



**ZEAKSANTİN ÖNCÜL MADDESİNİ
KULLANARAK SAFRAN APOKAROTENOİDLERİNİN
HETEROLOG MİKROBİYAL BİYOSENTEZİ**

Esra ÖZ

Yüksek Lisans Tezi

Anabilim Dalı: Biyomühendislik

Tezin Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Venhar ÇELİK ÖZGEN

TEMMUZ - 2019

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZEAKSANTİN ÖNCÜL MADDESİNİ KULLANARAK SAFRAN
APOKAROTENOİDLERİNİN HETEROLOG MİKROBİYAL BİYOSENTEZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra ÖZ

161132103

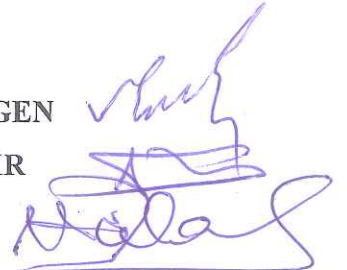
Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 09.07.2019

Tezin Savunulduğu Tarih: 31.07.2019

Tezin Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Venhar ÇELİK ÖZGEN

Diğer Jüri Üyeleri: Dr. Öğr. Üyesi Aykut TOPDEMİR

Doç. Dr. Hakan YILDIRIM



ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezim süresince yardımlarını, bilimsel katkı ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doktor Öğretim Üyesi Venhar ÇELİK ÖZGEN'e teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım esnasında desteğini esirgemeyen Sentetik Biyoloji ve Metabolik Mühendisliği laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. M. Şaban TANYILDIZI, Prof. Dr. İnanç ÖZGEN ve Arş. Gör. Kübra ŞİŞLİOĞLU'na deneysel süreçteki desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmasında deneysel aşamada 117M051 proje numarası ile TÜBİTAK kurumuna ve MF1750 proje numarası ile Fırat Üniversitesi FÜBAP birimine finansal desteğinden dolayı teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarımda katkısı bulunan ENEA Casaccia Research Center (İtalya) kurumuna ve Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

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

Esra ÖZ

ELAZIĞ-2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	IX
KISALTMALAR DİZİNİ	X
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Bitkilerde Sekonder (Özelleştirilmiş) Metabolitler.....	3
1.2. Karotenoidler.....	4
1.2.1. Karotenoidlerin Kimyası, Sınıflandırılması ve Oluşumu	5
1.2.2. Zeaksantin.....	8
1.2.3. Karotenoidlerin Tıbbi Önemi	9
1.3. Apokarotenoidler.....	10
1.3.1. Karotenoid bölünme dioksijenazları ve karotenoid türevli sinyal molekülleri.....	11
1.4. Safran Apokarotenoidleri (<i>Crocus sativus</i> L.)	13
1.4.1. Safranın Tıbbi Önemi	16
1.4.2. Safran Metabolitleri	18
1.5. Sentetik Biyoloji ve Metabolik Mühendisliği	21
1.5.1. Metabolik Mühendisliğinde Kullanılan Stratejiler	23
1.5.2. Bakterilerde Metabolik Mühendisliği.....	25
1.5.3. Sekonder Metabolitlerde Metabolik Mühendisliği	27
1.6. Safran Metabolik Yolak	29
1.6.1. Safran Metabolik Yolak Genleri.....	31
1.7. Safran Apokarotenoidlerinin Heterolog Mikrobiyal Biyosentezi	35
2. MATERYAL ve METOD	37
2.1. Materyal	37
2.1.1. Plazmidler	38
2.1.2. Çözeltiler ve Tamponlar	38

2.1.3. Antibiyotikler.....	38
2.1.4. <i>In Vitro</i> Ortamda Bakterilerin Büyümesini Sağlayan Besiyerleri	39
2.1.5. <i>E. coli</i> Suşları.....	41
2.2. Metod	41
2.2.1. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması	41
2.2.2. Transformasyon	42
2.2.3. Plazmid DNA İzolasyonu	43
2.2.4. RNA İzolasyonu	44
2.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Reaksiyonları	44
2.2.6. Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile DNA'nın Kesilmesi	46
2.2.7. Gibson Assembly Metodu	47
2.2.8. cDNA Sentezi	48
2.2.9. Agaroz Jel Elektroforezi	49
2.2.10. PCR Ürünlerinin Jelden Saflaştırılması.....	50
2.2.11. Stok Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması	51
2.2.12. Sentetik Gen Devresinin Plazmid Haritasının Tasarlanması.....	51
2.2.13. Primer Tasarımı	51
2.2.14. HPLC Analizi	52
2.2.15. HPLC Analizi İçin Standart Numune Hazırlama	52
2.2.16. Safran Metabolitleri İçin Başlangıç Kültürlerinin Hazırlanması.....	53
2.2.17. Safran Metabolitleri İçin Ekstraksiyon Metodu	53
3. BULGULAR ve TARTIŞMA	54
3.1. pTHIO-CCD2, pTHIO-UGT74AD1 ve pTHIO-ALDH3I1 Plazmidlerinin PCR ile Doğrulanması.....	54
3.2. pVC-CCD2, pVC-UGT ve pVC-CCD-UGT Plazmidinin İnşası	56
3.2.1. pVC-CCD2 Plazmidinin İnşa Edilmesi	56
3.2.2. pVC-UGT Plazmidinin İnşa Edilmesi	60
3.2.3. pVC-CCD-UGT Plazmidinin İnşa Edilmesi	64
3.3. Safran Bitkisinin (<i>Crocus sativus</i> L.) Gelişim Aşamaları.....	67
3.4. HPLC Analizi.....	68
4. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	72
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	92

ÖZET

Bitki sekonder metabolitleri; çiçeklerin rengi, yemeğin tadı, zararlılara ve hastalıklara karşı direnç gibi özellikler için çok önemlidir. Dahası, ilaçlar, boyalar ve kokular gibi birçok değerli kimyasal maddenin kaynağıdır. Bu nedenle, bitkilerde sekonder metabolit üretimi, daha iyi bir kimyasal üretmek, daha az toksik bir bileşik üretmek veya yeni bileşikler üretmek için mühendisliğini yapabilmek oldukça ilgi çekmiştir. Bitki sekonder metabolitleri ile ilgili yapılan çalışmalar son yıllarda giderek artmıştır. Sekonder metabolitlerin üretiminin geliştirilmesi ile ilgili yeni alanlar ortaya çıkmaya başlamıştır. Rekombinant Dna teknolojisi gibi yeni gelişen alanlar, sekonder metabolit yollarının üzerinde çalışmalar yaparak sekonder metabolit üretimini geliştirmeyi amaçlamışlardır. Fakat bu yollar üzerinde bazı sıkıntıların aşılması başarılamamıştır. Bu eksikliklerin giderilebilmesi için metabolik mühendisliği ve sentetik biyoloji gibi yeni gelişen ve çözüm odaklı çalışmalar başarıyı beraberinde getirmiştir. Bakteriler, mayalar gibi mikroorganizmaları kullanılarak bitkide üretimi olan metabolitlerin yolak yapısını bakteriye entegre edilerek metabolit üretimi artırılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada bitkiye ihtiyaç duyulmadan yolak genleri bakteriye aktararak bitki sekonder metabolitleri üretim aşamaları geliştirilmiştir. Safran bitkisinde (*Crocus sativus* L.) bulunan sekonder metabolitleri olan krosin, safranal ve pikrokrosin sentez aşamaları incelenmiştir. Metabolit biyosentezinin gerçekleşebilmesi için CCD2 ve UGT genlerinin plazmid inşaları yapılmıştır. Plazmid inşaları yapılan genlerin ekspresyonu için *E. coli* NEB 10-beta ve *E. coli* MG1655 soyları kullanılmıştır. Safran metabolitlerinin biyosentezi HPLC cihazı kullanılarak incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda HPLC analizlerine dayanarak pikrokrosin üretiminin gözlemlendiği fakat safranal ve krosin biyosentezinin gerçekleşmediği görülmektedir. Birçok alanda oldukça ekonomik değere sahip olan safran bitkisinin bitki-bağımsız üretilebilmesi için alternatif ve ilgi çekici çalışmalar yapılmıştır.

Anahtar kelimeler: Sekonder metabolit, sentetik biyoloji, metabolik mühendisliği, safran, krosin, pikrokrosin, safranal, *Crocus sativus* L.

SUMMARY

Heterologous Microbial Biocynthesis Of Saffron Apocarotenoids Using Zeaxanthin Previous Substance

Plant secondary metabolites; color of flowers, taste of food, resistance to pests and diseases is very important for such features. Moreover, medicines are the source of many valuable chemicals such as dyes and odors. Therefore, the production of secondary metabolites in plants, producing a better chemical, producing a less toxic compound or being able to engineer to produce new compounds has attracted considerable interest. Studies on plant secondary metabolites have increased in recent years. New areas of development of the production of secondary metabolites have begun to emerge. Emerging areas, such as recombinant DNA technology, have aimed to improve secondary metabolite production by studying secondary metabolite pathways. However, some problems on these pathways have not been overcome. In order to overcome these shortcomings, new and solution oriented studies such as metabolic engineering and synthetic biology have brought success. By using microorganisms such as bacteria and yeasts, it was tried to increase the metabolite production by integrating the pathway structure of the metabolites produced in plants. In this study, pathway genes were transferred to bacteria without the need for plant and plant secondary metabolites production stages were developed. Secondary metabolites found in saffron (*Crocus sativus* L.), crocin, safranal and picrocrocin synthesis stages were investigated. Plasmid constructs of CCD2 and UGT genes were performed for metabolite biosynthesis. *E. coli* NEB 10-beta and *E. coli* MG1655 strains were used for expression of the plasmid constructs. Biosynthesis of saffron metabolites was investigated using HPLC. As a result of the studies, it was observed that picrocrocin production was observed on the basis of HPLC analysis but safranal and crocin biosynthesis was not realized. Alternative and interesting studies have been conducted in order to produce plant-independent saffron plant which has economic value in many fields.

Key words: Secondary metabolite, synthetic biology, metabolic engineering, saffron, crocin, picrocrocin, safranal, *Crocus sativus* L.

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Karotenoid metabolik yolak.....	7
Şekil 1.2. Bitkilerde apokarotenoid sinyal biyosentezi için genel şematik.....	12
Şekil 1.3. Safranın başlıca kimyasal bileşenleri.....	14
Şekil 1.4. Safran ve bileşenlerinin farmakolojik uygulamaları.....	17
Şekil 1.5. Krosin ve krosetinin yapısı	19
Şekil 1.6. Safran apokarotenoid yolak	30
Şekil 1.7. <i>E. coli</i> 'de safran apokarotenoidlerinin üretilmesi için önerilen biyosentetik şema.	36
Şekil 3.1. pTHIO-CCD2, pTHIO-UGT74AD1 ve pTHIO-ALDH3I1 plazmidlerinin haritaları.	55
Şekil 3.2. pTHIO-CsCCD2 (Cm), pTHIO-CsUGT74AD1 (Spect), pTHIO-CsALDH3I1 (Amp) plazmidinin PCR ile doğrulanması.	56
Şekil 3.3. (A) pVC-CCD2 plazmidinin elde edilmesi için CCD2 fragmentinin PCR ile doğrulanması. (B) pVC-UGT ve pVC-CCD2 plazmidlerinin elde edilmesi için ppVC00154 fragmentinin PCR ile doğrulanması.....	58
Şekil 3.4. pVC-CCD2 plazmid haritası.....	59
Şekil 3.5. pVC-CCD2 plazmidinin transformasyon sonuçları.....	59
Şekil 3.6. pVC-CCD2 plazmidinin SalI-HF ve AatII restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesimi sonrası elde edilen bantlar.....	60
Şekil 3.7. A) ppVC00154 plazmid haritası ve B) pVC-UGT plazmid haritası.....	61
Şekil 3.8. pVC-UGT plazmidinin elde edilmesi için UGT fragmentinin PCR ile doğrulanması.	62
Şekil 3.9. pVC-UGT plazmidinin transformasyon sonuçları.....	63
Şekil 3.10. pVC-UGT plazmidinin SacI-HF restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesimi sonrası elde edilen bantlar.	63
Şekil 3.11. A) pVC-CCD-UGT plazmidlerinin elde edilmesi için UGT fragmentinin PCR ile doğrulanması. B) pVC-CCD-UGT plazmidlerinin elde edilmesi için CCD2 fragmentinin PCR ile doğrulanması. C) pVC-CCD-UGT	

plazmidlerinin elde edilmesi için ppVC00154 fragmentinin PCR ile doğrulanması.....	65
Şekil 3.12. pVC-CCD-UGT plazmidi için transformasyon sonuçları.	66
Şekil 3.13. pVC-CCD-UGT plazmidinin Sall-HF restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesimi sonrası elde edilen bantlar.	66
Şekil 3.14. pVC-CCD-UGT plazmidinin CCD2 geni için (KJ541749.1, F-R) ve UGT geni için (UGT-F-R) gerekli primerler kullanılarak PCR doğrulama sonrası elde edilen bantlar..	67
Şekil 3.15. Safran bitkisinin gelişim aşamaları.	68
Şekil 3.16. Pikrokrosin standartı HPLC kromatogramı.	69
Şekil 3.17. Plazmid için ekstraksiyon sonrası HPLC kromatogramı.	69
Şekil 3.18. Krosin standartı için HPLC kromatogramı.	70
Şekil 3.19. Safran al standartı için HPLC kromatogramı.....	70
Şekil 3.20. Safran al ve krosin için ekstraksiyon örnekleri ile verilen HPLC kromatogramı.....	71

TABLÖLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. SOC Bileşimi.	40
Tablo 2.2. LB Broth besiyeri bileşimi.	40
Tablo 2.3. LB Agar besiyeri bileşimi.	40
Tablo 2.4. NaCl'siz LB Broth Besiyeri bileşimi.	41
Tablo 2.5. Kesim reaksiyonu bileşimi.	47
Tablo 2.6. Gibson Master Mix Bileşimi.	47
Tablo 2.7. DNA Eliminasyon Mix Bileşimi.	48
Tablo 2.8. Reverse Transkripsiyon Mix Bileşimi.	49
Tablo 2.9. Genler ve primer dizileri.	51
Tablo 2.10. Gibson assembly metodu için tasarlanan primerler.	52
Tablo 2.11. HPLC Çalışma Şartları.	52
Tablo 3.1. pTHIO-CCD2, pTHIO-UGT74AD1 ve pTHIO-ALDH3I1 plazmidinin doğrulaması için kullanılacak fragmentlerin elde edilmesi için PCR şartları.	55
Tablo 3.2. pVC-CCD2 plazmidinin inşa edilmesi için fragmentlerin elde edilmesi. ...	57
Tablo 3.3. pVC-CCD2 plazmidinin inşası için kullanılacak fragmentlerin elde edilmesi için PCR şartları.	57
Tablo 3.4. pVC-CCD2 plazmidinin inşası için Gibson Assembly metodu reaksiyon şartları.	58
Tablo 3.5. pVC-UGT plazmidinin inşa edilmesi için fragmentlerin elde edilmesi.	61
Tablo 3.6. pVC-UGT plazmidinin inşası için kullanılacak fragmentlerin elde edilmesi için PCR şartları.	61
Tablo 3.7. pVC-UGT plazmidinin inşası için Gibson Assembly reaksiyon şartları.	62
Tablo 3.8. pVC-CCD-UGT plazmidinin inşası için kullanılacak fragmentlerin elde edilmesi için PCR şartları.	64
Tablo 3.9. pVC-CCD-UGT plazmidinin inşa edilmesi için fragmentlerin elde edilmesi.	65

KISALTMALAR DİZİNİ

<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
sp.	: Tür
DNA	: Deoksiribonükleik asit
CCD	: Karetonoid dioksigenaz
UGT	: UDP-glukozil transferaz
ALDH	: Aldehit dehidrogenaz
β-GS	: Beta-glukosidaz
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
OD	: Optik dansite
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
dNTP	: Deoksiribonükleotidtrifosfat
Cm	: Kloramfenikol
Amp	: Ampisilin
Kan	: Kanamisin
Spect	: Spektinomisin
SOB	: Süper optimize besiyeri
SOC	: Süper optimize edilmiş katabolit represyonlu besiyeri
dH₂O	: Distile su
TAE	: Tris-asetat-EDTA
EtBr	: Etidyum bromür
LB	: Luria Bertani
UV	: Ultraviyole
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
Mg	: Miligram
μg	: Mikrogram
ng	: Nanogram
ppm	: Milyonda bir
μl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
kg	: Kilogram

g	: Gram
μM	: Mikromolar
mM	: Milimolar
μmol	: Mikromol
v/v	: Hacim/Hacim
dk	: Dakika
rpm	: Rotorun dakikadaki dönme hızı
°C	: Santigrat derece
kb	: Kilobaz
bp	: Baz çifti



1. GİRİŞ

Bitkiler, büyüme ve gelişmede doğrudan bir işlevleri olmayan, fotosentez, solunum, çözünen madde taşınımı, translokasyon, besin asimilasyonu ve farklılaşma süreçlerinde genel olarak kabul gören bir role sahip olmayan geniş ve çeşitli organik bileşikler dizisi üretirler [1]. Bunlar, sekonder veya özel metabolitler olarak bilinen düşük molekül ağırlıklı çeşitli organik bileşikler olarak bilinmektedir. Bu metabolitlerin % 1'den fazlası, düşük kaynama noktalı ve ortam sıcaklığında yüksek buhar basıncına sahip lipofilik moleküllerdir. Bunlar ağırlıklı olarak terpenoidler, fenilpropanoidler/benzenoidler, yağ asiti türevleri ve amino asit türevleri ile temsil edilir [2]. Sekonder metabolitler ilaçlar, lezzet ve koku, boya ve pigmentler, zirai ilaçlar ve gıda katkı maddeleri gibi alanlarda kullanılan ekonomik açıdan önemli bileşenlerdir [3].

Metabolik mühendisliği sistemleri, etkin mikrobiyal hücre fabrikaları inşa etmek için temel bir teknoloji haline gelmiştir. Son zamanlarda, metabolik mühendisliği sistemlerinin gücü, gelişmiş araçlar ve stratejilerin geliştirilmesi ile daha da gelişmiştir. İstenilen kimyasalların ve materyallerin geliştirilmiş üretimi için metabolik mühendisliği sistemleri ile mikrobiyal suşların geliştirilmesine ilişkin başarılı örnekler giderek artmaya başlamıştır [4]. Metabolik mühendisliği, genellikle kimyasal transformasyon, enerji iletimi ve süper moleküler montaj için hücresel yolları daha iyi anlamak ve kullanabilmek için bir organizmada bulunan metabolik yolların hedefli ve maksatlı değişimi olarak adlandırılır [5]. Belirli biyokimyasal reaksiyonların modifiye edilmesi veya Rekombinant DNA teknolojisi gibi çeşitli teknikler kullanılarak yeni genlerin sokulması yoluyla hücresel özelliklerin yönlendirilmesi için uygulanabilir [6]. Metabolik mühendisliğin amacı, akılcı genetik modifikasyonları tasarlayarak ve uygulayarak, ürün geliştirmeye yönelik hücresel özellikleri iyileştirmek için moleküler biyolojik tekniklerle metabolik ve diğer yolların sistematik analizidir [7]. Yüksek üretkenlik yeteneği ile geleneksel olmayan çevresel koşullar altında tatmin edici şekilde işlev görebilecek suşların elde edilmesi mümkün görünmektedir [8]. Yeşil bitkiyi istenen ürünü üretmek üzere tasarlayan yeşil fabrikalar kavramı, yakın gelecekte bu teknolojilerin ilerlemesiyle karşılanacak gibi görünmektedir [9].

Karotenoidler, tozlayıcıların çekiciliği, patojen ve herbivorlara karşı savunma gibi bitki-çevre etkileşimlerinde önemli fonksiyonları olan izoprenoidleri içeren apokarotenoidler olarak adlandırılan karotenoid türevli moleküllerin öncüleridir [10]. Apokarotenoidler, bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenen, karotenoidler adı verilen C40 izoprenoid pigmentlerinin ayrılma ürünleridir [11]. Apokarotenoidler ayrıca uzaklaştırıcılar, kemoatraktanlar, büyüme simülatörleri ve inhibitörleri, aynı zamanda fitohormonlar, absisik asit ve strigolaktonlar olarak işlev gören uçucu aromatik bileşikleri içerir. Bitkilerde, apokarotenoidler çeşitli plastidlerde (etiyooplast, lökoplast ve kromoplast), çiçekler ve kökler gibi farklı bitki dokularında bulunabilir [10].

Genel olarak safran olarak bilinen *Crocus sativus* L., Iridaceae familyasına ait çok yıllık küçük bir bitkidir. Bu bitki, İran, Afganistan, Türkiye ve İspanya dahil olmak üzere birçok ülkede ekimi yapılmaktadır [12]. Safran, kendine özgü renk, olağanüstü tadı ve eşsiz aroması ile farklı mutfaklarda çok değerli olan, dünyanın en pahalı baharatıdır [13]. Safran, ağırlıklı olarak, sırasıyla renk, lezzet ve aromasından sorumlu olan krosin, pikrokrosin ve safranal gibi kimyasal bileşenleri içerir [14]. Safran apokarotenoidlerin öncüsü, ardışık bölünmelerle krosetin ve 3-OH- β -siklositral oluşumuna yol açan, daha sonra sırasıyla krosinler ve pikrokrosin elde etmek için glikolize olan zeaksantin olarak kabul edilir [13]. Küresel olarak, 'safran' Mısır, Güney Avrupa, İspanya, Fas, Türkiye, Hindistan ve İran'da yetiştirilmekte ve üretilmekte ve ithal edilmektedir [15]. Dünyanın en değerli endüstriyel tıbbi ürünü olan 'safran' önemli bir ihracat ürünüdür ve İran tarım ekonomisinde büyük öneme sahiptir. Mevcut durumda dünyadaki safran üretiminin % 90'ını İran yapmaktadır. 2002 yılında 121 ton safran ihracatından elde edilen net gelir 51 milyon ABD dolarını aşmıştır [16]. İran Tarım Bakanlığı'nın 2013 tarihli raporuna göre, İran (en bol safran ürünleri) 87930 hektar araziden 280323 kg safran üretmiştir [17].

Escherichia coli, metabolik mühendisliği çalışmalarında çeşitli nedenlerden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. *E. coli*, uygun büyüme hızına sahiptir ve bu organizmanın laboratuvarındaki genetik mühendisliği ve deneysel analizi için birçok sağlam yöntem geliştirilmiştir [18]. *E. coli*, heterolog karotenoid üretimi için çok uygun bir konaktır. Bakterilerden, mantarlardan ve daha yüksek bitkilerden elde edilen karotenogenik genlerin çoğu, bu bakteride fonksiyonel olarak eksprese edilebilmektedir [19].

Bu çalışmada metabolik mühendisliği ve sentetik biyolojide kullanılan araçlar yardımıyla apokarotenoid yolla bulunan ve safran (*Crocus sativus* L.) üretimini sağlayan genlerin *E. coli* bakterisine aktarımı yapılmıştır ve safran metabolitlerinin heterolog üretimi aşamaları incelenmiştir.

1.1. Bitkilerde Sekonder (Özelleştirilmiş) Metabolitler

Üç tür bitki doğal ürünü vardır; fenolikler, terpenoitler ve alkaloidlerdir. Şimdiye kadar 21000 alkaloid, 22000 terpenoid, 5000 flavonoid ve tanen dahil olmak üzere birçok ürün varlığı belgelenmiştir. Bununla birlikte, bu ürünler özelleştirilmiş metabolitlerin sadece bir bölümünü temsil etmektedir [20]. Bitki kaynaklı sekonder metabolitler, farmasötikler, gıda katkı maddeleri, nutrasötikler vb. olarak yaygın şekilde kullanılır [21]. 1985 yılında, Dünya Sağlık Örgütü, dünya nüfusunun yaklaşık % 65'inin temel sağlık hizmetleri için bitki kökenli geleneksel ilaçların kullanımına karşı güvenin arttığı görülmüştür. Günümüzde bitki kaynaklı doğal ürünlerin sağlıkta kullanımı oldukça fazladır. Yeni üretilen ilaçların yaklaşık % 70'i son 30 yılda bitki sekonder (özelleştirilmiş) metabolitlerinden kaynaklanmaktadır [20]. Birçok bitki sekonder metabolitlerinin yapıları birbirine benzer fakat biyoaktivite bakımından farklıdır ve bunların muazzam heterojenliği genellikle ortak omurga yapılarının farklı modifikasyonlarından türetilir [21]. Bitkilerde özellikle üç yolla birçok sekonder metabolitin kaynağıdır: sikimat yolla, izoprenoid yolla ve polipid yolla. Temel bazal iskeletlerin oluşumundan sonra, başka modifikasyonlar bitki türlerinde spesifik bileşiklerle sonuçlanır. Örneğin hidroksi-, metoksi-, aldehit-, karboksil- grupları ve molekülün prenil-, malonil- ve glukosil kısımları gibi başka karbon atomları ekleyen bileşikler ile ilgilidir [22].

Bitkiler, büyük ekonomik öneme sahip çok çeşitli kimyasal bileşikler üretir. En büyük grup, bilinen tüm bileşiklerin üçte birinden fazlasını içeren terpenoidlerden oluşur. İkinci en büyük grup, birçok ilaç ve zehir içeren alkaloidler tarafından oluşturulur [23]. Terpenoidler veya terpenler olarak da denilen izoprenoidler, hemen hemen tüm canlı organizmalarda sentezlenen en bol ve oldukça çeşitli (yapısal ve işlevsel) doğal ürünler grubudur. Farmasötikler, nutrasötikler, tatlandırıcılar, kozmetikler, gıda katkı maddeleri ve biyoyakıtlar için birçok izoprenoid kullanılmıştır [24]. Terpenoidler, 30.000'den fazla farklı yapıya sahip büyük ve önemli bir doğal

ürünler sınıfını temsil eder. Terpenoidler (C5 (izopren) ‘yapı taşları’ndan oluşur), lezzet ve koku, katkı maddeleri gibi geniş ticari uygulamalarıyla bilinirler. Esansiyel yağ bileşenleri ağırlıklı olarak monoterpenoidler (C10) ve seskiterpenoidlerdir (C15) [25]. Bazıları solunumda, fotosentezde ve büyüme ve gelişmenin düzenlenmesinde birincil metabolitler olarak işlev görür, ancak bitki izoprenoidlerinin büyük kısmı bitkilerin çevreleriyle etkileşimlerini düzenleyen sekonder metabolitlerdir [26]. İzoprenoidler genellikle karbon sayısına göre gruplara ayrılır: hemiterpen (C5), monoterpen (C10), seskiterpen (C15), diterpen (C20), triterpen (C30) ve tetraterpenoid (karotenoid, C40). Tüm izoprenoidler, izopentenil difosfattan (IPP) ve bunun izomeri dimetilasil difosfattan (DMAPP) türetilir [24].

1.2. Karotenoidler

Karotenoidler, bitkiler ve bazı mikroorganizmalar tarafından sentezlenen doğal pigmentlerdir. İnsanlar ve hayvanlar, karotenoidleri *de novo* sentezleyemez ve diyet yoluyla bunları elde etmeleri gerekir [27]. Karotenoidler, çoğunlukla 400 nm ile 500 nm arası dalga boylarındaki ışığı emen kırmızı, turuncu veya sarı renkte olan tetraterpenoid pigmentlerdir. Karada, denizde ve tatlı suda yaşayan fotosentetik organizmaların yanı sıra, karasal ve suda yaşayan birçok heterotrofik organizmada yaygın olarak dağılırlar [28]. Çok sayıda meyve, sebze, bazı hayvansal ürünler (yumurta, tereyağı, süt) ve deniz ürünlerinde (somon, karides, alabalık, yumuşakça, vs.) bulunur. Karotenoidler çeşitli işlevleri nedeniyle oldukça ilgi çekmiştir [27]. Beslenme yaklaşımı durumunda, karotenoidler önemli bir biyoaktif bileşik olarak kabul edilir. Doğada yaklaşık olarak 750 karotenoid tanımlanmıştır, bunların 50'si insan diyetinde tanımlanmıştır ve insan kanında ve dokularında 20'den fazla karotenoid tespit edilmiştir [29]. İnsan diyetinde bulunan karotenoidler, öncelikle karotenoidlerin bulunduğu mahsul bitkilerinde köklerde, yapraklarda, sürgünlerde, tohumlarda, meyvelerde ve çiçeklerden elde edilir. İnsanlar tarafından tüketilen meyve ve sebzelerde yaklaşık 60 farklı karotenoid tanımlanmıştır. Biyoyararlanım, vücuda fizyolojik işlevlerde veya depoda kullanım için mevcut olan bir besinin fraksiyonu olarak tanımlanır. Karotenoidlerin biyoyararlanımını etkileyen en az 9 faktör vardır: karotenoid türleri, moleküler bağ, bir öğünde tüketilen miktar, karotenoidin dahil edildiği matris, absorpsiyon ve biyo-dönüşüm etkileyicileri, konağın besin durumu, genetik faktörler, konak-ilişkili faktörler ve etkileşimler [30]. Karotenoidler arasında, β -karoten, α -karoten, likopen, lutein, zeaksantin ve β -

kriptoksantin insan diyetinde, kanında ve dokularında bulunan en yaygın karotenoidlerdir. Lutein ve zeaksantin, retinanın merkezi bölgesinde yer alan hayati bir maküler pigment olarak kabul edilir, yüksek enerjili mavi ışığın filtresi, tekli oksijen söndürücüler ve antioksidanlar olarak görev yapar ve göze fototoksik hasarın azaltılmasında rol oynar [29]. Hayvanlarda ve insanlarda, bu bileşikler, morfogenez için gerekli olan A vitamini ve retinoid bileşiklerinin öncüleridir. Bitkilerde, bitki büyümesi ve gelişiminin düzenleyicileri olarak fotosentezde yardımcı pigmentler olarak, fotoprotektörler olarak, hormonlardan absisik asit ve strigolaktonlar için öncüler olarak ve polen böcekleri ve tohum dağıtan otçullar gibi diğer organizmalar için çekiciler olarak görev yaparlar. Sonuç olarak, bu pigmentler organik kimyagerler, gıda kimyagerleri, biyologlar, fizyologlar, tıp doktorları ve son zamanlarda çevreciler tarafından kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Karotenoidlere olan yaygın ilgi, bunları tanımlama ve belirleme için güvenilir analitik metodolojilere olan talebin artmasına neden olmuştur [27].

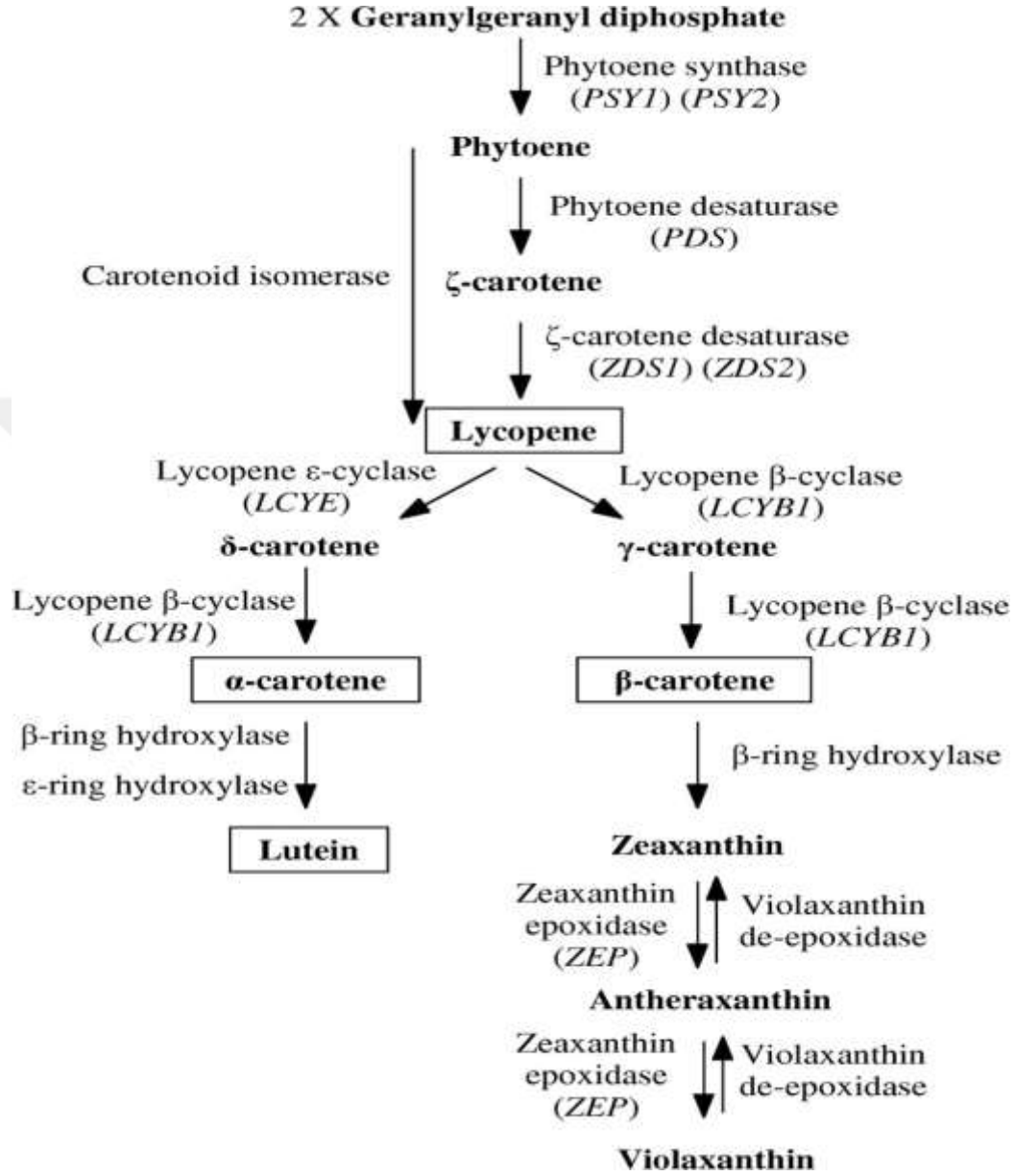
1.2.1. Karotenoidlerin Kimyası, Sınıflandırılması ve Oluşumu

İlk karotenoid 1831'de izole edildiğinden, devam eden süreçte tanımlanan karotenoid yapıların sayısı toplam 1100 yapıya yükselmiştir. Karotenoidler her yerde yaşamın tüm alanlarında bulunur ve bu nedenle en çeşitli ve en yaygın doğal pigment sınıfını oluşturduğu düşünülmektedir [31]. Karotenoidler bakteri, mantar, alg ve bitkilerden üretilen önemli doğal pigmentlerdir. Yapısal özelliklere bağlı olarak, karotenoidler iki ana gruba ayrılabilir: i) hidrokarbon karotenoidler, α -karoten, β -karoten ve likopen gibi karotenler olarak bilinir; ii) ksantofiller olarak bilinen hidrokarbon karotenoidlerin oksijenli türevleridir. Ksantofillerde oksijen atomu; bir alkol (-OH) (lutein), bir keton (=O) (siyanantin), bir alkol ve keton (astaksantin) veya alkol (fukoksantin) esterleri halinde bulunabilir. Ek olarak, karotenoidler farklı stereoizomerlerde (E/Z, yani cis/trans) ve optik izomerlerde (R/S) oluşturulabilir [32-35].

Karotenoidlerin büyük bir kısmı C40 tetraterpenoid pigment fitoen türevleridir ve iki C20 geranilgeranil difosfat molekülünün birarada yoğunlaşması ile biyosentezlenir. Karotenoidlerin geri kalanı, çeşitli enzimatik reaksiyonlar geçirerek bir fitoen molekülünden türetilmiştir [33, 36]. Karotenoidleri sentezleyebilen tek bitki dışı organizmalar, belirli mikroorganizmalardır. Hayvanlar, sadece beslenme yoluyla dış

kaynaklardan karotenoidler elde edebilirler [37]. Hayvanlarda karotenoidler, süslü renk sinyalleriyle çekiciliğini geliştirdikleri ve böylece üreme başarısını arttıran flamingolar, somon ve ispinozlara belirgin bir renklenme sağlarlar [38]. Bitkilerde izoprenoidler, sitozolik mevalonat (MVA) ve plastidial 2-C-metil-d-eritritol-4-fosfat (MEP) yollarından üretilir [39]. Karotenoid biyosentezi ile ilgili daha önce yapılan çalışmalar, klorofil, sitokininler, gibberellinler ve absisik asit gibi karotenoidlerin, daha yüksek bitkilerin plastidlerinde MEP yolağı ile sentezlendiğini ve daha sonra kompleks bir metabolik ağın parçası haline geldiğini göstermiştir [37]. MEP yolağı, karotenoidlere giren karbon akışının büyük bir kısmını sağlar. Ana ürünleri, izopentenil pirofosfat (IPP) ve dimetilalil pirofosfat (DMAPP), karotenoidler dahil olmak üzere bir dizi izoprenoid molekülü için bir öncü olarak işlev gören geranilgeranil pirofosfata (GGPP) kondanse edilir [40]. IPP, izoprenoidlerin, terpenlerin, kinonların, sterollerin, klorofillerin ve karotenoidlerin sentezi için bir öncüdür [38]. İki GGPP molekülünün yoğunlaşması, iki desatüraz ve iki izomerata dayanan bir poli-cis desatürasyon/izomerizasyon yolu ile likopene dönüştürülen renksiz, doğrusal bir karoten olan 15-cis-fitoen üretmektedir [40]. Fitoen, karotenogenez yolundaki ilk karotenoiddir [41]. Bu aşama, yolak için hız sınırlayıcı bir enzim olan fitoen sentaz (PSY) ile katalize edilir. Fitoen, daha sonra karotenlere siklize edilen likopen oluşturmak için desatürasyon ve izomerizasyon gibi ardışık değişikliklere tabi tutulur (Şekil 1.1). Karotenler ksantofillere oksijenlenir [42]. Çalışmalar, bitkilerdeki karotenoid metabolik yolağın yüksek oranda korunduğunu, ancak bitki türlerinde karotenoidlerin birikim davranışlarında büyük ölçüde farklı olduğunu göstermiştir. Bazı bitkilerde, karotenoidlerin birikim modelleri genotipler arasında farklılık gösterir. Örneğin, domates meyvesi, sarı krizantemleri, havuç kökleri ve mısır endospermi, sırasıyla, likopen, lutein, β -karoten ve zeaksantin biriktirir [37]. Karotenojenik genlerin klonlanmasındaki büyük ilerleme, mikroorganizmalarda ve bitkilerde karotenoid biyosentetik yollarının modifiye edilmesi ve tasarlanması olasılığını arttırmaktadır. Son dönemlerde içerisinde heterolog mikroorganizmalarda karotenoid üretim potansiyeli, birkaç farklı moleküler biyoloji yaklaşımı ve manipüle edilmiş karotenoid biyosentezi olan ekimi yapılan bitkilerinin mühendisliği kullanılarak gösterilmiştir [43]. Karotenoid biyosentetik yolağın yapısal genlerinin neredeyse tamamı bir dizi bitki türünde klonlanmıştır. Bitkilerde karotenoid biyosentezinin çeşitli yönleri üzerinde,

ilgili genlerin ekspresyonu, regülasyonu ve çeşitli metabolik enzimlerin yapısı ve işlevi de dahil olmak üzere kapsamlı çalışmalar yapılmıştır [37].



Şekil 1.1. Karotenoid metabolik yolak [44].

Karotenoid sentezine alternatif bir yaklaşım olarak, heterolog organizmalardaki biyosentetik yollar (yolak mühendisliği), bol miktarda doğal bileşik üreten en güçlü yöntemlerden biridir. Bu yaklaşımla, yapısal olarak yenilerini içeren çeşitli karotenoidler, *E. coli* veya daha yüksek bitkilerde, karotenojenik (karotenoidler üreten) bakterilerden izole edilen çeşitli karotenoid biyosentez genleri kombinasyonları kullanılarak üretilmiştir [45]. Karotenoid biyosentezi, transkripsiyonel, epigenetik ve

translasyon sonrası düzenleme sistemlerini kapsayan ayrıntılı bir düzenleyici ağ tarafından koordine edilir. Organ tipine ve gelişim evresine bağlı olarak, spesifik transkripsiyon faktörleri, organın gereksinimlerine göre karotenoid biyosentezi ve katabolizması için genlerin doğru ifadesini oluşturmaktadır. Meyve olgunlaşması sırasında karotenoid biyosentetik gen ekspresyonunu sisteme eden karmaşık transkripsiyonel düzenleyici ağın anlaşılması, meyve olgunlaşması için model sistemi olarak domates kullanımı yoluyla son yıllarda artmıştır [46].

1.2.2. Zeaksantin

Her bir β -karoten halkasının β -karoten hidroksilaz enzimi (CrtZ) tarafından hidroksilasyonu, zeaksantin üretir. Zeaksantin, bir gıda katkı maddesi olarak kullanılan sarı bir karotenoiddir ve balık (et için renk geliştirme) ve kümes hayvanları (yumurta sarısı ve cilt pigmentasyonu) için bir yem katkı maddesidir. Katarakt, kanser ve yaşa bağlı maküler dejenerasyonun önlenmesinde kritik bir rol oynar [47]. Doğal zeaksantin, sarı sebze ve mısır, portakal, biber, mango, pembe üzüm meyvesi, kayısı, şeftali, kavun, avokado ve kadife çiçeği gibi meyvelerden elde edilebilir. Bununla birlikte, bitkilerdeki zeaksantin sofraya arzı olarak kullanılamaz çünkü pahalı üretim yönteminden dolayı düşük verimle üretilmektedir. Kimyasal olarak sentezlenmiş zeaksantin pazara hakimdir; ancak, düşük aktivitesi nedeniyle sadece bir pigment olarak kullanılır, bir gıda katkı maddesi veya farmasötik olarak kullanılmaz. Mikroorganizmalar, alternatif ve ilgi çekici bir zeaksantin kaynağı haline gelmiştir. Zeaksantini üretmek için bazı denizel bakteri ve mikro algler kullanılmıştır. *E. coli*'deki karotenoid genlerin heterojen ekspresyonu, özellikle spesifik karotenoidleri üretmek için ilgi çekici bir alternatiftir. Zeaksantin üretmek için *E. coli*'nin metabolik mühendisliği üzerine birkaç makale vardır [48]. Zeaksantin insan gözünde, pankreasta, karaciğerde, dalakta, böbreklerde, yumurtalıklarda ve diğer organlarda bulunur ve zeaksantin, insan serumundaki toplam karotenoidlerin % 3'ünü oluşturur. Zeaksantin kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir ve yeterli miktarda zeaksantin tüketilmesi diyabetiklerde pankreas kanseri gelişme oranını önemli ölçüde azaltabilir [49].

1.2.3. Karotenoidlerin Tıbbi Önemi

Yüzyıllar boyunca bitkiler hem bir besin kaynağı hem de aktif farmasötik ajan kaynağı olarak kullanılmıştır. 2010 yılı itibarıyla, anti-bakteriyel bileşiklerin % 75'i ve anti-kanser bileşiklerinin % 48.6'sı ya doğal bir ürün ya da doğal ürün analogundan oluşmaktadır. Strese karşı gelişime ve savunmaya yardımcı olmak için bitkiler, birçoğu türe özgü ve karmaşık biyosentetik yollarla üretilen yüz binlerce bileşiği sentezler. Örneğin, şikimik asit yolağı, mevalonat olmayan (MEP) yolağı ve mevalonat (MVA) yolağı terpenoidler, monoterpen indol alkaloidleri, izokinolin alkaloidler, flavonoidler ve antosiyaninleri içeren çeşitli bileşik sınıflarına yol açmaktadır. Yüksek derecede yapısal çeşitliliği nedeniyle, bu bileşikler farmasötikler, nutrasötikler, boyalar, kokular, tatlandırıcılar ve pestisitler olarak önemli bir ticari değere sahiptir. Ticari uygulamalarına ek olarak, birçok gıda ve sağlığa yararlı popüler gıda ürünleri belirli bitki doğal ürünlerinden oluşabilir [50, 51]. Karotenoidler, çiçekleri ve meyveleri renkli yaparak göze çarpan doğal olarak oluşan bir pigment grubudur. Yapısal olarak bu pigmentler, prenil pirofosfatların yoğunlaşmasıyla elde edilen terpenoidlerdir. Karotenoidler lipofilik bileşiklerdir ve lipofilik bir ortamda depolanabilirler. Bunlar plastitlerde sentezlenir ve sekestre edilir [43, 52-53].

Karotenoid pigmentlerinin görsel özellikleri ve sağlığa yararları, yıllardır temel araştırma ve endüstriyel uygulamaları desteklemiştir [54]. Karotenoidlerin fizyolojik fonksiyonları yapıları kadar çeşitlidir ancak temel olarak üç kategoriye ayrılabilir: fotosentez, foto koruma ve beslenme. Fotosentez sırasında karotenoidler, temel olarak ışık biriktirme kompleksinde yardımcı pigmentler olarak işlev görür ve burada fotosentez için kullanılabilecek spektral aralığı genişletmeye yardımcı olurlar. Ancak, fotosistemlerin aşırı radyasyona ve dolayısıyla oksidatif hasara karşı korunmasına da katılırlar [31]. Karotenoidler, bitkilerin yanı sıra bakteri, mantar, maya ve alg tarafından sentezlenen izoprenoid molekülleridir. Bitkilerde karotenoidlerin varlığı fotosentez için zorunludur ve birçok önemli üründe çiçek organlarının, meyvelerin ve tohumların pigmentasyonunu belirler. Karotenoidler, enerji aktarımı ve fotosentez sırasında fotooksidatif hasara karşı koruma, tozlaşma ve böcek/hayvanların dağılması için böceklerin ve hayvanların çekiciliği, bitki patojenleri, dejeneratif hastalık risklerinin azaltılması ve kardiyovasküler kazaların önlenmesi ve bir A vitamini kaynağı

sağlanması, zararlı böcekler ve simbiyotik organizmalarla çapraz etkileşime katkı gibi bitki ve hayvanlarda çok çeşitli fonksiyonları kapsamaktadır [54].

1.3. Apokarotenoidler

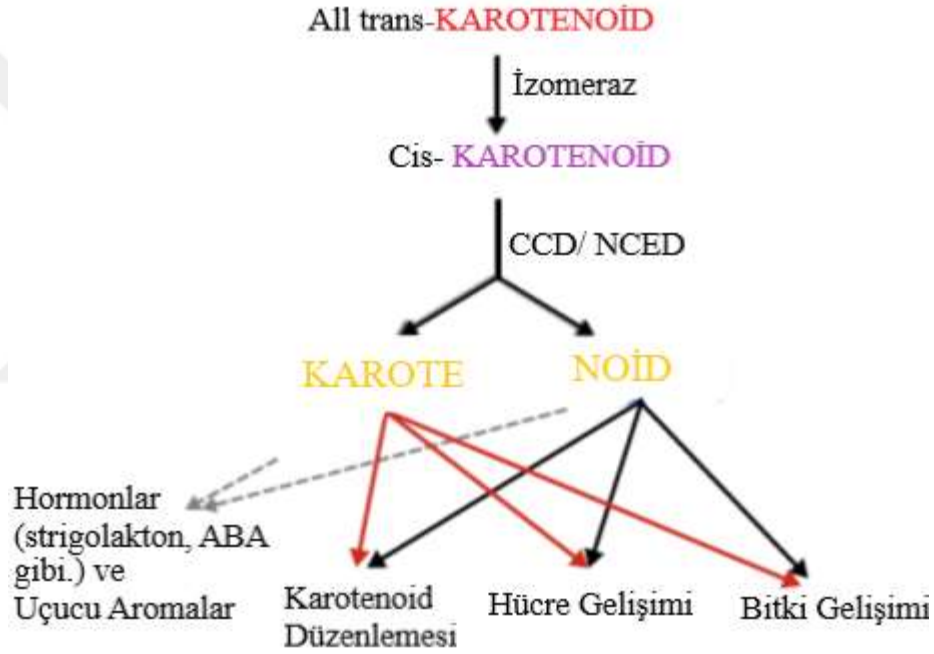
Canlı organizmalarda karotenoidler enzimatik olarak çok çeşitli ürünlere dönüştürülebilir [55]. Karotenoidlerin enzimatik ve enzimatik olmayan oksidatif bölünmesi biyolojik olarak önemli karotenoid türevleri olan apokarotenoidleri üretir [56]. Örneğin biyolojik olarak aktif apokarotenoidler, (2) hayvanlarda retinoidleri, (3) mantarlarda trisporik asidi ve (4) daha yüksek bitkilerde absisik asidi içerir. Diğer biyolojik olarak önemli bileşiklerin, karotenoidlerin oksidatif bölünmesiyle elde edildiğine inanılmaktadır [57]. Apokarotenoidler olarak adlandırılan bu tür bir grup, polen omurgası içindeki çift bağın, çift bağ konumunda kesen aldehid veya keton grupları oluşturan molekülerin oksijen ile bölünmesiyle üretilir [55]. Bu yapısal çeşitlilik, çok sayıda karotenoid öncülünün (600'den fazla) ve ardından yükseltgenme, indirgenme ve konjugasyon gibi sonraki değişikliklerin sonucudur. Apokarotenoid oluşumunun spesifik olmayan oksidasyon yoluyla da oluşabilmesine rağmen, düzenleyici fonksiyonlara sahip biyolojik olarak aktif formların sahaya özgü bölünme yoluyla üretilmesi beklenmektedir [57]. Apokarotenoidler nispeten küçük, uçucu, çözünür ve bazı durumlarda plastid membranlar boyunca taşınma ve/veya difüzyona yardımcı olabilirler [38]. Metabolik kökene bakılmaksızın, apokarotenoidler, kısmen nükleer gen ekspresyonu ve retrograd (plastid-nükleus) sinyalleme değişiklikleri yoluyla karotenogenez ve bitki gelişimi ve çevresel tepkilerin düzenlenmesine yardımcı olmaktadır. Apokarotenoidlerin ayrıca gen ekspresyonunu değiştirerek memeli kanser hücreleri proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [56]. Apokarotenoidlerin büyük çeşitliliği, büyük miktarlarda karotenoid öncüllerinin, spesifik bölünme bölgelerindeki varyasyonların ve bölünmeden sonraki modifikasyonların bir sonucudur. Likopen, β -karoten ve zeaksantin, şimdiye kadar tarif edilen ana apokarotenoidlerin, biksin, krosin, pikrokrosin, absisik asit, strigolakton ve mikorradisin'i içeren öncül maddeleridir [58]. İnsanlar için, bitkiler tarafından sentezlenen bazı apokarotenoidler, çok güçlü aromaları (örneğin, b-iyonon ve safranal) ve pigmentasyon kapasiteleri (örneğin krosin ve biksin) nedeniyle önemli bir ekonomik değere sahiptir [59]. Daha yüksek bitkilerde, apokarotenoidler moleküllere sinyal veren fitohormonlar olarak görev yapar ve çiçeklere ve meyvelere renk verir [60]. Apokarotenoidler (karotenoid kaynaklı

metabolitler), meyvelerde ve diğer bitki materyallerinde glukozitler olarak bulunan önemli bir sekonder metabolit grubu oluşturur. Bunların birçoğu kimya ve gıda endüstrisinin dikkatini çeken çekici aroma ve lezzet özelliklerine sahiptir [61]. Hayvanlarda, en önemli apokarotenoid C20 bileşiği, retinal ve türevleridir; çünkü retina, omurgalı görsel döngüsünde rodopsin kromoforu olarak çok önemli bir rol oynar. Bitkilerde ve siyanobakterilerde, apokarotenoidler, aksesuar ve foto-koruyucu pigmentler olarak işlev gördükleri tilakoid membranında büyük miktarlarda bulunur. Kırmızımsı ve sarımsı renkli bitki dokularında, apokarotenoidler, kromoplastlar adı verilen özel plastitlerde büyük miktarlarda bulunurken, C13-norizoprenoidler gibi uçucu düşük moleküler ağırlıklı apokarotenoidler, çiçeklerin, meyvelerin ve birçok bitkinin yapraklarındaki aroma bileşiklerdir [62].

1.3.1. Karotenoid bölünme dioksijenazları ve karotenoid türevli sinyal molekülleri

Apokarotenoidler, karotenoidlerin oksidatif bölünmesinden elde edilir ve hayvanlarda, böceklerde, mikroorganizmada ve bitkilerde önemli fonksiyonlara sahip büyüyen bir sekonder metabolit sınıfı oluşturur [60]. Hayvanlar ve bitkilerde karotenoidleri belirli pozisyonlarda oksidatif olarak parçalayabilen enzimler tanımlanmıştır. Tanımlanan ilk enzim, mısırdan elde edilen dokuz-cis-epoksi-karotenoid dioksijenazdır; bu enzim, absisik asit biyosentezinin hız sınırlayıcı aşamasını katalize etmektedir [63]. β -karoten metabolizması yoluyla A vitamini sentezi ilk kez 1930'da gösterilmiştir. 1965 yılında Olson, Hayaishi, Goodman ve Huang bağımsız olarak sıçan karaciğerinden ve bağırsaklardan izole edilen ham enzim fraksiyonlarını kullanarak β -karotenin enzimatik bölünmesini bildirmişlerdir. Ancak, karotenoid bölünme aktivitesine sahip bir enzim izole edilmesi otuz yıl kadar sürmüştür [64]. Birincil karotenoid parçalanma reaksiyonu apokarotenoid biyogenezinde kararlı ve genellikle hız sınırlayıcı bir adımdır. Bu aşama, Archeae hariç tüm krallıklarda bulunabilen, evrimsel olarak korunmuş bir karotenoid bölünme oksijenaz (CCO) enzim sınıfı tarafından gerçekleştirilir [65]. Arabidopsis bitkisinde, dokuz-sis-epoksi karotenoid dioksijenazlara bir dizi sekans benzerliğini paylaşan dokuz hipotetik protein vardır. Bu proteinlerden beşinin, absisik asit biyosentezine katıldığı görülmektedir. Kalan dört proteinin, diğer karotenoid yarıma reaksiyonlarını katalize etmektedir ve bunlar karotenoid yarıma dioksijenazları (CCD'ler) olarak adlandırılmaktadır [63]. Bitki CCO'larına şu anda *Crocus sativus*'tan CCD2 de dahil olmak üzere beş ek sınıf CCD1,

CCD4, CCD7, CCD8 içeren karotenoid bölünme dioksijenazlar (CCD'ler) adı verilmektedir [65]. Birçok apokarotenoid, karotenoid bölünme deoksijenazlara (CCD) ait eski bir oksidatif enzim ailesinin bölünme etkisiyle üretilir [66, 67]. Bu enzimler, karotenoid moleküllerini belirli pozisyonlarda parçalayarak spesifik apokarotenoidlerin oluşumuna yol açar. Apokarotenoidler ayrıca, lipoksijenaz yoluyla başlatılan ko-oksidasyon yoluyla enzimatik olarak da oluşturulabilir [68]. Bu maddeler doğaya yayılır ve prokaryotlarda, hayvanlarda, mantarlarda, yeşil alglerde ve daha yüksek bitkilerde önemli metabolik ve hormonal fonksiyonlara sahiptir [62].



Şekil 1.2. Bitkilerde apokarotenoid sinyal biyosentezi için genel şematik [46].

CCD ve CCD ile ilgili enzimler, bitkilerde absisik asit ve strigolakton hormonlarının sentezinde rol oynarlar ve ayrıca çiçeklerin aroma ve aromalarının sentezini ve çeşitli yiyecekleri katalize ederler [69]. Karotenoidler, 9-cis-epoksi-karotenoid dioksijenazlar (NCED'ler) ve karotenoid bölünme dioksijenazlar (CCD'ler) dahil olmak üzere, karotenoid spesifik bölünme oksijenazları (CCO'lar) ile karotenoidler oluşturmak üzere oksidatif olarak ayrılır (Şekil 1.2) [40, 41]. NCED'ler, absisik asit (ABA) biyosentezine özgüdür ve 9-cis-epoksi-karotenoidleri, 9-cis-neoxanthin ve 9-cis-violaxanthin'i hedef almaktadır [46]. Bazı apokarotenoidlerin, bitki büyümesinin düzenlenmesinde hormon olarak görev yaptığı bilinmektedir. En iyi karakterize edilen örnek, kuraklık toleransı,

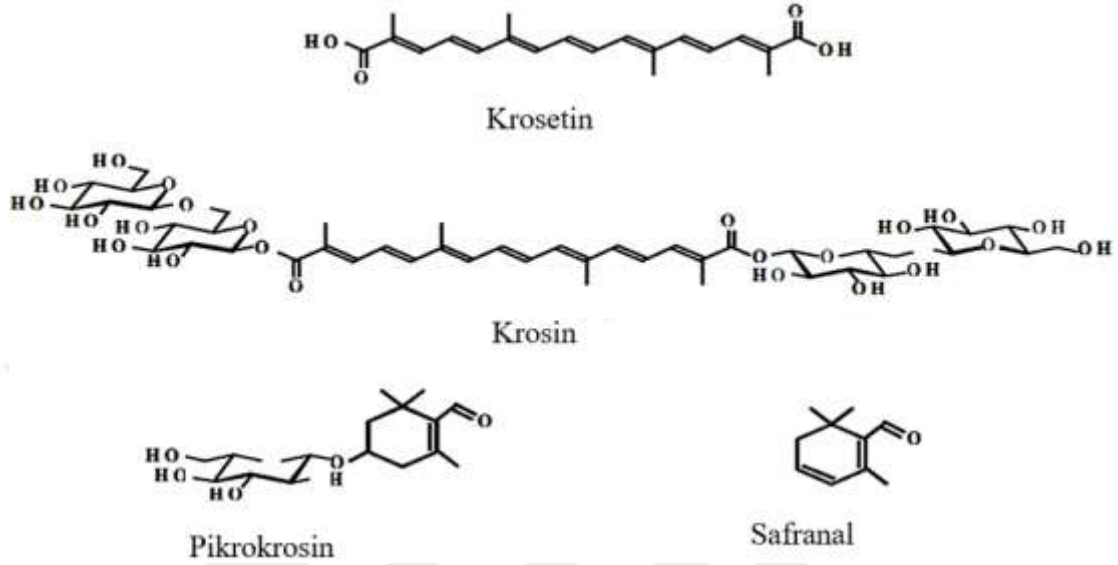
tohum gelişimi ve şeker algılamasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan absisik asittir (ABA). Fonksiyonel olarak karakterize edilen ilk CCD enzimi VP14 tarafından üretilen C15 apokarotenoid ksantoksenden elde edilir [62]. CCD'ler genel olarak tüm karotenoidleri, lineer, uniksiklik ve bi-siklik olarak, CCD'ye özgü karotenoid omurgası üzerinde sayısız lokasyonda bölünmelerini kolaylaştırır. CCD'lerin substrat özgüllüğü anlayışı, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda iyileşme gösterirken, bitkilerdeki rolü büyük ölçüde bilinmemektedir [46]. Hayvanlarda, CCD enzimi BCDO1, retinoid sentezinde rol alırken, BCD02, karotenoid homeostazında ve mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif strese karşı korumada önemli bir rol oynayan bir mitokondriyal CCD'dir [69].

1.4. Safran Apokarotenoidleri (*Crocus sativus* L.)

Crocus sativus L. (safran), Iridaceae familyasına ait çok yıllık bir bitkidir [70-76]. Güney Avrupa ve küçük Asya kökenli bir bitkidir. Sadece Akdeniz ülkelerinde (İtalya, İspanya, Yunanistan, Fransa, Türkiye, Avusturya, Libya) değil, Hindistan ve İran'da da yetiştirilmektedir. Safran, yüzyıllar boyunca yaygın olarak kullanılmıştır. Orta çağda ve takip eden yüzyıllarda, safran ticareti çok sert kurallara tabi tutulmuştur. Nadirliği nedeniyle büyük talep görmüştür. O dönemde Basle (İsviçre), esasen İtalya'dan gelen safran ticaretinin merkeziydi. Safran çiçeği, Basle'in armasının bir parçası olmuştur. İtalya'dan yaklaşık 360 kg safran sevkiyatı ganimet olarak kabul edildiğinden, baharatı geri kazanmak ve ticaretinin güvenli geçiş yollarından sevkiyatını sağlamak için bir ordu gönderilmişti. 1374'te "Safran Savaşı"nın nedeni safranın öneminden kaynaklanmaktaydı [77].

Iridaceae familyasının bir üyesi olan 'safran' (*Crocus sativus* L.), *Crocus* cinsinin en önemli türüdür ve yaklaşık 2000-1500 yıllarından beri baharat olarak, boya olarak ve geleneksel tıpta kullanılır [78-80]. Dünyanın en pahalı baharatını oluşturan *Crocus sativus* L. bitkisinin kurutulmuş kırmızı stigmaları olan safran, parlak sarı tonlarının çekici olması, karakteristik acı tadı ve bazı yemeklere ve içeceklerle verdiği ayırt edici aromasından dolayı büyük beğeni toplamaktadır [79, 81-84]. Tadı, aroması ve rengi ile belirlenen safran kalitesi biyolojik olarak aktif sekonder metabolitlerin konsantrasyonuna bağlıdır [71]. Safran, *Crocus sativus* L.'nin kurutulmuş stigmaları, baharat ve ilaç olarak yaygın şekilde kullanılır. Safran kalitesi, sarı pigment "krosin",

acı tatlandırıcı "pikrokrosin" ve iyi bir parfüm "safranal" için önemli olan üç ana sekonder metabolit içerir (Şekil 1.3) [85].



Şekil 1.3. Safranin başlıca kimyasal bileşenleri [86].

Iridaceae familyasından bir bitki olan safran çiçeği (*Crocus sativus* L.), kırmızı-turuncu üçlü stigmalara sahiptir [87, 88]. Bu triploid steril monokot türleri uzun süredir stigmatı için yetiştirilmektedir [87]. Aynı zamanda safran; sağlık çiçeği, baharat kralı ve kırmızı altın olarak da adlandırılmaktadır [89]. Safran apokarotenoidlerinin insan sağlığı üzerindeki etkisine olan ilgi, yüksek antioksidan kapasiteleri nedeniyle artmaktadır [87]. Safran, kültürel çiftlik koşullarında veya yabani ortamda farklı iklim koşullarına sahip ortamlarda yetiştirilmektedir. Deniz seviyesinden yaklaşık 2000 m yüksekliğe kadar yükselen rakımlarda yetişir, yine de 600 ila 1700 m arasındaki rakımlarda, yaylalara ve dağlık vadilere daha fazla alıştırılmıştır [86]. Safran, her yıl stigma üreten kurak ve yarı kurak topraklara iyi adapte edilmiş çok yıllık bir mahsuldür. Sonbaharda çiçek açar ve yaz aylarında uzun bir uyku hali (canlandırma) geçirir. Sonbahar-kış-ilkbahar yağışları ile soğuk kışlar ve çok az yağış alan ılık kuru yazlar ile karakterize olan Akdeniz ortamına özgü olduğu söylenmektedir. Akdeniz ortamı, birçok faktöre atfedilen kalitesiyle birlikte safran üretimi için en iyi bölge olarak kabul edilmektedir [87]. Bundan dolayı safran (*Crocus sativus* L.) ılıman kış, kurak ve sıcak yaz mevsimi olan bölgelerde ekim için uygundur. İran'da oldukça kıymet verilen bir mahsuldür ve kurak

ve yarı kurak iklimlerin olduğu, Horasan (Kuzey Doğu) ve Fars (Güney Batı) illerinde uygun sulama koşullarında ekilen önemli bir ihracat ürünüdür [70]. Kilden ve çürüyen humustan arınmış, zengin, iyi süzölmüş, kumlu veya gevşek yapılı bir toprak gerektirir. Bitki vejetatif olarak soğanlar tarafından yayılır. Soğanlar etli bir yapıya sahiptir ve soğanın nişastası etini koruyan dokunmuş elyaf filmi çıkarıldıktan sonra görölebilir [90]. Safran yaprakları kavisli ve saçaklı kenarlara sahip, köklü, uzun, ince ot gibi; alt yüzeyinde beyaz bir ton ile gri yeşil renklidir ve ince yarı saydam, beyazımsı doku kılıflarıyla çevrili daha düşük bir yaprağa sahiptir. Safran yaprakları 50 cm uzunluğa ulaşır. Yaprak çıkması çiçeklenmeden kısa bir süre sonra çakışır veya oluşur. Her korm 6-15 yaprak üretir. Safran bitkileri gölgeli koşullarda zayıf büyür ve doğrudan güneş ışığında en iyi şekilde büyür. Bu nedenle ekim, güneye eğimli tarlalarda en iyi şekilde yapılır (Kuzey Yarımküre'de güney eğimli) [91]. Safran, çiçekler steril olduğundan ve canlı tohumlar üretmediğinden soğanlar tarafından çoğaltılır. Bir korm sadece bir mevsim hayatta kalır ve sonunda yeni bitkilere yol açan on adet "kormlet" üretir [92]. Hasat ve hasat sonrası işlemler, tadı, rengi ve stigmanın kokusu üzerinde zararlı bir etkisi olmamasını sağlamak için dikkatli bir şekilde gerçekleştirilmelidir. Tüm çiçeğin kesilmesi ve toplanması da dahil olmak üzere elle hasat, gün doğumundan önce günlük yapılmalıdır. Çiçeğin işlenmesinde önemli bir etkiye sahip olduğu düşünülen nem içeriğine ek olarak çiçeğin kalitesini düşürmektedir. Hasat sonrasındaki işlem, toplanan çiçekleri kurutmadan önce en kısa sürede çiçeğin diğer kısımlarından stigmaların ayırmasını içerir. Tüm işlemler elle olarak gerçekleştirilmektedir. Safran çiçeğinin hasat ve hasat sonrası işlemlerin mekanizasyonu zaman kısıtlaması, günlük hasat ve manuel işlemlerden dolayı olası kirlenme nedeniyle ekonomik olarak önemlidir [93]. Bitkilerin çoğaltımı insan bağımlıdır; kormlar elle kazılmalı, parçalanmalı ve tekrar dikilmelidir [92]. Stigma ayrımı en zahmetli ve pahalı işlemlerden biridir [93]. Dehidrasyon ve depolama koşulları gibi hasat sonrası işlemler, nihai ürünün stabilitesini, kalitesini ve ekonomik değerini belirler [94]. Safran bitkisinin (*Crocus sativus* L.) zor ekimi, kurutulmuş stigmalarından yapılan baharatını çok değerli kılar. Tek bir safran pound yapmak için 75.000 çiçek veya 225.000 elle toplanmış stigmanın gerekli olduğu tahmin ediliyor, bu da neden dünyanın en pahalı baharatı olduğunu açıklamaktadır [95]. Safran mahsulünün geleceğini sağlamak için, yetiştirme tekniklerini, ekim malzemesini ve kalite değerlendirme metodolojisini geliştirmek vazgeçilmezdir [91]. Bu nedenle, yüksek kalitede safran üretmek için ticari olarak uygulanabilirliği olan bazı daha

gelişmiş yöntemleri tanımlayarak safran çiftçilerin ilgisini artırmak gerekir. Safran kalitesini ve miktarını arttırmak için, olası tüm engeller büyük bir dikkatle kaldırılmalı ve en iyi elit çeşitler yetiştiriciliğinde kullanılmalıdır [96].

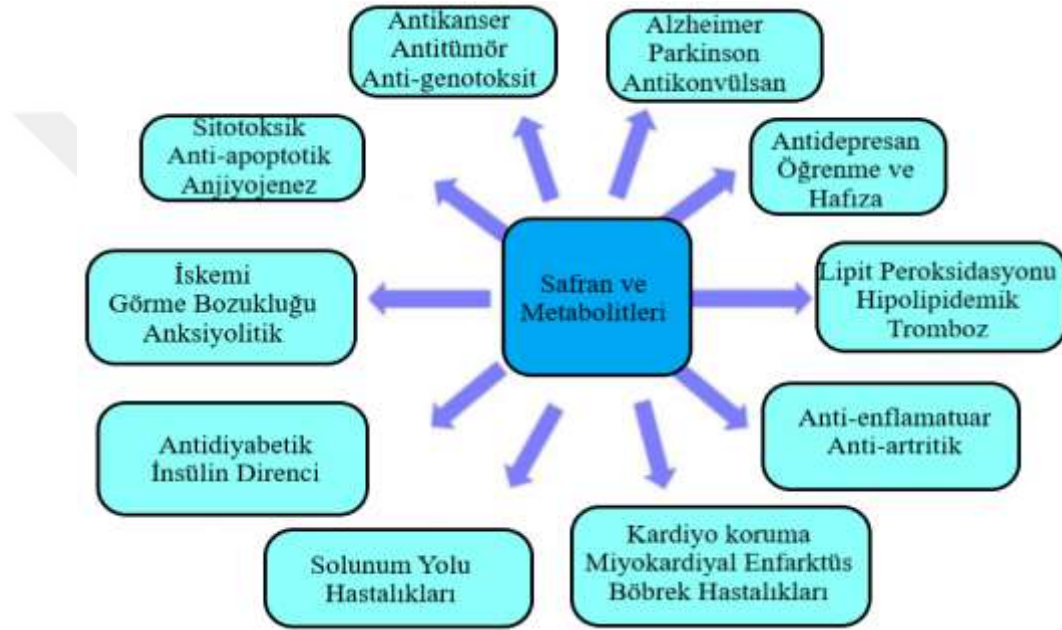
Vejetatif ekim, bitkilerin genetik özelliklerini korumada avantajlar sunar, ancak herhangi bir genetik gelişmeyi engeller. *C. Sativus*'ta, tohumları ve *in vitro* rejenere bitkileri başarılı bir şekilde elde etmek için birçok deney yapılmıştır. Alternatif bir yaklaşım olarak, *C. Sativus*'un en yakın akrabalarını araştırmak, triploid türlerinin nasıl üretildiğini açıklamaya çalışmaktır. *C. sativus* o kadar uzun zamandır tarımı sürüyor ki yabani atası, şu anda bir tartışma konusudur. *C. sativus* $2n=24$ kromozomuna sahiptir ve biri indirgenmemiş bir gamete sahip olan diploid ebeveynler arasındaki çaprazlamanın bir sonucu olarak allopoliploid bir hibrid olduğu düşünülmektedir. Beş fertil diploit ($2n=16$) *crocus* türleri steril safranın ataları olarak kabul edilir: *Crocus cartwrightianus*, *Crocus hadriaticus*, *Crocus oreocreticus*, *Crocus pallasii* ve *Crocus thomasii* [97].

Bazı ülkelerde ayrıca bazı *crocus* türlerinin temsilcileri vardır: İtalya (10 tür), İspanya (6 tür), Macaristan (6 tür) vs. *crocus* cinsi iki alt gruba bölünmüştür: biri hariç tüm türleri içeren subgenus *crocus* ve subgenus *crociris*'in benzersiz üyesi olan *C. banaticus*. *Crocus* ayrıca iki alt bölüme ayrılmıştır: *crocus* ve *Nudiscapus*. Bu cinsin alt bölümü, genetik analizin yanı sıra morfolojik ve sitolojik karakterlere dayanmaktadır. *Crocus* cinsi, öncelikle Akdeniz, Avrupa ve Batı Asya'da dağılan 85–100 civarında türü içerir. Türkiye ve Balkan yarımadası çok sayıda tür ve alt türü biriktirmektedir. Sadece Yunanistan, dünyadaki yabani '*crocus*' çeşitliliğinin yaklaşık % 40'ına katkıda bulunurken, toplam 32 türü (18'i endemiktir) Türkiye florasına dahildir [98].

1.4.1. Safranın Tıbbi Önemi

Crocus sativus L.'nin çiçeklerinin kırmızı stigmalarından üretilen bir baharat olan safran, renklendiriciliği, lezzet vermesi ve biyolojik özellikleri nedeniyle katma değeri yüksek bir tarım ürünüdür, sadece tüketiciler tarafından değil, aynı zamanda gıda ve ilaç endüstrisi tarafından da takdir edilmektedir [99]. Safran ve bileşenlerinin genel olarak kemopreventif ajanlar ve özellikle de murin tümörlerine ve insan lösemi hücre hatlarına geniş bir yelpazeye karşı ümit verici oldukları bulunmuştur. Safran ve bileşenlerinin ayrıca obezite ve ilişkili metabolik bozuklukları modüle ettiği bildirilmiştir [73]. Safran iştah açıcıdır ve sindirimi kolaylaştırır [16]. Safran takviyesi, obezite ile ilişkili aşırı

iştah riskini düşürmekten ve böylece aşırı kilolu bireylerde kilo kaybını arttırmaktan sorumlu olabilir. Safran tüketimi ayrıca kardiyovasküler hastalık, mide rahatsızlığı, depresyon, uykusuzluk, anksiyete ve premenstrüel sendrom gibi diğer birçok hastalık riski ile de ilişkilidir [100]. Safran ağrı gidermek için çeşitli opioid preparatlarında kullanılmıştır (16-19. yy) [101]. Safran'ın ayrıca kalsiyum antagonistik aktivitesine sahip olduğu da gösterilmiştir. Bu antagonistik aktivite, reseptör tarafından çalıştırılan $Ca^{(2+)}$ kanalları ve potansiyel bağımlı $Ca^{(2+)}$ kanalları boyunca hücre dışı $Ca^{(2+)}$ girişinin engellenmesiyle olmuştur [102].



Şekil 1.4. Safran ve bileşenlerinin farmakolojik uygulamaları [103].

Son zamanlarda, tıptaki biyolojik rolleri (özellikle sitotoksik, anti-kanserojen ve antitümör özelliklerine dayalı olanlar) vurgulanmıştır (Şekil 1.4) [73, 104]. Sadece renk ve aromasından dolayı yiyecek hazırlığı için kullanılmaz; ayrıca, antitümör, nöron koruyucu ve antidepresan etkileri dahil olmak üzere birçok terapötik özelliğe sahiptir. Safran baharatı; vitaminler (riboflavin ve tiamin), mineraller (magnezyum, kalsiyum, demir, manganez, bakır ve çinko), indirgen şeker, protein, nişasta, flavonoidler (kaempferolün glikozile edilmesi) dahil olmak üzere çeşitli bileşikler içerir [105].

Geleneksel tıpta safran; gevşetici, balgam söktürücü, canlandırıcı madde, sindirim uyarıcısı, spazm giderici, menstrüasyon ve fetüs kürtajı gibi çeşitli kullanım özelliklerine sahiptir. Safran ayrıca kan ishali, ateş, kızamık, hepatit, karaciğer ve

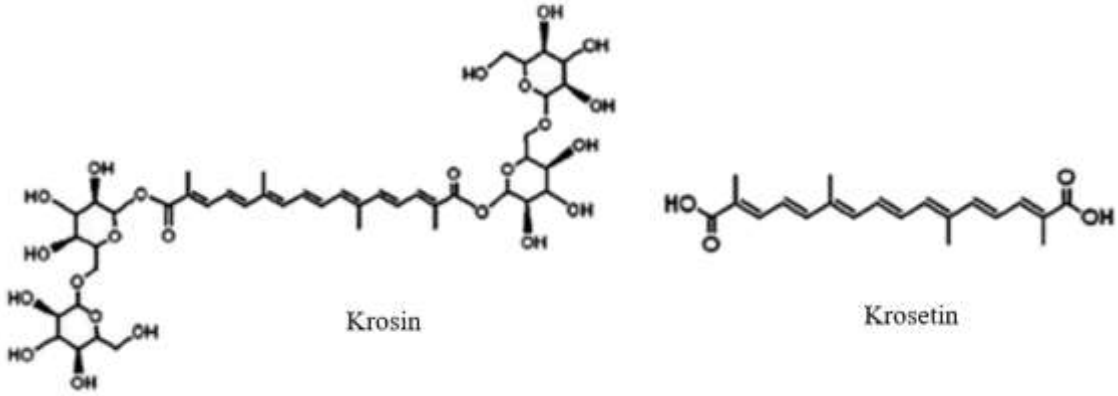
dalakta siros, idrar enfeksiyonu, kolera, diyabet ve dermal hastalıklara karşı kullanılmıştır [16]. Safran'ın en zengin riboflavin kaynağı olduğu bulunmuştur ($100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Safran çiçeğinin kurutulmuş koyu kırmızı stigmalarından toplanan bu ürün, sadece lezzet veren ve renklendiren bir baharat olarak değil, aynı zamanda birkaç hastalığın tedavisinde de kullanım alanı bulmaktadır. Bir ilaç olarak metabolizmayı uyarıcı, soğutucu, diüretik, antihusterik, mide, antiseptik ve spazmodik olarak kabul edilir. Krosetin mevcudiyeti nedeniyle, dolaylı olarak kandaki kolesterol seviyesini ve aterosklerozun ciddiyetini azaltmaya yardımcı olur, böylece kalp krizi riskini azaltır [106]. Safran, kardiyovasküler fonksiyonları ve çarpıntı tedavisini desteklemek için kullanılmış bir kalp toniğidir. Safran ayrıca afrodisyak özelliklere sahiptir ve dolayısıyla iktidarsızlığı iyileştirmek için kullanılır [107]. Safranda bulunan krosetin antibiyotik verimini artırdığı tespit edilmiştir [106]. Kadınlarda adet bozukluklarını düzenlemek için de kullanılır. Safran gençleştirme için zayıflıkta kullanılır. Baş bölgesine safran macunu sürüldüğü zaman baş ağrısını iyileştirdiği söylenmektedir [91]. Esansiyel yağı gevşeticidir ve sinir kaynaklı uykusuzlukta faydalı olabilir. Bronş üzerindeki etkileri için safran kronik bronşit ve akciğer hastalıklarında kullanılır. Güney Asya'da safran, böbrek, karaciğer, vezikül hastalıkları ve kolera ilaçları için yaygın olarak kullanılmaktadır [16].

1.4.2. Safran Metabolitleri

Krosin

Safran (*Crocus sativus* L.), iyi bilinen bir antioksidan etkiye ve hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak kanıtlanmış birçok terapötik özelliğe sahip doğal bir gıda katkı maddesidir. Safranın temel bir bileşeni olan krosin (krosetin di-gentiobiose ester), doğada bulunan ve serbest radikalleri, özellikle süperoksit anyonunu söndürerek bir antioksidan görevi gören suda az çözünen karotenoidlerden biridir [108]. Krosinler (apokarotenoidler), esterlenmiş krosetin formları olan safranın renginden sorumludur. Bu glikozidik karotenoid suda çözünür ve farklı şeker kısımları ile ayırt edilirler. Şeker kısımları, yalnızca bir glukoz, iki glukoz (gentibiyoz) veya üç glukoz (neapolitanoz) olabilir. Ana nokta, bitkilerde *trans* şeklinde üretildiği, ancak beyaz ışığın etkisiyle C13 pozisyonunda *cis* formuna dönüştürülebilecekleridir [105]. Krosin, safranın ana glikosile karotenoidlerinden biridir; krosetin, karboksilik uç gruba sahip hidrolize bir

krosin şeklidir (Şekil 1.5) [109]. Bitki hücre kültürleri, krosin türevlerinin üretimi için etkili bir alternatif olarak önerilmiştir. Krosinler ve krosetin dışında, safranda, az miktarda likopen, alfa ve beta-karoten, zeaksantin, fitoen ve safranin yağda çözünen renk pigmentleri olarak sınıflandırılan fitofluen dahil olmak üzere birkaç karotenoid bileşiği tanımlanmıştır [110].



Şekil 1.5. Krosin ve krosetinin yapısı [109].

Krosin, Asya ve Avrupa'da çeşitli hastalıkların tedavisi için terapötik bir ajan olarak büyük ilgi görmüştür. Araştırmalar, meme, kolorektal ve prostat kanseri hücreleri gibi kanser hücrelerinin büyümesinin, replikasyonun inhibisyonu yoluyla krosin tarafından değiştirildiğini göstermiştir. Krosin'in ayrıca hafızayı önemli ölçüde artırdığı, farelerde antidepresan bir etkiye sahip olduğu ve kardiyovasküler hastalığa karşı koruyucu etkiler ortaya çıkardığı gösterilmiştir. Krosin, *Crocus sativus* L.'in stigmasında ve *Gardenia jasminoid*'lerinin meyvesinde bulunmuştur [111]. Safranal ve krosin olmak üzere iki safran bileşeninin biyolojik ve farmakolojik özellikleri ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Krosin'in, sinir sistemi, en çok çalışılan gastrointestinal, kardiyovasküler, genital, endokrin, bağışıklık sistemleri vb. dahil olmak üzere birçok organ üzerinde yararlı etkiler gösterdiğini bildirilmiştir [110, 112]. Krosin, sinir sistemi, üreme organları ve karaciğerdeki birçok farmakolojik aktiviteye katılır. Krosin, iltihabı ve iskemiye azaltır. Krosin'in çeşitli faydalı aktivitelerinin antioksidan özelliklerinden kaynaklandığı görülmektedir. Krosin, iltihaplanma ve oksidatif hasar ile birlikte artrit kaynaklı kıkırdak ve kemik bozulmasını engeller. Oksidatif stresin osteoporotik süreçte kritik bir rol oynadığı göz önüne alındığında, krosin antioksidan özellikleri osteoporozu

iyileştirebilir [113]. Krosin, koroid ve retinadaki kan akışını arttırır ve iskemik bazı retinopati ve yaşa bağlı maküler dejenerasyonun tedavisinde kullanılabilir. Dahası, krosin cilt tümörü büyümesini inhibe eder, etanol veya hiyosin tarafından bozulmuş öğrenme davranışını iyileştirir ve sıçanlarda etanolün inhibe edici etkisini azaltır [112].

Pikrokrosin

Pikrokrosin, diğer ilgili bileşikler ve kaempferollerle birlikte safranın acı tadından sorumlu olarak kabul edilir [114-117]. Safranın gerçek tadı, temel olarak, safran kuru maddesinin yaklaşık olarak % 1 ile % 13'ünü oluşturan ikinci en bol bulunan bileşen olan pikrokrosinden elde edilir. Pikrokrosinin doğal olarak glikosilasyonu, safran aromasından sorumlu bir başka önemli kimyasal bileşen olan safranal üretecektir [115, 118]. Aromadan sorumlu ana uçucu yağ olan safranalın ($C_{10}H_{14}O$) monoterpen glikozit öncüsüdür [119]. Bu acı madde, safranal (bir glikoz ve aldehit) üreterek asit hidrolizi yoluyla kristalleşebilir [120]. Taze safranda stabil olduğu ve serbest kalması için ısıtıldığında parçalandığı görülmüştür [101].

Safranal

Safran (*Crocus sativus* L.) en pahalı baharattır. Safran, 150'den fazla uçucu aroma veren bileşik içerir [121]. Bir monoterpen aldehit olan safranal (2,6,6-trimetil-1, 3-siklohekssadien-1-karboksaldehit), safranın kokusu ve aromadan sorumlu olan uçucu yağın ana bileşenidir. [122, 123]. Safran esansiyel yağında en bol bulunan kimyasal olarak safranal, uçucu fraksiyonun % 60-70'ini oluşturur [121, 125, 84]. Safranal; antioksidan, analjezik ve anti-enflamatuar, hipnotik ve anksiyolitik, antikonvülsan, anti-iskemik, antidepresan ve nöroprotektif gibi birçok nörofarmakolojik özellikleri bildirilmiştir [125, 126]. Safranal suda çözünmez ancak metanol, etanol, petrol eteri, buzlu asetik asit ve asetonytrilde çözünür [121]. *Crocus sativus* ve safranal bileşenlerinin etanolik ekstraktı, nebülize sitrik asit çözeltisinin (% 20) öksürüğü uyarmak için kullanıldığı periton içine enjekte edildiğinde guinea domuzlarındaki öksürük sayısını azalttığı bulunmuştur [123].

1.5. Sentetik Biyoloji ve Metabolik Mühendisliği

Mevcut toplumun 21. yüzyıl boyunca karşılaşacağı en büyük zorluklardan biri, yenilenebilir malzemeler kullanılarak çevre dostu kimyasal süreçlerin geliştirilmesidir. Bu amaca yönelik olarak, biyoteknoloji, geleneksel endüstriyel süreçlere alternatif olarak biyo-temelli çözümlerin sürekli gelişmesini sağlamıştır. Bu bağlamda, metabolik mühendisliği disiplini, *E. coli* gibi iyi karakterize edilmiş organizmalara heterolog yollar ekleyerek yerli ve doğal olmayan yüksek değerli bileşiklerin üretimi için mikropları genetik olarak değiştirmeyi amaçlamaktadır [127]. Mikroplar çok çeşitli uyaranları algılayabilir, bilgiyi verimli bir şekilde işleyebilir ve bir dizi kimyasal ve fiziksel tepki üretebilmektedir. Genetik mühendisleri, doğal biyolojik sinyal yollarını incelemek için bu etkileyici yetenekleri yeniden oluşturdular ve istenen bileşikler üretmek, toksik metallerin veya kanserin varlığını belirlemek ve rapor etmek veya patojenik bakterileri aramak ve yok etmek için hücreleri yeniden programlamışlardır. Bu son teknoloji ürünü örnekler, karmaşık yerli sistemlere kıyasla göreceli olarak basit sinyal işleme ağları kullanmaktadır, bu da tasarımcı organizmalar için büyük bir potansiyele işaret etmektedir, aynı zamanda sentetik gen devrelerinin etkili ve rutin olarak programlanması için ne kadar zor olduğunu da vurgulamaktadır [128].

Metabolik mühendisliği, bir hücresel fenotipin mühendisliğine yönelik sistemsel bir yaklaşımdır. Biyolojik moleküller, doğada hayatta kalmak için optimize edilmiş ağlarda yüksek derecede birbirine bağlıdır. Sadece nihai ürün oluşturan reaksiyona odaklanan molekül merkezli yaklaşımlardan farklı olarak metabolik mühendisliği, metabolik yolağı bütünüyle vurgular [130]. Metabolik mühendisliği, rekombinant DNA ve diğer moleküler biyolojik teknikler kullanılarak hücresel metabolizmanın amaca yönelik modifikasyonu olarak tanımlanabilir. Metabolik mühendisliği, metabolik ve hücresel sistemi bir bütün olarak ele alır ve buna göre, sistemi temel genetik mühendisliğinden ayıran genel biyoprosesin verimliliği göz önüne alınarak sistemin manipülasyonuna izin verir. Ayrıca, temel genetik mühendisliği veya rastgele mutagenез ile karşılaştırıldığında, çeşitli açılardan avantajlıdır, çünkü hücrenin tanımlanmış mühendisliğine izin verir, böylece hücrede gereksiz değişiklikleri önler. Metabolik mühendisliğinin başarılı birçok örneği arasında, L-valin, L-treonin, likopen, antimalaryal ilaç prekürsörü ve benzilzokinolin alkaloitlerinin verimli üretimi

hakkındaki son raporlar, metabolik mühendisliğin istenen hedeflere ulaşmak için nasıl gerçekleştirilebileceğini göstermektedir [131]. Son gelişmeler, büyük DNA'nın fragmentlerinin kimyasal olarak, hatasız sentezleme kapasitesini büyük ölçüde genişletmiştir. Bu teknoloji, DNA seviyesinde programlanmış çeşitli aktiviteleri teşvik etmiştir: (i) yeni biyomoleküllerin tasarımı ve sentezi; (ii) çeşitli dinamik cevaplara sahip entegre genetik ağların (veya devrelerin) münferit elemanlarının (örneğin sensörler, geçiş anahtarları) yapımı; ve (iii) bu bileşenlerin ürünlerin sentezi için metabolik ağlara birleştirilmesidir. Genetik devreleri tasarlama kavramı ve dinamik tepkileri yeni olmamasına rağmen, DNA fragmentlerinin sentezlenmesi için geliştirilmiş yöntemler, birçok hücre tipinde hem transkripsiyon hem de metabolik seviyelerde yeni yanıt sistemlerinin inşasında önemli etkilere sahiptir. [130]. Genellikle, metabolik mühendisliğinde iki strateji kullanılır: (1) heterolog yolak mühendisliği ve (2) konağın metabolizma yolağının aşırı ekspresyonu ve/veya optimizasyonu şeklindedir. Bu stratejiler, ucuz enerji kaynakları ve katı destekler olarak farklı yenilenebilir yem stoklarının kullanılmasıyla çok sayıda farklı emtia kimyasallarının, yeni malzemelerin, sürdürülebilir yakıtların ve ilaçların üretilmesini sağlar [132]. Birden fazla heterolog gen içeren bir biyosentetik yolağın tanıtılması, genellikle biyoyakıtların, kimyasal maddelerin ve ilaçların mikrobiyal üretimi için ilk adımdır [133]. Diğer endüstriyel olarak yararlı kimyasallar gibi, ilaçlar da metabolik mühendisliğin ana hedefi olmuştur. Artemisinik asit, taksol öncülü ve benzilizokinolin alkaloidler gibi tıbbi değere sahip bitki sekonder metabolitleri, metabolik olarak yapılandırılmış mikroorganizmalar tarafından başarıyla üretilmiştir. Rekombinant *E. coli* tarafından insan insülini üretimi, basit rekombinant DNA teknolojisinin bir sonucu olarak kabul edilir, ancak büyük terapötik değerlerin daha kompleks proteinleri de mikroorganizmaların metabolik ve hücresel mühendisliği ile üretilir. Metabolik mühendisliği ile yapısal ve fonksiyonel olarak çeşitli antibiyotiklerin geliştirilmesi, gelişmekte olan ilaca dirençli patojenlere karşı savaşmak için büyük önem taşımaktadır [131].

Sentetik biyoloji, endüstriyel olarak harmanlanmış biyolojik işlemlerin yararları üzerine niteliksel olarak yeni bakış açıları sunar. Yaklaşık on yıldan beri yapay biyolojik sistemlerin tasarımı veya *de novo* yapımı yeni ufuklara ulaşmıştır. Bunlar sentetik biyolojinin temel odağını temsil ederler. Özellikle, büyük ölçüde azaltılmış maliyetlerle hücreleri genetik olarak değiştirmeye yönelik artan teknik yeteneğin etkisiyle girişim derecesi önemli ölçüde artmıştır [134]. Sentetik biyolojinin büyümesi,

bir dizi bilimsel ve teknolojik gelişme ile desteklenmiştir [135]. Sentetik biyoloji, genetik mühendisliği ruhunu tüm gen ve gen ürünleri sistemlerine odaklanmak için genişletir. Sentetik biyolojinin amacı, organizmaların davranışlarını genişletmek veya değiştirmek ve yeni görevleri yerine getirmek için onların mühendisliğini yapmaktır [136]. Sentetik biyoloji, özellikle metabolik yolak ve ürün mühendisliğinin alt alanlarında yeni biyolojik sistemlerin oluşturulması için güçlü bir disiplin olarak ortaya çıkmıştır [137].

Metabolik mühendisliği ve sentetik biyoloji, bitki kaynaklı (ve diğer) doğal ürünlerin mikrobiyal sistemlerden heterolog üretimine hazır bir uygulama görmüştür. Bu gelişmeye yardımcı olmak için genom dizilimi, DNA sentezi, kromozomal mühendisliği ve analitik yeteneklerde (omik karakterizasyon yöntemleri dahil) etkileyici teknik atılımlar olmuştur [138].

1.5.1. Metabolik Mühendisliğinde Kullanılan Stratejiler

Metabolik mühendisliği yaklaşımlarının çoğu genetik mühendisliği tekniklerine dayanmaktadır. Metabolik mühendisliği için temel gereksinimlerden bazıları (1) üretilcek kimyasalın biyosentetik yolağı, (2) ilgili enzimleri kodlayan genler, (3) bu enzimlerin düzenlenmesi, (4) konakçı organizmada istenen genleri transfer edip, eksprese etme veya inhibisyon kabiliyetine sahip olmaları; (5) kodlanmış enzimin özelliklerini değiştirebilmek için *in vivo* ve *in vitro* geni mutasyona uğratmak ve (6) konak hücre içinde ekspresyonları için bir dizi geni birleştirme hakkındaki bilgilerdir. Bakteriler ve mayalar metabolik mühendisliğin öncü konakçısı olsalarda, günümüzde benzer deneyler için mantarlar, hayvan ve bitki hücreleri gibi diğer organizmalar da kullanılmaktadır [139].

Metabolik mühendisliği, bir veya daha fazla spesifik ürünün birikimini kontrol etmek için endojen metabolizmanın hedeflenen onarımını tanımlamaktadır [140]. Amaçlardan biri, normalde az miktarda biriken bir metabolitin seviyelerini yükseltmek ya da bazı durumlarda istenmeyen bir ürünün seviyesini düşürmek için metabolik mühendisliğin kullanıldığı bazı maddelerin üretilmesini sağlamaktır. Metabolik yollar, kavramsal olarak reaksiyonların doğrusal dizilerine indirgenebilir, ancak asıl özellikleri bitkilerde ve diğer yüksek ökaryotlarda daha karmaşıktır çünkü düzenleme için birden çok katman olduğu gibi diğer yollarla etkileşimler de vardır [141]. Doğada

mevcut olan çeşitli enzimler ve yolaklar, spesifik moleküller üretmek için sentetik yolakların yeniden yapılandırılmasında büyük bir kaynağı temsil etmektedir [142].

Bitki kaynaklı doğal ürünler, alternatif üretim konakları aracılığıyla biyosentezi yeniden oluşturmak için yeni biyo-mühendislik stratejilerini yönlendiren kayda değer bir fayda göstermiştir. Bu tür stratejiler birkaç farklı bilgi ve teknolojiyi kullanmaya çalışır. Örneğin, bitki türevli bileşiklerin farmasötikler, zirai kimyasallar, kozmetikler, hassas kimyasallar ve nutrasötikler olarak umut vaat ettikleri iyi bilinmektedir. Bununla birlikte, bileşiklerin ve bunların yerli üretim konaklarının karmaşıklığı, hızlı ve büyük ölçekli üretim süreçlerinde ciddi bir çaba sarf edilmiştir. Buna cevaben, metabolik mühendisliği gibi yerleşik alanlar ve sentetik biyoloji gibi yeni ortaya çıkan alanlar ile ilgili bilimsel ve mühendislik ilerlemeleri, bitki kaynaklı bileşiklere ve bunların güçlü potansiyellerine daha iyi erişim için yeni fırsatlar sunmaktadır [138]. Stabil bir dönüşüm prosedürü oluşturulduktan sonra, bir metabolik mühendisliği stratejisi tanımlanmalıdır. Doğal ürün verimini artırmak için metabolik mühendisliği, istenen sonuca bağlı olarak iki ana strateji kullanılarak ele alınabilir. Gıda bitkileri için, büyük bir bileşik sınıfının üretiminin artırılması genellikle yararlıdır, bu da bir bitkinin çevreye uyum sağlamasına (örneğin, zararlılar, sıcaklık, kuraklık, UV) veya bir gıda ürününün genel besin değerini artırmasına neden olur (örneğin, antioksidan kapasite, vitamin üretimi, yağ asidi üretimi). Öte yandan, biyosentetik bir yolak içinde spesifik bileşiklerin hedeflenmesi, tıbbi veya nutrasötik uygulamalar için tek bir ürünün daha fazla verimine olanak sağlaması için oldukça gereklidir. Bu durum için tipik metabolik mühendisliği stratejileri, spesifik yolak genlerinin, ortak veya rakip yolak genlerinin veya transkripsiyon faktörlerinin yukarı regülasyonu veya baskılanmasının yanı sıra, doğal olmayan bileşiklerin üretilmesine olanak sağlaması için heterolog genlerin dahil edilmesini gerektirmektedir. Bu stratejiler, ilgilenilen bileşik(ler) için biyosentetik yolağın en azından kısmi karakterizasyonu gereklidir [50].

Konakçı hücrelerde, sekonder metabolitler bir bileşiğin üretiminde yer almadıklarından dolayı, üretici suş için (mg-mg/L) bir selektif avantaja sahip olmaları sebebiyle yeterli konsantrasyonlarda üretilmelidir. Bununla birlikte, bu miktarlar endüstriyel ölçekli üretim için gerekenden çok daha azdır (g/L). Suş gelişimi için standart protokoller, en yüksek verimle üreten yerli suşun seçilmesine veya taranmasına ve bu suşun mutajenez ve seleksiyon ile daha da geliştirilmesine dayanmaktadır. DNA dizileme ve rekombinant teknolojilerdeki ilerlemelerle, metabolik mühendisliği yoluyla

rasyonel suş gelişimi, sekonder metabolitlerin titrelerini arttırmak için güçlü bir araç haline gelmiştir. Örneğin, öncül arzını güçlendirmek, rakip yollara veya istenmeyen yan ürünlere doğru akışı azaltmak, gen ekspresyon regülasyonunun değiştirilmesi, darboğaz enzimlerinin aşırı ekspresyonu, hedef gen kümesinin amplifikasyonu veya biyosentetik yolağın heterolog ifadesi için genetik araçlar kullanılabilir [143].

Mikroorganizmalar teorik olarak metabolik ağlarında bulunan tüm metabolitleri üretebilirler, ancak doğal olarak oluşan mikroorganizmaları kullanarak bu kimyasalların çoğunu üretme verimlilikleri oldukça düşüktür. Metabolik mühendisliği, kimyasalların ve ilgili malzemelerin biyo-bazlı üretiminde üç ana performans endeksini (titre, verim ve üretkenlik) geliştirmeyi mümkün kılmıştır. Performansın iyileştirilmesine ilişkin tatmin edici sonuçlardan bazıları, metabolik mühendisliği stratejilerini, farklı kimyasallar ve materyalleri maliyeti etkin bir şekilde üretebilen biyo-rafineri süreçlerinin geliştirilmesine ve ilerlemeye yönelik daha fazla çaba sarf etmemizi teşvik etmiştir [4].

1.5.2. Bakterilerde Metabolik Mühendisliği

Metabolik mühendisliği, canlı hücrelerdeki metabolik ağların, rekombinant DNA teknikleri kullanılarak daha yüksek verim ve üretkenlikle arzulanan kimyasallar üretmek üzere amaca yönelik modifikasyonu olarak tanımlanır. Başlıca uygulamalarından birisi, uygun mikroorganizmaları kullanarak verimli ve bol miktarda ticari yararı olan kimyasalları üretmek için yapılan araştırmalardır. Geleneksel olarak, üretken konakçıların arzu edilen kimyasalları doğal olarak sentezleyen mikroplar olduğu varsayılmıştır. Bununla birlikte, istenen kimyasalların öncüllerini üstün verim ve üretkenlikle üretme yeteneğine sahip olan mikroorganizmalar da konakçı olarak kabul edilir. Bu kavram, verimli konakçı olarak kullanılabilir mikropların kapsamını önemli ölçüde genişletmektedir [144]. Moleküllerin tasarlanan biyosentezine yönelik aktif araştırmalar üç kategoriye ayrılabilir: (1) mevcut biyosentez yollarının güçlendirilmesi, (2) mevcut biyosentetik yolların rekapitülasyonu ve optimizasyonu, (3) doğal olmayan moleküller için *de novo* yollarının oluşturulması [145].

Mikroorganizmalardaki izoprenoidlerin üretimi, son yirmi yılda metabolik mühendisliğin en büyük başarılarından biri olmuştur. Metabolik mühendisliğinde, biyosentetik yollar, ürün verimini artırmak amacıyla tipik olarak doğal konakçılardan

heterolog organizmalara aktarılır. Doğal ürün yollarının yeniden yapılandırılması için rekombinant sentezleme sistemlerinin kullanılması, metabolik mühendisliği ve sentetik biyolojideki gelişmeler nedeniyle önemli ölçüde iyileşmiştir. Farklı heterolog sistemler arasında, *E. coli* ve *Saccharomyces cerevisiae* genetik izlenebilirliği ve hızlı büyümesi nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Sonuç olarak, seçilen bir konakçıya metabolik yolların sokulması, zaman alıcı olabilen ve çoğu zaman etkisiz olan sıralı klonlama yöntemlerini gerektirmektedir [146]. Kapsamlı araştırma ve geliştirme çalışmaları nedeniyle *E. coli*, dünyadaki en iyi karakterize edilmiş organizmadır ve moleküler biyoloji laboratuvarlarında ve sanayide kullanılan en önemli organizmalardan biri haline gelmiştir. Hızlı büyümesi, kolay kültür koşulları, metabolik plastisitesi, biyokimyasal ve fizyolojik bilgi hazinesi ve genetik ve genomik mühendisliği için araçların bolluğu nedeniyle, *E. coli* aynı zamanda metabolik mühendisliği ve sentetik biyoloji için en iyi konakçı organizmalardan biri haline gelmiştir. Yaygın olarak kullanılan *E. coli* suşları genellikle zararsız olarak kabul edilmektedir [147]. Kısacası, başarılı bir metabolik mühendisliği yaklaşımları, bitkilere yeni yollar tanıtan yaklaşımlardır. Buradaki temel zorluk, yeterli substrat mevcudiyetinin sağlanması, getirilen heterolog enzimin yeterli aktivitesinin sağlanması ve ürünün endojen enzimler tarafından bozulmasının önlenmesi ile sınırlıdır. Bu tip bir yaklaşımın kullanım örnekleri arasında pirinçte A vitamini üretimi, *Arabidopsis* ve *Brassica*'da biyoplastik üretimi, osmoprotektan biriktirme mühendisliği ve yağlı asit bileşimlerinin değiştirilmesi yer alır [148].

Sekonder metabolitlerde olduğu gibi, mikrolardaki bitki sekonder metabolitlerinin ekspresyonunu artırmak ve yüksek verim elde etmek zor bir iştir. Kodon kullanımının heterolog gen ekspresyonunu etkilediği bilinmektedir ve bunlar tüm metabolik mühendisliği yaklaşımının bir parçası olmalıdır. Heterolog konakçıdaki enzim stabilitesi, kofaktör gereksinimleri, translasyon sonrası modifikasyon ve düzenleme, subüçer kompartmantasyon ve geri besleme inhibisyonu, göz önünde bulundurulması gereken diğer faktörlerdir. Ökaryotik ekspresyon sistemleri, translasyon sonrası modifikasyon imkanı sunar ve genellikle bitki sekonder metabolitlerinin üretimi için heterolog konakçı olarak kullanılır. En yaygın kullanılan ökaryotik ifade sistemleri maya ve böceklerdir [149].

Son zamanlardaki ilerlemeler, daha kapsamlı genetik araçlarla ve mikroorganizmaların hücresel bilgisiyle artmıştır. Örneğin, *E. coli*'nin mevalonat olmayan yolağı, akson dengesi analizi ve transpozon kütüphanelerinin taranması

yoluyla distal gen hedeflerini tanımlayarak likopen üretecek şekilde tasarlanmıştır. Mevalonat yolağı, sırasıyla, anti-sıtma ilacı artemisin öncüleri olan amorfadiyen ve artemisimik asidi üretmek üzere *E. coli* ve *S. Cerevisiae*'de dahil edilmiş ve geliştirilmiştir [130]. Mikroplar, endüstrilerde geniş mikrop kullanımı nedeniyle, eczacılık, tarım, gıda vb. gibi çeşitli sektörlerde birçok değerli ürünün üretiminde kullanılmaktadır [150].

1.5.3. Sekonder Metabolitlerde Metabolik Mühendisliği

Bitki sekonder metabolizmasının, bitkinin yaşam döngüsü boyunca birçok işlevi vardır. Bu işlevler, bitkinin bitki-böcek, bitki-mikroorganizma ve bitki-bitki etkileşimleri gibi çevresiyle etkileşiminde aracı olarak sınıflandırılabilir. Sekonder metabolitlerin üretimi, örneğin, antifeedants, fitoantinantların yapısal üretimi ve fitoaleksinlerin indüklenabilir üretimi gibi, bitkinin savunma sisteminin bir parçasını oluşturur. Sekonder metabolizma, örneğin, polinatörlerin çekilmesinde ve erkek fertilitesinde, bitki reproduksiyonunda da rol oynar. Sekonder metabolitler insan gıda kalitesinin önemli yönlerini belirler (tat, renk ve koku) ve bitki pigmentlerinin, süs bitkilerinin ve çiçeklerin çeşitliliği için önemlidir. Dahası ilaçlar, boyalar, böcek öldürücüler, tatlar ve kokuların üretimi için birkaç bitki sekonder metaboliti kullanılmaktadır. Sekonder metabolizma böylece bitki yetiştiriciliği için ilginç bir hedeftir [151]. Bitkiler yapısal açıdan farklı kimyasallar gibi görünen tükenmez bir havuz sağlarlar. Planta'da, bu bileşiklerin biyosentezi dışsal veya çevresel ipuçlarına bir cevaptır ve bu nedenle de bitki ekosistemlerinin karşılıklı bağımlılıklarını ve çeşitliliğini şekillendirmede çok önemli bir rol oynar. Bu kimyasallar, bitkilerin gıda ve enerji kaynakları olarak ne kadar etkili kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca, bitkilerin ürettiği birçok kimyasal madde insan sağlığını geliştirir ve ilaç endüstrisinde kullanılmak üzere birçok bitki metaboliti izole edilmektedir [152].

Geçtiğimiz birkaç yılda, modüler mühendislik ile sentetik biyoloji çalışmalarında birçok başarı elde edilmiştir ve bu da insan toplumunu sağlık bakımı ve kimyasal üretim açısından önemli ölçüde etkilemiştir [153]. Daha güçlü biyolojik aktiviteye sahip çeşitlendirilmiş doğal bileşiklerin hazırlanması, metabolik mühendisliğinin önemli bir uygulamasıdır. Örneğin, flavonoid türevleri, rekombinant mikroorganizmaların öncü beslenmesiyle üretilmiştir.

Bitkilerin metabolik mühendisliği temelde zor bir uğraştır. "Mühendislik" teriminin kullanılması, değiştirilmekte olan sistemin kesin bir şekilde anlaşıldığını ima eder. Ancak, bu normalde bitkilerdeki bir durum değildir. Tipik bir metabolik mühendisliği yaklaşımı; nişasta, E vitamini veya amino asitler gibi belirli bir metabolik ara ürün veya ürüne odaklanarak belirlenir. Biyosentez yolundaki bilgi değerlendirilir ve "hız sınırlayıcı adımlar" için adaylar belirlenir. Bunlar genellikle *in vivo* dengeden uzak olduğuna veya bilinen düzenleyici özelliklere sahip olduğuna inanılan reaksiyonları katalize eden enzimlerdir. Bu aşamalardan sonra katalitik kapasiteyi artıran yeni bir enzimin katılmasıyla mühendisliğe tabi tutulur. Çoğu zaman, seçilen enzim, endojen sistemde "heterolog" dır ve bu nedenle, hedef organizmada bulunan düzenleyici kontrollerden (örn., Allosterik regülasyon, protein modifikasyonu ve protein ilişkisi) bağımsız olarak bilinir veya kabul edilir. Bu yaklaşım bazı muhteşem başarılar üretmiştir. İlk gerçekleştirilen örneklerden biri, steril edilmiş bir *E. coli* enzimini (ADP glukoz pirofosforilaz) patates yumrularına sokarak artan nişasta biyosentezinin başarıldığını [148].

Bitki ve hayvanlardan elde edilen bir dizi doğal bileşik, kronik hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde sağlığa yararları ile ilişkilendirilmiştir [146]. Bitki sekonder metabolitleri, bitkilerin büyümesi, gelişimi veya yeniden üretilmesinde rol alır. Ayrıca bitki savunmasında ve sinyallemede önemli işlevlere sahiptir ve pigment veya koku verici olarak işlev görür. Tüm canlı organizmaların geniş spektrumunda çoğunlukla aynı olan primer metabolitlerden farklı olarak, bitki sekonder metabolitleri türlerden türlere değişebilir ve çeşitli karmaşık kimyasal yapılar dizisinden oluşabilir. Sınırlı erişim ve yüksek kaliteli doğal ürünler nedeniyle, son yıllarda gıda endüstrisinde sentetik bileşikler giderek daha fazla önem kazanmıştır. Bununla birlikte, günümüzde insanlar bazı sentetik bileşiklerin kanıtlanmış toksikolojik etkilerinin bir sonucu olarak doğal ürünler talep etmektedir. Genellikle, bitkideki doğal ürünlerin besin değeri yoktur, fakat bitkilerdeki doğal ürünler açısından zengin bir diyet, bağışıklık sistemini güçlendirebilir veya insan vücudunu serbest radikallerden koruyabilir ve böylece karsinogenezi önleyebilir veya bastırabilir. Bu nedenle, bitki doğal ürünleri farmasötik ilaçlar olarak büyük öneme sahiptir [154].

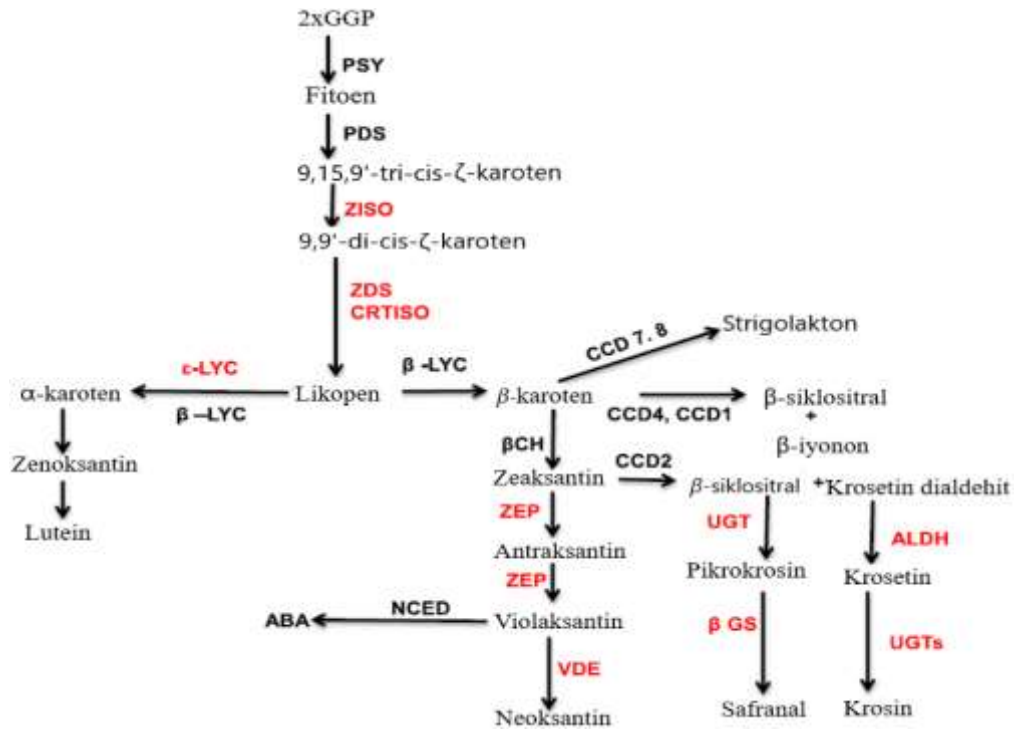
Sekonder metabolizma, hücre büyümesi için uygulanabilen bir grup biyolojik işlem tarafından oluşturulur. Mantar ve filamentöz bakteriler gibi mikroorganizmalarda

sekonder metabolizma, tıbbi kimya ve biyoteknolojideki uygulamalarla birlikte biyolojik olarak aktif bileşiklerin önemli bir kaynağıdır. Mikroorganizmalardan türetilen sekonder metabolitler, çok yönlü çeşitliliği ve biyolojik aktiviteleri barındıran sentetik ilaçların birçoğundan daha büyük kimyasal karmaşıklığa sahip olma eğilimindedir. Bununla birlikte, bunlar tipik olarak saf bileşikler olarak mevcut değildir ve karmaşık karışımlardan izolasyonları sıklıkla can sıkıcı ve karmaşık bir süreçtir [155]. Bitki sekonder metabolitlerinin mikrobiyal üretimi, manipüle etmeleri nispeten kolay oldukları, fermantasyonları daha iyi kontrol edilebildiklerinden, hızlı büyüme oranlarına sahip olduklarından ve genellikle ucuz substratlar kullandıklarından çeşitli avantajlar sunar [149]. Mikrobiyal türler, terapötik olarak ilgili sekonder metabolitler veya doğal ürünler için olağanüstü kaynaklardır. Bu bileşikler, bakteriler tarafından, savunmadan besin alımına kadar uzanan çeşitli işlevlerde ve antibakteriyeller, antifungaller, antikanser ajanları ve diğer tedaviler olarak kullanılmak üzere modern tıp tarafından üretilmiştir. Doğal ürünler organizmanın hayatta kalması için esas olarak kabul edilmemiş olsa da hem üretici hem de çevre organizmalar için çevresel avantajları destekleyen yönleri bulunmaktadır ve bunların devam ettirilmesi, yeni bileşik iskelelerinin ve yolların açığa çıkarılmasında anahtardır [156].

1.6. Safran Metabolik Yolak

Karotenoid ve apokarotenoid yollar, izopentenil fosfattan (IPP) zeaksantine kadar başlayan ortak biyosentetik adımları paylaşır. Yolun birinci hız sınırlayıcı enzimi, yani fitoen sentaz (PSY), iki GGDP (Geranil geranil difosfat) molekülünün yoğunlaşmasıyla fitoen üretir. Bunu takiben, birkaç eşzamanlı adımla, oksidatif klevaj yoluyla farklı apokarotenoidlere dönüştürülen zeaksantin (apokarotenoid öncülü) üretimi meydana gelir. Ayrıca *Crocus*'ta, zeaksantin diglukosidaz, diğer birkaç glikozitin karakteristik aromasından toplu olarak sorumludur [157]. İki halkalı beta karoten, likopen, β -siklaz (LYC) ile likopen siklizasyonu ile oluşturulur. MVA yolundaki β -karotenin hidroksilasyonu, zeaksantin elde etmek için BCH geni tarafından kodlanan β -karotenoid hidroksilaz tarafından katalize edilir [158]. Karotenoid bölünme dioksijenazları (CCD'ler) adı verilen ve karotenoidlerin farklı bağlarındaki çift bağları apokarotenoidlerin oluşumu ile sonuçlanan bir enzim sınıfı vardır. Zeaksantin, CCD2 için, krosetin dialdehit ve β -siklositral'de bölünen substrat görevi görür. CCD2, 7'8' bölünme aktivitesine sahip enzim olarak tanımlanmıştır ve *Crocus*'ta krosin

biyosentezinde ilk adımı katalize etmiştir. Daha sonra krosetin dialdehit, aldehit dehidrogenaz (ALDH) tarafından krosetin'e dönüştürülür. Ayrıca, krosetin ve β -siklositral, sırasıyla UDP-glukosil transferazlar (UGT) tarafından krosin ve pikrokrosine dönüştürülür [159]. Yani safranın renk ve koku aktif bileşiklerinin biyogenezi, krosetin dialdehit ve pikrokrosin üretmek üzere 7,8 (7', 8') noktadaki zeaksantin biyooksidatif bölünmesiyle türetilir [158]. Pikrokrosin ayrıca bir beta-glukosidaz (β -GS) etkisi olduğu varsayılan safran haline dönüştürülür (Şekil 1.6) [159]. Krosetin glukosil ve gentiobiosil esterlerin oluşumu için glukosiltransferaz aktivitesi, safran filizlenme kordonlarının farklı kısımlarında ve kallus kültüründe mevcuttur, ancak enzimler saflaştırılmamıştır veya karakterize edilmemiştir. Krosetinin krosin içine glukosilasyonu sıralıdır ve iki farklı glukosiltransferaz içerebilir; bir tanesi krosetin karboksil grupları ve glikoz kısımları arasında ester bağları oluştururken, diğeri glukozidik bağların oluşumunu katalizleyerek molekülün her iki ucunda da işlev görür [160]. Krosetin glikosilasyonu önemlidir, çünkü pigmente suda çözünürlük sağlar. Glukosilasyon, farmasötik veya beslenmeyle ilgilenen moleküllerin stabilitesini, aktivitesini, biyolojik mevcudiyetini ve suda çözünürlüğünü artırabilir. Ayrıca *Crocus sativus* L. kallus ekstraktının, UDP-glukoz kullanarak krosetin glikositlere dönüşme kabiliyeti de bildirilmiştir [161].



Şekil 1.6. Safran apokarotenoid yolak [159].

1.6.1. Safran Metabolik Yolak Genleri

CCD2 Geni;

Bitkilerde karotenoidlerin oksidatif bölünmesi, foto koruma, fotosentez, pigmentasyon ve sinyalizasyon gibi kritik fonksiyonlara hizmet eden bir dizi apokarotenoid bileşiğinin üretimine yol açar. Bitki CCD'leri, şimdiye kadar tanımlanan en bol grubu oluşturmaktadır [162]. CCD'ler, ayrıldıkları çift bağ için özgülük sergilerler, fakat birçoğu substrat seçiminde kararsızdır. Bitkilerde, CCD1 ve CCD7 kendi karotenoid substratlarının 9,10 çift bağını ayırırken, 9-cis-epoksi-karotenoid dioksijenazların (NCED'ler) 11,12 çift bağını ayırır. Ek olarak, *Bixa orellana*'dan (bir ödikot) BoLCD'nin likopen 5,6 çift bağını ayırdığını ve *Crocus sativus*'tan bir CsZCD'nin (bir monokot) 7,8 çift zeaksantin bağını ayırdığı tespit edilmiştir [64].

CCD ailesinin yeni bir üyesi olan karotenoid bölünme dioksijenaz 2, zeaksantin *Crocus*'ta krosetin dialdehit'e dönüşümünü katalize eder [59]. CsCCD2'nin ekspresyonu safradaki stigma ile sınırlıdır ve gelişimi sırasında bu dokudaki krosetin seviyelerini belirler. Aynı davranış, bahar çiğdemi *C. Ancyrensis*'ten izole edilen bir CCD2 homologu olan CaCCD2 için de gözlenir. Her iki CCD2 enzimi, CCD1 alt ailesi ile büyük bir fark olarak plastidiktir [162]. CCD2 çiçeklerde eksprese edilir, tepal ve stigma ile gösterilen sarı, turuncu ve kırmızı renklerden sorumludur. CCD bitki ailesinde beş alt aile tanımlanmıştır; Substratları ve regioelektriklikleri bakımından farklı olan CCD1, CCD2, CCD4, CCD7 ve CCD8 şeklinde gösterilmiştir. CCD1, CCD4, CCD7 ve CCD8 alt familyasından üyeler, bugüne kadar sıralanan tüm yüksek bitki genlerinde, CCD2'nin istisna olduğu, yalnızca *Crocus sativus*'ta ve diğer *Crocus* türlerinde belirlenmiş üyeler ile tanımlanmıştır [59, 163]. NCED'ler, ABA öncüsü ksantoksinini üretmek için sadece 11,12 çift 9-cis-epoksi-karotenoid bağını parçalamaktadır. CCD7 ve CCD8, strigolakton öncüsü karlaktona yol açan, sırasıyla strigolakton yolunda etki eder. CCD1 ailesinin enzimleri, birkaç farklı pozisyonda geniş bir yelpazede farklı karotenoid parçalarını ayırır (9,10; 9,10,9', 10'; 5,6,5', 6'; veya 7,8,7',8'). CCD4 enzimleri 9',10' veya 7',8' pozisyonlarında karotenoidleri ayırır ve krizantem yaprakları, şeftali eti, patates yumruları, narenciye kabuğu ve *Arabidopsis* tohumları dahil olmak üzere bitki dokularındaki pigmentasyon seviyesini belirler [163]. Krosetin, CsCCD2 tarafından katalize edilen bir C7-C8 ve C7'-C8' ayrılma reaksiyonu

ile zeaksantin biyo-oksidatif ayrılması ile elde edilir. CsCCD2'nin ekspresyonu safradaki stigma ile sınırlıdır ve gelişimi sırasında bu dokudaki krosetin seviyelerini yansıtır [162].

UGT Geni;

Glikosiltransferazlar (GTazlar), belirli bir alıcıya bir şeker molekülü bağlayan ve böylece bir glukosidik bağ oluşturan enzimlerdir [61]. Glikosiltransferazlar (GT'ler), nükleotit difosfatla aktive edilmiş şekerlerin, proteinlerden, lipitlerden, nükleik asitlerden antibiyotiklere ve sekonder metabolitler olarak bilinen diğer düşük molekül ağırlıklı bileşiklere kadar geniş ve çeşitli moleküllere stereospesifik ve regiospesifik transferini katalize eder. Glikosilasyon mekanizması, çeşitli biyolojik işlemlerde meydana gelen ve gliko-çeşitliliğe sahip sayısız bitki sekonder metabolitinin oluşmasına neden olan anahtar modifikasyon aşamasıdır [164]. Krosin, bir apokarotenoid aglikon olan krosetin digentiobiosil esteridir ve bir dizi krosetin glikosil esterleri ile birlikte safranda (*Crocus sativus* stigmaları) sarı bir pigment olarak bulunur. Krosetin glukosil esterleri, suda çözünür bir gıda boyası olarak kullanılmıştır ve farmakolojik yararları nedeniyle nutrasötikler olarak dikkat çekmiştir. Krosin biyosentezine özgü ilk adım, krosetin dialdehit verecek şekilde zeaksantin bölünmesidir. Krosetin dialdehit daha sonra krosetine oksitlenir [165]. Glikosiltransferazlar, düzenleyici metabolitlerin aktivitelerini değiştirerek hücrel metabolizmada çeşitli roller oynarlar. Bitki sekonder metaboliti UDP'ye bağlı glikosiltransferazlar (UGT'ler), bir glikozidik bağ oluşumu ile bir karbonhidratın aktive edilmiş donör şekerden küçük molekül alıcılarına transferini katalize eder. Glikosilasyon, aglikonun stabilitesini ve/veya çözünürlüğünü değiştirir ve hatta diferansiyel ve çoklu konjugasyonlar nedeniyle daha yüksek bir çeşitlilik yaratabilir [166]. Glikosilasyon, bir karbonhidratın aktif bir donör şekerden bir glikozidik bağ oluşumu ile küçük molekül alıcılarına transferini katalize eden UDP karbonhidrat bağımlı glikosiltransferazlar (UGT'ler) ile sağlanır [167]. Bitkilerdeki şeker alıcı aralığının çok çeşitli olduğu düşünülmektedir, ancak bazı substratlar UGT'lerin sadece birkaçı için bilinmektedir ve yapısal kimlik ile substrat spesifikliği arasında sert bir korelasyon eksikliği vardır. Bitkilerde bulunan çok sayıda farklı glikozit göz önüne alındığında, yüksek özgüllük, gerçekte tanımlandığından daha fazla sayıda UGT'nin gerekliliğini gösterecektir [166]. Ekonomik açıdan uygun mahsullerin genetik manipülasyonu, gıdanın (besin içeriği) veya mahsulün kalitesinin iyileştirilmesi

için önemli bir biyoteknolojik uygulamadır. Enzim immobilizasyon tekniğini kullanarak, pummelo'dan bir rekombinant şekilde klonlanmış GT, limon suyunun acı limonoidlerini tatsız glikozitlere dönüştürmüştür. Bitkilerde enzimatik faaliyetlerin izolasyonu, oluşturulması ve GT'lerin biyolojik rollerini içeren teknikler, mahsulün iyileştirilmesi için bir platform görevi görecektir. GT'ler bitki sekonder metabolizmasında savunma yanıtlarından detoksifikasyona ve hormon seviyelerinin düzenlenmesine kadar moleküllerin stabilitesinde artışa kadar çeşitli fonksiyonel roller oynarlar ve geliştirilmiş özelliklere sahip transgenikler oluşturmak için ideal bir aday olurlar [164].

Crocus türlerinde flavonoller genellikle 3'-OH, 7'-OH ve 4'-OH pozisyonlarında glikosile edilir, bu da oldukça karmaşık bir flavonol deseni oluşturur [167]. Flavonol glukozitler, *Crocus sativus* stigmalarında biriken ikinci grup sekonder metabolitleri oluşturur [168]. *Crocus sativus*'taki krosin biyosentezinin, karotenoid bölünme dioksijenaz 2 (CCD2) ile katalize edilen bir zeaksantin parçalanma yolu ve ardından CsGT2 (UGT74AD1) tarafından katalize edilen glukosilasyon reaksiyonları ile devam ettiği ileri sürülmüştür. Kısacası CsUgt enzimi *Crocus sativus* bitkisinde krosin ve pikrokrosin üretiminden sorumludur [60].

β-GS Geni;

Substrat spesifikliği temelinde, β-glukozidazlar, üç sınıfa ayrılmıştır; (1) aril-β-glukozidazlar, (2) gerçek sellobazlar ve (3) ok çeşitli substratlarda aktif olan geniş substrat spesifiklik enzimleri [169]. Selüloz, bitki hücre duvarının en bol bulunan bileşenidir ve Amazon toprakları, nehirleri ve glleri, mikroorganizmalar tarafından bozulmuş bitkilerden elde edilen büyük miktarda organik maddeye sahiptir. Bu şekilde, bu bölgede bulunan mikroorganizmalar, selülozu parçalayabilen ve ayrıca fermente edilebilen şekere (rneğin selülazlar, sellobiyozlar ve β-glukosidazlar) dönüştürebilen enzimler üretmelidir [170]. β-D-Glukozit glukohidrolazları veya β-glukosidazlar, glikozil grubunun oksijen nükleofilleri arasında transferini katalize eden, iyi karakterize edilmiş, biyolojik olarak önemli bir enzim grubunu oluşturur [169]. Pek çok biyolojik süreç ve biyoteknolojik uygulamadaki kilit rolleri nedeniyle, β-glukosidazlar birçok araştırmaya konu olmuştur [171]. β-D-Glukozit glukohidrolazları, indirgenmeyen glikoziti aril, alkil, glkozitler ve oligosakkaritlerden salmak için glikosidik bağları

hidrolize eden enzimler grubudur. Glikozu glikozitlerden salma etkinlikleri nedeniyle, β -glukosidazlar, hayvanlar, böcekler, bitkiler, mantarlar, bakteriler gibi çok çeşitli organizmalara dağılır ve çeşitli işlevleri yerine getirir. Hayvanlarda, β -glukosidazlar, glikolipidlerde ve diyet glikozitlerinin bozulmasında ve hücrel sinyallerde rol oynar. Böcek sindirim sisteminde bulunan β -glukosidazlar, zehirli olmayan glukozinolatları zararlıları önlemek için toksinlere hidrolize eden myrosinazlar olarak adlandırılır. Bitkilerde hücre duvarı oligosakkaritlerinin katabolizmasında rol oynayan β -glukosidazlar, aroma bileşiklerinin aktif olmayan glükozitlerinden salınımı ve fitohormon konjugat aktivasyonu vb. görevleri yaparlar [172]. β -glukosidaz aktivitesi birçok faktörden etkilenir. Selülozun glukozu indirgenmesi sırasında, ürün geri bildirimi nedeniyle artan glukoz konsantrasyonu ile inhibe edilebilir, böylece selüloz bozulma oranını sınırlar. Çok çeşitli araştırmalara göre, β -glukosidazların çoğu glukozu duyarlıdır ve glukozu karşı inhibisyon sabitleri 0.5 mM ile 100 mM arasındadır [173]. *E. coli*'nin vahşi tip suşları β -glukozitleri fermente edemez [174, 175]. Bununla birlikte, salisin veya arbutin gibi β -glukozitler üzerinde büyüeyebilen, bgl olarak bilinen kriptik bir operonun varlığını ortaya çıkaran spontan mutantları ortaya çıkarır. *E. coli*'nin bgl operonu, düzenlenmiş alımı ve aril β -glukozitlerin kullanımı için gerekli tüm fonksiyonları kodlar. Bu operon, ilk üçü (bglG, bglF ve bglB) operonun şifresi çözüldükten sonra aril- β -glukozitlerin düzenlenmiş alımı ve bozunması için gerekli tüm fonksiyonları kodlayan en az dört gen içerir [174]. *In vitro* enzim aktivitesi, CsBGlu12'nin, flavonol β -glukozitler ve viyolo-oligosakkaritlerin hidrolizini katalize ettiğini ortaya koymuştur. Her ne kadar *Crocus*'ta ve bitki aleminde flavonol β -glukozitlerin glikosilasyonunda rol oynayan glukosiltransferazlar karakterize edilmiş olsada, hidrolizlerine katılan β -glukosidazlar araştırılmamıştır. CsBGlu12, flavonoller ve apokarotenoidleri içeren fakat bunlarla sınırlı olmayan, çiçek stıgması, biyosentezin ana bölgesi ve *C. Sativus*'taki birçok ikincil metabolitlerin birikiminde daha yüksek ekspresyon sergilemiştir [176]. Glikosilasyon ve deglikosilasyon, bitkilerin bir dizi sekonder metabolitin biyolojik aktivitesini düzenlemesini sağlayan etkileyici mekanizmalardır [176].

ALDH Geni;

Aldehit dehidrojenaz, çok çeşitli aldehitlerin oksidasyonunu katalize eden bir süper aile enzimleridir [177]. Genellikle, ALDH'ler, kofaktör olarak NAD(P)⁺ kullanılarak

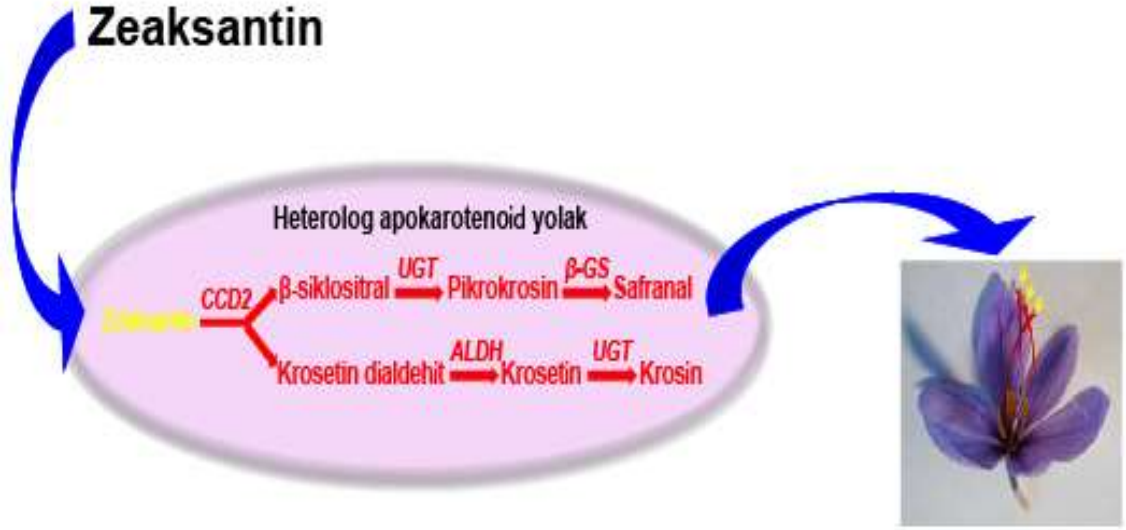
çok çeşitli aldehidlerin oksidasyonunu katalize eden multimerik enzimlerin bir üst ailesidir. 2002 yılı itibariyle yaklaşık 555 ALDH rapor edilmiştir. Özellikle, *E. coli* 17 farklı ALDH izozimine sahiptir ve birçoğu genetik ve protein seviyelerinde yoğun olarak çalışılmıştır [178]. Hücrel metabolizmadaki önemli rolleri, bakterilerden insanlara kadar değişen organizmalarda yoğun bir şekilde incelenmiştir [179].

ALDH süper ailesi, karnitin biyosentezi, glikoliz/glukoneogenez, hücrel redoks dengesi bakımı ve amino asit metabolizması gibi birçok proste yer alan çok sayıda enzinden oluşur. Bitkilerde bulunan ALDH'lerin sayısı, yeşil alg *Volvox carteri*'de bulunan yediden *Populus trichocarpa*'da 26'ya kadardır. Bitki ALDH proteinlerinin sitozol, mitokondri, plastidler (kloroplastlar, kromoplastlar ve lökoplastlar), peroksizomlar ve mikrozomlarda lokalize olduğu bulunmuştur. ALDH ekspresyonu, aldehid birikiminde rol oynayan oksidatif strese neden olan koşullar için, dehidrasyon, su kütlesi kaybı, yüksek tuzluluk, ağır metaller, ısı, oksidatif stres, soğuk, ultraviyole ışıması ve diğerleri gibi abiyotik stresler tarafından değiştirilir ve bitki dokuları ve gelişim aşamaları boyunca düzenlenir [180]. ALDH enzimleri, aldehidleri karşılık gelen karboksilik asitlere dönüştürmek için kofaktör olarak ya Nikotinamid Adenin Dinükleotidi (NAD^+) ya da Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat'ı ($NADP^+$) kullanır [180]. Birçok aldehit gibi, krosetin dialdehit oldukça reaktiftir ve henüz tanımlanamayan ALDH enzimleri ile diasit krosetin'e dönüştürülür. *Crocus sativus* bitkisinde bulunan ALDH enzimi krosetin oluşumundan sorumludur [181]. Krosetin dialdehit, daha sonra glukozile olan krosetin elde etmek için bilinmeyen bir aldehit dehidrojenaz (ALDH) ile ayrıca oksitlenir [180].

1.7. Safran Apokarotenoidlerinin Heterolog Mikrobiyal Biyosentezi

Bu çalışmada güncel bir yaklaşım olarak metabolik mühendisliği, sentetik biyoloji ve sentetik metabolik mühendisliği yaklaşımları kullanılarak zeaksantin öncül maddesi aracılığıyla safran bitkisine biyosentetik bir alternatif geliştirmek için yüksek değerli kimyasallar olan safran apokarotenoidlerinin (krosetin/krosin, pikrokrosin ve safranal) mikrobiyal biyosentezi amaçlanmaktadır (Şekil 1.7). *Crocus sativus* L. bitkisindeki apokarotenoid yolak bir karotenoid olan zeaksantini öncü molekül olarak kullanmaktadır [182]. Çalışmada safran bitkisinin apokarotenoid yolak genleri olan

CCD2 ve UGT, *E. coli* bakterisine aktarılarak heterolog ekspresyon gerçekleştirilmesi amaçlanmaktadır.



Şekil 1.7. *E. coli*'de safran apokarotenoidlerinin üretilmesi için önerilen biyosentetik şema.

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Materyal

RNA izolasyonu ve cDNA sentezi için RNeasy plant mini kit (Qiagen, Katalog No; 74903) ve RT² first strant kit (Qiagen, Katalog No; 330401) kullanılmıştır. Sıvı bakteri kültüründen (bakteri+besiyeri) plazmid DNA izolasyonu için QIAprep Spin Miniprep Kit (Katalog No; 27106) kullanılmıştır. Gibson Assembly metodu için hazırlanması gereken Master karışımında T5 exonuclease, Taq ligase, 5X tampon, NAD⁺ ve polimeraz zincir reaksiyonu için (PCR) kullanılan Phusion High-Fidelity DNA polymerase enzimi, dNTP'ler ise New England Biolabs (NEB)'den temin edilmiştir. Ayrıca PCR reaksiyonlarında kullanılan kesim enzimleri ve burada kullanılan tamponlar NEB'den temin edilmiştir. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonrası jelden izolasyonu için QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen'den (Katalog No; 28706) temin edilmiştir. Safran çiçeklerinin elde edilmesi için kullanılan soğanlar Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. *E. coli* suşlarının ekstraksiyonu için kullanılan çözücüler (Etanol, DMSO, Kloroform) Sigmadan temin edilmiştir. HPLC işleminde kullanılan mobil faz (Asetonitril, Metanol) Merck'den temin edilmiştir. HPLC için C18 kolon (GL Sciences, 5020-07346) kullanılmıştır. Ayrıca HPLC için; safranal standartı TRC (Kanada) (Katalog No; 116-26-7), krosin standartı Sigma (Katalog No; 42553-65-1) ve Carbo synth (Katalog No; 42553-65-1), pikrokrosin standartı Aktin (Katalog No; 138-55-6) markasından temin edilmiştir. Öncül madde olarak verilen zeaksantin pipingRock'dan temin edilmiştir. Besiyeri ortamında çalışmada kullanılan şeker donörü için kullanılan Udp-glc (Katalog No; V7092) ve Udp-gal (Katalog No; V7171) Promega'dan temin edilmiştir. HCl ve MgCl₂ Merck'den, Nülease free water Wisent Kanada'dan temin edilmiştir. Agoroz jelle elektroforezinde kullanılan marker Hibrigen 1 kb DNA Ladder MG-LDR-1000 Hibrigen'den temin edilmiştir. PCR işleminde kullanılan primerler Gen Plaza Biyoteknoloji Merkezi San. ve Tic. Ltd. Şti. (Türkiye) tarafından ticari olarak sentezi yapılmıştır.

2.1.1. Plazmidler

Bu çalışmada gen kaynağı olarak ppVC00154 plazmidi kullanılmıştır. Ayrıca çalışmanın bir diğer aşamasında zeaksantin öncülü olarak pAC-EHER-EBIidiYZ plazmidi [183] kullanılmıştır. Çalışmadaki genlerin (CCD2, UGT, ALDH) elde edilmesi için pTHIO-Dan1 plazmidi kullanılmıştır. Bu plazmid *Giovanni Giuliano ve ark.* (2018) tarafından yapılan bir çalışmadan temin edilmiştir. Bu plazmidler pTHIO-CCD2, pTHIO-UGT74AD1, pTHIO-ALDH31I ve orjinal vektör pTHIO-Dan1 plazmididir [181].

2.1.2. Çözeltiler ve Tamponlar

Gliserol çözeltileri

% 10'luk gliserol çözeltisi hazırlığında; 10 ml gliserol için 90 ml distile su eklenip 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Tampon çözeltileri

1XTAE Tampon Çözeltisi

50xTAE tampon çözeltisi, 1xTAE'ye distile su ile seyreltilip jel elektroforezi için çalışma çözeltisi hazırlanmıştır.

2.1.3. Antibiyotikler

Kloramfenikol

Kloramfenikol, bakteriyostatik aktiviteye sahip *Streptomyces venequellae*'den türetilen, yarı sentetik, geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Kloramfenikol bakteride hücre duvarı boyunca yayılır ve geri dönüşümlü olarak bakteri 50S ribozomal alt ünitesine bağlanır. Bu bağlanma, peptidil transferaz aktivitesine müdahale eder, böylece amino asitlerin büyüyen peptid zincirlerine transferini önler ve peptit bağı oluşumunu bloke eder. Bunun bir sonucu olarak bakteriyel protein sentezi bloke edilir ve bakteriyel hücre çoğalmasını engeller. Çalışmada kullanılan antibiyotik Sigma'dan (C0378) temin edilmiştir. 34 mg/ml stok solüsyonu tartılarak etanol içinde çözdürülüp filtreden geçirilmiştir. Çalışma konsantrasyonu 25 µg/ml'dir. Kloramfenikol dirençli plazmidlerde Cm antibiyotiği kullanılmıştır.

Kanamisin

Kanamisin, aminoglikozid grubu bir antibiyotiktir. Oral, intravenöz ve intramusküler formları vardır ve enfeksiyon tedavisinde geniş bir yelpazede kullanılır. Kanamisin; *Streptomyces kanamyceticus* bakterisinden izole edilmiştir ve sülfatlı formunda kullanılır. Kanamisin stok konsantrasyonu 30 mg/ml'dir. 10 ml hacminde kanamisin hazırlığı için 0.3 g kanamisin tartılıp DNase-RNase free su ile 10 ml'ye tamamlanır ve filtreden geçirilerek steril edilir. Kanamisin antibiyotiği Fisher BioReagents'den (BP906-5) temin edilmiştir.

Spektinomisin

Spektinomisin, bakteriyostatik aktiviteye sahip *Streptomyces spectabilis*'ten türetilmiş bir aminosiklitol aminoglikozit antibiyotiktir. Bu çalışmada stok konsantrasyonu 50 mg/ml olarak hazırlanmıştır. 10 ml hacminde spektinomisin hazırlığı için 500 mg spektinomisin tartılıp, belirlenen hacimde DNase-RNase free su eklenir ve sterilizasyon amacıyla 0.2 µm'lik filtreden geçirilmiştir. Hazırlanan stok -20 °C'de saklanmıştır. Spektinomisin antibiyotiği Fisher BioReagents'den (BP2957-1) temin edilmiştir.

Ampisilin

Ampisilin, yarı sentetik bir penisilin ve bakteriyel hücre zarının iç yüzeyinde transpeptidazları etkisiz hale getirerek bakteriyel hücre duvarı sentezini önleyen bir β-laktam antibiyotiktir. Bu çalışmada Ampisilin stok çözeltisi 100 mg/ml olarak hazırlanmıştır. 5 ml hacminde ampisilin hazırlığı için 0.5 g ampisilin tartılıp, belirlenen hacimde DNase-RNase free su eklenmiştir ve 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Hazırlanan stok -20 °C'de saklanmıştır. Ampisilin antibiyotiği Fisher BioReagents'den (BP1760-25) temin edilmiştir.

2.1.4. *İn Vitro* Ortamda Bakterilerin Büyümesini Sağlayan Besiyerleri

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

Genellikle *E. coli*'den gelen, mikrobiyolojik bir kültür için kullanılan besin bakımından zengin bakteri üreme ortamıdır. 1983 yılında Douglas Hanahan tarafından geliştirilmiştir ve yaygın olarak kullanılan LB ortamının (lizojen suyu) düzeltilmiş bir

versiyonudur. SOB veya SOC ortamında *E. coli*'nin büyümesi, plazmidlerin daha yüksek transformasyon verimleri ile sonuçlanır. SOB besiyeri için BD Difco SOB Medium (244310) kullanılmıştır. Aşağıdaki Tablo 2.1'de SOC besi yeri bileşimleri verilmiştir.

Tablo 2. 1. SOC Bileşimi.

Kimyasalın adı	Miktar
SOB besiyeri	28 g/L
Distile su (dH ₂ O)	1 L
Glikoz çözeltisi (% 20)	20 ml

SOB besiyeri çalışma konsantrasyonu 28 g/l olacak şekilde dH₂O ile seyreltilir ve 121 °C'de 15 dakika sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Steril edilen SOB çözeltisi içerisine % 20'lik glikoz çözeltisi hazırlanıp eklenmiştir. Daha sonra 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek SOC çözeltisi hazırlanmıştır.

LB Broth (Sıvı Besiyeri)

LB Broth sıvı besiyeri bileşimi Tablo 2.2'de verilmiştir. Besiyeri bileşimi hazırlandıktan sonra otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir.

Tablo 2.2. LB Broth besiyeri bileşimi.

Kimyasal Adları	Miktar
Trypton	10 g/l
Maya Ekstraktı	5 g/l
NaCl	10 g/l

LB Agar (Katı Besiyeri)

LB agar besiyeri bileşimi Tablo 2.3' de verilmiştir. Hazırlanan besiyeri 121 °C'de 15 dakikada otoklavda steril edilmiştir.

Tablo 2. 3. LB Agar besiyeri bileşimi.

Kimyasal Adları	Miktar
Maya Ekstraktı	5 g/l
Trypton	10 g/l
NaCl	10 g/l
Agar	15 g/l

NaCl'siz LB Broth Besiyeri

Kompetent hücre hazırlığı için gereken besiyerlerinden biri NaCl içermeyen LB ortamıdır. Aşağıda verilen kimyasallar Becton Tecnical'dan (2020-05-17) temin edilmiştir. Besiyeri bileşimleri Tablo 2.4' de verilmiştir.

Tablo 2. 4. NaCl'siz LB Broth Besiyeri bileşimi.

Kimyasal Adları	Miktar
Trypton	10 g/l
Maya ekstraktı	5 g/l

2.1.5. *E. coli* Suşları

Çalışmada konakçı suş olarak *E. coli* K-12 MG1655 (F-, lambda-, rph-1) ve NEB 10-beta soyları kullanılmıştır.

2.2. Metod

2.2.1. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması

Bu çalışmada kompetent hücre hazırlama küçük değişikliklerle Sambrook ve Russell'a [184] göre yapılmıştır. Serbest DNA'yı içine alabilen bakterilere kompetant bakteri adı verilir. Bazı bakteriler normal büyüme koşullarında oldukça kompetanttır; fakat bazılarının kompetant özellik kazanması için kimyasal veya fiziksel yöntemlerle muamele edilmeleri gerekir.

Deney öncesi yapılması gereken hazırlıklar;

- 150 ml NaCl'siz LB besiyeri
- % 10'luk steril gliserol çözeltisi
- Steril edilmiş distile su
- 1 gece önce ekimi yapılmış bakteri sıvı kültürü

Kompetent hücre hazırlamak için öncelikle konak olarak kullanılacak suşun ekimi yapılmalıdır. Ekim işlemi öncelikle katı besi yerine öze ile çizim yapılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 16 saat 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Katı besiyerine (LB Agar) ekimi yapılan konağın inkübasyondan sonra 5 ml LB Broth besiyerine steril kürdan yardımıyla koloni seçilerek sıvı ekimi yapılmıştır. Sıvı

besiyerine ekimi yapılan konak; 16 saat, 37 °C'de ve 225 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. 16 saatlik inkübasyonu yapılmış sıvı kültürden 500 µl alınarak steril 250 ml'lik erlene alınan 100 ml'lik NaCl'siz LB ortamına inoküle edilmiştir. Ardından 100 ml'lik NaCl'siz LB ve 500 µl'lik kültür karışımı 50/50 ml olarak ayrılarak 250'lik steril erlenlere bölünmüştür. OD₆₀₀ değeri 0.3-0.4 arasında bir değer elde edilene kadar 37 °C ve 225 rpm'de çalkalamalı inkübatörde bekletilmiştir. İstenilen değere ulaşıldıktan sonra erlenlerdeki 50 ml'lik kültürleri steril falkonlara bırakılıp buz içerisinde 20 dakika bekletilmiştir. Bundan sonraki aşamalar buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bekleme süresi sonrasında falkonlar 0 °C-4000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant kısmı döküldükten sonra kalan pelet, 1ml dH₂O ile çözündürülüp üzerine 39 ml dH₂O eklenmiştir. Tekrardan belirtilen şartlarda santrifüj yapılmıştır. Süpernatant dökülüp pelet çözündürüldükten sonra toplamda 20 ml dH₂O eklenmiştir. Santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Süpernatant kısmı dökülüp pelet çözündürüldükten sonra üzerine toplamda 10 ml steril % 10'luk gliserol eklenmiştir. Santrifüj işlemi yapıp süpernatant dökülmüştür ve pelet içerisine 300 µl % 10'luk gliserol eklenmiştir. Pelet çözündürüldükten sonra, 100'er µl olacak şekilde ependorflara paylaştırılmıştır. Hazırlanan kompetent hücreler -80 °C'de saklanmıştır.

2.2.2. Transformasyon

Transformasyon, ekzojen DNA'nın hücre tarafından içeri alınması ve genoma entegre edilmesi olayıdır. Transformasyon sonucunda alınan DNA ile birlikte hücrenin fenotipi de değişir. İzole edilmiş DNA'nın hücreye aktarılması moleküler genetik ve rekombinant DNA çalışmalarında çok büyük önem taşır.

Transformasyon işlemleri için; steril cam tüp, 930 µl SOC besiyeri, 100 µl kompetent hücre ve plazmid DNA veya Gibson Assembly ürünü gereklidir. Çalışmaya başlamadan önce SOC besiyeri ve steril cam tüp 37 °C'de 10 dakika bekletilmiştir. Diğer yandan buz içerisine elektroporator küvet, DNA ve kompetent hücre alınmıştır. SOC besiyeri 930 µl mikropipetle çekilerek elektroşok sonrasında hemen eklenmesi için bekletilmiştir. Plazmid DNA'sı veya Gibson Assembly ürünü, kompetent hücreye eklenerek karıştırılmıştır. Ardından elektroporator küvetine aktarılıp 1.8 kV şartında elektroporatore alınıp güç uygulanmıştır. SOC besiyeri hemen şok uygulanan küvete koyulmuştur. Ters-düz edilerek karıştırılmıştır. Mikropipet yardımıyla transformasyon

ürünü cam tüpe alınmıştır. Daha sonra 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem sırasında antibiyotikli katı besiyeri petrilere dökülmüştür. İnkübasyondan sonra 100 µl alınıp petriye drigalski yardımıyla ekimi yapılmıştır. Kalan ürün 1.5 ml'lik bir ependorfa alınıp 5000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Pelete dokunmadan süpernatant ile birlikte 100 µl içinde bırakılmıştır. Pelet mikropipet yardımıyla çözündürüldükten sonra petriye drigalskiyle ekimi yapılmıştır. Petriler 37 °C'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Petrilerde oluşan kolonilerden seçilip ve kürdan yardımıyla 5 ml'lik antibiyotikli besiyerine koyulmuştur. 37 °C'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kesim reaksiyonu ile doğrulama yapıldıktan sonra kültürlerden stok alınmıştır.

2.2.3. Plazmid DNA İzolasyonu

Plazmid DNA izolasyonu işlemi Qiagen miniprep kit protokolü kullanılarak yapılmıştır. İzolasyon protokolü uygulanmadan önce plazmid DNA'sı sıvı besiyerine ekimi ve 37 °C'de 16 saat inkübasyonu yapılmıştır. Sırasıyla aşağıdaki işlemler yapılmıştır.

- Sıvı kültürden 1300-1400 µl alınıp 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne koyulur ve 9000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapılmıştır. Pelet yoğunluğunu arttırmak için bu işlem tekrarlanmıştır.
- 250 µl Buffer P1 eklenerek pelet çözündürülmüştür. Çözünen pelet içerisine 250 µl Buffer P2 eklenmiştir. Ters-düz edilerek karışması sağlanmıştır.
- 350 µl Buffer N3 eklenip ve ters-düz edilerek karıştırılmıştır. 13 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Qiagen spin kolonlar stantlara yerleştirilip pellete dokunmadan süpernatant kısmı alınıp kolonlara aktarılmıştır. Tekrar santrifüj edilmiştir.
- 500 µl Buffer PB eklenip tekrar santrifüj edilmiştir.
- 750 µl Buffer PE eklenip tekrar santrifüj yapılmıştır. Her santrifüjden sonra kolonun altındaki sıvı dökülmüştür. Bir defa da boş santrifüj yapıp kolonda kalan buffer çöktürülmüştür.
- Kolon 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır ve 50 µl DNase-RNase free su eklenmiştir. Santrifüj yapılmıştır. İzole edilen plazmid DNA'sı -20 °C'ye alınıp saklanmıştır.

2.2.4. RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu Qiagen plant RNA izolasyon kit protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekimi yapılan safran bitkisinden RNA izolasyonu yapılmıştır. İşlemler sırasıyla aşağıda verildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

- 100 mg safran bitkisi sıvı nitrojene alınıp havanda öğütülmüştür. Ezilen safran stigması sıvı nitrojende soğutulmuş bir tüpe alınıp nitrojen buharlaşmaya kadar bekletilmiştir. Bu aşamada bitkinin çözünmesine izin verilmemelidir.
- Tüp içerisine 450 µl Tampon RLT eklenip vortekslenmiştir (Başlamadan önce protokolde verilen önerilere göre β-ME, Buffer RLT içerisine eklenmiştir).
- Lizat 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş spin kolon içerisine aktarılmıştır ve 2 dakika tam hızda santrifüj yapılmıştır. Pelete dokunmadan süpernatant kısmı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır.
- Süpernatant içerisine 200 µl etanol (% 96-100) ilave edilmiştir ve pipetleme yapılarak karıştırılmıştır. Oluşan çözelti tekrardan 2 ml'lik bir spin kolona aktarılmıştır. 10000 rpm'de 15 s santrifüj edilip alttaki sıvı dökülmüştür.
- RNeasy spin kolona 700 µl RW1 eklenip tekrar santrifüj edilmiştir. Altteki çöken sıvı her defasında atılmıştır. Daha sonra 500 µl Buffer RPE eklenip 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Bir defa da içerisindeki solüsyon kalıntılarından ayırabilmek için boş santrifüj yapılmıştır.
- Spin kolon 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. Kolona 50 µl DNase-RNase free su eklenip 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Dipte çöken izole RNA nanodrop cihazında ölçümü yapıldıktan sonra alikotlar halinde -20 °C'de saklanmıştır.

2.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Reaksiyonları

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), tipik olarak heterojen bir DNA dizisi popülasyonu içinde, tanımlanmış hedef DNA dizilerini çoğaltmak için uygulanan hızlı bir yöntemdir. Rutin bir PCR çalışması, standart koşullar ve reaktifler kullanılarak ~% 40-60 arasında bir GC içeriğine sahip tipik olarak ≤ 5 kb olan tek bir DNA hedefinin amplifikasyonunu ifade eder. PCR, moleküler biyoloji çalışmalarında iş akışının ana bileşenidir ve genellikle hızlı, sağlam ve tekrar üretilebilir.

Her PCR deneyi, şablon DNA, primerlerin, nükleotitlerin ve DNA polimerazın varlığını gerektirir. DNA polimeraz, PCR ürününü oluşturmak için ayrı ayrı nükleotitleri birbirine bağlayan anahtar enzimdir. Nükleotitler, DNA'da bulunan dört bazı (adenin, timin, sitozin ve guanin (A, T, C, G)) içerir. Bunlar, elde edilen PCR ürününü oluşturmak için DNA polimeraz tarafından kullanılan yapı taşları olarak işlev görür. Reaksiyondaki primerler, amplifiye edilecek tam DNA ürününü belirtir. Primerler, saptanacak ve çoğaltılacak olan hedef DNA'ya tamamlayıcı olarak tanımlanmış bir sekansa sahip kısa DNA fragmanlarıdır. Bunlar, DNA polimerazın fragmanlar üzerine nükleotitlerin eklenebilmesi için bir uzama noktası görevi görür [185].

PCR, basit bir üç aşamalı çevrim prosesinde, spesifik bir DNA veya RNA sekansının bir milyondan fazla kopyasını kolayca üretebilir. İlk adım, tamamlayıcı şeritleri ayırmak için çift sarmallı DNA'nın denatürasyonunu içerir ve ikinci adım, primerlerin ayrılmış DNA sarmallarına bağlanması için izin verir. Üçüncüsü, primerler, termostabil bir DNA polimerazı tarafından katalizlenen bir uzatma reaksiyonuna katılır ve daha sonra döngü tekrarlanır. PCR reaksiyonu, çoğaltılacak hedef dizinin bir soluna (5') ve bir sağına (3') sahip DNA'nın karşıt ipliklerine tamamlayıcı ve hibridize olan iki primer kullanır. Şablon bir RNA dizisi ise, bir DNA kopyası (cDNA), PCR başlatılmadan önce ilk olarak bir ters transkriptaz kullanılarak sentezlenmelidir. DNA kopyaları veya 'amplikonlar' tipik olarak, yaklaşık 30 saniye ile 5 dakikalık bir devirden birkaç saat sonra üretilir, burada enzimatik uzama önceki döngüdeki DNA miktarını teorik olarak ikiye katlar. Her ne kadar farklı DNA polimerazları PCR uygulamalarında kullanılmış olsada, en uygun olanı termostabil polimerazdır. Taq' Thermits aqualicus'tan izole edilmiştir. Taq polimeraz, DNA'yı denatüre etmek için gereken yüksek sıcaklıklara dayanabilir ve şimdi çeşitli ticari kaynaklardan temin edilebilen programlanabilir termal döngüleyicileri kullanarak tekniğin isteğe bağlı otomasyonuna izin vermiştir [186]. Diğer DNA polimerazlarında olduğu gibi, Taq polimeraz, yalnızca bir primer verildiğinde, DNA sentezi için bir başlangıç noktası sağlayan kısa bir nükleotit sekansı olan DNA'yı yapabilir. Bir PCR reaksiyonunun sonuçları genellikle jel elektroforezi kullanılarak görselleştirilir.

Thermocycler, hem reaksiyon sıcaklığı hem de her bir sıcaklık aşamasının süresi üzerinde sıkı kontrol sağlayarak, verimli amplifikasyon sağlar. Tipik bir PCR sırasında,

denatürasyon döngüleri, primerlerin bağlanması ve uzatılması, hedef dizinin üssel amplifikasyonunu sağlamak için tekrarlanır. Denatürasyon, örnek DNA'nın denatürasyonuna neden olmak, hidrojen bağlarını ve DNA iplikçilerini bir arada tutan bazların etkileşimlerini bozmak için tipik olarak 94-98 °C arasında ısıtmayı içerir. Dna iplikleri ayrıldıktan sonra, primerlerin şablonun tamamlayıcı bölgelerine baz çifti eşlemesini sağlamak için sıcaklık eşleme sıcaklığına düşürülür. Eşleme sıcaklığı (tipik olarak 48-72 °C arasında), primerlerin erime sıcaklığı (T_m) ile ilgilidir ve PCR'de kullanılan her primer çifti için belirlenmelidir. Uzatma basamağı sırasında (tipik olarak 68-72 °C), polimeraz, yeni oluşan bir DNA ipliğini oluşturmak için primerlere uzanır. Bu işlem birçok kez tekrarlanır (tipik olarak 25-35 döngü), ve her yeni iplikçi ayrıca primerlerin bir kalıbı olarak da görev yapabileceği için ilgilenilen bölge katlanarak büyütülür. PCR'nin son basamağı genellikle daha uzun, tek bir sıcaklık basamağıdır (genellikle 68-72 °C'de 5-10 dak.), kısmi kopyaların tamamlanmasına ve tüm çoğaltma işlemleriyle yeni oluşan DNA'dan ayrılmasına izin verir. PCR tamamlandığında, thermocycler, PCR tüplerinin cihazdan çıkarılabileceği zamana kadar ürün bütünlüğünü korumak için 4 °C -10 °C'ye ayarlanır.

2.2.6. Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile DNA'nın Kesilmesi

Restriksiyon enzimi veya restriksiyon endonükleazı çift zincirli DNA moleküllerindeki belli nükleotit dizilerini tanıyan ve her iki zinciri birlikte kesen bir enzim türüdür. Bu özel enzimler, bakteri ve arkelerde bulunurlar ve virüslere karşı bir savunma mekanizmasına aittirler. RE enzimleri, kısa DNA dizilerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilimlere yakın bölgelerden veya bu dizilimler içindeki spesifik bölgelerden DNA'yı kesen yapılardır [187]. İsimlendirmede önce enzimin elde edildiği bakteri cinsinin ilk harfi, daha sonra bakteri türünün ilk iki harfi ve son olarak da soya ait bir harf ile ilk izolasyondan başlayarak Romen rakamı ile enzimin izolasyon sırası belirtilir.

Tek bir enzimle yapılan kesim reaksiyonu yukarıdaki Tablo 2.5'de verildiği gibidir. Plazmid kesimi birden fazla enzim ile yapılabilir.

In vitro deneylerde yapılan rutin kesim (digest) reaksiyonu;

Tablo 2.5. Kesim reaksiyonu bileşimi.

Malzeme	Miktar (µl)
DNA	X
Buffer	2,5
Enzim	1

Yukarıda verilen DNA, buffer ve enzim karışımı PCR tüplerine koyulduktan sonra 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakılıp kesim reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra kesim ürünü % 1’lik agaroz jel elektroforeziyle yürütülüp kesim reaksiyonu görselleştirilmiştir.

2.2.7. Gibson Assembly Metodu

Gibson Assembly metodu, çoklu DNA fragmanlarının tek bir izotermal reaksiyonda birleştirilmesine izin veren moleküler klonlama metodudur. Gibson reaksiyonunun tamamı küçük manipülasyonlarla birkaç bileşen gerektirir. Gereken üç enzim aktivitesi şunlardır: ekzonükleaz, DNA polimeraz ve DNA ligaz enzimleridir.

- Ekzonükleaz DNA’yı 5’ ucundan geri okuma yapar, bu durum polimeraz aktivitesini inhibe etmez ve reaksiyonun tek bir işlemde gerçekleşmesini sağlar.
- DNA polimeraz herhangi bir boşluğu doldurmak için gereken nükleotitleri içerir.
- DNA ligaz kovalent olarak bitişik segmentlerin DNA’sına bağlanır, böylece DNA'daki herhangi bir çentik çıkarılır.

Elde edilen ürün, bir araya getirilen farklı DNA parçalarıdır. Doğrusal veya kapalı dairesel moleküller monte edilebilir [188]. Gibson master mix içeriği Tablo 2.6’da gösterilmiştir.

Tablo 2.6. Gibson Master Mix Bileşimi.

Kimyasal Adları	Çalışma Konsantrasyonu
5X ISO Tampon	100 µl
T5 Ekzonükleaz (10 U/µl)	0.2 µl
Phusion Polymerase (2U/µl)	6.25 µl
Tag Ligaz (40U/µl)	50 µl
dH ₂ O	218.55 µl
Toplam Hacim	375 µl

Yukarıdaki tabloda verilen gibson karışımı 15 µl olarak PCR tüplerine paylaştırılarak -20 °C’de saklanmıştır. Deneysel çalışmada yapılan Gibson Assembly reaksiyonu aşağıda belirtildiği gibidir.

- Reaksiyon başlatılmadan önce çalışma buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.
- 15 µl Gibson master mix ve fragmentler buz üzerine alınmıştır. Daha sonra fragmentlerden toplamda 5 µl alınarak Gibson karışımına eklenmiştir. Toplamda 20 µl reaksiyon hacmiyle 50 °C’de 1 saat Thermocycle cihazında inkübasyonu gerçekleştirilmiştir.
- İnkübasyon sonrasında Gibson ürünü alınarak kompetent hücreye transformasyonu yapılmıştır. Antibiyotikli besiyerine ekim yapılmıştır. 16 saat 37 °C’de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Restriksiyon enzimleriyle Gibson reaksiyonunun doğrulaması yapılmıştır.

2.2.8. cDNA Sentezi

Tamamlayıcı DNA, Komplementer DNA veya cDNA, genetikte, ters transkriptaz enzimiyle katalizlenen bir reaksiyonda şablon olarak kullanılan olgun bir mRNA’dan sentezlenen DNA paçasına verilen addır. Bitkiden cDNA sentezi Qiagen First Strand Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kit protokolü uygulanarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

RNA örneği için genomik DNA eliminasyon mix hazırlanmıştır. Karışım bileşenleri aşağıdaki Tablo 2.7’de verilmiştir.

Tablo 2.7. DNA Eliminasyon Mix Bileşimi.

Bileşen	Miktar
RNA	25 ng-5 ng
Buffer GE	2 µl
Rnase free water	X
Toplam Hacim	10 µl

Genomik eliminasyon mix 42 °C’de 5 dakika inkübe edilmiştir. Ardından hemen buz içerisine alınmıştır. Daha sonra Reverse-transkripsiyon mix hazırlanmıştır. Reverse transkripsiyon mix aşağıdaki Tablo 2.8’de verildiği gibi hazırlanmıştır.

Tablo 2.8. Reverse Transkripsiyon Mix Bileşimi.

Bileşen	Miktar
5X Buffer BC3	4 µl
Kontrol P2	1 µl
Re3 Reverse-Transkriptaz mix	2 µl
Rnase free water	3 µl
Toplam Hacim	10 µl

Yukarıdaki tabloda verilen karışım 10 µl hacmindeki genomik DNA eliminasyon karışımına eklenmiştir. Pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. Ardından 42 °C’de 15 dakika ve 95 °C’de 5 dakika inkübe edilerek reaksiyon tamamlanmıştır. İnkübasyondan sonra 91 µl Rnase free water eklenmiştir ve normal bir PCR protokolü uygulanması için buzda bekletilmiştir. Bu aşamada cDNA sentez ürünü -20 °C’de bekletilebilir.

2.2.9. Agaroz Jel Elektroforezi

Jel elektroforezi, saflaştırılmış nükleik asit ve proteinlerin molekül ağırlığı, miktarının saptanmasında yaygın olarak kullanılan moleküler bir inceleme yöntemidir. Agaroz jel elektroforezi DNA moleküllerinin büyüklüğüne göre ayrımı, tanımlanması ve saflaştırılması için kullanılan standart bir yöntemdir. DNA’nın jeldeki konumunu düşük konsantrasyonlarda floresan veren etidiyum bromür ile boyamak mümkündür.

Agaroz jel elektroforezi için kullanılan bileşenler;

- Jel elektroforez sistemi (elektroforez tankı, jel dökme tepsisi, tarak, güç kaynağı)
- Yürütme boyası olarak Etidiyum Bromür
- Agaroz
- 1X TAE Tamponu
- Marker
- Gel Loading dye blue

% 1’lik 100 ml agaroz jel hazırlamak için; 250 ml’lik bir vida kapaklı şişeye 1 gr agaroz tartılıp şişeye eklenir ve üzerine 100 ml Tris asetat EDTA (TAE) tamponu eklenmiştir. Mikrodalga yardımıyla ısı etkisiyle agaroz çözeltisi çözünene kadar bekletilmiştir. Daha sonra 50 °C’ye kadar soğutulup 2.5 µl Etidiyum Bromür eklenmiştir ve jel kuyucukların oluşması için jel dökme tepsisine dökülmüştür. Polimerizasyon için

30 dakika bekletilmiştir. Ardından taraklar çıkarılarak jel tepsisi, elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tank içerisine jelin üstünü geçebilecek kadar TAE tamponu eklenerek iyonik geçiş ortamını ve pH dengesi sağlanmaya çalışılmıştır. DNA örneklerine 3 µl gel loading dye blue boyası eklenmiştir. Marker ve DNA örnekleri ayrı ayrı kuyucuklara yüklenip gerekli zaman ve voltajda koşturulmuştur. Elektroforez sonrasında DNA örnekleri jel görüntüleme sisteminde görselleştirilmiştir.

2.2.10. PCR Ürünlerinin Jelden Saflaştırılması

Agaroz jel elektroforezinin tamamlanmasının ardından saflaştırılmak istenen DNA örneği QIAquick Gel Extraction Kit protokolü uygulanarak saflaştırma işlemi tamamlanmıştır.

Agaroz jel üzerindeki DNA örneği elektriksel güç yardımıyla yürütüldükten sonra jel, UV transilatör üzerine alınır ve bant görüldükten sonra steril bir bistüri yardımıyla bantın bulunduğu bölge bistüri ile kesilip steril darası alınan 2 ml'lik tüpe eklenmiştir.

- Kesilen jelin tartım işlemi yapıldıktan sonra miktarın 3 katı kadar Buffer QG eklenip 50 °C'de 2-3 dakikada bir vorteksenerek 10 dakika su banyosunda inkübasyona tabi tutulmuştur ve jelin erimesi sağlanmıştır.
- Jel eridikten sonra üzerine ağırlığı kadar izopropanol eklenip ve ters-düz yapılarak karışması sağlanmıştır.
- Tüpün içerisinde bulunan karışım Quick spin kolona aktarılıp 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Bu aşama tüpdeki numunenin tamamı bitene kadar aynı kolonda tekrardan eklenerek DNA'nın spin kolonda birikmesi sağlanmıştır.
- 0.5 ml Buffer QG spin kolona tekrar eklenmiştir. Bu adım kalan agarozu uzaklaştırmak için tavsiye edilmiştir.
- 750 µl tampon PE eklenip 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır ve bir defa daha içerisinde fazladan olan etanolü uzaklaştırmak için santrifüj yapılmıştır.
- Spin kolon altına çöken numune her santrifüj işleminden sonra dökülmüştür.
- Spin kolon 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak tüpün merkezinden 50 µl dH₂O eklenmiştir ve 1 dakika bekletilip tekrar santrifüj yapılmıştır. Saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan DNA örneği -20 °C'de saklanmıştır.

2.2.11. Stok Bakteri Kùltürlerinin Hazırlanması

Laboratuvarı bir sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere stok kùltürlerin hazırlanması gerekmektedir. Kùltürleri bozulmadan saklayabilmek için steril edilmiş ve saf gliserol kullanılmaktadır. Stok hazırlığı için; 700 µl gliserol ve 300 µl sıvı bakteri kùltürü alınarak steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılır ve vorteks yapılarak karışması sağlanır. Stok kùltürler -80 °C’de uzun süre saklanabilmektedir.

2.2.12. Sentetik Gen Devresinin Plazmid Haritasının Tasarlanması

Plazmid haritalarının tasarlanması için Vector NTI programı kullanılmıştır. ppVC00154 plazmidi tasarımı kaynak olarak kullanılarak pVC-CCD2, pVC-UGT ve pVC-CCD-UGT plazmidleri tasarlanmıştır. CCD2, UGT ve ALDH genleri için pTHIO-CCD2, pTHIO-UGT74AD1 ve pTHIO-ALDH3I1 plazmidleri esas alınarak tasarımları yapılmıştır.

2.2.13. Primer Tasarımı

Çalışmada kullanılan primerler Sentegen A.ř’den ticari olarak sentezletilmiştir. Dizilerin tasarımı Vector NTI programı yardımıyla tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler aşağıdaki Tablo 2.9 ve Tablo 2.10’da verilmiştir.

Tablo 2.9. Genler ve primer dizileri.

Primer isimleri	Nùkleotit Dizileri (5’-3’)	Primer Team (°C)	Primer GC % oranı
MF596166.1-F	atggagcagaaagatgtgaa	48	40
MF596166.1-R	tcattgcaacactgatgtatg	49	36
AY262037.1-F	atgttgacggcaacaaatg	48	40
AY262037.1-R	ttaactaaggaaatttggagtc	49	29
KJ541749.1-F	atggcaataaggaggaggca	52	48
KJ541749.1-R	tcatgtctctgcttggtgct	52	50
MF596165.1-F	atggccttcgatggagagaaag	55	50
MF596165.1-R	tcaagatttgagaagccaaag	51	41
KX790358.1-F	atgggggttcgctacatctctc	54	52
KX790358.1-R	ctattcttcagaaattcttaaacc	50	27

Tablo 2.10. Gibson assembly metodu için tasarlanan primerler.

Primer isimleri	Nükleotit Dizileri (5'-3')	Primer Team (°C)	Primer GC % oranı
Thioredoxin-F	ttaaaggaggagaaaggtaccctccatacccggtttttgggctag	68	44
CCD2-UGT-R	tagatcagctaattaagctttcaatgggtgatgggtgatgaccg	66	40
p154-F	atcatcaccatcaccattgaaagcttaattagctgatctagacgc	66	40
p154-R	ccaaaaaacgggtatggagggtaccttctcctcttaataat	66	40
UGT-F	cattattatcatgacattaaattgtcctactcaggagagcggttc	65	36
UGT-R	gtactaatcggcttcaacgttatacagttgacttgacagctag	67	42
pVC-CCD2-F	tgtaagtacaactgtataacgttgagccgattagtacaatag	65	38
pVC-CCD2-R	ctctcctgagtaggacaaatttaattgcatgataataatggtttcttag	65	33

2.2.14. HPLC Analizi

Safran metabolitlerinin ekstraksiyonu BHT ekli aseton ile yapılmıştır. PTFE (politetrafloroetilen) 0.45 µm filtereden numuneler geçirilerek steril edilmiştir. Ardından HPLC cihazına enjekte edilmiştir. HPLC analizi için 20 µl enjeksiyon hacmi kullanılmıştır. 0.8 ml/dk akış hızında asetonitril ve ultra saf su kullanılarak (% 90-10) işlem gerçekleştirilmiştir. Safran metabolitlerinin analizi için InertSustain C18 (5 µm, 4.6x150 mm) kolon kullanılmıştır. HPLC çalışma şartları Tablo 2.11’ de gösterilmiştir.

Tablo 2.11. HPLC Çalışma Şartları.

Marka	Shimadzu
Model	LC-20AT
Dedektör	SPD-20A, UV-Vis
Mobil Faz	Asetonitril-Ultra saf su (90:10 v/v)
Dedeksiyon	250 nm, 310 nm, 440 nm
Sıcaklık	30 °C
Akış Hızı	0.8 ml/dk
Enjeksiyon Hacmi	20 µl

2.2.15. HPLC Analizi İçin Standart Numune Hazırlama

Safran metabolitlerinin HPLC cihazında analizi için pikrokrosin, krosin ve safranal standartları hazırlanmıştır. Her bir standart için ara seyreltmeler yapılarak 2, 5, 10 ve 15

ppm standart hazırlanmıştır. Safranal standartı için % 100 metanol ve krosin standartları için çözücü olarak % 50 ACN ve % 50 deiyonize ultra saf su kullanılmıştır. Pikrokrosin standartı için metanol (% 100) kullanılmıştır. Krosin stok standart çözeltisi 20 ppm, safranal stok çözeltisi 40 ppm ve pikrokrosin stok çözeltisi 100 ppm olarak hazırlanmıştır.

2.2.16. Safran Metabolitleri İçin Başlangıç Kültürlerinin Hazırlanması

Tasarımı yapılan pVC-CCD-UGT plazmidi için öncül olarak zeaksantin biriktiren pAC-EHER-EBli diYZ plazmidi kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemine başlamadan önce bu plazmidlerin *E. coli* MG1655 suşu kullanılarak kotransformasyonu yapılmıştır. Kanamisin ve kloramfenikol antibiyotikli besiyerine ekimi yapılmıştır. 1 gecelik (16 saat 37 °C) inkübasyondan sonra koloni seçilerek her iki antibiyotiğinde bulunduğu sıvı besiyerine ekimi yapılmıştır. Başlangıç kültürlerin 1 gecelik inkübasyonundan sonra OD₆₀₀ ölçümü yapılmıştır. 50 ml'lik besiyerinde 0.1 kültür olacak şekilde hesaplamalar yapılarak inkübasyonları gerçekleştirilmiştir.

2.2.17. Safran Metabolitleri İçin Ekstraksiyon Metodu

Safran metabolitleri için uygulanan ekstraksiyon metodu aşağıda verildiği gibidir.

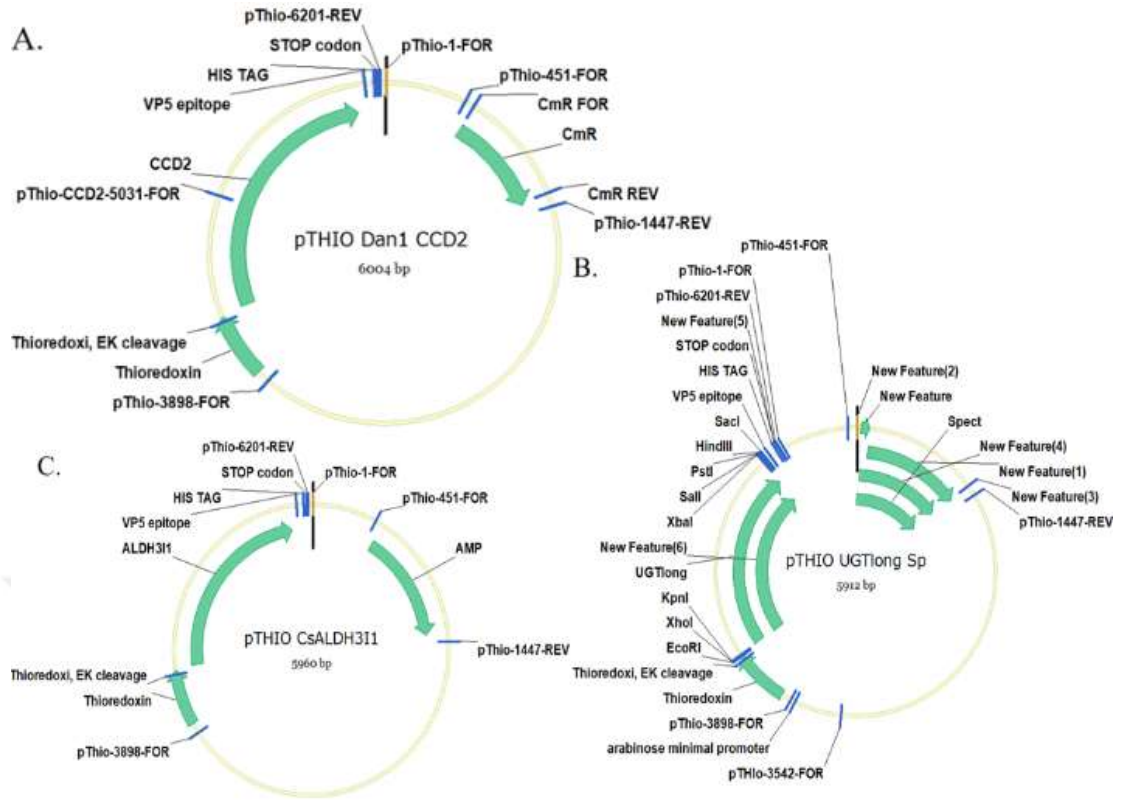
- Ekimi yapılan sıvı kültürden 1 ml alınıp steril bir ependorf tüpe aktarılır.
- Kültür içerisine 100 µl metanol eklenip 5 dk buz üzerinde inkübasyonu sağlanır.
- Sıvı kültüre 100 µl Tris-HCl eklenir ve buz üzerinde 10 dakika inkübasyonu sağlanır.
- İnkübasyondan sonra kültür 5000 rpm, 5 dk ve 4 °C'de santrifüj edilir.
- Ardından pelet 400 µl Aseton (BHT eklenmiştir) yardımıyla çözdürülmüştür. 10 dk buz üzerinde inkübasyonu sağlanmıştır. Daha sonra tekrar belirtilen şartlarda santrifüj edilip süpernatant 0.45 µl çapındaki filtreden geçirilerek viallere aktarılmıştır. Ekstraksiyon ürünü enjeksiyon yapılana kadar -20 °C'de bekletilmiştir.

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada safran metabolitlerinin biyosentezi için apokarotenoid yolaktaki genlerin elde edilmesi ve plazmidlerinin tasarımı yapılmıştır. Safran apokarotenoid yolakta bulunan CCD2 ve UGT genleri için plazmidler inşa edilerek safran metabolitlerinin biyosentez aşamaları HPLC cihazı yardımıyla incelenmiştir. CCD2, UGT genleri için pVC-CCD2, pVC-UGT, pVC-CCD-UGT plazmidleri inşa edilmiştir. Tasarımlarda ppVC00154 plazmidi gen kaynağı olarak kullanılmıştır. Ayrıca β -GS geni için bitki kaynak olarak kullanılıp cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir ve ayrıca bitkinin ekimi yapılarak gelişim aşamaları takip edilmiştir. Çalışmada öncül olarak zeaksantin biriktiren pAC-EHER-EBliDiYZ plazmidi kullanılmıştır. İnşa edilen plazmidler için *E. coli* MG1655 ve *E. coli* NEB 10-beta soyları kullanılarak elektroporasyon ile aktarımı yapılmıştır. Safran metabolit üretiminin incelenebilmesi için suşların başlangıç kültürleri OD₆₀₀ değerleri 0.1'den başlatılarak kültürler 37 °C-225 rpm ve 96 saat inkübasyona bırakılmıştır. Analizler HPLC sistemi kullanılarak yapılmıştır. Ekstraksiyon aseton kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1. pTHIO-CCD2, pTHIO-UGT74AD1 ve pTHIO-ALDH3I1 Plazmidlerinin PCR ile Doğrulanması

pTHIO-CCD2, pTHIO-UGT74AD1 ve pTHIO-ALDH3I1 plazmidleri MTA yoluyla temin edilmiştir [183]. Plazmid haritaları Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Bu plazmidlerin beklenen büyüklüklerinin belirlenebilmesi için Tablo 2.9'da primerler ile doğrulama yapılmıştır. Beklenen büyüklükler 1689, 1574, 1368 bp uzunluğundaki fragmentlerdir. Doğrulama işlemi agaroz jel elektroforezi uygulanarak jel görüntüleme sistemi yardımıyla Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



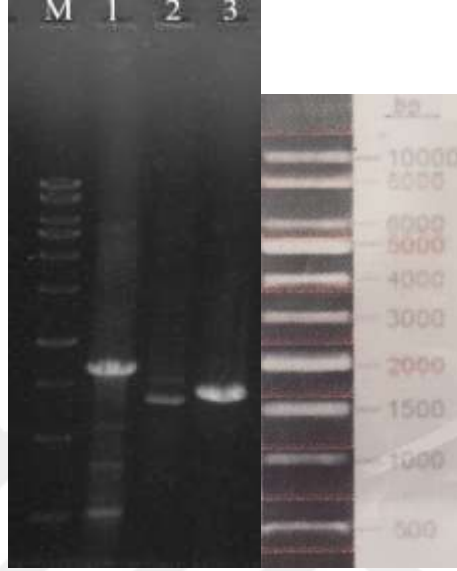
Şekil 3.1. pTHIO-CCD2, pTHIO-UGT74AD1 ve pTHIO-ALDH3I1 plazmidlerinin haritaları.

Yukarıdaki Şekil 3.1’de verilen plazmid haritaları pVC-CCD2, pVC-UGT ve pVC-CCD-UGT plazmid tasarımları yapılırken faydalanılmıştır.

Tablo 3.1. pTHIO-CCD2, pTHIO-UGT74AD1 ve pTHIO-ALDH3I1 plazmidinin doğrulaması için kullanılacak fragmentlerin elde edilmesi için PCR şartları.

1. Plazmid		2. Plazmid		3. Plazmid	
PCR Bileşenleri	Miktar (µl)	PCR Bileşenleri	Miktar (µl)	PCR Bileşenleri	Miktar (µl)
dH ₂ O	33.3	dH ₂ O	33	dH ₂ O	33.3
5XHF Buffer	10	5XHF Buffer	10	5XHF Buffer	10
dNTPs	1	dNTPs	1	dNTPs	1
KJ541749.1-F	2.5	MF596166.1-F	2.5	MF596165.1-F	2.5
KJ541749.1-R	2.5	MF596166.1-R	2.5	MF596165.1-R	2.5
pTHIO-CCD2	0,2	pTHIO-UGT74AD1	0.5	pTHIO-ALDH3I1	0.2
Phusion DNA Polimeraz	0.5	Phusion DNA Polimeraz	0.5	Phusion DNA Polimeraz	0.5
TOPLAM	50	TOPLAM	50	TOPLAM	50
PCR Şartları		PCR Şartları		PCR Şartları	
98 °C’de 30 sn	1 Döngü	98°C’de 30 sn	1 Döngü	98°C’de 30 sn	1 Döngü
98 °C’de 10 sn	35 Döngü	98°C’de 10 sn	35 Döngü	98°C’de 10 sn	35 Döngü
48 °C’de 20 sn		45°C’de 20 sn		51°C’de 20 sn	
72 °C’de 45 sn		72°C’de 45 sn		72°C’de 45 sn	
72 °C’de 5 dk	1 Döngü	72 °C’de 5 dk	1 Döngü	72 °C’de 5 dk	1 Döngü

Tablo 3.1’de plazmidlerinin doğrulanması için uygulanan PCR reaksiyonu şartları verilmiştir. Tabloda verilen plazmidlerinin doğrulanmasında DNA konsantrasyonu en fazla 50 ng/μl olacak şekilde hesaplanmıştır. Tm sıcaklığı temin edilen primerlere göre ayarlanmıştır.



Şekil 3.2. pTHIO-CsCCD2 (Cm), pTHIO-CsUGT74AD1 (Spect), pTHIO-CsALDH3I1 (Amp) plazmidinin PCR ile doğrulanması. Beklenen bant büyüklükleri: 1689 bp (1), 1380 bp (2) ve 1449 bp (3). (M: Markır: Hibrigen 1 kb Ladder MG-LDR-1000).

Yukarıda verilen Şekil 3.2’de pTHIO-CsCCD2 (Cm), pTHIO-CsUGT74AD1 (Spect), pTHIO-CsALDH3I1 (Amp) plazmidlerinin Tablo 3.1’de verilen PCR reaksiyonu şartları uygulanarak plazmidlerin beklenen uzunlukları kontrol edilmiştir. Markır yardımıyla okuma yapılarak sırasıyla 1689 bp, 1380 bp ve 1449 bp uzunluğundaki bant görülerek beklenen büyüklükler belirlenmiştir.

3.2. pVC-CCD2, pVC-UGT ve pVC-CCD-UGT Plazmidinin İnşası

3.2.1. pVC-CCD2 Plazmidinin İnşa Edilmesi

Safran metabolitlerinin sentezinde zeaksantin parçalanmasını sağlayan CCD2 geni için pVC-CCD2 plazmidi tasarlanmıştır. Bu plazmidin tasarımı Vector NTI programı kullanılmıştır. Plazmid tasarımı için MTA yoluyla elde edilen pTHIO-Dan1-CCD2 plazmidi esas alınmıştır ve tasarımı kaynak olarak ppVC00154 plazmidi

kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan ppVC00154 plazmid haritası Şekil 3.7’de verilmiştir.

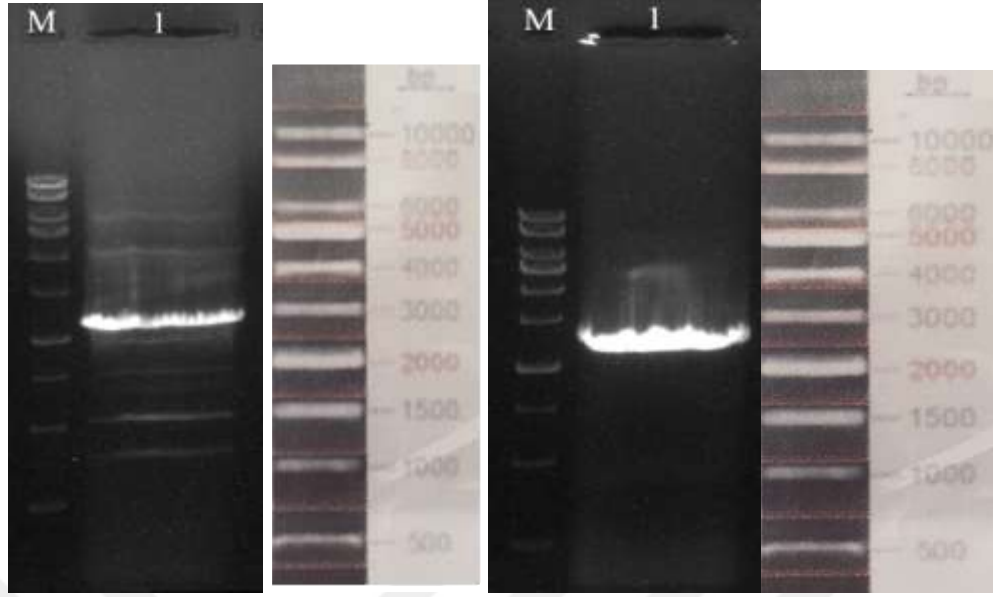
Tablo 3.2. pVC-CCD2 plazmidinin inşa edilmesi için fragmentlerin elde edilmesi.

Fragment No	Primer Çiftleri	PCR için DNA kaynağı	Beklenen bant büyüklüğü
1	Thioredoxin-F ve CCD2-UGT-R	pTHIO-Dan1-CCD2	2314 bp
2	p154-F ve p154-R	ppVC00154	2415 bp

Plazmid tasarımı gerekliliği fragmentler Tablo 3.2’de verilen primerler kullanılarak elde edilmiştir. Çalışmada yapılan PCR reaksiyonu şartları Tablo 3.3’de verilmiştir.

Tablo 3.3. pVC-CCD2 plazmidinin inşası için kullanılacak fragmentlerin elde edilmesi için PCR şartları.

1. Fragment		2. Fragment	
PCR Bileşenleri	Miktar (µl)	PCR Bileşenleri	Miktar (µl)
dH ₂ O	33,2	dH ₂ O	33,3
5XHF Buffer	10	5XHF Buffer	10
dNTPs	1	dNTPs	1
Forward primer	2.5	Forward primer	2.5
Reverse primer	2.5	Reverse primer	2.5
pTHIO-Dan1-CCD2	0.3	ppVC00154	0.2
Phusion DNA Polimeraz	0.5	Phusion DNA Polimeraz	0.5
TOPLAM	50	TOPLAM	50
PCR Şartları		PCR Şartları	
98 °C’de 30 sn	1 Döngü	98°C’de 30 sn	1 Döngü
98 °C’de 10 sn 64 °C’de 20 sn 72 °C’de 45 sn	35 Döngü	98°C’de 10 sn 62°C’de 20 sn 72°C’de 45 sn	35 Döngü
72 °C’de 5 dk	1 Döngü	72 °C’de 5 dk	1 Döngü



A.

B.

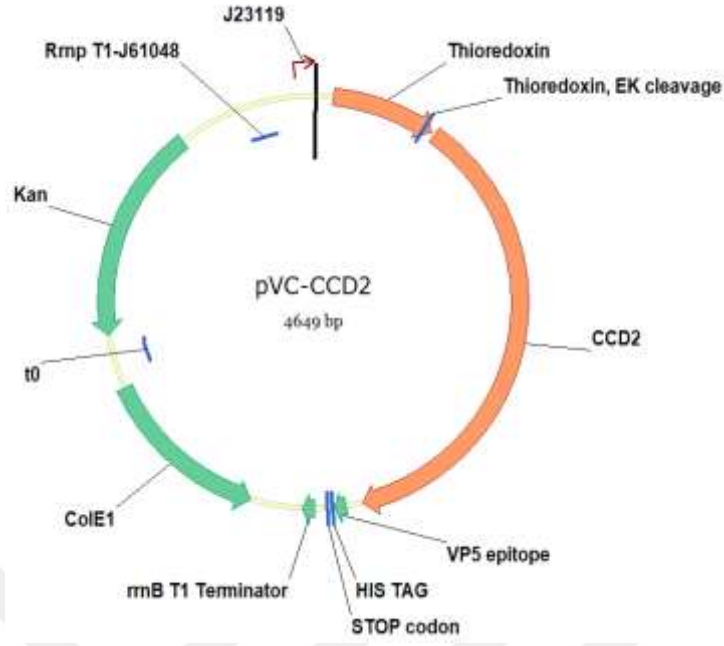
Şekil 3.3. (A) pVC-CCD2 plazmidinin elde edilmesi için CCD2 fragmentinin PCR ile doğrulanması. Beklenen bant büyüklükleri: 2314 bp (M: Markır: Hibrigen 1 kb Ladder MG-LDR-1000). (B) pVC-UGT ve pVC-CCD2 plazmidlerinin elde edilmesi için ppVC00154 fragmentinin PCR ile doğrulanması. Beklenen bant büyüklükleri: 2415 bp (M: Markır: Hibrigen 1 kb Ladder MG-LDR-1000).

Tasarımı yapılan pVC-CCD2 plazmidi inşası için gerekli primerler kullanılarak (Tablo 2.10) ve PCR uygulanarak agaroz jel elektroforezi üzerinde yürütülmüştür. Beklenen uzunluk jel görüntüleme sistemiyle Şekil 3.3’de gösterilmiştir.

Tablo 3.4. pVC-CCD2 plazmidinin inşası için Gibson Assembly metodu reaksiyon şartları.

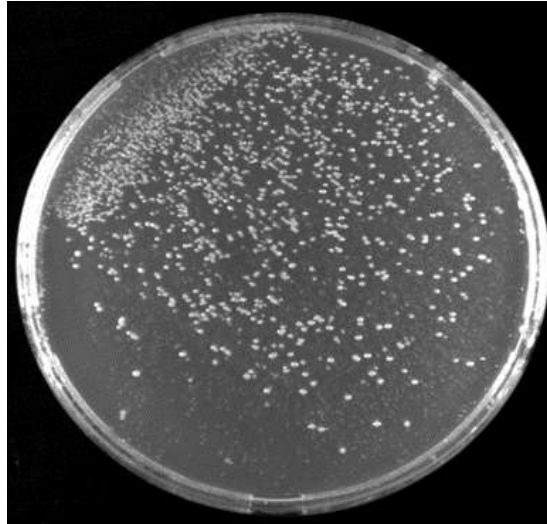
Gibson Bileşenleri	Miktar (µl)
Fragment 1 (208.614 ng/µl)	1
Fragment 2 (87.112 ng/µl)	4
Gibson enzim karışımı	15
TOPLAM	20
Gibson Şartları	
50 °C’de 1 saat	

Yukarıda verilen tabloda elde edilen fragmentler kullanılarak pVC-CCD2 plazmidini elde etmek için Gibson Assembly reaksiyonu kurulmuştur ve pVC-CCD2 plazmidi inşa edilmiştir. Plazmid haritası Şekil 3.4’de gösterilmiştir.



Şekil 3.4. pVC-CCD2 plazmid haritası.

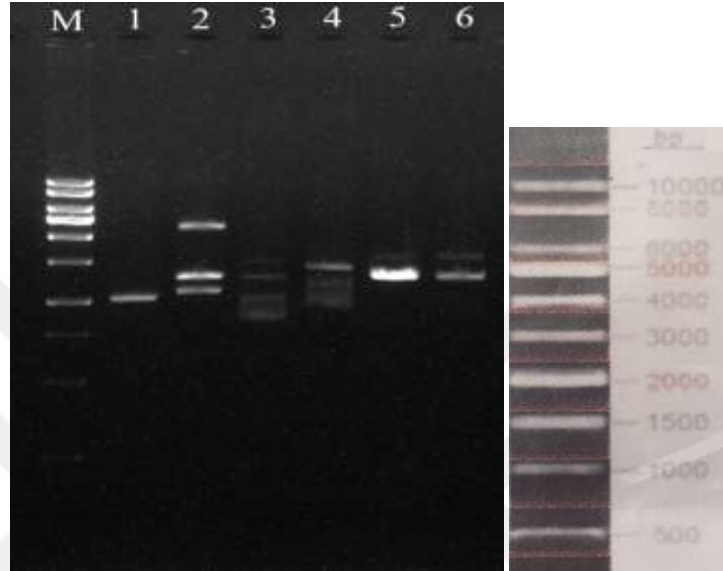
Gibson Assembly reaksiyonu uygulandıktan sonra gibson ürünü *E. coli* NEB 10-beta hücrelerine transformasyon metodu ile aktarılmıştır. Kanamisin antibiyotikli besiyerine ekimi yapılmıştır. Transforme edilen plazmidin petri görüntüsü Şekil 3.5’de gösterilmiştir.



Şekil 3.5. pVC-CCD2 plazmidinin transformasyon sonuçları.

Plazmid doğrulaması, digest (plazmid kesimi) reaksiyonu yapılarak incelenmiştir. pVC-CCD2 plazmidinin doğrulama reaksiyonu için tasarlanan plazmid haritasına

bakılarak kesim enzimi belirlenmiştir. Plazmid haritası Şekil 3.4’de verilmiştir. Kesim reaksiyonu SalI-HF ve AatII restriksiyon enzimleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Beklenen büyüklükler 2151 ve 2498 bp olarak belirlenmiştir ve reaksiyon sonunda kesim ürünleri % 1’lik agaroz jel üzerinde yürütülerek beklenen büyüklükler kontrol edilmiştir.



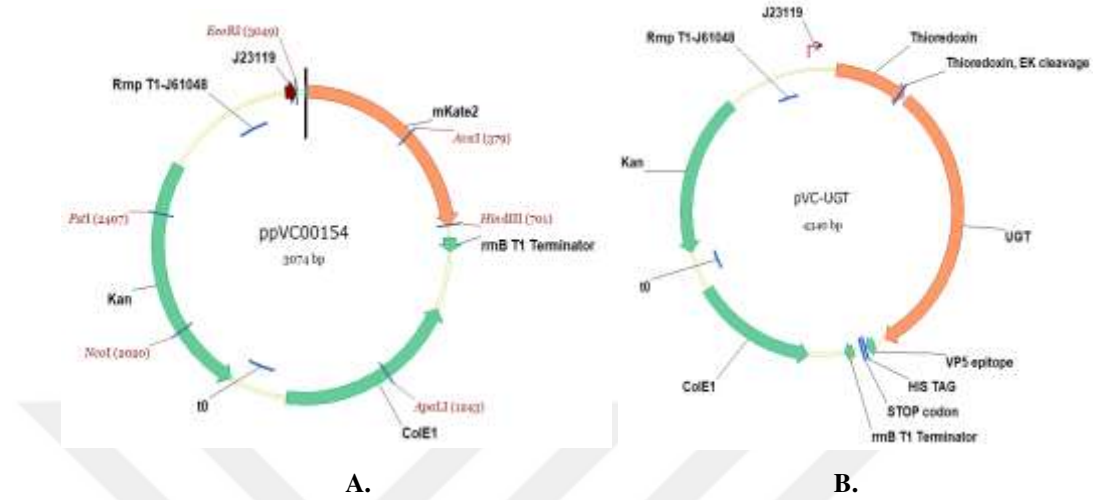
Şekil 3.6. pVC-CCD2 plazmidinin SalI-HF ve AatII restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesimi sonrası elde edilen bantlar. Beklenen bant büyüklükleri: 2151 bp, 2498 bp. (M: Markır: Hibrigen 1 kb Ladder MG-LDR-1000).

Şekil 3.6’da kesim reaksiyon sonucunda agaroz jel elektroforezi uygulanmış ve jel görüntüleme sisteminde beklenen bantlar gösterilmiştir. Şekilde seçilen 6 koloniden sadece 2. kuyucukta verilen koloni için pozitif olduğu görülmüştür. Pozitif kolonide 3 parça görülmüştür. Bunun sebebi kesim enzimlerinin plazmidi kesememesi olarak yorumlanmıştır. Diğer beklenen iki parça 2. kolonide görülmüştür. Pozitif sonuç veren koloni kültürü stok alınarak -80 °C’de saklanmıştır.

3.2.2. pVC-UGT Plazmidinin İnşa Edilmesi

Safran metabolitlerinin sentezinde pikrokrosin ve krosin sentezini sağlayan UGT geni için pVC-UGT plazmidi tasarlanmıştır. Plazmid tasarımı için pTHIO-UGT74AD1 plazmidi esas alınmıştır ve tasarımda kaynak olarak ppVC00154 plazmidi kullanılmıştır. Tasarımda kullanılan ppVC00154 ve pVC-UGT plazmid haritası Şekil 3.7’de verilmiştir. Plazmid tasarımı gerekliliği fragmentler Tablo 3.5’de verilen

primerler kullanılarak elde edilmiştir. Çalışmada yapılan PCR reaksiyonu şartları Tablo 3.6’de verilmiştir.



Şekil 3.7. A) ppVC00154 plazmid haritası ve B) pVC-UGT plazmid haritası.

Tablo 3.5. pVC-UGT plazmidinin inşa edilmesi için fragmentlerin elde edilmesi.

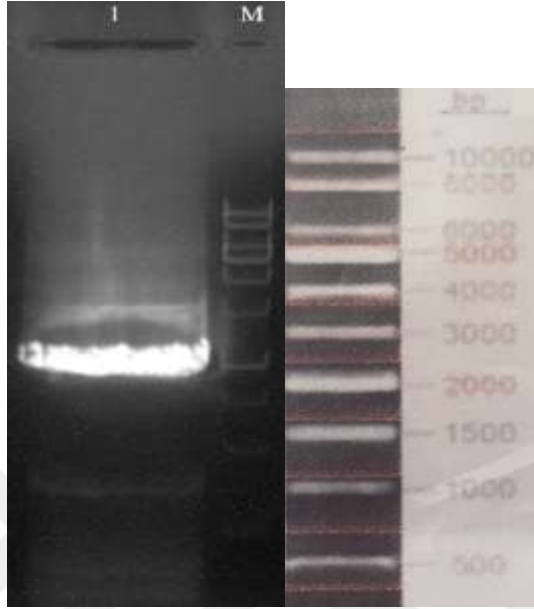
Fragment No	Primer Çiftleri	PCR için DNA kaynağı	Beklenen bant büyüklüğü
1	Thioredoxin-F ve CCD2-UGT-R	pTHIO-Dan1-UGT74AD1	2005 bp
2	p154-F ve p154-R	ppVC00154	2415 bp

Tablo 3.5’de verilen primerler kullanılarak 2005 ve 2415 bp uzunluğunda fragmentler elde edilmiştir.

Tablo 3.6. pVC-UGT plazmidinin inşası için kullanılacak fragmentlerin elde edilmesi için PCR şartları.

1. Fragment		2. Fragment	
PCR Bileşenleri	Miktar (µl)	PCR Bileşenleri	Miktar (µl)
dH ₂ O	32,9	dH ₂ O	33,3
5XHF Buffer	10	5XHF Buffer	10
dNTPs	1	dNTPs	1
Forward primer	2.5	Forward primer	2.5
Reverse primer	2.5	Reverse primer	2.5
pTHIO-Dan1-UGT74AD1	0.6	ppVC00154	0.2
Phusion DNA Polimeraz	0.5	Phusion DNA Polimeraz	0.5
TOPLAM	50	TOPLAM	50
PCR Şartları		PCR Şartları	
98 °C’de 30 sn	1 Döngü	98°C’de30 sn	1 Döngü
98 °C’de 10 sn	35 Döngü	98°C’de 10 sn	35 Döngü
64 °C’de 20 sn		62 °C’de 20 sn	
72 °C’de 40 sn		72 °C’de 45 sn	
72 °C’de 5 dk	1 Döngü	72 °C’de 5 dk	1 Döngü

Tablo 3.6’da verilen PCR şartları ve primerler kullanılarak 2005 ve 2415 bp uzunluğunda fragmentler elde edilmiştir. PCR ürünleri % 1’lik agaroz jel üzerinde yürütülmüştür. Fragmentler Şekil 3.8’de gösterilmiştir.



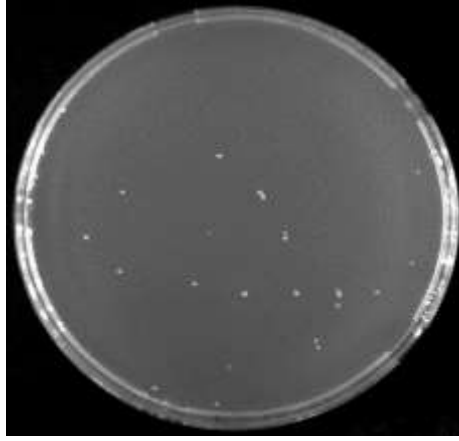
Şekil 3.8. pVC-UGT plazmidinin elde edilmesi için UGT fragmentinin PCR ile doğrulanması. Beklenen bant büyüklükleri: 2005 bp (M: Markır: Hibrigen 1 kb Ladder MG-LDR-1000).

2005 bp UGT fragmentinin doğrulanabilmesi için Tablo 3.6’da verilen PCR şartları uygulanmıştır. Beklenen büyüklükler agaroz jel elektroforezi sonucunda görülmüştür. Jel üzerinde verilen bant steril bir bistüri yardımıyla kesilerek jel saflaştırma protokolü uygulanmıştır. Saflaştırma sonrası konsantrasyon nanodrop cihazı yardımıyla ölçülmüştür.

Tablo 3.7. pVC-UGT plazmidinin inşası için Gibson Assembly reaksiyon şartları.

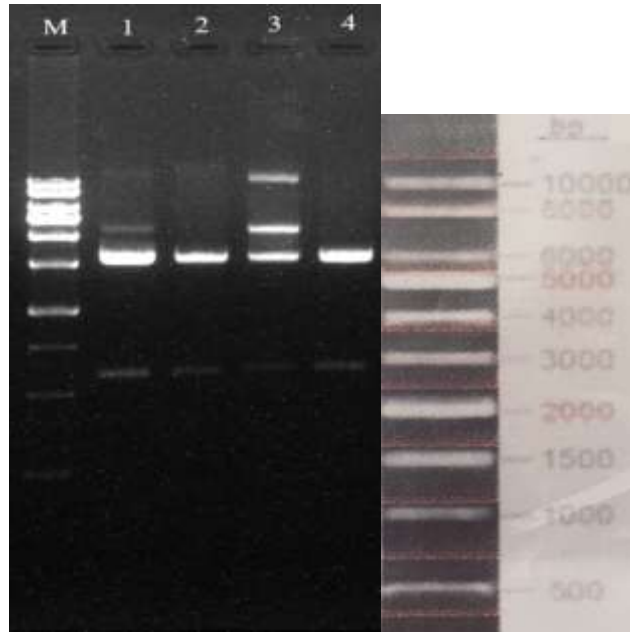
Gibson Bileşenleri	Miktar (µl)
Fragment 1 (224.806 ng/µl)	1.4
Fragment 2 (87.112 ng/µl)	3.6
Gibson enzim karışımı	15
TOPLAM	20
Gibson Şartları	
50 °C’de 1 saat	

Gibson assembly metodu Tablo 3.7’de verilen fragmentler ve reaksiyon şartları uygulanarak yapılmıştır. pVC-UGT plazmidi için 2 fragment birleştirilmeye çalışılmıştır ve reaksiyon sonrası gibson ürünü transformasyon yapılarak *E. coli* NEB 10-beta kompetent hücreye elektroporasyonu yapılmıştır.



Şekil 3.9. pVC-UGT plazmidinin transformasyon sonuçları.

Yukarıda verilen Şekil 3.9’da pVC-UGT plazmidi için yapılan transformasyon gösterilmiştir. *E. coli* NEB 10-beta kompetent hücreye transformasyon gerçekleştirilmiştir. Transforme edilen gibson ürünü için öncelikle antibiyotikli katı besiyerine ekim yapılmıştır. Şekil 3.9’da verilen katı besiyerine ekim sonrası 16 saatlik inkübasyona bırakılmış petrideki üreyen koloniler gösterilmiştir. Bu kolonilerden 4 adet seçilerek sıvı besiyerine ekimi yapılmıştır. Daha sonra kolonilerin sıvı kültüründen plazmid DNA izolasyonu yapılarak kesim reaksiyonu uygulanmıştır. Bu süreçler inşası yapılan pVC-UGT plazmidinin doğrulanması için gerekmektedir.



Şekil 3.10. pVC-UGT plazmidinin SacI-HF restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesimi sonrası elde edilen bantlar. Beklenen bant büyüklükleri: 3173 bp, 1167 bp. (M: Markır: Hibrigen 1 kb Ladder MG-LDR-1000).

Kesim reaksiyonu uygulandıktan sonra elde edilen 4 plazmid için agaroz jel elektroforezinde yürütülerek doğrulama aşaması jel görüntüleme sistemi yardımıyla Şekil 3.10'da verildiği gibi görüntülenmiştir. Jel üzerinde görüntülenen plazmidlere göre inşası yapılan plazmid haritası dikkate alınarak SacI-HF enziminin plazmidleri kesmesiyle beklenen büyüklükler 2. ve 4. kolonilerde görülmüştür. Bunun sonucu olarak 2. ve 4. Plazmid inşası yapılan pozitif pVC-UGT plazmid olduğu görülmüştür. Bu plazmidlerin stoğu alınarak -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.3. pVC-CCD-UGT Plazmidinin İnşa Edilmesi

Plazmid haritaları tasarlanan pVC-CCD-UGT plazmid; Tablo 3.9'da verilen gerekli fragmentler ve Tablo 3.8'de verilen PCR şartları ile elde edilmiştir. İnşa edilen plazmid safran apokarotenoid metabolitlerinin biyosentezinde kullanılmıştır. Analiz için öncül madde olarak zeaksantin üreten pAC-EHER-EBIidiYZ plazmid kullanılmıştır. UGT geni için şeker donörü olarak Udp-glc kullanılarak metabolit üretiminde gen aktivitesi artırılmaya çalışılmıştır.

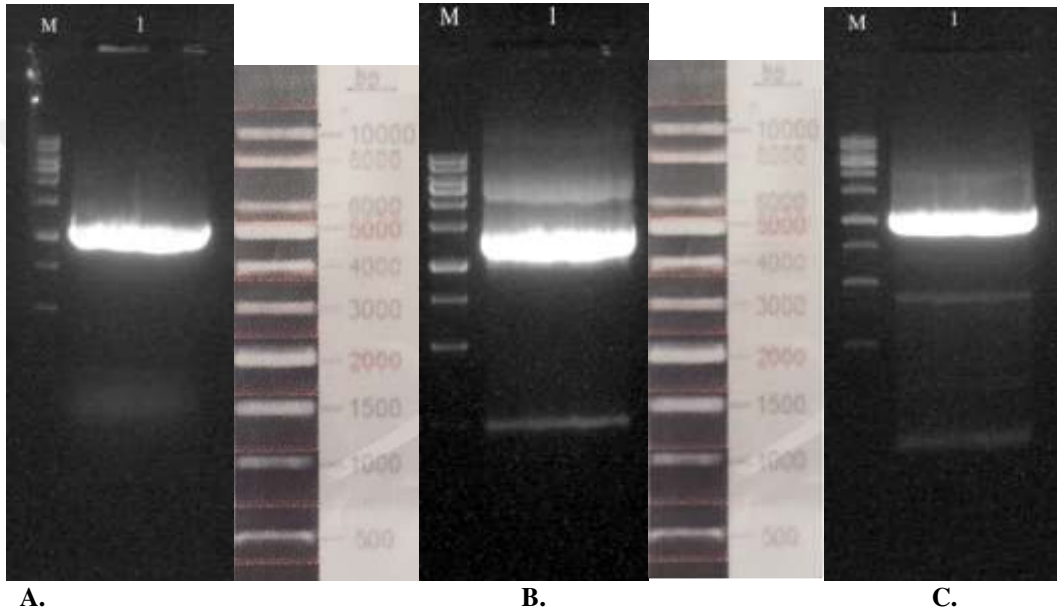
Tablo 3.8. pVC-CCD-UGT plazmidinin inşası için kullanılacak fragmentlerin elde edilmesi için PCR şartları.

1. Fragment		2. Fragment		3. Fragment	
PCR Bileşenleri	Miktar (µl)	PCR Bileşenleri	Miktar (µl)	PCR Bileşenleri	Miktar (µl)
dH ₂ O	32.5	dH ₂ O	32.8	dH ₂ O	33.3
5XHF Buffer	10	5XHF Buffer	10	5XHF Buffer	10
dNTPs	1	dNTPs	1	dNTPs	1
UGT-F	2.5	pVC-CCD2-F	2.5	p154-F	2.5
UGT-R	2.5	CCD2-UGT-R	2.5	pVC-CCD2-R	2.5
pVC-UGT	1	pVC-CCD2	0.6	ppVC00154	0.2
Phusion DNA Polimeraz	0.5	Phusion DNA Polimeraz	0.5	Phusion DNA Polimeraz	0.5
TOPLAM	50	TOPLAM	50	TOPLAM	50
PCR Şartları		PCR Şartları		PCR Şartları	
98 °C'de 30 sn	1 Döngü	98 °C'de 30 sn	1 Döngü	98 °C'de 30 sn	1 Döngü
98 °C'de 10 sn	35 Döngü	98 °C'de 10 sn	35 Döngü	98 °C'de 10 sn	35 Döngü
63 °C'de 20 sn		61 °C'de 20 sn		62 °C'de 20 sn	
72 °C'de 45 sn		72 °C'de 45 sn		72 °C'de 45 sn	
72 °C'de 5 dk	1 Döngü	72 °C'de 5 dk	1 Döngü	72 °C'de 5 dk	1 Döngü

Yukarıda verilen PCR şartları uygulanarak gerekli fragmentler elde edilmiştir. Fragmentler PCR ürünlerinin jelden saflaştırma kiti yardımıyla elde edilmiştir. Konsantrasyonu nanodrop cihazı yardımıyla ölçülüp kaydedilmiştir.

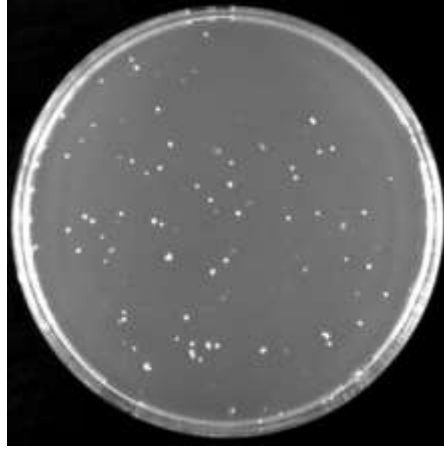
Tablo 3.9. pVC-CCD-UGT plazmidinin inşa edilmesi için fragmentlerin elde edilmesi.

Fragment No	Primer Çiftleri	PCR için DNA kaynağı	Beklenen bant büyüklüğü
1	UGT-F ve UGT-R	pVC-UGT	2206 bp
2	pVC-CCD2-F ve CCD2-UGT-R	pVC-CCD2	2608 bp
3	p154-F ve pVC-CCD2-R	ppVC00154	2095 bp



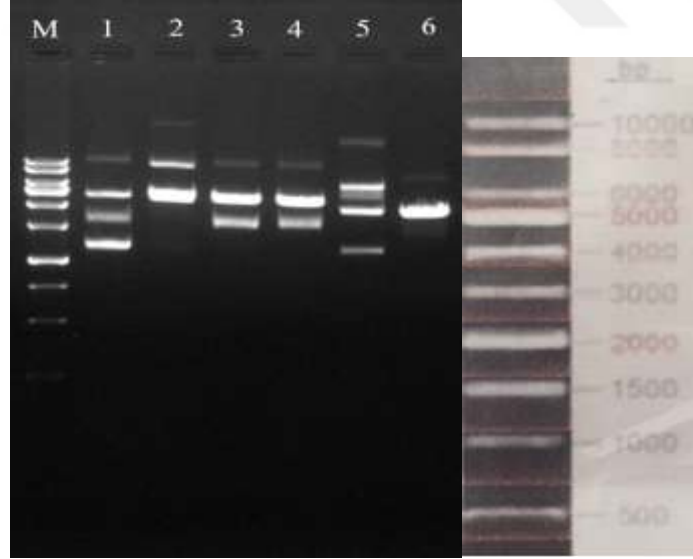
Şekil 3.11. A) pVC-CCD-UGT plazmidlerinin elde edilmesi için UGT fragmentinin PCR ile doğrulanması. Beklenen bant büyüklükleri: 2206 bp B) pVC-CCD-UGT plazmidlerinin elde edilmesi için CCD2 fragmentinin PCR ile doğrulanması. Beklenen bant büyüklükleri: 2608 bp C) pVC-CCD-UGT plazmidlerinin elde edilmesi için ppVC00154 fragmentinin PCR ile doğrulanması. Beklenen bant büyüklükleri: 2095 bp (M: Markır: Hibrişen 1 kb Ladder MG-LDR-1000).

Plazmid inşası için gerekli fragmentler, PCR reaksiyonları uygulandıktan sonra Şekil 3.11’de agaroz jel elektroforezi sonucu beklenen büyüklükler elde edilmiştir. Tablo 3.9’da verilen fragmentler kullanılarak Gibson Assembly metodu uygulanmıştır. 50 °C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra gıbson ürünü *E. coli* NEB 10-beta kompetent hücreye transformasyon yapılmıştır. Transformasyonu yapılan plazmid için Şekil 3.12’de görüntülenmiştir.



Şekil 3.12. pVC-CCD-UGT plazmidi için transformasyon sonuçları.

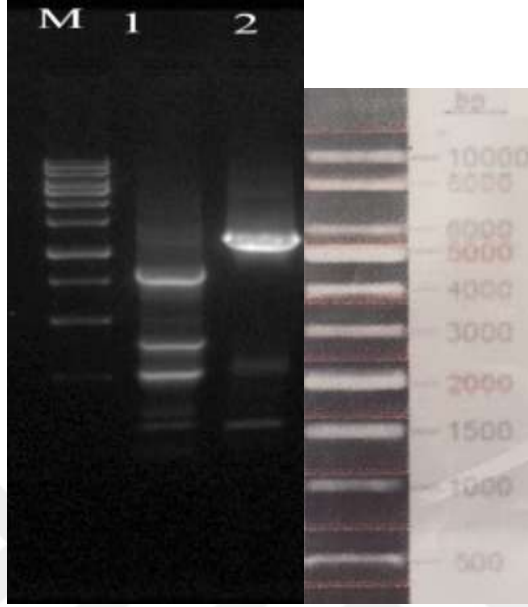
Yukarıda verilen Şekil 3.12’de transformasyon sonucu üreyen koloniler gösterilmiştir. Bu kolonilerden belli sayıda koloniler seçilerek plazmid doğrulama işlemlerinin yapılabilmesi için ilk olarak sıvı besiyeri ekimi daha sonra plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sonucu plazmidlerin doğrulanabilmesi için ilk olarak kesim reaksiyonu uygulanmıştır ve agaroz jel elektroforeziyle Şekil 3.13’de gösterilmiştir.



Şekil 3.13. pVC-CCD-UGT plazmidinin Sall-HF restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesimi sonrası elde edilen bantlar. Beklenen bant büyüklükleri: 4412 bp, 2426 bp. (M: Markır: Hibrigen 1 kb Ladder MG-LDR-1000).

Kesim reaksiyonu sonrası agaroz jel elektroforezinde 1. kolonide görülen beklenmeyen bant için ikinci bir doğrulama işlemi olarak PCR doğrulama yapılmıştır. Şekil 3.14’de verilen jel görüntüsünde iki farklı primer ile CCD2 ve UGT gen

uzunluklarının plazmitde bulunup bulunmadığı kontrol edilmiştir. Bu işlem sonucunda beklenen dizi uzunlukları plazmitde görülmesiyle 1. kuyucukta verilen plazmidin pozitif olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.14. pVC-CCD-UGT plazmidinin CCD2 geni için (KJ541749.1, F-R) ve UGT geni için (UGT-F-R) gerekli primerler kullanılarak PCR doğrulama sonrası elde edilen bantlar. Beklenen bant büyüklükleri: 1689 bp, 2206 bp. (M: Markır: Hibrigen 1 kb Ladder MG-LDR-1000).

pVC-CCD-UGT plazmidi inşa edildikten sonra ikinci bir transformasyon yapılarak *E. coli* MG1655 suşuna transformasyonu yapılmıştır. HPLC analizine başlanabilmesi için reaksiyonun başlangıç materyali olan zeaksantin öncül olarak verilmesi gerekmektedir. Bunun için pAC-EHER-EBIidiYZ plazmidi ve pVC-CCD-UGT plazmidinin kotransformasyonu yapılmıştır. Her iki plazmid *E. coli* MG1655 kompetent hücreye aktarımı yapılmıştır. Bu plazmid ile bakteride endojen olduğu düşünülen β -GS, ALDH ve plazmitde bulunan UGT, CCD2 genleri yoluyla metabolit üretimleri HPLC yardımıyla incelenecektir.

3.3. Safran Bitkisinin (*Crocus sativus* L.) Gelişim Aşamaları

Safran bitkisi gelişim aşamalarını incelemek için ekimi yapılan soğanlar Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Ekim işlemi saksıda yapılmıştır. 5 gün arayla sulama işlemi yapılmıştır. Şekil 3.15'de safran bitkisinin gelişim aşamaları gösterilmiştir. Safran bitkisinin geliştiği mevsim olan Ekim-Aralık

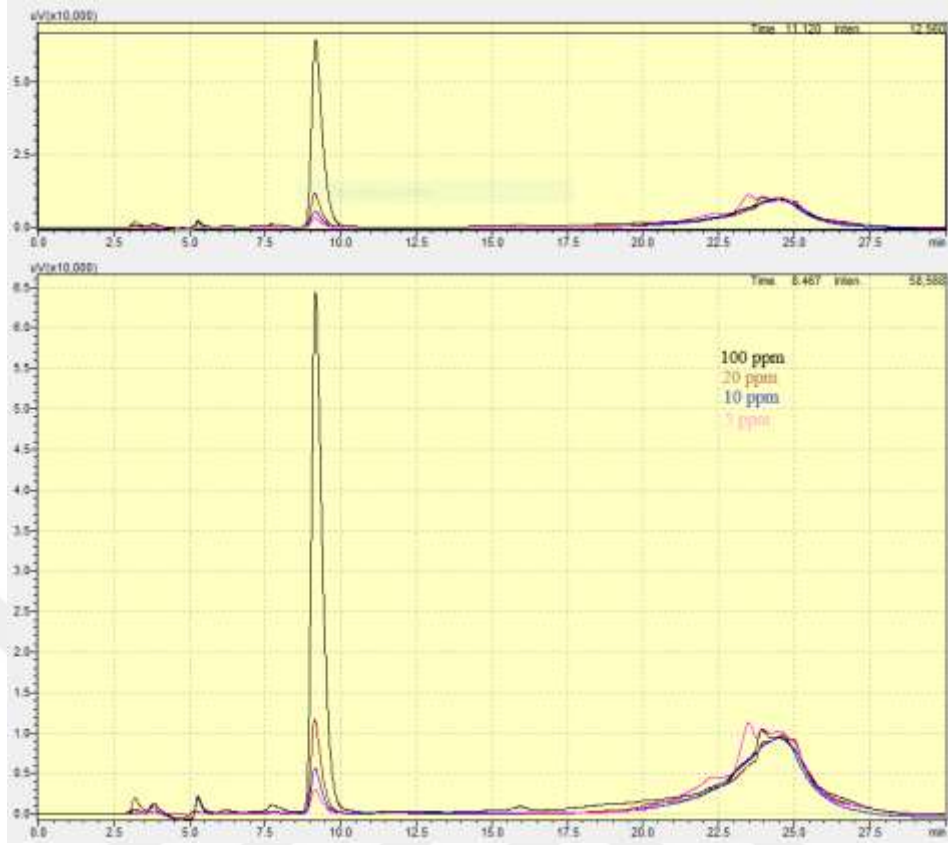
aylarında ekimi yapılmıştır. Yaklaşık 15 soğandan sadece 2 tanesinde çiçek gelişimi gözlenmiştir. Bu çiçeklerin stigma ve yaprakları RNA izolasyonu ve dolayısıyla cDNA sentezinde kullanılmak üzere sıvı nitrojende dondurularak -80 °C’de saklanmıştır.



Şekil 3.15. Safran bitkisinin gelişim aşamaları.

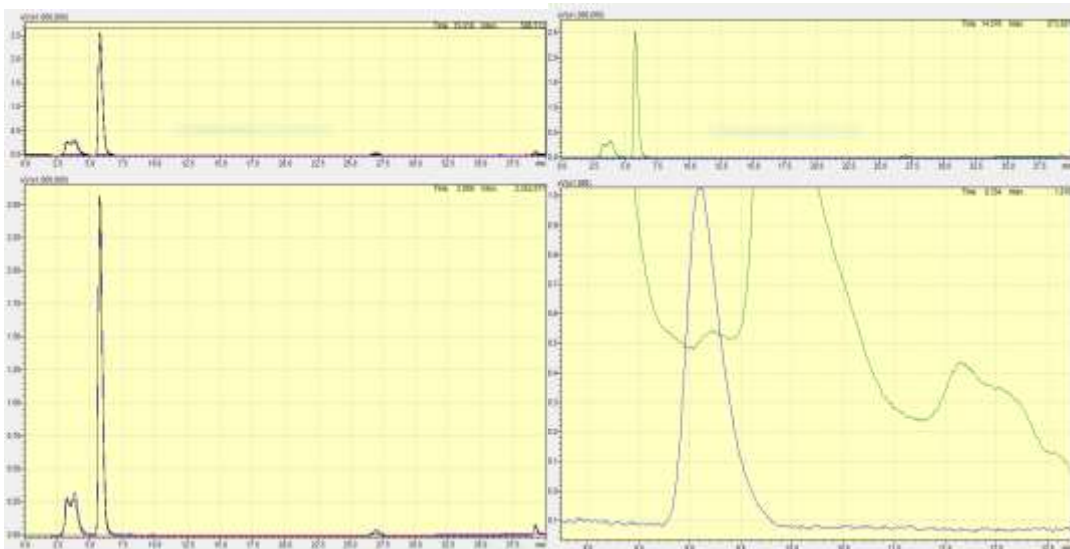
3.4. HPLC Analizi

Zeaksantin biriktiren pAC-EHER-EBİdiYZ plazmidi (Cm25) ve pVC-CCD-UGT plazmidinin (Kan30) kotransformasyonu yapılmıştır. HPLC analizi öncesinde başlangıç kültürü OD₆₀₀ değeri 0.1’den başlatılarak 24 saatte bir aseton ile ekstraksiyonu yapılmıştır. Pikrokrosin, krosin ve safranal standartı farklı konsantrasyonlarda HPLC cihazında analiz edilmiştir. Pikrokrosin standartının HPLC kromatogramı Şekil 3.16’da verilmiştir.



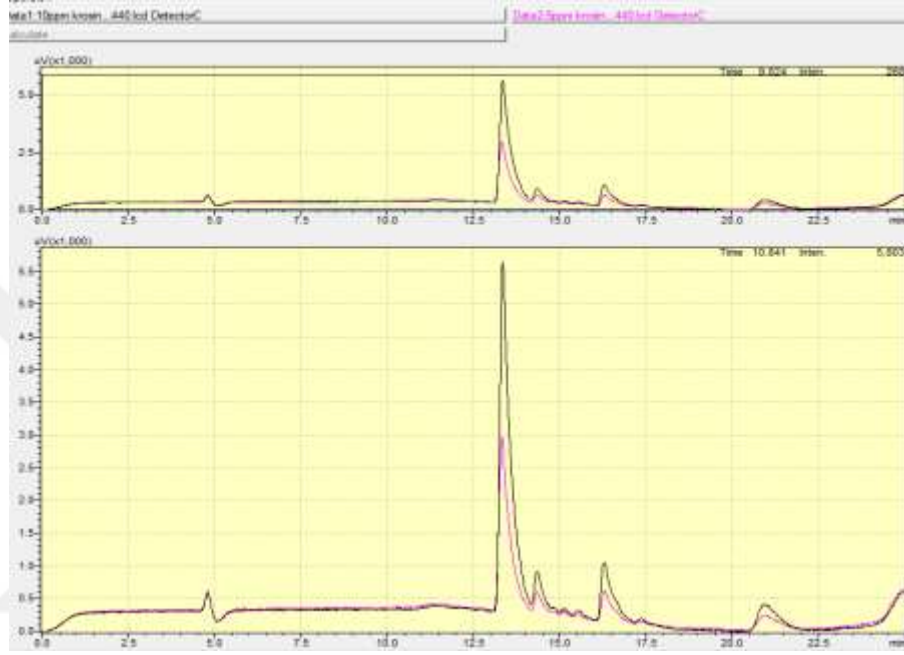
Şekil 3.16. Pikrokrosin standardı HPLC kromatogramı.

Şekil 3.16’da verilen pikrokrosin için HPLC kromatogramında standart RT 8.467 olarak belirlenmiştir. Standart konsantrasyonları 5, 10, 20, 100 ppm olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.17. Plazmid için ekstraksiyon sonrası HPLC kromatogramı.

Ekstraksiyon sonrası metabolitlerin HPLC kromatogramı Şekil 3.17’ de verilmiştir. Ekstraksiyonlar 96. saat olmak 24 saatte bir tekrarlanmıştır. Kromatogramda görüldüğü gibi pikrokrosin metaboliti için belirgin bir pik gözlenmemiştir. Fakat daha yakından bakıldığında küçükde olsa bir pik gözlenmektedir. Bu durum pikrokrosin metabolitinin oldukça az da olsa bir sentezinin gerçekleştirildiğinin göstergesidir.



Şekil 3.18. Krosin standartı için HPLC kromatogramı.



Şekil 3.19. Safranal standartı için HPLC kromatogramı.

Safranal standartları için belirlenen konsantrasyonlarda HPLC kromatogramı verilmiştir. Şekil 3.18 ve 3.19’da verildiği gibi 5 ppm ve 10 ppm konsantrasyonlarında safranal standartı hazırlanmıştır ve cihazda analiz edilmiştir. Aynı şekilde krosin ile metabolit ekstraksiyonları karşılaştırılarak sentez incelenmiştir.



Şekil 3.20. Safranal ve krosin için ekstraksiyon örnekleri ile verilen HPLC kromatogramı.

Safranal ve krosin için Şekil 3.20’de verilen kromatogramda belirgin bir mevcudiyet gözlenmemiştir. Safranal ve krosin biyosentezi hücrede gerçekleşmediği HPLC analizine dayanarak gösterilmektedir.

4. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada ilk olarak safran apokarotenoid genleri olan CCD2, UGT ve ALDH genleri temin edilmiştir. β -GS geninin endojen olarak *E. coli* bakterisinde bulunmaması durumunda safran bitkisi yetiştirilerek bitkiden elde edilmeye çalışılmıştır ve aynı zamanda safran bitkisinin gelişim aşamaları incelenmiştir. Bu gen çalışmanın ileri aşamalarında kullanılmak üzere saklanmıştır. Safran bitkisinin gelişim aşamalarını incelemek ve cDNA sentezi yapmak için soğanlar temin edilmiş ve ekimi saksıda yapılmıştır.

Safran apokarotenoid biyosentezinin *E. coli* bakterisinde gerçekleşebilmesi için pVC-CCD, pVC-UGT ve pVC-CCD-UGT plazmidlerinin tasarımı yapılmıştır. Plazmid tasarımları kesim reaksiyonlarıyla kontrol edilmiştir.

Tasarımı yapılan pVC-CCD-UGT plazmidi için öncül olarak pAC-EHER-EBlidiYZ plazmidi kullanılmıştır ve *E. coli* MG1655 suşuna kotransformasyonu yapılmıştır. HPLC aşamasına geçmeden önce Udp-glc verilerek UGT aktivitesi arttırılmaya çalışılmıştır. HPLC cihazında ekstraksiyonu yapılan örneklerin analizi yapılmıştır.

Metabolitlerin ekstraksiyonu için aseton kullanılmıştır. Standartların çözücüsü olarak farklı çözücüler kullanılmıştır. Pikrokrosin metanolde çözündürülmüş ve nitrojen yardımıyla uçurulmuştur. Safranal ve krosin için asetonitril-su (% 50-50) kullanılmıştır. Belirli konsantrasyonlarda stok standartlar hazırlanmıştır. HPLC sisteminde standartlar verilerek pikler belirlenmiştir.

Yapılan analiz sonucunda Udp-glc materyalinin UGT aktivesi için gerekli olduğu görülmüştür. Pikrokrosin ara metabolit olduğu için tamamı tüketilerek reaksiyon sonucu dönüşümden dolayı krosin ve safranal ortamda belirlenememiştir. β -GS ve ALDH geninin *E. coli*'de endojen olarak aktivitesiyle ilgili herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. Bu nedenle analiz sonucunda safranal ve krosin için HPLC analizinde pik görülmemiştir. Bu genlerin endojen olarak bulunabilse bile üretiminin oldukça az olması nedeniyle görülememesi de diğer bir beklenen durumdur.

Metabolitlerin üretim aşamasındaki faktörler optimize edilerek üretimin daha iyi bir şekilde gerçekleştirilebileceği düşünülmektedir.

Çalışmada inşası yapılmayan diğer genlerin plazmid tasarımı yapılarak ve yolak genlerinin birarada bulunduğu nihai plazmid elde edilerek krosin, pikrokrosin ve safranal metabolitlerin incelenebilmesi çalışmanın ileri düzeyde yapılabilmesi ve metabolit üretiminin arttırılması için düşünülebilir.



KAYNAKLAR

1. **Mazid, M., Khan, T. A., & Mohammad, F.** (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and medicine*, **3**(2), 232-249.
2. **Dudareva, N., & Pichersky, E.** (2008). Metabolic engineering of plant volatiles. *Current opinion in biotechnology*, **19**(2), 181-189.
3. **Hussain, M. S., Fareed, S., Saba Ansari, M., Rahman, A., Ahmad, I. Z., & Saeed, M.** (2012). Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, **4**(1), 10.
4. **Chae, T. U., Choi, S. Y., Kim, J. W., Ko, Y. S., & Lee, S. Y.** (2017). Recent advances in systems metabolic engineering tools and strategies. *Current opinion in biotechnology*, **47**, 67-82.
5. **Lessard, P.** (1996). Metabolic engineering: the concept coalesces. *Nature biotechnology*, **14**(13), 1654.
6. **Stephanopoulos, G.** (1999). Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metabolic engineering*, **1**(1), 1-11.
7. **Van Maris, A. J., Abbott, D. A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M. A., ... & Pronk, J. T.** (2006). Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **90**(4), 391-418.
8. **Falb, M., Müller, K., Königsmaier, L., Oberwinkler, T., Horn, P., von Gronau, S., ... & Oesterhelt, D.** (2008). Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles*, **12**(2), 177-196.
9. **Olano, C., Lombo, F., Méndez, C., & Salas, J. A.** (2008). Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metabolic engineering*, **10**(5), 281-292.
10. **Khazdair, M. R., Boskabady, M. H., Hosseini, M., Rezaee, R., & Tsatsakis, A. M.** (2015). The effects of *Crocus sativus* (saffron) and its constituents on nervous system: A review. *Avicenna journal of phytomedicine*, **5**(5), 376.
11. **Kyriakoudi, A., Ordoudi, A. S., Roldán-Medina, M., & Tsimidou, Z. M.** (2015). Saffron, a functional spice. *Austin J Nutri Food Sci*, **3**(1), 1059.

12. **Yasmin, S., & Nehvi, F. A.** (2013). Saffron as a valuable spice: A comprehensive review. *African Journal of Agricultural Research*, **8**(3), 234-242.
13. **Harrison, E. H., & Quadro, L.** (2018). Apocarotenoids: emerging roles in mammals. *Annual review of nutrition*, **38**, 153-172.
14. **Beltran, J. C. M., & Stange, C.** (2016). Apocarotenoids: a new carotenoid-derived pathway. In *Carotenoids in Nature* (pp. 239-272). Springer, Cham.
15. **Golmohammadi, F.** (2014). Saffron and its farming, economic importance, export, medicinal characteristics and various uses in South Khorasan Province-East of Iran. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, **3**(5), 566-596.
16. **Moghaddasi, M. S.** (2010). Saffron chemicals and medicine usage. *Journal of medicinal plants research*, **4**(6), 427-430.
17. **Vahedi, M., Kabiri, M., Salami, S. A., Rezadoost, H., Mirzaie, M., & Kanani, M. R.** (2018). Quantitative HPLC-based metabolomics of some Iranian saffron (*Crocus sativus* L.) accessions. *Industrial Crops and Products*, **118**, 26-29.
18. **Orth, J. D.** (2012). Systems biology analysis of *Escherichia coli* for discovery and metabolic engineering (Doctoral dissertation, UC San Diego).
19. **Sandmann, G.** (2001). Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Archives of biochemistry and biophysics*, **385**(1), 4-12.
20. **Fu, R., Martin, C., & Zhang, Y.** (2018). Next-generation plant metabolic engineering, inspired by an ancient Chinese irrigation system. *Molecular plant*, **11**(1), 47-57.
21. **Zhong, J. J.** (2011). 3.27-Plant Secondary Metabolites A2-Moo-Young, Murray *Comprehensive Biotechnology*.
22. **Verpoorte, R.** (2000). Secondary metabolism. In *Metabolic engineering of plant secondary metabolism* (pp. 1-29). Springer, Dordrecht.
23. **Verpoorte, R., Van der Heijden, R., Ten Hoopen, H. J. G., & Memelink, J.** (1999). Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology letters*, **21**(6), 467-479.
24. **Niu, F. X., Lu, Q., Bu, Y. F., & Liu, J. Z.** (2017). Metabolic engineering for the microbial production of isoprenoids: Carotenoids and isoprenoid-based biofuels. *Synthetic and systems biotechnology*, **2**(3), 167-175.

25. **Julsing, M. K., Koulman, A., Woerdenbag, H. J., Quax, W. J., & Kayser, O.** (2006). Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites. *Biomolecular engineering*, **23**(6), 265-279.
26. **Flores-Pérez, Ú., Pérez-Gil, J., Rodríguez-Villalón, A., Gil, M. J., Vera, P., & Rodríguez-Concepción, M.** (2008). Contribution of hydroxymethylbutenyl diphosphate synthase to carotenoid biosynthesis in bacteria and plants. *Biochemical and biophysical research communications*, **371**(3), 510-514.
27. **Rivera, S. M., & Canela-Garayoa, R.** (2012). Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *Journal of Chromatography A*, **1224**, 1-10.
28. **Huang, J. J., Lin, S., Xu, W., & Cheung, P. C. K.** (2017). Occurrence and biosynthesis of carotenoids in phytoplankton. *Biotechnology advances*, **35**(5), 597-618.
29. **Arathi, B. P., Sowmya, P. R. R., Vijay, K., Baskaran, V., & Lakshminarayana, R.** (2015). Metabolomics of carotenoids: The challenges and prospects—A review. *Trends in Food Science & Technology*, **45**(1), 105-117.
30. **Fraser, P. D., & Bramley, P. M.** (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in lipid research*, **43**(3), 228-265.
31. **Hartz, P., Milhim, M., Trenkamp, S., Bernhardt, R., & Hannemann, F.** (2018). Characterization and engineering of a carotenoid biosynthesis operon from *Bacillus megaterium*. *Metabolic engineering*, **49**, 47-58.
32. **Amorim-Carrilho, K. T., Cepeda, A., Fente, C., & Regal, P.** (2014). Review of methods for analysis of carotenoids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **56**, 49-73.
33. **Saini, R. K., & Keum, Y. S.** (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, **240**, 90-103.
34. **Lerfall, J.** (2016). Carotenoids: occurrence, properties and determination. In *Encyclopedia of food and health* (pp. 663-669). Elsevier, Trondheim, Norway.
35. **Sandmann, G., Albrecht, M., Schnurr, G., Knörzer, O., & Böger, P.** (1999). The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, **17**(6), 233-237.
36. **Schmidt-Dannert, C.** (2000). Engineering novel carotenoids in microorganisms. *Current opinion in biotechnology*, **11**(3), 255-261.

37. **Ma, X., Zheng, B., Ma, Y., Xu, W., Wu, H., & Wang, S.** (2018). Carotenoid accumulation and expression of carotenoid biosynthesis genes in mango flesh during fruit development and ripening. *Scientia Horticulturae*, **237**, 201-206.
38. **Alagoz, Y., Nayak, P., Dhami, N., & Cazzonelli, C. I.** (2018). cis-carotene biosynthesis, evolution and regulation in plants: The emergence of novel signaling metabolites. *Archives of biochemistry and biophysics*.
39. **Rosati, C., Diretto, G., & Giuliano, G.** (2009). Biosynthesis and engineering of carotenoids and apocarotenoids in plants: state of the art and future prospects. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **26**(1), 139-162.
40. **Giuliano, G.** (2014). Plant carotenoids: genomics meets multi-gene engineering. *Current opinion in plant biology*, **19**, 111-117.
41. **Sankari, M., Rao, P. R., Hemachandran, H., Pullela, P. K., Tayubi, I. A., Subramanian, B., ... & Ramamoorthy, S.** (2018). Prospects and progress in the production of valuable carotenoids: Insights from metabolic engineering, synthetic biology, and computational approaches. *Journal of biotechnology*, **266**, 89-101.
42. **Shumskaya, M., & Wurtzel, E. T.** (2013). The carotenoid biosynthetic pathway: thinking in all dimensions. *Plant Science*, **208**, 58-63.
43. **Sandmann, G.** (2001). Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: strategies, problems and achievements. *Trends in plant science*, **6**(1), 14-17.
44. **Clotault, J., Peltier, D., Berruyer, R., Thomas, M., Briard, M., & Geoffriau, E.** (2008). Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *Journal of Experimental Botany*, **59**(13), 3563-3573.
45. **Osawa, A., Harada, H., Choi, S. K., Misawa, N., & Shindo, K.** (2011). Production of caloxanthin 3'- β -D-glucoside, zeaxanthin 3, 3'- β -D-diglucoside, and nostoxanthin in a recombinant *Escherichia coli* expressing system harboring seven carotenoid biosynthesis genes, including crtX and crtG. *Phytochemistry*, **72**(8), 711-716.
46. **McQuinn, R. P., Giovannoni, J. J., & Pogson, B. J.** (2015). More than meets the eye: from carotenoid biosynthesis, to new insights into apocarotenoid signaling. *Current opinion in plant biology*, **27**, 172-179.

47. **Sajilata, M. G., Singhal, R. S., & Kamat, M. Y.** (2008). The carotenoid pigment zeaxanthin—a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, **7**(1), 29-49.
48. **Shen, H. J., Cheng, B. Y., Zhang, Y. M., Tang, L., Li, Z., Bu, Y. F., ... & 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.
49. **Zhang, Y., Liu, Z., Sun, J., Xue, C., & Mao, X.** (2018). Biotechnological production of zeaxanthin by microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*, **71**, 225-234.
50. **Wilson, S. A., & Roberts, S. C.** (2014). Metabolic engineering approaches for production of biochemicals in food and medicinal plants. *Current opinion in biotechnology*, **26**, 174-182.
51. **Xie, W., Ye, L., Lv, X., Xu, H., & Yu, H.** (2015). Sequential control of biosynthetic pathways for balanced utilization of metabolic intermediates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic engineering*, **28**, 8-18.
52. **Lee, P. C., Momen, A. Z. R., Mijts, B. N., & Schmidt-Dannert, C.** (2003). Biosynthesis of structurally novel carotenoids in *Escherichia coli*. *Chemistry & biology*, **10**(5), 453-462.
53. **Zhu, C., Bai, C., Sanahuja, G., Yuan, D., Farré, G., Naqvi, S., ... & Christou, P.** (2010). The regulation of carotenoid pigmentation in flowers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **504**(1), 132-141.
54. **Rosati, C., Diretto, G., & Giuliano, G.** (2009). Biosynthesis and engineering of carotenoids and apocarotenoids in plants: state of the art and future prospects. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **26**(1), 139-162.
55. **Sui, X., Kiser, P. D., Von Lintig, J., & Palczewski, K.** (2013). Structural basis of carotenoid cleavage: from bacteria to mammals. *Archives of biochemistry and biophysics*, **539**(2), 203-213.
56. **Hou, X., Rivers, J., León, P., McQuinn, R. P., & Pogson, B. J.** (2016). Synthesis and function of apocarotenoid signals in plants. *Trends in plant science*, **21**(9), 792-803.
57. **Vogel, J. T., Tan, B. C., McCarty, D. R., & Klee, H. J.** (2008). The carotenoid cleavage dioxygenase 1 enzyme has broad substrate specificity, cleaving

- multiple carotenoids at two different bond positions. *Journal of Biological Chemistry*, **283**(17), 11364-11373.
58. **Liang, M. H., Zhu, J., & Jiang, J. G.** (2018). Carotenoids biosynthesis and cleavage related genes from bacteria to plants. *Critical reviews in food science and nutrition*, **58**(14), 2314-2333.
 59. **Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Argandona-Picazo, J., Castillo, R., & Gómez-Gómez, L.** (2016). Intron retention and rhythmic diel pattern regulation of carotenoid cleavage dioxygenase 2 during crocetin biosynthesis in saffron. *Plant molecular biology*, **91**(3), 355-374.
 60. **Ahrazem, O., Rubio Moraga, A., JIMENO, M. L., & Gómez-Gómez, L.** (2015). Structural characterization of highly glucosylated crocins and regulation of their biosynthesis during flower development in *Crocus*. *Frontiers in plant science*, **6**, 971.
 61. **Moraga, A. R., Nohales, P. F., Pérez, J. A. F., & Gómez-Gómez, L.** (2004). Glucosylation of the saffron apocarotenoid crocetin by a glucosyltransferase isolated from *Crocus sativus* stigmas. *Planta*, **219**(6), 955-966.
 62. **Taylor, M., & Ramsay, G.** (2005). Carotenoid biosynthesis in plant storage organs: recent advances and prospects for improving plant food quality. *Physiologia Plantarum*, **124**(2), 143-151.
 63. **Schwartz, S. H., Qin, X., & Loewen, M. C.** (2004). The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(45), 46940-46945.
 64. **Auldridge, M. E., McCarty, D. R., & Klee, H. J.** (2006). Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Current opinion in plant biology*, **9**(3), 315-321.
 65. **Walter, M. H., Stauder, R., & Tissier, A.** (2015). Evolution of root-specific carotenoid precursor pathways for apocarotenoid signal biogenesis. *Plant Science*, **233**, 1-10.
 66. **Baba, S. A., & Ashraf, N.** (2016). Carotenoid Cleavage Dioxygenases of *Crocus sativus* L. In *Apocarotenoids of Crocus sativus* L: From biosynthesis to pharmacology (pp. 23-37). Springer, Singapore.

67. **Avendaño-Vázquez, A. O., Cordoba, E., Llamas, E., San Román, C., Nisar, N., De la Torre, S., ... & León, P.** (2014). An uncharacterized apocarotenoid-derived signal generated in ζ -carotene desaturase mutants regulates leaf development and the expression of chloroplast and nuclear genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **26**(6), 2524-2537.
68. **Havaux, M.** (2014). Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *The Plant Journal*, **79**(4), 597-606.
69. **Ramel, F., Mialoundama, A. S., & Havaux, M.** (2012). Nonenzymic carotenoid oxidation and photooxidative stress signalling in plants. *Journal of experimental botany*, **64**(3), 799-805.
70. **Mirsafi, Z. S., Sepaskhah, A. R., Ahmadi, S. H., & Kamgar-Haghighi, A. A.** (2016). Assessment of AquaCrop model for simulating growth and yield of saffron (*Crocus sativus* L.). *Scientia horticulturae*, **211**, 343-351.
71. **Cossignani, L., Urbani, E., Simonetti, M. S., Maurizi, A., Chiesi, C., & Blasi, F.** (2014). Characterisation of secondary metabolites in saffron from central Italy (Cascia, Umbria). *Food chemistry*, **143**, 446-451.
72. **Nerome, H., Ito, M., Machmudah, S., Kanda, H., & Goto, M.** (2016). Extraction of phytochemicals from saffron by supercritical carbon dioxide with water and methanol as entrainer. *The Journal of Supercritical Fluids*, **107**, 377-383.
73. **Maleki, F., Kazemi, H., Siahmarguee, A., & Kamkar, B.** (2017). Development of a land use suitability model for saffron (*Crocus sativus* L.) cultivation by multi-criteria evaluation and spatial analysis. *Ecological Engineering*, **106**, 140-153.
74. **D'Agostino, N., Pizzichini, D., Chiusano, M. L., & Giuliano, G.** (2007). An EST database from saffron stigmas. *BMC Plant Biology*, **7**(1), 53.
75. **Pardo, J. E., Zalacain, A., Carmona, M., Lopez, E., Alvarruiz, A., & Alonso, G. L.** (2002). INFLUENCE OF THE TYPE OF DEHYDRATION PROCESS ON THE SENSORY PROPERTIES OF SAFFRON SPICE. *Italian journal of food science*, **14**(4).
76. **Fernández, J. A., Santana, O., Guardiola, J. L., Molina, R. V., Heslop-Harrison, P., Borbely, G., ... & Thiercelin, J. M.** (2011). The world saffron and *Crocus* collection: strategies for establishment, management,

- characterisation and utilisation. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **58**(1), 125-137.
77. **Giaccio, M.** (2004). Crocetin from saffron: an active component of an ancient spice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **44**(3), 155-172.
 78. **Siracusa, L., Gresta, F., Avola, G., Lombardo, G. M., & Ruberto, G.** (2010). Influence of corm provenance and environmental condition on yield and apocarotenoid profiles in saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of food composition and analysis*, **23**(5), 394-400.
 79. **Gresta, F., Santonoceto, C., & Avola, G.** (2016). Crop rotation as an effective strategy for saffron (*Crocus sativus* L.) cultivation. *Scientia Horticulturae*, **211**, 34-39.
 80. **Gonda, S., Parizsa, P., Surányi, G., Gyémánt, G., & Vasas, G.** (2012). Quantification of main bioactive metabolites from saffron (*Crocus sativus*) stigmas by a micellar electrokinetic chromatographic (MEKC) method. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **66**, 68-74.
 81. **Kyriakoudi, A., Chrysanthou, A., Mantzouridou, F., & Tsimidou, M. Z.** (2012). Revisiting extraction of bioactive apocarotenoids from *Crocus sativus* L. dry stigmas (saffron). *Analytica chimica acta*, **755**, 77-85.
 82. **Kyriakoudi, A., O'Callaghan, Y. C., Galvin, K., Tsimidou, M. Z., & O'Brien, N. M.** (2015). Cellular Transport and Bioactivity of a Major Saffron Apocarotenoid, Picrocrocin (4-(β -D-Glucopyranosyloxy)-2, 6, 6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde). *Journal of agricultural and food chemistry*, **63**(39), 8662-8668.
 83. **Escribano, J., Alonso, G. L., Coca-Prados, M., & Fernández, J. A.** (1996). Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer letters*, **100**(1-2), 23-30.
 84. **Sánchez, A. M., Carmona, M., del Campo, C. P., & Alonso, G. L.** (2009). Solid-phase extraction for picrocrocin determination in the quality control of saffron spice (*Crocus sativus* L.). *Food Chemistry*, **116**(3), 792-798.
 85. **Himeno, H., & Sano, K.** (1987). Synthesis of crocin, picrocrocin and safranal by saffron stigma-like structures proliferated in vitro. *Agricultural and Biological Chemistry*, **51**(9), 2395-2400.

86. **Kiani, S., Minaei, S., & Ghasemi-Varnamkhasti, M.** (2018). Instrumental approaches and innovative systems for saffron quality assessment. *Journal of Food Engineering*, **216**, 1-10.
87. **Lage, M., & Cantrell, C. L.** (2009). Quantification of saffron (*Crocus sativus* L.) metabolites crocins, picrocrocin and safranal for quality determination of the spice grown under different environmental Moroccan conditions. *Scientia Horticulturae*, **121**(3), 366-373.
88. **Ordoudi, S. A., & Tsimidou, M. Z.** (2004). Saffron quality: Effect of agricultural practices, processing and storage. In *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops Volume 1* (pp. 209-260). Springer, Dordrecht.
89. **Aghdaie, S. F. A., Seidi, M., & Riasi, A.** (2012). Identifying the barriers to iran's saffron export by using porter's diamond model. *International journal of marketing studies*, **4**(5), 129.
90. **Srivastava, T. N., Rajasekharan, S., Badola, D. P., & Shah, D. C.** (1985). Important medicinal plants of Jammu and Kashmir I. Kesar (Saffron). *Ancient science of life*, **5**(1), 68.
91. **Kumar, R., Singh, V., Devi, K., Sharma, M., Singh, M. K., & Ahuja, P. S.** (2008). State of art of saffron (*Crocus sativus* L.) agronomy: a comprehensive review. *Food Reviews International*, **25**(1), 44-85.
92. **Bakhtavari, A. S., Khawar, K. M., & Arslan, N.** (2011). Ex vitro shoot regeneration and lateral buds of freshly harvested saffron corms. *African Journal of Agricultural Research*, **6**(15), 3583-3587.
93. **Emadi, B.** (2009). Separating saffron flower parts using vertical air column. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, **49**, 25-28.
94. **Acar, B., Sadikoglu, H., & Ozkaymak, M.** (2011). Freeze drying of saffron (*Crocus sativus* L.). *Drying Technology*, **29**(14), 1622-1627.
95. **Aytekin, A., & Acikgoz, A.** (2008). Hormone and microorganism treatments in the cultivation of saffron (*Crocus sativus* L.) plants. *Molecules*, **13**(5), 1135-1147.
96. **Dar, R. A., Shahnawaz, M., Malik, S. B., Sangale, M. K., Ade, A. B., & Qazi, P. H.** (2017). Cultivation, distribution, taxonomy, chemical composition and medical importance of *Crocus sativus*.

97. **Castillo, R., Fernández, J. A., & Gómez-Gómez, L.** (2005). Implications of carotenoid biosynthetic genes in apocarotenoid formation during the stigma development of *Crocus sativus* and its closer relatives. *Plant Physiology*, **139**(2), 674-689.
98. **Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Nebauer, S. G., Molina, R. V., & Gomez-Gomez, L.** (2015). Saffron: its phytochemistry, developmental processes, and biotechnological prospects. *Journal of agricultural and food chemistry*, **63**(40), 8751-8764.
99. **Ordoudi, S. A., Cagliani, L. R., Melidou, D., Tsimidou, M. Z., & Consonni, R.** (2017). Uncovering a challenging case of adulterated commercial saffron. *Food Control*, **81**, 147-155.
100. **Liu, M., Amini, A., & Ahmad, Z.** (2017). Safranal and its analogs inhibit *Escherichia coli* ATP synthase and cell growth. *International journal of biological macromolecules*, **95**, 145-152.
101. **Siddiqui, M. J., Saleh, M. S., Basharuiddin, S. N. B., Zamri, S. H. B., bin Mohd Najib, M. H., & bin Che Ibrahim, M. Z.** (2018). Saffron (*Crocus sativus* L.): As an antidepressant. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, **10**(4), 173.
102. **Bhargava, V. K.** (2011). Medicinal uses and pharmacological properties of *Crocus sativus* linn (saffron). *Int J Pharm Pharm Sci*, **3**(Suppl 3), 22-6.
103. **Bukhari, S. I., Manzoor, M., & Dhar, M. K.** (2018). A comprehensive review of the pharmacological potential of *Crocus sativus* and its bioactive apocarotenoids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **98**, 733-745.
104. **Bhandari, P. R.** (2015). *Crocus sativus* L.(saffron) for cancer chemoprevention: a mini review. *Journal of traditional and complementary medicine*, **5**(2), 81-87.
105. **Kabiri, M., Rezadoost, H., & Ghassempour, A.** (2017). A comparative quality study of saffron constituents through HPLC and HPTLC methods followed by isolation of crocins and picrocrocin. *LWT-Food Science and Technology*, **84**, 1-9.
106. **Nehvi, F. A., Yasmin, S., Sethi, J., & Sharma, E.** (2012, October). Saffron: from medicine to industry. In *IV International Symposium on Saffron Biology and Technology* 1200 (pp. 227-232).

107. **Javadi, B., Sahebkar, A., & Emami, S. A.** (2013). A survey on saffron in major islamic traditional medicine books. *Iranian journal of basic medical sciences*, **16**(1), 1.
108. **Sapanidou, V., Taitzoglou, I., Tsakmakidis, I., Kourtzelis, I., Fletouris, D., Theodoridis, A., ... & Tsantarliotou, M.** (2015). Antioxidant effect of crocin on bovine sperm quality and in vitro fertilization. *Theriogenology*, **84**(8), 1273-1282.
109. **Kalalinia, F., Ghasim, H., Farzad, S. A., Pishavar, E., Ramezani, M., & Hashemi, M.** (2018). Comparison of the effect of crocin and crocetin, two major compounds extracted from saffron, on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Life sciences*, **208**, 262-267.
110. **Alavizadeh, S. H., & Hosseinzadeh, H.** (2014). Bioactivity assessment and toxicity of crocin: a comprehensive review. *Food and Chemical Toxicology*, **64**, 65-80.
111. **Ji, A., Jia, J., Xu, Z., Li, Y., Bi, W., Ren, F., ... & Song, J.** (2017). Transcriptome-Guided Mining of Genes Involved in Crocin Biosynthesis. *Frontiers in plant science*, **8**, 518.
112. **Jiang, Z., Gu, M., Liu, J., Li, H., Peng, J., & Zhang, Y.** (2018). Anticancer activity of crocin against cervical carcinoma (HeLa cells): Bioassessment and toxicity evaluation of crocin in male albino rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **180**, 118-124.
113. **Suh, K. S., Chon, S., Jung, W. W., & Choi, E. M.** (2019). Crocin attenuates methylglyoxal-induced osteoclast dysfunction by regulating glyoxalase, oxidative stress, and mitochondrial function. *Food and Chemical Toxicology*, **124**, 367-373.
114. **Maggi, L., Carmona, M., Zalacain, A., Tomé, M. M., Murcia, M. A., & Alonso, G. L.** (2009). Parabens as agents for improving crocetin esters' shelf-life in aqueous saffron extracts. *Molecules*, **14**(3), 1160-1170.
115. **Melnyk, J. P., Wang, S., & Marccone, M. F.** (2010). Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. *Food research international*, **43**(8), 1981-1989.

116. **Shahi, T., Assadpour, E., & Jafari, S. M.** (2016). Main chemical compounds and pharmacological activities of stigmas and tepals of 'red gold'; saffron. *Trends in Food Science & Technology*, **58**, 69-78.
117. **Serrano-Díaz, J., Sánchez, A. M., Maggi, L., Carmona, M., & Alonso, G. L.** (2011). Synergic effect of water-soluble components on the coloring strength of saffron spice. *Journal of Food Composition and Analysis*, **24**(6), 873-879.
118. **Rahaiee, S., Moini, S., Hashemi, M., & Shojaosadati, S. A.** (2015). Evaluation of antioxidant activities of bioactive compounds and various extracts obtained from saffron (*Crocus sativus* L.): a review. *Journal of food science and technology*, **52**(4), 1881-1888.
119. **Isfahani, S. M. M., Mortezaeinejad, F., & Darbaghshahi, M. R. N.** (2013). Impact of Gibberellic acidon concentration of crocin, picrocrocin and safranal in *Crocus sativus* L. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, **6**(14), 1000.
120. **Gazeran, S., Tajalli, F., & Mohamadi Sani, A.** (2016). Effect of ultrasonic extraction on qualitative parameters of saffron edible extract. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **19**(5), 1286-1291.
121. **Kulkarni, S., Sane, A., Bhise, K., Patil, A., Dhamole, P., & Desai, S.** (2014). Development of extraction methods and quantification of Safranal by high performance liquid chromatography from *Cuminum cyminum* L. and studying its antimicrobial properties. *Int Cong Environl Biotechnol Chem Eng*, **64**.
122. **Ziaee, T., Razavi, B. M., & Hosseinzadeh, H.** (2014). Saffron reduced toxic effects of its constituent, safranal, in acute and subacute toxicities in rats. *Jundishapur journal of natural pharmaceutical products*, **9**(1), 3.
123. **Hosseinzadeh, H., Shakib, S. S., Sameni, A. K., & Taghiabadi, E.** (2013). Acute and subacute toxicity of safranal, a constituent of saffron, in mice and rats. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, **12**(1), 93.
124. **Rezaee, R., & Hosseinzadeh, H.** (2013). Safranal: from an aromatic natural product to a rewarding pharmacological agent. *Iranian journal of basic medical sciences*, **16**(1), 12.
125. **Sadeghnia, H. R., Kamkar, M., Assadpour, E., Boroushaki, M. T., & Ghorbani, A.** (2013). Protective effect of safranal, a constituent of *Crocus*

- sativus, on quinolinic acid-induced oxidative damage in rat hippocampus. Iranian journal of basic medical sciences, **16**(1), 73.
126. **Delkhosh-Kasmaie, F., Farshid, A. A., Tamaddonfard, E., & Imani, M.** (2018). The effects of safranal, a constitute of saffron, and metformin on spatial learning and memory impairments in type-1 diabetic rats: behavioral and hippocampal histopathological and biochemical evaluations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **107**, 203-211.
 127. **Fernández-Castané, A., Fehér, T., Carbonell, P., Pauthenier, C., & Faulon, J. L.** (2014). Computer-aided design for metabolic engineering. *Journal of biotechnology*, **192**, 302-313.
 128. **Bradley, R. W., Buck, M., & Wang, B.** (2016). Tools and principles for microbial gene circuit engineering. *Journal of molecular biology*, **428**(5), 862-888.
 129. **Tyo, K. E., Alper, H. S., & Stephanopoulos, G. N.** (2007). Expanding the metabolic engineering toolbox: more options to engineer cells. *Trends in biotechnology*, **25**(3), 132-137.
 130. **Lee, S. Y., Kim, H. U., Park, J. H., Park, J. M., & Kim, T. Y.** (2009). Metabolic engineering of microorganisms: general strategies and drug production. *Drug Discovery Today*, **14**(1-2), 78-88.
 131. **Khan, A. Z., Bilal, M., Rasheed, T., & Iqbal, H. M.** (2018). Advancements in biocatalysis: From computational to metabolic engineering. *Chinese Journal of Catalysis*, **39**(12), 1861-1868.
 132. **Lian, J., Mishra, S., & Zhao, H.** (2018). Recent advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: New tools and their applications. *Metabolic engineering*, **50**, 85-108.
 133. **Rollié, S., Mangold, M., & Sundmacher, K.** (2012). Designing biological systems: systems engineering meets synthetic biology. *Chemical Engineering Science*, **69**(1), 1-29.
 134. **Shapira, P., Kwon, S., & Youtie, J.** (2017). Tracking the emergence of synthetic biology. *Scientometrics*, **112**(3), 1439-1469.
 135. **Andrianantoandro, E., Basu, S., Karig, D. K., & Weiss, R.** (2006). Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline. *Molecular systems biology*, **2**(1).

136. **Martin, C. H., Nielsen, D. R., Solomon, K. V., & Prather, K. L. J.** (2009). Synthetic metabolism: engineering biology at the protein and pathway scales. *Chemistry & biology*, **16**(3), 277-286.
137. **Li, Y., & Pfeifer, B. A.** (2014). Heterologous production of plant-derived isoprenoid products in microbes and the application of metabolic engineering and synthetic biology. *Current opinion in plant biology*, **19**, 8-13.
138. **Kulkarni, R.** (2016). Biological Art of Producing Useful Chemicals. *Resonance*.
139. **Farré, G., Blancquaert, D., Capell, T., Van Der Straeten, D., Christou, P., & Zhu, C.** (2014). Engineering complex metabolic pathways in plants. *Annual review of plant biology*, **65**, 187-223.
140. **Caspi, R., Dreher, K., & Karp, P. D.** (2013). The challenge of constructing, classifying, and representing metabolic pathways. *FEMS microbiology letters*, **345**(2), 85-93.
141. **Dai, Z., & Nielsen, J.** (2015). Advancing metabolic engineering through systems biology of industrial microorganisms. *Current opinion in biotechnology*, **36**, 8-15.
142. **Bilyk, O., & Luzhetskyy, A.** (2016). Metabolic engineering of natural product biosynthesis in actinobacteria. *Current opinion in biotechnology*, **42**, 98-107.
143. **Misawa, N., & Shimada, H.** (1998). Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. *Journal of Biotechnology*, **59**(3), 169-181.
144. **Bachmann, B. O.** (2016). Applied evolutionary theories for engineering of secondary metabolic pathways. *Current opinion in chemical biology*, **35**, 133-141.
145. **Mora-Pale, M., Sanchez-Rodriguez, S. P., Linhardt, R. J., Dordick, J. S., & Koffas, M. A.** (2014). Biochemical strategies for enhancing the in vivo production of natural products with pharmaceutical potential. *Current opinion in biotechnology*, **25**, 86-94.
146. **Pontrelli, S., Chiu, T. Y., Lan, E. I., Chen, F. Y. H., Chang, P., & Liao, J. C.** (2018). *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering. *Metabolic engineering*, **50**, 16-46.

147. **Trethewey, R. N.** (2004). Metabolite profiling as an aid to metabolic engineering in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**(2), 196-201.
148. **Guzmán-Trampe, S., Ceapa, C. D., Manzo-Ruiz, M., & Sánchez, S.** (2017). Synthetic biology era: improving antibiotic's world. *Biochemical pharmacology*, **134**, 99-113.
149. **Kumar, R. R., & Prasad, S.** (2011). Metabolic engineering of bacteria. *Indian journal of microbiology*, **51**(3), 403-409.
150. **Verpoorte, R., & Memelink, J.** (2002). Engineering secondary metabolite production in plants. *Current opinion in biotechnology*, **13**(2), 181-187.
151. **Tatsis, E. C., & O'Connor, S. E.** (2016). New developments in engineering plant metabolic pathways. *Current opinion in biotechnology*, **42**, 126-132.
152. **Qi, H., Li, B. Z., Zhang, W. Q., Liu, D., & Yuan, Y. J.** (2015). Modularization of genetic elements promotes synthetic metabolic engineering. *Biotechnology advances*, **33**(7), 1412-1419.
153. **Marienhagen, J., & Bott, M.** (2013). Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. *Journal of biotechnology*, **163**(2), 166-178.
154. **Leitao, A. L., Costa, M. C., & Enguita, F. J.** (2017). Applications of genome editing by programmable nucleases to the metabolic engineering of secondary metabolites. *Journal of biotechnology*, **241**, 50-60.
155. **Sidebottom, A. M., & Carlson, E. E.** (2015). A reinvigorated era of bacterial secondary metabolite discovery. *Current opinion in chemical biology*, **24**, 104-111.
156. **Bhat, A., Mishra, S., Kaul, S., & Dhar, M. K.** (2018). Elucidation and functional characterization of CsPSY and CsUGT promoters in *Crocus sativus* L. *PloS one*, **13**(4), e0195348.
157. **IqbalMzr, J., Ahmed, N., Mokhdomi, T. A., Wafai, A. H., Wani, S. H., Bukhari, S., ... & Qadri, R. A.** (2013). Relative expression of apocarotenoid biosynthetic genes in developing stigmas of *Crocus sativus* L. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, **16**(3), 183-188.
158. **Baba, S. A., Mohiuddin, T., Basu, S., Swarnkar, M. K., Malik, A. H., Wani, Z. A., ... & Ashraf, N.** (2015). Comprehensive transcriptome analysis of *Crocus*

- sativus for discovery and expression of genes involved in apocarotenoid biosynthesis. *BMC genomics*, **16**(1), 698.
159. **Côté, F., Cormier, F., Dufresne, C., & Willemot, C.** (2000). Properties of a glucosyltransferase involved in crocin synthesis. *Plant Science*, **153**(1), 55-63.
 160. **Dufresne, C., Cormier, F., Dorion, S., Niggli, U. A., Pfister, S., & Pfander, H.** (1999). Glycosylation of encapsulated crocetin by a *Crocus sativus* L. cell culture. *Enzyme and Microbial Technology*, **24**(8-9), 453-462.
 161. **Ahrazem, O., Gómez-Gómez, L., Rodrigo, M., Avalos, J., & Limón, M.** (2016). Carotenoid cleavage oxygenases from microbes and photosynthetic organisms: features and functions. *International journal of molecular sciences*, **17**(11), 1781.
 162. **Frusciante, S., Diretto, G., Bruno, M., Ferrante, P., Pietrella, M., Prado-Cabrero, A., ... & Giuliano, G.** (2014). Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**(33), 12246-12251.
 163. **Tiwari, P., Sangwan, R. S., & Sangwan, N. S.** (2016). Plant secondary metabolism linked glycosyltransferases: an update on expanding knowledge and scopes. *Biotechnology advances*, **34**(5), 714-739.
 164. **Nagatoshi, M., Terasaka, K., Owaki, M., Sota, M., Inukai, T., Nagatsu, A., & Mizukami, H.** (2012). UGT75L6 and UGT94E5 mediate sequential glucosylation of crocetin to crocin in *Gardenia jasminoides*. *FEBS letters*, **586**(7), 1055-1061.
 165. **Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Trapero-Mozos, A., Climent, M. F. L., Gómez-Cadenas, A., & Gómez-Gómez, L.** (2015). Ectopic expression of a stress-inducible glycosyltransferase from saffron enhances salt and oxidative stress tolerance in *Arabidopsis* while alters anchor root formation. *Plant Science*, **234**, 60-73.
 166. **Trapero, A., Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Jimeno, M. L., Gómez, M. D., & Gómez-Gómez, L.** (2012). Characterization of a glucosyltransferase enzyme involved in the formation of kaempferol and quercetin sophorosides in *Crocus sativus*. *Plant physiology*, **159**(4), 1335-1354.

167. **Moraga, Á. R., Mozos, A. T., Ahrazem, O., & Gómez-Gómez, L.** (2009). Cloning and characterization of a glucosyltransferase from *Crocus sativus* stigmas involved in flavonoid glucosylation. *BMC plant biology*, 9(1), 109.
168. **Bhatia, Y., Mishra, S., & Bisaria, V. S.** (2002). Microbial β -glucosidases: cloning, properties, and applications. *Critical reviews in biotechnology*, **22**(4), 375-407.
169. **Toyama, D., de Moraes, M. A. B., Ramos, F. C., Zanphorlin, L. M., Tonoli, C. C. C., Balula, A. F., ... & Murakami, M. T.** (2018). A novel β -glucosidase isolated from the microbial metagenome of Lake Poraquê (Amazon, Brazil). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, **1866**(4), 569-579.
170. **Khan, S.** (2012). Molecular development of a thermostable β -glucosidase for modification of natural products.
171. **Ramani, G., Meera, B., Rajendhran, J., & Gunasekaran, P.** (2015). Transglycosylating glycoside hydrolase family 1 β -glucosidase from *Penicillium funiculosum* NCL1: Heterologous expression in *Escherichia coli* and characterization. *Biochemical engineering journal*, **102**, 6-13.
172. **Liu, J., Zhang, X., Fang, Z., Fang, W., Peng, H., & Xiao, Y.** (2011). The 184th residue of β -glucosidase Bgl1B plays an important role in glucose tolerance. *Journal of bioscience and bioengineering*, **112**(5), 447-450.
173. **Schnetz, K., & Rak, B.** (1988). Regulation of the bgl operon of *Escherichia coli* by transcriptional antitermination. *The EMBO journal*, **7**(10), 3271-3277.
174. **Schnetz, K., Toloczyki, C., & Rak, B.** (1987). Beta-glucoside (bgl) operon of *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence, genetic organization, and possible evolutionary relationship to regulatory components of two *Bacillus subtilis* genes. *Journal of bacteriology*, **169**(6), 2579-2590.
175. **Baba, S. A., Vishwakarma, R. A., & Ashraf, N.** (2017). Functional Characterization of CsBGlu12, a β -Glucosidase from *Crocus sativus*, Provides Insights into Its Role in Abiotic Stress through Accumulation of Antioxidant Flavonols. *Journal of Biological Chemistry*, **292**(11), 4700-4713.
176. **Zhang, L., Liu, Q., Pan, H., Li, X., & Guo, D.** (2017). Metabolic engineering of *Escherichia coli* to high efficient synthesis phenylacetic acid from phenylalanine. *AMB Express*, **7**(1), 105.

177. **Jo, J. E., Raj, S. M., Rathnasingh, C., Selvakumar, E., Jung, W. C., & Park, S.** (2008). Cloning, expression, and characterization of an aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli* K-12 that utilizes 3-hydroxypropionaldehyde as a substrate. *Applied microbiology and biotechnology*, **81**(1), 51.
178. **Ho, K. K., & Weiner, H.** (2005). Isolation and characterization of an aldehyde dehydrogenase encoded by the *aldB* gene of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, **187**(3), 1067-1073.
179. **Gómez-Gómez, L., Pacios, L., Diaz-Perales, A., Garrido-Arandia, M., Argandoña, J., Rubio-Moraga, Á., & Ahrazem, O.** (2018). Expression and Interaction Analysis among Saffron ALDHs and Crocetin Dialdehyde. *International journal of molecular sciences*, **19**(5), 1409.
180. **Demurtas, O. C., Frusciante, S., Ferrante, P., Diretto, G., Azad, N. H., Pietrella, M., ... & Al-Babili, S.** (2018). Candidate enzymes for saffron crocin biosynthesis are localized in multiple cellular compartments. *Plant physiology*, **177**(3), 990-1006.
181. **Bae, S.-J., S. Kim, and J.-S. Hahn.** 2016. "Efficient production of acetoin in *Saccharomyces cerevisiae* by disruption of 2, 3-butanediol dehydrogenase and expression of NADH oxidase", *Scientific Reports*, **6**: p. 27667.
182. **Kuş, Yasemin.** (2019). Mikrobiyal konsorsiyum mühendisliği yaklaşımıyla zeaksantin üretimi.
183. **Sambrook, J., Russell, D.W.,** 2001, *Molecular Cloning A Laboratory Manual I-II-III*, Third Edition, CSHL Press, New York.
184. **Garibyan, L., & Avashia, N.** (2013). Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). *The Journal of investigative dermatology*, **133**(3), e6.
185. **OL, P. O. O. K.** The polymerase chain reaction: An overview and development of diagnostic PCR protocols at the LCDC.
186. https://tr.wikipedia.org/wiki/Restriksiyon_enzimi, 2019.
187. https://en.wikipedia.org/wiki/Gibson_assembly, 2019.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: ESRA ÖZ

Meslek: BİYOMÜHENDİS

İletişim Bilgileri

E-Posta: esra.410@hotmail.com, esra.oz410@gmail.com

Adres Bilgileri: Fırat Üniversitesi-Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü,
Türkiye – Elazığ /Merkez

Cep Telefonu: +90 (535) 032 20 15

Kişisel Bilgiler

Uyruk: Türkiye Cumhuriyeti

TC. Kimlik No: 27208615034

Doğum Tarihi: 25.09.1993

Doğum Yeri: Türkiye/Malatya

Sürücü Belgesi: B Sınıfı (08.04.2019)

İş Tecrübesi

☐ Stajyer Mühendis

Tezkim Tarımsal Kimya San Tic A.Ş

08.2014- 09.2014 (1 ay) | Adana-Türkiye | Stajyer

Fırat Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi

07.2013-08.2013(1 ay) /Elazığ–Türkiye | Stajyer

Eğitim Bilgileri

Üniversite (Lisans):09.2011-06.2015

Fırat Üniversitesi- (İkinci Öğretim) Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik

Ortalama: 2,74

Lise: 11/2008– 06/2011

Hıdır Sever Lisesi -Fen Bilimleri (Alan)– ELAZIĞ

Yüksek Lisans: Fırat Üniversitesi – ELAZIĞ

Tez bilgileri:

Lisans: AIDS ve Fırsatçı Enfeksiyonlar

Yüksek Lisans: Zeaksantin Öncü Maddesini Kullanarak Safran Apokarotenoidlerinin Heterolog Mikrobiyal Biyosentezi (TUBİTAK-117 M 051, FÜBAP- MF1750)

Bursiyer – (1001) Metabolik Mühendisliği Yaklaşımıyla Biyosentetik Bir Alternatif Olarak Safran Apokarotenoidlerinin Mikrobiyal Sentezi ve Biyoreaktörde Üretimi (Tubitak-117M051)

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

V. Celik Ozgen* , E. ÖZ, A New Approach for Biosynthesis of Medicinal and Aromatic Plants: Metabolic Engineering of Saffron Plant, UGAP2018 - 1st International GAP Agriculture And Livestock Congress, 2018

Sertifikalar: HPLC (Ant Teknik)

Konferanslar: ‘Akkuyu Nükleer Enerji’ konferansı (Akkuyu Nükleer)