigment olarak kullanılmaktadır. İlaç endüstrisinde, tabletler için bir renklendirme maddesi olarak görev yapmaktadır; kozmetik endüstrisinde, cilt lezyonlarını oksidasyona ve UV ışınlarına karşı koruyan kremlerin biyoaktif bir bileşeni olarak kullanılmaktadır. β -karotenin yüksek biyoaktivitesi ve çeşitli endüstrilerdeki yaygın kullanımı, üretim yöntemlerinin gelişimini etkilemektedir [23].

Karotenoidlerin antiproliferatif etkileri, birçok tümör ve hücre hattında gösterilmiştir. β -karotenin MCF-7 meme kanseri ve H1299 akciğer kanseri hücrelerinin büyümesini baskıladığı, apoptozisini indüklediği; β -karoten, astaksantin, kapsantin, biksinin apoptozisi indükleyerek ve hücre döngüsü ilerlemesini etkileyerek K562 hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmada, likopen ve β -karotenin ESCC (özefagus skuamöz hücreli karsinom) hücrelerinde güçlü anti-proliferatif ajanlar olarak hareket edebildiği ve özofagus kanserinde diyet veya takviye stratejileri ile gelecekteki terapötik müdahaleler hakkında yeni bilgiler sunacağı öngörülmüştür [25].



Şekil 1.2. Beta-karoten molekülünün kimyasal yapısı [9].

Beyaz adipoz dokuda artan oksidatif stres, obezite ile ilişkili bozuklukların patogenezeine bağlıdır. Kısmen bu olaya adipositler tarafından üretilen ve salınan adipokinler aracılık eder. Adipoz doku tarafından üretilen yüksek oksidatif stres seviyesi bağışıklık sistemi hücrelerini toplayan ve daha kötü lokal iltihaplanmaya neden olan NF-KB, AP-1 ve STAT3 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu yoluyla bazı pro-enflamatuar adipokinlerin ekspresyonuna yol açmaktadır. Bu nedenle, adiposit türevli oksidatif stresin ve/veya enflamasyonun baskılanması, diyabet ve obezite ile ilişkili bozukluklar dahil olmak üzere enflamatuar komplikasyonların önlenmesi için terapötik bir hedef olarak düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, 3T3-L1 adipositlerinde β -karotenin anti-enflamatuar etkisinin olduğu gösterilmiştir [26]. Sonuç olarak β -karoten takviyesi adipoz doku kaynaklı enflamasyon, enflamatuar komplikasyonlarını önleyebilir ve inhibe edebilir. Sonuçlara benzer şekilde, antioksidan özelliklere sahip bir karotenoid olan likopenin NF-KB yolunu modüle ederek 3T3-L1 hücrelerinde TNF- α ile indüklenen enflamasyonu baskıladığı gösterilmiştir [27]. Karotenoidlerin anti-enflamatuar etkisi birçok *in vitro* ve *in vivo* modelde kanıtlandığı gibi antioksidan etkisine bağlanabilir. Elektrofilik gruplar içeren bazı karotenoidlerin, aktivasyonlarını inhibe etmek için NF-KB alt birimlerinin sistein kalıntıları ile doğrudan etkileştiği öne sürüldüğünden, ROT'ları temizlemenin yanı sıra enflamatuar araçlar üzerinde doğrudan etkisinin olduğu düşünülmektedir. Klinik çalışmalar, daha yüksek oranda karotenoid tüketiminin obezite ile ilişkili daha düşük enflamasyon düzeyleriyle bağlantılı olduğunu göstermiştir. Ayrıca, yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada obez grupların adipositlerindeki β -karoten konsantrasyonunun obez olmayan grupların adipositlerine kıyasla anlamlı düzeyde daha düşük olduğu bildirilmiştir [26]. Bu nedenle, olumsuz sağlık sonuçlarının önlenmesi için obez populasyon için gıda veya takviye yoluyla yeterli miktarda β -karoten alınması önemlidir [26].

Radyasyon ve bazı kimyasal ajanlar, genomik instabiliteye neden olan ve kanser oluşumunu aktive eden DNA lezyonlarını indüklemektedir. Bu mutajenlere maruziyet, ROT homeostazını bozarak DNA hasarını artıran ROT'ların aşırı üretimine neden olmaktadır. Modern dünyada bu tür zararlı radyasyona maruz kalma oranı daha sık hale gelmiştir. Yaygın olarak tüketilen meyveler, sebzeler ve içeceklerden elde edilen kimyasal önleyici fitokimyasallar, farklı mekanizmalarla antimutajenik ve/veya antioksidan aktivitesi sergilemektedir. Fitokimyasalların en yaygın radyokoruyucu etkisi, mutajenlere maruz kalma sırasında oluşan serbest radikallerin temizlenmesi; katalaz, glutatyon S-transferaz gibi antioksidan enzimlerin mRNA'larının aşırı ekspresyonuyla oksidatif stres ve DNA hasarından hücrelerin kurtarılmasını içermektedir. Çalışmalar, β -karoten'in γ -radyasyon ve UV radyasyonları da dahil olmak üzere radyasyona bağlı DNA hasarını önemli ölçüde azalttığını göstermektedir. β -karoten'in kromozomal hasara, mikronükleus ve lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağladığı bildirilmiştir [28].

Tüketiciler tarafından renk, gıdaların kalitesi ve güvenliğinin bir göstergesi olarak görülmektedir. İşlenmiş gıdaların ürün çeşitlerinin farklı tonlarla çekici bir şekilde renkli olması istenmektedir. Sentetik boyalar, görünümünü iyileştirmek ve daha çekici hale getirmek için gıdalara eklenmektedir. Ancak, bu boyalar duyarlılık ve karsinogenisite gibi sağlık sorunlarıyla sonuçlanabilmektedir. Bu nedenle, daha sağlıklı olması sebebiyle en yaygın doğal kaynaklı gıda renklendirici olarak geniş konjuge çift bağ dizisi ile güçlü bir kırmızı-turuncu renge sahip olan β -karoten (E160a, gıda katkı maddesi kodu) gibi doğal renklendiriciler tercih edilmektedir [29]. Her ne kadar β -karoten, esas olarak kimyasal sentezle sağlansa da, bu bileşiğin *Neurospora crassa* mantarı, *Candida utilis* ve *Saccharomyces cerevisiae* mayaları, *Escherichia coli* gibi mikroorganizmalarda sentezlenmesine büyük ilgi gösterilmektedir [30].

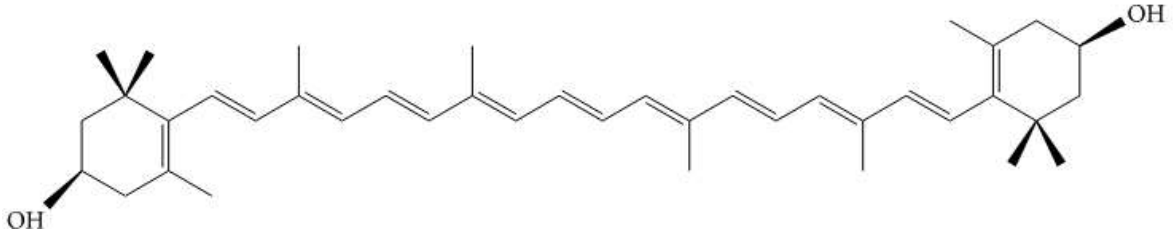
1.1.3. Zeaksantin

Zeaksantin bazı bitkiler, bakteriler ve algler tarafından sentezlenen ksantofil sınıfı, sarı renkli, $C_{40}H_{56}O_2$ formülüne sahip bir karotenoid moleküldür (Şekil 1.3) [31]. Zeaksantin 568.88 daltonluk bir moleküler ağırlığa sahiptir ve CAS numarası 144-68-3'dür. Zeaksantin kimyasal adı (all-E)-1,1'-(3,7,12,16-tetrametil-1,3,5,7,9,11,13,15,17-oktadekanonaien-1,18'-diyl)bis[2,6,6-trimetilsikloheksen-3-ol]'dür ve eş anlamlıları

şunlardır: 3R,3'R- β , β -karoten-3,3'-diol; all-trans- β -karoten-3,3'-diol; (3R, 3'R) dihidroksi- β -karoten; zeaxanthol; ve anchovyxanthin [32].

Yaşa bağlı makula dejenerasyonu (AMD), retinanın merkezi bölgesinde ilerleyici ve dejeneratif bir hastalık olup ciddi görme bozukluğu ile sonuçlanmaktadır. Özellikle gelişmiş ülkelerde 50 yaş üstü insanlar arasında geri dönüşümsüz görme kaybının önemli bir nedenidir. Nüfusun ortalama yaşı arttıkça sonraki 30 ila 40 yıl içinde dünyada AMD hastalarının sayısının 60 ila 75 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir. AMD'nin patojenik mekanizması tam tanımlanmamıştır. Başlayan oksidatif hasar ve makula pigmentinin (MP) azalmasının bu hastalığa neden olan mekanizmalar olduğu düşünülmektedir. MP'nin bileşenleri lutein, zeaksantin, mezo-zeaksantindir ve yapılan bir çalışmada lutein, zeaksantin, meso zeaksantin desteğinin erken AMD hastalarında makuler pigment optik dansitesini artırabildiğini göstermiştir. Bu nedenle, karotenoidler açısından zengin ek besinlerin günlük alımı erken AMD riskini azaltabilir [33]. Bu karotenoidlerin bir diğer önemli rolü serbest oksijen radikalleri tarafından oluşan ışık kaynaklı oksidatif strese karşı koruma sağlayarak makulada bulunan fotoreseptörlerin korunmasını sağlamalarıdır [34].

Lutein ve zeaksantin, retinadaki iki ksantofil karotenoid olmasının yanında her ikisi de insan cildinde önemli miktarda bulunmaktadır. Gözlerde olduğu gibi ciltte de bu karotenoidler, zararlı mavi dalga boylarını ve serbest radikal hasarını önlemek için antioksidanlar olarak görev yapmaktadır. 10 mg lutein ve 2 mg zeaksantin izomerleri içeren günlük oral takviyesinin değerlendirildiği bir çalışmada 12 hafta içinde ortalama minimal eritem doz değerinin arttığı ve cilt tonunun, parlaklığının, renginin önemli ölçüde iyileştiği sonucuna ulaşılmıştır. Diğer çalışmalar, lutein ve zeaksantin keratinositleri UV radyasyonu ile indüklenen erken yaşlanmadan koruduğunu, matriks metalloproteazları inhibe ederek ekstrasellüler matriks bozunmasını durdurduğunu ve deride lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermiştir. Bu çalışmalar, lutein ve zeaksantin oral takviyesi, topikal uygulama veya her ikisinin birlikte uygulanması ile ciltte yararlı etkileri için değerlendirebileceğini göstermektedir [35]. Ayrıca, lutein ve zeaksantin diyetle yüksek miktarda alımı ile deri kanseri insidansının düşmesi ilişkilendirilmiştir [17].



Şekil 1.3. Zeaksantin molekülünün kimyasal yapısı [9].

Zeaksantin antidiyabetik aktivitelerinin yüksek yağlı, yüksek şekerli diyet, streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçan modeli kullanılarak araştırıldığı çalışmada zeaksantin, azaltılmış vücut ağırlığı ve artırılmış açlık kan şekerini güçlü bir şekilde normalize ettiği; hipoglisemik, hipolipidemik, antidiyabetik nefritik etkiler ürettiği ve T2DM adjuvan tedavisine aday olarak desteklenmesi için deneysel kanıt sağladığı gösterilmiştir [36].

Sentetik pigmentlerde görülen toksik etkiler nedeniyle doğal pigmentlerin üretimi gıda, ilaç, kozmetik, tekstil gibi alanlarda giderek artan bir öneme sahip olmaktadır ve zeaksantin toksik ve mutajenik etkilerinin olmaması gıda maddeleri ve kozmetik ürünlerin renklendirilmesinde kullanılabilen doğal bir pigment olmasını sağlamaktadır [37]. Zeaksantin, bir gıda ve yem katkı maddesi olarak balıklar (et için renk artışı) ve kümes hayvanları (yumurta sarısı ve deri pigmentasyonu) için kullanılmaktadır [38]. Avrupa Birliği'nde zeaksantin (E 161h), kümes hayvanlarında pigmentasyon amaçlı gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır [2].

Doğal zeaksantin sarı renkli mısır, mango, pembe greyfurt, kayısı, şeftali, kavun, avokado, marigold çiçekleri gibi sebze ve meyvelerden elde edilebilir. Kimyasal olarak sentezlenen zeaksantin piyasada ağırlıklı olarak bulunsa da düşük aktivitesi nedeniyle gıda katkı maddesi veya farmasötik olarak değil, bir pigment olarak kullanılmaktadır [38]. *Flavobacterium* sp., *Erwinia herbicola*, *Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens*, *Zeaxanthinibacter enoshimensis*, *Muricauda luteonensis* bakterileri ve *Dunaliella salina*, *Chlorella saccharophila*, *Neosporangium*, *Microcystis aeruginosa* algleri doğal zeaksantin üreticisi mikroorganizmalar olarak alternatif bir zeaksantin kaynağıdır [32, 39]. Ayrıca son yıllarda zeaksantin *S. cerevisiae* mayaları, *E. coli* gibi mikroorganizmalarda sentezlenmesine büyük ilgi gösterilmektedir.

1.2. Metabolik Mühendisliği

Metabolik mühendisliği, genetik mühendisliği ve moleküler biyoloji uygulamalarının yoğun bir gelişme, araştırma sürecinin ardından 1990'lı yılların başında ortaya çıkmıştır. Bu süreci takiben rekombinant teknoloji kullanılarak kimyasalların, farmasötik ürünlerin aşırı üretimi amacıyla metabolik yolların düzenlenmesi olarak tanımlanmıştır. Genetik mühendisliği yöntemlerini kapsamlı bir şekilde kullanmasına rağmen metabolik mühendisliği zamanla bu iki alanı farklılaştıran özelliklere sahip olmuştur. Metabolik mühendisliği bireysel gen ve enzimlerin aksine entegre metabolik yolların ve genetik düzenleyici ağların araştırılması üzerine odaklanmıştır. Sentetik biyoloji ve sistem biyolojisi tekniklerinin de bu alanda kullanılmasıyla metabolik mühendisliği terimi günümüzde oldukça geniş bir kapsama ulaşmıştır [40].

Sentetik biyoloji biyoloji, kimya, bilgisayar bilimi, mühendislik bilgilerini ve tekniklerini birleştirerek yeni sentetik sistemler oluşturmak için genetik parçaları kullanmaya odaklanan disiplinler arası bir alandır [41, 42]. Sentetik biyoloji yeni biyomoleküler bileşenleri, ağları, yolları tasarlamak ve inşa etmek için mühendislerle biyologları bir araya getirmektedir ve bu yapıları organizmaları yeniden programlamak için kullanmaktadır [43]. Sentetik biyoloji başlığı 1980'lerde literatürde rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak genetik olarak değiştirilmiş bakterileri tanımlamak için kullanılmıştır. Bu bakteriler, insan müdahalesi ile yani sentetik olarak değiştirilen canlı sistemlerdir. 2000'lerde sentetik biyoloji terimi, canlı sistemlerde işlev gören doğal olmayan organik moleküllerin sentezini tanımlamak için daha geniş anlamıyla organizmalarda yaşamı yeniden tasarlama çabalarına atıfta bulunularak kullanılmıştır [44]. Sentetik biyolojinin son 15 yıldaki hızlı gelişimi, DNA dizilerinin mühendisliğine, genetik devrelerin tasarlanmasına, genomların sentezlenmesine ve hatta hücre akıbetinin yeniden programlamasına imkan sağlamıştır. Bu genç ve yeni ortaya çıkan alan biyoenerji, biyofarmasötikler, biyoremediyasyon ve rejeneratif tıp da dahil olmak üzere çeşitli uygulama alanlarında büyük potansiyel göstermiştir [45].

Sentetik biyoloji ve metabolik mühendisliğindeki gelişmeler yakıtlar, kimyasallar ve yenilenebilir hammaddelerden üretilen ilaçlar da dahil olmak üzere biyo-bazlı ekonomi için büyük bir gelecek yaratmaktadır. Çeşitli miktarlarda ürün üretmek için yolak genleri başarılı bir şekilde ifade edilebilmektedir, ancak titre, oran ve verim optimize edilene kadar

maliyete uygun bir işlem gerçekleştirilememektedir. Dolayısıyla birkaç ay içinde işlevsel bir yolak oluşturulabilse de ticari bir süreci destekleyebileceği noktaya kadar geliştirmek daha uzun sürebilmektedir. Bu durum, metabolik mühendisliğinde yolak tasarımı, inşası ve optimizasyonunu hedef alan temel unsurların önemini göstermektedir [46]. Bu temel unsurların iyileştirilmesinde genomik bilgilerin, veritabanlı bilgi birikiminin artmasından moleküler ve genetik tekniklerin gelişmesine kadar birçok faktör etkili olmuştur.

Sekonder metabolitler bitkiler, bakteriler, mantarlar ve diğer organizmalar tarafından sentezlenen, yaşam için gerekli olmayan ancak üretici organizmaya evrimsel avantaj sağlayan moleküllerdir. Sekonder metabolitler yapısal olarak büyük bir çeşitlilik göstermektedir ve oldukça geniş biyolojik aktivitelere sahiptir. Bu biyolojik aktiviteler çeşitli endüstriyel ve farmasötik uygulamalarda sekonder metabolitlerin kullanılmasını sağlamaktadır ve metabolik mühendisliği bu değerli moleküllerin verimli üretimleri için güçlü stratejiler sunmaktadır. Bakteriyel genomların biyosentetik potansiyelinin farmasötik uygulamalardan tarıma kadar çeşitli alanlarda sekonder metabolitler de dahil olmak üzere yüzbinlerce karmaşık molekülü üretmek için uygun olduğu bilinmektedir [47, 48]. Bu moleküllerin doğal üreticisindeki sentezi karmaşık genetik sistemler aracılığıyla kontrol edilen birçok gen tarafından gerçekleştirilmektedir. Sentetik biyolojide yer alan DNA düzenleme teknolojileri, hassas gen ifadesi için genetik parçalar, sentetik düzenleyici devreler, bilgisayar destekli tasarım ve multipleks genom mühendisliği gibi alanların metabolik mühendisliğindeki uygulamaları, istenilen ürüne yalnızca dizi bilgisine dayanarak erişilebilen bir döneme geçişi sağlamaktadır [47].

1.2.1. Mikrobiyal Metabolik Mühendisliğinde Tasarımsal Süreçler

Mikroorganizmalar gıda ve farmasötik endüstrileri için kullanılabilirliğinin kanıtlandığı, istenen ürünlerin biyosentezi için yararlı platformlardır. Mikroorganizmalar ucuz karbon kaynaklarında hızlı bir şekilde büyürler, kültür büyüklüğü üretimi büyütme için kolayca artırılabilir ve mikroorganizmaların doğal metabolik yollarından önemli bileşikler elde etmek için faydalanılabilir [49]. Mikrobiyal üretimin ilk uygulamaları amino asitler, alkoller, organik asitler, yağ asitleri veya antibiyotikler gibi doğal metabolitlerle sınırlanmıştır. Genetik ve metabolik mühendisliğin gelişimi biyoyakıtlar, farmasötikler, biyopolimerler, özel kimyasallar dahil olmak üzere çok sayıda ve çeşitli moleküllerin

üretimini mümkün kılmıştır. Tanımı gereği metabolik mühendisliği, endojen ve/veya heterolog enzim aktivitelerinin değiştirilmesi, istenen moleküllerin biyosentezini veya biyokatalizini elde etmek için hücresel metabolizmanın inşasını, yeniden yönlendirilmesini ve manipülasyonunu içeren alandır. Dolayısıyla hedef ürün için mikrobiyal fabrika olarak da tanımlanan hücrelerin tasarımı, bu ürünün sentezinde yer alan metabolik reaksiyonların, metabolik verimi etkileyen düzenleyici elemanların ve hücresel metabolizmadaki bağlantıların analizini gerektirmektedir [50].

Metabolik mühendisliği için değerlendirilmesi gereken faktörler şunlardır: Substrat alım hızının artırılması ve çoklu karbon kaynaklarının birlikte tüketilmesi (hedef metabolit üretim hızının artırılması için); *E. coli*, *S. cerevisiae*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis* gibi uygun konak organizmaların seçimi; mevcut karbon kaynağından hedef metabolite kadar olan metabolik yolağın ilgili konakta analizi, rekombinant DNA teknolojisi ile heterolog yolakların yapılandırılabilirliği; istenmeyen yan ürünlere olan metabolik akışın indirgenmesi; öncül metabolit üretiminin gerekli kofaktör üretimi ile birlikte geliştirilmesi; hedef metaboliti ekstrasellüler ortama vermek için hücresel taşıyıcıların modülasyonu; metabolik regülasyon mekanizmasının hem enzimlerin allosterik regülasyonu hem de global regülatörler tarafından transkripsiyonel düzenlemeyle anlaşılması; istenen yolaklar ve konak organizma için güvenilir, duyarlı genetik kontrol sistemi, seçilen yolakları kapatmak için yöntemler; verimi, titreleri ve üretkenlikleri en üst düzeye çıkarmak için etkili yöntemlerin denenmesi [51]. Bu tasarımsal kararlar; istenen ürünü veren reaksiyonun biyolojik koşullar altında termodinamiksel olarak gerçekleşebilir olması, aktarılan genin konakta ifade edilebilir olması ve gen ürününün işlevsel olması, ürün veya ara metabolitlerin konak için toksik olmaması faktörleri nedeniyle önemlidir. [52].

Konak Mikroorganizma Seçimi

Metabolik mühendisliği kavramı olarak konak suş bir mühendislik yapısını oluşturmak üzere bir araya getirilen diğer bileşenlerin eklenmesini destekleyen fiziksel bir iç çerçeve veya yapı olarak düşünülmektedir [53]. Doğal üretici suшта verimi artırmak için metabolik mühendisliği manipülasyonları uzun bir geçmişe sahiptir ve genetik olarak manipüle edilebildiği sürece doğal üreticinin mühendisliği uygulanabilir bir seçenektir. Bir diğer

seçenek gerekli metabolik yolağın yeni bir konakta yapılandırılmasıdır. Birçok doğal üretici organizmanın kültürü veya manipülasyonu zor olmakla birlikte heterolog ekspresyon genetik olarak manipüle edilebilen, güvenli ve ucuz kültürlenmeye uygun konak suş kullanımına izin vermektedir [48]. Sentetik biyoloji açısından bakıldığında, suş tasarımının metabolik ortam, enerji kaynakları, transkripsiyon ve translasyon mekanizmalarının sağlanması da dahil olmak üzere diğer asgari hücresel işlevlerin yanı sıra sentetik bir sistemin yürütülmesini sağlayan bir araç olduğu anlaşılmaya çalışılmaktadır. Bu nedenle suş seçimi, özellikle suş sentetik bir sistemin davranışını ve işlevini doğrudan etkileyeceğinden kritik bir tasarım kararıdır. Konak suş mevcut olan biyolojik parçalarla uyumlu olması gerektiğinden hangi biyoparçaların kullanılabileceğini belirlemektedir. Suş, ortogonalitesini optimize eden ve yükü azaltan gen nakavtlarıyla ya da kodon optimizasyonu yoluyla tasarlanabilir. Konak seçimi herhangi bir sentetik sistem için alt tasarım koşullarını belirlemektedir ve seçim stratejisinin uygun olduğunu rasyonel hale getirmek için her bir stratejinin avantajlarının dikkate alınması önemlidir. Bir suş ile ilgili ayrıntılı biyolojik bilgiye erişim, modelleme çabalarına ve metabolik yük veya akış etkileriyle başa çıkmak için optimizasyon stratejilerinin uygulanmasına yardımcı olmaktadır [53].

Biyosentetik üretim için mikrobiyal konak seçimi organizmanın kullanım uygunluğuna bağlıdır. Kolayca kültürlenebilen, bilinen bir genom dizisine sahip, genetik manipülasyona uygun ve metabolik yolları anlaşılmış bir mikroorganizma seçimi gerekmektedir. Bu anlamda en sık kullanılan model organizmalar *E. coli* ve *S. cerevisiae* bu kriterleri karşılamaktadır ve ürün verimini artırmak için çeşitli yeniden programlama stratejileri için uygundur [49]. Yaygın olarak kullanılan bazı konak mikroorganizmalar ve özellikleri Tablo 1.1’de verilmiştir.

E. coli, endüstriyel biyoteknoloji için oldukça önemli bir mikroorganizmadır. Yaklaşık çeyrek asır öncesinde oldukça önemli uygulamalarla *E. coli*’de amino asit L-treoninin aşırı üretimi ve insan insülininin ilk rekombinant sentezi gerçekleştirilmiştir. Sistem biyolojisi ve sentetik metabolik mühendisliği, konak mühendisliğini bir tasarım bilimine yükseltmiş ve dikkate değer sentetik özelliklere sahip suşlar üretmiştir. Gelişim aynı zamanda, endüstriyel biyoteknolojinin en değerli pazarları olan terapötikler, prebiyotikler, nutrasötikler, pigmentler gibi üstün özelliklere ve yüksek değerlere sahip moleküllere başarıyla uygulanmıştır. *E. coli*’nin rekombinant suşları mikroorganizma, bitki, mantar ve

hayvan kökenli kompleks sekonder metabolitlerin yanı sıra spesifik biyo-polimerler için hücre fabrikalarına başarılı bir şekilde dönüştürülmüştür. Böylece daha önce sadece doğal kaynaklarından ayrıntılı proseslerle elde edilebilen bir ürün yelpazesine erişim sağlanmıştır. *E. coli* ile heterolog üretim; patojenler, kültüre alınması zor organizmalar, daha yüksek bitki ve hayvanlar tarafından doğal olarak üretilen moleküller için güvenilir bir konak olarak da bilinmektedir. *E. coli* genomu, endüstriyel üretim amaçları için cazip özellikler sunan, zengin bir yolak repertuarı içermektedir. *E. coli*'nin çeşitli suşları, metabolik çok yönlülüğünün yanı sıra hızlı büyüme oranına sahiptir [50, 54, 55]. Günümüzde, genetik mühendisliği için geniş bir moleküler araç seti *E. coli*'nin ürün çeşitliliğinin geleneksel ürünlerin çok ötesinde etkileyici bir şekilde genişlemesini sağlayan metabolik yolların hedeflenen modifikasyonuna izin vermektedir [55].

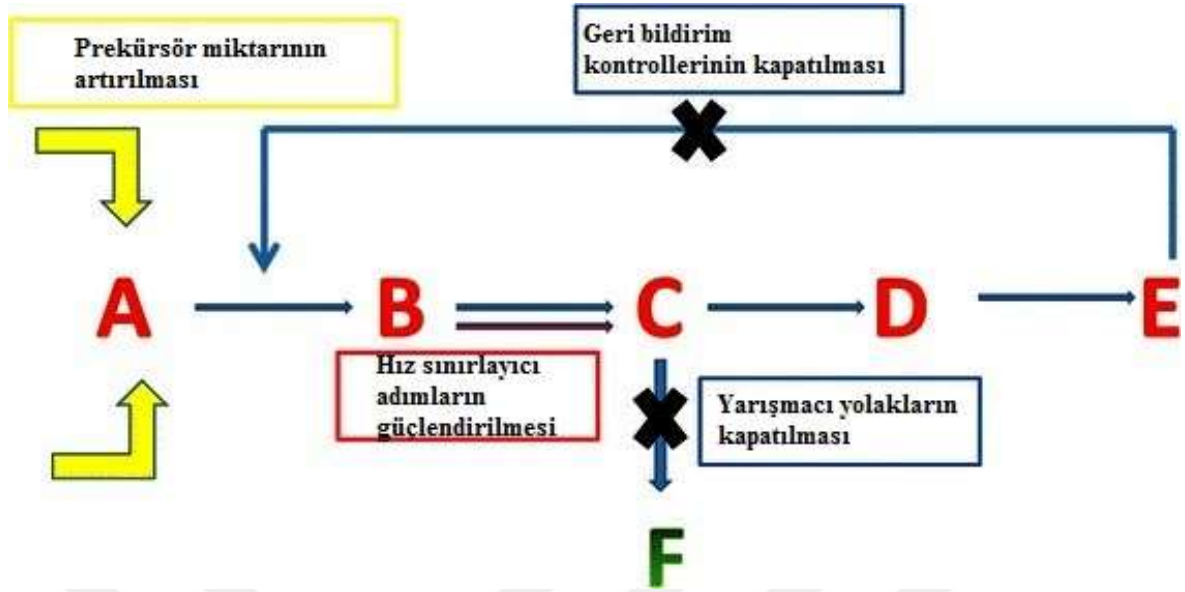
Tablo 1.1. Metabolik mühendisliğinde kullanılan bazı konak mikroorganizmalar ve özellikleri [54].

Organizma	Olumlu/olumsuz özellikleri
<i>Clostridium sp.</i>	Gen nakavt ve yüksek ekspresyon teknikleri mümkün fakat büyümesi ve mühendislik koşulları zor olabilir. Büyümeyi sürdürmek için lignoselüloz ve CO ₂ de dahil olmak üzere çok çeşitli kompleks substratları kullanma becerisine sahiptir.
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Köklü bir endüstriyel atölyedir, işlenmesi için genetik araçlar kullanılabilir.
<i>Escherichia coli</i>	En iyi tanımlanmış prokaryot organizmadır, endüstriyel sektörde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Uygun genomik araçlar ve sistem biyolojisi veri setleri yaygın olarak mevcuttur.
<i>Myxococcus xanthus</i>	Mikozobakteri, poliketid ve deltaproteobakteri sentez yolları için etkin bir konaktır.
<i>Pseudomonas putida</i>	Kolay kültürlenebilme, iyi tanımlanmış transformasyon teknikleri, hızlı büyüme özelliklerine sahiptir. Homolog rekombinasyon ve post-translasyonel modifikasyonlar yapabilen; <i>E. coli</i> ile değiştirilebilir genetik elementlere sahip bir organizmadır.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	İyi karakterize edilmiştir ve endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır. Genomik araçlar ve sistem biyolojisi veri setleri yaygın olarak bulunmaktadır. Anaerobik fermantasyonda zorluklar görülmektedir.

Yolak Yapılandırması

Konak hücrenin mühendisliği, metabolit üretimini hedefleyen mikrobiyal platformların tasarlanması için güçlü bir araç olarak ortaya çıkmıştır. Bu alandaki büyük başarılar arasında izoprenoidler, şikimik asit, izobutanol, amino asitler, artemisin, likopen ve birçok metabolitin üretimi bulunmaktadır. Temel amaç, bu metabolitlerin biyosentez yolağını oluştururken yolaktaki birçok adımı mühendislik yaparak yeniden tasarlamak olmuştur. Bu amaç için gen insersiyonu ve delesyonu, promotor mühendisliği, kritik genlerin ekspresyonunu artırma, enzim mühendisliği gibi birçok teknik birleştirilmiştir. Ürüne giden metabolit akışını bir yolak boyunca güçlendirmek için yaygın olarak kullanılan stratejiler arasında yolaktaki hız sınırlayıcı basamaklardan akışın artırılması, öncül miktarını artırmak, yan ürün oluşumuna neden olan dallanmış yolları engellemek ve yolaktaki geri bildirim kontrollerini kaldırmak sayılabilir (Şekil 1.4) [56]. Örneğin, *E. coli*'de glukozdan 1,3-propandiol üretimi için yapılan mühendislik çalışmaları ürün verimini artırmıştır. Doğal olarak gliserolden üretilen bu bileşiğin sentezinde gliserol önce gliserol dehidrataz ile 3-hidroksipropionik asite daha sonra bir oksidoredüktaz ile 1,3-propandiole dönüştürülmektedir. Glukozdan üretimi kolaylaştırmak için rasyonel yaklaşımların bir kombinasyonu uygulanmıştır. İlk olarak, gliserolün merkez metabolizmaya yeniden katılmasını önlemek için verimi azaltan reaksiyonların yok edilmesi gerçekleştirilmiştir. İkinci olarak, glukoz fosfotransferaz sistemi kaldırılmıştır. Bu sistem PEP-bağımlıdır ve ATP temelli alternatiften daha az enerjiktir. Son olarak, ekspresyon seviyesi değişimi için birkaç farklı enzim kullanılmıştır. Bu modifikasyonlarla birlikte üretilen 1,3-propandiol miktarı 3.5 g/l iken %51 verimle 135 g/l'ye ulaşmıştır [46].

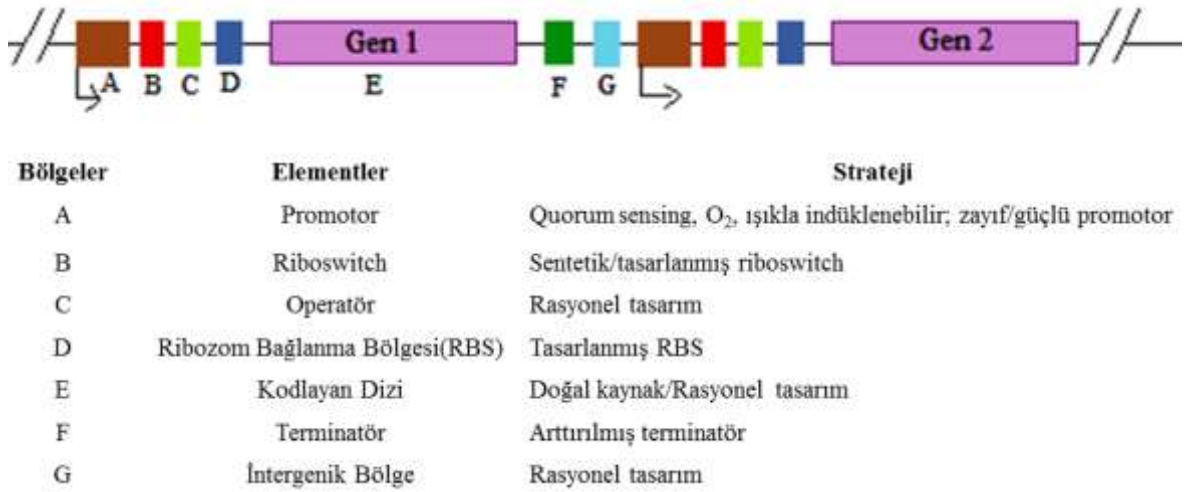
Biyosentetik yolak mühendisliğinin temel zorluğu mikrobiyal konakta istenen bileşiklerin optimize üretkenliği için birçok heterolog yolak enzim seviyelerinin ve aktivitelerinin dengelenmesindedir [42]. Bu enzimlerin sentezlenmesindeki dengesizlik, toksik ara ürünlerin birikimi ve hücre büyümesi inhibisyonu nedeniyle ürün veriminin düşmesiyle sonuçlanır [57]. Yolak optimizasyonu enzimlerin yeterli ekspresyonunu sağlamak ve bunu yaparken konağa aşırı metabolik yük koymamak, yolak akışını optimize etmek için gereklidir. Sentetik biyoloji, yolak yapımını ve optimizasyonunu destekleyen yeni teknikler sağlayarak biyosentez yeteneklerinde ilerlemeler sağlamaktadır.



Şekil 1.4. Yolak akışının optimizasyonu için metabolik mühendisliği stratejileri [56].

Bir metabolik yolağın optimize edilmesi için enzimlerin ifadesinin dengelenmesi temel faktör olarak görülmektedir. Enzimlerin ekspresyonunu düzenleyerek bir yolağın optimizasyonu farklı seviyelerde gerçekleştirilebilir [57]. Biyosentetik yolaklarda enzim ekspresyonunun düzenlenmesi ise farklı genetik parçaların bileşimini gerektirmektedir. Vektörlerin replikasyon kaynağı değiştirilerek genlerin DNA kopya sayısı ve ribozom bağlama bölgeleri (RBS'ler), promotorlar ve terminatörler gibi karakterize edilmiş genetik kontrol elemanları ve bu kontrol elemanlarının öngörülebilir bir şekilde davranabilmeleri için gereken dereceleri ayarlanarak enzim ifadesinin seviyelerinin düzenlenmesi aracılığıyla bir yolağın optimizasyonu gerçekleştirilebilir (Şekil 1.5) [58, 59]. İlk seviye, vektörlerinin replikasyon kaynağını değiştirilerek genlerin DNA kopya sayısını modüle etmek olup >100 kat arasında değişebilir. İkinci seviye, genlerin kontrol elemanlarını (örn., promotor, RBS) ayarlamaktır. Bir promotor kütüphanesi transkripsiyon seviyesinde enzim ekspresyonunu yüzlerce kattan daha fazla değiştirebilirken, bir RBS kütüphanesi translasyon seviyesinde 100,000 katına kadar enzimlerin ekspresyonunu değiştirebilir [59]. Bunların yanında kodon optimizasyonu, özellikle sentetik biyoloji ve metabolik mühendisliği çalışmalarında heterolog gen ekspresyonunu geliştirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır [60]. Kodon optimizasyonu kodon kullanım sıklığının farklılıklar göstermesi nedeniyle gerekmektedir. 20 çeşit amino asidi kodlamak için 61 trinükleotid

kodonu kullanılır. Metionin ve triptofan yalnızca bir kodon tarafından kodlanırken, diğer 18 amino asidin her biri 2-6 sinonim kodon tarafından kodlanır. Sinonim kodonlar aynı amino asidi kodlamaktadırlar ve bu nedenle herhangi birinin kodlama yapması amino asit dizilimini değiştirmemektedir. Organizma tarafından sinonim kodonlardan belli bazılarının tercih edilmesi kodon kullanım sıklığı olarak adlandırılmaktadır [61]. Heterolog gen ifadesi için aktarılan gende nadir bulunan kodonların varlığı, translasyon hızını düşürebilir ve rekombinant mikrobiyal üretim süreçleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olan translasyon hatalarını indükleyebilir. Gen tasarımı ve kodon optimizasyonu için son on yıldır temelden ileri seviyeye kadar birçok web tabanlı uygulama geliştirilmiştir. Codon optimizer, Gene Designer ve OPTIMIZER gibi yazılım uygulamalarının çoğunda kodon sıklıklarına göre dizi düzenlemesi yapılmaktadır [62, 63]. Kodon optimizasyonu, rekombinant DNA ekspresyonunu sağlayan önemli bir sentetik biyoloji aracıdır. Kodon optimizasyonu istenilen ürünün etkin ve verimli eldesi için mikrobiyal biyoteknolojik süreçte oldukça önemlidir.



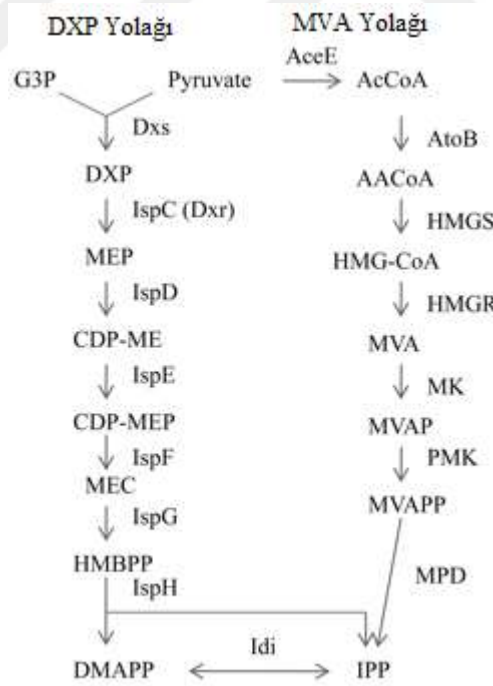
Şekil 1.5. Metabolik mühendisliği için protein kodlayan gen içerisindeki olası hedef bileşenler [64].

1.3. Mikrobiyal Metabolik Mühendisliği Yaklaşımıyla Karotenoid Üretimi

Sekonder metabolitler, biyolojik olarak aktif bileşiklerin keşfedilmesi için bir hazinedir, ve insan ihtiyacına yönelik talepleri karşılamak için mikrobiyal hücreler, doğal kaynağından ekstraksiyon veya kimyasal sentez yöntemlerine alternatif olarak kompleks sekonder metabolitlerin (bitki, mantar veya mikroorganizma kökenli) aşırı üretimi için tasarlanabilmektedir. Doğal ekstraksiyon ve kimyasal sentez yoluyla üretim sınırlı miktarda, düşük verimliliktedir. Ayrıca bu yöntemlerin çevre kirliliğini artırması nedeniyle ihtiyaçların gerisinde kalmaktadır. Mikrobiyal sistemler bu kompleks bileşiklerin üretimi için çeşitli avantajlara sahiptir: düşük maliyet, kolay genetik manipülasyon, büyük ölçekli üretim, kirliliğin olmaması [65]. Metabolik mühendisliği, endüstriyel mikrobiyal konaklarda terpenoidler, flavonoidler, alkaloidler dahil olmak üzere çeşitli bileşiklerin üretimi için bitki ve mantar gibi farklı sistemlerden sentetik genleri kullanarak yüksek miktarda üretim gerçekleştirebilmektedir [66]. Özellikle *S. cerevisiae* ve *E. coli*'de çeşitli sekonder metabolitlerin üretimleri gerçekleştirilmiştir (Tablo 1.2).

Karotenoidler, terpenoidler olarak da bilinen izoprenoid sınıfı bileşenlerdir ve bütün izoprenoidler beş karbonlu prekürsör birimleri isopentenil-pirofosfat (IPP) ile izomeri olan dimetilalil pirofosfat (DMAPP)'den sentezlenmektedir. IPP ve DMAPP iki farklı yolla sentezlenebilmektedir: mevalonat (MVA) yolağı ve DXP yolağı olarak da bilinen metileritritol-4-fosfat (MEP) yolağı. MVA yolağı birçok ökaryotta, arkede, bazı bakterilerde, bitkilerin sitozolde ve mitokondrilerinde bulunurken MEP yolağı birçok bakteri, bitki kloroplastları, alg ve apikompleksan parazitlerinde bulunmaktadır. İki yolağın öncüller, reaksiyon adımları, enerji tüketimi, anahtar enzimler vb. bakımından oldukça farklıdır. MVA biyosentetik yolağı, 3-hidroksi-3-metil-glutatil-CoA (HMG-CoA) oluşturmak için üç molekül asetil-CoA molekülünün birbirini izleyen iki kondenzasyon reaksiyonu ile başlamaktadır. Daha sonra HMG-CoA MVA'ya indirgenmektedir. İki ardışık fosforilasyon adımının ardından MVA, mevalonat-5-difosfata dönüştürülmektedir ve daha sonra IPP elde etmek için katalizlenmektedir. IPP ve DMAPP'nin ara-çeviriminden IPP izomerazı sorumludur. MEP yolağında ise IPP ve DMAPP sentezi yedi enzimin aktivitesine dayanmaktadır. Reaksiyon, 1-deoksi-D-ksilüloz-5-fosfat (DXP) üretmek üzere piruvat ve gliseraldehit-3-fosfatın (G3P) yoğunlaşması ile başlamaktadır. Bir indirgeme ve izomerizasyon ile 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat (MEP) DXP'den 1-

deoksi-D-ksiluloz-5-fosfat redüktoizomeraz (DXR/IspC) ile katalize edilerek oluşmaktadır. MEP, 2C-metil-D-eritritol-4-fosfat siktililtransferaz (IspD) için bir substrat olarak görev almaktadır ve 4-difosfositidil-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME)'ye dönüştürülmektedir. CDP-ME, 4-difosfositidil-2C-metil-D-eritritol kinaz (IspE) ile 4-difosfositidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfat (CDP-MEP)'e fosforile edilmektedir. CDP-MEP'in 2-Metil-D-eritritol-2,4-siklodifosfat (MEcPP)'ye siklizasyonu, 2C-metil-D-eritritol-2,4-siklodifosfat sentaz (IspF) ile katalize edilmektedir. MEP yolağının son iki aşamasında MEcPP, 1-hidroksi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfat sentaz (IspG) ile 4-hidroksi-3-mehtil-bütenil 1-difosfat (HMBPP) haline dönüştürülmektedir. Son olarak HMBPP, IPP ve DMAPP oluşturmak üzere 4-hidroksi-3-metil-2-(E)-butenil-4-difosfat redüktaz (IspH) ile katalizlenmektedir [65]. Bu iki yolağın MEP yolağı, MEV yolağından enerjik olarak daha dengeli ve etkilidir [67]. *E. coli*'de bulunan doğal MEP yolağı ve heterolog MVA yolağı Şekil 1.6'da gösterilmiştir.



Şekil 1.6. *E. coli*'de doğal DXP yolağı ve heterolog MVA yolağı [68].

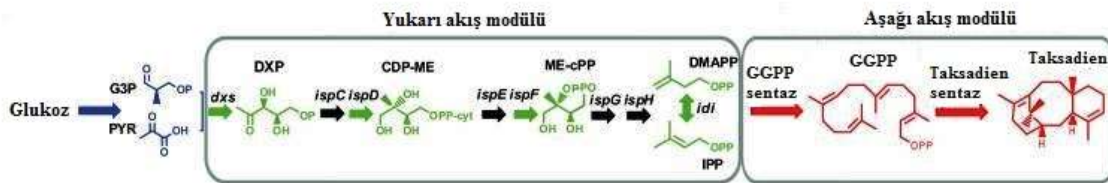
Tablo 1.2. Metabolik mühendisliği yaklaşımı ile *S. cerevisiae* ve *E. coli*'de sentezi gerçekleştirilen bazı sekonder metabolit örnekleri

Sekonder Metabolit	Sınıfı	Konak mikroorganizma	Başlangıç substratı	Miktarı
Likopen	Terpen	<i>S. cerevisiae</i>	glukoz	54.63 mg/g [69]
β -karoten	Terpen	<i>E. coli</i>	glukoz	60 mg/g [70]
Zeaksantin	Terpen	<i>E. coli</i>	glukoz	43 mg/l [39]
Astaksantin	Terpen	<i>E. coli</i>	glukoz	7.4 mg/g [71]
Tebain	Alkaloid	<i>S. cerevisiae</i>	glukoz	6.4 μ g/L [72]
Retisülin	Alkaloid	<i>S. cerevisiae</i>	glukoz	19.2 μ g/L [73]
Noskapin	Alkaloid	<i>S. cerevisiae</i>	norlaudanosolin	1.64 μ m [74]
Kodein	Alkaloid	<i>S. cerevisiae</i>	tebain	7.7 mg/l [75]
Morfin	Alkaloid	<i>S. cerevisiae</i>	tebain	4.7 mg/l [75]
Kurkumin	Fenolik	<i>E. coli</i>	ferulik asit	113 mg/l [76]
Naringenin	Fenolik	<i>E. coli</i>	<i>p</i> -kumarik asit	474 mg/l [77]
Pinosembrin	Fenolik	<i>S. cerevisiae</i>	sinnamik asit	16.3 mg/l [78]
Resveratrol	Fenolik	<i>S. cerevisiae</i>	glukoz	800 mg/l [79]
Resveratrol	Fenolik	<i>E. coli</i>	<i>p</i> -kumarik asit	2.3 g/l [80]

Doğa, terapötik olarak aktif bileşikler için bir hazine sandığı ve renklerin çeşitliliği olarak bilinir. Metabolik açıdan bakıldığında, bu çekici özelliklerin birçoğu terpenoidlerle ilişkilidir ve tek bir öncülden kaynaklanmaktadır: IPP. *E. coli*, IPP tabanlı farklı moleküller için bir üretim platformu olarak değerli olduğunu kanıtlamıştır. Merkezi bir mühendislikle terpenoid-omurga biyosentetik yolağı olan *E. coli* suşları kullanılarak çok çeşitli bileşikler üretilabilir hale gelmiştir. Farklı terminal yollara farklı ilerleme yolu ile geranil pirofosfat (GPP), farnesil pirofosfat (FPP) ve geranilgeranil pirofosfat (GGPP) gibi ortak

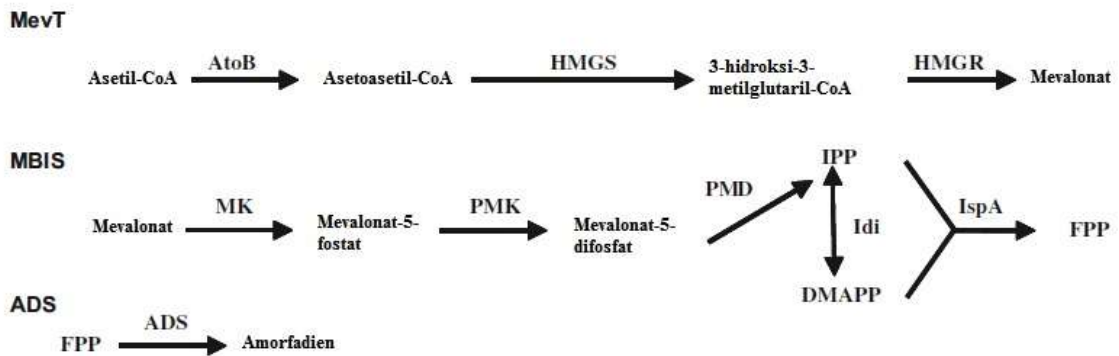
terpenoid yapı blokları, monoterpenler, seskiterpenler, diterpenler ve karotenoidler sentezlenebilmektedir [55].

Taxus brevifolia tarafından üretilen paclitaxel (taksol), antikanser aktivitesi olan bir diterpendir. *E. coli*'de antikanser taksol prekürsörlerinin üretimini optimize etmek için metabolik mühendisliği uygulaması olarak önemli ve etkin bir yöntem olan “çok değişkenli modüler mühendislik” yaklaşımıyla metabolik akışın geliştirilmesi hedeflenmiştir. İzoprenoid biyosentetik yolağı, öncül sağlayan doğal bir yukarı akış modülü ve izoprenoidi üreten heterolog bir aşağı akış modülü olarak iki modüle ayrılarak optimum yolak dengesi elde edilmiştir (Şekil 1.7). Öncül moleküller DMAPP ve IPP'nin üretimi için gerekli olan sekiz doğal genin dördü, bir operona indüklenebilir promotorla klonlanmıştır ve doğal MEP yolağından verim artışı görülmüştür. Fazla öncüller heterolog olarak ifade edilen GGPP sentaz ve taksadien sentazı içeren ikinci modüle yönlendirilmiştir. Böylece, altı genle çalışmak yerine sistemin iki modüle indirgenmesi sistemi basitleştirmiştir ve sistem daha işlevsel hale gelmiştir. Bu yaklaşım kullanılarak her biri modül ekspresyonunu yönlendiren promotorlar ve modüllerin sentezlendiği plazmidlerin kopya sayıları bakımından farklı 32 suş oluşturulmuştur; bu suşlar arasında en verimli taksadien üreticisi, taksadien yolağını taşıyan kontrol suşundan yaklaşık 15.000 kat daha fazla, 1 g/l titre sağlamıştır [81].



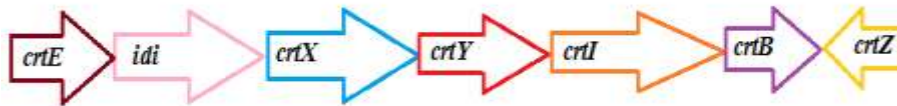
Şekil 1.7. Çok değişkenli modüler mühendislik uygulamasıyla taksadien üretiminin optimizasyonu [82].

Artemisia annua'dan izole edilen artemisinin güçlü antimalaryal aktiviteye sahip bir seskiterpendir. Artemisinin biyosentezine ait ara ürün olan amorfa-4,11-dien (amorfadien) üretimi *E. coli*'de yapılmıştır. Tamamen heterolog bir yolak konağın düzenleyici kontrollerine tabi olmayabilir ve bu nedenle aşırı üretim için daha yararlı olabilir, bu nedenle *E. coli*'de doğal olarak mevcut olmayan MVA yolağı konağa IPP/DMAPP öncül kaynağı sağlaması amacıyla aktarılmıştır [48, 83]. *E. coli*'de, heterolog mevalonat yolak ve *A. annua*'dan amorfadien sentaz kullanılarak artemisinik asidin yüksek miktarda üretilmesi için amorpha-4,11-dienin artemisinik aside oksidasyonunu üç aşamalı gerçekleştiren metabolik mühendisliği çalışması yapılmıştır (Şekil 1.8). Doğal deoksiksiluloz-5-fosfat (DXP) yolağı yerine *S. cerevisiae*'den alınan heterolog MVA yolağı IPP biyosentezi için seçilmiştir. Mevalonat yolak iki sentetik operona bölünmüştür. Asetil-CoA sentaz, hidroksimetilglutaril-CoA sentaz ve HMG-CoA redüktazı içeren MevT operonu, asetil-CoA'yı mevalonata dönüştürmektedir. Mevalonat kinaz, fosfomevalonat kinaz, mevalonat pirofosfat dekarboksilaz, izopentenil pirofosfat (IPP) izomeraz, FPP sentaz enzimlerini taşıyan MBIS operonu, mevalonatu FPP'ye dönüştürmektedir. Yapılan çalışmada yolak optimizasyonu için gen ekspresyonunun dengelenmesi, hız sınırlayıcı enzimlerin belirlenmesi, konaktaki metabolik yükün azaltılmasına odaklanılmıştır ve modüler vektörlerin kullanımı ile oldukça yüksek amorfadien titreleri (300 mg/l) elde edilmiştir [83].

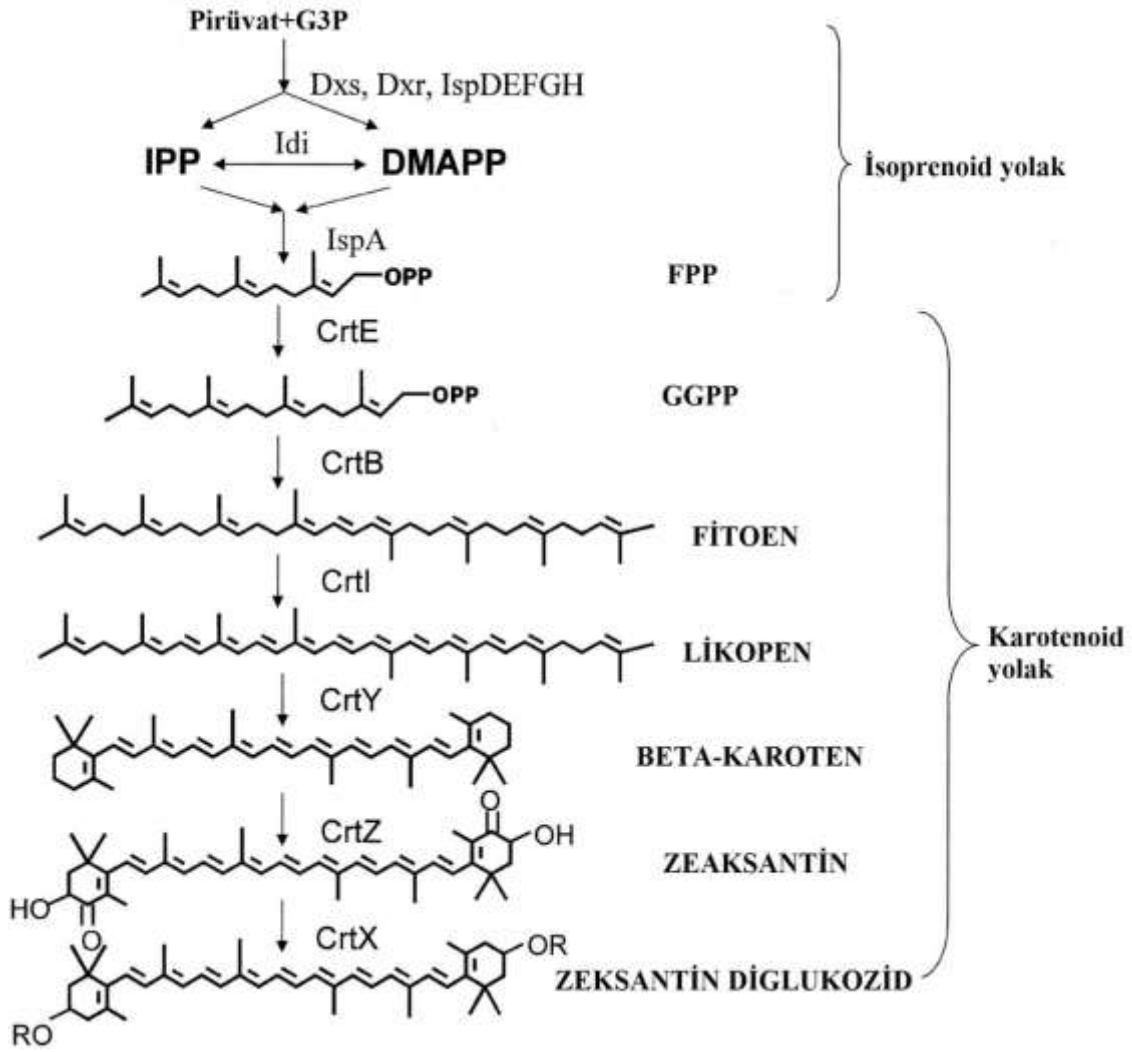


Şekil 1.8. Mevalonat yolağı aracılığı ile amorfadien üretimi [83].

Karotenoid biyosentezden sorumlu gen kümeleri çeşitli bakterilerde tanımlanmıştır ve bunlar gen organizasyonuna göre üç tipe ayrılabilir. Birinci tip, *crtEXYIBZ*'nin klasik organizasyonuna sahiptir, ikinci tipte *crtE-idi-crtXYIBZ* organizasyonu vardır ve üçüncü tipte *crtE-idi-crtYIBZ* organizasyonu vardır [84]. Örneğin, *Pantoea agglomerans* Eho10'da *crtE-idi-crtXYIBZ* karotenoid gen kümesi organizasyonu bulunmaktadır (Şekil 1.9) [85, 86]. Farklı mikroorganizmalar benzer gen kümelerini içermelerine rağmen farklı karotenoidler üretebilirler. Bu durum yaşam ortamlarına bağlı olabilir, çünkü farklı yapılara sahip karotenoidler membran akışkanlığı ve termo kararlılık üzerinde farklı etkiler göstermektedir. Bu nedenle, bakterinin farklı karotenoidleri nasıl sentezlediğini araştırmak ilgi çekmektedir. Karotenogenik bakterilerde karotenoid biyosentetik yolların genetik açıdan aydınlatılmasıyla *in vivo* karotenoid üretiminde genetik mühendisliği için çeşitli olanaklar mevcut hale gelmiştir [84]. *Pantoea* (*Enterobacter*) türleri zeaksantin ve türevlerini ürettiği bilinen karotenogenik bakterilerdir, bu türlerin karotenoid yolağı *P. ananatis* (*Erwinia uredovora*) ve *Pantoea agglomerans*'ta (*Erwinia herbicola*) iyi tanımlanmıştır. *Pantoea* karotenogenik yolağı 6 enzimli aşamadan oluşmaktadır (Şekil 1.10): Geranilgeranil difosfat (GGPP) sentaz (CrtE) enzimi, karotenoid yolağın ilk substratı FPP'yi kullanarak GGPP'yi sentezlemektedir. Fitoen sentaz (CrtB) enzimi, GGPP'den β -karoten biyosentezi için gerekli olan fitoeni sentezlemektedir. Fitoen desatüraz (CrtI) enzimi likopeni ve likopen siklaz (CrtY) enzimi likopenden β -karoteni oluşturmaktadır. β -karoten hidroksilaz (CrtZ) enzimi C-3 pozisyonundaki β -karotenin her bir halkasının hidroksilasyonu ile zeaksantin üretmektedir. Zeaksantin glukozil transferaz (CrtX) enzimi, zeaksantin ve UDP-glukoza kullanarak zeaksantin- β -D-diglikozidi sentezlemektedir [39].



Şekil 1.9. *Pantoea agglomerans* Eho10 karotenoid yolağına ait gen kümesi [86].



Şekil 1.10. *Pantoea* karotenoid yolağı [86].

Pantoea'nın karotenoid biyosentetik yollarına ait genler kullanılarak karotenogenik olmayan bir bakteri olan *E. coli*'de likopen [21, 87], β -karoten [88, 89], astaksantin [69, 90], zeaksantin [38, 39, 91] karotenoid moleküllerinin heterolog biyosentezi gerçekleştirilmiştir. *E. coli*'de zeaksantin üretimi için farklı metabolik mühendisliği çalışmaları bulunmaktadır. Nishizaki ve ark. [92] gen düzeninin, *E. coli*'de heterolog sentezlenen zeaksantin miktarını etkileyip etkilemediğini araştırmak için zeaksantin biyosentez yolağına yani *crtE-crtB-crtI-crtY-crtZ* sırasına göre farklı operonlar inşa etmişlerdir. *Pantoea* genleri kullanılarak oluşturulan *crtB-crtI-crtY-crtZ-crtE*, *crtI-crtY-crtZ-crtE-crtB*, *crtY-crtZ-crtE-crtB-crtI*, *crtZ-crtE-crtB-crtI-crtY* gibi dairesel

permütasyonlu gen düzenlerine sahip bir dizi plazmid arasında farklı gen düzenlerinin bu genlere ait mRNA seviyelerini dolayısıyla *E. coli*'deki zeaksantin verimini etkilediğini göstermişlerdir. *E. coli*'de (820 µg/g kuru ağırlık) en yüksek zeaksantin üretimi, gen sırasının zeaksantin metabolik yolağının (*crtE-crtB-crtI-crtY-crtZ*) sırasına tekabül eden bir plazmidle transformantında gözlenmiştir. Li ve ark. [39] likopen üreten *E. coli* suşunda *P. ananatis*'ten *crtY* ve *crtZ*'nin ekspresyonu ile 43 mg/l ($11,95 \pm 0,21$ mg/g kuru ağırlık) zeaksantin sentezi sağlamışlardır. Shen ve ark. [38] *E. coli*'de zeaksantin üretimini artırmak için mevalonat yolağın dinamik kontrolü ile 722,46 mg/l ve 23,16 mg/g kuru ağırlık zeaksantin elde etmişlerdir.

1.4. Metabolik Mühendisliği Yaklaşımıyla Zeaksantin Üretimi

Bu tez çalışmasında metabolik mühendisliği yaklaşımıyla zeaksantin karotenoidinin *E. coli*'de heterolog üretimi amaçlanmıştır. Bunun için *Erwinia herbicola* (*P. agglomerans*) Eho10'a ait karotenoid yolak enzim genleri (*crtE*, *crtY*, *crtI*, *crtB*, *crtZ*) ve *idi* geninin plazmid aracılı yapılandırılmasıyla farklı *E. coli* suşlarına klonlanması, böylece zeaksantin sentezinin gerçekleşmesi beklenmiştir (Şekil 1.11). Karotenoid sentezinde *idi* geni hız sınırlayıcı adım olarak bilinmektedir [93] ve bu gen de karotenoid üretimini artırması için karotenoid yolak genleri ile birlikte aktarılmıştır. Sonuç olarak zeaksantin; düşük maliyetli, verimli ve çevre kirliliğinin azalmasına yardımcı bir üretim için kullanılan metabolik mühendisliği yaklaşımıyla rekombinant suşlarda sentezlenecektir.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

Gibson Assembly metodu için Master karışımı hazırlanmasında kullanılan T5 exonuclease, Taq ligase, 5X tampon, NAD⁺ ve polimeraz zincir reaksiyonlarında (PCR) da kullanılan Phusion High-Fidelity DNA polymerase enzimi ile dNTP, plazmid DNA'larının enzimatik kesim reaksiyonlarında kullanılan EcoRI-HF, HindIII-HF, SalI-HF restriksiyon endonükleaz enzimleri ve enzimlere ait tampon çözeltiler New England Biolabs (NEB)'dan temin edilmiştir. Gibson Assembly metodu için Master karışımı hazırlanmasında kullanılan DTT ve Trisma base Sigma'dan, HCl çözeltisi ve MgCl₂ Merck'den, Nuclease free water Wisent Kanada'dan temin edilmiştir. Sıvı kültürlerden plazmid DNA'sı izolasyonu için QIAprep Spin Mini Prep Kit ve PCR ürünlerinin agaroz jelden izolasyonu için QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen'den temin edilmiştir. PCR, enzimatik kesim reaksiyonları ve Gibson Assembly reaksiyonları Bio-Rad T100 Thermal Cycler cihazında yapılmıştır. Agaroz jel elektroforezi işlemi sonrasında DNA bantlarının büyüklüklerini belirlemek için Hibrigen 1 kb DNA ladder MG-LDR-1000, Hibrigen'den temin edilmiştir. *E. coli* kültürlerinden karotenoid ekstraksiyonu için aseton (Carlo erba, 412502) kullanılmıştır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizleri için zeaksantin standardı (ChemFaces, CFN90234) temin edilmiştir. HPLC çalışmalarında mobil faz için asetonitril (Carlo erba, CE.412372), metanol (Isolab, 947.046.2500) kullanılmıştır. HPLC çalışmalarında C18 kolon (GL Sciences, 5020-07346) kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan primerler Gen Plaza Biyoteknoloji Merkezi (Türkiye) tarafından ticari olarak sentezletilmiştir.

2.1.1. *E. coli* Suşları

Bu tez çalışmasında kullanılan suşlar Fırat Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Sentetik Biyoloji ve Metabolik Mühendisliği Laboratuvarı arşivinden temin edilmiştir. Kullanılan suşlar Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan suşlar ve genotipleri [94-96].

Suş Adı	Suşun Genotipi
<i>E. coli</i> NEB 10-beta	$\Delta(ara-leu)$ 7697 <i>araD139 fhuA $\Delta lacX74$ galK16 galE15 e14-$\phi 80dlacZ\Delta M15$ recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str^R) rph spoT1 $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$</i>
<i>E. coli</i> MG1655	F ⁻ λ ilvG- <i>rfb-50 rph-1</i>
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG $\Phi 80dlacZ\Delta M15$ $\Delta(lacZYA-argF)U169$, hsdR17($r_K^- m_K^+$) λ^-</i>
<i>E. coli</i> DH5 α -Pro	<i>deoR endA1 gyrA96 hsdR17($r_K^- m_K^+$) recA1 relA1 supE44 thi-1 $\Delta(lacZYA-argFV)U169$ $\phi 80lacZ\Delta M15$ F⁻ λ PN25/tetR Plac^q/placI SpR</i>
<i>E. coli</i> NEB-Turbo	<i>glnV44 thi-1 $\Delta(lac-proAB)$ galE15 galK16 R(zgb-210::Tn10)TetS endA1 fhuA2 $\Delta(mcrB-hsdSM)5$ ($r_K^- m_K^+$) F'[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ$\Delta M15$]</i>
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>endA1 gyrA96 (nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::TN10 proAB⁺ lacI^q $\Delta(lacZ) M15$] hsdR17($r_K^- m_K^+$)</i>
<i>E. coli</i> TOP10	<i>F-mcrA $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ nupG recA1 araD139 $\Delta(ara-leu)7697$ galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ^-</i>
<i>E. coli</i> EPI300	<i>F⁻ λ mcrA $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80dlacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ recA1 endA1 araD139 $\Delta(ara-leu)$ 7697 galU galK rpsL (Str^R) nupG' trfA dhfr</i>
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B($r_B^- m_B^-$) $\lambda($DE3[<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB⁺</i>]_{K-12}(λ^S)</i>

2.1.2. Plazmidler

Çalışmada gen kaynağı olarak kullanılan pAC-EHER plazmidi (Katalog No. 53262) Addgene'den bakteri içerisinde agar stab halinde ticari olarak alınmıştır. Bu plazmid Francis ve ark. tarafından *Erwinia herbicola* (*P. agglomerans*) Eho10'a (Genbank:

M87280.1) ait karotenoid yolak kümesine ait yedi geni (*crtE*, *idi*, *crtX*, *crtY*, *crtI*, *crtB*, *crtZ*) içeren 9.34 kb BglII-BglII genomik fragmanın pPL376 plazmidinden kesilmesiyle ve ileri yönde oryantasyonla pACYC184'ün BamHI bölgesine eklenmesiyle oluşturulmuştur [97]. pAC-EHER plazmidi fotosentetik olmayan *Erwinia herbicola* (*Pantoea agglomerans*) Eho10 bakterisindeki karotenoid yolağın gen kümesine ait yedi geni endojen promotor altında içermektedir ve zeaksantin diglukosid üretimini sağlamaktadır. Bu plazmid kloramfenikol antibiyotigine direnç geni (*CmR*) ve p15A replikasyon orijini taşımaktadır [98].

2.1.3. Çözeltiler

% 10'luk gliserol çözeltisi: 10 ml gliserol üzerine 90 ml dH₂O (distile su) 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.

2.1.4. Suş Gelişiminde Kullanılan Besiyerleri ve Antibiyotikler

Luria Bertani (LB) Broth

Tripton 10 g/l

Maya ekstraktı 5 g/l

Sodyum klorür 10 g/l

İstenen bir hacimde besiyeri için gerekli miktarlarda bileşenler tartılmıştır, dH₂O ile istenen hacime tamamlanmıştır ve otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

LB Broth Agar

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 tartılmıştır, dH₂O ile istenen hacime tamamlanmıştır ve otoklavda 121 °C’de 15 dk sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

NaCl İçermeyen LB Broth

Trypton	10 g/l
Maya ekstraktı	5 g/l

İstenen bir hacimde besiyeri için gerekli miktarlarda bileşenler tartılmıştır, dH₂O ile istenen hacime tamamlanmıştır ve otoklavda 121 °C’de 15 dk sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

SOB (Süper optimize edilmiş besiyeri) ve SOC (Süper optimize edilmiş katabolit represyonlu besiyeri) Besiyeri

İçeriği 1 litre için 20 g tripton, 5 g maya ekstraktı, 0,5 g NaCl, 0,186 g KCl, 2,4 g MgSO₄ olan SOB besiyeri hazır karışım halinde kullanılmıştır (BD Difco SOB Medium, 244310). 28 g toz SOB karışımı 1 l dH₂O içerisinde çözündürülmüştür ve sterilizasyon işlemi otoklavda 121 °C’de 15 dk gerçekleştirilmiştir. SOB besiyeri hazırlandıktan sonra sıcaklığı 45-50 °C’ye ulaştığında 1 litre SOB besiyerine 20 ml steril % 20 glukoz çözeltisi eklenerek SOC besiyeri hazırlanmıştır. SOC besiyeri elektroporasyon işleminden sonra hücrelerin

toparlanması için ihtiyaç duyduğu zengin ve izotonik ortamın oluşturulması için kullanılmıştır [98].

Kloramfenikol (Cm)

34 mg/ml stok solüsyonu için toz formdaki kloramfenikol (Sigma, C0378) gerekli miktarda tartılmıştır, etanol ile istenen hacime tamamlanarak hazırlanmıştır ve besiyerinde 25 µg/ml çalışma konsantrasyonunda kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan plazmid kloramfenikol dirençli (Cm^R) olduğu için besiyerlerinde Cm seçici antibiyotik olarak kullanılmıştır.

2.2. Metot

2.2.1. Plazmid DNA'sının İzolasyonu

Plazmid içeren bakteri öze yardımıyla seçici antibiyotik içeren LB agar besiyerine ekilmiştir ve 37 °C'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. 16 saatlik inkübasyon sonrasında katı besiyerinden steril bir kürdan yardımıyla seçilen bir koloni seçici antibiyotik içeren 5 ml LB Broth sıvı besiyerine ekilmiştir, 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 [100].

2.2.2. Restriksiyon Endonükleazları ile Plazmid DNA'sının Kesilmesi

Ticari olarak satın alınan pAC-EHER plazmidinin EcoRI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu yapılmıştır. Reaksiyon şartları:

pAC-EHER DNA : X μ l

10X CutSmart Tamponu : 2,5 μ l (Enzim ile birlikte verilmiştir.)

EcoRI-HF : 1 μ l (20000 u/ml)

HindIII-HF : 1 μ l (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-1 saat inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir.

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

Plazmid DNA'sı : X μ l

10X CutSmart Tamponu : 2,5 μ l (Enzim ile birlikte verilmiştir.)

SalI-HF : 1 μ l (20000 u/ml)

Gibson Assembly 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-1 saat inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir.

2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez yüklü moleküllerin (protein ve nükleik asitler gibi) elektriksel alandaki hareketine (göç) dayanan bir ayırım ve analiz yöntemidir [101]. DNA moleküllerinin analitik amaçlı analizleri (restriksiyon endonükleazları ile kesim reaksiyonları, PCR reaksiyonları) Etidyum bromür (EtBr) ile boyanan % 1'lik agaroz jelde ve BIO-RAD Wide-Mini Sub-Cell sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. EtBr, DNA bağları arasına bağlanarak UV ışık altında floresan etki göstermektedir ve DNA'nın agaroz jelde görünür olmasını sağlamaktadır [101]. % 1'lik agaroz jel hazırlamak için kullanılacak jel büyüklüğüne göre % 1 agaroz içeren 1xTAE tampon çözeltisi mikrodalga fırında ara ara karıştırılarak kaynatılmıştır ve agaroz çözündürülmüştür. Kuyuları oluşturması için tarak jel tepsisine yerleştirilmiştir. Çözelti 55-65 °C sıcaklığa gelene kadar ara ara çalkalanarak

soğutulmuştur ve final konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde EtBr eklenerek kabarcık oluşturmamaya dikkat edilerek hafifçe karıştırılmıştır. Jel hazırlanan tepsiye dökülmüştür, varsa oluşan kabarcıklar mikropipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. 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 ladder kuyulara yüklenmiştir. Elektoroforez işlemi anoda hareket olacak şekilde 70 V-2 saat gerçekleştirilmiştir. Jelin görüntüsü Sygene GBox sistemi ve Genesys programı kullanılarak alınmıştır.

2.2.4. Gibson Assembly Metodu

Gen klonlama moleküler biyoloji uygulamaları için oldukça önemli bir adımdır. Gibson Assembly yöntemi, restriksiyon enzim kesimi veya uyumlu restriksiyon bölgelerine ihtiyaç duymadan iki veya daha fazla fragmentin klonlanmasını sağlayan bir metottur. Hem basit hem de karmaşık yapılar oluşturmaya yönelik bu yenilikçi yaklaşım ilk olarak 2008 yılında Daniel Gibson ve meslektaşları tarafından yayınlanmıştır [102]. Gibson Assembly, kullanımı kolay olduğundan ve büyük, karmaşık montajlar için bile çok az optimizasyon gerektirdiğinden *in vitro* montaj yöntemlerinin en yaygın kullanılanı haline gelmiştir. Yöntem için uygun örtüşen DNA'lar ve üç enzimin uygun bir karışımı (Gibson Assembly Master karışımı) gerekmektedir [103]. Gibson Assembly'de, tek iplikli 3'-çıkıntılar T5 ekzonükleaz aracılığıyla oluşturulmaktadır. Yapışkan tamamlayıcı tek iplikli uçlarda eklenecek fragmentin plazmide bağlanmasından sonra bu çıkıntılar DNA polimeraz uzantısı için primerler olarak işlev görür. Bu şekilde, Phusion DNA polimerazı istenmeyen tek iplikli boşlukları doldurur. Kalan çentikler daha sonra Taq DNA ligaz tarafından kapatılmaktadır. Protokol, tek karışımda üç enzimle birlikte uygun bir izotermal inkübasyon aşamasından oluşur [104]. Bu birleştirme protokolü, sentetik ve doğal genleri, genetik yolları kusursuz bir şekilde oluşturmak için kullanılabilir [105].

Gibson Assembly reaksiyonunu oluşturmak için gerekli karışım laboratuvar şartlarında buz içerisinde hazırlanmıştır. Öncelikle reaksiyon için gerekli 5X ISO tamponu hazırlanmıştır, 100 µl'lik hacimlerde -20 °C'de saklanmıştır (Tablo 2.2). 5X ISO tamponuna diğer bileşenlerin eklenmesiyle Gibson Assembly Master karışımı hazırlanmıştır (Tablo 2.3), 15 µl'lik hacimlerde -20 °C'de saklanmıştır.

Tablo 2.2. 5X ISO tamponu bileşenleri [105].

Bileşen	Miktarı
1 M Tris-HCl (pH 7.5)	3 ml
2 M MgCl ₂	150 µl
100 mM dGTP	60 µl
100 mM dATP	60 µl
100 mM dTTP	60 µl
100 mM dCTP	60 µl
1 M DTT	300 µl
PEG-8000	1,5 g
100 mM NAD ⁺	300 µl
Nukleaz-free dH ₂ O	X (toplam hacim 6 ml olacak miktarda)
Toplam Hacim	6 ml

Tablo 2.3. Gibson Assembly Master karışımı bileşenleri [105].

Bileşen	Miktarı
5X ISO tamponu	320 µl
10 U/µl T5 ekzonükleaz	0,64 µl
2 U/µl Phusion polimeraz	20 µl
40 U/µl Taq ligaz	160 µl
Nukleaz-free dH ₂ O	X (toplam hacim 1,2 ml olacak miktarda)
Toplam Hacim	1,2 ml

2.2.5. Plazmid Haritalarının Tasarlanması

Plazmid haritalarının tasarımı Vector NTI programı kullanılarak yapılmıştır. pAC-EHER plazmid DNA'sının dizi bilgisine Addgene'den ulaşarak [106] programdaki haritası oluşturulmuştur, bu harita üzerinden final plazmid olan pAC-EHER-EBIidiYZ plazmid haritası oluşturulmuştur.

2.2.6. Primerlerin Tasarlanması ve PCR Reaksiyonları

Kullanılan primerler, Gibson Assembly reaksiyonunda fragmanların birleşmesi için gerekli olan tamamlayıcı diziyi ve PCR amplifikasyonu sırasında DNA kaynağından (pAC-EHER) istenen bölgenin çoğalmasını sağlayacak diziyi içerecek şekilde final plazmid (pAC-EHER-EBIidiYZ) üzerinden tasarlanmıştır (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. pAC-EHER-EBIidiYZ plazmidinin inşası için kullanılan primerler, bağlanma sıcaklıkları ve baz uzunlukları

Primer	Primer Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı	Baz Uzunluğu
F2	atgtgcgggatacgccatgaatgagacgctgcatcagcgtctgg	76 °C	44
R2	cgcctggcagaggagacgccgggtgcttactatattgatc	74 °C	40
F1	gatcaatatagtaagcaccggcgtctcctctgccaggcg	74 °C	40
R1	acgctgatgcagcgtctcattcatggcgtatcccgccacatagcg	77 °C	44

pAC-EHER plazmid DNA'sı kaynağından reaksiyondaki DNA miktarı 25 ng olacak şekilde (X µl) F1 ve R1 primerleri kullanılarak 6547 bp'lik bölgenin amplifikasyonu için belirtilen şartlarla PCR yapılmıştır:

Nuclease free water	: 33 µl
5xHF Buffer	: 10 µl (Enzim ile birlikte verilmiştir.)
dNTPs	: 1 µl (Stok 10 mM)
F1 Primer	: 2,5 µl (10 µM)
R1 Primer	: 2,5 µl (10 µM)
pAC-EHER DNA	: X µl
Phusion DNA Polymerase	: 0,5 µl (2000 u/ml)
Toplam Hacim	: 50 µl

pAC-EHER plazmid DNA'sı kaynağından reaksiyondaki DNA miktarı 25 ng olacak şekilde (X µl) F2 ve R2 primerleri kullanılarak 5995 bp'lik bölgenin amplifikasyonu için belirtilen şartlarla PCR yapılmıştır:

Nuclease free water	: 33 µl
5xHF Buffer	: 10 µl (Enzim ile birlikte verilmiştir.)
dNTPs	: 1 µl (Stok 10 mM)
F2 Primer	: 2,5 µl (10 µM)
R2 Primer	: 2,5 µl (10 µM)
pAC-EHER DNA	: X µl
Phusion DNA Polymerase	: 0,5 µl (Stok 2000 u/ml)
Toplam Hacim	: 50 µl

Döngü Şartları (5995 bp ve 6547 bp için aynı PCR şartları kullanılmıştır) :

Başlangıç Denatürasyonu : 98 °C-30 sn

Denatürasyon, Bağlanma ve Uzama : 98 °C-10 sn, 72 °C-3 dk (35 Döngü)

Final Uzama : 72 °C-5 dk

2.2.7. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması

Agaroz jel elektroforezi işlemi sonrasında UV transüliminatörde bakılan jelden beklenen büyüklükteki DNA bantları bistüri ile kesilerek 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine alınmıştır ve QIAquick Gel Extraction Kit kullanılarak saflaştırılmıştır [107].

2.2.8. Elektrokompotent Hücrelerin Hazırlanması

Elektrokompotent hücre hazırlamak için konak olarak kullanılacak suşun stoktan LB agar besiyerine öze ile çizilerek ekimi yapılmıştır ve 37 °C'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. 16 saatlik inkübasyondan sonra LB agar besiyerinden seçilen tek koloni steril bir kürdan yardımıyla 5 ml LB Broth besiyerine ekilmiştir ve 37 °C-225 rpm'de (rotorun dakikadaki dönüş sayısı) 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. 16 saatlik sıvı kültürden 500 µl alınarak steril 250 ml'lik erlene alınan 100 ml NaCl içermeyen LB Broth besiyerine inoküle edilmiştir ve OD₆₀₀ değeri 0,35-0,4 aralığına ulaşana kadar 37 °C-225 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı kültür beklenen OD₆₀₀ aralığına ulaştığında 50'er ml olacak şekilde steril 50 ml'lik falkonlara alınmıştır ve falkonlar 20-25 dk buz içerisinde bekletilmiştir ve bundan sonraki aşamalarda santrifüj dışındaki işlemler buz içerisinde gerçekleştirilmiştir. Buzdan alınan falkonlar 0 °C-4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir, süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelet 1 ml steril dH₂O ile nazikçe çözündürülmüştür ve üzerine 39 ml dH₂O eklenerek 0 °C-4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir, süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelet 1 ml steril dH₂O ile nazikçe çözündürülmüştür ve üzerine 19 ml dH₂O eklenerek 0 °C-4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir, süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelet 1 ml steril % 10'luk gliserol ile nazikçe çözündürülmüştür ve ardından 9 ml %10'luk gliserol içerisinde çözündürülmüştür, 0 °C-4000 rpm'de santrifüj edilmiştir, süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelet 300 µl % 10'luk gliserol içerisinde çözündürülmüştür ve hazır hale

gelen elektrokompotent hücre karışımından steril 1,5 ml'lik mikrosantrüfuj tüplerine 100'er µl alınarak -80 °C'de saklanmıştır [108].

2.2.9. Transformasyon

Elektroporasyon ile plazmid DNA'sı veya Gibson Assembly reaksiyonu ürününün transformasyonu işlemleri için öncelikle bir adet steril cam tüp ve 930 µl SOC besiyeri içeren 1,5 ml'lik mikrosantrüfuj tüpü 37 °C'de 10 dk bekletilmiştir. İşlem öncesinde elektroporator küveti buzda bekletilmiştir. Transformasyonu yapılacak plazmid DNA'sı veya Gibson Assembly reaksiyonu ürünü ve kompetent hücre buza alınmıştır. İşleme başlamadan hemen öncesinde 930 µl SOC besiyeri mikropipetle çekilerek hazır tutulmuştur. Kompetent hücre üzerine plazmid DNA'sı veya Gibson Assembly reaksiyonu ürünü eklenerek hafifçe karıştırılmıştır. Karışım elektroporator küvetine küvetin alt kısmına dokunmamaya dikkat edilerek alınmıştır. Küvet Eppendorf Eporator cihazına (Katalog No: 4309000019) yerleştirilmiştir ve 1.8 kV şartında çalıştırılmıştır. Elektroporasyon işleminden sonra elektroporator küveti alınarak üzerinde hazırda bekletilen SOC besiyeri hızlıca eklenmiştir, küvet kapağı kapatılarak birkaç kez ters-düz edilmiştir. Küvetteki besiyeri-hücre karışımı cam tüpe alınarak 37 °C-225 rpm'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. 1 saatlik inkübasyonun ardından sıvı kültürden önce 100 µl'si drigalski spatülü ile seçici antibiyotik içeren petriye yayarak ekilmiştir. Kalan kültür 1,5 ml'lik mikrosantrüfuj tüpüne alınarak santrifuj edilmiştir, süpernatant 100 µl'si kalacak şekilde uzaklaştırılmıştır, pelet 100 µl süpernatant içerisinde pipetajla çözdürüldükten sonra drigalski spatülü ile seçici antibiyotik içeren petriye yayarak ekilmiştir. Petriler 37 °C'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. 16 saatlik inkübasyondan alınan petrilere steril kürdan yardımıyla alınan koloni seçici antibiyotik içeren 5 ml LB Broth besiyerine ekilmiştir ve 37 °C-200 rpm'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan alınan petrilere seçilen kolonilerin enzimatik kesim reaksiyonu ile doğrulaması yapıldıktan sonra stok kültürleri hazırlanmıştır.

2.2.10. Stok Kùltürlerin Hazırlanması

Otoklavda 121 °C-15 dk steril edilmiş % 100 gliserolden 700 µl alınarak steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne bırakılmıştır ve üzerine 300 µl bakteri kùltürü eklenmiştir. Kùltür ve gliserolün karışması için mikrosantrifüj tüpü vortekslenmiştir. Hazırlanan stok kùltürler -80 °C'de saklanmıştır.

2.2.11. pAC-EHER-EBIidiYZ İçeren *E. coli* Suşlarından Zeaksantin Ekstraksiyonu İçin Başlangıç Kùltürlerinin Hazırlanması

Başlangıç kùltürleri için stok kùltürlerden steril öze yardımıyla 10 ml sıvı besiyerine ekimler yapılmıştır, 37 °C-225 rpm'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan alınan kùltürlerin OD₆₀₀ ölçümleri yapılmıştır. 50 ml'de OD₆₀₀: 0,1 olacak şekilde gerekli miktarda besiyerleri ve inokülasyon hacimleri hesaplanmıştır:

$OD_{600} \cdot X = 0,1 \cdot V$ (X=kùltürden alınması gereken hacim, V=toplam son hacim; V-X hacimdeki besiyerine X hacimde kùltür inokülasyonu yapılmıştır).

250 ml'lik erlenlerde hazırlanan ve seçici antibiyotik içeren 50 ml OD₆₀₀ 0,1 başlangıç kùltürleri 30 °C-200 rpm'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.

2.2.12. pAC-EHER-EBIidiYZ İçeren *E. coli* Suşlarından Zeaksantin Ekstraksiyonu

Karotenoidleri izole etmek için hücreler aseton ile ekstrakte edilmiştir. *E. coli* kùltür örnekleri (1 ml) 12.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek toplanmıştır. Hücre peleti steril dH₂O ile yıkanmıştır ve 1 mL % 0,1 BHT (Bütıl hidroksitoluen) içeren aseton ile 50 °C'de 10 dk ara ara vortekslenerek ekstrakte edilmiştir. Karışım 12.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir ve aseton süpernatant yeni bir tüpe transfer edilmiştir [39]. İşlemler az ışıklı-karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

2.2.13. pAC-EHER-EBliDiYZ İçeren *E. coli* Suşlarından Ekstrakte Edilen Zeaksantin HPLC ile Analizi

Zeaksantin 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 2.5’de verilen şartlarda gerçekleştirilmiştir. İşlemler sırasında numunelerin ışıktan korunmasına dikkat edilmiştir ve numuneler -20 °C’de saklanmıştır. Numunelerdeki zeaksantin tayini, standart olarak kullanılan zeaksantin maddesinin alıkonma süresi ve konsantrasyonlarına bağlı olarak elde edilen standart eğriden faydalanılarak tespit edilmiştir.

Standart Maddenin Hazırlanması

Zeaksantin HPLC ile tanımlanması için zeaksantin standardı kullanılmıştır. 5 mg zeaksantin standardı 20 ml asetonda çözdürülerek 250 ppm standart çözeltisi hazırlanmıştır. 250 ppm’lik çözeltinin 10 ml’si alınarak 10 ml DMSO içerisinde zdrlmştır ve 125 ppm DMSO-Aseton (1:1) standart çözeltisi hazırlanmıştır. 125 ppm DMSO-Aseton (1:1 v/v) zeaksantin çözeltisinden 2 ml alınarak üzerine 10,5 ml mobil faz eklenmiştir ve 20 ppm ara stok hazırlanmıştır. Bu ara stoktan mobil faz ile seyreltmeler yapılarak farklı konsantrasyonlarda (0,1 ppm, 0,25 ppm, 0,5 ppm, 0,7 ppm, 1,5 ppm, 10 ppm, 15 ppm) standart karışımları hazırlanmıştır ve Tablo 2.5’deki şartlarla HPLC cihazında ölçümleri yapılarak kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır.

Tablo 2.5. HPLC çalışma koşulları

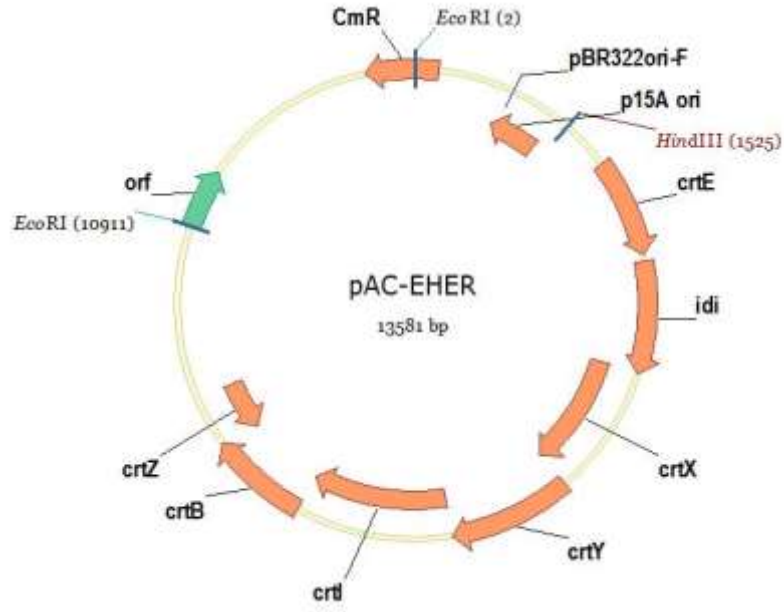
Marka	Shimadzu
Model	LC-20AT
Dedektör	SPD-20A, UV-Vis
Kolon	InertSustain C18 (5 µm, 4.6x150 mm)
Kolon Fırını	CTO-10AS
Mobil Faz	Asetonitril-metanol (65:35 v/v)
Dedeksiyon	470 nm, 450 nm
Akış Hızı	1 ml/dk
Kolon Sıcaklığı	28 °C
Akış Süresi	20 dk
Enjeksiyon Hacmi	20 µl

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

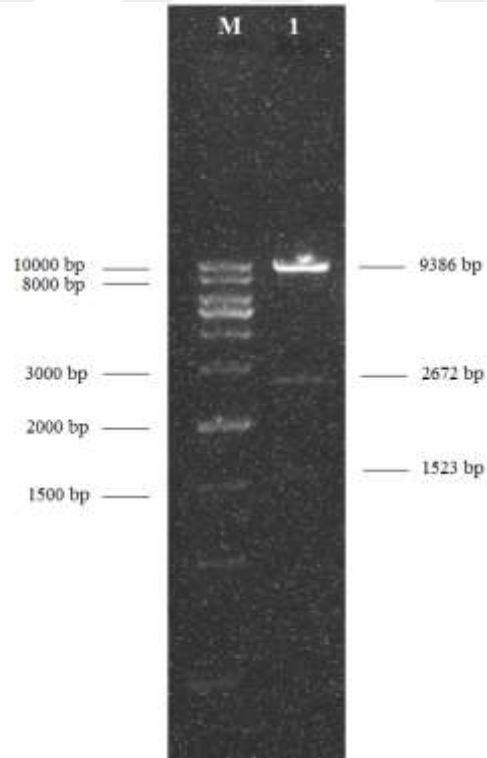
Bu çalışmada *P. agglomerans* bakterisinin karotenoid yolak genlerini içeren pAC-EHER plazmidi kullanılarak *E. coli*'de zeaksantin biyosentezi için gerekli genleri içeren pAC-EHER-EBIidiYZ plazmidi Gibson Assembly metodu ile inşa edilmiştir. İnşa edilen plazmid elektrokompotent hücreleri hazırlanan 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) elektroporasyonla aktarılmıştır. Bu suşlardaki zeaksantin üretiminin incelenmesi için her suşun başlangıç OD₆₀₀: 0,1 olan 50 ml'lik kültürleri hazırlanmıştır ve 30 °C-200 rpm'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyon süresinde her 24 saatte bir kültürlerden 1 ml numune çekilerek asetonla zeaksantin ekstraksiyonu metodu uygulanmıştır ve HPLC ile ekstraksiyon ürünlerinin analizi gerçekleştirilmiştir. Deneyler 2 paralel halinde 2 tekrar olacak şekilde toplam dört tekrarlı gerçekleştirilmiştir ve analizler sonucunda ortalama değerler elde edilmiştir.

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

pAC-EHER plazmid DNA'sı, Qiagen QIAprep Spin Mini Prep kit [95] kullanılarak 50 ng/ μ l konsantrasyonda izole edilmiştir. New England Biolabs (NEB) firmasından ticari olarak satın alınan EcoRI-HF ve HindIII-HF restriksiyon enzimleri, 13581 bp uzunluğundaki plazmid DNA'sını 9386, 2672, 1523 bp uzunluğunda üç fragmente ayırmaktadır (Şekil 3.1). Enzimatik kesim reaksiyonu agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir, elde edilen jel görüntüsü Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



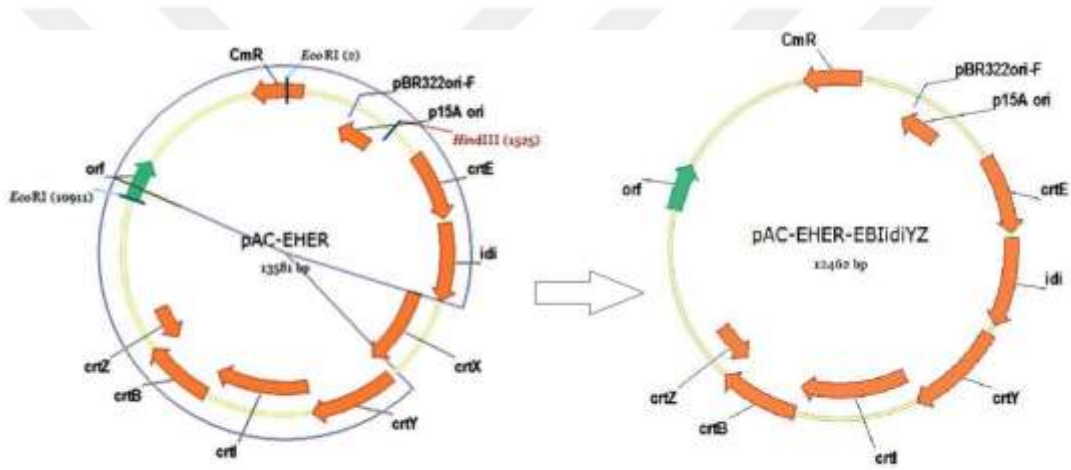
Şekil 3.1. pAC-EHER plazmidinin haritası ve EcoRI, HindIII enzimlerinin kesim bölgeleri



Şekil 3.2. pAC-EHER plazmidinin enzimatik doğrulamasına ait agaroz jel görüntüsü, EcoRI ve HindIII enzimleriyle kesim sonrası elde edilen bantlar (1), (M) Markır: Hibrigen 1 kb ladder MG-LDR-1000

3.2. pAC-EHER-EBIdiYZ Plazmidinin İnşası

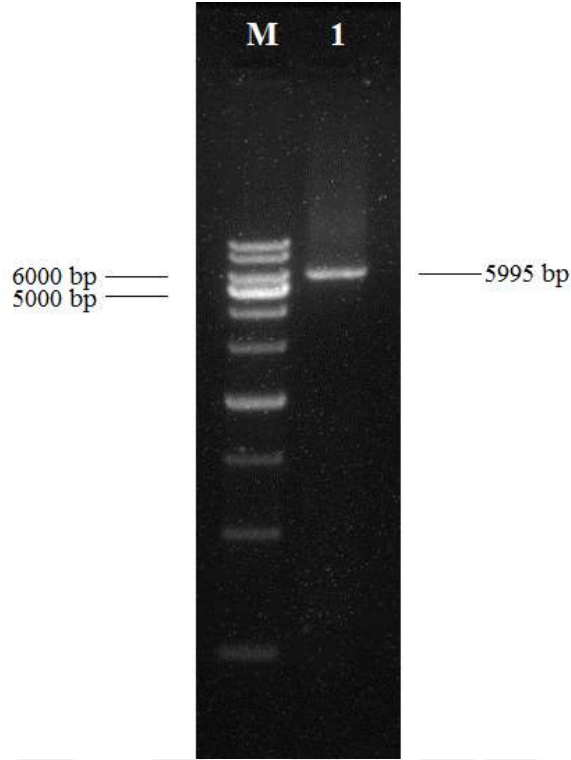
Zeaksantin sentezi için gerekli *crtE*, *crtY*, *crtI*, *crtB*, *crtZ* genlerini içeren 12462 bp pAC-EHER-EBIdiYZ plazmidinin inşası için zeaksantin diglukozid sentezini sağlayan *crtE*, *crtX*, *crtY*, *crtI*, *crtB*, *crtZ*, *idi* genlerini içeren 13581 bp pAC-EHER plazmidinden *crtX* geninin amplifikasyonunu içermeyecek şekilde iki fragment elde edilmiştir. Bu fragmentler Gibson Assembly metoduna uygun olarak tasarlanan primerler kullanılarak PCR ile elde edilmiştir ve plazmid inşası amaçlanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. pAC-EHER-EBIdiYZ plazmidinin tasarımı

3.2.1. Fragmentlerin Elde Edilmesi ve Gibson Assembly Reaksiyonu

pAC-EHER plazmid DNA'sı ile (50 ng/μl) ve F2, R2 primerleri kullanılarak *crtYIBZ* genlerini içeren 5995 bp bölgenin amplifikasyonu için PCR, Bölüm 2.2.6'da belirtilen şartlarda yapılmıştır. PCR ürünü agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir, jel görüntüsü Şekil 3.4'de verilmiştir.



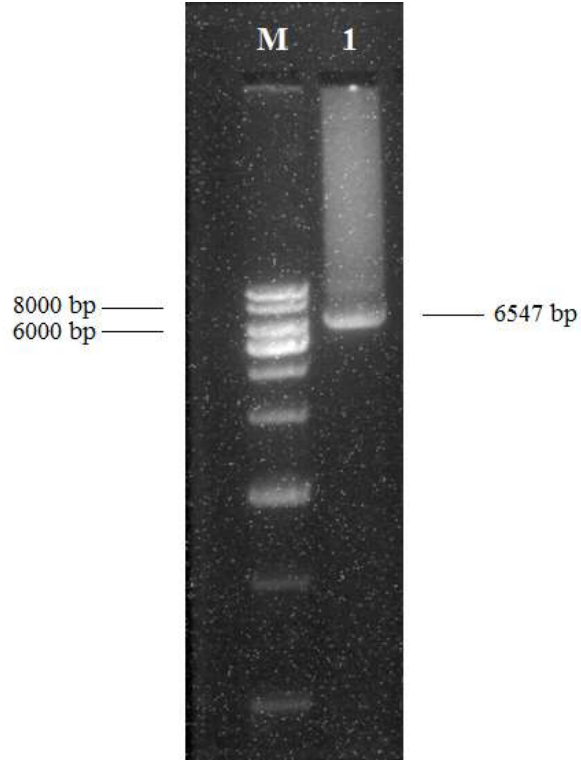
Şekil 3.4. pAC-EHER plazmid DNA'sından F2 ve R2 primerleri ile 5995 bp fragmentin PCR ürününün agaroz jeldeki görüntüsü (1), (M) Markır: Hibrigen 1 kb ladder MG-LDR-1000

pAC-EHER plazmid DNA'sı ile (50 ng/μl) F1, R1 primerleri kullanılarak 6547 bp'lik bölgenin (p15A replikasyon orijini ve *crtE*, *idi*, *CmR* geni bulunduran bölge, backbone yapısı) amplifikasyonu için PCR, Bölüm 2.2.6'da belirtilen şartlarda yapılmıştır. PCR ürünü agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir, jel görüntüsü Şekil 3.5'de verilmiştir.

Agaroz jel elektroforezi ile amplifikasyonu doğrulanan 5995 bp ve 6547 bp fragmentler için üçer tüp 50 μl PCR reaksiyonu yapılmıştır. 6547 bp PCR ürünü 37 °C-1 saat DpnI enzimi ile muamele edilmiştir. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra QIAquick Gel Extraction Kit [107] ile jelden saflaştırılarak fragmentler elde edilmiştir.

5995 bp jel saflaştırma konsantrasyonu: 70,004 ng/μl

6547 bp jel saflaştırma konsantrasyonu: 78,475 ng/μl



Şekil 3.5. pAC-EHER plazmid DNA'sından F1 ve R1 primerleri ile 6547 bp fragmentin PCR ürününün agaroz jeldeki görüntüsü (1), (M) Markır: Hibrigen 1 kb ladder MG-LDR-1000

Jelden saflaştırılan fragmentler ile Gibson Assembly reaksiyonu gerçekleştirilmiştir:

5995 bp : 2,6 µl

6547 bp : 2,4 µl

Gibson Assembly Master karışımı : 15 µl

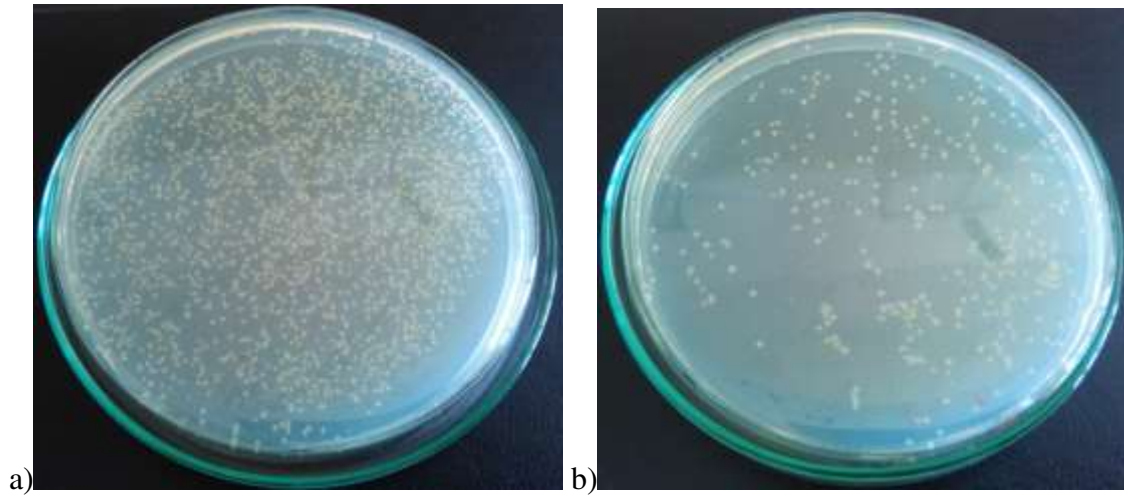
Toplam Hacim : 20 µl

Gibson Assembly reaksiyonu thermal cycler cihazında 50 °C-1 saat inkübasyon şartlarında gerçekleştirilmiştir.

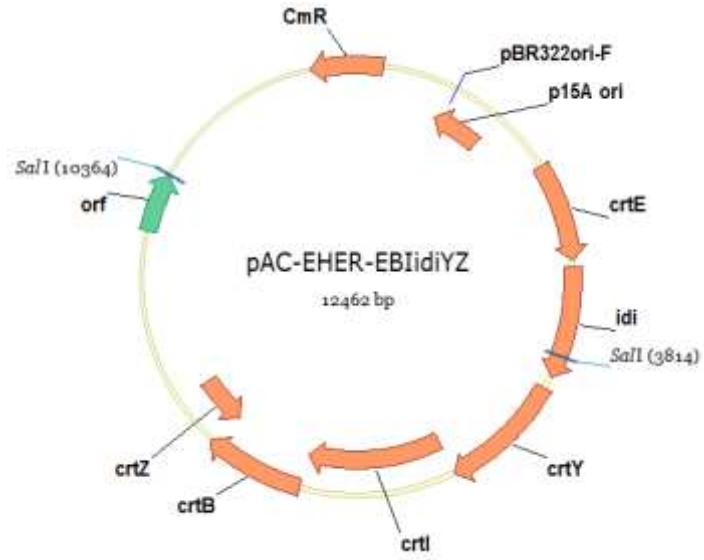
3.2.2. Gibson Assembly Ürününün Transformasyonu ve Enzimatik Kesim Reaksiyonu ile Doğrulanması

Gibson Assembly reaksiyonu ürününün elektrokompotent *E. coli* NEB bakterisine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Seçici antibiyotik içeren LB agar besiyerine ekilen transformasyon ürünü 37 °C-16 saat inkübasyona bırakılmıştır. 16 saatlik inkübasyon sonrasına ait petri görüntüleri Şekil 3.6’da verilmiştir.

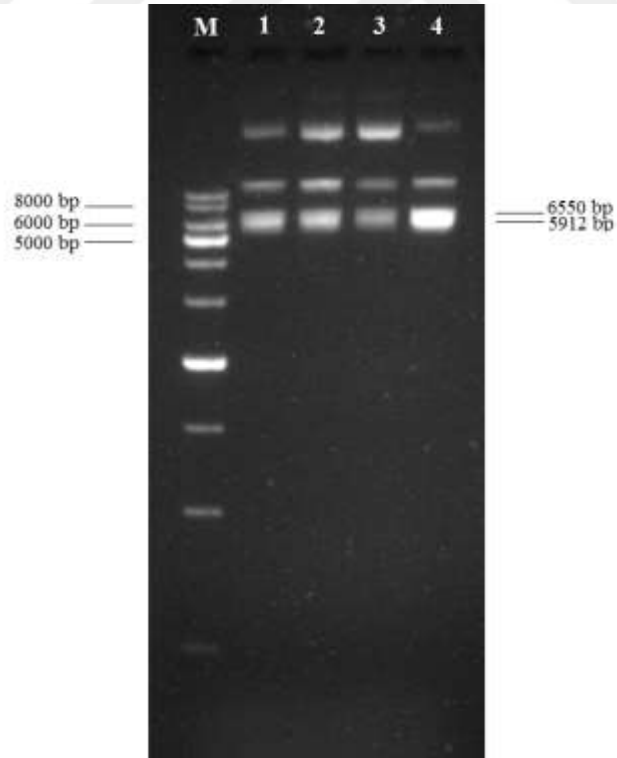
Gibson Assembly transformasyonuna ait petrilere zeaxantin karotenoidinin sarı renginden dolayı üretiminin gerçekleştiği düşünülen fenotipik olarak sarı renkli kolonilerden dört adet seçilerek seçici antibiyotik içeren 5 ml LB besiyerine ekilmiştir ve 37 °C-225 rpm’de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan alınan kolonilerin Qiagen QIAprep Spin Mini Prep kit ile plazmid DNA’sı izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA’ların SalI enzimi ile kesim reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. SalI enzimi plazmidi 6550, 5912 bp uzunluğunda iki fragmente ayırmaktadır (Şekil 3.7). Enzimatik kesim reaksiyonu agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir, elektroforez işlemine ait jel görüntüsü Şekil 3.8’de verilmiştir.



Şekil 3.6. pAC-EHER-EBLidiYZ plazmidinin Gibson Assembly reaksiyonu ürününün transformasyonuna ait petri görüntüsü a) Rest petri b)100 µl petri



Şekil 3.7. pAC-EHER-EBIdiYZ plazmidinin haritası ve SalI enziminin kesim bölgeleri



Şekil 3.8. pAC-EHER-EBIdiYZ plazmidinin SalI kesimi sonrası elde edilen bantlar, (M) Markır: Hibrişen 1 kb ladder MG-LDR-1000

pAC-EHER-EBIidiYZ plazmidinin inşasında Gibson Assembly transformasyonu petrilerinden seçilen fenotipik olarak sarı renkli dört koloni enzimatik olarak doğrulanmıştır ve bu kolonilerin stok kültürleri hazırlanmıştır. Koloniler stoktan alınıp petriye çizilerek 30 °C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır ve fenotipik olarak zeaksantin üretimi gözlemlenmiştir. Kolonilere ait petri görüntüsü Şekil 3.9’da verilmiştir.

3.3. pAC-EHER-EBIidiYZ Plazmidi İçeren *E. coli* Suşlarında Zeaksantin Üretiminin İncelenmesi

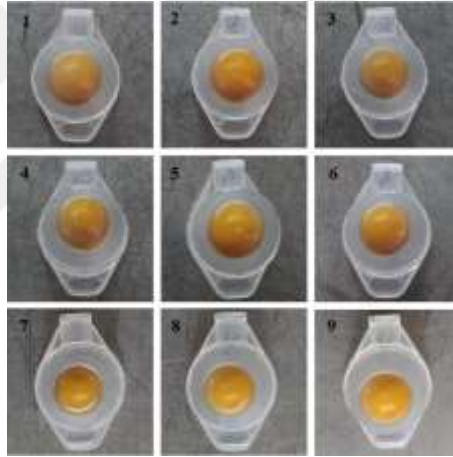
Doğrulan kolonilerden jelde (Şekil 3.8) 3. kuyuda bulunan plazmid DNA kaynağı seçilerek elektrokompotent hücreleri hazırlanan farklı *E. coli* suşlarına (*E. coli* MG1655, *E. coli* NEB 10-beta, *E. coli* DH5 α , *E. coli* DH5 α -Pro, *E. coli* NEB-Turbo, *E. coli* XL1-Blue, *E. coli* TOP10, *E. coli* EPI300, *E. coli* DE3) elektroporasyon ile transformasyonu gerçekleştirilmiştir ve zeaksantin üretiminin incelenmesi için seçici antibiyotik içeren 50 ml OD₆₀₀: 0,1 başlangıç kültürleri 250 ml’lik erlenlerde hazırlanarak 30 °C-200 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.9. pAC-EHER-EBIidiYZ plazmidinin enzimatik doğrulamasında görülen pozitif kolonilerin petrideki görüntüleri

3.3.1. Başlangıç Kültürlerinin Kurulması

Başlangıç kültürlerinin kurulması için pAC-EHER-EBIidiYZ 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 OD₆₀₀: 0,1 olacak şekilde besiyerlerine inokülasyonlar yapılmıştır ve 30 °C-200 rpm’de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondaki kültürler ait pelet görüntüsü Şekil 3.10’da verilmiştir.



Şekil 3.10. pAC-EHER-EBIidiYZ plazmidi içeren *E. coli* suşlarına (1-*E. coli* MG1655, 2-*E. coli* NEB 10-beta, 3-*E. coli* DH5 α , 4-*E. coli* DH5 α -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 peleti görüntüleri

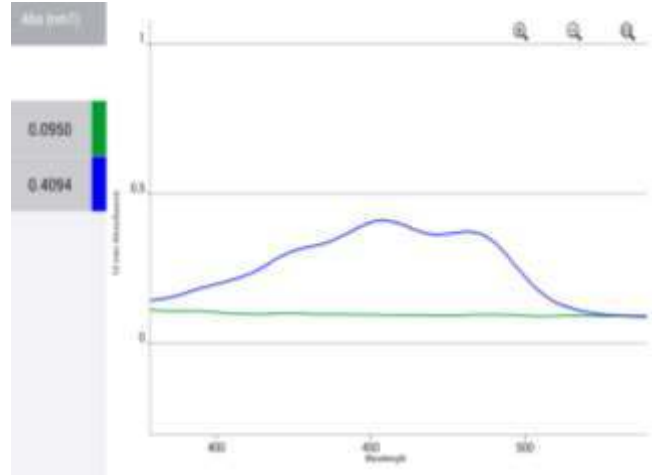
3.3.2. Zeaksantin Ekstraksiyonu ve HPLC ile Ölçümleri

Spektrofotometrik Analiz

Karotenoidlerdeki konjuge çift bağ sistemi, karotenoidlere renk veren ve karotenoidlerin tanımlanması, miktar tayinleri için işlev gören görünür bölge absorpsiyon spektrumunu sağlayan ışık emici kromoforu oluşturmaktadır. Zeaksantin karotenoidi aseton çözücüsünde 452 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon göstermektedir [32]. Şekil 3.11’de pAC-EHER-EBLidiYZ içeren ve içermeyen *E. coli* MG1655 suşlarının 24 saatlik sıvı kültürlerinden alınan 1 ml kültürün zeaksantin ekstraksiyonu için santrifüj edilmesiyle elde edilen hücre peletlerinin görüntüsü verilmiştir ve bu peletlerden ekstrakte edilen bu numunelerin Denovix-DS-11 FX+ ile 452 nm’de yapılan spektrofotometrik ölçümü Şekil 3.12’de verilmiştir, şekilde pAC-EHER-EBLidiYZ içeren *E. coli* MG1655 kültürüne ait ekstraksiyon ürününe ait maksimum pik 450 nm civarında görülmektedir.



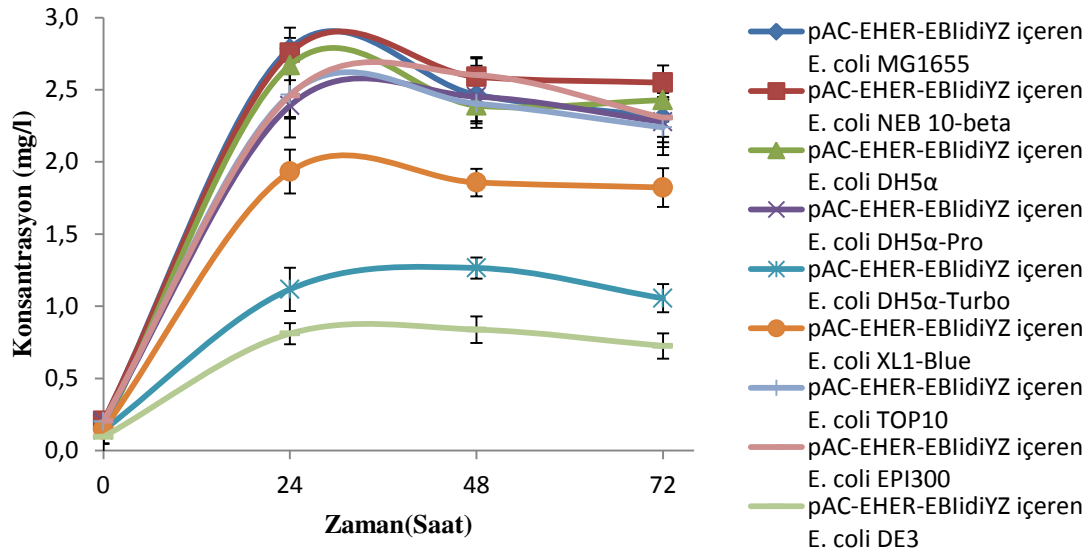
Şekil 3.11. pAC-EHER-EBLidiYZ içeren ve içermeyen *E. coli* MG1655 kültürlerine ait peletler



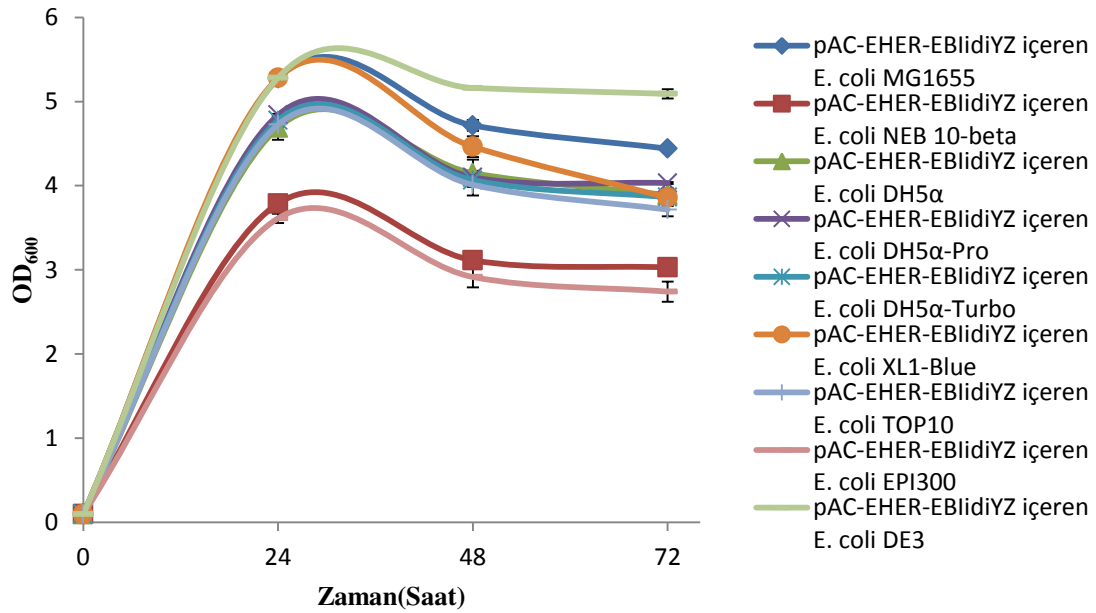
Şekil 3.12. 24 saatlik pAC-EHER-EBIidiYZ içeren ve içermeyen *E. coli* MG1655 kültürlerine ait ekstraksiyon ürünlerinin spektrofotometrik ölçümüne ait grafik görüntüsü

HPLC Analizleri

E. coli kültür örneklerinden zeaksantin ekstraksiyonu başlangıç kültürlerinin kurulmasıyla başlangıcından itibaren 24 saatte bir asetonla gerçekleştirilmiştir. Ölçümler 2 tekrarlı 2 paralel deney halinde yapılmıştır. HPLC ile ölçümler sonucunda elde edilen ortalama zeaksantin konsantrasyonlarının zamana bağlı grafiği Şekil 3.13’de ve kültürlerin ortalama OD₆₀₀ değerlerinin zamana bağlı grafiği Şekil 3.14’de verilmiştir.



Şekil 3.13. Suşların ortalama zeaksantin konsantrasyonlarının zamana bağlı grafiği



Şekil 3.14. Suşların ortalama OD₆₀₀ değerlerinin zamana bağlı grafiği

Şekil 3.13'te HPLC analizi ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda bu çalışmada inşa edilen pAC-EHER-EBIidiYZ plazmidini içeren *E. coli* suşlarının zeaksantin sentezini gerçekleştirdiği görülürken, altı suşun (*E. coli* MG1655, *E. coli* DH5 α , *E. coli* EPI300, *E. coli* NEB 10-beta, *E. coli* DH5 α -Pro, *E. coli* TOP10) daha yüksek miktarda, üç suşun (*E. coli* DE3, *E. coli* XL1, *E. coli* NEB-Turbo) daha az miktarda zeaksantin ürettiği görülmektedir. Bu duruma suşların farklı kullanım amaçlarına uygun olarak tasarlanması sebebiyle sahip oldukları genetik farklılıklar neden olabilmektedir. Örneğin, *E. coli* DE3 suşu genellikle T7 promotorunun kontrolündeki ekspresyonlar için tercih edilirken *E. coli* DH5 α suşu plazmid transformasyonu ve alt klonlama çalışmaları için etkilidir [94, 95].

Şekil 3.13'te pAC-EHER-EBIidiYZ plazmidini içeren *E. coli* suşlarının 72 saatlik inkübasyon süresinde genel olarak 24. saatteki zeaksantin üretiminin 48. ve 72. saatteki üretimlere göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Yapılan analizler incelendiğinde 24. saatteki zeaksantin üretimlerine göre *E. coli* MG1655, *E. coli* NEB 10-beta, *E. coli* DH5 α suşlarının bu çalışmada daha yüksek miktarda zeaksantin ürettiği gözlemlenmektedir. Aynı zamanda pAC-EHER-EBIidiYZ plazmidini içeren *E. coli* suşlarının 72 saatlik inkübasyon süresinde Şekil 3.14'teki OD₆₀₀ değerlerine ait grafiğin Şekil 3.13'teki zeaksantin konsantrasyonlarına ait grafik ile benzer eğri göstermesi mikrobiyal gelişim ile üretim miktarı arasındaki ilişkiyi açıklamaya yardımcı olmaktadır. Kültür ortamında zamana bağlı olarak gerçekleşen mikrobiyal gelişimin azalmasıyla alınan kültür örneklerinden ekstrakte edilen zeaksantin miktarında da azalma görülmektedir.

4. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Karotenogenik olmayan bir bakteri olan *E. coli*'de zeaksantin karotenoidinin heterolog üretiminin amaçlandığı bu çalışmada;

- Zeaksantin diglukosid üretimini sağlayan pAC-EHER plazmidi DNA kaynağı olarak kullanılmıştır ve bu plazmidten iki fragment elde edilerek zeaksantin sentezini sağlayan genleri içeren pAC-EHER-EBIidiYZ plazmidi restriksiyon endonükleazları aracılı klonlamaya alternatif olarak oldukça kullanışlı bir metot olan Gibson Assembly metodu ile başarıyla oluşturulmuştur.
- pAC-EHER-EBIidiYZ plazmidinin aktarıldığı *E. coli* suşlarında gerçekleşen zeaksantin sentezine bağlı olarak zeaksantin renginden dolayı fenotipik olarak sarı renkli koloniler oluştuğu görülmüştür.
- pAC-EHER-EBIidiYZ plazmidinin aktarıldığı *E. coli* suşlarından zeaksantin ekstraksiyonu asetonla yapılmıştır ve ekstraksiyon sonucu zeaksantin miktarları HPLC ile analiz edilmiştir. pAC-EHER-EBIidiYZ plazmidinin aktarıldığı *E. coli* suşları arasında 72 saatlik inkübasyon süresinde en yüksek üretim HPLC analizleri sonucunda *E. coli* MG1655 suşunda 24. saatte $2,786 \pm 0,145$ mg/l, *E. coli* DH5 α suşunda 24. saatte $2,669 \pm 0,104$ mg/l, *E. coli* NEB 10-beta 24. saatte $2,757 \pm 0,102$ mg/l olarak bulunmuştur. pAC-EHER-EBIidiYZ plazmidinin aktarıldığı *E. coli* suşları arasında yapılan analizlerde *E. coli* MG1655, *E. coli* DH5 α , *E. coli* EPI300, *E. coli* NEB 10-beta, *E. coli* DH5 α -Pro, *E. coli* TOP10 suşlarında yakın değerlerde seyreden daha yüksek miktarda zeaksantin üretimi, *E. coli* DE3, *E. coli* XL1, *E. coli* NEB-Turbo suşlarında daha düşük miktarda zeaksantin üretimi olduğu görülmüştür.
- Kültürlerin ortam şartları ve plazmidin gen düzeni optimize edilerek zeaksantin üretimi artırılabilir.
- Metabolik mühendisliği farklı organizmalara ait karotenoid yolak genlerinin seçilen konaklarda yapılandırılmasıyla çeşitli karotenoidlerin üretimi için umut vaat etmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Sedkova, N., Tao, L., Rouvière, P. E. and Cheng, Q.,** 2005. Diversity of carotenoid synthesis gene clusters from environmental Enterobacteriaceae strains. *Applied and environmental microbiology*, **71**(12), 8141-8146.
2. **Beuttler, H., Hoffmann, J., Jeske, M., Hauer, B., Schmid, R. D., Altenbuchner, J. and Urlacher, V. B.,** 2011. Biosynthesis of zeaxanthin in recombinant *Pseudomonas putida*. *Applied microbiology and biotechnology*, **89**(4), 1137-1147.
3. **Chen, X., Zhou, L., Tian, K., Kumar, A., Singh, S., Prior, B. A. and Wang, Z.,** 2013. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: a sustainable industrial platform for bio-based chemical production. *Biotechnology advances*, **31**(8), 1200-1223.
4. **Song, G. H., Kim, S. H., Choi, B. H., Han, S. J. and Lee, P. C.,** 2012. Functional complementation of heterologous carotenoid biosynthetic enzymes and their effect on carotenoid profiles in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM-02556.
5. **Ruiz-Sola, M. Á. and Rodríguez-Concepción, M.,** 2012. Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: a colorful pathway. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, **10**.
6. **Kiokias, S., Proestos, C. and Varzakas, T.,** 2016. A review of the structure, biosynthesis, absorption of carotenoids-analysis and properties of their common natural extracts. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, **4**(Special Issue Carotenoids March 2016), 25-37.
7. **Botella-Pavía, P. and Rodríguez-Concepción, M.,** 2006. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiologia Plantarum*, **126**(3), 369-381.
8. **Eggersdorfer, M. and Wyss, A.,** 2018. Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of biochemistry and biophysics*.
9. **Mezzomo, N. and Ferreira, S. R.,** 2016. Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: A review. *Journal of Chemistry*, **2016**.

10. **Hozawa, A., Jacobs Jr, D. R., Steffes, M. W., Gross, M. D., Steffen, L. M. and Lee, D. H.,** 2006. Associations of serum carotenoid concentrations with the development of diabetes and with insulin concentration: interaction with smoking: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *American journal of epidemiology*, **163**(10), 929-937.
11. **Ylönen, K., Alfthan, G., Groop, L., Saloranta, C., Aro, A., Virtanen, S. M. and Botnia Research Group.,** 2003. Dietary intakes and plasma concentrations of carotenoids and tocopherols in relation to glucose metabolism in subjects at high risk of type 2 diabetes: the Botnia Dietary Study. *The American journal of clinical nutrition*, **77**(6), 1434-1441.
12. **Sathasivam, R. and Ki, J. S.,** 2018. A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries. *Marine drugs*, **16**(1), 26.
13. **Anunciato, T. P. and da Rocha Filho, P. A.,** 2012. Carotenoids and polyphenols in nutricosmetics, nutraceuticals, and cosmeceuticals. *Journal of cosmetic dermatology*, **11**(1), 51-54.
14. **Johnson, E. J.,** 2002. The role of carotenoids in human health. *Nutrition in clinical care*, **5**(2), 56-65.
15. **Zaghdoudi, K., Ngomo, O., Vanderesse, R., Arnoux, P., Myrzakhmetov, B., Frochot, C. and Guiavarc'h, Y.,** 2017. Extraction, Identification and Photo-Physical Characterization of Persimmon (*Diospyros kaki* L.) Carotenoids. *Foods*, **6**(1), 4.
16. **Story, E. N., Kopec, R. E., Schwartz, S. J. and Harris, G. K.,** 2010. An update on the health effects of tomato lycopene. *Annual Review of Food Science and Technology*, **1**, 189-210.
17. **Milani, A., Basirnejad, M., Shahbazi, S. and Bolhassani, A.,** 2017. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *British journal of pharmacology*, **174**(11), 1290-1324.
18. **Hernandez-Almanza, A., Montanez, J., Martinez, G., Aguilar-Jimenez, A., Contreras-Esquivel, J. C. and Aguilar, C. N.,** 2016. Lycopene: progress in microbial production. *Trends in Food Science & Technology*, **56**, 142-148.
19. **Saini, R. K. and Keum, Y. S.,** 2017. Progress in microbial carotenoids production. *Indian journal of microbiology*, **57**(1), 129-130.

20. **Bahieldin, A., Gadalla, N. O., Al-Garni, S. M., Almehdar, H., Noor, S., Hassan, S. M., Shokry A. M., Sabir J. M. and Murata, N.,** 2014. Efficient production of lycopene in *Saccharomyces cerevisiae* by expression of synthetic crt genes from a plasmid harboring the ADH2 promoter. *Plasmid*, **72**, 18-28.
21. **Kang, M. J., Yoon, S. H., Lee, Y. M., Lee, S. H., Kim, J. E., Jung, K. H., Shin Y. C., Keasling J. D. and Kim, S. W.,** 2005. Enhancement of lycopene production in *Escherichia coli* by optimization of the lycopene synthetic pathway. *Journal of microbiology and biotechnology*, **15**(4), 880-886.
22. **Gul, K., Tak, A., Singh, A. K., Singh, P., Yousuf, B. and Wani, A. A.** 2015. Chemistry, encapsulation, and health benefits of β -carotene-A review. *Cogent Food & Agriculture*, **1**(1), 1018696.
23. **Bogacz-Radomska, L. and Harasym, J.,** 2018. β -Carotene—properties and production methods. *Food Quality and Safety*, **2**(2), 69-74.
24. **Wu, L., Guo, X., Wang, W., Medeiros, D. M., Clarke, S. L., Lucas, E. A. ... and Lin, D.,** 2016. Molecular aspects of β , β -carotene-9', 10'-oxygenase 2 in carotenoid metabolism and diseases. *Experimental Biology and Medicine*, **241**(17), 1879-1887.
25. **Ba Ngoc, N., Lv, P. and Zhao, W. E.,** 2018. Suppressive effects of lycopene and β -carotene on the viability of the human esophageal squamous carcinoma cell line EC109. *Oncology letters*, **15**(5), 6727-6732.
26. **Cho, S. O., Kim, M. H. and Kim, H.,** 2018. β -Carotene Inhibits Activation of NF- κ B, Activator Protein-1, and STAT3 and Regulates Abnormal Expression of Some Adipokines in 3T3-L1 Adipocytes. *Journal of cancer prevention*, **23**(1), 37.
27. **Gouranton, E., Thabuis, C., Riollot, C., Malezet-Desmoulins, C., El Yazidi, C., Amiot, M. J., ... and Landrier, J. F.,** 2011. Lycopene inhibits proinflammatory cytokine and chemokine expression in adipose tissue. *The Journal of nutritional biochemistry*, **22**(7), 642-648.
28. **Nagpal, I., and Abraham, S. K.,** 2017. Protective effects of tea polyphenols and β -carotene against γ -radiation induced mutation and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Genes and Environment*, **39**(1), 24.
29. **Chen, D., Zhao, C. X., Lagoin, C., Hai, M., Arriaga, L. R., Koehler, S., ... and Weitz, D. A.,** 2017. Dispersing hydrophobic natural colourant β -carotene in shellac particles for enhanced stability and tunable colour. *Royal Society open science*, **4**(12).

30. **Li, J., Shen, J., Sun, Z., Li, J., Li, C., Li, X. and Zhang, Y.,** 2017. Discovery of Several Novel Targets that Enhance β -Carotene Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in microbiology*, **8**, 1116.
31. **Prabhu, S. U. D. H. A. R. S. H. A. N., Rekha, P. D. and Arun, A. B.,** 2014. Zeaxanthin biosynthesis by members of the genus *Muricauda*. *Pol. J. Microbiol*, **63**, 115-119.
32. **Sajilata, M. G., Singhal, R. S. and Kamat, M. Y.,** 2008. The carotenoid pigment zeaxanthin—a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, **7**(1), 29-49.
33. **Li, S., Liu, N., Lin, L., Sun, E. D., Li, J. D. and Li, P. K.,** 2018. Macular pigment and serum zeaxanthin levels with Goji berry supplement in early age-related macular degeneration. *International journal of ophthalmology*, **11**(6), 970.
34. **Tudosescu, R., Alexandrescu, C. M., Istrate, S. L., Vrapciu, A. D., Ciuluvică, R. C. and Voinea, L.,** 2018. Correlations between internal and external ocular factors and macular pigment optical density. *Romanian journal of ophthalmology*, **62**(1), 42.
35. **Souyoul, S. A., Saussy, K. P., and Lupo, M. P.,** 2018. Nutraceuticals: A review. *Dermatology and therapy*, 1-12.
36. **Kou, L., Du, M., Zhang, C., Dai, Z., Li, X. and Zhang, B.,** 2017. The hypoglycemic, hypolipidemic, and anti-diabetic nephritic activities of zeaxanthin in diet-streptozotocin-induced diabetic Sprague Dawley rats. *Applied biochemistry and biotechnology*, **182**(3), 944-955.
37. **Venil, C. K., Zakaria, Z. A. and Ahmad, W. A.,** 2013. Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, **48**(7), 1065-1079.
38. **Shen, H. J., Cheng, B. Y., Zhang, Y. M., Tang, L., Li, Z., Bu, Y. F., ... and Liu, J. Z.,** 2016. Dynamic control of the mevalonate pathway expression for improved zeaxanthin production in *Escherichia coli* and comparative proteome analysis. *Metabolic engineering*, **38**, 180-190.
39. **Li, X. R., Tian, G. Q., Shen, H. J. and Liu, J. Z.,** 2015. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce zeaxanthin. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, **42**(4), 627-636.
40. **Stephanopoulos, G.,** 2012. Synthetic biology and metabolic engineering. *ACS synthetic biology*, **1**(11), 514-525.

41. **Ding, Y., Wu, F. and Tan, C.** 2014. Synthetic biology: A bridge between artificial and natural cells. *Life*, **4**(4), 1092-1116.
42. **Chen, Y. Y., Galloway, K. E. and Smolke, C. D.,** 2012. Synthetic biology: advancing biological frontiers by building synthetic systems. *Genome biology*, **13**(2), 240.
43. **Khalil, A. S. and Collins, J. J.,** 2010. Synthetic biology: applications come of age. *Nature Reviews Genetics*, **11**(5), 367.
44. **Benner, S. A. and Sismour, A. M.,** 2005. Synthetic biology. *Nature Reviews Genetics*, **6**(7), 533.
45. **Wang, L. Z., Wu, F., Flores, K., Lai, Y. C. and Wang, X.,** 2016. Build to understand: synthetic approaches to biology. *Integrative Biology*, **8**(4), 394-408.
46. **Woolston, B. M., Edgar, S. and Stephanopoulos, G.,** 2013. Metabolic engineering: past and future. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, **4**, 259-288.
47. **Smanski, M. J., Zhou, H., Claesen, J., Shen, B., Fischbach, M. A. and Voigt, C. A.** 2016. Synthetic biology to access and expand nature's chemical diversity. *Nature Reviews Microbiology*, **14**(3), 135.
48. **O'Connor, S. E.,** 2015. Engineering of secondary metabolism. *Annual review of genetics*, **49**, 71-94.
49. **Quin, M. B. and Schmidt-Dannert, C.,** 2014. Designer microbes for biosynthesis. *Current opinion in biotechnology*, **29**, 55-61.
50. **Comba, S., Arabolaza, A. and Gramajo, H.,** 2012. Emerging engineering principles for yield improvement in microbial cell design. *Computational and structural biotechnology journal*, **3**(4), e201210016.
51. **Matsuoka, Y. and Shimizu, K.,** 2012. Importance of understanding the main metabolic regulation in response to the specific pathway mutation for metabolic engineering of Escherichia coli. *Computational and structural biotechnology journal*, **3**(4), e201210018.
52. **Keasling, J. D.,** 2010. Manufacturing molecules through metabolic engineering. *Science*, **330**(6009), 1355-1358.
53. **Kelwick, R., MacDonald, J. T., Webb, A. J. and Freemont, P.,** 2014. Developments in the tools and methodologies of synthetic biology. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, **2**, 60.

54. **Fisher, A. K., Freedman, B. G., Bevan, D. R. and Senger, R. S.,** 2014. A review of metabolic and enzymatic engineering strategies for designing and optimizing performance of microbial cell factories. *Computational and structural biotechnology journal*, **11**(18), 91-99.
55. **Becker, J. and Wittmann, C.,** 2016. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for the heterologous production of high value molecules—a veteran at new shores. *Current opinion in biotechnology*, **42**, 178-188.
56. **Mahalik, S., Sharma, A. K. and Mukherjee, K. J.,** 2014. Genome engineering for improved recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Microbial cell factories*, **13**(1), 177.
57. **Jones, J. A., Toparlak, Ö. D. and Koffas, M. A.** 2015. Metabolic pathway balancing and its role in the production of biofuels and chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, **33**, 52-59.
58. **Galanie, S., Siddiqui, M. S. and Smolke, C. D.,** 2013. Molecular tools for chemical biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, **24**(6), 1000-1009.
59. **Zhang, S., Zhao, X., Tao, Y. and Lou, C.,** 2015. A novel approach for metabolic pathway optimization: Oligo-linker mediated assembly (OLMA) method. *Journal of biological engineering*, **9**(1), 23.
60. **Lanza, A. M., Curran, K. A., Rey, L. G. and Alper, H. S.,** 2014. A condition-specific codon optimization approach for improved heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC systems biology*, **8**(1), 33.
61. **Chaney, J. L. and Clark, P. L.,** 2015. Roles for synonymous codon usage in protein biogenesis. *Annual review of biophysics*, **44**, 143-166.
62. **Chung, B. K. S. and Lee, D. Y.,** 2012. Computational codon optimization of synthetic gene for protein expression. *BMC systems biology*, **6**(1), 134.
63. **Elena, C., Ravasi, P., Castelli, M. E., Peirú, S. and Menzella, H. G.,** 2014. Expression of codon optimized genes in microbial systems: current industrial applications and perspectives. *Frontiers in microbiology*, **5**, 21.
64. **Wang, T., Ma, X., Du, G. and Chen, J.,** 2012. Overview of regulatory strategies and molecular elements in metabolic engineering of bacteria. *Molecular biotechnology*, **52**(3), 300-308.
65. **Li, Y. and Wang, G.,** 2016. Strategies of isoprenoids production in engineered bacteria. *Journal of applied microbiology*, **121**(4), 932-940.

66. **King, J. R., Edgar, S., Qiao, K., and Stephanopoulos, G.,** 2016. Accessing Nature's diversity through metabolic engineering and synthetic biology. *F1000Research*, **5**.
67. **Park, S. Y., Yang, D., Ha, S. H. and Lee, S. Y.,** 2018. Metabolic engineering of microorganisms for the production of natural compounds. *Advanced Biosystems*, **2**(1), 1700190.
68. **Xue, J., and Ahring, B. K.,** 2011. Enhancing isoprene production by genetic modification of the DXP pathway in *Bacillus subtilis*. *Applied and environmental microbiology*.
69. **Chen, Y., Xiao, W., Wang, Y., Liu, H., Li, X. and Yuan, Y.,** 2016. Lycopene overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* through combining pathway engineering with host engineering. *Microbial Cell Factories*, **15**(1), 113.
70. **Zhao, J., Li, Q., Sun, T., Zhu, X., Xu, H., Tang, J., ... and Ma, Y.,** 2013. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β -carotene production. *Metabolic engineering*, **17**, 42-50.
71. **Lu, Q., Bu, Y. F. and Liu, J. Z.,** 2017. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for producing astaxanthin as the predominant carotenoid. *Marine drugs*, **15**(10), 296.
72. **Galanie, S., Thodey, K., Trenchard, I. J., Interrante, M. F. and Smolke, C. D.,** 2015. Complete biosynthesis of opioids in yeast. *Science*, **349**(6252), 1095-1100.
73. **Trenchard, I. J., Siddiqui, M. S., Thodey, K. and Smolke, C. D.,** 2015. De novo production of the key branch point benzyloquinoline alkaloid reticuline in yeast. *Metabolic engineering*, **31**, 74-83.
74. **Li, Y. and Smolke, C. D.,** 2016. Engineering biosynthesis of the anticancer alkaloid noscapine in yeast. *Nature communications*, **7**.
75. **Thodey, K., Galanie, S. and Smolke, C. D.,** 2014. A microbial biomanufacturing platform for natural and semisynthetic opioids. *Nature chemical biology*, **10**(10), 837-844.
76. **Katsuyama, Y., Matsuzawa, M., Funa, N. and Horinouchi, S.,** 2008. Production of curcuminoids by *Escherichia coli* carrying an artificial biosynthesis pathway. *Microbiology*, **154**(9), 2620-2628.

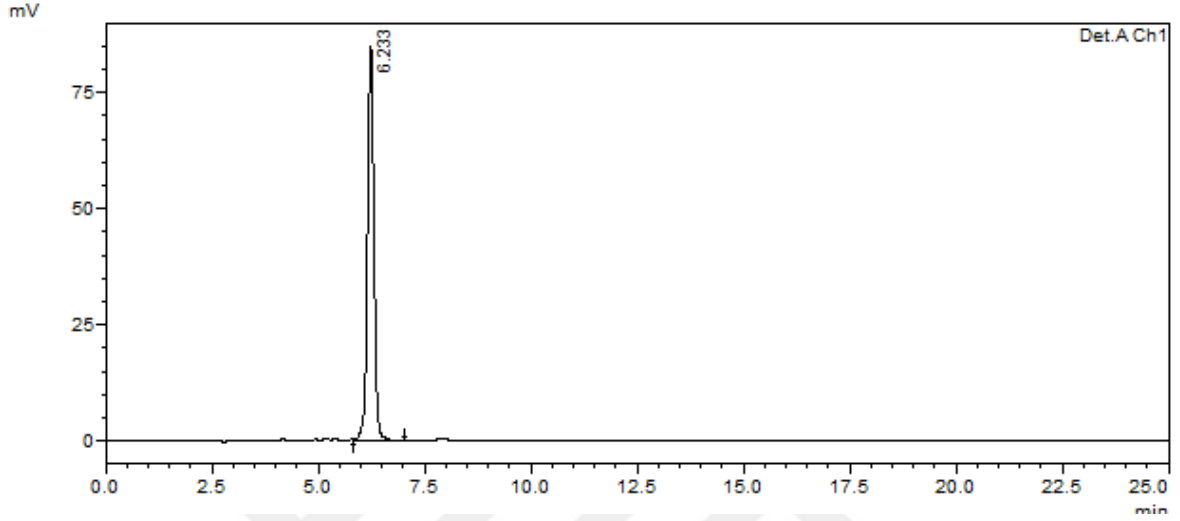
77. **Xu, P., Ranganathan, S., Fowler, Z. L., Maranas, C. D. and Koffas, M. A.,** 2011. Genome-scale metabolic network modeling results in minimal interventions that cooperatively force carbon flux towards malonyl-CoA. *Metabolic engineering*, **13**(5), 578-587.
78. **Yan, Y., Kohli, A. and Koffas, M. A.,** 2005. Biosynthesis of natural flavanones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(9), 5610-5613.
79. **Chen, Y., Xiao, W., Wang, Y., Liu, H., Li, X. and Yuan, Y.,** 2016. Lycopene overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* through combining pathway engineering with host engineering. *Microbial Cell Factories*, **15**(1), 113.
80. **Lim, C. G., Fowler, Z. L., Hueller, T., Schaffer, S., and Koffas, M. A.,** 2011. High-yield resveratrol production in engineered *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, **77**(10), 3451-3460.
81. **Ajikumar, P. K., Xiao, W. H., Tyo, K. E., Wang, Y., Simeon, F., Leonard, E., ... and Stephanopoulos, G.,** 2010. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, **330**(6000), 70-74.
82. **Yadav, V. G., De Mey, M., Lim, C. G., Ajikumar, P. K. and Stephanopoulos, G.,** 2012. The future of metabolic engineering and synthetic biology: towards a systematic practice. *Metabolic engineering*, **14**(3), 233-241.
83. **Anthony, J. R., Anthony, L. C., Nowroozi, F., Kwon, G., Newman, J. D. and Keasling, J. D.,** 2009. Optimization of the mevalonate-based isoprenoid biosynthetic pathway in *Escherichia coli* for production of the anti-malarial drug precursor amorpha-4, 11-diene. *Metabolic engineering*, **11**(1), 13-19.
84. **Zhang, W., Hu, X., Wang, L. and Wang, X.,** 2014. Reconstruction of the carotenoid biosynthetic pathway of *Cronobacter sakazakii* BAA894 in *Escherichia coli*. *PloS one*, **9**(1), e86739.
85. **Hundle, B., Alberti, M., Nievelstein, V., Beyer, P., Kleinig, H., Armstrong, G. A., ... and Hearst, J. E.,** 1994. Functional assignment of *Erwinia herbicola* Eho10 carotenoid genes expressed in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics MGG*, **245**(4), 406-416.
86. **Sedkova, N., Tao, L., Rouvière, P. E. and Cheng, Q.** 2005. Diversity of carotenoid synthesis gene clusters from environmental Enterobacteriaceae strains. *Applied and environmental microbiology*, **71**(12), 8141-8146.

87. **Albermann, C.**, 2011. High versus low level expression of the lycopene biosynthesis genes from *Pantoea ananatis* in *Escherichia coli*. *Biotechnology letters*, **33**(2), 313-319.
88. **Song, G. H., Kim, S. H., Choi, B. H., Han, S. J. and Lee, P. C.**, 2013. Heterologous carotenoid-biosynthetic enzymes: functional complementation and effects on carotenoid profiles in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, **79**(2), 610-618.
89. **Yoon, S. H., Park, H. M., Kim, J. E., Lee, S. H., Choi, M. S., Kim, J. Y. ... and Kim, S. W.**, 2007. Increased β -carotene production in recombinant *Escherichia coli* harboring an engineered isoprenoid precursor pathway with mevalonate addition. *Biotechnology progress*, **23**(3), 599-605.
90. **Wang, C. W., Oh, M. K. and Liao, J. C.**, 1999. Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*, **62**(2), 235-241.
91. **Ruther, A., Misawa, N., Böger, P. and Sandmann, G.**, 1997. Production of zeaxanthin in *Escherichia coli* transformed with different carotenogenic plasmids. *Applied microbiology and biotechnology*, **48**(2), 162-167.
92. **Nishizaki, T., Tsuge, K., Itaya, M., Doi, N., and Yanagawa, H.** 2007. Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in *Escherichia coli* by ordered gene assembly in *Bacillus subtilis*. *Applied and environmental microbiology*, **73**(4), 1355-1361.
93. **Kang, M. J., Lee, Y. M., Yoon, S. H., Kim, J. H., Ock, S. W., Jung, K. H., ... and Kim, S. W.**, 2005. Identification of genes affecting lycopene accumulation in *Escherichia coli* using a shot-gun method. *Biotechnology and bioengineering*, **91**(5), 636-642.
94. https://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes, 2018.
95. Matthew F., Plasmids 101:Common Lab *E. coli* Strains. <https://blog.addgene.org/plasmids-101-common-lab-e-coli-strains>, 2018.
96. **Češka, M., and 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.

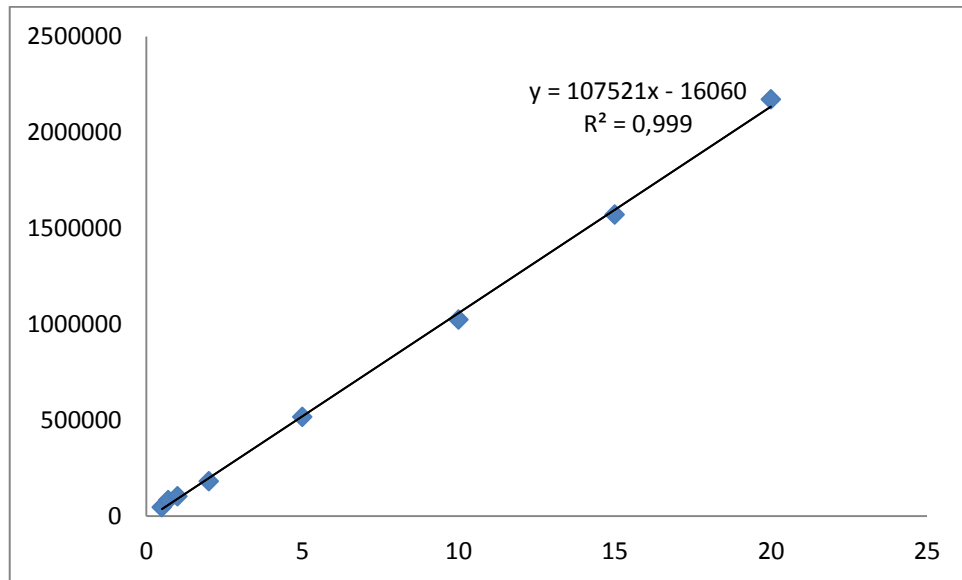
97. **Cunningham, F. X., Sun, Z., Chamovitz, D., Hirschberg, J. and Gantt, E.,** 1994. Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp strain PCC7942. *The Plant Cell*, **6**(8), 1107-1121.
98. <https://www.addgene.org/53262/>, 2018.
99. http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/244310.pdf, 2018
100. QIAGEN, QIAprep[®] Miniprep Handbook, 2015, Cat. No: 27104-27106, Germany, 20p.
101. **Temizkan, G., Arda N.,** 2008. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler, İst. Üniv. BİYOGEM Yayın, İstanbul.
102. https://www.biocat.com/bc/files/Gibson_Guide_V2_101417_web_version_8.5_x_1_1_FINAL.pdf, 2018.
103. <https://international.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/gibson-assembly-building-a-synthetic-biology-toolset>, 2018.
104. **Kalva, S., Boeke, J. D. and Mita, P.,** 2018. Gibson Deletion: a novel application of isothermal in vitro recombination. *Biological procedures online*, **20**(1), 2.
105. **Gibson, D.,** 2009. One-step enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases in size. *Protocol Exchange*.
106. <https://www.addgene.org/53262/sequences/>, 2018.
107. QIAGEN, QIAquick[®] Spin Handbook, Cat. No: 28506, Germany.
108. **Sambrook, J., Russell, D.W.,** 2001, *Molecular Cloning A Laboratory Manual I-II-III*, Third Edition, CSHL Press, New York.

EKLER

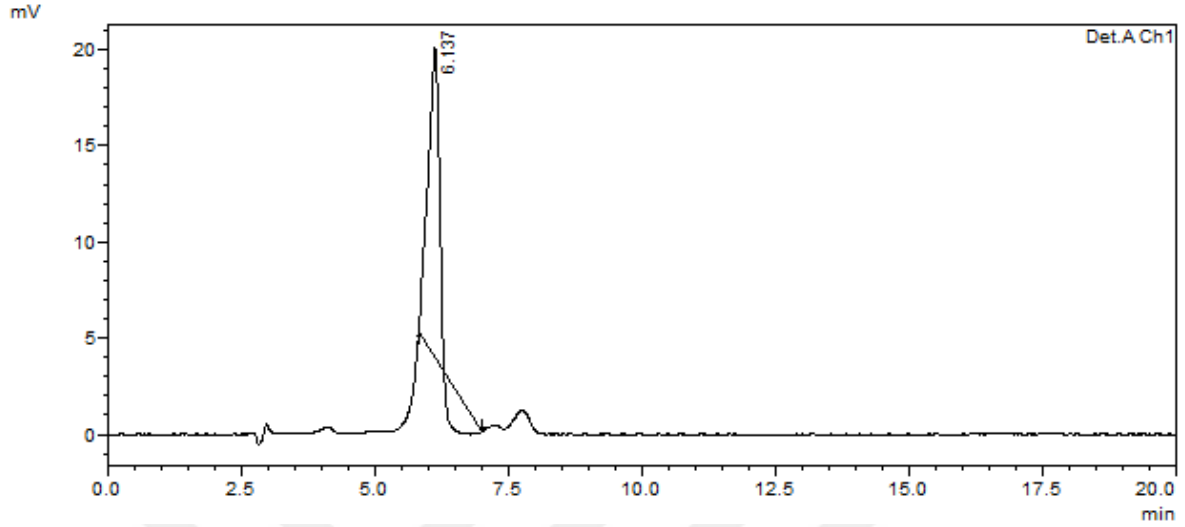
EK Şekil 1. 10 ppm zeaksantin standardına ait HPLC kromatogramı



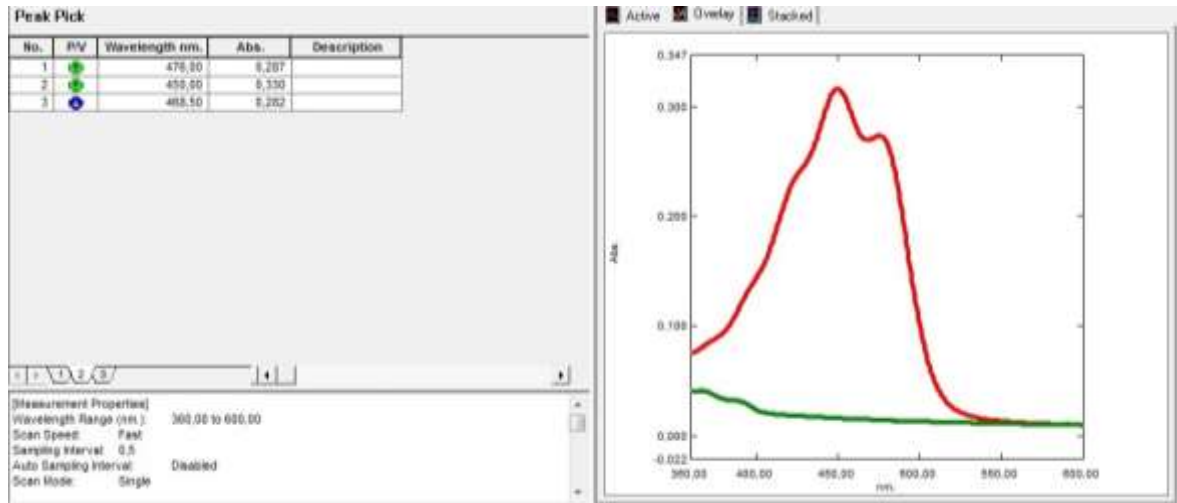
EK Şekil 2. Zeaksantin standardı ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi



EK Şekil 3. pAC-EHER-EBİdİYZ içeren *E. coli* TOP10 suşundan ekstrakte edilen zeaksantine ait kromatogram



EK Şekil 4. pAC-EHER-EBİdİYZ içeren ve içermeyen *E. coli* MG1655 kültürlerine ait ekstraksiyon ürünlerinin spektrofotometrik dalga boyu taramasına ait grafik görüntüsü (Kırmızı çizgi: pAC-EHER-EBİdİYZ içeren *E. coli* MG1655, Yeşil çizgi: *E. coli* MG1655)



EK Tablo 1. HPLC ile ölçümler sonucunda elde edilen ortalama zeaksantin konsantrasyonları

pAC-EHER-EBİdİYZ içeren suşlar	Zamana bağlı ortalama zeaksantin konsantrasyonları ± standart sapma (mg/l)			
	0	24	48	72
<i>E. coli</i> MG1655	0,202± 0,008	2,786± 0,145	2,465± 0,113	2,311± 0,136
<i>E. coli</i> NEB 10-beta	0,205± 0,008	2,757± 0,102	2,590± 0,127	2,557± 0,132
<i>E. coli</i> DH5α	0,150± 0,100	2,669± 0,104	2,391± 0,108	2,428± 0,147
<i>E. coli</i> DH5α-Pro	0,201± 0,010	2,390± 0,219	2,452± 0,215	2,277± 0,173
<i>E. coli</i> NEB-Turbo	0,142± 0,095	1,118± 0,149	1,265± 0,073	1,056± 0,097
<i>E. coli</i> XL1-Blue	0,147± 0,098	1,933± 0,152	1,858± 0,095	1,823± 0,134
<i>E. coli</i> TOP10	0,201± 0,015	2,466± 0,165	2,404± 0,136	2,239± 0,191
<i>E. coli</i> EPI300	0,206± 0,007	2,460± 0,149	2,602± 0,125	2,306± 0,170
<i>E. coli</i> DE3	0,096± 0,111	0,811± 0,073	0,839± 0,092	0,725± 0,088

EK Tablo 2. pAC-EHER-EBIidiYZ içeren *E. coli* suşlarının ortalama OD₆₀₀ değerleri (0. saat değerleri OD₆₀₀: 0,1 olacak şekilde ayarlanmıştır.)

pAC-EHER-EBIidiYZ içeren suşlar	Saate bağlı ortalama OD ₆₀₀ değerleri ± standart sapma		
	24	48	72
<i>E. coli</i> MG1655	5,274± 0,067	4,717± 0,066	4,441± 0,015
<i>E. coli</i> NEB 10-beta	3,789± 0,012	3,115± 0,056	3,030± 0,100
<i>E. coli</i> DH5α	4,690± 0,142	4,150± 0,162	3,890± 0,051
<i>E. coli</i> DH5α-Pro	4,840± 0,013	4,100± 0,076	4,032± 0,011
<i>E. coli</i> NEB-Turbo	4,775± 0,049	4,066± 0,016	3,864± 0,104
<i>E. coli</i> XL1-Blue	5,280± 0,081	4,463± 0,124	3,859± 0,087
<i>E. coli</i> TOP10	4,725± 0,030	4,011± 0,127	3,716± 0,079
<i>E. coli</i> EPI300	3,613± 0,055	2,916± 0,124	2,742± 0,120
<i>E. coli</i> DE3	5,283± 0,078	5,161± 0,014	5,092± 0,056

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Yasemin KUŞ

Adres: Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Elazığ/Türkiye

E-posta: ysmn_ks@hotmail.com, yasemnkus@gmail.com

Kişisel bilgiler

Doğum Tarihi : 25.09.1992

Doğum Yeri : Tunceli

Ehliyet : B Sınıfı (30/7/2012)

Eğitim bilgileri

2006-2010 Tunceli Türk Telekom Fen Lisesi

2011-2015 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Lisans Programı

2015-2018 Fırat Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Tezli Yüksek Lisans

Yüksek Lisans Tez Konusu: Metabolik Mühendisliği Yaklaşımıyla Zeaksantin Üretimi

Staj deneyimi

İstanbul Üniversitesi DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı (25 İş Günü)

İstanbul Üniversitesi DETAE Genetik Anabilim Dalı (25 İş Günü)

Projeler

117M051 No'lu Metabolik Mühendisliği Yaklaşımıyla Biyosentetik Bir Alternatif Olarak
Safran Apokarotenoidlerinin Mikrobiyal Biyosentezi Ve Biyoreaktörde Üretimi başlıklı
TÜBİTAK projesinde bursiyer, 01.01.18-17.09.18

MF.17.40 No'lu Metabolik Mühendisliği Yaklaşımıyla Zeaksantin Üretimi başlıklı
FÜBAP projesinde araştırmacı, 03.11.2017-Devam ediyor

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

V. Celik Ozgen* , Y. Kuş, Production of Plant Secondary Metabolites by Metabolic
Engineering Approach, 8TH International Advanced Technologies Symposium, 2017

Venhar CELİK OZGEN* , Yasemin KUŞ, Heterologous Biosynthesis Approach to the
Production of Zeaxanthin as an Animal Feed Additive, 1. International GAP
Agriculture & Livestock Congress, 2018