

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİKOPENİN REKOMBİNANT PSEUDOMONAS PUTIDA SOYUNDA
MİKROBİYAL ÜRETİMİ

SERAP SAKARYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2021

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LİKOPENİN REKOMBİNANT PSEUDOMONAS
PUTIDA SOYUNDA MİKROBİYAL ÜRETİMİ**

SERAP SAKARYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ
II. DANIŞMANI
DR. ÖZLEM AKKAYA

GEBZE

2021

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

MICROBIAL PRODUCTION OF LYCOPENE
IN RECOMBINANT PSEUDOMONAS
PUTIDA STRAIN

SERAP SAKARYA

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ
II. THESIS SUPERVISOR
DR. ÖZLEM AKKAYA

GEBZE

2021



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 29/01/2021 tarih ve 2021/05 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 16/02/2021 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Serap SAKARYA'nın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Mine GÜL ŞEKER

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Özge DİNÇ

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

Karotenoitler izoprenoitlerin önemli bir sınıfıdır. Bitkiler, algler, bakteriler ve mantarlarda bulunurlar. Bitki yapraklarının, meyvelerin ve çiçeklerin kırmızı, turuncu ve sarı renklerinden sorumludur. Etkili bir antioksidan ajan olması sebebiyle bazı kanser çeşitleri ile diğer dejeneratif insan hastalıkları için olası bir tedavi olarak bir karotenoid çeşidi olan likopenin takviyesi önerilmiştir. Bu nedenle metabolizma mühendisliği kullanılarak likopenin mikroorganizmalar tarafından daha fazla miktarda üretilmesine odaklanılmıştır. Tez çalışmasında likopen sentezinden sorumlu crtE, crtI ve crtB genlerini taşıyan *Pseudomonas putida* (P. putida) bakterisinde likopen üretimini iyileştirmede farklı karbon kaynaklarının optimizasyonu stratejisi izlenmiştir. Buna göre farklı besiyerlerinde değişik karbon kaynakları kullanılarak; elde edilen likopen miktarı spektrofotometrik ve analitik (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) yöntemler kullanılarak analiz edilmiştir. Spektrofotometrik analizler sonucunda elde edilen verilere göre 2xYT (Yeast Ekstrakt/Tripton) (303.6 µg/g) ve 2xYT+ 6 g/L glikoz (279 µg/g) besiyerlerinde yaklaşık olarak aynı miktarda likopen biyosentezi tespit edilmekle birlikte daha hassas ve güvenilir veri sağlayan HPLC analizi sonuçlarına göre ise likopen üretimi için test edilen koşullar içerisinde en uygun besiyeri 2xYT+ 6 g/L glikoz (114.9 ± 26.4 mg/L) olarak belirlenmiştir. P. putida bakterisinde likopen üretimine yönelik besiyeri optimizasyonuna dayalı detaylı bir araştırma mevcut olmadığından bu çalışma likopen biyosentezinde P. putida bakterisi için uygun besiyeri ve karbon kaynağı seçimi konusunda literatüre katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Likopen, *Pseudomonas putida*, 2xYT, Fruktoz, Glikoz.

SUMMARY

Carotenoids are an important class of isoprenoids. They are found in plants, algae, bacteria and fungi. They are responsible for the red, orange, yellow tones of plant leaves, fruits and flowers. Supplementation of lycopene, a type of carotenoid, has been suggested as a possible treatment for some types of cancer and other degenerative human diseases because it is an effective antioxidant agent. For this reason, the focus has been on the production of lycopene in greater amounts by microorganisms using metabolic engineering. In the thesis study, an optimization strategy of different carbon sources was followed to improve lycopene production in the bacterium *Pseudomonas putida* (*P. putida*), which carries the *crtE*, *crtI* and *crtB* genes responsible for lycopene synthesis. For this reason, using different carbon sources in various media; the lycopene amount obtained was analyzed using spectrophotometric and analytical (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) methods. According to the data obtained as a result of the spectrophotometric analysis, approximately the same amount of lycopene biosynthesis is detected in 2xYT (Yeast Ekstract/Tryptone) (303.6 µg/g) and 2xYT + 6 g/L glucose (279 µg/g) media, but according to the results of HPLC analysis, which provides more sensitive and reliable data, the most suitable medium for lycopene production is 2xYT + 6 g/L glucose (114.9 ± 26.4 mg/L). Since there is no detailed research based on media optimization for lycopene production in *P. putida*, this study will contribute to the literature on the selection of suitable media and carbon source for lycopene biosynthesis using *P. putida*.

Keywords: Lycopene, *Pseudomonas putida*, 2xYT, Fructose, Glucose.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardım ve destekleri ile her zaman yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini esirgemedi bana yol gösteren danışman hocam sayın Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ'ye; yüksek lisansımın sonuna kadar tüm bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, tez konumun belirleyicisi ve yürütücüsü olan, sonuçlarımın değerlendirilmesinde her zaman yanımda olan ikinci danışman hocam sayın Dr. Özlem AKKAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Mine GÜL ŞEKER'e ve bilgi ve tecrübeleriyle bana her zaman yol gösteren değerli hocam Öğr. Gör. Hamit EKİNCİ'ye teşekkür ederim.

Deneylerime hazırlık aşamasında yanımda olan, baştan beri bilgi ve deneyimleriyle bana katkı sağlayan çok değerli arkadaşım Ebru ARSLAN'a; gece gündüz demeden, benim deneylerimi kendi deneyi gibi benimseyip yardım eden, canım laboratuvar ve ev arkadaşım Buse Nur URAL'a; varlıkları ile beni her zaman mutlu eden, yüksek lisansım boyunca yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen fedakar ev arkadaşlarım Tuğçe ARIT, İlkay İLHAN ve Neslihan EL'e en içten dileklerle teşekkür ederim. Lisans eğitimimden bu yana yanımda olan, ne zaman ihtiyacım olsa yardımları ve motivasyonu bana destek olan kıymetli arkadaşım Gülcan AKKÖK'e; yüksek lisansım süresince desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, tanımaktan her zaman mutluluk duyacağım çok değerli laboratuvar arkadaşlarım Selin Gül ÜNSAL, Nil TÜRKÖLMEZ, Merve ALBAYRAK, Gülçiçek KILIÇ, İrem BAKŞAN İLTER, İlkay ÜNAL, Nida ARSLAN, Ömer İLTAŞ, Nicat CEBRAİLOĞLU, Sinem KURT, Hilal CİVELEK, Melike TEPE ve Burcu UZAN EKEN'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Son olarak, varlığını hep yanımda hissedeceğim canım dedem Halil SAKARYA'ya; hayatım boyunca her anımda bana olan güvenleri, sonsuz sevgileri, ve maddi manevi destekleri için; çok kıymetli annem ve babam Fadim SAKARYA'ya ve Osman SAKARYA'ya; babannem Şehri SAKARYA'ya; canım ablalarım ve kardeşim Sevim SAKARYA, Sibel SAKARYA ve Halil SAKARYA'ya; kıymetli kuzenlerim Dilek ÖZTÜRK ve Recep ÖZTÜRK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Sentetik Biyoloji ve Metabolizma Mühendisliği	4
2.2. <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	5
2.3. <i>Pseudomonas putida</i> EM42	6
2.4. <i>Pseudomonas putida</i> ve Metabolizma Mühendisliği	7
2.5. Karotenoidler	8
2.6. Karotenoidlerin Biyosentezi	12
2.7. Mikroorganizmalar ile Karotenoid Üretimi	15
2.8. Mikrobiyal Üretimin Avantaj ve Dezavantajları	15
2.8.1. Avantajları	16
2.8.2. Dezavantajları	16
2.9. Likopen	16
2.9.1. Likopenin Mikrobiyal Biyosentezi	19
2.10. Promotorlar ve IPTG	22
2.11. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM	26
3.1. Materyal	26
3.1.1. Kullanılan Bakteri Soyları	26
3.1.2. Kimyasallar	26
3.1.3. Cihazlar	27

3.2. Yöntem	28
3.2.1. Kullanılan Besiyerleri	28
3.2.1.1. Lysogeny (LB) Broth	28
3.2.1.2. 2xYeast Ekstrakt/Trypton (YT) Besiyeri	28
3.2.1.3. Otoindüksiyon Besiyeri	29
3.2.1.4. M9 Minimal Besiyeri	30
3.2.2. Likopen Üretimi İçin Yardımcı Karbon Kaynakları ve IPTG'nin Eklenmesi	31
3.2.3. Solüsyonlar ve Çözeltiler	32
3.2.3.1. M9 Salt Solüsyonu (10X)	32
3.2.3.2. MgSO ₄ (1 M) Çözeltisi	32
3.2.3.3. % 20 Sitrat Çözeltisi	33
3.2.3.4. % 1,6 Agar Çözeltisi	33
3.2.3.5. % 5 Kazein Çözeltisi	33
3.2.4. Bakteri Kültür Ortamı ve Koşulları	33
3.2.5. Likopen Ekstraksiyonu Yöntemi	34
3.2.6. Ölçüm ve Analizler	34
3.2.6.1. Spektrofotometrik Ölçüm	34
3.2.6.2. Likopen Miktarının Hesaplanması	34
3.2.6.3. Likopen Üretiminin Belirlenmesi İçin Kuru Ağırlık Tayini	35
3.2.6.4. HPLC Analizi	35
3.2.6.5. HPLC Analizi İçin Test Edilen Protokoller	36
3.2.6.6. İstatistiksel Analizler	37
4. SONUÇLAR	38
4.1. <i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC Soyunun Farklı Besiyerlerinde Ürettiği Likopen Miktarının Değerlendirilmesi	38
4.1.1. Likopen Üretimi İçin Yardımcı Karbon Kaynakları Kullanımının Optimizasyonu	38
4.1.2. LB+Fruktoz Besiyerinde Likopen Üretimi	39
4.1.3. LB+Fruktoz Besiyerinde IPTG'nin Likopen Üretimine Etkisi	42
4.1.4. LB+Glukoz Besiyerinde IPTG'nin Likopen Üretimine Etkisi	43
4.1.5. Otoindüksiyon Besiyerinde Likopen Üretimi	44

4.1.6. 2xYT Besiyerinde Likopen Üretimi	45
4.1.7. 2xYT Besiyerinde IPTG'nin Likopen Üretimine Etkisi	46
4.1.8. 2xYT Besiyerinde Yardımcı Karbon Kaynaklarının Hücre Büyümesi ve Likopen Miktarı Üzerine Etkisi	48
4.1.8.1. Fruktoz Konsantrasyonunun Optimizasyonu	48
4.1.8.2. 2xYT+Fruktoz Besiyerinde IPTG'nin Likopen Üretimine Etkisi	51
4.1.8.3. Glikoz Konsantrasyonunun Optimizasyonu	52
4.1.8.4. 2xYT+glikoz Besiyerinde IPTG'nin Likopen Üretimine Etkisi	56
4.1.8.5. M9 Minimal Besiyerinde Likopen Üretimi	57
4.1.8.6. M9 Kazein Minimal Besiyerinde Likopen Üretimi	58
4.1.8.7. M9 Kazein Minimal Besiyerinde (+Goodies) Likopen Üretimi	60
4.2. Fruktoz ve Glikoz Karbon Kaynaklarının 2xYT Besiyerinde pH Değişimine Etkisi	61
4.3. Likopen Konsantrasyonunun HPLC Analiziyle Belirlenmesi	62
4.3.1. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması	64
4.3.2. Yardımcı Karbon Kaynağı Olarak Fruktozun ve Glikozun Hücre Büyümesi ve Likopen Miktarı Üzerine Etkisi	65
5. TARTIŞMA	67
KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ	80

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
µl	: Mikrolitre
G	: Gram
°C	: Santigrat derece
dH ₂ O	: Distile su
<i>P. putida</i>	: <i>Pseudomonas putida</i>
PHBA	: Para hidroksi benzoik asit
GRAS	: Generally regarded as safe
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>S. cerevisiae</i>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
C	: Karbon
ATP	: Adenozin trifosfat
NAD(P)H	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
TEAC	: Antioksidan aktivitesi
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
pH	: Power of hydrogen
L	: Litre
MVA	: Mevalonat
MEP	: 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat
Ng	: Nanogram
IPP	: İzopentenil difosfat
DMAPP	: Dimetilallil difosfat
G3P	: Gliseraldehit-3-fosfat
HMG-CoA	: 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA
DXS	: DXP sentetaz
DXP	: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate
CTP	: Sitidin trifosfat

IDI	: IPP/DMAPP izomeraz
GGPP	: Geranilgeranil difosfat
FPP	: Farnesil pirofosfat
<i>crtE</i>	: GGPP sentaz
<i>crtB</i>	: Fitoen sentaz
<i>crtI</i>	: Fitoen desatüraz
%	: Yüzde
H	: Hidrojen
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
NO	: Nitrik asit
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
MCF-7	: Michigan Cancer Foundation-7
SD	: Shine Dalgarno
G	: Gram
DCW	: Dry cell weight
mg	: Miligram
IPTG	: İzopropil β-d-1-tiyogalaktopiranosid
RNAP	: RNA polimeraz
RNA	: Ribonükleik asit
RT	: Retention Time
ROS	: Reactive Oxygen Species
HPLC	: High Performance/Pressure Liquid Chromatography
Km ^R	: Kanamisin dirençlilik geni
Cm ^R	: Kloramfenikol dirençlilik geni
NaOH	: Sodyum hidroksit
mM	: Milimolar
M	: Molar
rpm	: Rounds per minute
UV	: Ultraviyole
OD	: Optical density
A	: Absorbans

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: <i>Pseudomonas putida</i> .	5
2.2: β -karoten molekül yapısı.	10
2.3: Likopen molekül yapısı.	10
2.4: Lutein molekül yapısı.	10
2.5: Zeaksantin molekül yapısı.	10
2.6: Karotenoid biyosentez yolu.	14
2.7: Likopenin kimyasal yapısı.	17
2.8: Likopen ve diğer karotenoidlerin MEP yolağı aracılığıyla biyosentez aşamaları.	20
4.1: <i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin farklı karbon kaynakları içeren LB besiyerindeki hücre yoğunluğu, A_{474}/OD_{600} değeri ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu.	39
4.2: 60 saat büyütülen <i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin LB+fruktoz besiyerindeki hücre yoğunluğu, A_{474}/OD_{600} değeri ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu.	40
4.3: 72 saat büyütülen <i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin LB+fruktoz besiyerindeki hücre yoğunluğu, A_{474}/OD_{600} değeri, yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu ve 48. saat pelet görüntüsü.	41
4.4: <i>E. coli</i> DH5 α pAC_LYC soyunun LB+fruktoz besiyerindeki A_{474}/OD_{600} değeri ve hücre yoğunluğu.	41
4.5: <i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin LB+fruktoz besiyerindeki hücre yoğunluğu, A_{474}/OD_{600} değeri ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonuna IPTG'nin etkisi.	43
4.6: <i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin LB+glikoz besiyerindeki hücre yoğunluğu, A_{474}/OD_{600} değeri, yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonuna IPTG'nin etkisi ve 48. saat pelet görüntüsü.	44

4.7:	<i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin otoindüksiyon besiyerindeki hücre yoğunluğu, A_{474}/OD_{600} değeri, yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu ve 48. saat pelet görüntüsü.	45
4.8:	<i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin 2xYT besiyerindeki hücre yoğunluğu, A_{474}/OD_{600} değeri ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu.	46
4.9:	<i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin 2xYT besiyerindeki hücre yoğunluğu, A_{474}/OD_{600} değeri ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonuna IPTG'nin etkisi.	47
4.10:	2xYT besiyerinde likopen üretiminin spektrofotometrik pik (A), erlen (B) ve pelet görüntüsü (C).	47
4.11:	<i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin 4 g/L fruktoz içeren 2xYT besiyerindeki hücre yoğunluğu, A_{474}/OD_{600} değeri ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu.	48
4.12:	<i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin 6 g/L fruktoz içeren 2xYT besiyerindeki hücre yoğunluğu, A_{474}/OD_{600} değeri ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu.	49
4.13:	<i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin 10 g/L fruktoz içeren 2xYT besiyerindeki hücre yoğunluğu, A_{474}/OD_{600} değeri ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu.	50
4.14:	Farklı fruktoz konsantrasyonlarında <i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin 72. saatteki hücre yoğunluğu ve yaş ağırlık dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu.	50
4.15:	<i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin 2xYT+fruktoz (6 g/L) besiyerindeki hücre yoğunluğu, A_{474}/OD_{600} değeri ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonuna IPTG'nin etkisi.	51
4.16:	<i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin 2xYT+fruktoz (10 g/L) besiyerindeki hücre yoğunluğu, A_{474}/OD_{600} değeri ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonuna IPTG'nin etkisi.	52

4.17:	<i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin 4 g/L glikoz içeren 2xYT besiyerindeki hücre yoğunluğu, A_{474}/OD_{600} değeri ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu.	53
4.18:	<i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin 6 g/L glikoz içeren 2xYT besiyerindeki hücre yoğunluğu, A_{474}/OD_{600} değeri ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu.	54
4.19:	<i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin 2xYT+glikoz (6 g/L) besiyerindeki 24. saat (a), 48. saat (b), 72. saat (c) pelet görüntüsü.	54
4.20:	<i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin 10 g/L glikoz içeren 2xYT besiyerindeki hücre yoğunluğu, A_{474}/OD_{600} değeri ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu.	55
4.21:	Farklı glikoz konsantrasyonlarında <i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin 72. saatteki hücre yoğunluğu ve yaş ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu.	55
4.22:	<i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin 2xYT+glikoz (6 g/L) besiyerindeki hücre yoğunluğu, A_{474}/OD_{600} değeri ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonuna IPTG'nin etkisi.	56
4.23:	<i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin 2xYT+glikoz (10 g/L) besiyerindeki hücre yoğunluğu, A_{474}/OD_{600} değeri ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonuna IPTG'nin etkisi.	57
4.24:	<i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin M9 minimal (sitrat) besiyerindeki A_{474}/OD_{600} değeri ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu.	58
4.25:	<i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin M9 kazein minimal (sitrat) besiyerindeki A_{474}/OD_{600} değeri ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu.	59
4.26:	<i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin M9 kazein (+goodies) minimal (sitrat) besiyerindeki A_{474}/OD_{600} değeri ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu.	60
4.27:	<i>P. putida</i> EM42'nin 2xYT, 6 g/L glikoz ve 6 g/L fruktoz karbon kaynakları içeren 2xYT besiyerindeki hücre yoğunluğu, pH değeri.	61

4.28:	<i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin 2xYT, 6 g/L glikoz ve 6 g/L fruktoz karbon kaynakları içeren 2xYT besiyerindeki hücre yoğunluğu, pH değeri.	62
4.29:	Mobil faz 1'de likopen standardının 21. dakikada gelen piki.	63
4.30:	Mobil faz 2'de likopen standardının 30. dakikada gelen piki.	63
4.31:	Mobil faz 3'de likopen standardının 41. dakikada gelen piki.	63
4.32:	Mobil faz 4'de likopen standardının 18. dakikada gelen piki.	64
4.33:	Likopen kalibrasyon eğrisi.	64
4.34:	<i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin ürettiği likopen pikinin HPLC görüntüsü.	64
4.35:	<i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin farklı besiyerlerinde 72. saatteki hücre yoğunluğu ve HPLC analizi sonucu elde edilen likopen üretimi.	66

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Karoten ve ksantofillerin antioksidan aktivitesi.	9
2.2: Likopenin kimyasal özelliği.	17
3.1: Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar.	26
3.2: Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.	27
3.3: LB besiyeri içeriği.	28
3.4: 2xYT besiyeri içeriği.	29
3.5: Otoindüksiyon besiyeri içeriği.	29
3.6: M9 minimal besiyeri içeriği.	30
3.7: Kullanılan yardımcı karbon kaynakları ve IPTG'nin denenen farklı konsantrasyonları, örnek toplanma saatleri.	31
3.8: M9 salt solüsyonu (10X) içeriği.	32
3.9: Kullanılan HPLC metodu.	36
3.10: HPLC analizi için test edilen protokoller.	36
4.1: <i>P. putida</i> EM42/pSEVA_LYC'nin farklı besiyerlerinde 72. saatteki kuru ağırlığı, kuru hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen miktarı ve HPLC analizi sonucu elde edilen likopen üretimi.	65

1. GİRİŞ

Değerli kimyasal bileşiklere olan talebin artmasıyla bu kimyasalların mikrobiyal yolla üretimi alternatif hale gelmiştir. Bu nedenle, endüstriyel ve farmasötik biyoteknoloji çalışmaları önümüzdeki yıllar içinde daha da önem kazanacaktır [Meyer and Turner, 2009]. Mikrobiyal üretim bizlere kolay çoğaltım, karbon kaynağı olarak diğer endüstrilerden gelen atık ürünlerin kullanılabilmesi gibi avantajlar sunmaktadır. Üretilmek istenilen molekül için gerekli olan besin, uygun pH ve sıcaklık optimizasyonları, mikroorganizmanın metabolik yollarındaki mühendislik çalışmaları mümkün olduğunca düşük maliyetle yapılması gerekmektedir [Chiang, 2004].

Yiyecek, içecek endüstrisinin yanı sıra parfüm, kozmetik, sağlık endüstrileri gibi diğer endüstriler tat ve koku olarak yararlanmak üzere karotenoidleri kullanırlar. Bazı etmenler, karotenoidlerin mikrobiyal yöntemlerle üretimi için araştırmacıları teşvik etmiştir. Bu faktörler; bitkisel hammaddenin bulunabilirliği ve yüksek fiyatı, bitkideki nispeten düşük terpen içeriği, endüstriyel ölçekte yeterli miktarda terpen üretimi için verimsiz ve uzun işlemlerle ekstraksiyon yöntemlerinin kullanılmasıdır. Aynı zamanda geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında, mikroorganizmalar toprağa gereksinim duymadan hızlı büyüme avantajına sahiptir [Kumaran et al., 2018].

Karotenoidler bitkilerde, alglerde, mantarlarda, kuşlarda ve balık eti kütikülünde bulunan doğal pigmentlerdir [Rao and Rao, 2007]. İnsanlar veya hayvanlar tarafından *in vivo* sentezlenemezler sadece diyet yoluyla alınabilirler [Saini et al., 2015]. Karotenoid pigmentler, anti-inflamatuar ve antioksidan özellikleri nedeniyle biyoaktif bileşikler olup insan hastalıklarının önlenmesinde ve sağlığının korunmasında önemli rol oynamaktadırlar. Bağışıklık sistemine destek olmanın yanında kalp ve damar hastalıkları, göz hastalıkları ve bazı kanser tipleri ile mücadele etmek için kullanılmaktadırlar. Dokulara zarar veren serbest radikalleri yok ederler, DNA hasarını önleyerek kansere karşı korurlar, LDL-kötü kolesterole karşı savaşırlar, A vitaminine dönüşerek gözde, kemiklerde, üreme ve bağışıklık sisteminde etki gösterirler [Clifton et al., 2004], [Ötleş ve Atlı, 1997]. Karotenoidleri doğrudan meyve ve sebze tüketerek vücudumuza aldığımızda derimizdeki karotenoid yoğunluğu artar ve cildin erken yaşlanmasına ve kırışmasına neden olabilecek serbest radikaller temizlenir. Klinik çalışmalar, karotenoid bileşiklerinin yara iyileşmesini

hızlandırdığını ve ultraviyole hasarını önleyerek cilt sağlığını koruduğunu ortaya koymaktadır [Darvin et al., 2011]. Karotenoidler hayvan beslenmesinde de önemli rol oynarlar. Daha iyi ürün rengi, daha verimli besin üretimi için tüm hayvanların karotenoidlere ihtiyacı vardır. Bu nedenle, karotenoidler hayvanlara yemleri ile birlikte takviye olarak verilmektedir [Vilchez et al., 2011].

Biyoteknolojinin özel ve çok önemli bir uygulama alanı olan rekombinant DNA teknolojisi veya genetik mühendisliği tıp, gıda teknolojisi ve eczacılık gibi bilim dallarında insanlığa geniş ufuklar açmış ve sayısız faydalar sağlamıştır. Organizmalardan genlerin izolasyonu, manipülasyonu ve bu gen ürünlerinin kontrollü bir şekilde organizmalarda ifade edilmesinin sağlanması genetik mühendisliğinin başlıca konularını oluşturmaktadır.

Uygulamalı alanlarda genetik mühendislik teknikleri sayesinde insan insülini, insan büyüme hormonu, interferon, aşılar ve endüstriyel enzimler gibi birçok maddenin mikroorganizmalar aracılığı ile üretilmesi mümkün olmuştur. Genlerin izole edildikten sonra özellikleri iyi bilinen mikroorganizmalara aktarılımları ile çok değerli biyolojik maddelerin bol ve ucuz şekilde elde edilmesi mümkün olmaktadır. Bu kapsamda hayatımızda büyük önemi olan karotenoidlerin metabolizma mühendisliği kullanılarak bakterilerde üretiminin sağlanması, söz konusu avantajlarından dolayı artan bir ilgi kazanmıştır [Leavell et al., 2016].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Etkili antioksidan özellikli likopen aynı zamanda bazı kanser türlerinin, kalp rahatsızlıklarının ve bazı dejeneratif hastalıkların tedavilerinde ön plana çıkmaktadır. Nötrosötik olarak da büyük ticari öneme sahiptir. Bu nedenle likopenin hızlı ve bol miktarlarda üretimi önemlidir. Önerilen tez çalışmasında *Erwinia herbicola* bakterisine ait likopen sentez genleri aktarılmış *P. putida* bakterisinde likopen üretimi ve eldesini etkileyecek adımlarda optimizasyon çalışmaları yapılarak maksimum seviyede likopen eldesi amaçlanmaktadır.

Karotenoidlerin üretimi doğal konakçılarında sınırlıdır. Besinsel değeri, hastalıkların tedavilerinde kullanımı ve endüstriyel öneminden dolayı likopenin bol miktarlarda, hızlı ve ucuz yolla üretimi büyük önem arz etmektedir. *P. putida* bakterisi bu konuda iyi bir alternatif mikrobiyal üretim platformu sunmaktadır. Likopen

biyosentez genlerinin plazmit üzerinde aktarıldığı *P. putida* bakterisinde likopen üretimine yönelik çalışmalar sınırlı olduğu için öngörülen tez çalışması literatüre katkı sağlayarak, likopen sentezi için optimal koşulların belirlenmesine yardımcı olarak bu alanda yapılacak yeni çalışmalara ışık tutacaktır.

P. putida normalde likopen üretmeyen bir bakteri türüdür. Çalışmada kullanılan bakteri soyu ise likopen üretmek için gerekli olan genlerin (*crtEIB*) aktarıldığı, *P. putida* EM42/pSEVA_LYC soyudur. Bu tez çalışmasında bakteri soyu steril kültür koşullarında, farklı karbon kaynakları içeren besiyerlerinde, farklı sürelerde izopropiltiyogalaktopiranosid (IPTG) ile uyarımlı ve uyarımsız koşullarda büyütülerek, likopen üretiminin optimizasyonuna gidilmiştir. Belirlenen karbon kaynakların seçilen 2xYT besiyerinde farklı konsantrasyonları denenerek optimizasyon yapılmıştır. Aynı zamanda fruktoz ve glikoz karbon kaynaklarının kullanıldığı 2xYT besiyerinde büyütülen *P. putida* EM42 ve *P. putida* EM42/pSEVA_LYC soyunda likopen üretimi üzerine pH değişiminin etkisi incelenmiştir. Daha sonra üretilen likopen miktarı spektrofotometrik ve analitik (HPLC) yöntemler kullanılarak analiz edilmiştir. HPLC analizinde farklı protokoller denenerek en uygun analiz koşulları belirlenmeye çalışılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

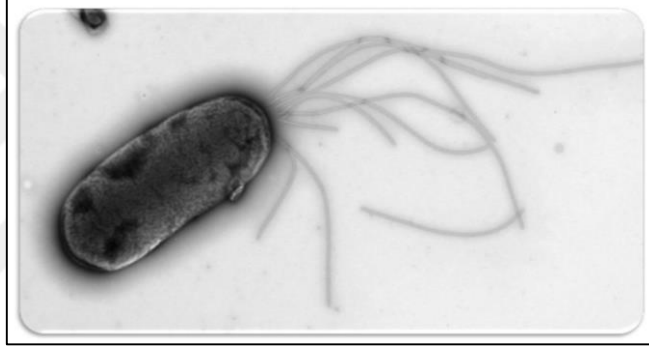
2.1. Sentetik Biyoloji ve Metabolizma Mühendisliği

Sentetik biyoloji mühendislikte uygulanan prensiplerin biyoloji alanında uygulanmasını içeren disiplinlerarası bir alandır. Mevcut olmayan biyolojik bileşenleri oluşturmayı amaçlar veya mevcut biyolojik sistemleri farklı amaçlar için yeniden dizayn eder [Chen, 2012]. Metabolizma mühendisliği, rekombinant DNA teknolojisinin kullanımı ile spesifik biyokimyasal reaksiyonların modifikasyonu veya yeni biyokimyasal reaksiyonların oluşturulması yoluyla hücrel özelliklerin yönlendirilmesidir. Metabolizma mühendisliğiyle bir organizmanın metabolik profilini değiştirmek veya biyosentetik yeteneklerini geliştirmek amacıyla, ilgili organizmanın genetik yapısında değişiklik yapılması hedeflenmektedir [Nielsen, 2001]. Moleküler biyoloji teknikleri alanındaki gelişmeler, sekanslama teknolojisinin maliyetindeki düşüşler yüksek miktarda genomik veri elde edilmesine ve doğal ürün yollarında yer alan birçok genin tanımlanmasına yol açmıştır. Sonuçta bu bilgiler karmaşık biyosentetik süreçler üzerinde benzeri görülmemiş miktarda kontrol sağlamıştır [Oberhardt et al., 2009].

Metabolizma mühendisliğinde verimi artırmak için, karbon akışı istenilen ürüne doğru artırılabilir, metabolik yolaktaki hız sınırlayıcı adımlar belirlenip rekabetçi yollar kapatılabilir, biyosentez süreçlerinde yer alan genleri kontrol eden regülatör genlerin ekspresyonu değiştirilebilir [Ramos et al., 2014], [Yabuzaki, 2017] ve organizmanın genomu yeniden düzenlenebilir [Nielsen, 2001]. Bu aşamadaki önemli bir basamak da konakçı seçimidir. Değerli bileşikleri kendiliğinden üretebilen mikroorganizmaların dışında, sentezlenmek istenilen bileşik ile ilgili genlerin heterolog ifade edilebilmesi için genetik olarak manipüle edilebilen, kültüre alınması güvenli ve ucuz olan bir konakçı mikroorganizmanın tercih edilmesine olanak sağlamaktadır [Bian et al., 2017].

2.2. *Pseudomonas putida* KT2440

P. putida bakterisi, çubuk formunda olup polar kamçılı, aerobik, gram negatif, bir bakteridir ve boyutu $0.5-1.0 \times 1.5-5.0 \mu\text{m}$ 'dur (Şekil 2.1; Fotoğraf: Esteban Martinez Garcia, CNB/CSIC, İspanya). *Pseudomonas* türlerinin yaşayabildikleri uygun sıcaklık $25-30^\circ\text{C}$ aralığında olmakla birlikte bu bakteri türleri su, toprak ve özellikle bitki rizosferinde bulunurlar. [Brenner et al., 2005]. Karbon ve enerji kaynağı olarak geniş bir organik bileşik kullanabilme yeteneğine sahip olduklarından dolayı besinlerin sınırlı olduğu habitatlarda bile kolonize olabilirler. Doğal mikrobiyal toplulukların önemli üyelerinden olan *Pseudomonas*lar bitki büyümesi üzerinde uyarıcı bir etkiye sahiptirler [Akkaya ve Arslan, 2019].



Şekil 2.1: *Pseudomonas putida*.

Pseudomonas türleri minimal besin gereksinimleri, basit büyüme koşulları ile bilinmektedirler. Bunların yanı sıra çeşitli bileşikler üretme ve degrade etme kapasiteleri nedeniyle, *Pseudomonas* türleri, çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadır [Delfan et al., 2012]. Bir biyopolimer olan ligninden naylon üretmek amaçlanırken katekol ara maddesinin toksisitesinden dolayı *P. putida* KT2440 kullanılmıştır, p-kumarik asitin üretiminin optimizasyonunda *P. putida*, tirozin ve p-kumarik asitin degradasyonunu önlemek için tasarlanmıştır [Kohlstedt et al., 2018], [Calero et al., 2016]. Yine ligninden glikozdan bağımsız olarak mukonik asit sentezleyebilmek için bu bakteri ile çalışılmıştır [Sonoki et al., 2018]. Gıda, ilaç ve kişisel bakım ürünlerinde yaygın bir koruyucu olan parabenlerin hazırlanmasında önemli olan para hidroksi benzoik asit (PHBA) üretimi için tasarlanmıştır [Yu et al., 2016]. Etilen glikol antifiriz ve boru hatlarında, diğer birçok endüstriyel uygulamada hammadde olarak kullanılır. Etilen glikol metabolize edilirken oluşan toksik ara

maddelerden daha fazla korunmak için *P. putida* KT2440 ile çalışılmıştır [Franden et al., 2018]. Biyotransformasyon yaklaşımları kullanılarak karotenoid sınıfından zeaksantin ve likopen izoprenoidlerinin üretimi için kullanılmıştır [Beuttler et al., 2011], [Hernandez-Arranz et al., 2019]. Ancak *P. putida* bakterisinde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Pseudomonas cinsinin üyeleri, çeşitli hidrokarbonların, aromatik bileşiklerin ve bunların türevlerinin toksisitesine karşı toleransı ile ünlüdür. Bu bileşiklerin önemli bir kısmı toksiktir ve çevresel kirletici maddeler olarak bilinmelerine karşın çoğu, *Pseudomonas* türleri tarafından büyümeleri için kullanılabilirler [Nelson et al., 2002]. Aynı zamanda, bakteri antibiyotikler ve organik çözücüler dahil olmak üzere ksenobiyotiklere karşı yüksek bir tolerans gösterirler [Fernández et al., 2009]

P. putida KT2440 saprofitik, patojenik olmayan, GRAS (generally regarded as safe) sertifikalı bir bakteridir. *Escherichia coli* (*E. coli*) dahil olmak üzere diğer mikrobiyal platformlar için inhibitör olan endojen ve eksojen streslere karşı yüksek oranda dirençlidir. Endüstriyel olarak ilgili kimyasallara (etanol, kumarik asit, tolüen); biyokütle hidrolizi sonucu oluşan ürünlere (furfural, benzoat, asetik asit) karşı dayanıklıdır. Örneğin *E. coli* veya *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) için toksik olan monoterpen geranik asitin yüksek konsantrasyonlarından etkilenmezler [Mi et al., 2014]. *P. putida* KT2440'ın büyüyebileceği disakkaritler sınırlıdır (glukoz, fruktoz). Bazı 5C'lu şekerleri ve disakkaritleri verimli şekilde metabolize edemediklerinden selülozik ve hemiselülozik atıkların karbonhidrat ürünlerini işlemek için platform olarak kullanımlarını sınırlamaktadır [Kim and Park, 2014]. Buna karşın *P. putida* KT2440, çok yönlü metabolizması, basit besin gereksinimi ile hızlı büyüme oranı ve zorlu çevre koşullarına karşı yüksek dayanıklılık göstermesi gibi avantajlı birçok özelliğiyle biyoteknolojik çalışmalar için ön plana çıkmaktadır [Ebert et al., 2011], [Poblete-Castro et al., 2012].

2.3. *Pseudomonas putida* EM42

P. putida KT2440 suşunun genomu düzenlenerek elde edilmiştir. Karakterize edilmiş en kapsamlı *Pseudomonas* olarak, günümüzde moleküler biyoloji alanında kullanılan mevcut sistemler ve sentetik biyoloji araçlarının kullanılabilirliğine sahiptir [Dammeyer et al., 2011], [Nikel and Lorenzo, 2014]. *P. putida* EM42 suşu KT2440

suşu ile karşılaştırıldığında oksidatif strese karşı daha düşük duyarlılık, artmış büyüme oranı ve heterolog genlerin daha iyi ekspresyonu dahil olmak üzere gelişmiş fizyolojik özelliklere sahiptir. Çeşitli enerji tüketen fonksiyonlarının silinmesiyle genomu düzenlenmiş olan *P. putida* EM42 suşunun hücre içindeki daha yüksek ATP seviyesi, bu bakterinin yüksek sıcaklığa karşı tolerans penceresini genişletmiştir. *Pseudomonas* türlerinin doğal nişlerindeki büyüme optimum sıcaklıkları 25-30 °C aralığındadır. *P. putida* KT2440'ın 42°C'de ölümü gerçekleşirken, EM42 varyant popülasyonun çoğu en az 6 saat boyunca 42°C'de büyüme ve yaşamını korumuştur. Heterolog ekspresyon çalışmalarında yüksek sıcaklığa toleransı fazla olan bu varyantın kullanılmasının oldukça faydalı olacağı düşünülmektedir.

Endüstriyel uygulamalarda kullanabilmek adına daha uygun hale getirmek için *P. putida* EM42; *P. putida* KT2440'ın genomundan yaklaşık 300 geninin (yaklaşık % 4.3) silinmesiyle tüm kararsızlıklardan uzaklaştırılarak tasarlanmıştır. Kamçı mekanizmaları da ortadan kaldırılmıştır. Elde edilen hareketsiz suşun farklı tipte fizikokimyasal streslere dayanmada yaban tipi soydan daha üstün olduğu ortaya çıkmıştır. Genomu indirgenmiş suş *P. putida* EM42'nin hücre içi ATP ve NAD(P)H seviyeleri % 20 oranında artmıştır [Martinez Garcia et al., 2014].

2.4. *Pseudomonas putida* ve Metabolizma Mühendisliği

Son yıllarda çok basit manipülasyonlardan daha karmaşık tasarımlara kadar değişen metabolik mühendislik yaklaşımları, endüstriyel olarak önem taşıyan bileşiklerin sayısını büyük ölçüde artırmıştır [Nielsen and Keasling, 2016], [Park et al., 2018], [Woolston et al., 2013].

Toprak bakterileri, bulundukları ortamda zorlu koşullara (sıcaklık, su, pH değişimi, kendilerine rakip olan diğer mikroorganizmalar, patojenler vb.) maruz kaldıkları için metabolizma mühendisliği çalışmalarında kullanılmak üzere dikkat çeken mikroorganizmalardır. Bugüne kadar, doğal olarak izole edilmiş hiçbir bakteri suşu, optimal bir konakçı için gerekli olan tüm özelliklere sahip değildir. Genetik ve metabolizma mühendisliği çalışmalarıyla fonksiyonel bir konakçı geliştirmenin temeli olarak zorlu ortam koşullarına ve hücre içinde biriken ara maddelerin toksik etkilerine karşı dayanıklı bir bakterinin benimsenmesi çok önemlidir. Bu niteliklerin başlıca örneklerinden biri olarak *P. putida* akla gelmektedir [Beites and Mendes, 2015].

2.5. Karotenoidler

Karotenoidler, bitkiler ve bazı mikroorganizmalar tarafından doğal olarak sentezlenen ve birçok önemli fizyolojik işlevi yerine getiren kırmızı, turuncu ve sarı pigmentlerdir. Fotosentetik organizmalarda fotosentez ve ışığa karşı korumada gerekli iken; fotosentetik olmayan organizmalarda ışıktan kaynaklanan oksidatif hasarı hafifletmeye yarar sağlamaktadırlar. Oksidatif hasara karşı karotenoidleri etkili hale getiren yapılarında bulunan konjuge çift bağlardır. Tetraterpenoid olan karotenoidler C₄₀ yapısına sahip olup yan yana dizilen 8 tane izoprenin oluşturduğu merkezi iskelete sahiptirler [Mezzomo and Ferreira, 2016]. Karotenoidler, elektron açısından zengin polien zincirleri sayesinde ışığa, ısıya, oksijene, asitlere ve bazik pH değerlerine maruz kaldıklarında bozulmaya karşı oldukça duyarlıdırlar [Xu et al., 2018].

Konjuge çift bağ sistemi, pigmentlere kolayca izomerize edilebilen ve oksitlenebilen yüksek kimyasal reaktivite sağlar [Oliver and Palou, 2000]. Günümüze kadar karotenoidler, 1100'den fazla farklı kimyasal yapıda tespit edilen büyük bir pigment sınıfıdır [Yabuzaki, 2017]. Bu pigmentlerin büyük çoğunluğu elektromanyetik spektrumun görünür bölgesinin (400-500 nm) bir kısmını absorbe etmektedir. Birçok organizma, bozunmadan kaçınmaya bir yanıt olarak biyotik ve abiyotik stresler altında karotenoid oluşturma eğilimindedir.

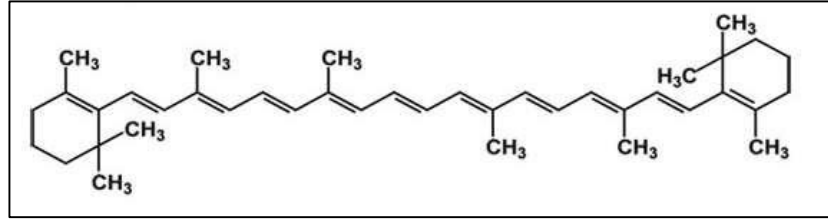
Karotenoidler renklendirici özelliklerinden dolayı genellikle gıda, ilaç, kozmetik ve hayvan yemi endüstrilerinde kullanılırlar. Ayrıca provitamin A gibi olası aktiviteleri ve bağışıklık sistemini güçlendirme, dejeneratif hastalık riskini azaltma, antioksidan özellikler ve antiobezite gibi sağlık yararına biyolojik işlevleri nedeniyle gıda takviyesinde de kullanılırlar [Niizu, 2003]. A vitamini epitel dokuların büyümesi, gelişimi, bakımı; üreme, bağışıklık sistemi ve özellikle fotoreseptörlerin rejenerasyonunda rol oynamaktadır. Eksikliği, gelişmekte olan ülkelerde bebek ölümlerinin başlıca nedeni olan ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Çocuklukta körlüğe, büyüme bozukluklarına ve öğrenme güçlüklerine yol açar. Öte yandan, A vitamini fazlalığı toksiktir ve gebelikte doğuştan malformasyona, kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda kemik hastalığına, körlüğe ve ölüme neden olabilir [Ambrósio et al., 2006], [Carvalho et al., 2006]. Karotenoidler, değişen seviyelerde dönüşüm verimliliği ile vücudun ihtiyaç duyduğu şekilde A vitaminine dönüştürülür. Ek olarak, bitkilerde üretilen karotenoidler de türlerin hayatta kalması ve yayılması için önemli olan hayati

bir ekolojik rol oynamaktadırlar; çünkü tozlaşma ve tohum için böcekleri ve hayvanları kendilerine çekmede önemli bir işaret olan meyve ve çiçeklerin rengine katkıda bulunmaktadırlar, yüksek ışık stresi altında potansiyel olarak ölümcül etkilere sahip olan yüksek derecede reaktif serbest oksijenin oluşumunu önleyerek ışığa karşı korumada oldukça önemlidirler [Lu and Li, 2008]. Her ne kadar hayvanlar bu bileşenleri kendileri sentezleyemezler ve diyet yoluyla alsalarda Arizona Üniversitesi araştırmacıları, yaprak bitlerinin yatay gen transferi yoluyla karotenoidleri sentezleyebildiğini bildirmişlerdir [Moran and Jarvik, 2010]. Hayvanlarda bu pigmentler belirli dokularda birikerek birçok kuşa, deniz omurgasına ve balıklara karakteristik renkler verir. Astaksantin gibi karotenoidler bazı deniz hayvanlarının (örn; somon, alabalık, karides ve ıstakoz) ve kuşların (örn; flamingo ve bıldırcın) dokularına pigmentasyon sağlayarak bağışıklık sistemini geliştirir [Nisar et al., 2015]. Karotenoidler, kendilerine renklerini veren konjuge çift bağ sistemi ve metil grupları bağlanmış alifatik bir zincirden oluşmaktadır; konjuge bağ sayısı arttıkça renk yoğunluğu da artmaktadır [Lindqvist and Andersson, 2002]. Olson'a göre, karotenoidler tekli oksijeni kaybederek, serbest radikalleri uzaklaştırır, kanserojen metabolizmayı modüle eder, hücre proliferasyonunu inhibe eder, hücreler arasındaki iletişimi uyarır ve bağışıklık yanıtını artırır. *In vitro* ve *in vivo* testler, karotenoidlerin mükemmel antioksidanlar olduğunu göstermektedir [Olson, 1999]. Bazı karotenoidlerin antioksidan aktivitesi (TEAC) Tablo 2.1'de gösterilmiştir [Yıldız, 2019].

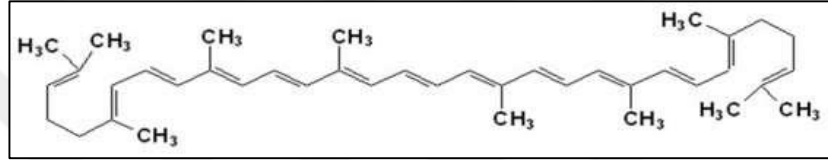
Tablo 2.1: Karoten ve ksantofillerin antioksidan aktivitesi.

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

Karoten yapısında eğer karbon bulunduruyorsa karotenoid, oksijen bulunduruyorsa ksantofil adı verilmek üzere karotenoidler yapılarına göre “hidrokarbon karotenoidler” ve “ksantofiller” olarak iki gruba ayrılmaktadır. Apolar özellikte olan hidrokarbon karotenoidlerin başlıcaları; α -karoten, β -karoten (Şekil 2.2) ve likopendir (Şekil 2.3) [Yıldız, 2019].

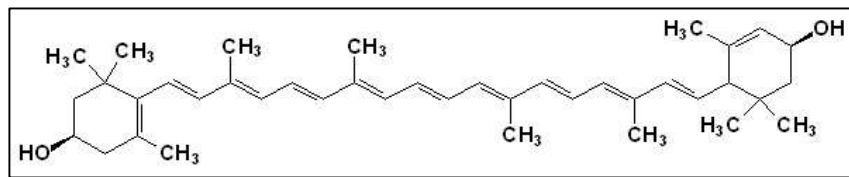


Şekil 2.2: β -karoten molekül yapısı.

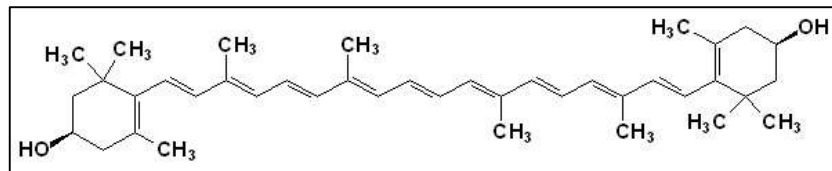


Şekil 2.3: Likopen molekül yapısı.

Yapısında karboksi, hidroksi, keto-metoksi ve epoksi formunda oksijen içeren, daha polar özellikte olan ksantofillere örnek ise, β -kriptoksantin, lutein (Şekil 2.4) ve zeaksantin (Şekil 2.5) verilebilir [Yıldız, 2019], [Bağdatlıoğlu ve Demirbuke, 1999].



Şekil 2.4: Lutein molekül yapısı.



Şekil 2.5: Zeaksantin molekül yapısı.

Karotenoidler önemli membran bileşenleridir, çünkü bunlar genellikle hidrofobik lipid çekirdeğinin derinliklerinde yer alan ve membran yüzeyine paralel (β -karoten gibi polar olmayan karotenoidler) olan veya membran ikili tabakasını kapsayan (astaksantin gibi polar olan karotenoidler) lipitte çözünür pigmentlerdir [Britton, 2008]. Bu özelliklerinden ötürü apolar organik çözücülerde çözünmekte olup, alkolde çözünmezler. Çoklu doymamış bir yapıya sahip olan karotenoidler, ısıl kararlılığa sahip olmakla birlikte proses ve depolama sırasında izomerizasyona uğramaktadır. Karotenoidlerin çift bağ sisteminde meydana gelen izomerizasyonlar renk yoğunluğunda azalmaya neden olmaktadır [Schieber and Carle, 2005]. Bu çift bağ sebebiyle karotenoidler kolaylıkla okside olurlar. Böylece, karotenoidlerin membran hasarını önlemek için ışığa karşı korumanın yanı sıra, membranların yapısı ve dinamikleri üzerinde de etkileri vardır [Gruszecki and Strzalka, 2005].

Sentetik karotenid kaynakları kimyasal yollarla elde edilmektedirler, yemlere eklenerek yem maliyetini artırırlar. Örnek olarak, astaksantin balıketinin doğal pembe renginin elde edilmesi için ticari olarak kullanılmaktadır. Günümüzde sentetik karotenoidler ithal edildiklerinden dolayı dışa bağımlılığı ve fazla maliyeti önlemek adına doğal karotenoidlere yönelim söz konusudur [Rojas et al., 2017].

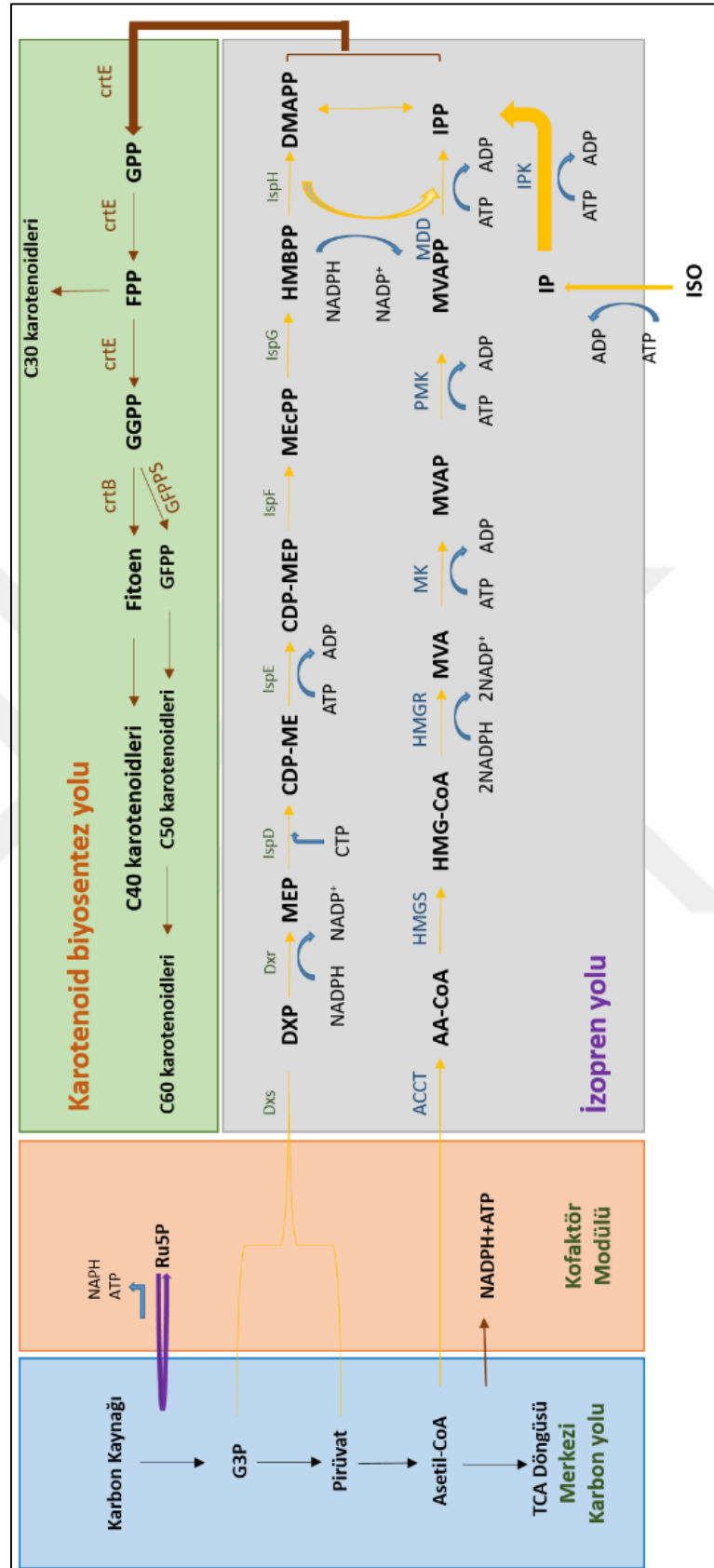
Bitki ve hayvanlarda olduğu gibi karotenoidlerin, mikrobiyal hücrelerde de önemli fizyolojik rol oynadıkları bilinmektedir. Bununla birlikte mikroorganizmalardaki karotenoidlerin hücresel işlevleriyle ilgili çalışmalar nadirdir. Bu alandaki araştırmaların amaçları mikroorganizmaların ekonomik anlamda önemli karotenoidlerin kaynağı olarak kullanılmasına odaklanmıştır. Doğal ortamlardaki mikroorganizmalar genellikle ticarileştirme için yetersiz verim sağlar. Çok çeşitli (tercihen ucuz) karbon ve azot kaynaklarının kullanılması, pH toleransı, sıcaklık gereksinimi, gerekli mineral konsantrasyonu, gerekli ışık koşulları dahil olmak üzere, mikroorganizmalar tarafından endüstriyel karotenoid üretimi için çeşitli kriterler değerlendirilmektedir. Belirli bir pigment üreten veya ticari alanlarda uygulanabilir yeni özelliklere sahip tanımlanmamış pigmentler üreten yeni mikroorganizmaları keşfetme ilgisi son yıllarda önemli ölçüde artmıştır.

2.6. Karotenoidlerin Biyosentezi

Bugüne kadar bitkilerde, mikroalglerde, mantarlarda ve bakterilerde binden fazla doğal karotenoid bulunmuştur [Yabuzaki, 2017]. Karotenoidlerin biyosentez yolağı Şekil 2.6’da gösterildiği gibi iki farklı yolla gerçekleşmektedir [Li et al., 2020]. Bunlardan biri mevalonat (MVA) yolu, esas olarak ökaryotlarda ve arkealarda bulunurken, 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat (MEP) yolu tipik olarak çoğu bakteri ve bitki plastidinde bulunur [Chatzivasileiou, 2019]. 5C’lu iki alt birim olan izopentenil difosfat (IPP) ve onun izomerik formu dimetilallil difosfat (DMAPP), C40 ve C50 karotenoidlerinin üretimi için evrensel öncülerdir. Bu iki izoprenoid öncülünün *in vivo* olarak biyosentezi sözü edilen iki yolla gerçekleşir. MVA ve MEP yolaklarının substratları, tümü merkezi karbon yolu tarafından sağlanan asetil-CoA, gliseraldehit-3-fosfat (G3P) ve piruvattır [Wang et al., 2016], [Zhao et al., 2013]. Mikrobiyal konakçılar tipik olarak, karotenoid biyosentezinde kritik kofaktörleri (ATP ve NADPH) sağlamak için merkezi karbon yolağını kullanır [Alper vd., 2005]. Bu yolaklarda bir dizi enzim, asetil-CoA, piruvat ve G3P’nin, IPP ve DMAPP’e dönüşümünü katalize eder. MVA yolağında, bir IPP molekülü üretmek için, 1,5 glikoz molekülü ve 3 ATP molekülü tüketilir ve MVA yolağı kullanılarak dört NADPH molekülü üretilirken, MEP kullanılarak bir glikoz molekülü, 3 ATP molekülü ve iki NADPH molekülü gereklidir [Li et al., 2020]. MVA yolağında, iki asetil-CoA molekülü, 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) oluşturmak için yoğunlaştırılır, daha sonra bir indirgeme reaksiyonu sonucu mevalonat üretilir ve IPP üretmek için üç fosforilasyon ve bir dekarboksilasyon reaksiyonu gerçekleşir. MEP yolağında IPP üretimi G3P ve pirüvatın yoğunlaştırılmasıyla başlar. DXP sentetaz (DXS) ile DXP oluşumu ve ardından DXP redüktoizomeraz enzimi vasıtasıyla indirgeyici bir izomerizasyon reaksiyonu ile MEP bileşiği oluşur, ardından sitidin trifosfat (CTP) ile birleşme ve son olarak bir fosforilasyon ve siklizasyon reaksiyonu sonucu IPP oluşur. IPP’nin DMAPP’e izomerizasyonu IPP/DMAPP izomeraz (IDI) ile gerçekleşmektedir. İzopren öncülerinin oluşumunun ardından, bir DMAPP molekülü ve üç IPP molekülü, bir geranilgeranil difosfat (GGPP) oluşumu için yoğunlaştırılır. IPP ve DMAPP, farnesil pirofosfat (FPP) sentaz ile FPP’ye dönüştürülür. Daha sonra FPP, karotenoid biyosentezinin öncü molekülü C20 GGPP’nin biyosentezi diğer bir enzim olan GGPP sentaz (*crtE*) ile gerçekleşir.

Sonuçta oluşan iki tane GGPP molekülü fitoen sentaz (*crtB*) ile karotenoid biyosentez yolağındaki ilk kararlı adım olan, rengi olmayan fitoeni oluşturmak için birbirini ardınca eklenmektedir; sonrasında fitoen desatüraz (*crtI*) biyosentez yolundaki ilk renkli karoten olan likopeni oluşturmaktadır. Likopen 1100 farklı karotenoid veren bu yolağın omurgası olarak kabul edilmektedir. Likopen β -siklaz tarafından β -iyonon halkalarının eklenmesiyle likopenin her iki ucunda siklizasyon yapılarak, α -karoten ve β -karoten oluşturulmaktadır. Daha sonra α -karoten ve β -karotenin lutein ve zeaksantine hidroksilasyonu, sırasıyla β -halkalı hidroksilaz ve α -halkalı hidroksilaz yoluyla gerçekleşmektedir [Moise et al., 2014].





Şekil 2.6: Karotenoid biyosentez yolu.

2.7. Mikroorganizmalar ile Karotenoid Üretimi

Doğal ürünler, endüstriyel takviyeler, aromalar veya kokular yaşam kalitemizi artırmak için çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Doğal ürünlerden en yaygını karotenoidlerdir [Avalos and Limón, 2015]. Yapısal olarak karmaşık olan karotenoidlerin çoğunun ekonomik nedenlerden dolayı kimyasal olarak sentezlenmesi tercih edilmemektedir [Zhang et al., 2008]. Bu karmaşık çok aşamalı süreçlerden sonra doğal kaynaklarından düşük verimde sentezlenmiş olurlar [Adadi et al., 2018]. Karotenoidlerin mikrobiyal üretimleri, mahsul yetiştirmek, mahsullerin hasatı ve uzun aşamalı ekstraksiyonlarda harcanan zamanı gerektirmediği için tercih edilmektedir [Jia and Schwille, 2019]. Mikroorganizmaların genetik ve metabolik mühendisliğindeki son gelişmeler, konakçı mikroorganizmaların gelişmiş mikrobiyal hücre fabrikaları olarak tasarlanmasını ve optimize edilmesini giderek daha fazla mümkün kılmaktadır [Ajikumar et al., 2010].

2.8. Mikrobiyal Üretimin Avantaj ve Dezavantajları

Doğal ürünler, endüstriyel takviyeler, aromalar veya kokular yaşam kalitemizi artırmak için çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Doğal ürünlerden en yaygını karotenoidlerdir [Avalos and Limón, 2015]. Yapısal olarak karmaşık olan karotenoidlerin çoğunun ekonomik nedenlerden dolayı kimyasal olarak sentezlenmesi tercih edilmemektedir [Zhang et al., 2008]. Bu karmaşık çok aşamalı süreçlerden sonra doğal kaynaklarından düşük verimde sentezlenmiş olurlar [Adadi et al., 2018]. Karotenoidlerin mikrobiyal üretimleri, mahsul yetiştirmek, mahsullerin hasatı ve uzun aşamalı ekstraksiyonlarda harcanan zamanı gerektirmediği için tercih edilmektedir [Jia and Schwille, 2019]. Mikroorganizmaların genetik ve metabolik mühendisliğindeki son gelişmeler, konakçı mikroorganizmaların gelişmiş mikrobiyal hücre fabrikaları olarak tasarlanmasını ve optimize edilmesini giderek daha fazla mümkün kılmaktadır [Ajikumar et al., 2010].

2.8.1. Avantajları

Bileşiklerin mikrobiyal olarak üretilmesi, çeşitli pigment veren bileşiklerin elde edilmesi, düşük ortam gereksinimleri ve mevsimsel koşullara bağımlı olmamaları nedeniyle avantajlıdır. Enzimler, amino asitler, vitaminler gibi diğer değerli bileşiklerle birlikte üretim imkanı sağlar. Düşük maliyetli karbon ve nitrojen kaynakları için şeker kamışı ve pancar pekmezi gibi tarımsal endüstriyel atıkların kullanımı karotenoid üretim maliyetlerini daha da azaltır ve atıkların güvenli bir şekilde bertaraf edilmesini sağlar. Bakterilerin prokaryotik doğası, daha kolay genetik modifikasyonlar sağlar. Bakteri popülasyonunun yalnızca <1'i bilindiğinden, diğer bakteri türlerinin araştırılması yeni karotenoidlerin tanımlanmasına yol açabilir [Ram et al., 2020].

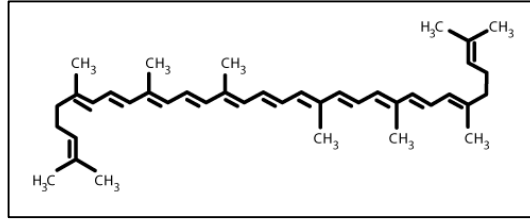
2.8.2. Dezavantajları

Bakteriyel karotenoidlerin üretimiyle ilişkili yüksek maliyetler, ticari değerlerini düşürür ancak daha ekonomik hale getirmek için optimizasyon stratejileri kullanılarak bu sorun çözülebilir. Mikroalgler ve bitkiler gibi var olan doğal ticari karotenoid kaynakları, bakteriyel kaynaklı karotenoidlerin kabul edilebilirliği için zorluklar ortaya çıkarabilir ancak bakteriyel yöntemlerle üretimde tarladaki bitkiler arasında olan rekabet söz konusu olmadığı için mikroorganizmalar önemli bir alternatif olarak ön plana çıkmaktadır. Ayrıca, genetik mühendisliği yoluyla bakteri genomunu düzenleme, sentezi artırmak adına önemli bir avantaj sunmaktadır [Ram et al., 2020].

2.9. Likopen

Likopen, bitki ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilirken hayvanlar tarafından sentezlenemezler. İnsan serumunda birincil olarak bulunan doğal pigmentlerdir, bu nedenle insan vücudunda önemli bir rolü vardır. Likopen, 11 konjuge ve 2 konjuge olmayan çift bağ içeren yüksek oranda doymamış bir hidrokarbondur [Giovannucci, 1999]. Görünür spektrumun çoğunu emer ve her bir çift bağ, elektronların daha yüksek enerji durumlarına geçişi için gereken enerjiyi azaltır

ve böylece molekülün giderek daha uzun dalga boylarındaki görünür ışığı emmesiyle kırmızı görünür. Ayrıca fotosentez sırasında ışığı emme özelliğine sahip olan likopen bitkileri foto duyarlılığa karşı korumaktadır [Singh and Goyal, 2008]. Likopenin kimyasal yapısı (Şekil 2.7) ve kimyasal özellikleri (Tablo 2.2) gösterilmiştir [Yıldız, 2019].



Şekil 2.7: Likopenin kimyasal yapısı.

Tablo 2.2: Likopenin kimyasal özelliği.

Moleküler Ağırlık (g/mol)	536,89
Moleküler Formül	C ₄₀ H ₅₆
Moleküler Bileşimi (%)	C % 89,49 ; H % 10,51
Sınıflandırma	Karotenoid, Hidrokarbon

Likopen, başta domates ve domates ürünleri olmak üzere, karpuz, kayısı, pembe greyfurt ve papaya gibi birçok meyve ve sebzede bulunmaktadır [Hwang and Bowen, 2004]. Domates ve domates ürünleri kişilerin genel sağlığına katkı sağlamakla birlikte, oksidatif stres biyomarkırlarını baskılayarak birçok kronik hastalık riskini azaltmaktadırlar [Palozza et al., 2011]. Birçok antioksidan madde fiziksel ve kimyasal faktörlerden etkilenmektedir ancak insan hem antioksidan ve antikanserojen etkili likopen diğer karotenoidlere nazaran yüksek derecedeki sıcaklıktan, oksijen ve ışıktan etkilenmemektedir. Diğer antioksidan maddelerle karşılaştırıldığında insan vücudunda yüksek düzeyde likopen bulunmaktadır. Likopenin karaciğer ve prostat kanserlerine karşı etkisi bildirilmiştir [Kayaalp, 2002], [Sheppard and Lampiris, 1994]. Likopenin ilginç bir özelliği de, β -karoten ve α -tokoferolü aşan düzeyde önemli antioksidan aktivitesine sahip olmasıdır [Miller et al., 1996]. Bitkisel yağda az miktarda çözünen likopen suda çözünmeyen lipofilik özellikte bir karotenoiddir. Likopenin % 50'si 100 °C'ye maruz kaldığında 60 dakika sonra, 125 °C'ye maruz kaldığında 20 dakika, 150 °C'ye maruz kaldığında ise 10 dakika sonra bozulmaktadır. Likopen kanser ve tümöre

karşı önleyici etkisi, kardiyovasküler koruma, antiproliferatif ve antioksidan etkilerinden dolayı önemlidir [Yıldız, 2019]. Bazı çalışmalar sonucunda uterus kanserlerine karşı etkisinden dolayı olumlu sonuçlar alınmıştır [Song et al., 2019]. Bunun yanı sıra alzheimer ve kardiyovasküler hastalıklarda da etkinliği kanıtlanmıştır [Crowe-White et al., 2019], [Costa-Rodrigues et al., 2018]. Likopenin yüksek düzeyde antioksidan özelliği nedeniyle kozmetik ürünlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Vücudun yaşlanma sürecini yavaşlatmakla birlikte ciltteki deformasyonları önlemektedir [Marchena et al., 2020]. Likopen, serbest radikallerin vücutta meydana getirdiği olumsuz birçok etkiyi azaltır veya daha ileriki evrede meydana gelecek yıkımları en aza indirmektedir [Mostafa et al., 2007]. Likopenin birçok yararlı özelliğinden dolayı daha yüksek miktarda ve daha kararlı bir likopen üretmek için biyoteknolojik yöntemler geliştirilmiştir. Bu çalışmalarda kullanılan mikroorganizmalara mayalar, mantarlar, bakteriler ve algler örnek gösterilebilir [Erdman et al., 2009]. Likopen, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve nitrik oksit (NO) aktivitesini engelleyip, hücreleri NO'ya bağlı membran hasarı ve hücre ölümüne karşı koruyarak reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu hücre hasarını önlemektedir. Bu etkilerini kimyasal ve fiziksel özellikleri ile gerçekleştirmektedir [Anshumalee et al., 2007]. Reaktif oksijen türleri (ROS), yapılarında oksijen bulunduran, serbest radikal oluşumuna sebep olan moleküllerdir. Yüksek düzeyde oluşumları oksidatif strese neden olarak kanser ve kardiyovasküler hastalıklara zemin hazırlamaktadır. Likopen özellikle ROS tekli oksijeni süpürmede etkilidir, *in vitro* koşullarda güçlü bir antioksidatif özellik gösterir, *in vivo* ortamlarda ise DNA, protein ve lipitlerin oksidasyonuna karşı koruyucudur [Khachik et al., 1997]. Bowen ve arkadaşları likopen bakımından zengin besin alımının prostattaki oksidatif DNA zararını azalttığını bildirmişlerdir [Rao et al., 1999].

Likopenin antioksidan rolünün yanı sıra antikanser rolü de bulunmaktadır. Hücre aktarımında görevli olan siklin D1'i düzenlediği ve G0/G1 fazı arasında gecikmeye neden olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda hücreler arası birleşme yerlerinde haberleşmeyi artırdığı da bilinmektedir ve sonuçta doku homeostazında oldukça etkilidir. Serum insülin benzeri büyüme faktörü olan IGF-1 seviyesinin artması akciğer, kolon, rektum ve prostat kanseri risklerinin artışıyla önceden bildirmektedir. Likopen, MCF-7 göğüs kanser hücrelerinde uyarılmış IGF-1 artışını önemli derecede düşürmüştür [Ahmet, 2015].

Bunun yanı sıra likopenin gıda katkı maddesi olarak ve besin takviyesi olarak geniş uygulama alanları vardır. Literatür raporlarına göre, günlük maksimum likopen

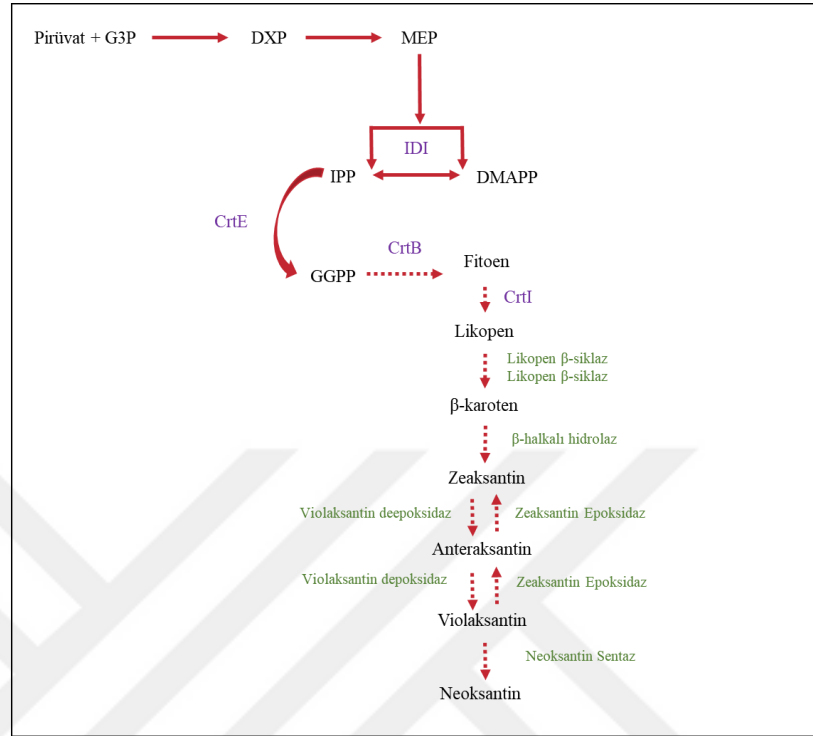
alımı 75 mg'dır ve bu, iyi bir besin takviyesidir [Shao and Hathcock, 2006]. Likopenin uygulama amaçları esas olarak kanser, yaşlanma, yorgunluk önleme ve fonksiyonel içecekler, renklendirici maddeler içeren sağlıklı gıdalar geliştirmektir. Bu anlamda likopen, sağlıklı besinler geliştirmek için iyi bir olanak sağlamaktadır. Örneğin, *in vivo* hayvan çalışmaları, domates tozu diyetinin kimyasal olarak indüklenmiş prostat kanserinin gelişimini geciktirdiğini göstermiştir. Etki mekanizması, likopenin vücuttaki tekli oksijenin etkisini yok edip reaksiyona girmesini engelleyip, hücre iletişimini teşvik etmesi olabilir [Campbell and Erdman, 2005].

Likopenin yoğun egzersizin ardından ortaya çıkabilecek iltihaplanmaya ve oksidatif strese karşı koyabilme yeteneğinden dolayı birçok ticari şirket, sporcu içecekleri ve bileşik meyve suyu içecekleri için çeşitli likopen içeren formülasyonlar geliştirmişlerdir. Aynı zamanda likopen, gıda işleme alanında renklendirici ve gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi likopenin güvenliğini ve etkinliğini değerlendirmiş ve Nisan 2008'de likopenin gıda bileşenlerinde güvenle kullanılabileceğini açıklamıştır [Aguilar et al., 2008].

2.9.1. Likopenin Mikrobiyal Biyosentezi

Likopen doğrudan bitkilerden ekstrakte edilebilir ya da kimyasal olarak sentezlenebilir. Bitkilerden elde edilen likopenin düşük miktarda olduğu ve ekstraksiyon prosedürünün yüksek maliyetli olduğu bilinmektedir. Kimyasal olarak sentezlenmesi ise kompleks ve kullanılması riskli materyalleri gerektirmektedir. Metabolizma mühendisliği ve sentetik biyoloji alanındaki son gelişmeler likopenin mikroorganizmalar tarafından uygun maliyetle üretilmesine izin vermiştir. Likopenin mikrobiyal olarak üretilmesinde, beş karbonlu (C5) IPP ve DMAPP önemli olan iki izoprenoid öncüdürler. Bu iki izoprenoid öncülünün *in vivo* olarak biyosentezi iki yolla (Şekil 2.9) gerçekleşmektedir [Ram et al., 2020]. Bunlar MEP ve MVA yolağıdır. MEP yolağı esas olarak prokaryotik hücrelerde, MVA yolağı bilinen tüm ökaryotik hücrelerde bulunmaktadır. Bir dizi enzim, asetil-CoA, piruvat ve gliseraldehit-3-fosfatın (G3P), IPP ve DMAPP'e dönüşümünü katalize eder. IPP ve DMAPP, FPP sentaz ile farnesil pirofosfat (FPP)'a dönüştürülür. Daha sonra FPP, geranilgeranil difosfat sentaz (*crtE*), fitoen sentaz (*crtB*) ve fitoen desaturaz (*crtI*) tarafından sırasıyla

geranilgeranil di fosfat (GGPP), fitoen ve sonuçta likopen sentezi gerçekleşmektedir [Liu et al., 2020].



Şekil 2.8: Likopen ve diğer karotenoidlerin MEP yolağı aracılığıyla biyosentez aşamaları.

Xu ve arkadaşları 2018’de yaptıkları çalışmada *Deinococcus wulumugiensis* R12 soyundan alınan *crtE*, *crtB* ve *crtI* genleri kopya sayıları farklı vektörler olan pET28A (düşük kopya sayılı) ve pTrc99A (orta kopya sayılı)’ya klonlanmıştır, daha sonra bu oluşturulan plazmitler farklı *E. coli* konak suşlarına (DH5 α , BL21, JM109) aktarılmışlardır. 60 saat boyunca Lysogeny broth (LB) besiyerinde büyütüldüklerinde biyokütle (DCW) ve likopen üretimi 40-50. saatte maksimuma ulaşmıştır. Aynı çalışmada rekombinant *E. coli* hücrelerinde hücre büyümesi ve likopen üretimine karbon kaynaklarının etkisi incelenmiştir. 99JM 40 saat 2xYT besiyerinde karbon kaynağısız ve glikoz (% 6), fruktoz (% 6), gliserol (% 20) eklenerek büyütülmüştür. 2xYT gliserol ile diğer karbon kaynaklarından yaklaşık 1,5 kat fazla olarak likopen üretimi gözlenmiştir. En düşük likopen üretimi glikoz karbon kaynağında olduğu bildirilmiştir [Xu et al., 2018].

Zhang ve arkadaşları ise 2015 yılında likopen üretiminde önemli rolleri olan *crtE*, *crtB* ve *crtI* genlerini içeren pACYCipi plazmitinin aktarıldığı *E.coli*’de likopen

üretimini artırmak için uygun konakçı ve besiyeri optimizasyonu yapmışlardır. Uygun konağı seçmek için pACLYCipi plazmiti *E.coli*'nin farklı suşlarına aktarılmıştır ve genel olarak bakterilerin büyüme gösterdiği LB besiyerinde 24 saat büyütülmüştür. Daha sonra *E. coli* K12 suşunda yapılan besiyeri optimizasyonunda gliserol ve glikoz karbon kaynağına nazaran 6 g/L fruktoz karbon kaynağının ilavesi daha yüksek verimde likopen üretimiyle sonuçlanmıştır [Zhang et al., 2015].

Başka bir çalışmada yine likopen üreten genler *Brevibacterium linens*'ten alınmış, sonuçta oluşan pACM-E_{B.L}-B_{B.L}-I_{B.L} plazmiti, *E. coli* SURE soyuna aktarılmıştır. MR besiyerinde 25 saat büyütülmüştür. Glikoz, mannoz, maltoz, gliserol, laktoz ve galaktoz olmak üzere altı farklı karbon kaynağı denenmiştir. Hücre yoğunluğu ve likopen üretiminin en iyi sonuç verdiği karbon kaynağının gliserol olduğu bildirilmiştir [Kim et al., 2010].

Deinococcus wulumigiensis R12'den alınan *crtE*, *crtB* ve *crtI* genleri *E. coli* BL21'e aktarılıp, Shine Dalgarno (SD) bölgeleri optimize edilerek 2xYT+gliserol ortamında daha yüksek oranda likopen biyosentezi elde edilmiştir [Jin et al., 2015].

Wen Du ve arkadaşları rekombinant *E. coli* K12f-pACLYC soyunda likopen üretimini geliştirmek için yaptıkları çalışmada farklı karbon kaynakları kullanmışlardır. 10 g/L konsantrasyonunda fruktoz karbon kaynağı kullanıldığında yüksek büyüme ve likopen üretim kapasitesi gözlenmiştir [Du et al., 2016].

MVA yolağına dikkat çeken bir çalışmada *crtE*, *crtB*, *crtI*, *idi* genlerini ve MVA yolağındaki genleri taşıyan plazmitlerin aktarıldığı *E. coli* BW125113 soyunda erlen çalışmasında karbon kaynağı olarak glikoz ve gliserol birlikte kullanılmıştır [Albermann, 2010].

Ekstremofilik bir mikroorganizma olan *Deinococcus radiodurans* R1 soyunda ilk olarak, *crtLm* geni kodlayan likopen siklaz, likopenin γ -karotene dönüşümünü önlemek için silinmiştir. Daha sonra, fitoen sentazı kodlayan *crtB* geni ve 1-deoksi-D-ksilüloz 5-fosfat sentazı kodlayan *dxs* geni, likopene doğru karbon akışını arttırmak için aşırı eksprese edilip, *crtE*, *crtB*, *crtI*, *dxs* ve *idi* genlerinin likopen üretimi üzerindeki etkilerini incelemek için her gen bir Δ crtLm *D. Radiodurans* R1 suşunda test edilmiştir. Sonuçta *crtB* geninin aşırı ekspresyonu, beş gen arasında en iyi sonuçları sağlamıştır. *Dxs* geni ile birlikte *crtB*'yi aşırı ifade eden Δ crtLm *D. radiodurans* R1'de likopen üretimi önemli ölçüde artmıştır. Kültürler yarı tanımlanmış ortama 10 g/L glikoz ve 1 g/L maya ekstraktı eklenerek 72 saat büyütülmüştür [Kang et al. 2020].

P. putida KT2440 suşunda, değerli bir ksantofil olan zeaksantin biyosentezi çalışılmıştır. *Pantoea ananatis*'ten beş karotenojenik geni (*crtE*, *crtI*, *crtB*, *crtY* ve *crtZ*) ve *E. coli*'den üç geni (*idi*, *ispA* ve *dxs*) barındıran, L-ramnoz ile indüklenebilir bir promotorun kontrolü altında yeni bir plazmit oluşturulmuştur. *P. putida* KT2440 soyunun, karotenoid üretimi için plazmitleri zorlukla tolere ettiği saptanmıştır [Beuttler et al., 2011].

Hernandez-Arranz ve arkadaşları *P. putida* KT2440'ta IPP ve DMAPP sentezi için eksojen MVA yolağı ekleyerek, *nDXS* (mutant DXS) yoluyla DXP üreterek ve farklı promotorların kontrolü altında DXS ve diğer MEP yolağı enzimlerini ifade ederek izoprenoid öncülerinin seviyelerini artırma ve bu sayede likopen üretimini iyileştirmeyi denemişlerdir. *Pantoea ananatis*'ten *crtE*, *crtI* ve *crtB* genleri alınarak KT2440'ta ifade edilmiştir. *P. putida* bakterisinde likopen üretiminin kaydedildiği başka bir çalışma yoktur. Likopen sentez genlerinin ifadesi doğrulandıktan sonra *crtEIB* operonu kendi promotoru ile *P. putida* KT2440'ın kromozomuna entegre edilmiştir (KTLYC). Düşük likopen üretiminden dolayı IPP ve DMAPP'i artırmak için bu suş kullanılmıştır [Hernandez-Arranz et al., 2019].

2.10. Promotorlar ve IPTG

Promotorlar, gen ifadesinin düzenlenmesinde anahtar unsurlardan biridir. Bakteri hücreleri, farklı büyüme evrelerine veya değişen çevre koşullarına bağlı olarak gen ifadesini kontrol ederler. Transkripsiyon, büyük çok alt birimli bir enzim olan RNA polimeraz (RNAP) enzimine bağlıdır. Bakterilerde, transkripsiyon, farklı sinyallere yanıt olarak gen ifadesini aktive eden veya baskılayan düzenleyici proteinler için promotor ve bağlanma bölgesi içeren düzenleyici bölgeler tarafından kontrol edilir. Sigma alt birimi promotor bölgesine bağlanarak transkripsiyonu başlatır. Çoğu bakteri, sigma faktörünün birden fazla türünü kodlar. Örneğin *E. coli*'de, sigma alt biriminin yedi türü mevcuttur ve her biri belirli bir promotor bölgesini tanıır [Minchin and Busby, 2009]. Genel olarak bakterilerin yaşamsal evrelerine, değişen çevre koşullarına uyum sağlamada gösterdiği başarı bu kontrol mekanizmasıyla açıklanabilir.

Sentetik promotorlarla rekombinant yapılarıdaki gen ifadeleri daha hızlı ve daha spesifik kontrol edilebilir. İdeal bir promotor, baskılandığında tamamen kapalı olmalı,

indüklendiğinde ise farklı seviyelerde güçlere ayarlanabilmelidir. Sentetik biyologlar tarafından *E. coli* ve *S. cerevisiae* gibi çeşitli organizmaların genomları tasarlanmasına karşılık bu organizmaların dışında çeşitli organizmalarda işlev gören gen düzenleyici öğelere yönelik artan bir ihtiyaç vardır [Wang et al., 2019]. Sentetik promotorların geliştirilmesi önceden bilinen doğal promotorları, yeni düzenleyici birimler ekleyerek değiştirmektir. Hücresel mühendislik, ilgilenilen birçok genin ekspresyon seviyelerinin sıkı bir şekilde düzenlenmesini gerektirir ve bu kontroller ile düzenlemeler, verimli gen ekspresyon sistemlerini gerektirir. Bunların geliştirilmesi, gen ekspresyon seviyesi ve düzenlenmesiyle yakından ilişkili olduğu için promotor seçimi özellikle önemlidir [Siegl et al., 2013].

Operonlar ise bir promotor bölgenin kontrolü altında bir gen kümesi içeren DNA'nın işlevsel bir birimidir. En yaygın kontrol mekanizmalarından biri olan Lac operonu hücrede transkripsiyonun gerçekleşmesi için açılıp kapanmaktadır. Promotore bitişik olan operatöre protein baskılayıcılar bağlanır. Baskılayıcı proteinin operatöre bağlanması transkripsiyonun başlamasını önler. Bu baskılayıcı protein Lac operonunun parçası olmayan ayrı bir gen olan *lacI* tarafından üretilir. Operatör ve promotor bölgelerinin rölatif pozisyonu tüm operonlar için aynı değildir ancak sonuç aynıdır; baskılayıcının operatöre bağlanması RNA polimerazın promotordan hareket etmesini ve transkripsiyonun başlamasını önlemektedir. Lac baskılayıcı proteini ayrıca allolaktoz (laktozun bir türevi) için afiniteye sahiptir. Allolaktozun baskılayıcıya bağlanması proteinde allosterik bir değişikliğe neden olur ve baskılayıcı artık operatöre bağlanamaz. Sonuçta laktoz varlığında baskılayıcı inaktiftir, operon eksprese edilir ve hücre laktoz metabolizması için gerekli olan enzimleri üretir. Laktoz yokluğunda baskılayıcı aktiftir operatöre bağlanır ve Lac operonun transkripsiyonu önler [Field and Osbourn, 2012]. Laktoz rahatsız edici bir indükleyicidir; çünkü indüksiyon olur olmaz metabolize olmaya başlar. Bu nedenle etkiyi azaltma eğilimindedir. Moleküler biyoloji ve biyoteknolojide en yaygın kullanılan indükleyicilerden biri laktoz baskılayıcı *lacI*'nin etkisini engelleyen IPTG'dir. IPTG β -galaktozidaz tarafından inhibe edilmez [Marbach and Bettenbrock, 2009].

2.11. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Öncelikle kromatografi; sağlık, tarım, sanayi gibi birçok değişik alanda çeşitli ölçüm, ayırıştırma ve saflaştırma gibi değişik amaçlar için kullanılmaktadır. En önemli kromatografi yöntemlerinden biri ise maddeleri kolondan çıkış zamanlarına (Retention Time, RT) göre analiz yapan sıvı kromatografi temelli HPLC yöntemidir. Kromatografi, ortak ve uygun bir çözücü ortamında, karışımın içerdiği maddelerin, fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre çözünerek ayrılma işlemleri olarak tanımlanmaktadır [Yıldız et al., 1997]. Kromatografik analizlerin ana amacı istenilen numunenin ayrımı ve miktarının ölçülmesidir.

Bu yöntem, çeşitli maddelerin, hareketli bir faz yardımıyla, sabit bir faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanır. Çözücü olarak adlandırılan hareketli faz mobil fazdır. Numuneyi, sabit faz (kolon) boyunca taşımaktadır. Mobil faz içerisinde gelen numuneye ait bileşenlerin etkileşime girdikleri ve belirli ölçüde alıkonuldukları faz ise sabit faz olarak adlandırılır. Mobil faz sıvı, sabit faz selüloz kağıdından kapiller cam tüplere kadar farklı bir dizi materyalden olabilmektedir. Karışım, destek ortamı (sabit faz) boyunca ilerlerken, molekül destek ortamındaki fonksiyonel gruplarla etkileşime girer. Sabit faz kromatografi tekniğinin çeşidine göre tasarlanmış, çok değişik materyallerden, çok farklı ölçülerde imal edilmiştir ve “kolon” olarak adlandırılırlar. Alıkonma süresi ise mobil faz içerisinde, analizi yapılacak numunenin bileşenlerinin sabit faz ile etkileşime girerek, belirli oranda tutulmaları, yavaşlatılmaları ve böylece farklı zamanlarda sabit fazı terk etmeleri olayıdır [Eser ve Sepici Dinçel, 2018].

Cihaz temelde 5 kısımdan oluşur. Bu kısımlar; mobil faz, pompa, enjektör, kolon, dedektördür. Yaygın olarak kullanıldıkları alanlara ise klinik biyokimya (safra asitleri, üre ekstraktları, ilaç metabolitleri), gıda ve çevre kirleticileri (pestisitler, herbisitler, fenoller), ilaç analizleri (antibiyotikler, steroidler, analjezikler), gıda analizleri (antioksidanlar, alfatoksinler, suni tatlandırıcılar, gıda katkı maddeleri, hormon ve pestisit kalıntı analizleri, su analizleri), adli tıp, toksikoloji (uyuşturucu ilaçlar, narkotikler, zehirler), biyokimyasal analizler (aminoasitler, proteinler, karbonhidratlar, lipidler, hormonlar, vitaminler, ketosteroidler, porfirin, homosistein), endüstriyel analizler (polimerler, boyalar, yüzey aktif maddeler, çok halkalı

aromatikler, petro kimya uygulamaları) örnek verilebilir [Boyer, 2009], [Gault and McClenaghan. 2009].



3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Bakteri Soyları

Bu tez çalışmasında likopen üretimine bakılmak amacıyla kullanılan bakteri soyu, likopen sentezinden sorumlu olan *crtE*, *crtB* ve *crtI* genlerini taşıyan *P. putida* EM42/pSEVA_LYC soyu (Dr. Özlem Akkaya'dan temin edilmiştir.), *P. putida* EM42 ve likopen sentezinden sorumlu olan *crtE*, *crtB* ve *crtI* genlerini taşıyan *E. coli* DH5 α /pAC_LYC soyudur [Cunningham, 1994]. *P. putida* EM42/pSEVA_LYC soyu kanamisine dirençlilik geni (Km^R); *E. coli* DH5 α /pAC_LYC soyu kloramfenikole dirençlilik geni (Cm^R) taşımaktadır.

3.1.2. Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katolog No
Pepton	Merck	107228
Maya Ekstraktı	Merck	103753
NaCl	Merck	1064041000
MgSO ₄	Merck	A543086423
Agar	Affymetrix/USB	AAJ10907A1
Trypton	Bioline	21P010
KH ₂ PO ₄	Chem Cruz	7778770
K ₂ HPO ₄	Alfa Aesar	AA11593A7
Gliserol	Merck	1040932500
D-Glikoz	Duchefa Biochemie	5996101
Laktoz	Conda	190200
Fruktoz	Sigma Aldrich	57487

Tablo 3.1: Devam.

Na ₂ HPO ₄	Sigma Aldrich	7558794
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Chem Cruz	10028247
MgSO ₄	Merck	1058861000
NH ₄ Cl	Chem Cruz	12125029
Sitrat	Chem Cruz	A2216
Kazein	Sigma Aldrich	91079402
LB Broth Miller	BD Difco	244620
Agar	Affymetrix/USB	AAJ10907A1
Aseton	Merck	1000141000
Tetrahidrofuran	Sigma Aldrich	SZBF335MV
Asetonitril	Merck	1000302500
Metanol	Supelco	1060072500
Diklorometan	Merck	1060502500

3.1.3. Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Tablo 3.2’de listelenmiştir.

Tablo 3.2: Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Cihaz Modeli	Firma Adı
Hassas Terazî	TP3030	Denver Enstrument
pH metre	Hanna	Ph209
İnkübatör	EC-160	Nüve
Spektrofotometre	UV-1800	Shimadzu
HPLC		Shimadzu
HPLC UV Dedektör	SPD-20A	Shimadzu
Soğutmalı İnkübatör	ES-120	Nüve
Soğutmalı Santrifüj	CF48R	Awel

3.2. Yöntem

3.2.1. Kullanılan Besiyerleri

3.2.1.1. Lysogeny (LB) Broth

Lysogeny broth (LB), zengin bir besiyeridir ve bakteri büyütmeye, plazmit saflaştırmasında, protein ekspresyonu çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Birçok bakteri türü için hızlı ve verimli bir büyüme sağlar. İlk olarak 1951 yılında Giuseppe Bertani tarafından açıklanmıştır [Sezonov et al., 2007]. Besin içeriği ve konsantrasyonları Tablo 3.3'te yer almaktadır. Besiyeri, dH₂O ile istenen hacimde, gerekli miktarlarda bileşenler tartılarak hazırlandı. pH değeri sodyum hidroksit (NaOH) ile 7.57'ye ayarlandıktan sonra 121 °C'de 20 dakika sterilizasyon için otoklavlandı. LB Agar besiyerini hazırlamak için besiyerine 15 g/L konsantrasyonunda agar eklendi.

Tablo 3.3: LB besiyeri içeriği.

Bileşimi	Konsantrasyon (%)
Trypton	1
Maya özütü	0,5
NaCl	1

3.2.1.2. 2xYeast Ekstrakt/Trypton (YT) Besiyeri

Bakterilerin büyümesi için besin açısından zengin bir ortamdır. Trypton ve maya özütü miktarları bu besiyerinde fazla miktarda bulunur. Büyüme ve gelişme sırasında hücrenin ihtiyaç duyduğu ilave aminoasitler, vitaminler ve diğer metabolitler nedeniyle bakteriler bu ortamda daha fazla gelişmektedirler [Yıldız, 2019].

Besin içeriği ve konsantrasyonları Tablo 3.4'te yer almaktadır. Besiyeri, dH₂O ile istenen hacimde, gerekli miktarlarda bileşenler tartılarak hazırlandı. pH değeri sodyum hidroksit (NaOH) ile 7,57'ye ayarlandıktan sonra 121 °C'de 20 dakika sterilizasyon için otoklavlandı.

Tablo 3.4: 2xYT besiyeri içeriği.

Bileşimi	Konsantrasyon (%)
Trypton	1,6
Maya özütü	1,0
NaCl	0,5

3.2.1.3. Otoindüksiyon Besiyeri

İçerisinde iki farklı karbon kaynağı bulunduran oldukça zenginleştirilmiş bir besi ortamıdır. Laktoz, protein ekspresyonunu indükleyebilmektedir ve bu indüksiyon farklı bileşikler ile bakterilerin üremesi sırasında önlenmektedir. Bakteri üremesini takip ederek, belirlenen zamanlarda indükleyici eklemeyen, otomatik olarak protein ekspresyonu sağlamaktadır [Studier, 2005]. İndüksiyonun başlıca sebebi, besiyerinde bulunan az miktardaki laktozdur. Ortamda glikoz olduğu zaman, laktozun hücre içine alımı ve hücreler tarafından kullanımı engellenmektedir ve sonuçta laktozun gerçekleştirdiği indüksiyon da glikoz tarafından engellenmiş olur. Glikoz başlangıç aşamasındaki indüksiyonu inhibe ederek, hücrelerin yeterli yoğunluğa ulaşmasını ve yeterli plazmidin oluşmasını sağlamaktadır. Besiyerinde glikoz tükendikten sonra laktoz hücreler tarafından indükleyici olarak kullanılmaktadır [Inada et al.,1996], [Meadow et al., 1990].

Besin içeriği ve konsantrasyonları Tablo 3.5’te yer almaktadır. Besiyeri, dH₂O ile istenen hacimde, gerekli miktarlarda bileşenler tartılarak hazırlandı. pH değeri sodyum hidroksit (NaOH) ile 7.57’ye ayarlandıktan sonra 121 °C’de 20 dakika sterilizasyon için otoklavlandı.

Tablo 3.5: Otoindüksiyon besiyeri içeriği.

Bileşimi	Konsantrasyon (%)
Pepton	2,0
Maya özütü	0,5
NaCl	0,5
Glikoz	0,05
Gliserol	0,6

Tablo 3.5: Devam.

Laktoz	0,2
Na ₂ HPO ₄	0,6
K ₂ HPO ₄	0,3

3.2.1.4. M9 Minimal Besiyeri

Çözeltiler ayrı ayrı istenen hacimlerde, bileşenlerin gerekli miktarlarda tartılmasıyla hazırlandı. 121 °C’de 20 dakika sterilizasyon için otoklavlandı. M9 minimal besiyeri hazırlamak için çözeltiler steril edilmiş şişelerde hazırlandı.

P. putida EM42 ve *P. putida* EM42/pSEVA_LYC bakteri soylarını -80 °C’taki gliserol stoktan alınarak canlandırılması için seçici besiyeri olan M9 minimal agar kullanıldı. M9 minimal agar hazırlamak için besiyeri içine % 1,6 konsantrasyonunda agar çözeltisi eklendi.

P. putida EM42/pSEVA_LYC bakteri soyunun likopen üretimi ve hücre yoğunluğuna bakmak için ayrıyeten M9 minimal besiyerine % 5 kazein çözeltisinden son konsantrasyon % 0,2 olacak şekilde kazein eklendi.

Ek olarak M9 minimal kazein besiyerine son konsantrasyon % 0.25 olacak şekilde goodies (Garcia ve ark., 2014) eklenerek yine *P. putida* EM42/pSEVA_LYC bakteri soyunda likopen üretimi ve hücre yoğunluğuna bakıldı.

Tablo 3.6: M9 minimal besiyeri içeriği.

Bileşimi	Konsantrasyon (%)
M9 tuz çözeltisi (10X)	10
1 M MgSO ₄ Çözeltisi	0,2
% 20 sitrat	1

3.2.2. Likopen Üretimi İçin Yardımcı Karbon Kaynakları ve IPTG'nin Eklenmesi

Tablo 3.7'de tez kapsamında likopen sentezi için kullanılan yardımcı karbon kaynakları ve IPTG'nin denenen konsantrasyonları, örnek toplanma saatleri verilmiştir.

Tablo 3.7: Kullanılan yardımcı karbon kaynakları ve IPTG'nin denenen farklı konsantrasyonları, örnek toplanma saatleri.

Kullanılan besiyeri	Karbon kaynağı	LB içindeki konsantrasyonu (g/L)	Denenen IPTG (mM) konsantrasyonları	Örnek Toplanma Aralığı (Saat)
LB	-	-	-	24 ve 48. saat
	Fruktoz	10	-	24 ve 48. saat
		10	-	60 saat takibi (6 saatte 1)
		10	-	24., 48. ve 72. saat
		10	0.1/ 0.5/1.0	4., 24. ve 48. saat
	Glikoz	10	0.1/ 0.5/1.0	4., 24. ve 48. saat
	Maltoz	10	-	24 ve 48. saat
	Gliserol	10	-	24 ve 48. saat
	Laktoz	10	-	24 ve 48. saat
Otoindüksiyon	-	-	-	4., 24. ve 48. saat
2xYT	-	-	-	24., 48. ve 72. saat
	-	-	0.5/1.0	24., 48., 72. ve 96. saat
	Fruktoz	4	-	24., 48. ve 72. saat
		6	-	24., 48. ve 72. saat
		6	0.1/0.5	24., 48. ve 72. saat
		10	-	24., 48. ve 72. saat
		10	0.1/0.5	24., 48. ve 72. saat

Tablo 3.7: Devam.

2xYT	Glikoz	4	-	24., 48. ve 72. saat
		6	-	24., 48. ve 72. saat
		6	0.1/0.5	24., 48. ve 72. saat
		10	-	24., 48. ve 72. saat
		10	0.1/0.5	24., 48. ve 72. saat
	Yardımcı Besin Kaynakları			
M9 minimal	Sitrat	20	0.1	24. ve 48. saat
	Kazein	2	0.1/0.5	4. ve 24. saat
	Goodies	2.5	0.1/0.5	24. saat

3.2.3. Solüsyonlar ve Çözeltiler

3.2.3.1. M9 Salt Solüsyonu (10X)

M9 salt solüsyonu (10X) için Tablo 3.7’de bileşenlerin konsantrasyonları yer almaktadır. pH değeri sodyum hidroksit (NaOH) ile 7.2’ye ayarlandıktan sonra 121 °C’de 20 dakika sterilizasyon için otoklavlandı.

Tablo 3.8: M9 salt solüsyonu (10X) içeriği.

Bileşimi	Konsantrasyon (%)
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	7,52
KH ₂ PO ₄	3,0
NaCl	0,5
NH ₄ Cl	0,5

3.2.3.2. MgSO₄ (1 M) Çözeltisi

12,04 g MgSO₄ 100 ml dH₂O’da çözüldü, otoklavda 121 °C’de 20 dk sterilizasyonu gerçekleştirildi.

3.2.3.3. % 20 Sitrat Çözeltisi

20 g sitrat 100 ml dH₂O'da çözüldü, otoklavda 121 °C'de 20 dk sterilizasyonu gerçekleştirildi.

3.2.3.4. % 1,6 Agar Çözeltisi

1,6 gr agar üzerine 100 ml dH₂O eklenip, otoklavda 121 °C'de 20 dk sterilizasyonu gerçekleştirildi.

3.2.3.5. % 5 Kazein Çözeltisi

5 gr kazein 100 ml dH₂O'da çözüldü, otoklavda 121 °C'de 20 dk sterilizasyonu gerçekleştirildi.

3.2.4. Bakteri Kültür Ortamı ve Koşulları

P. putida EM42 ve *P. putida* EM42/pSEVA_LYC bakteri soylarının -80 °C'teki gliserol stoktan alınarak canlandırılması için seçici besiyeri olan M9 minimal agar üzerine tek koloni ekimi yapıldı. *E. coli* DH5α/pAC_LYC soyu için ise LB agar üzerine tek koloni ekimi yapıldı. Canlandırılan soylardan, 50 ml hacimli erlenler içinde 10 ml ilgili besiyeri kullanılarak tek koloni ekimlerinden ön kültür başlatıldı. *P. putida* EM42, *P. putida* EM42/pSEVA_LYC soyları 30 °C'de 170 rpm ve *E. coli* DH5α/pAC_LYC soyu 37 °C'de 170 rpm koşullarında 12-16 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Daha sonra ana kültürler OD₆₀₀ 0.1'e ayarlanarak başlatıldı. Ana kültürler başlatılırken, erlenlere havalandırma oranları 1/3 olacak şekilde ilgili besiyeri konuldu.

P. putida EM42/pSEVA_LYC bakteri soyu için ön kültürler ve ana kültürler başlatılırken son konsantrasyon 50 µg/ml olacak şekilde kanamisin antibiyotiği eklendi. *E. coli* DH5α/pAC_LYC soyu için ise son konsantrasyon 30 µg/ml olacak şekilde kloramfenikol antibiyotiği eklendi.

3.2.5. Likopen Ekstraksiyonu Yöntemi

Likopen ekstraksiyonu için Zhang ve ark. (2015) tarafından önerilen yöntem modifiye edildi. 15 ml hacimli falkonlara analiz edilecek saatlerde 5 ml örnek toplandı. 4000 rpm'de 15 dk +4°C'de santrifüj ile hücre peletleri çöktürüldü. Üst sıvı atıldıktan sonra 1 ml steril miliQ su ile yıkama yapıldı. 4000 rpm'de 5 dk +4°C'de santrifüj ile çöktürme işlemi yapıldı. Üst sıvı atıldıktan sonra peletler 2 ml aseton ile çözüldü. 55 °C'ye ayarlanmış ultrasonik su banyosunda 30 dk boyunca inkübe edildi. Örnekler 10 dk aralıklarla 30 saniye boyunca vorteks yapıldı. Daha sonra 4000 rpm'de 15 dk +4°C'de santrifüj yapıldı. Aseton ile ekstrakte edilen likopenin bulunduğu üst sıvı spektrofotometrik analiz ve HPLC analizi için 1.5 ml'lik tüplere alındı. Analiz edilinceye kadar -20°C de muhafaza edildi. Çalışma iki tekrarlı şekilde yapıldı.

3.2.6. Ölçüm ve Analizler

3.2.6.1. Spektrofotometrik Ölçüm

Analizi yapılmak istenen saatlerde erlenlerden toplanan örneklerin hücre yoğunluğuna OD₆₀₀ nm'de bakıldı. Ekstrakte edildikten sonra likopen üretimine bakılmak üzere 474 nm dalga boyundaki absorbands değeri spektrofotometrik olarak okutuldu [Kim et al., 2010].

3.2.6.2. Likopen Miktarının Hesaplanması

Belirli saatlerde toplanıp, ekstraksiyonu gerçekleştiren örneklerin 474 nm dalga boyundaki absorbands değeri (A_{474}) ve 600 nm dalga boyunda hücre yoğunluğu (A_{600}) spektrofotometrik olarak analiz edildikten sonra A_{474} değerinin OD₆₀₀ değerine oranı (A_{474}/OD_{600}) alınarak likopen üretimine bakıldı. Sonuçlar *P. putida* EM42'ye göre normalize edildi.

Bir diğer likopen konsantrasyonunun belirlendiği formül, ekstrakte edilecek örnekler ekstrakte edilmeden peletlerin yaş ağırlığı tartılarak Kim J. ve ark. (2010), referans alınarak aşağıda gösterildiği gibi belirlendi [Kim et al., 2010]. Sonuçlar *P. putida* EM42'ye göre normalize edildi.

Likopen konsantrasyonu ($\mu\text{g/g}$):

$$[(A_{474} \times \text{ekstrakt hacmi (ml)} \times 10^4) / (3410 \times \text{yaş pelet ağırlığı (g)})]$$

3.2.6.3. Likopen Üretiminin Belirlenmesi İçin Kuru Ağırlık Tayini

15 ml hacimli falkonlara ölçüm yapılacak saatlerde 5 ml örnek toplandı. Örnek toplama işlemi 15 saat süresince 3 saatte bir 5 defa yapıldı. Her örnek toplama saatinde aynı zamanda spektrofotometrede $\lambda 600$ nm dalga boyunda hücre yoğunluğu (OD_{600})'na bakıldı. 4000 rpm'de 15 dk 4°C 'de santrifüj ile hücre peletleri çöktürüldü. Üst sıvı atıldıktan sonra 1 ml otoklavlı distile su ile yıkama yapıldı. 4000 rpm'de 5 dk 4°C 'de santrifüj ile çöktürme işlemi yapıldı. Üst sıvı atıldıktan sonra peletler 24 saat boyunca 80°C 'de kurutuldu. Kurutma işlemi gerçekleştikten sonra dört besiyeri için ayrı ayrı optik yoğunluk-kuru ağırlık kalibrasyon eğrileri çizildi [Liu et al., 2020]. Kalibrasyon eğrisinin sonucuna göre 1 OD_{600} değeri 2 mg olarak kabul edilmiştir.

3.2.6.4. HPLC Analizi

Spektrofotometrik analizlerin yanı sıra bakteri tarafından sentezlenen likopen miktarının belirlenmesi için HPLC yöntemi de kullanıldı. Analizi yapılmak istenen saatlerde erlenlerden toplanan örnekler ekstrakte edildikten sonra HPLC analizi için $0,45\mu\text{m}$ 'luk membran filtreden geçirildi ve likopen konsantrasyonunu hesaplamak üzere UV/VIS dedektör ile $\lambda 474$ nm dalga boyunda, C18 kolon kullanılarak Seifi ve arkadaşları tarafından kullanılan metot modifiye edilerek HPLC (Shimadzu 10A, Shimadzu, Colombia, MD) analizine tabi tutuldu [Seifi et al., 2013]. Kullanılan HPLC metodu Tablo 3.8'de verildi. Örnekler 20 dakika süresince analiz edildi. Elde edilen likopen ekstraktının absorbansı 474 nm'de ölçüldü ve likopen konsantrasyonunun (mg/l) hesaplanması için ticari olan likopen (Sigma, katalog no:75051) standardı ile kalibrasyon eğrisi çizildi.

Tablo 3.9: Kullanılan HPLC metodu.

HPLC Metodu	
Mobil faz	Asetonitril:metanol:diklorometan (42:42:16)
Akış hızı	0,8 ml/dk
Kolon sıcaklığı	30 °C
Enjeksiyon Hacmi	20 µL

Likopen konsantrasyonlarının belirlenmesi için standartlar hazırlanarak 0,45 µm'lik membran filtreden geçirildi ve HPLC analizleri Tablo 3.9'da belirtilen metoda göre yapıldı. Analiz sonuçlarına göre likopen için kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.

3.2.6.5. HPLC Analizi İçin Test Edilen Protokoller

Bakteri tarafından sentezlenen likopen miktarının belirlenmesinde kullanılacak olan en uygun HPLC metodunu kararlaştırmak için birkaç farklı protokol test edildi[Sathish et al., 2009], [Priyadarsani, 2015], [Zhang et al., 2012]. Kullanılan metodların koşulları Tablo 3.10'da gösterildi.

Tablo 3.10: HPLC analizi için test edilen protokoller.

Mobil Faz	Akış hızı (ml/dk)	Kolon sıcaklığı (°C)	Enjeksiyon hacmi (µL)
Metanol:Tetrahidrofuran:dH ₂ O (66:30:4)	1.5	30	20
Asetonitril:Metanol:Tetrahidrofuran (75:20:5)	1	30	20
Asetonitril:Tetrahidrofuran (90:10)	0.6	30	20

3.2.6.6. İstatistiksel Analizler

Tez kapsamında yapılan deneyler en az iki defa tekrar edildi ve her sonuç için üç örneğin ortalaması alındı. İstatistiksel analizler tek yönlü ANOVA testi ile GraphPad Prism 8.0 yazılımı kullanılarak yapıldı. Hücre yoğunluğu-Likopen konsantrasyonu karşılaştırma içeren iki cetveli grafiklerde istatistiksel analizler hücre yoğunluğu için ayrı, likopen konsantrasyonu için ayrı yapıldı. Gruplar arasındaki farklar Tukey testi kullanılarak $P<0,05$ düzeyinde anlamlı olarak kabul edildi.



4. SONUÇLAR

4.1. *P. putida* EM42/pSEVA_LYC Soyunun Farklı Besiyerlerinde Ürettiği Likopen Miktarının Değerlendirilmesi

4.1.1. Likopen Üretimi İçin Yardımcı Karbon Kaynakları Kullanımının Optimizasyonu

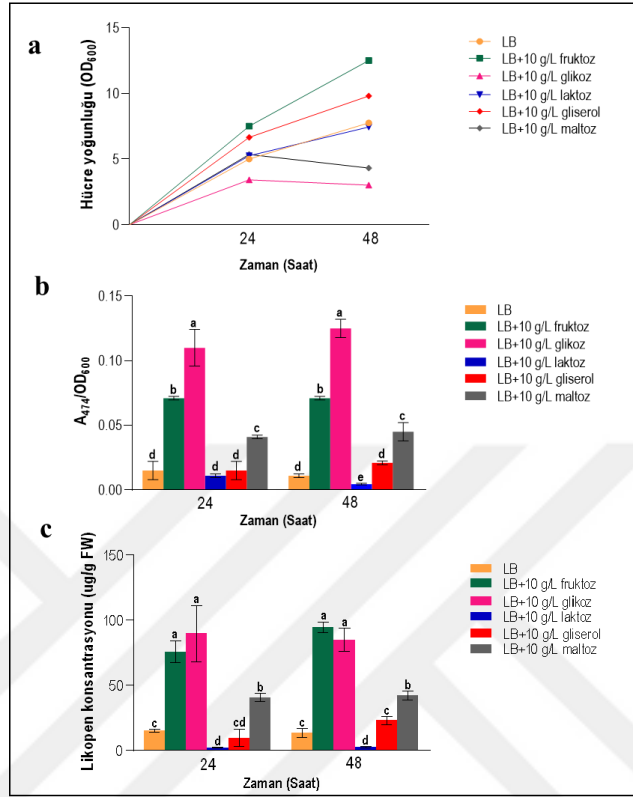
LB besiyeri az miktarda karbonhidrat içerdiğinden dolayı bu çalışmada beş farklı karbon kaynağı (fruktoz, glikoz, laktoz, gliserol, maltoz) kullanılarak likopen üretimi geliştirilmeye çalışıldı. *P. putida* EM42/pSEVA_LYC soyu 48 saat büyütüldü. 24 ve 48. saatlerde örnek alınarak hücre yoğunluğu ve likopen üretimi analiz edildi. Kullanılan karbon kaynakları 10 g/L konsantrasyonunda besiyerine eklendi.

Farklı karbon kaynaklarıyla desteklenen LB besiyerinde hücre yoğunluğu (OD₆₀₀) LB+glikoz ortamında 24. saatte 3.4, 48. saatte ise 3.0 olarak tespit edildi. Hücre yoğunluğu diğer besi ortamlarına göre oldukça düşüktü. LB+maltoz besiyerinde hücre yoğunluğunun 5.4'ten 4.3'e düştüğü gözlemlendi LB+glikoz besiyerine görece hücre yoğunluğu daha fazla olarak belirlendi. LB+fruktoz besiyerinde ise hücre yoğunluğu 24. saatte 7.5 ve 48. saatte 12.5'a artış göstererek LB+fruktoz besiyeri 48. saatte hücre büyümesinin en fazla gözlemlendiği besiyeri olarak tespit edildi. LB, LB+laktoz, LB+gliserol besi ortamlarında 24. saatten 48. saate kadar hücre büyümesinde artış gözlemlendi (Şekil 4.1a).

Spektrofotometredeki A_{474}/OD_{600} ölçüm sonuçlarına görece en iyi sonuç LB+glikoz besiyerinde 24. saatte 0.11 ve 48. saatte 0.13 olarak gözlemlendi. Daha sonra tespit edilen en iyi sonuç ise LB+fruktoz besiyerinde 24 ve 48. saatte 0.07 olarak belirlendi. LB, LB+laktoz, LB+gliserol ve LB+maltoz besiyerlerinde ise LB+glikoz ve LB+fruktoz besiyerlerine göre A_{474}/OD_{600} değerleri oldukça düşüktü (Şekil 4.1b).

Yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu sonuçlarına göre ise A_{474}/OD_{600} sonuçlarından farklı olarak, en iyi sonuç LB+fruktoz besi ortamında 94.54 µg/g miktarıyla 48. saatte gözlenirken; 24. saatte likopen konsantrasyonu 75.9 µg/g olarak hesaplandı. LB+glikoz besiyerinde ise 24. saatte 89.72 µg/g likopen gözlenirken 48. saatte bu miktarda hafif bir düşme gözlenerek 84.9 µg/g likopen sentezi belirlendi. LB, LB+laktoz, LB+gliserol ve LB+maltoz

besiyerlerinde ise A_{474}/OD_{600} sonuçlarıyla uyumlu olarak yaş hücre ağırlığı esas alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonlarında da düşüş gözlemlendi (Şekil 4.1c).

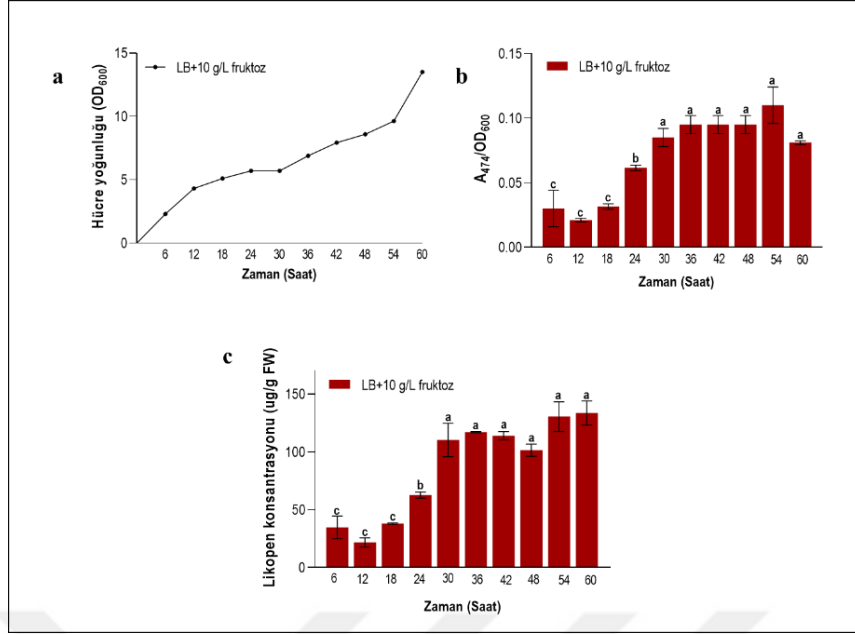


Şekil 4.1: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin farklı karbon kaynakları içeren LB besiyerindeki hücre yoğunluğu (a), A_{474}/OD_{600} değeri (b) ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu (c).

4.1.2. LB+Fruktoz Besiyerinde Likopen Üretimi

P. putida EM42/pSEVA_LYC soyu LB+fruktoz besiyerinde 60 saat büyütüldü. 6 saatte bir örnek alınarak hücre yoğunluğu ve likopen üretimi analiz edildi. Kullanılan karbon kaynağı fruktoz 10 g/L konsantrasyonunda besiyerine eklendi.

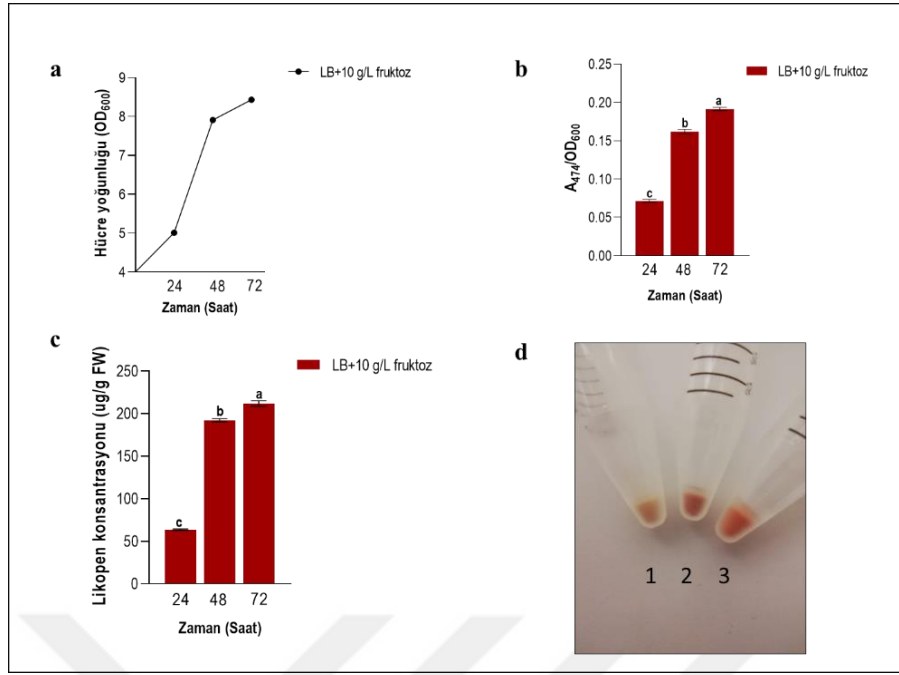
A_{474}/OD_{600} ölçüm sonucunda en iyi likopen üretimi 54. saatte 0.11 olarak analiz edildi (Şekil 4.2b). Yaş hücre ağırlığı ile hesaplanan en iyi likopen konsantrasyon sonucu ise 54. saatte 130.4 µg/g ve 60. saatte 133.455 µg/g olarak bulundu (Şekil 4.2c).



Şekil 4.2: 60 saat büyütülen *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin LB+fruktoz besiyerindeki hücre yoğunluğu (a), A_{474}/OD_{600} değeri (b) ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu (c).

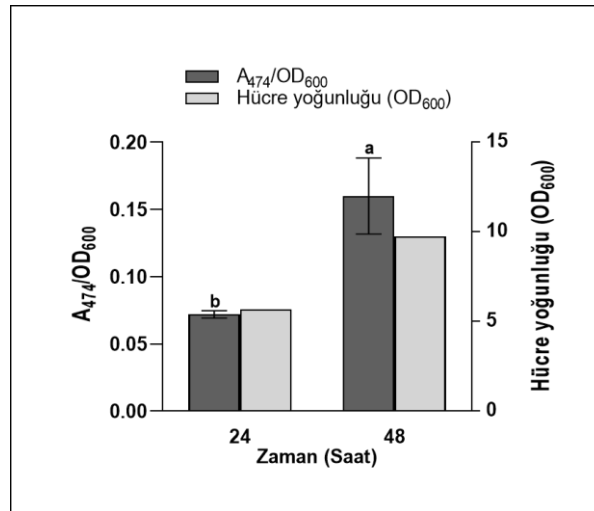
P. putida EM42/pSEVA_LYC soyu LB+fruktoz besiyerinde 72 saat büyütüldü. 24, 48 ve 72. saatlerde örnek alınarak hücre yoğunluğu ve likopen üretimi analiz edildi. Substrat olarak kullanılan karbon kaynağı fruktoz 10 g/L konsantrasyonunda besiyerine eklendi.

Fruktoz karbon kaynağıyla desteklenen LB besi ortamında hücre yoğunluğu 24, 48 ve 72. saatte sırasıyla 5.0, 8.0 ve 8.40 olarak belirlendi (Şekil 4.3a). A_{474}/OD_{600} ölçümlerinde likopen üretiminde 24. saatten 72. saate (0.07'den 0.19'a artış gözlemlendi.) 2.7 kat artış tespit edilirken (Şekil 4.3b) 24. saatte 63.7 µg/g olan yaş ağırlıktan hesapladığımız likopen konsantrasyonu 48. saatte 3 katına çıkıp (192.2 µg/g) 72. saatte 3.3 katına (211.9 µg/g) çıkmıştır (Şekil 4.3c). Her iki analiz sonucunda da hücre yoğunluğu arttıkça likopen üretiminin de arttığı gözlemlendi.



Şekil 4.3: 72 saat büyütülen *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin LB+fruktoz besiyerindeki hücre yoğunluğu (a), A_{474}/OD_{600} değeri (b), yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu (c) ve 48. saat pelet görüntüsü. 1: *P. putida* EM42, 2: *E. coli* DH5α pAC_LYC, 3: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC (d).

Çalışmada pozitif kontrol amaçlı kullanılan *E. coli* DH5α pAC_lyc soyunun 48 saat büyütüldükten sonraki A_{474}/OD_{600} değeri Şekil 4.4'te gösterildi. Bu soy bütün deney setlerinde çalışıldı.

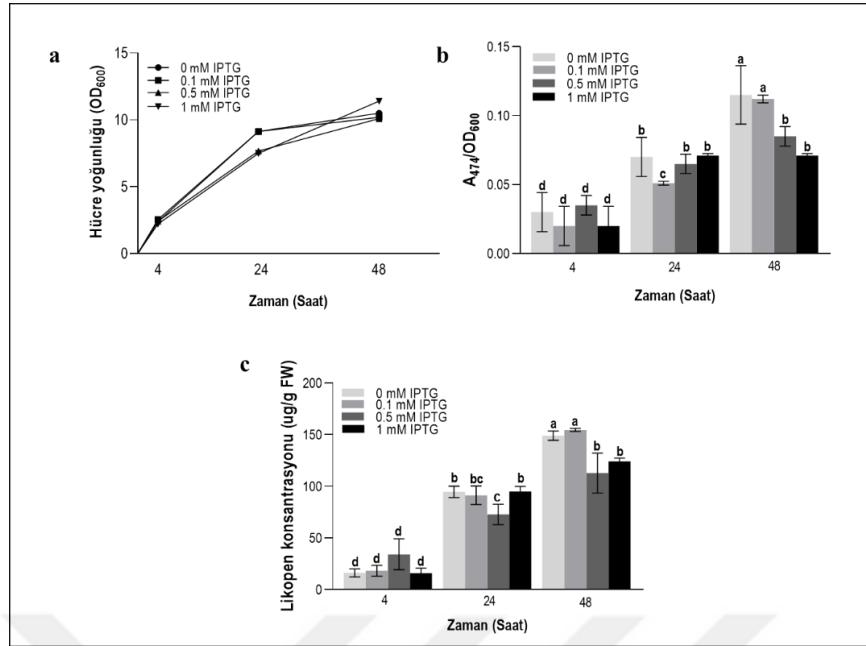


Şekil 4.4: *E. coli* DH5α pAC_LYC soyunun LB+fruktoz besiyerindeki A_{474}/OD_{600} değeri ve hücre yoğunluğu.

4.1.3. LB+Fruktoz Besiyerinde IPTG'nin Likopen Üretimine Etkisi

P. putida EM42/pSEVA_LYC soyu LB+fruktoz ortamında 48 saat büyütüldü. 4, 24 ve 48. saatlerde örnek toplanarak hücre yoğunluğu ve likopen üretimi analiz edildi. Fruktoz karbon kaynağı 10 g/L konsantrasyonunda besiyerine eklendi. Besiyeri içinde son konsantrasyonları 0.1 mM, 0.5 mM ve 1 mM olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda IPTG eklenerek IPTG'nin likopen üretimi üzerine etkisi incelendi.

4. saatteki hücre yoğunlukları, IPTG'nin bütün konsantrasyonlarında yaklaşık olarak aynıydı ve 2.0 olarak tespit edildi. 0 mM, 0.1 mM, 0.5 mM ve 1 mM IPTG ile uyarılan deneylerde 24 ve 48. saatteki hücre yoğunlukları ise sırasıyla 9.1, 9.1, 7.7, 7.5 ve 10.5, 10.2, 10.1, 11.4 olarak gözlemlendi. 24. saatte 0.5 mM ve 1 mM IPTG ile indüklenmiş soylarda hücre yoğunluğunda hafif bir düşüş gözlenirken; 48. saatte hücre yoğunlukları arasında yine önemli derecede bir fark tespit edilmedi (Şekil 4.5a). A_{474}/OD_{600} sonucuna göre en iyi üretim 48. saatte IPTG ile uyarım yapılmadan 0.11 sonucu olarak görüldü. IPTG'nin denenen üç farklı konsantrasyonunda daha iyi bir sonuç elde edilemedi. A_{474}/OD_{600} sonucuna göre 48. saatte artan IPTG konsantrasyonlarıyla orantılı olarak düşüş görüldü (Şekil 4.5b). Yaş ağırlıktan hesaplanan likopen konsantrasyon sonuçlarına göre en iyi likopen üretimi 48. saatte 0.1 mM IPTG eklendiğinde 154.55 $\mu\text{g/g}$ olarak bulunmasına karşılık IPTG olmadan da likopen üretimi 149.05 $\mu\text{g/g}$ olarak bulundu. IPTG uyarımının likopen üretimi üzerinde olumlu bir etkisi görülmedi (Şekil 4.5c).



Şekil 4.5: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin LB+fruktoz besiyerindeki hücre yoğunluğu (a), A_{474}/OD_{600} değeri (b) ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonuna IPTG'nin etkisi (c).

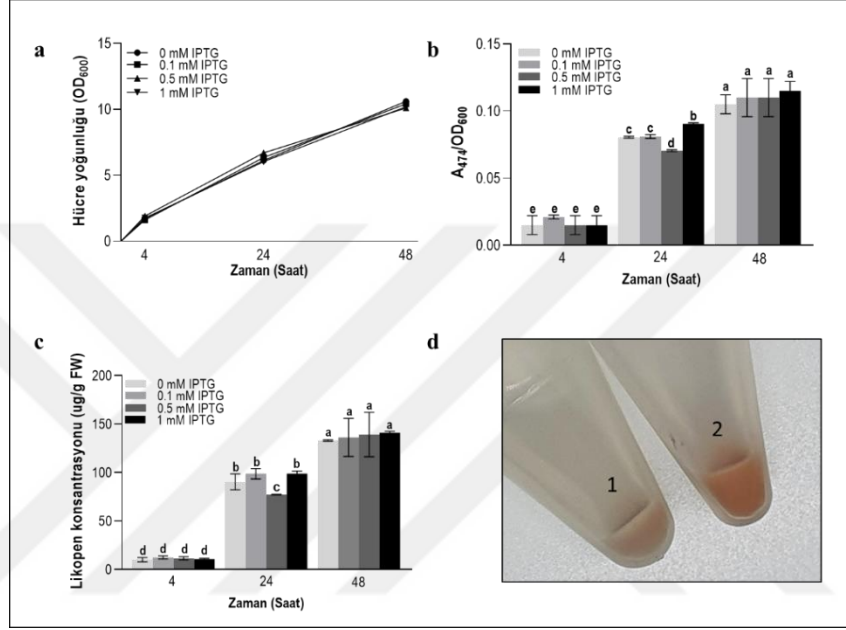
4.1.4. LB+Glikoz Besiyerinde IPTG'nin Likopen Üretimine Etkisi

P. putida EM42/pSEVA_LYC soyu LB+glikoz besiyerinde 48 saat büyütüldü. 4, 24 ve 48. saatlerde örnek toplanarak hücre yoğunluğu ve likopen üretimi analiz edildi. Karbon kaynağı glikoz 10 g/L oranında besiyerine eklendi. Besiyeri içinde son konsantrasyonları 0.1 mM, 0.5 mM ve 1 mM olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda IPTG eklenerek IPTG'nin likopen üretimine etkisi incelendi.

Hücre yoğunluğunda 4, 24 ve 48. saatlerde sırasıyla 1.7, 6.1 ve 10.6 olarak artış gözlemlendi (Şekil 4.6a). A_{474}/OD_{600} sonuçlarına bakıldığında 4. saatten 48. saate kadar likopen üretimi 5 katına çıkarak 0.10 olarak ölçüldü (Şekil 4.6b). Likopen konsantrasyonu sonuçlarına göre ise LB+glikoz ortamında 4. saatte 10.0 µg/g iken 48. saatte yaklaşık 13 katına çıkarak 133.0 µg/g likopen üretimi gözlemlendi (Şekil 4.6c). Artan hücre yoğunluğuyla birlikte likopen biyosentezinin arttığı gözlemlendi.

0.1 mM, 0.5 mM ve 1 mM IPTG konsantrasyon denemelerinin her birinde hücre yoğunluklarına bakıldığında 4, 24 ve 48. saatlerde sırasıyla yaklaşık 2.0, 6.0 ve 10.0 olarak gözlemlendi. Hücre yoğunlukları arasında fark çok azdı (Şekil 4.6a). En iyi likopen üretiminin gözlemlendiği 48. saatte IPTG ile indüklenmemiş olan örnekte A_{474}/OD_{600} 0.10 olarak ölçülürken; diğer üç IPTG konsantrasyonunda da yaklaşık

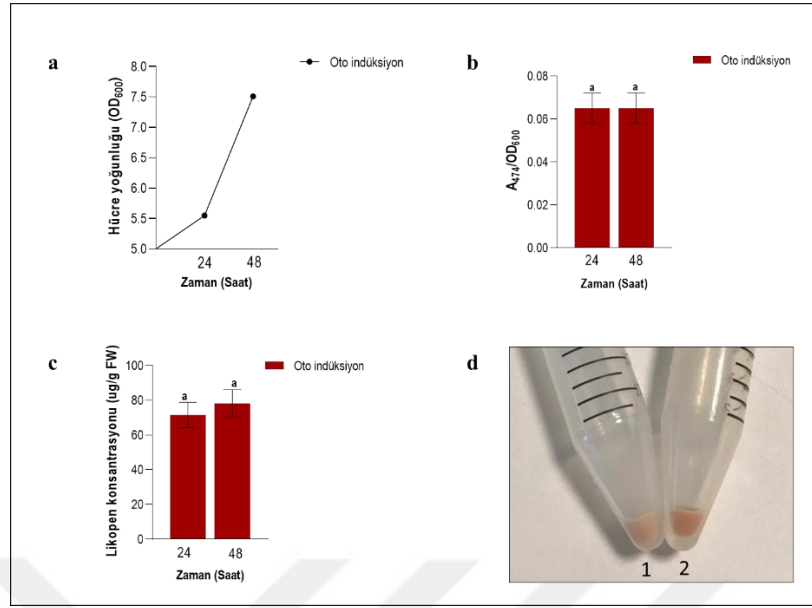
olarak benzer oranlar (0.11) tespit edildi (Şekil 4.6b). Yaş hücre ağırlıkları dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu ise 48. saatte IPTG ile indüklenmemiş olan örnekte 133.0 $\mu\text{g/g}$ iken 0.1 mM, 0.5 mM ve 1 mM IPTG konsantrasyon denemelerinde sırasıyla 136.2 $\mu\text{g/g}$, 139.2 $\mu\text{g/g}$ ve 141.0 $\mu\text{g/g}$ idi (Şekil 4.6c). Buna göre A_{474}/OD_{600} sonucuyula uyumlu olarak IPTG ile uyarımın likopen üretimi üzerinde olumlu bir etkisi gözlenmedi.



Şekil 4.6: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin LB+glikoz besiyerindeki hücre yoğunluğu (a), A_{474}/OD_{600} değeri (b) yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonuna IPTG'nin etkisi (c) ve 48. saat pelet görüntüsü; 1: *P. putida* EM42, 2: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC (d).

4.1.5. Otoindüksiyon Besiyerinde Likopen Üretimi

P. putida EM42/pSEVA_LYC soyu otoindüksiyon besiyerinde 48 saat büyütüldü. 4, 24 ve 48. saatlerde örnek alınarak hücre yoğunluğu ve likopen üretimi analiz edildi. Hücre yoğunluğu 4, 24 ve 48. saatte sırasıyla 1.5, 5.6 ve 7.5 olarak analiz edildi (Şekil 4.7a). A_{474}/OD_{600} ölçüm sonuçlarında 4. saatte 0.04, 24 ve 48. saatte ise 0.07 olarak aynı değeri verdi (Şekil 4.7b). Yaş ağırlıktan hesaplanan likopen konsantrasyonu 4. saatte 20.0 $\mu\text{g/g}$, 24. saatte 71.5 $\mu\text{g/g}$ ve 48. saatte 78.1 $\mu\text{g/g}$ likopen üretimi gözlemlendi (Şekil 4.7c). Hücre yoğunluğunda 24. saatten 48. saate artış gözlenmesine rağmen likopen üretiminde artış gözlenmedi.

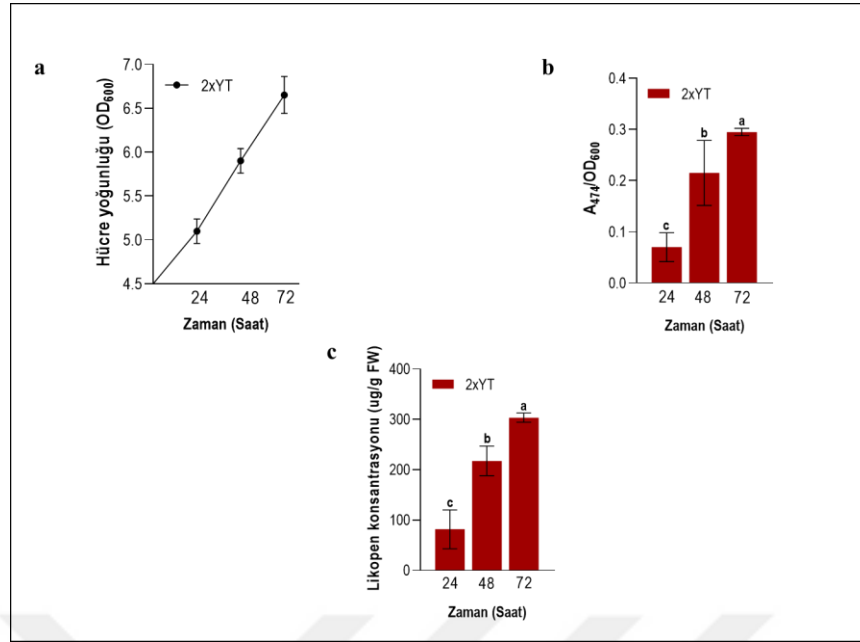


Şekil 4.7: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin otoindüksiyon besiyerindeki hücre yoğunluğu (a), A_{474}/OD_{600} değeri (b), yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu (c) ve 48. saat pelet görüntüsü; 1: *P. putida* EM42, 2: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC (d).

4.1.6. 2xYT Besiyerinde Likopen Üretimi

P. putida EM42/pSEVA_LYC soyu 2xYT besiyerinde 72 saat büyütüldü. 24, 48 ve 72. saatlerde örnek alınarak hücre yoğunluğu ve likopen üretimi analiz edildi.

Hücre yoğunluğunda 24. saatten 72. saate 5'ten 7'ye artış gözlemlendi (Şekil 4.8a). A_{474}/OD_{600} sonuçlarında 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 0.07, 0.22 ve 0.30 olarak ölçüldü ve bu değer LB+fruktoz besiyerinde görülen likopen üretiminin 1.5 katıydı (Şekil 4.8b). Aynı şekilde yaş ağırlıktan hesaplanan likopen konsantrasyonu 2xYT besiyerinde 24. saatte 81.7 µg/g, 48. saatte 217.6 µg/g ve 72. saatte 303.6 µg/g likopen üretimi sonucu LB+fruktoz besiyerine göre 1.5 katına çıkmıştır (Şekil 4.8c). LB+glikoz besiyerindeki likopen üretiminde yaklaşık 3 katı olarak tespit edildi. Sonuçta 2xYT besiyerinde gözlenen likopen miktarı farklı karbon kaynaklarıyla desteklenen LB ve otoindüksiyon besiyerindeki likopen üretiminden daha iyi sonuçlar verdi.

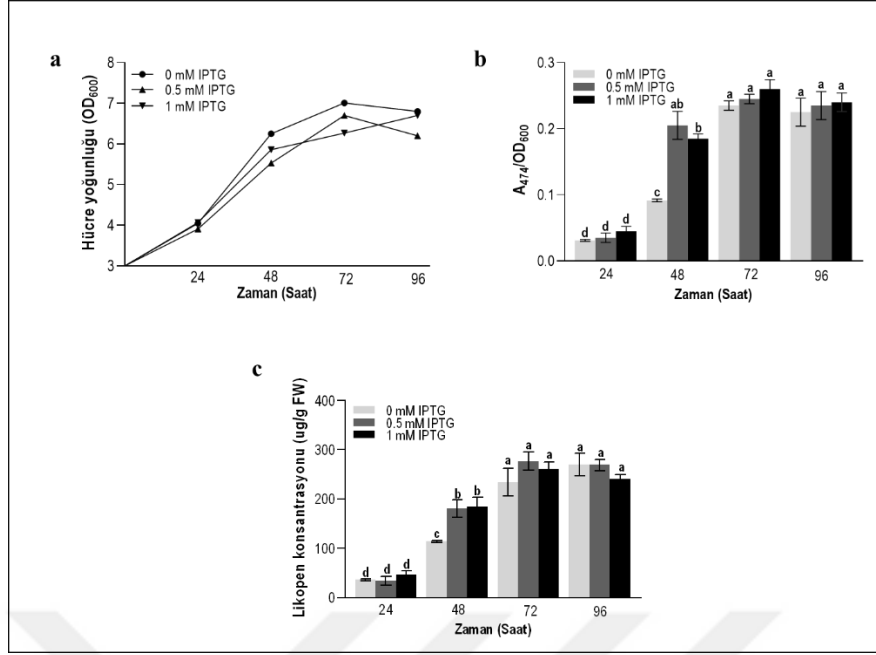


Şekil 4.8: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin 2xYT besiyerindeki hücre yoğunluğu (a), A_{474}/OD_{600} değeri (b) ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu (c).

4.1.7. 2xYT Besiyerinde IPTG'nin Likopen Üretimine Etkisi

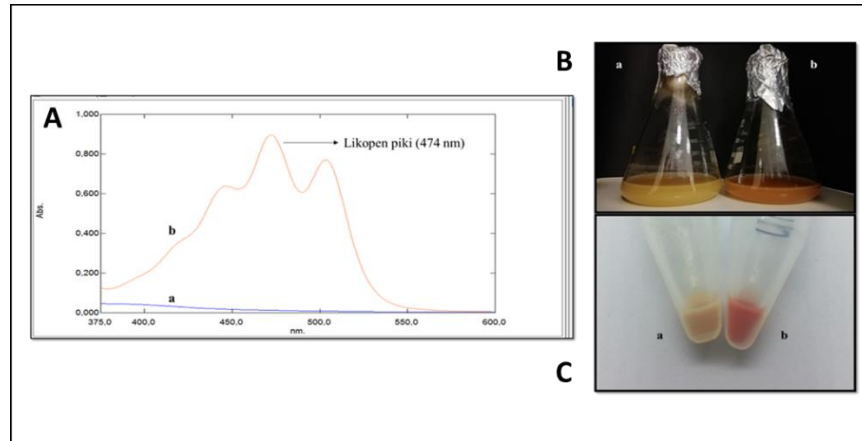
P. putida EM42/pSEVA_LYC 2xYT besiyerinde daha sonraki saatlerde likopen üretimini incelemek için 96 saat büyütüldü. 24, 48, 72 ve 96. saatlerde örnek toplanarak hücre yoğunluğu ve likopen üretimi analiz edildi. Besiyeri içinde son konsantrasyonları 0.5 mM ve 1 mM olacak şekilde iki farklı konsantrasyonda IPTG eklenerek IPTG'nin likopen üretimi üzerine etkisi incelendi.

24. saatte bütün IPTG konsantrasyon denemelerinde hücre yoğunlukları benzerdi ve yaklaşık 4.0 olarak tespit edildi. 48. saatte hücre yoğunlukları yine benzer sonuçlar verdi. 72. saatte ise sırasıyla hücre yoğunlukları 7.0, 6.7 ve 6.3 olarak analiz edildi. 72. saatten sonraki likopen üretiminin analiz edildiği 96. saatteki hücre yoğunluklarında artış gözlenmedi (Şekil 4.9a). En iyi likopen üretiminin gözlemlendiği 72. saatte IPTG ile uyarılmamış olan örnekte A_{474}/OD_{600} sonucu 0.24, 0.5 mM ve 1 mM IPTG konsantrasyon denemelerinde 0.25 ve 0.26 sonucu gözlenirken (Şekil 4.9b) yaş ağırlıkla hesaplanan likopen konsantrasyonu 72. saatte IPTG ile indüklenmemiş olan örnekte 235 µg/g iken 0.5 mM ve 1 mM IPTG uyarımlarının olumlu bir etkisi olmadı (Şekil 4.9c). Likopen üretiminde her iki sonuçta da 96. saatte daha iyi bir üretim gözlenmedi.



Şekil 4.9: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin 2xYT besiyerindeki hücre yoğunluğu (a), A₄₇₄/OD₆₀₀ değeri (b), ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonuna IPTG'nin etkisi (c).

2xYT besiyerinde *P. putida* EM42 ve *P. putida* EM42/pSEVA234_LYC soylarının 72. saatte ürettiği likopenin erlen (Şekil 4.10B), pelet (Şekil 4.10C) ve spektrofotometrik olarak pik (Şekil 4.10A) görüntüsü gösterildi.



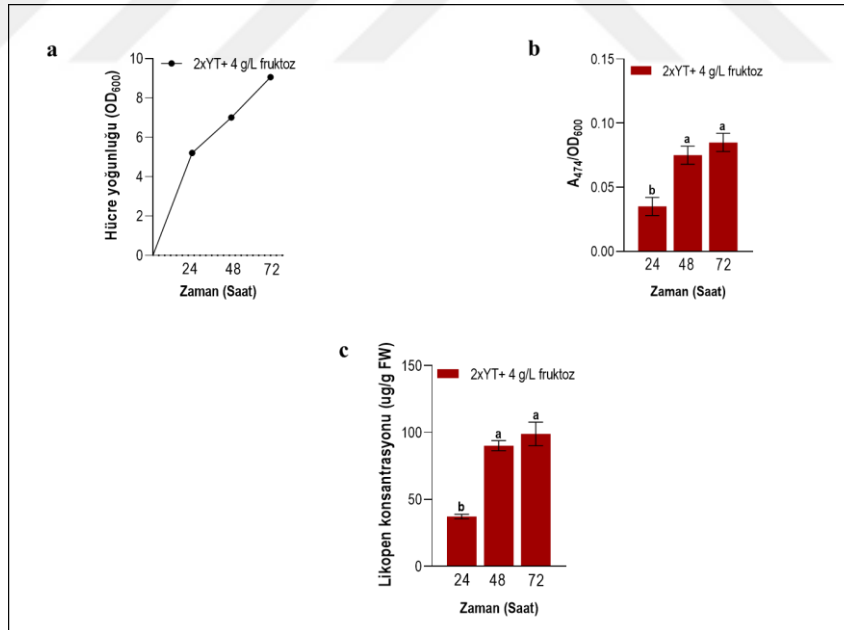
Şekil 4.10: 2xYT besiyerinde likopen üretiminin spektrofotometrik pik (A), erlen (B) ve pelet görüntüsü (C). *P. putida* EM42 (a), *P. putida* EM42/pSEVA234_LYC (b).

4.1.8. 2xYT Besiyerinde Yardımcı Karbon Kaynaklarının Hücre Büyümesi ve Likopen Miktarı Üzerine Etkisi

4.1.8.1. Fruktoz Konsantrasyonunun Optimizasyonu

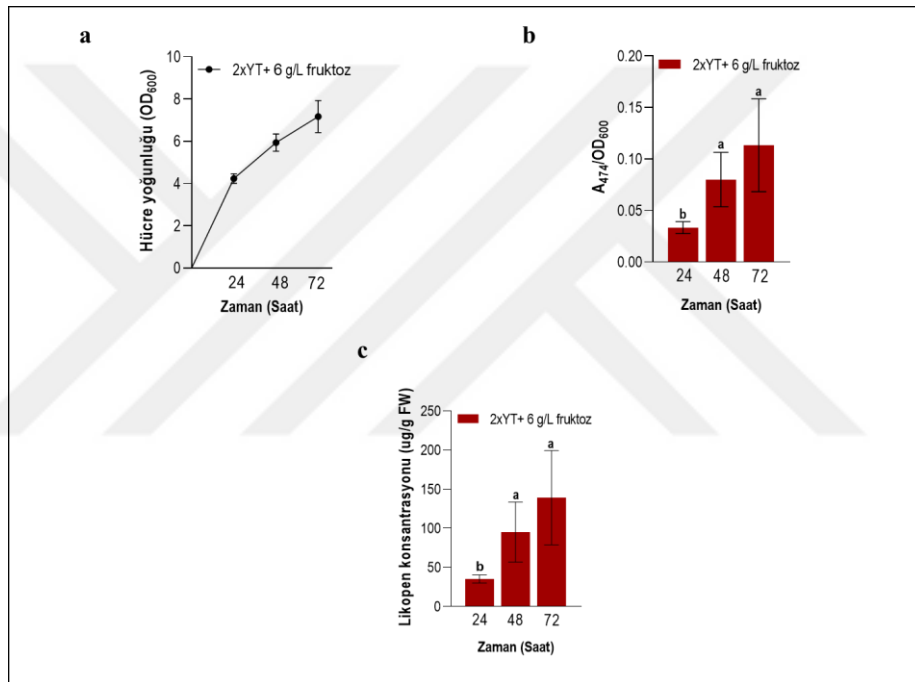
P. putida EM42/pSEVA_LYC soyu 2xYT+fruktoz besiyerinde 72 saat büyütüldü. 24, 48 ve 72. saatlerde örnek alınarak hücre yoğunluğu ve likopen üretimi analiz edildi. Likopen üretimi üzerine etkilerinin incelenmesi için fruktoz karbon kaynağı 4 g/L, 6 g/L ve 10 g/L olarak üç farklı konsantrasyonda besiyerine eklendi.

4 g/L fruktoz karbon kaynağıyla desteklenen 2xYT besi ortamında hücre yoğunluğu 24. saatten 72. saate 5'ten 9'a arttı (Şekil 4.11a). A_{474}/OD_{600} sonuçlarına bakıldığında likopen üretimi 72. saatte 0.09 olarak analiz edildi (Şekil 4.11b). Likopen konsantrasyon sonuçlarında 24. saatte 37.25 $\mu\text{g/g}$, 48. saatte 90.15 $\mu\text{g/g}$ ve 72. saatte 99.0 $\mu\text{g/g}$ likopen üretimi gözlemlendi (Şekil 4.11c). Sonuçta likopen üretimi 72. saatte fruktoz eklenmemiş 2xYT ortamında 303.0 $\mu\text{g/g}$ iken 4 g/L konsantrasyonda fruktoz eklenmesi ile likopen üretiminde 2 katı kadar azalış tespit edildi.



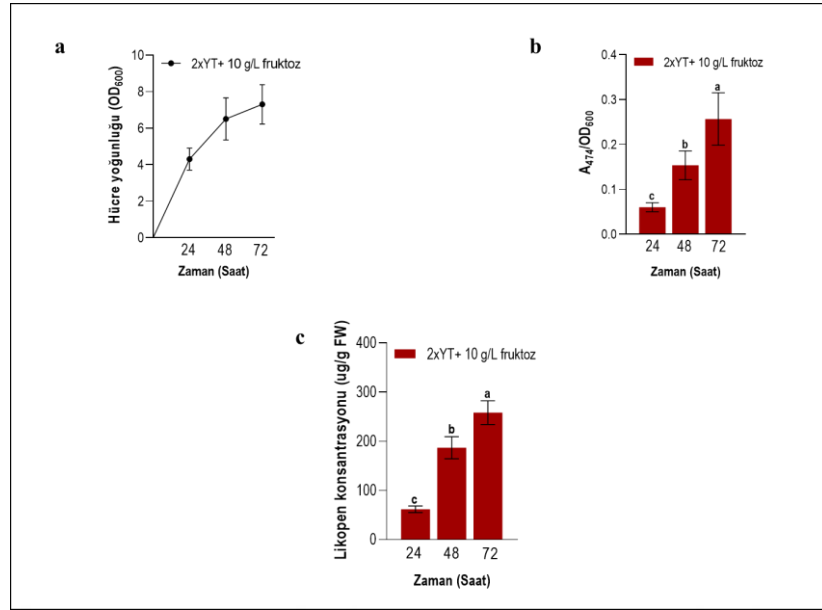
Şekil 4.11: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin 4 g/L fruktoz içeren 2xYT besiyerindeki hücre yoğunluğu (a), A_{474}/OD_{600} değeri (b) ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu (c).

6 g/L fruktoz karbon kaynağıyla desteklenen 2xYT besiyerinde hücre yoğunluğu 24, 48 ve 72. saatte sırasıyla 4.2, 5.9, ve 7.2 olarak tespit edildi (Şekil 4.12a). A_{474}/OD_{600} ölçümünde en iyi likopen üretimi 72. saatte 0.11 olarak hesaplandı (Şekil 4.12b). Likopen konsantrasyonu sonuçlarına bakıldığında ise 24. saatte 35 $\mu\text{g/g}$, 48. saatte 91 $\mu\text{g/g}$ ve 72. saatte 139 $\mu\text{g/g}$ likopen üretimi gözlemlendi (Şekil 4.12c). Sonuçlar 4 g/L fruktoz eklenen konsantrasyonuyla karşılaştırıldığında likopen üretiminde 24 ve 48. saatte anlamlı bir değişiklik gözlenmezken 72. saatte 0.09 (99.0 $\mu\text{g/g}$)’dan 0.11(139 $\mu\text{g/g}$)’e artış gözlemlendi. Ancak sonuçlar yine karbon kaynağı eklenmeyen 2xYT ortamındaki likopen üretiminden daha iyi değildi.



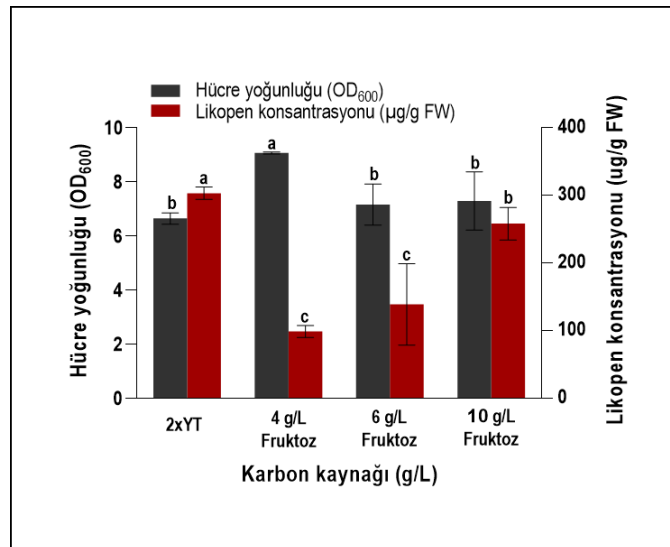
Şekil 4.12: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC’nin 6 g/L fruktoz içeren 2xYT besiyerindeki hücre yoğunluğu (a), A_{474}/OD_{600} değeri (b) ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu (c).

10 g/L fruktoz karbon kaynağıyla desteklenen 2xYT besiyerinde hücre yoğunluğunun 24. saatten 72. saate 4’ten 7’ye arttığı tespit edildi (Şekil 4.13a). A_{474}/OD_{600} sonuçlarında 24, 48 ve 72. saatte sırasıyla 0.06, 0.15 ve 0.26 olarak analiz edilirken (Şekil 4.13b) likopen konsantrasyonu sonuçlarında ise en iyi likopen üretimi 72. saatte 258.3 $\mu\text{g/g}$ olarak bulundu (Şekil 4.13c). Sonuçta likopen üretiminin 6 g/L fruktoz eklenilen 2xYT besiyerindeki likopen üretimiyle karşılaştırıldığında 2 katına çıktığı gözlemlendi.



Şekil 4.13: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin 10 g/L fruktoz içeren 2xYT besiyerindeki hücre yoğunluğu (a), A₄₇₄/OD₆₀₀ değeri (b) ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu (c).

Fruktoz karbon kaynağının artan konsantrasyonuyla birlikte likopen üretimi de artmıştır. En iyi likopen üretimi 10 g/L fruktoz konsantrasyonu kullandığımız 2xYT besiyerinde tespit edilmesine rağmen 2xYT besiyerine karbon kaynağı eklenmeden gözlenen likopen üretiminden daha iyi bir sonuç elde edilmedi (Şekil 4.14).

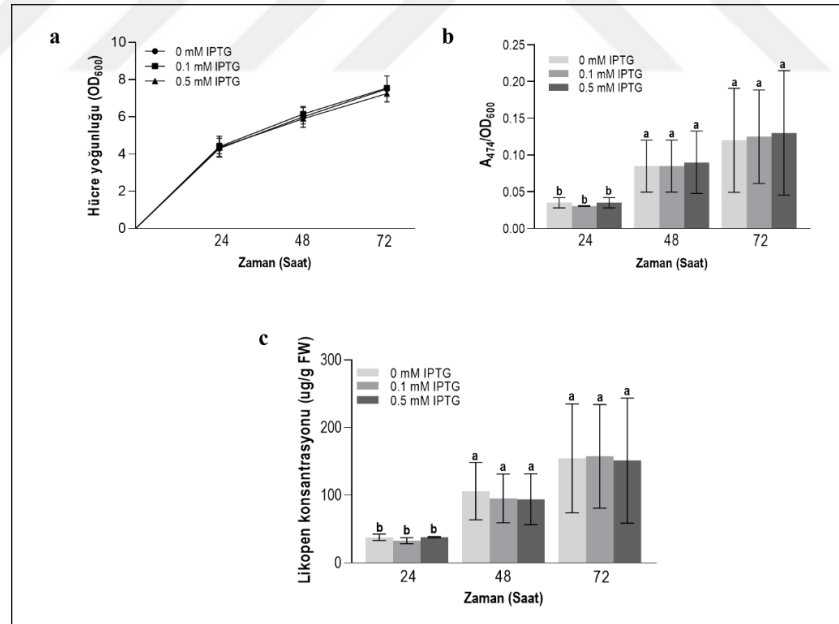


Şekil 4.14: Farklı fruktoz konsantrasyonlarında *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin 72. saatteki hücre yoğunluğu ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu.

4.1.8.2. 2xYT+Fruktoz Besiyerinde IPTG'nin Likopen Üretimine Etkisi

P. putida EM42/pSEVA_LYC soyu 2xYT+fruktoz besiyerinde 72 saat büyütüldü. 24, 48 ve 72. saatlerde IPTG'nin etkisini incelemek için örnek alınarak hücre yoğunluğu ve likopen üretimi analiz edildi. Fruktoz karbon kaynağı 6 g/L ve 10 g/L olarak iki farklı konsantrasyonda besiyerine eklendi. Besi ortamına 0.5 mM ve 1 mM IPTG eklendi.

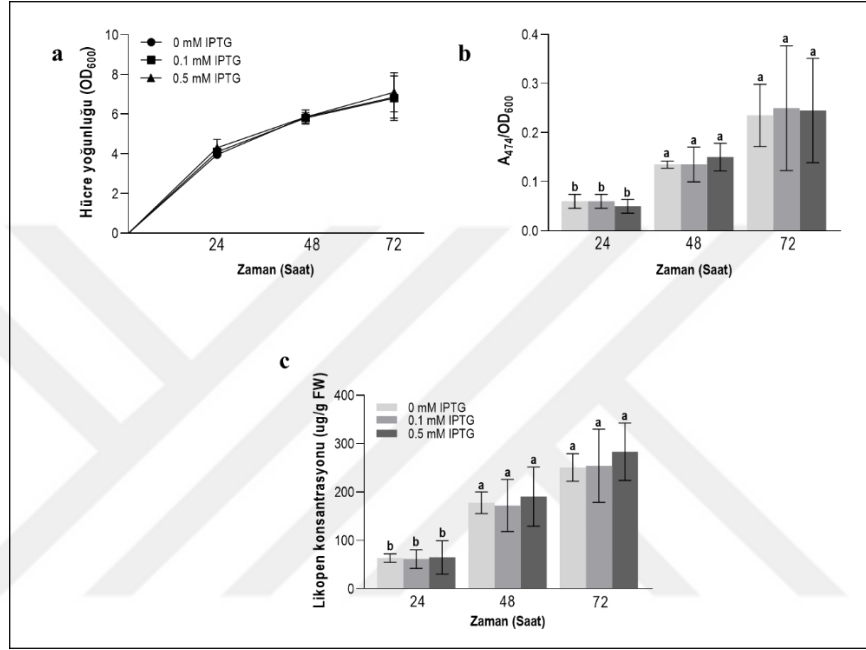
6 g/L fruktoz eklenen 2xYT besiyerinde hücre yoğunlukları bütün IPTG konsantrasyonlarında neredeyse benzer şekilde 24, 48 ve 72. saatte sırasıyla 4.5, 6.0 ve 7.0 olarak ölçüldü (Şekil 4.15a). A_{474}/OD_{600} sonucunda örnek alınan 3 saatte de IPTG'nin olumlu bir etkisi gözlenmedi. 72. saatte 0 mM, 0.1 mM ve 0.5 mM IPTG eklenmesiyle sırasıyla 0.12, 0.13 ve 0.13 olarak bulundu (Şekil 4.15b). Yaş ağırlıktan hesaplanan likopen konsantrasyon sonucunda da aynı şekilde IPTG'nin olumlu etkisi gözlenmeyip 0 mM, 0.1 mM ve 0.5 mM IPTG konsantrasyonlarında sırasıyla 154 $\mu\text{g/g}$, 157 $\mu\text{g/g}$ ve 151 $\mu\text{g/g}$ olarak bulundu (Şekil 4.15c).



Şekil 4.15: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin 2xYT+fruktoz (6 g/L) besiyerindeki hücre yoğunluğu (a), A_{474}/OD_{600} değeri (b) ve yaş ağırlık dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonuna IPTG'nin etkisi.

10 g/L fruktoz eklenen 2xYT besiyerinde hücre yoğunlukları bütün IPTG konsantrasyonlarında neredeyse aynıydı. 24, 48 ve 72. saatte sırasıyla 4.0, 5.0 ve 7.0

olarak analiz edildi (Şekil 4.16a). 6 g/L fruktoz denemesinde olduğu gibi A_{474}/OD_{600} sonucunda örnek alınan 3 saatte de olumlu bir IPTG etkisi gözlenmedi. 72. saatte 0 mM, 0.1 mM ve 0.5 mM IPTG uygulanmasıyla sırasıyla 0.24, 0.25 ve 0.24 olarak likopen üretimi gözlenirken (Şekil 4.16b) yaş ağırlıktan hesaplanan likopen konsantrasyon sonucunda sırasıyla 250 $\mu\text{g/g}$, 254 $\mu\text{g/g}$ ve 283 $\mu\text{g/g}$ tespit edildi (Şekil 4.16c).



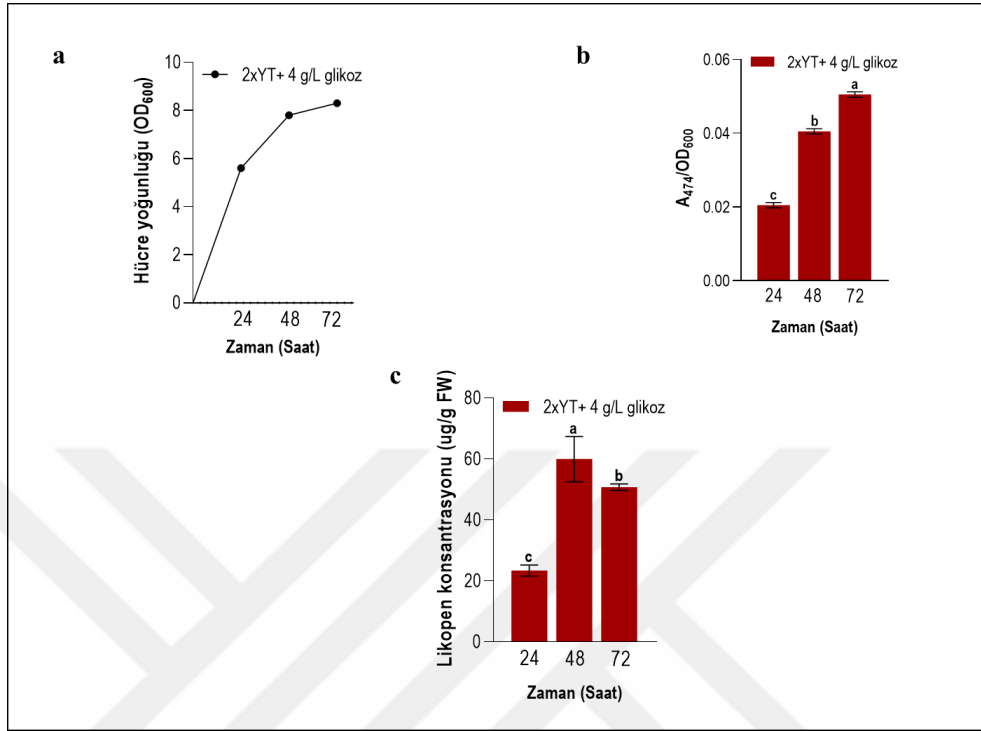
Şekil 4.16: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin 2xYT+fruktoz (10 g/L) besiyerindeki hücre yoğunluğu (a), A_{474}/OD_{600} değeri (b) ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonuna IPTG'nin etkisi (c).

4.1.8.3. Glikoz Konsantrasyonunun Optimizasyonu

P. putida EM42/pSEVA_LYC soyu 2xYT+glikoz besiyerinde 72 saat büyütüldü. 24, 48 ve 72. saatlerde örnek alınarak hücre yoğunluğu ve likopen üretimi analiz edildi. Likopen üretimi üzerine etkilerinin incelenmesi için fruktoz karbon kaynağı 4 g/L, 6 g/L ve 10 g/L oranında üç farklı konsantrasyonda besiyerine eklendi.

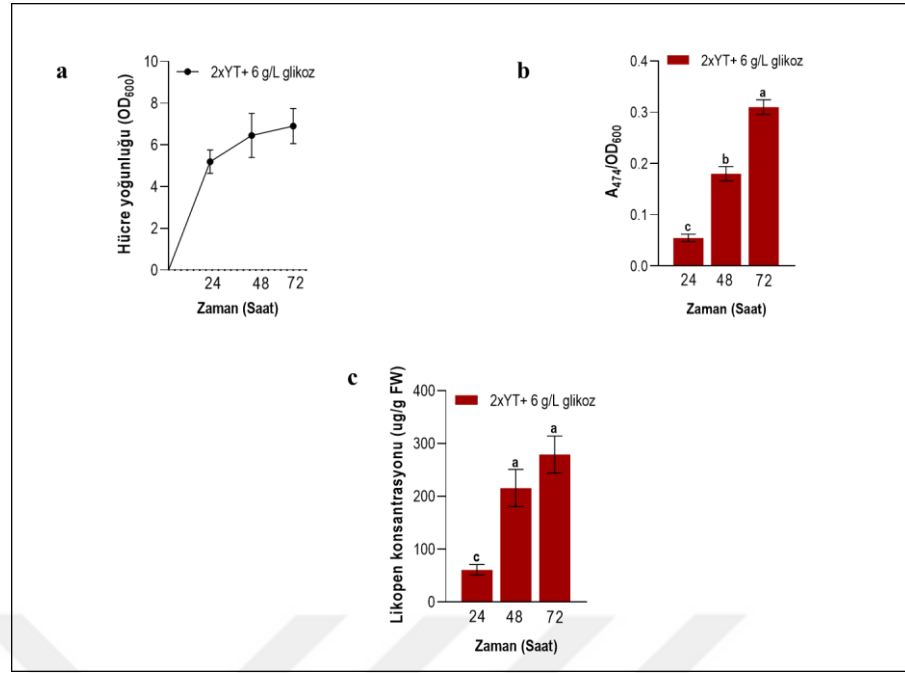
4 g/L glikoz karbon kaynağıyla desteklenen 2xYT besiyerinde hücre yoğunluğu 24, 48 ve 72. saatte sırasıyla 5.6, 7.8 ve 8.3 olarak bulundu (Şekil 4.17a). A_{474}/OD_{600} sonuçlarında yine 24, 48 ve 72. saatte sırasıyla 0.02, 0.04 ve 0.05 likopen üretimi tespit edilirken (Şekil 4.17b). likopen konsantrasyonu sonuçlarında 24. saatte 23.4 $\mu\text{g/g}$, 48. saatte 60 $\mu\text{g/g}$ ve 72. saatte 50.8 $\mu\text{g/g}$ likopen üretimi gözlemlendi (Şekil

4.17c). Sonuçta 4 g/L glikoz konsantrasyonunda oldukça düşük likopen üretimi gözlemlendi.

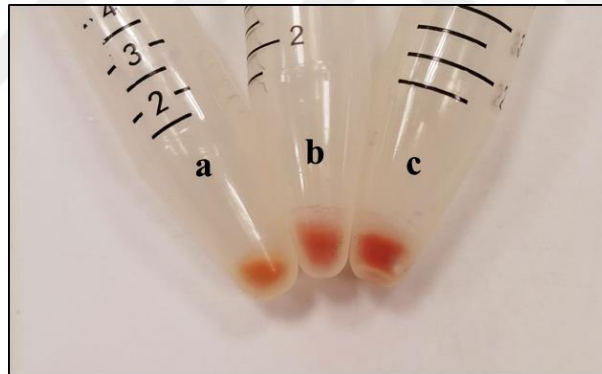


Şekil 4.17: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin 4 g/L glikoz içeren 2xYT besiyerindeki hücre yoğunluğu (a), A₄₇₄/OD₆₀₀ değeri (b) ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu (c).

6 g/L glikoz karbon kaynağıyla desteklenen 2xYT besiyerinde hücre yoğunluğu 24. saatten 72. saate 5'ten 7'ye artış göstermiştir (Şekil 4.18a). A₄₇₄/OD₆₀₀ ölçüm sonuçları 24. saatten 72. saate kadar 5 katına çıkarak 0.31 olarak analiz edilirken (Şekil 4.18b) yaş ağırlık ile hesaplanan likopen konsantrasyonu sonuçlarına bakıldığında 24. saatte 60.1 µg/g, 48. saatte 215.7 µg/g ve 72. saatte 279 µg/g likopen üretimi gözlenmiştir (Şekil 4.18c). Bu hesaplamada da 72. saatte likopen üretiminin yaklaşık 5 katına çıktığı tespit edildi. 4 g/L glikoz konsantrasyonundaki likopen üretiminden oldukça yüksekti. Şekil 4.19'da 24, 48 ve 72. saatteki likopen miktarıyla orantılı olarak renk değişimi gösterilmiştir.

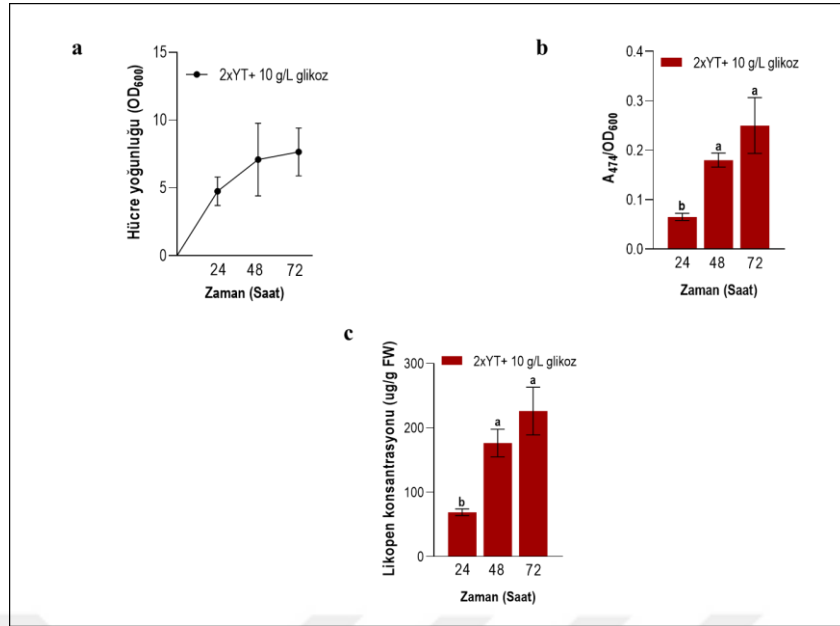


Şekil 4.18: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin 6 g/L glikoz içeren 2xYT besiyerindeki hücre yoğunluğu (a), A₄₇₄/OD₆₀₀ değeri (b) ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu (c).



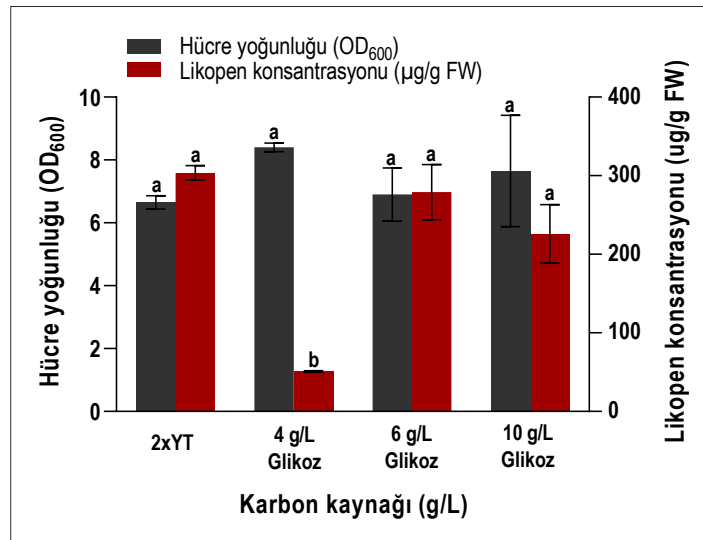
Şekil 4.19: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin 2xYT+glikoz (6 g/L) besiyerindeki 24. saat (a), 48. saat (b), 72. saat (c) pelet görüntüsü.

10 g/L glikoz karbon kaynağıyla desteklenen 2xYT besiyerinde hücre yoğunluğu 24. saatten 72. saate sırasıyla 5'ten 8'e kadar artış gösterdi (Şekil 4.20a). A₄₇₄/OD₆₀₀ sonuçlarında 24, 48 ve 72. saatte sırasıyla 0.07, 0.18 ve 0.25 olarak tespit edildi (Şekil 4.20b) ve yaş ağırlık ile hesaplanan likopen konsantrasyonu sonuçlarında da en iyi likopen üretim 72. saatte 226 µg/g likopen olarak tespit edildi (Şekil 4.20c). Bu konsantrasyondaki likopen üretimi 6 g/L glikoz konsantrasyonundaki likopen üretiminden daha iyi değildi.



Şekil 4.20: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin 10 g/L glikoz içeren 2xYT besiyerindeki hücre yoğunluğu (a), A_{474}/OD_{600} değeri (b) ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu (c).

Şekil 4.21'de gösterildiği gibi glikozun denenen üç konsantrasyonunda da hücre yoğunluğu benzer iken likopen konsantrasyonlarında farklılık gözlemlendi. En fazla miktarda likopen biyosentezi karbon kaynağı kullanılmayan 2xYT besiyeri ve 6 g/L glikoz eklenen 2xYT besiyerinde tespit edildi.

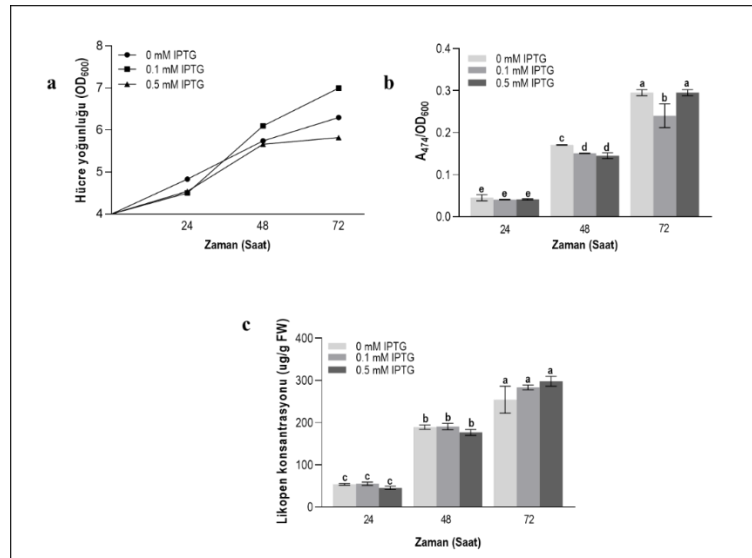


Şekil 4.21: Farklı glikoz konsantrasyonlarında *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin 72. saatteki hücre yoğunluğu ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu.

4.1.8.4. 2xYT+glikoz Besiyerinde IPTG'nin Likopen Üretimine Etkisi

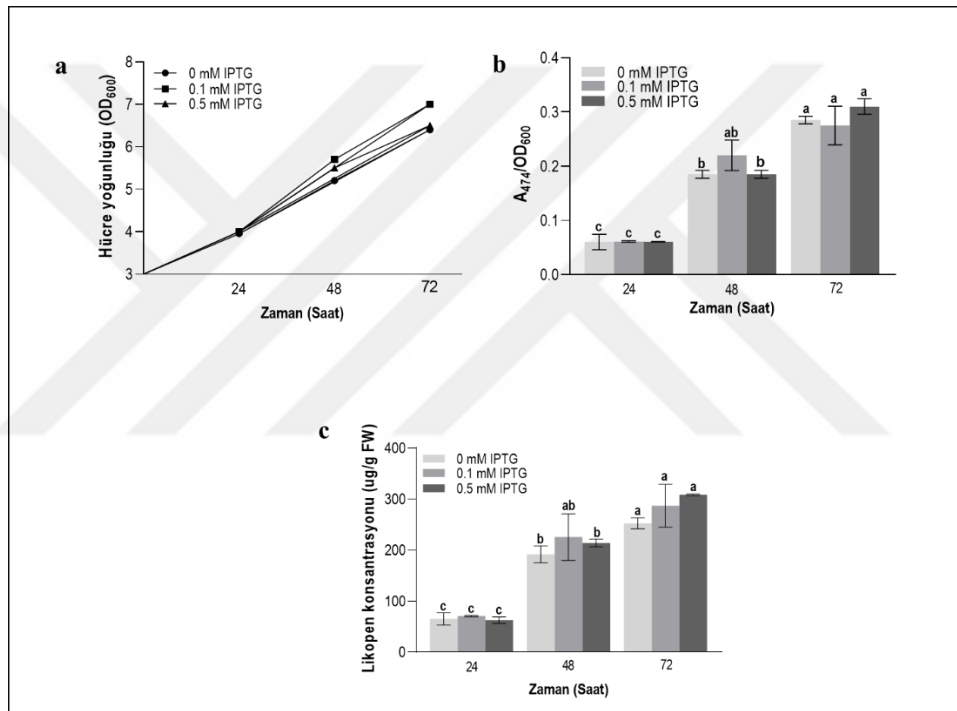
P. putida EM42/pSEVA_LYC soyu 2xYT+glikoz besiyerinde 72 saat büyütüldü. 24, 48 ve 72. saatlerde IPTG'nin etkisini incelemek için örnek alınarak hücre yoğunluğu ve likopen üretimi analiz edildi. Glikoz karbon kaynağı 6 g/L ve 10 g/L konsantrasyonunda iki farklı konsantrasyonda besiyerine eklendi. 0.5 mM ve 1 mM konsantrasyonlarda IPTG eklenerek kültürler uyarıldı.

6 g/L glikoz eklenen 2xYT besiyerinde hücre yoğunlukları 24. saatte 0 mM, 0.1 mM ve 0.5 mM IPTG konsantrasyonlarında sırasıyla 4.8, 4.5 ve 4.5 olarak neredeyse aynıydı (Şekil 4.22a). 48 ve 72. saatte de hücre yoğunlukları farklı IPTG konsantrasyonlarında benzerdi. A_{474}/OD_{600} sonucunda 24. ve 48. saatte farklı IPTG konsantrasyonlarında anlamlı bir fark gözlenmezken 72. saatte 0 mM, 0.1 mM ve 0.5 mM IPTG konsantrasyonlarında sırasıyla 0.29, 0.24 ve 0.29 olarak analiz edildi (Şekil 4.22b). Yaş ağırlıktan hesaplanan likopen konsantrasyonları 24. saatte 0 mM, 0.1 mM ve 0.5 mM IPTG konsantrasyonlarında sırasıyla 54 $\mu\text{g/g}$, 55 $\mu\text{g/g}$ ve 45 $\mu\text{g/g}$; 48. saatte 189 $\mu\text{g/g}$, 190 $\mu\text{g/g}$ ve 177 $\mu\text{g/g}$ ve son olarak 72. saatte ise 254 $\mu\text{g/g}$, 283 $\mu\text{g/g}$ ve 297 $\mu\text{g/g}$ olarak saptandı (Şekil 4.22c). A_{474}/OD_{600} sonucunda 0.5 mM IPTG konsantrasyonunda likopen üretiminde gözlenen hafif azalma yaş ağırlıkla hesaplanan likopen konsantrasyonunda gözlenmedi.



Şekil 4.22: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin 2xYT+glikoz (6 g/L) besiyerindeki hücre yoğunluğu (a), A_{474}/OD_{600} değeri (b) ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonuna IPTG'nin etkisi (c).

10 g/L glikoz eklenen 2xYT besiyerinde hücre yoğunlukları 24. saatte 0 mM, 0.1 mM ve 0.5 mM IPTG konsantrasyonlarında aynı olup 4.0 iken 48. saatte sırasıyla 5.2, 5.7 ve 5.5; 72. saatte ise 6.4, 7.0 ve 6.5 olarak bulundu (Şekil 4.23a). Sonuçta hücre yoğunluklarının üç saattede farklı IPTG konsantrasyonlarında benzer olduğu belirlendi. A_{474}/OD_{600} sonucunda 24. saatte farklı IPTG konsantrasyonlarında anlamlı bir fark gözlenmedi. 48. saatte sırasıyla 0.19, 0.22 ve 0.19 sonuçlarına rastlanırken 72. saatte 0.29, 0.28 ve 0.30 olarak belirlendi (Şekil 4.23b). Likopen konsantrasyon sonuçlarında da IPTG'nin anlamlı bir etkisine rastlanmazken 72. saatte likopen konsantrasyonu 252 $\mu\text{g/g}$ olarak bulundu (Şekil 4.23c).

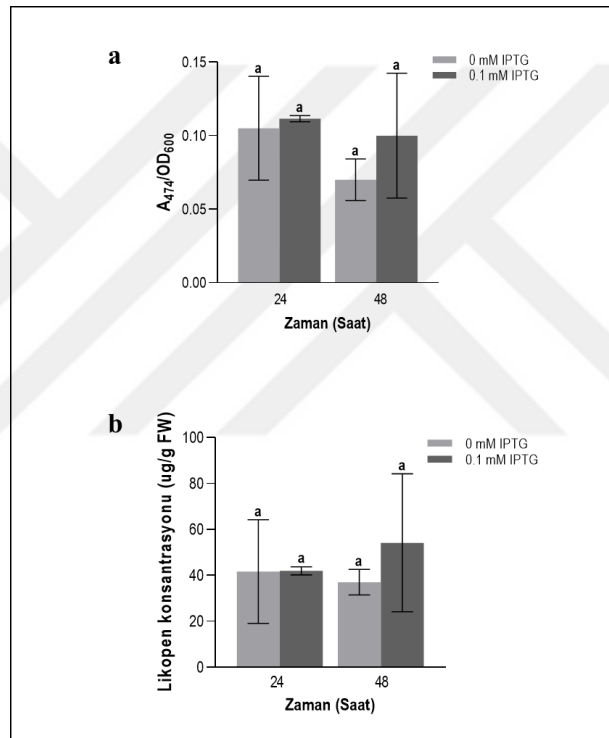


Şekil 4.23: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin 2xYT+glikoz (10 g/L) besiyerindeki hücre yoğunluğu (a), A_{474}/OD_{600} değeri (b) ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonuna IPTG'nin etkisi (c).

4.1.8.5. M9 Minimal Besiyerinde Likopen Üretimi

P. putida EM42/pSEVA_LYC soyu M9 minimal besi ortamına sitrat eklenerek 48 saat büyütüldü. 24 ve 48. saatlerde örnek alınarak hücre yoğunluğu ve likopen üretimi analiz edildi. Aynı zamanda 0.1 mM konsantrasyon IPTG'nin likopen üretimi üzerine etkisi incelendi.

M9 minimal besiyerindeki bakteri hücre yoğunluğu diğer besi ortamlarındaki hücre yoğunluğuna göre oldukça düşük olarak tespit edildi. IPTG ile uyarılan kültürdeki hücre yoğunluğuyla uyarılmayan kültürün hücre yoğunluğu benzerdi ve 24. saatte 0.70, 48. saatte 0.60 olarak bulundu. A_{474}/OD_{600} sonuçlarında 24. saatte 0 mM ve 0.1 mM IPTG konsantrasyonlarındaki sonuçlar sırasıyla 0.10 ve 0.11, 48. saatte 0.07 ve 0.10 iken (Şekil 4.24a) yaş ağırlıkla hesaplanan likopen konsantrasyonu değerlerine bakıldığında 24. saatte sonuçlar sırasıyla 41 $\mu\text{g/g}$ ve 42 $\mu\text{g/g}$, 48. saatte 37.0 $\mu\text{g/g}$ ve 54 $\mu\text{g/g}$ olarak belirlendi (Şekil 4.24b) ve her iki hesaplama göre likopen üretimindeki sonuçlar birbirleriyle uyumluydu.



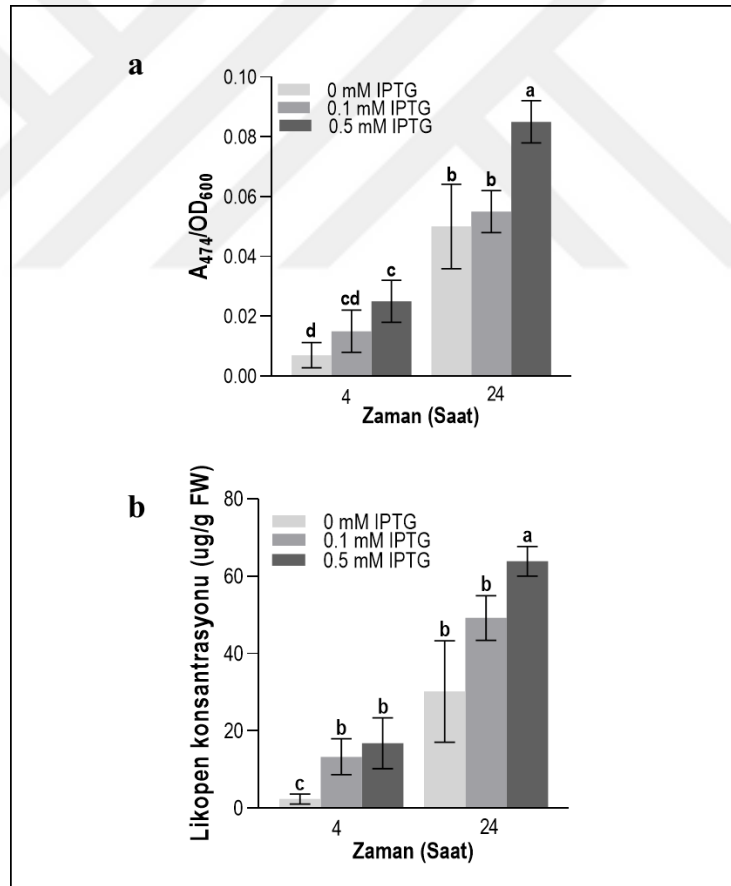
Şekil 4.24: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin M9 minimal (sitrat) besiyerindeki A_{474}/OD_{600} değeri(a) ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu (b).

4.1.8.6. M9 Kazein Minimal Besiyerinde Likopen Üretimi

P. putida EM42/pSEVA_LYC soyu M9 minimal besiyerine sitrat ve son konsantrasyonu % 0.2 olacak şekilde kazein eklenerek 24 saat büyütüldü. 4. ve 24. saatlerde örnek alınarak hücre yoğunluğu ve likopen üretimi analiz edildi. Aynı

zamanda 0.1 mM ve 0.5 mM IPTG konsantrasyonunun likopen üretimi üzerine etkisi incelendi.

Hücre yoğunluğunda 4. saatten 24. saate IPTG'nin bütün konsantrasyonlarında düşüş gözlemlendi ve hücre yoğunlukları birbirine yakındı. 4. saatte 0 mM, 0.1 mM ve 0.5 mM IPTG konsantrasyonlarında sırasıyla 2.0, 2.3 ve 2.0; 24. saatte ise yine aynı sırada 1.90, 1.94 ve 1.91 olarak bulundu. A_{474}/OD_{600} sonuçlarına bakıldığında 0 mM, 0.1 mM ve 0.5 mM IPTG konsantrasyonlarındaki sonuçlar sırasıyla 4. saatte 0.01, 0.02 ve 0.03 iken 24. saatte 0.05, 0.06 ve 0.09 olarak bulundu (Şekil 4.25a). Yaş hücre ağırlığıyla bulunan likopen konsantrasyonu değerlerinde sonuçlar 4. saatte yine sırasıyla 2.5 $\mu\text{g/g}$, 13.0 $\mu\text{g/g}$ ve 17.0 $\mu\text{g/g}$; 24. saatte ise 30 $\mu\text{g/g}$, 49 $\mu\text{g/g}$ ve 64 $\mu\text{g/g}$ olarak gözlemlendi (Şekil 4.25b). Artan IPTG konsantrasyonlarıyla beraber likopen üretiminde de olumlu bir artış tespit edildi.

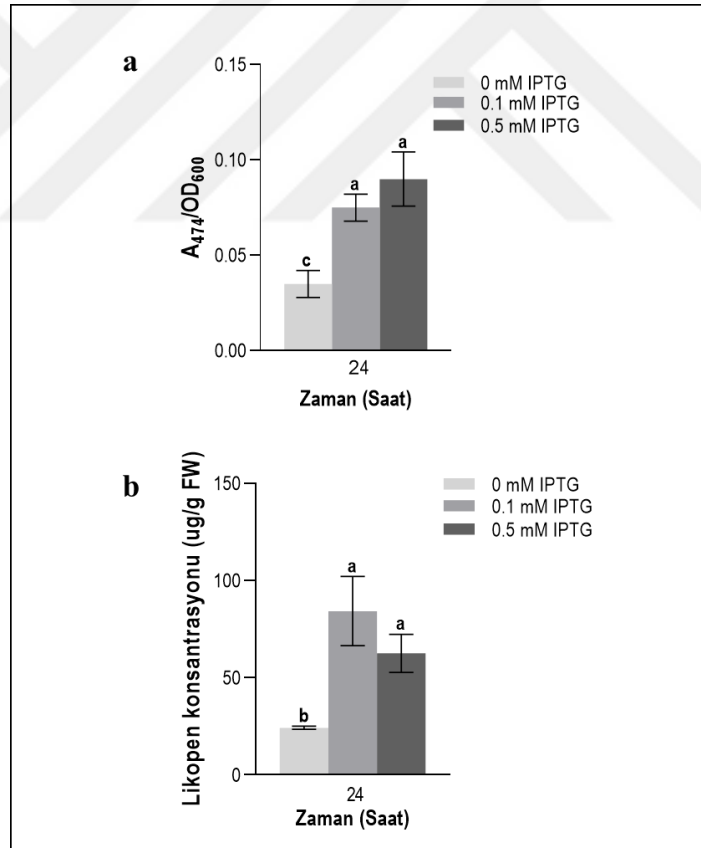


Şekil 4.25: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin M9 kazein minimal (sitrata) besiyerindeki A_{474}/OD_{600} değeri(a) ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu (b).

4.1.8.7. M9 Kazein Minimal Besiyesinde (+Goodies) Likopen Üretimi

P. putida EM42/pSEVA_LYC soyu M9 kazein minimal besiyesine sitrat ve goodies eklenerek 24 saat büyütüldü. 24. saatte örnek alınarak hücre yoğunluğu ve likopen üretimi analiz edildi. Aynı zamanda 0.1 mM ve 0.5 mM IPTG konsantrasyonunun likopen üretimine etkisi incelendi.

Hücre yoğunlukları 24. saatte IPTG'nin bütün konsantrasyonlarında birbirine yakındı ve yaklaşık 2.0 olarak belirlendi. A_{474}/OD_{600} sonuçlarında 0 mM, 0.1 mM ve 0.5 mM IPTG konsantrasyonlarında sırasıyla 24. saatte 0.04, 0.06 ve 0.09 iken (Şekil 4.26a) likopen konsantrasyonu değerlerine bakıldığında sonuçlar yine sırasıyla 24.0 $\mu\text{g/g}$, 84.0 $\mu\text{g/g}$ ve 62.0 $\mu\text{g/g}$ olarak gözlemlendi (Şekil 4.26b). A_{474}/OD_{600} ölçümlerinde görülen IPTG'nin olumlu etkisine yaş ağırlıkla elde edilen likopen konsantrasyon sonuçlarında rastlanmadı.

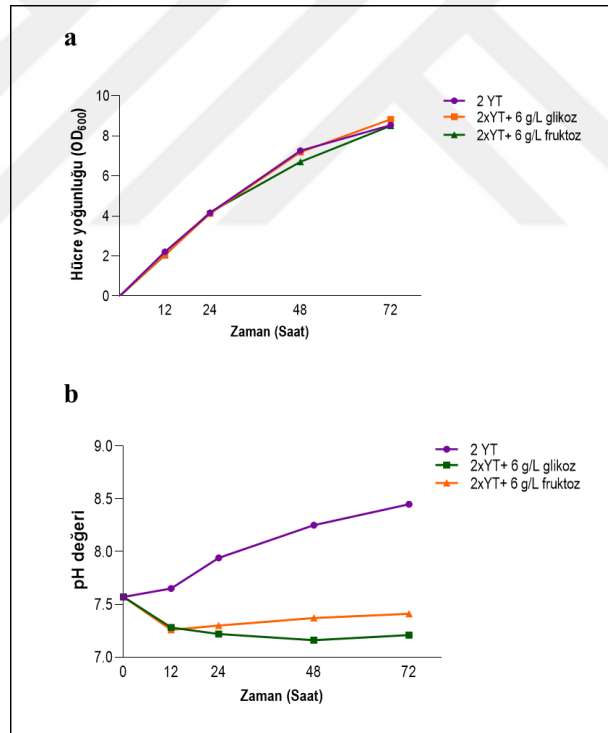


Şekil 4.26: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin M9 kazein (+goodies) minimal (sitrat) besiyesindeki A_{474}/OD_{600} değeri(a) ve yaş hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen konsantrasyonu (b).

4.2. Fruktoz ve Glikoz Karbon Kaynaklarının 2xYT Besiyerinde pH Değişimine Etkisi

P. putida EM42 ve *P. putida* EM42/pSEVA_LYC soyları 2xYT, 2xYT+glikoz ve 2xYT+fruktoz besiyerlerinde 72 saat büyütüldü. 12, 24, 48 ve 72. saatlerde pH değişimine ve hücre yoğunluğuna bakıldı.

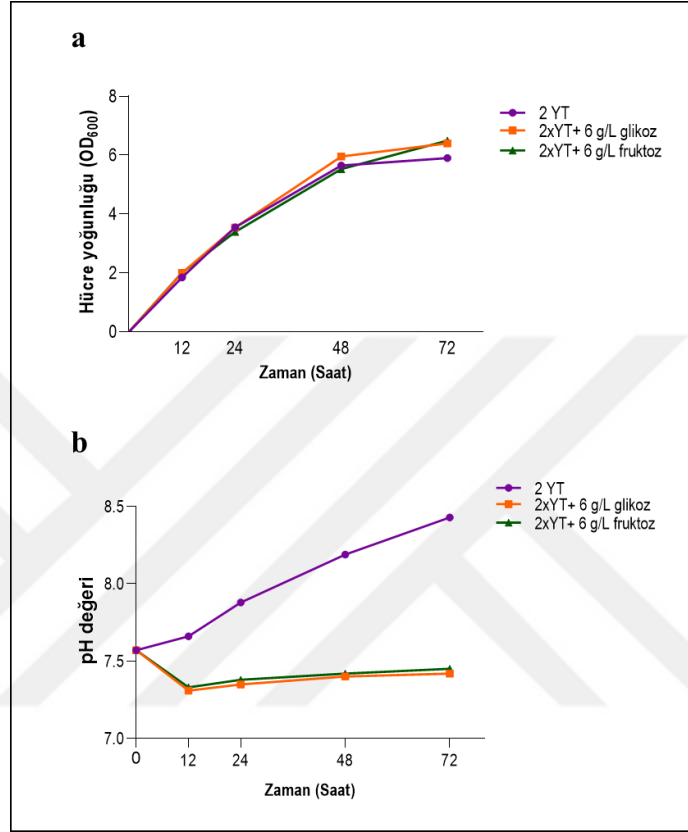
P. putida EM42 soyunda hücre yoğunluğu üç besiyerinde de yaklaşık aynıydı ve 12, 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 2.0, 4.0 ve 7.0 olarak tespit edildi (Şekil 4.27a). Karbon kaynağı eklenmemiş olan 2xYT ortamında pH değeri, inkübasyonun ilk saatlerinde 7.57 iken 12, 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 7.65, 7.94, 8.25 ve 8.45 olarak gözlemlendi. Sonuçta ortamın hafif bir şekilde bazikleştiği belirlendi. 2xYT+glikoz ve 2xYT+fruktoz ortamlarında ise pH değerinin başlangıçta 7.57 iken 72 saat sonunda yaklaşık 7.3'e düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.27b).



Şekil 4.27: *P. putida* EM42'nin 2xYT, 6 g/L glikoz ve 6 g/L fruktoz karbon kaynakları içeren 2xYT besiyerlerindeki hücre yoğunluğu (a), pH değeri(b).

P. putida EM42/pSEVA_LYC soyunda da benzer sonuçlar elde edildi. Hücre yoğunluğu üç besiyerinde de yaklaşık aynı olmakla birlikte 12, 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 2.0, 3.0 ve 5.5 olarak analiz edildi (Şekil 4.28a). Karbon kaynağı eklenmemiş

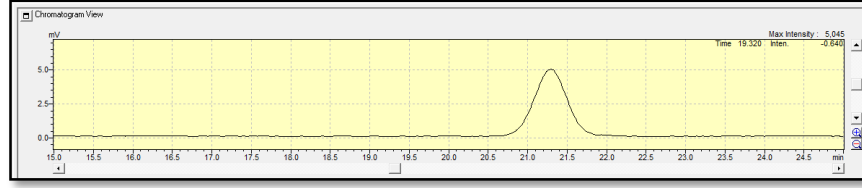
olan 2xYT ortamında pH değeri, inkübasyonun ilk saatlerinde 7.57 iken 12, 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 7.66, 7.88, 8.19 ve 8.43 olarak gözlenerek gittikçe bazikleşti. 2xYT+glikoz ve 2xYT+fruktoz ortamlarında ise pH değerinin başlangıçta 7.57 iken 72 saat sonunda yaklaşık pH değerinin 7.4'e düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.28b).



Şekil 4.28: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin 2xYT, 6 g/L glikoz ve 6 g/L fruktoz karbon kaynakları içeren 2xYT besiyerlerindeki hücre yoğunluğu (a), pH değeri(b).

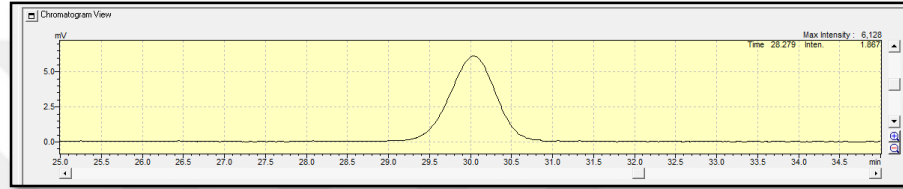
4.3. Likopen Konsantrasyonunun HPLC Analiziyle Belirlenmesi

Mobil faz olarak metanol:tetrahidrofuran:dH₂O su (66:30:4) karışımının (mobil faz 1) kullanıldığı metotta standart piki (Şekil 4.29) 21. dakikada geldi. Ancak mobil faz içeriğindeki fazla hacimdeki tetrahidrofuranın HPLC cihaz kolonuna verebileceği zarardan dolayı başka metotların denenmesine karar verildi.



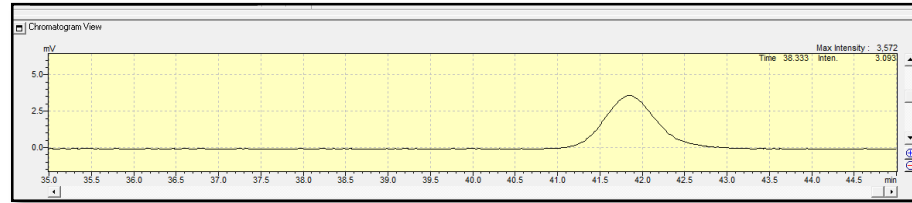
Şekil 4.29: Mobil faz 1’de likopen standardının 21. dakikada gelen piki.

Asetonitril:metanol:tetrahidrofuran (75:20:5) karışımının (mobil faz 2) kullanıldığı metotta ise likopen standart piki (Şekil 4.30) 30. dakikada geldi. Yarım saatlik analiz süresini kısaltabilmek adına optimizasyona devam edildi.



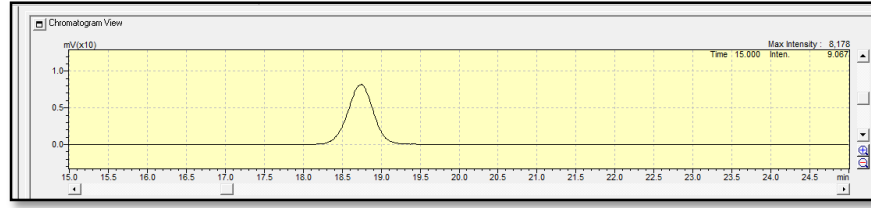
Şekil 4.30: Mobil faz 2’de likopen standardının 30. dakikada gelen piki.

Asetonitril:tetrahidrofuran (90:10) karışımının (mobil faz 3) kullanıldığı metotta pikin (Şekil 4.31) alıkonma zamanı ise 41. dakikada tespit edildi.



Şekil 4.31: Mobil faz 3’de likopen standardının 41. dakikada gelen piki.

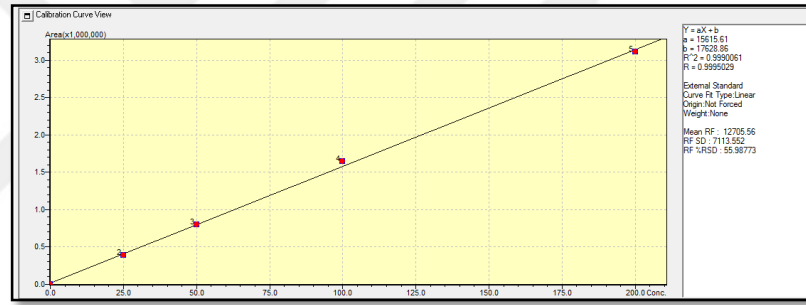
Likopen standart pikinin (Şekil 4.32) en erken dakikada (18. dakika) alıkonduğu ve analizlerin yapılmaya karar verildiği mobil faz 4 asetonitril:metanol:diklorometan (42:42:16) karışımı olarak belirlendi.



Şekil 4.32: Mobil faz 4’de likopen standardının 18. dakikada gelen piki.

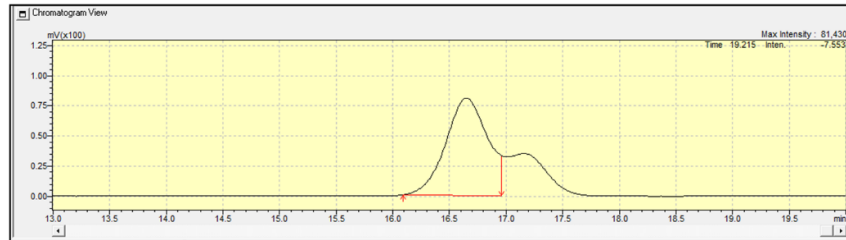
4.3.1. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Kalibrasyon eğrisinin (Şekil 4.33) çizilmesi için beş farklı konsantrasyonda asetonitril:metanol:tetrahidrofuran karışımı içinde hazırlanan likopen standart örnekleri belirtilen koşullarda HPLC cihazında okutuldu. 17. dakikada gelen piklerin konsantrasyonları, yoğunluk ve alan sonuçları birbirleriyle orantılıydı.



Şekil 4.33: Likopen kalibrasyon eğrisi.

HPLC’deki likopen üretimi analizlerinde *P. putida* EM42/pSEVA_LYC’nin ürettiği likopenin pikinin görüntüsü ve konsantrasyon hesabı yaparken seçilen pik alanı Şekil 4.34’te gösterildi.



Şekil 4.34: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC’nin ürettiği likopen pikinin HPLC görüntüsü.

4.3.2. Yardımcı Karbon Kaynağı Olarak Fruktozun ve Glikozun Hücre Büyümesi ve Likopen Miktarı Üzerine Etkisi

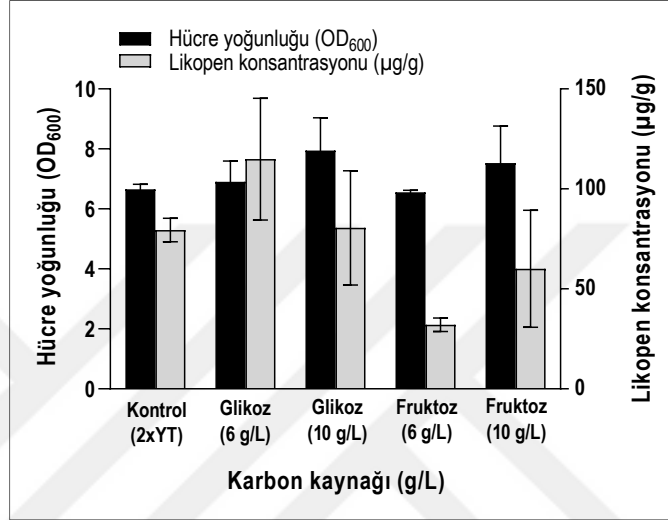
Spektrofotometre sonuçlarına göre belirlenen en iyi likopen biyosentezinin gözlendiği 2xYT, 2xYT+fruktoz, 2xYT+glikoz ve LB+fruktoz besiyerlerindeki likopen konsantrasyonunu daha hassas bir şekilde analiz edebilmek için HPLC cihazı kullanıldı. 72. saatteki örneklerin HPLC sonuçlarına göre (Tablo 4.1) en iyi likopen üretimi 6 g/L glikoz kullanılan 2xYT besiyerinde 114.9 ± 26.4 mg/l olarak tespit edildi. Daha sonraki en iyi likopen biyosentezinin gözlendiği iki besiyeri ise sırasıyla karbon kaynağı ilavesiz 2xYT besi ortamında 79.45 ± 8.9 mg/l ve 10 g/L glikoz kullanılan 2xYT besi ortamında 80.55 ± 28.6 mg/l olarak belirlendi. 2xYT+fruktoz ve LB+fruktoz besiyerlerindeki likopen biyosentezi bu üç besiyerine göre oldukça düşüktü.

Tablo 4.1’de görülen bakteri kuru ağırlığı (g/L) ve kuru ağırlıktan hesaplanan likopen miktarı (mg/g DCW) incelendiğinde kuru ağırlık azaldıkça likopen miktarında artış gözlendi. Kuru ağırlıktan hesaplanan likopen miktarı ile uyumlu olarak kuru ağırlık düştükçe HPLC analizi sonucu elde edilen likopen üretiminde de (mg/L) artış tespit edildi.

Tablo 4.1: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC’nin farklı besiyerlerinde 72. saatteki kuru ağırlığı, kuru hücre ağırlığı dikkate alınarak hesaplanan likopen miktarı ve HPLC analizi sonucu elde edilen likopen üretimi.

Besiyeri ortamı	Kuru ağırlık (g/L)	Likopen miktarı (mg/g DCW)	Likopen üretimi (mg/L)
2xYT	2.277 ± 0.1	1.054 ± 0.0	79.45 ± 8.9
2xYT + 6 g l ⁻¹ glikoz	2.020 ± 0.2	1.317 ± 0.2	114.9 ± 26.4
2xYT + 10 g l ⁻¹ glikoz	-	-	80.55 ± 28.6
2xYT + 6 g l ⁻¹ fruktoz	2.464 ± 0.1	0.290 ± 0.1	32.1 ± 3.4
2xYT + 10 g l ⁻¹ fruktoz	-	-	60.11 ± 29.2
LB + 10 g l ⁻¹ fruktoz	2.851 ± 0.0	0.658 ± 0.0	54.86 ± 0.2

Şekil 4.35'te gösterilen 72. saat HPLC analizleri sonucuna göre en iyi üretimin gözlemlendiği 6 g/L glikoz eklenmiş 2xYT besiyerinde *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin hücre yoğunluğu 6.9 olarak gözlenirken karbon kaynağı eklenmeyen ve 6 g/L fruktoz eklenen 2xYT ortamındaki hücre yoğunluğu ile çok yakındı. 10 g/L glikoz ve 10 g/L fruktoz eklenen 2xYT ortamında ise 7.9 ve 7.5 olarak tespit edilen hücre yoğunlukları biraz daha yüksekti.



Şekil 4.35: *P. putida* EM42/pSEVA_LYC'nin farklı besiyerlerinde 72. saatteki hücre yoğunluğu ve HPLC analizi sonucu elde edilen likopen üretimi.

5. TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında likopen biyosentezi için tasarlanmış olan sentetik likopen operonunu içeren *P. putida* EM42/pSEVA_LYC soyunun hücre büyümesi ve likopen üretim performansı farklı besiyerlerinde (LB, otoindüksiyon, 2xYT vb.) test edilmiştir. Likopen üretimi için LB besiyeri kullanıldığında hem hücre yoğunluğunun hem de likopen miktarının çok düşük olduğu belirlenmiştir. LB besiyerinin çok az miktarda karbonhidrat, peptit ve serbest aminoasitler içerdiği bilinmektedir. Bu sonuç daha önce Zhang ve arkadaşları tarafından *E. coli*'de likopen üretimi için bildirilen verilere benzerlik göstermektedir. Söz konusu çalışmada *E. coli* K-12 (pACLYCipi) soyunda LB besiyerine 6 g/L fruktoz eklendiğinde maksimum likopen biyosentezine (1.050 mg/L) ulaşılmıştır. Setoodeh ve arkadaşları ise çalışmalarında, *P. putida* KT2440 bakterisinde LB besiyerine 20 g/L glikoz eklediklerinde ramnolipid konsantrasyonunda artış gözlemlemişlerdir [Setoodeh et al., 2013]. Bu nedenle tez çalışmasında öncelikle LB besiyerine glikoz, fruktoz, laktoz ve maltoz gibi çeşitli yardımcı karbon kaynakları eklenmiş daha sonra ise farklı besiyerleri denenmiştir. Bu denemeler neticesinde bakterinin likopen biyosentezi analiz edildiğinde en iyi likopen üretiminin gözlendiği glikoz ve fruktoz karbon kaynaklarıyla desteklenen LB ve 2xYT besiyerleri daha ileri yapılacak optimizasyon çalışmaları için en uygun besiyerleri olarak seçilmiştir. İlk etapta spektrofotometrik analizler sonucu elde edilen verilere bakıldığında en iyi likopen biyosentezi 2xYT ve 2xYT+glikoz (6 g/L) besiyerleri için bakteri kültürünün 72. saatinde gözlenirken; HPLC analizi sonrasında likopen biyosentezi için en uygun besiyeri 2xYT+glikoz (6 g/L) olarak tespit edilmiştir. M9 minimal besi ortamında yapılan optimizasyonlar sonucunda ise test edilen diğer besiyerlerine görece daha düşük miktarda likopen üretimi gözlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında likopen biyosentezi üzerine etkisinin irdelenmesi amacıyla besiyerlerine farklı konsantrasyonlarda IPTG ilave edilmiş ancak IPTG'nin likopen üretimi üzerinde belirgin bir katkısı gözlenmemiştir. Bu sonuç, literatürde elde edilen bazı bulgularla uyumludur [Yoon et al., 2007], [Thakker et al., 2011]. *P. putida*'da *P_{lac}* türevi promotorların farklı etkinliği daha önce bildirilmiştir. Lac operonunu içeren sistemlerde kaçak ekspresyon nedeniyle yeterince uyarımın elde edilemediği durumların varlığı bilinmektedir [Cook et al., 2018]. IPTG'nin likopen biyosentezi üzerine olumlu etkisinin gözlenmemesinin nedenleri arasında ihtiyaç

duyulmayan proteinlerin fazla miktarda üretilmesinin neden olduğu metabolik yük ile IPTG ile indüksiyonu takiben likopen sentezinden sorumlu genlerin aşırı ifadesi sonucunda hücrelerdeki hayati öneme sahip metabolik reaksiyonlar için gerekli olan FPP'nin yetersizliği de öngörülebilir. Ancak bu öngörülerin kesinleşmesi adına yapılacak detaylı çalışmalara gereksinim vardır.

Değerli bileşiklerin bakteriler kullanılarak üretimi aşamasında farklı besiyerilerinin test edilerek, optimizasyon çalışmalarının yapılması oldukça önem taşımaktadır [Mandenies and Brundin, 2008]. Setoodeh ve arkadaşlarının, *P. putida* KT2440'ta ramnolipid üretimi üzerine yaptıkları çalışmada (2013) besiyeri optimizasyonu sonucunda peptonun (aminoasit kaynağı) ve maya özütünün ramnolipid üretimi üzerine olumlu etkisi tespit edilmiştir. Pepton, maya özütü ve gliserolün bir arada bulunması ise ramnolipid eldesinde olumsuz bir etki yaratmıştır [Setoodeh et al., 2013]. LB besiyerinde bulunan bakterilerin büyümesinde aminoasit kaynağı olarak görev yapan tripton ve bakterilerin hücre içindeki tuz konsantrasyonunu dengede tutarak fazla suyun hücre içine veya dışına taşınmasıyla ozmozı gerçekleştiren NaCl % 1 oranında bulunurken, içerisinde bakteri büyümesini destekleyen birçok vitamin, mineral ve aminoasit kaynağını ihtiva eden maya özütü ise % 0.5 oranında bulunmaktadır. Bu bileşenlerin konsantrasyonları 2xYT besiyerinde tripton için % 1.6, NaCl için % 0.5 ve maya özütü için ise % 1 oranındadır. Bu verilere göre tez çalışmasında 2xYT besiyerinde LB besiyerine görece daha fazla miktarda bulunan tripton ve maya özütünün üretilen likopen konsantrasyonunu artırdığı söylenebilir.

Xu ve arkadaşları *E. coli* JM109 (pTrc99A-EBI) soyunda, 2xYT besiyerine farklı karbon kaynakları (glukoz, fruktoz ve gliserol) ekleyerek yaptıkları optimizasyonlar sonucunda % 6 oranında kullandıkları gliserol içeren 2xYT ortamında en iyi likopen biyosentez miktarını 280 mg/L olarak bildirmiştir. % 6 oranında glukoz bulunan 2xYT besiyerinde ise likopen biyosentezi yaklaşık 180 mg/L (yaklaşık biyokütle 6 g/L DCW) olarak analiz edilmiştir [Xu et al., 2018]. Bu tez çalışmasında ise maksimum likopen biyosentezi 6 g/L konsantrasyonda glukoz kullanılarak hazırlanan 2xYT besiyerinde gözlenmiştir. Kim ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada ise *E. coli* SURE (pACM-EBI) soyunda yine en iyi likopen üretimi LB besiyerinde gliserol karbon kaynağı kullanılarak 280 µg/L (89 µg/g) tespit edilirken, aynı çalışmada glukoz, laktoz ve maltoz karbon kaynakları kullanıldığında sırasıyla 3.40, 9.30 ve 46.16 µg/g likopen elde edilmiştir. LB besiyeri gliserol, glukoz,

laktoz ve maltoz karbon kaynakları ile desteklendiğinde sırasıyla 23 µg/g, 133 µg/g, 2.5 µg/g ve 42 µg/g likopen konsantrasyonu analiz edilmiştir [Kim et al., 2010]. Tez çalışmasında glikoz karbon kaynağı ile elde edilen likopen miktarı bu makaledeki gliserol ve glikoz ile elde edilen likopen miktarından daha fazladır.

Kang ve arkadaşları tarafından 2020’de yapılan çalışmada *Deinococcus radiodurans* R1 soyunda *crtLm* genini kodlayan likopen siklaz, likopenin γ-karotene dönüşümünü önlemek için silinip, *crtB* geninin aşırı ekspresyonu sağlandığında 10 g/L glikoz içeren yarı tanımlanmış besi ortamında 29.9 ± 1.4 mg/L likopen üretimi tespit edilirken; tez çalışmasında glikoz 10 g/L oranında kullanılarak 80 mg/L; 6 g/L oranında kullanıldığında ise 114 mg/L likopen üretimi ile daha iyi bir sonuç elde edilmiştir. Hernandez-Arranz ve arkadaşlarının 2019’da yaptıkları ve literatür verilerine göre likopenin *P. putida* KT2440 bakterisinde üretiminin denendiği tek çalışmada *Pantoea ananatis*’ten *crtE*, *crtI* ve *crtB* genleri alınarak *P. putida* KT2440’a aktarılmıştır. İlgili soy LB besiyerinde 24 saat büyütüldükten sonra yapılan HPLC analizi sonucunda 1,223 ng/ml likopen biyosentezi tespit edilmiştir. Söz konusu likopen miktarı bu tez çalışmasından elde edilen likopen üretimine görece oldukça düşüktür. Bu çalışma rekombinat *P. putida* EM42 soyunda likopen üretiminin plazmit üzerindeki sentetik bir operon kullanılarak gerçekleştirildiği ve farklı besiyeri optimizasyonlarının yapıldığı ilk çalışmadır. Elde edilen sonuçlara göre glikozun likopen üretimini stimüle eden etkili bir karbon kaynağı olabileceği düşünülmekte olup; çalışmanın devamında yapılacak detaylı araştırmalara gereksinim vardır. Aynı çalışmada *crtEIB* operonu kendi promotörü ile *P. putida* KT2440’ın kromozomuna entegre edildiğinde ise likopen üretimi 0,106 ng/ml olarak analiz edilmiştir ve sonrasında yapılan optimizasyonlar sonucu yaban tipi bakteriye görece 50 kat daha fazla likopen biyosentezi bulunmuştur [Hernandez et al., 2019]. Söz konusu çalışmada sadece LB besiyeri denenmiş ve oldukça düşük miktarda likopen üretimi bulunmuştur. Dolayısıyla bu çalışma rekombinat *P. putida* EM42 kullanılarak likopen üretiminin plazmit üzerindeki sentetik bir operon tarafından denendiği ve farklı besiyeri optimizasyonlarının yapıldığı ilk çalışmadır. Elde edilen sonuçlara göre glikozun likopen üretimini stimüle eden etkili bir karbon kaynağı olabileceği düşünülmekte olup; çalışmanın devamında yapılacak detaylı araştırmalara gereksinim vardır.

Metabolizmadaki pH dengesi kritiktir; çünkü biyolojik moleküllerin işlevi pH değerine bağlıdır. Bakteriler farklı habitatlarda gelişir ve bulundukları çevre onların davranışlarını etkiler. Hücre içi pH değerleri nötre yakın olmakla birlikte hücre dışı

pH, ortamın başlangıç pH değerinden, bakterinin büyüme aşamasından, fizyolojisinden vb. etkilenmektedir. Sanchez-Clemente ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *P. putida* KT2440 nötrofilik bakterisinin bakteriyel büyüme sırasındaki pH değişimini irdelerken, LB besi ortamında glikoz yokken başlangıç pH değerinin 7'nin üzerinde olduğunu ancak ortamın pH değerinin zamanla 8.5'a ulaştığını belirtmiştir [Sanchez-Clemente et al., 2018]. Daha sonra ortama 4 g/L glikoz eklendiğinde pH değeri başlangıç pH değerinin hafif altında seyretmiştir [Sanchez-Clemente et al., 2018]. Tez çalışmasından elde edilen sonuçlarda da *P. putida* EM42/pSEVA_LYC ve *P. putida* EM42 bakteri soylarının her ikisi için karbon kaynağı içermeyen 2xYT ve fruktoz ya da glikoz içeren 2xYT besiyerindeki başlangıç pH değeri 7.5 iken karbon kaynağı içermeyen besiyerinde pH değeri yaklaşık 8.5'a, karbon kaynağı kullanılan besiyerinde ise pH değeri 7.5'un altına düşmüştür. Karbon kaynakları tüketildiğinde ortamdaki aminoasitlerin asimilasyonu sonucu amonyum konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak besiyerindeki pH değerinin bazikleşmesi beklenen bir sonuçtur.

Karotenogenik *Pantoea ananatis* bakterisinde doğal karotenoid biyosentetik yolağın endojenik olarak sentezlenmesi avantaj gibi görünse de GRAS (Generally Recognized as Safe) kategorisinde olmayan bu türe göre, *Pantoea ananatis*'ten likopen senteziyle ilgili genlerin aktarıldığı rekombinant *P. putida* EM42/pSEVA_LYC soyu; basit büyüme ortamı ve toksisiteye karşı yüksek dayanıklılığı gibi öne çıkan özellikleriyle likopen üretimi için uygun bir konakçı olarak ön plana çıkmaktadır. Literatürde *P. putida* bakterisinde likopen biyosentezine yönelik az sayıda çalışma mevcut olduğundan; tez çalışması uygun koşulların sağlanması durumunda *P. putida* bakterisinin likopenin fazla miktarda biyosentezi için alternatif iyi bir mikrobiyal üretim platformu olabileceğine işaret etmektedir.

KAYNAKLAR

- Adadi P., Nadezhda V. B., Elena F. K., (2018), "Selected methods of extracting carotenoids, characterization and health concerns: A review", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(24), 5925-47.
- Aguilar F., Autrup H., Barlow S., Castle L., Crebelli R., Dekant W., Engel K. H., Gontard N., Gott D., Grilli S., Gürtler R., Larsen J. C., Leclercq C., Leblanc J. C., Malcata F. X., Mennes W., Milana M. R., Pratt I., Rietjens I., Tobback P., Toldrá F., (2008), "Use of lycopene as a food colour, scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food", *The EFSA Journal*, 674, 1-66.
- Ajikumar P. K., Xiao W. H., Tyo K. E. J., Wang Y., Simeon F., Leonard E., Mucha O., Phon T. H., Pfeifer B., Stephanopoulos G., (2010), "Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*", *Science*, 330(6000), 70-74.
- Akkaya Ö., Arslan E., (2019), "Biotransformation of 2,4-dinitrotoluene by the beneficial association of engineered *Pseudomonas putida* with *Arabidopsis Thaliana*", *Biotech*, 9, 408.
- Albermann C., (2010), "High versus low level expression of the lycopene biosynthesis genes from *Pantoea ananatis* in *Escherichia coli*", *Biotechnology Letters*, 33(2), 313-319.
- Alper H., Yong S. J., Moxley J. F., Stephanopoulos G., (2005), "Identifying gene targets for the metabolic engineering of lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*", *Metabolic Engineering*, 7(3), 155-64.
- Ambrósio C. L. B., Campos F. A. C. E. S., De Faro Z. P., (2006), "Carotenoids as an alternative against hypovitaminosis A", *Revista de Nutricao*, 19(2), 233-43.
- Anshumalee N., Shashikanth M. C., Shambulingappa P., Deepak U., (2007), "Lycopene: A promising antioxidant", *JIAOMR*, 19(04), 458-463.
- Avalos J., Limón M. C., (2015), "Biological roles of fungal carotenoids", *Current Genetics*, 61(3), 309-24.
- Bağdatlıoğlu N., Demirbükler B., (1999), "Gıda işlemede karotenoidlerde meydana gelen gelişmeler", *Gıda*, 9, 4851.
- Beites T., Mendes M. V., (2015), "Chassis optimization as a cornerstone for the application of synthetic biology based strategies in microbial secondary metabolism", *Frontiers in Microbiology*, 6.

Beuttler H., Hoffmann J., Jeske M., Hauer B., Schmid R. D., Altenbuchner J., Urlacher V. B., (2011), "Biosynthesis of zeaxanthin in recombinant *Pseudomonas putida*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(4), 1137-47.

Bian G., Deng Z., Liu T., (2017), "Strategies for terpenoid overproduction and new terpenoid discovery", *Curr Opin Biotechnol*, 48, 234-41.

Boyer R. F., (2009), "Biochemistry laboratory: Modern theory and techniques", Prentice Hall.

Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity GM., (2005), "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", *Bergey's Man. Syst. Bacteriol*, 2, 1-399.

Britton G., (2008), "Carotenoids", 4th Edition, Birkhäuser Basel.

Calero P., Jensen S. I., Nielsen A. T., (2016), "Broad-host-range ProUSER vectors enable fast characterization of inducible promoters and optimization of p-coumaric acid production in *Pseudomonas putida* KT2440", *ACS Synth Biol*, 5(7), 741-753.

Campbell J. K., Erdman J. W., (2005), "Tomato, Lycopene, and Prostate Cancer", *Preventive Nutrition*, 157-170.

Carvalho P. G. B., Machado C. M. M., Moretti C. L., Fonseca M. E. N., (2006), "Hortaliças como alimentos funcionais", *Horticultura Brasileira*, 24(4), 397-404.

Chatzivasileiou A. O., Valerie W., Steven M. E. B., Gregory S., (2019), "Two-step pathway for isoprenoid synthesis", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(2), 506-11.

Chen Y. Y., Galloway K. E., Smolke C. D., (2012), "Synthetic biology: Advancing biological frontiers by building synthetic systems", *Genome Biology*, 13(2), 240.

Chiang S. J., (2004), "Strain improvement for fermentation and biocatalysis processes by genetic engineering technology", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31, 99-108.

Clifton P. M., Noakes M., Ross D., Fassoulakis A., Cehun M., Nestel P., (2004), "High dietary intake of phytosterol esters decreases carotenoids and increases plasma plant sterol levels with no additional cholesterol lowering", *Journal of Lipid Research*, 45(8), 1493-99.

Cook T. B., Rand J. M., Nurani W., Courtney D. K., Liu S. A., Pflieger B. F., (2018), "Genetic tools for reliable gene expression and recombineering in *Pseudomonas putida*", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 45(7), 517-527.

Costa-Rodrigues J., Pinho O., Monteiro P. R. R., (2018), "Can lycopene be considered an effective protection against cardiovascular disease?", 245, 1148-1153.

Crowe-White K. M., Phillips T. A., Ellis A. C., (2019), "Lycopene and cognitive function", *Journal of Nutritional Science*, 8(20), 1-8.

Cunningham F. X., (1994), "Molecular Structure and Enzymatic Function of Lycopene Cyclase from the Cyanobacterium *Synechococcus* sp Strain PCC7942", *The Plant Cell Online*, 6(8), 1107-1121.

Dammeyer T., Steinwand M., Kruger S. C., Dübel S., Hust M., Timmis K. N., (2011), "Efficient production of soluble recombinant single chain Fv fragments by a *Pseudomonas putida* strain KT2440 cell factory", *Microb Cell Fact*, 10, 11.

Darvin M. E., Wolfram S., Juergen L., Theognosia V., (2011), "The role of carotenoids in human skin", *Molecules*, 16(12), 10491-506.

Delfan A. S., Zahra E., Majid B., Giti E., (2012), "Screening of novel bacteriophage infection in *Pseudomonas putida* isolated from potato disease", *Jundishapur Journal of Microbiology*, 5(4), 550-54.

Du W., Song Y., Liu M., Yang H., Zhang Y., Fan Y., Zhang T., (2016), "Gene expression pattern analysis of a recombinant *Escherichia coli* strain possessing high growth and lycopene production capability when using fructose as carbon source" *Biotechnology Letters*, 38(9), 1571-1577.

Ebert B. E., Kurth, F., Grund M., Blank L. M., Schmid A., (2011), "Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to increased NADH and ATP demand", *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), 6597-6605.

Erdman J. W., Nikki A. F., Brian L. L., (2009), "Are the health attributes of lycopene related to its antioxidant function?", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483(2), 229-35.

Eser B., Sepici Dinçel A., (2018), "Kromatografiye giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi kullanımında basit ipuçları", *Journal of Health Services and Education*, 2(2), 51-57

Fernández M., Duque E., Pizarro-Tobías P., Van Dillewijn P., Wittich R. M., Ramos J. L., (2009), "Microbial responses to xenobiotic compounds. Identification of genes that allow *Pseudomonas putida* KT2440 to cope with 2,4,6-trinitrotoluene", *Microbial Biotechnology*, 2(2), 287-94.

Field B., Osbourn A., (2012), "Order in the playground: Formation of plant gene clusters in dynamic chromosomal regions", *Mobile Genetic Elements*, 2(1), 46-50.

Franden M. A., Jayakody L. N., Li W. J., Wagner N. J., Cleveland N. S., Michener W. E., Hauer B., Blank L. M., Wierckx N., Klebensberger J., Beckham G. T., (2018), "Engineering *Pseudomonas putida* KT2440 for efficient ethylene glycol utilization", *Metabolic Engineering*, 48, 197-207.

Gault V. A., Mc Clenaghan N. H., (2009), "Understanding bioanalytical chemistry. Principles and applications", *Wiley-Blackwell*.

Giovannucci, E., (1999), "Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature", *Journal of the National Cancer Institute*, 91(4), 317-331.

Gruszecki W. I., Strzałka K., (2005), "Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties", In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 108-15.

Hernandez-Arranz S., Jordi P. G., Dominic M. S., Manuel R. C., (2019), "Engineering *Pseudomonas putida* for isoprenoid production by manipulating endogenous and shunt pathways supplying precursors", *Microbial Cell Factories*, 18(1), 152.

Hwang E.S., Bowen P. E., (2004), "Cell cycle arrest and induction of apoptosis by lycopene in LNCaP human prostate cancer cells", *Journal of medicinal food*, 7(3), 284-289.

Inada T., Kimata, K., Aiba, H., (1996), "Mechanism responsible for glucose–lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model", *Genes to Cells*, 1, 293-301.

Jia H., Schwille P., (M), "Bottom-up synthetic biology: Reconstitution in space and time", *Current Opinion in Biotechnology*, 60, 179-87.

Jin W., Xu X., Jiang L., Zhang Z., Li S., Huang H., (2015), "Putative carotenoid genes expressed under the regulation of Shine–Dalgarno regions in *Escherichia coli* for efficient lycopene production", *Biotechnology Letters*, 37(11), 2303–2310.

Kale A., (2015), "Gentamisin Ototoksisitesinde Likopenin Koruyucu Rolü ", *Yüksek Lisans Tezi, Turgut Özal Üniversitesi*.

Kang C. K., Jeong S. W., Yang J. E., Choi Y. J., (2020), "High-yield production of lycopene from corn steep liquor and glycerol using metabolically engineered *Deinococcus radiodurans* R1 strain", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(18).

Kayaalp O., (2002), "Antiepileptik ilaçlar", *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*.

Khachik F., Spangler C. J., Smith J. C., Canfield L. M., Steck A., Pfander H., (1997), "Identification, quantification and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum", *Analytical Chemistry*, 69(10), 1873-1881.

Kim J., Kong M. K., Lee S. Y., Lee P. C., (2010), "Carbon sources-dependent carotenoid production in metabolically engineered *Escherichia coli*", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(12), 2231-2239.

Kim J., Park W., (2014), "Oxidative stress response in *Pseudomonas putida*", *Appl Microbiol Biotechnol*, 98, 6933-6946.

Kohlstedt M., Starck S., Barton N., Stolzenberger J., Selzer M., Mehlmann K., Schneider R., Pleissner D., Rinkel J., Dickschat J. S., Venus J., van Duuren J. B. J. H., Wittmann C., (2018), "From lignin to nylon: Cascaded chemical and biochemical conversion using metabolically engineered *Pseudomonas putida*", *Metabolic Engineering*, 47, 279-293.

Kumaran A. P., Lim C. G., Ghosh S., Pirie C., Donald J., Love A., Nan H., Tseng H. C., Santos N. C. S., Philippe R., (2018), "Methods for production of oxygenated terpenes", Patent Application Publication, 20180135081A1.

Leavell M. D., McPhee D. J., Paddon C. J., (2016), "Developing fermentative terpenoid production for commercial usage", *Curr Opin Biotechnol*, 37, 114-9.

Li M., Hou F., Wu T., Jiang X., Li F., Liu H., Xian M., Zhang H., (2020), "Recent advances of metabolic engineering strategies in natural isoprenoid production using cell factories", *Natural Product Reports*, 37(1), 80-99.

Lindqvist A., Andersson S., (2002), "Biochemical properties of purified recombinant human β -carotene 15,15'-monooxygenase", *Journal of Biological Chemistry*, 277(26), 23942-23948.

Liu N., Liu B. Wang G., Soong Y. V., Tao Y., Liu W., Xie D., (2020), "Lycopene production from glucose, fatty acid and waste cooking oil by metabolically engineered *Escherichia coli*", *Biochemical Engineering Journal*, 155, 107488.

Lu S., Li L., (2008), "Carotenoid metabolism: Biosynthesis, regulation and beyond", *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(7), 778-85.

Marbach A., Bettenbrock K., (2012), "Lac operon induction in *Escherichia coli*: systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA", *Journal Biotechnol*, 157(1), 82-88.

Marchena A.M., Franco L., Romero A.M., Barriga C., Rodríguez A.B., (2020), "Lycopene and Melatonin: Antioxidant Compounds in Cosmetic Formulations", *Skin Pharmacol Physiol*, 33, 237-243.

Martinez-García E., Nikel P. I., Aparicio T., de Lorenzo V., (2014), "Pseudomonas 2.0: Genetic upgrading of *P. Putida* KT2440 as an enhanced host for heterologous gene expression", *Microbial Cell Factories*, 13(1), 159.

Meadow N. D., Fox D. K., Roseman S., (1990), "The bacterial phosphoenol-pyruvate: glyucose phosphotransferase system, *Annual review of biochemistry*, 59, 497-542.

Meyer H. P., Turner N. J., (2009), "Biotechnological manufacturing options for organic chemistry", *Bentham Science*, 6(4), 300-306(7).

Mezzomo N., Ferreira S. R., (2016), "Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: A review", *Journal of Chemistry*, 2016.

Mi J., Becher D., Lubuta P., Dany S., Tusch K., Schewe H., Buchhaupt M., Schrader J., (2014), "De novo production of the monoterpene geranic acid by metabolically engineered *Pseudomonas putida*", *Microbial Cell Factories*, 13(1), 170.

Miller N. J., Sampson J., Candeias L. P., Bramley P. M., Rice-Evans C. A., (1996), "Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls", *FEBS Letters*, 384(3), 240-42.

Minchin S. D., Busby S. J. W., (2009), "Analysis of mechanisms of activation and repression at bacterial promoters", *Methods*, 47(1), 6-12.

Moise A. R., Salim A. B., Eleanore T. W., (2014), "Mechanistic aspects of carotenoid biosynthesis", *Chemical Reviews*, 114(1), 164-93.

Moran N. A., Jarvik T., (2010), "Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids", *Science*, 328(5978), 624-27.

Mostafa B. E., Tawfik S., Hefnawi N. G. E., Hassan M. A., Ismail F. A., (2007), "The role of deferroxamine in the prevention of gentamicin ototoxicity: A histological and audiological study in guinea pigs", *Acta Oto-Laryngologica*, 127(3), 234-39.

Nelson K. E., Weinl C., Paulsen I. T., Dodson R. J., Hilbert H., Martins dos Santos V. A.P., Fouts D. E., Gill S. R., Pop M., Holmes M., Brinkac L., Beanan M., De Boy R. T., Daugherty S., Kolonay J., Madupu R., Nelson W., White O., Peterson J., Khouri H., Hance I., Chris Lee P., Holtzapple E., Scanlan D., Tran K., Moazzez A., Utterback T., Rizzo M., Lee K., Kosack D., Moestl D., Wedler H., Lauber J., Stjepandic D., Hoheisel J., Straetz M., Heim S., Kiewitz C., Eisen J., Timmis K. N., Dusterhöft A., Tümmler B., Fraser C. M., (2002), "Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440", *Environmental Microbiology*, 4(12), 799-808.

Nielsen J., (2001), "Metabolic engineering", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 263-283.

Nielsen J., Keasling J. D., (2016), "Engineering cellular metabolism", *Cell*, 164(6), 1185-97.

Niizu P. Y., (2003), "Fontes de carotenoides importantes para a saúde humana", *Yüksek Lisans Tezi*, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Nikel P. I., de Lorenzo V., (2014), "Robustness of *Pseudomonas putida* KT2440 as a host for ethanol biosynthesis", *New Biotechnol*, 31, 562-571.

Nisar N., Li L., Lu S., Khin N. C., Pogson, B. J., (2015), "Carotenoid Metabolism in Plants", *Molecular Plant*, 8(1), 68-82.

Oberhardt M. A., Bernhard P., Jason A. P., (2009), "Applications of genome-scale metabolic reconstructions", *Molecular Systems Biology*, 5(1), 320.

Oliver J., Palou A., (2000) "Chromatographic determination of carotenoids in foods", *Journal of Chromatography A*, 881(1-2), 543-55.

Olson J. A., (1999), "Carotenoids and human health", *Archivos Latinoamericanos De Nutrición* 49(3), 7-11.

Ötleş S., Atlı Y., (1997), "Karotenoidlerin İnsan Sağlığı Açısından Önemi", *Journal of Engineering Sciences*, 3(1), 249-254.

Palozza P., Parrone N., Simone R., Catalano A., (2011), "Role of lycopene in the control of ROS-mediated cell growth: Implications in cancer prevention", *Current Medicinal Chemistry*, 18(12), 1846-1860.

Park S. Y., Binkley R. M., Kim W. J., Lee M. H., Lee S. Y., (2018), "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-level astaxanthin production with high productivity", *Metabolic Engineering*, 49, 105-115.

Poblete-Castro I., Becker J., Dohnt K., Santos V. M. D., Wittmann C., (2012), "Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species", *Applied Microbiology and biotechnology*, 93(6), 2279-90.

Priyadarsani S., (2015), "Extraction and Characterization of Lycopene From Papaya and Grapefruit Using Supercritical Carbon Dioxide", *Yüksek Lisans Tezi*, Indian Agricultural Research Institute.

Ram S., Mitra M., Shah F., Tirkey S. R., Mishra S., (2020) , "Bacteria as an alternate biofactory for carotenoid production: A review of its applications, opportunities and challenges", *Journal of Functional Foods*, 67.

Ramos K. R. M., Valdehuesa K. N. G., Liu H., Nisola G. M., Lee W. K., Chung W. J., (2014), "Combining de ley–doudoroff and methylerythritol phosphate pathways for enhanced isoprene biosynthesis from d-galactose", *Bioprocess Biosyst Eng*, 37, 2505-2513.

Rao A., Venket N. F., Sanjiv A., (1999), "Serum and tissue lycopene and biomarkers of oxidation in prostate cancer patients: A case-control study", *Nutrition and Cancer* 33(2), 159-64.

Rao A.V., Rao L.G., (2007), "Carotenoids and human health", *Pharmacological Research*, 55(3), 207-216.

Rojas-Garbanzo C., Gleichenhagen M., Heller A., Esquivel P., Schulze-Kaysers N., Schieber A., (2017), "Carotenoid profile, antioxidant capacity, and chromoplasts of Pink Guava during fruit ripening", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(18), 3737–47.

Saini R. K., Shivraj H. N., Se W. P., (2015), "Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities", *Food Research International*, 76, 735-50.

Sathish T., Udayakiran D., Himabindu K., Lakshmi P., Sridevi D., Kezia D., and Bhojaraju B., (2009), "HPLC Method for the Determination of Lycopene in Crude Oleoresin Extracts", *Asian Journal of Chemistry*, 21(1), 139-148.

Schieber A., Carle R., (2005), "Occurrence of carotenoid cis-isomers in food: technological, analytical, and nutritional implications", *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 416-422.

Seifi M., Seifi P., Hadizadeh F., Mohajeri S. A., (2013), "Extraction of Lycopene from Tomato Paste by Ursodeoxycholic Acid Using the Selective Inclusion Complex Method", *Journal of Food Science*, 78(11), 1680-1685.

Sezonov G., Joseleau-Petit D., D'Ari R., (2007), "Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth", *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8746-8749.

Shao A., Hathcock J. N., (2006), "Risk assessment for the carotenoids lutein and lycopene", *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45(3), 289-98.

Sheppard D., Lampiris H. W., (1994), "Antifungal agents katzung bg(eds). Lange Basic & Clinica Pharmacology", *J Ethnopharmacol*, 41(1-2), 9-13.

Siegl T., Tokovenko B., Myronovskiy M., Luzhetskyy A., (2013), "Design, construction and characterisation of a synthetic promoter library for fine-tuned gene expression in actinomycetes", *Metabolic Engineering*, 19, 98-106.

Singh P., Goyal G. K., (2008), "Dietary lycopene: Its properties and anticarcinogenic effects", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(3), 255-270.

Song P., Li D., Wang X., Zhong X., (2019), "Lycopene protects from perfluorooctanoic acid induced liver damage and uterine apoptosis in pregnant mice", *Int J Clin Exp Med*, 12(1), 212-219.

Sonoki T., Takahashi K., Sugita H., Hatamura M., Azuma Y., Sato T., Suzuki S., Kamimura N., Masai E., (2018), "Glucose-free cis,cis-muconic acid production via new metabolic designs corresponding to the heterogeneity of lignin", *ACS Sustain Chem Eng*, 6(1), 1256-1264.

Studier F. W., (2005), "Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures," *Protein expression and purification*, 41, 207-234.

Thakker C., Zhu J., San K. Y., Bennett G., (2011), "Heterologous pyc gene expression under various natural and engineered promoters in Escherichia coli for improved succinate production", *Journal Biotechnol*, 155, 236-243.

Vilchez C., Forján E., Cuaresma M., Bédmar F., Garbayo I., Vega J. M., (2011), "Marine carotenoids: Biological functions and commercial Applications", *Marine Drugs*, 9(3), 319-33.

Wang J., Niyompanich S., Tai Y. S., Wang J., Bai W., Mahida P., Gao T., Zhang K., (2016), "Engineering of a highly efficient Escherichia coli strain for mevalonate fermentation through chromosomal integration", *Applied and Environmental Microbiology*, 82(24), 7176-84.

Wang Y., Wang H., Liu L., Wang X., (2019), “Synthetic Promoter Design in *Escherichia coli* based on Generative Adversarial Network”, *Nucleic Acids Research*, 48(12), 6403-6412.

Woolston B. M., Steven E., Gregory S., (2013), “Metabolic engineering: Past and future”, *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 4, 259-88.

Xu X., Tian L., Xu J., Xie C., Jiang L., Huang H., (2018), “Analysis and expression of the carotenoid biosynthesis genes from *Deinococcus wulumuqiensis* R12 in engineered *Escherichia coli*”, *AMB Express*, 8(1), 94.

Yabuzaki J., (2017), “Carotenoids database: Structures, chemical fingerprints and distribution among organisms”, *Database*, 2017(1).

Yıldız A., Genç Ö., Bektaş S., (1997), “Enstrümental Analiz Yöntemleri”, Hacettepe Üniversitesi Yayınları.

Yıldız S., (2019), “Metabolik mühendisliği yaklaşımıyla likopenin mikrobiyal biyosentezi”, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi.

Yoon S. H., Kim J. E., Lee S. H., Park H. M., Choi M. S., Kim J. Y., Kim S. W., (2006), “Engineering the lycopene synthetic pathway in *E. coli* by comparison of the carotenoid genes of *Pantoea agglomerans* and *Pantoea ananatis*”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(1), 131-139.

Yu S., Plan M. R., Winter G., Krömer J. O., (2016), “Metabolic Engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for the production of para-hydroxy benzoic acid”, *Front Bioeng Biotechnol*, 4(90).

Zhang H., Yong W., Blaine A. P., (2008), “Bacterial hosts for natural product production”, *Molecular Pharmaceutics*, 5(2), 212-25.

Zhang L., Zhang H., Ndeurumi K. H., Parkin K. L., Venuste M., (2012), “Thermally-induced geometrical isomerisation of lycopene and its potential influence on functional activity”, *Food Chemistry*, (132)4, 2112-2117.

Zhang T., Li W., Luo X., Feng C., Zhang M., Du W., Ma D., (2015), “Increase of the Lycopene Production in the Recombinant Strains of *Escherichia coli* by Supplementing with Fructose”, *Advances in Applied Biotechnology*, 332, 29-35.

Zhao J., Li Q., Sun T., Zhu X., Xu H., Tang J., Zhang X., Ma Y., (2013), “Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving B-carotene production”, *Metabolic Engineering*, 17(1), 42-50.