

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**HETEROLOG ANTOSİYANİN BİYOSENTEZİNDE PETUNİA
HYBRİDA AN9 GLUTATYON TRANSFERAZININ ROLÜ**

ZEYNEP KOÇAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: DOÇ. DR. HÜLYA AKDEMİR KOÇ

MAYIS 2025

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

HETEROLOG ANTOSİYANİN BİYOSENTEZİNDE
PETUNİA HYBRİDA AN9 GLUTATYON
TRANSFERAZININ ROLÜ

ZEYNEP KOÇAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: DOÇ. DR. HÜLYA AKDEMİR KOÇ
2. DANIŞMAN: ÖĞR.GÖR.DR. HÜSEYİN BALCI

MAYIS 2025

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL

**ROLE OF PETUNIA HYBRIDA AN9 GLUTATHIONE
TRANSFERASE IN HETEROLOGOUS ANTHOCYANIN
BIOSYNTHESIS**

ZEYNEP KOÇAK

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

ADVISOR: ASSOC. PROF. DR. HÜLYA AKDEMİR KOÇ

Co-ADVISOR: DR. HÜSEYİN BALCI

MAYIS 2025

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun 21/04/2025 tarih ve 2025/23 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 07/05/2025 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Zeynep KOÇAK'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Hülya AKDEMİR KOÇ

ÜYE

: Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Merve SEVEN BARAK

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR



*Aileme
ve
biricik eşime*

ÖZET

Antosiyaninlerin eldesi, günümüzde hâlâ büyük ölçüde bitkilerden ekstraksiyona dayanmaktadır. Ancak bitkilerin görece yavaş büyümesi, tarım arazisine bağımlılık ve zahmetli, tahrip edici ekstraksiyon yöntemleri bu bileşiklerin yüksek maliyetle üretilmeleri ile sonuçlanmaktadır. Öte yandan mikrobiyal temelli üretim, antosiyanin biyosentezinde daha sürdürülebilir ve çevre dostu bir alternatif sunmaktadır. Günümüze kadar heterolog antosiyanin biyosentezi *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Lactococcus lactis* ve *Saccharomyces cerevisiae*'de rapor edilmiştir. Yapılan tüm çalışmalara rağmen antosiyanin üretimi istenilen seviyeye ulaşamamıştır. Bu nedenle, heterolog antosiyanin üretiminde farklı stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Literatürde, 2023 yılında mayada yapılan bir çalışmada, glutatyon S-transferaz (GST) enzimlerinin antosiyaninlerin taşınması işlevine ek olarak, biyosentez basamağında lökoantosiyandinin son derece kararsız yapıdaki antosiyanidine dönüşmesinde merkezi bir rol oynadığı ve antosiyanin üretim verimini yapılan denemelerde 36,5 kata kadar arttırdığı kanıtlanmıştır.

Bu tez çalışmasında GST'lerin bu etkisinin bakteriyel kaynaklardaki etkisinin belirlenebilmesi için mikrobiyal konakçı olarak *E. coli* seçilmiş ve PhAN9 (*Petunia hybrida* AN9) glutatyon S-transferaz gen (GST) ekspresyonunun antosiyanin üretimine olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, antosiyanin taşınması ve birikmesinde önemli işleve sahip PhAN9 glutatyon transferaz geni alınıp *E. coli*'de daha önce tasarlanmış olan antosiyanin üretici hücrelere klonlanmıştır.

Bu rekombinant hücreler, siyanidin 3-O-glukozit (C3G) adı verilen kırmızı renkli bir pigment üretmektedir. Antosiyanin üretiminin optimizasyonu için farklı karbon ve nitrojen kaynakları, IPTG konsantrasyonu ve uyarım zamanları, havalandırma oranı, inokulum oranı ve kültür toplama zamanları denenmiştir. Yapılan optimizasyonlar sonrasında, en yüksek antosiyanin oranı *E. coli*'de PhAN9 genini taşıyan GST rekombinantı hücrelerde (72 mg/L), C3G rekombinantı hücrelere (13.7 mg/L) görece yaklaşık 5 kat artış olarak gözlemlenmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmalarında, görece düşük glikoz varlığında ve düşük IPTG konsantrasyonunda daha yüksek C3G verimi elde edilmesi, ticari ölçekte önemli bir avantaj sağlayacaktır.

E. coli'de heterolog antosiyanin üretimine GST genlerinin klonlanması ile ilgili bu stratejinin daha önce uygulanmamış olması bu çalışmanın özgünlük değerini arttırmaktadır. Elde edilen sonuçlar, endüstriyel anlamda antosiyanin üretici soyların geliştirilmesi ve bu pigmentlerin gıda ve nutrasötik sektörlerde sürdürülebilir üretimi için biyosentetik anlamda önemli bilgiler sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *E. coli*, Heterolog Antosiyanin Üretimi, Siyanidin 3-O-Glukozit

ABSTRACT

Currently, the production of anthocyanins still relies largely on extraction from plants. However, the relatively slow growth of plants, dependence on agricultural land, and labor-intensive, destructive extraction methods result in high production costs for these compounds. On the other hand, microbially based production offers a more sustainable and environmentally friendly alternative for anthocyanin biosynthesis. To date, heterologous anthocyanin biosynthesis has been reported in *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Lactococcus lactis*, and *Saccharomyces cerevisiae*. Despite all efforts, anthocyanin production has not yet reached the desired levels. Therefore, alternative strategies need to be developed for efficient heterologous anthocyanin production.

According to a study conducted in yeast in 2023, glutathione S-transferase (GST) enzymes were shown to play a central role not only in the transport of anthocyanins but also in the biosynthetic conversion of highly unstable leucoanthocyanidins into anthocyanidins. In the experiments, this modification led to an increase in anthocyanin production yield by up to 36.5-fold.

In this thesis study, *E. coli* was selected as the microbial host to determine the contribution of GSTs in bacterial systems and effects of *PhAN9* (*Petunia hybrida* AN9) glutathione S-transferase gene expression was investigated on anthocyanin production. For this purpose, the *PhAN9* gene, which plays a significant role in anthocyanin transport and accumulation, was cloned into previously engineered anthocyanin-producing *E. coli* strains.

These recombinant cells produce a red-colored pigment known as cyanidin 3-O-glucoside (C3G). To optimize anthocyanin production, various parameters were tested, including different carbon and nitrogen sources, IPTG concentrations and induction times, aeration rates, inoculation ratios, and culture harvesting times. Following these optimization experiments, the highest anthocyanin concentration was obtained in the *PhAN9*-expressing GST recombinant strain (72 mg/L), representing approximately a 5-fold increase compared to the C3G-producing control strain (13.7 mg/L). Furthermore, it was observed that under relatively low glucose concentrations and low IPTG levels, higher C3G yields could be achieved, which may offer a significant advantage for commercial-scale applications.

The implementation of GST gene expression as a strategy for heterologous anthocyanin production in *E. coli* has not been previously reported, which adds to the originality of this study. The findings provide valuable biosynthetic insights for the development of industrially viable anthocyanin-producing strains and support the sustainable production of these pigments for use in the food and nutraceutical industries.

Keywords: *E. coli*, Cyanidine 3-O-Glucoside, Heterolog Anthocyanin Biosynthesis

TEŞEKKÜR

Tez danışmanım ve kıymetli hocam Doç. Dr. Hülya AKDEMİR KOÇ' a değerli katkılarından ve süreç boyunca gösterdiği desteğinden dolayı teşekkürlerimi sunuyorum.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bana burs vererek destek olan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Bilim İnsanı Destekleme ve Destek Programları Başkanlığı'na (BİDEB) 2210/A Ulusal Yüksek Lisans Burs Programı'na teşekkür ederim. Bu tez çalışması, TÜBİTAK 124Z462 numaralı proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Gebze Teknik Eğitim ve Araştırma Vakfına ve rektörümüz Prof. Dr. Hacı Ali MANTAR'a çalışmamızı destekledikleri için teşekkür ederim.

Yüksek Lisans süresince bize bilgilerini aktaran, her koşulda sabırlı şekilde bize yardımcı olan kıymetli hocam Dr. Hüseyin BALCI'ya ve Dr. Gamze ŞEKER'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Yüksek Lisansa başlama süresince bize laboratuvarında çalışma fırsatı sunan değerli hocam Nuri ÖZTÜRK' e teşekkürlerimi sunuyorum.

Üniversite hayatım boyunca bana katkı sağlayan Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümündeki değerli hocalarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Yüksek lisans süresince benden yardımını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Tugay TÜRKYILMAZ, Esra KAYNAK, Sena USTA, Emine YARADIR ve İlayda YILMAZ' a çok teşekkürlerimi sunuyorum.

Tüm eğitim hayatım boyunca beni hiç yalnız bırakmayan, her koşulda ve manevi desteğini benden esirgemeyen biricik aileme- babam Sabit AKYOL, annem Zehra AKYOL, abim Emre AKYOL, yengem Sadiye AKYOL'a- çok teşekkür ederim.

Hayatımı paylaştığım ve kararlarımın her daim arkasında duran sevgili eşim Serhat KOÇAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Antosiyanin Nedir?	1
1.2. Antosiyanin Bitkilerdeki Roller	3
1.3. Antosiyanin Biyosentez Yolağı	3
1.4. Antosiyanin Stabilizasyonu	6
1.5. Antosiyanin Taşınması	7
1.6. Doğal ve Sentetik Boyalar	9
1.7. Glutasyon Transferazlar (GST)	12
1.8. <i>PhAN9</i> GST Enziminin Filogenetik Sınıflandırılması	14
1.9. Mikroorganizmalarda Antosiyanin Üretimi	16
2. MATERYAL	21
2.1. Kullanılan Kimyasallar	21
2.2. Kullanılan Kitler ve Enzimler	23
2.3. Kullanılan Cihazlar	24
2.4. Besiyerleri ve Solüsyonlar	24
2.4.1. Kompetan Hücre Improved Buffer	25
2.4.2. 50× TAE Tampon Çözeltisi	25
2.4.3. LB Besiyeri ve LB Agar Besiyeri	25
2.4.4. AMM (Andrew's Magic Media) Besiyeri Bileşenleri	26
2.5. <i>PhAN9</i> Glutasyon S-Transferaz Geninin Sentezi	29
2.6. Gliserol Stok Hazırlama	29
3. YÖNTEM	30
3.1. <i>E. coli</i> DH5α Kompetan Hücre Hazırlanması	31
3.2. pUC57- <i>PhAN9</i> Plazmitinin <i>E. coli</i> DH5α Hücrelerine Transformasyonu	31
3.3. Plazmit İzolasyonu	32
3.4. Moleküler Klonlama	32
3.5. pCDM4 Vektörüne Glutasyon S-Transferazlarının Transformasyonu	34
3.6. pCDM4- <i>PhAN9</i> Klonlarının Doğrulanması	35
3.6.1. Restriksiyon enzim kesimi ile klonların doğrulanması	35
3.6.2. PCR ile Klonların Doğrulanması	36
3.7. C3G rekombinantı ve GST rekombinantı C3G üreticisi <i>E. coli</i> BL21 (DE3) hücrelerinin hazırlanması	38
3.8. C3G rekombinantı <i>E. coli</i> BL21 (DE3) hücrelerinin Büyüme Eğrisinin Hazırlanması	40

3.9. Katekin Substratı, IPTG ve HPLC çözeltilerinin hazırlanması	40
3.10. Siyanidin 3-O-glukozit (C3G) üretimi için Kültür Şartlarının optimize edilmesi	41
3.11. HPLC Analizi	42
3.12. HPLC C3G Standardı Hazırlama	43
3.13. Hücre kültüründen elde edilen C3G'nin UV-VİS Karakterizasyonu	43
3.14. Agaroz Jel Elektroforezi	44
4. BULGULAR	45
4.1. Glutasyon Transferaz geni <i>PhAN9</i> 'un klonlanması ve transformasyonu	45
4.1.1. pUC57- <i>PhAN9</i> içeren <i>E. coli</i> DH5 α Hücrelerinin Plazmit İzolasyon Sonucu	45
4.1.2. <i>PhAN9</i> geninin pCDM4 plazmitine klonlanması	45
4.2. pCDM4- <i>PhAN9</i> klonlarının moleküler doğrulanması	47
4.2.1. <i>XhoI</i> restriksiyon enzim kesimi ile klonların doğrulanması	48
4.2.2. <i>KpnI</i> ve <i>NdeI</i> restriksiyon enzim kesimi ile klonların doğrulanması	48
4.2.3. PCR ile Klonların doğrulanması	49
4.3. C3G rekombinantı ve GST rekombinantı <i>E. coli</i> BL21 (DE3) hücrelerinin transformasyonu	50
4.4. C3G üreticisi <i>E. coli</i> BL21 (DE3) hücrelerinin Büyüme Eğrisi	51
4.5. Siyanidin 3-O-glukozit (C3G) üretimi için Kültür Şartlarının optimize edilmesi	52
4.5.1. Havalandırma Oranının C3G Üretimine Etkisi	52
4.5.2. C3G Üretiminde Arttırılmasında Kültürlerin İnokülasyonun Oranının Etkisi	53
4.5.3. Farklı IPTG Uyarım Zamanlarının (Post-İndüksiyon) C3G Üretimine Etkisi	55
4.5.4. Farklı IPTG Konsantrasyonlarının C3G Üretimine Etkisi	57
4.5.5. Farklı Glukoz ve Farklı IPTG Konsantrasyonları ile Farklı Örnek Toplama Zamanlarının C3G Üretimine Etkisi	58
4.5.6. Farklı nitrojen kaynaklarının C3G üretimine etkisi	60
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	63
KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	87
TEZ METNİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR	88

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μL	: Mikrolitre
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
CaCl_2	: Kalsiyum Klorür
dk	: Dakika
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
G	: Gram
H	: hour (saat)
HCl	: Hidroklorik Asit
bp	: Baz Çifti
KH_2PO_4	: Potasyum Fosfat Monobazik
L	: Litre
LB	: Luria Bertani besiyeri
M	: Molar
mM	: milimolar
Mg	: Miligram
mL	: Mililitre
MgSO_4	: Magnezyum Sülfat
NaCl	: Sodyum Klorür
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	: Sodyum Dihidrojen Fosfat Dihidrat
NH_4Cl	: Amonyum Klorür
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TAE	: Tris bazı, asetik asit ve EDTA
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	: Magnezyum Klorür Hekzahidrat
KOH	: Potasyum Hidroksit
NH_4Cl	: Amonyum Chloride
MOPS	: 4-Morpholinepropan sülfonik asit
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	: Demir (II) Sülfat Heptahidrat
K_2SO_4	: Potasyum Sülfat
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	: Amonyum Molibdat
H_3BO_3	: Borik Asit
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	: Bakır (II) Sülfat Pentahidrat
MnCl_2	: Mangan Klorür
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	: Çinko Sülfat Heptahidrat
KH_2PO_4	: Potasyum Fosfat
K_2HPO_4	: Potasyum Fosfat
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	: di-Amonyum Fosfat
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	: Kalsiyum Klorür Dihidrat
$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$	: Tiamin Hidroklorür
IPTG	: İzopropil- β -D-tiyogalaktopiranozit
C3G	: Cyanidin-3- <i>O</i> -glucoside/ Siyanidin-3- <i>O</i> -glukozit
DMF	: N, N-dimetilformamid
HCl	: Hidroklorik asit
GST	: Glutasyon S-transferaz
<i>PhAN9</i>	: <i>Petunia hybrida</i> AN9 (Glutasyon S-transferaz)
DMSO	: Dimetil Sülfoksit

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1: Antosiyanin Yapısı	2
Şekil 1.2: Antosiyanin Biyosentez Yolağı	5
Şekil 1.3: Antosiyanin Flavilyum Katyonu	6
Şekil 1.4: Antosiyanin Taşınması	8
Şekil 1.5: <i>PhAN9</i> Glutasyon S Transferazın (GST) Soy Ağacı	16
Şekil 2.1: Kodon optimize gen dizilimi	29
Şekil 3.1: C3G üretimi için kullanılan plazmitler	39
Şekil 3.2: Miktar tayini için Siyanidin-3-Glukozitin 5 farklı konsantrasyon kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi	43
Şekil 4.1: pUC57- <i>PhAN9</i> plazmitinin <i>NdeI</i> - <i>KpnI</i> enzim kesimi	46
Şekil 4.2: <i>E. coli</i> DH5 α hücrelerinden elde edilen pCDM4 plazmitlerinin <i>NdeI</i> ve <i>KpnI</i> enzim kesim sonucu jel analizi	46
Şekil 4.3: <i>E. coli</i> DH5 α hücrelerinin pCDM4- <i>PhAN9</i> ile transformasyonu sonucunda, LB + 50 μ g/mL streptomisin besiyerinde elde edilen koloniler.	47
Şekil 4.4: <i>XhoI</i> ile enzim kesimi ile klon tayini	48
Şekil 4.5: <i>NdeI</i> ve <i>KpnI</i> enzim kesimi ile klon tayini	49
Şekil 4.6: PCR ile klon tayini	50
Şekil 4.7: C3G rekombinantı hücreler ve GST rekombinantı <i>E. coli</i> BL21 DE3) hücrelerinin transformasyonu sonucu elde edilen koloniler	51
Şekil 4.8: C3G rekombinantı <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Hücrelerinin Büyüme Eğrisi	51
Şekil 4.9: GST rekombinantı <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Hücrelerinin Büyüme Eğrisi	52
Şekil 4.10: C3G rekombinantı hücreler ve GST rekombinantı Hücrelerde Havalandırma Oranının C3G Üretimine Etkisi	53
Şekil 4.11: GST rekombinantı hücrelerde farklı inokulum oranlarının C3G üretimine etkisi	54
Şekil 4.12: C3G rekombinantı hücreler ve GST rekombinantı hücrelerde farklı inokulum oranlarının C3G üretimine etkisi	55
Şekil 4.13: Farklı IPTG (0.05 mM) uyarım saatlerinin (3.5h, 4.5h, 5.5h) C3G üretimi üzerindeki etkisi	56
Şekil 4.14: Farklı IPTG (0.1 mM) uyarım saatlerinin (3.5h, 4.5h, 5.5h) C3G üretimi üzerindeki etkisi	56
Şekil 4.15: %1 inokulum miktar ve farklı IPTG oranlarının C3G üretimine etkisi	57
Şekil 4.16: %2.5 inokulum miktar ve farklı IPTG oranlarının C3G üretimine etkisi	58
Şekil 4.17: %2 glukoz içeren AMM besiyerinde farklı IPTG oranları ve kültür periyodu sürelerinin C3G üretimine etkisi	59
Şekil 4.18: %4 glukoz içeren AMM besiyerinde farklı IPTG oranları ve kültür periyodu sürelerinin C3G üretimine etkisi	60
Şekil 4.19: %2 Glikoz içeren AMM besiyerinde farklı Nitrojen kaynaklarının C3G üretimine etkisi	61
Şekil 4.20: %2 Glikoz içeren AMM besiyerinde büyütülen hücrelerden elde edilen C3G'nin UV-Vis ölçümü	61
Şekil 4.21: C3G rekombinantı hücrelerden (sol) ve GST rekombinantı hücrelerden (sağ) elde edilen kırmızı renkli Siyanidin 3-O-Glukozit örnekleri.	62

TABLÖLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1: Tez kapsamında kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler	21
Tablo 2.2: Klonlama ve klonların doğrulanması aşamasında kullanılan kitler, enzimler, belirteçler	23
Tablo 2.3: Tez kapsamında kullanılan cihazlar	24
Tablo 2.4: AMM Besiyeri bileşenleri (1 litre için)	28
Tablo 3.1: Tez kapsamında kullanılan bakteri soyu ve plazmitler	30
Tablo 3.2: Restriksiyon enzim kesim reaksiyonu	33
Tablo 3.3: Ligasyon Reaksiyonu bileşenleri	34
Tablo 3.4: pCDM4- <i>PhAN9</i> plazmitinin ikili restriksiyon enzim kesimi	35
Tablo 3.5: pCDM4- <i>PhAN9</i> plazmitinin tekli restriksiyon enzim kesimi	36
Tablo 3.6: PCR Protokolü Bileşenleri	37
Tablo 3.7: PCR döngü programı	37
Tablo 3.8: GST genlerinin C3G üreten hücrelere aktarımı	40
Tablo 3.9: C3G analizinde kullanılan HPLC programı	42
Tablo 4.1: pUC57- <i>PhAN9</i> içeren <i>E. coli</i> DH5 α Hücrelerinin Plazmit İzolasyonuna ait nanodrop ölçüm sonuçları	45
Tablo 4.2: <i>PhAN9</i> geni ve pCDM4 plazmitinin agaroz jelden izolasyonu ile elde edilen DNA konsantrasyonları	47

1.GİRİŞ

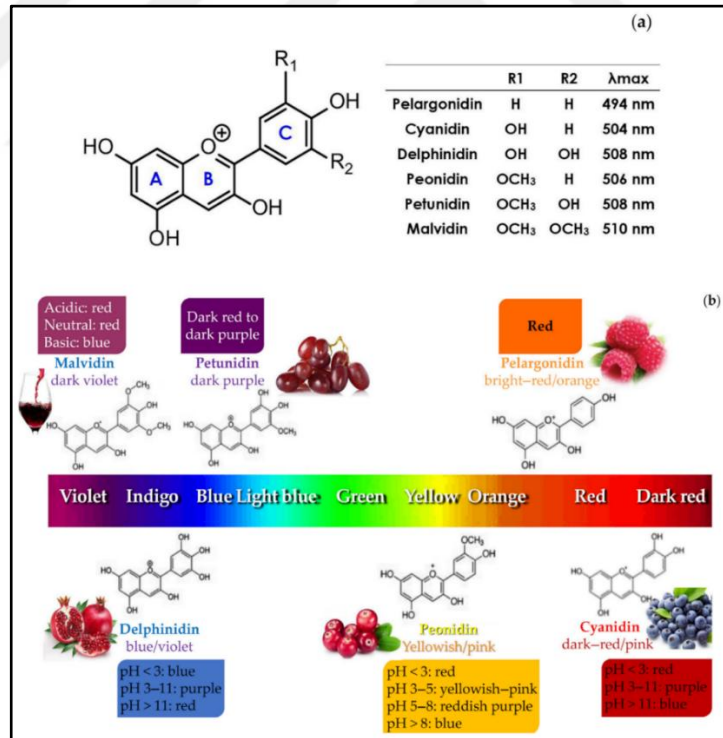
Bu tez çalışmasında, *PhAN9* (*Petunia hybrida* AN9) glutatyon S-transferazının (GST) antosiyanin biyosentezini arttırmasındaki etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, *E. coli*'de antosiyanin üretiminin arttırılması için; antosiyanin taşınması ve birikmesinde önemli işlevleri olduğu bilinen glutatyon transferaz geni *PhAN9*, *E. coli*'de daha önce tasarlanmış olan antosiyanin üretici hücrelere klonlanarak, antosiyanin üretimindeki etkisi irdelenmiştir. 2023 yılında mayada yapılan çalışmada [1], antosiyanin biyosentez yolağına eklenen GST geninin katalitik aktiviteyi arttırarak, heterolog antosiyanin üretimini 36,5 kat arttırdığı kanıtlanmıştır. Benzer şekilde, tez çalışması kapsamında *E. coli*'de *PhAN9* GST geninin de antosiyanin üretimini C3G rekombinantı hücrelere görece 5 kat arttırdığı gözlemlenmiştir. *E. coli*'de yapılan bu çalışmanın daha önce uygulanmamış olması bu çalışmanın özgünlük değerini arttırmaktadır.

1.1. Antosiyanin Nedir?

Antosiyanin adı, Yunanca kökenli iki kelimenin ("Anthos" Çiçek, "Kyaneos" Koyu Mavi) birleşiminden gelir [2]. Antosiyanin terimi ilk kez 1835 yılında Ludwig Clamor Marquart tarafından bitkilerde renklenme üzerine yaptığı çalışmada ortaya atılmış, yapısı ise ilk kez 1913 yılında Richard Willstätter tarafından *Centaurea cyanus* çiçeğinden izole edilen siyanidin 3,5-diglukozit ile rapor edilmiştir [2,3]. Antosiyaninler genellikle çiçeklerde ve birçok bitkinin meyvelerinde bulunur. Antosiyanin içeren çiçekler ilaç, renklendirici veya doğrudan gıda olarak kullanılmıştır. Öte yandan, antosiyanin içeren kırmızı, mor ve mavi renkli meyveler faydalı etkileri nedeniyle yaygın olarak tüketilmektedir. Böğürtlen, siyah frenk üzümü ve diğer kırmızıdan maviye kadar olan meyvelerin antosiyanin pigmentleri güçlü antioksidanlardır [4]. Ayrıca antosiyanin açısından zengin siyah havuç, kırmızı lahana ve mor patates, hastalıkların önlenmesi amacıyla tüketilen potansiyel fonksiyonel besinlerdir [4].

Antosiyaninler birçok çiçeğin yaprağın, sebzenin ve meyvenin mavi, mor, kırmızı ve bu renkler arasındaki tonlarından sorumlu olan, bitkilerde asidik koşullarda kırmızı

pigment, bazik koşullarda ise mavi pigment olarak bulunan, suda çözünebilen polifenollerdir. Polifenoller grubunda yer alan antosiyaninler temel flavonoid yapısının C halkasındaki oksijen atomunda pozitif yüke sahip olmasına rağmen flavonoidler grubunda yer alır [4]. Antosiyanin glikozit formunda bulunurken, antosiyanidin aglikon (şeker grubu içermeyen) olarak bilinir. Antosiyanidinler; 3-hidroksiantosiyanidinler, 3-deoksiantosiyanidinler ve O-metillenmiş antosiyanidinler olarak gruplandırılırken, antosiyaninler antosiyanidin glikozitleri ve açıl原因olu antosiyaninler olarak bulunur. En yaygın antosiyanidin türleri siyanidin, delfinidin, pelargonidin, peonidin, petunidin ve malvidindir (Şekil 1.1) [5]. Antosiyanidinlerin B halkasındaki hidroksilasyon ve metillenme derecesi ile şeker ve asit bağlanma durumu pigmentin rengini ve kararlılığını belirler [5]. Hidroksil gruplarının artması mavi renk oluşumuna sebep olurken, metillenme pigmentin kararlılığını artırır. Aynı zamanda şeker ve antosiyanidinlerin açıl原因onu, dalga boyunu ve emilimi artırarak bileşiğin spektrumunu değiştirebilir [5].



Şekil 1.1: Antosiyanin Yapısı (a) Bitkilerdeki temel iskelet yapısı ve başlıca antosiyaninler (ACN'ler) ile bunlara ait maksimum absorbans dalga boyları; (b) En bol bulunan antosiyaninlerin spektral absorbans aralıkları ve farklı pH değerlerinde gösterdikleri renkler [6].

1.2. Antosiyaninlerin Bitkilerdeki Roller

Antosiyaninler, bitkilerde pigmentasyonun yanı sıra çeşitli fizyolojik ve ekolojik rollere sahip olan flavonoid ailesine ait polifenolik bileşiklerdir. Bitkilere kırmızı, mor ve mavi tonları veren bu pigmentler, özellikle çiçekler, meyveler ve yapraklarda yoğun olarak bulunur ve bitkilerin çevresel streslere karşı adaptasyonunda önemli bir koruma sağlar [7]. Antosiyaninler, bir yapraktaki oksidatif yükü yalnızca sarı-yeşil ışığı filtreleyerek azaltır, çünkü bitki hücrelerindeki reaktif oksijenin büyük bir kısmı klorofilin uyarılması sonucu oluşur [8]. Ayrıca antosiyaninlerin düşük sıcaklık, su stresi ve aşırı tuzluluk gibi çevresel zorluklara karşı bitkilerin dayanıklılığını artırdığı gösterilmiştir. Ekolojik perspektiften, antosiyaninler bitkilerin hayatta kalma ve çoğalma stratejilerinde merkezi bir rol oynar. Canlı ve parlak renkleriyle tozlayıcı böcekleri, kuşları ve diğer hayvanları çekerek bitkilerin tozlaşma ve tohum yayma süreçlerine katkı sağlar [9]. Bu pigmentlerin meyvelerdeki yüksek konsantrasyonu, meyvenin olgunlaşmasını ve tohumlarının dağıtılmasını teşvik eder. Antosiyaninler ayrıca bitkilerin patojenlere ve otçul böceklere karşı kimyasal savunma mekanizmalarının bir parçasıdır [10]. Antimikrobiyal özellikleri sayesinde fungal ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı koruma sağladığı bilinmektedir [11].

1.3. Antosiyanin Biyosentez Yolağı

Antosiyanin biyosentetik üretim yolağı doğal konakçılarında kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve yolak enzimleri ve mekanizmaları aydınlatılmıştır. İyi tanımlanmış antosiyanin biyosentez yolağı, birçok bitki türünde yüksek oranda korunmuştur [12,13].

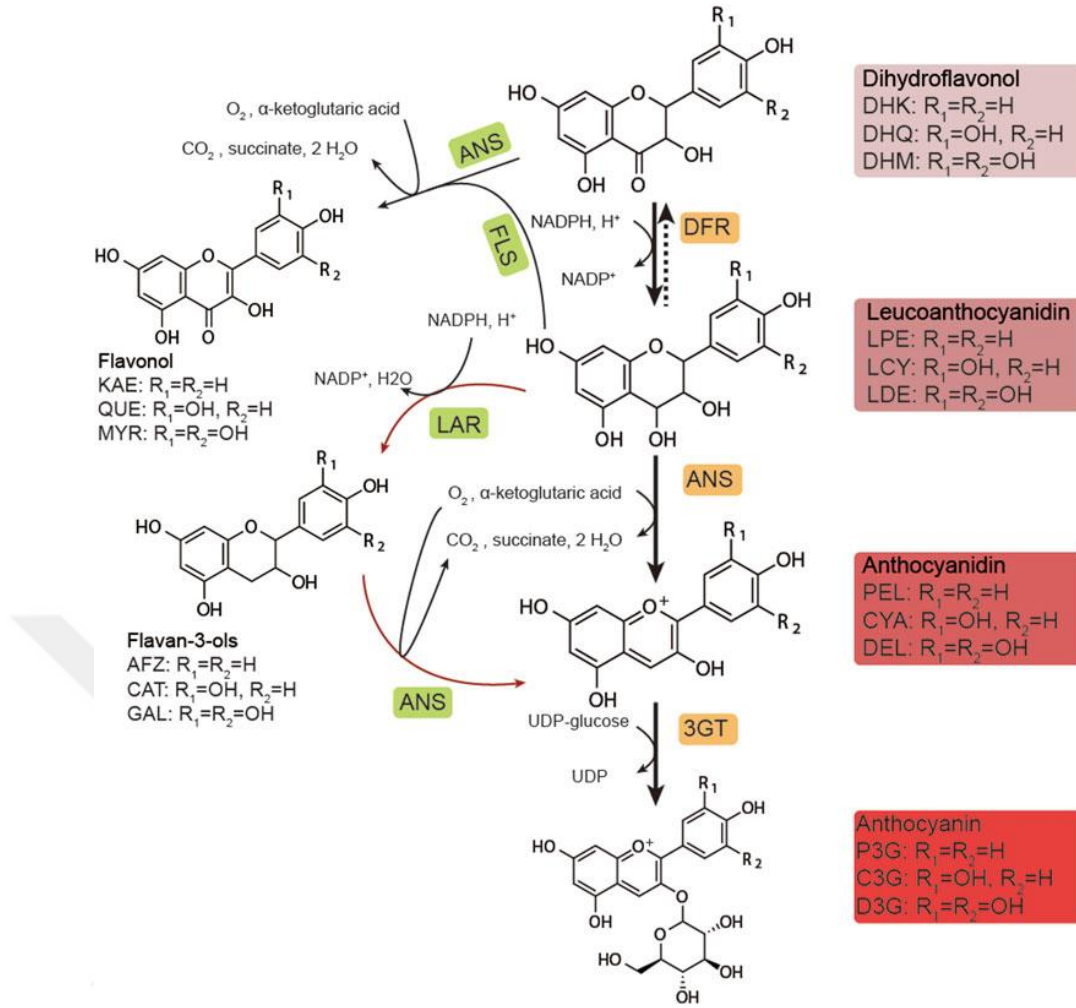
Antosiyanin biyosentez yolağı **Şekil 1.2**'de ayrıntılı olarak verilmiştir. Antosiyanin üretimi, fenilalaninin fenilpropanoid yolakta para-kumaroil-CoA'ya dönüştürülmesiyle başlar; bu, flavonoid biyosentez yolunun ilk öncül bileşiğidir. Çalkon sentaz (CHS) ile başlayan antosiyanin yolu, flavonoid sekonder metabolit yolunu devam ettirir. CHS tarafından bir molekül p-kumaroil-CoA ve üç molekül malonil-CoA'nın kondensasyonu sonucunda naringenin çalkonu üretilir [14,15]. CHS, kırmızı şarap kalitesini artıran üzüm üretimi için önemli olan üç geni kodlar (Chs1 AB015872, Chs2 AB066275, Chs3 AB066274). Chs1 ve Chs2 genleri üzüm yaprakları ve kabuğunda bulunurken, Chs3 ağırlıklı olarak üzüm kabuğunda bulunur. Üzümde bu üç genin üretimini çeşitli transkripsiyon faktörleri düzenler ve farklı

sekonder metabolitlerin üretilmesini sağlar [16]. Bu genlerin protein ve transkript düzeyindeki ifadesi düşük olsa da yüksek biyosentetik verimlilikleri üretimi artırabilir [16,17]. Çalkon flavon izomeraz (CHI) enziminin etkisiyle naringenin çalkon hızla stereo-spesifik izomer olan naringenin flavanona dönüştürülür. Naringenin, antosiyanin veya proantosiyanin sentezinde rol oynar ve aynı zamanda diğer fenolik bileşiklerin oluşumunda da işlev görür.

Naringenin, 3. pozisyonda hidroksillenerek flavanon 3-hidroksilaz (F3H) enzimi tarafından dihidrokaempferol üretimine yol açar (**Şekil 1.2**). F3'H ve F3'5'H, naringenin flavanonu ve dihidroflavonollerin oksitlenmiş ürünlerini substrat olarak kullanarak sırasıyla dihidrokuersetin ve dihidromirisetin üretir [18]. Her iki enzim de antosiyaninlerin B halkasına hidroksil grubu ekleyerek delfinidin ve siyanidin gibi diğer antosiyanidinlerin üretimi için gereklidir. *Chrysanthemum morifolium* ve *Rosa hybrida* gibi bitkilerde F3'5'H geninin olmaması nedeniyle delfinidin sentezlenemez ve bu da mavi/mor renk varyasyonunun eksikliğine yol açar [13].

Bir sonraki adımda, üç dihidroflavonol, dihidroflavonol 4-redüktaz (DFR) enziminin etkisiyle 3,4-cis-leukoantosiyanidinlere (renksiz bileşikler) dönüştürülür (**Şekil 1.1**). *Cymbidium* ve *Petunia* gibi bazı bitkilerde, DFR geni substrat özgüllüğü gösterir ve dihidrokaempferolu kullanamaz. Bu nedenle bu bitkiler pelargonidin üretmez ve çiçeklerinde tuğla kırmızısı veya turuncu renkler görülmez [13].

Devamında, renksiz leukoantosiyanidinler antosiyanidin sentaz (ANS) enzimi tarafından renkli antosiyanidinlere dönüştürülür (**Şekil 1.1**). ANS, flavonoid akışını antosiyanin biyosentetik yoluna yönlendiren ilk önemli enzimdir. ANS, hem proantosiyanidin hem de antosiyanin üretiminde kritik rol oynar [19,20]. Ayrıca, ANS ürünü antosiyanin redüktaz (ANR) tarafından da katalize edilebilir ve bu da (2R,3R)-cis flavan-3-ollerin, yani proantosiyanidin öncü maddelerinin oluşumuna yol açar [21].



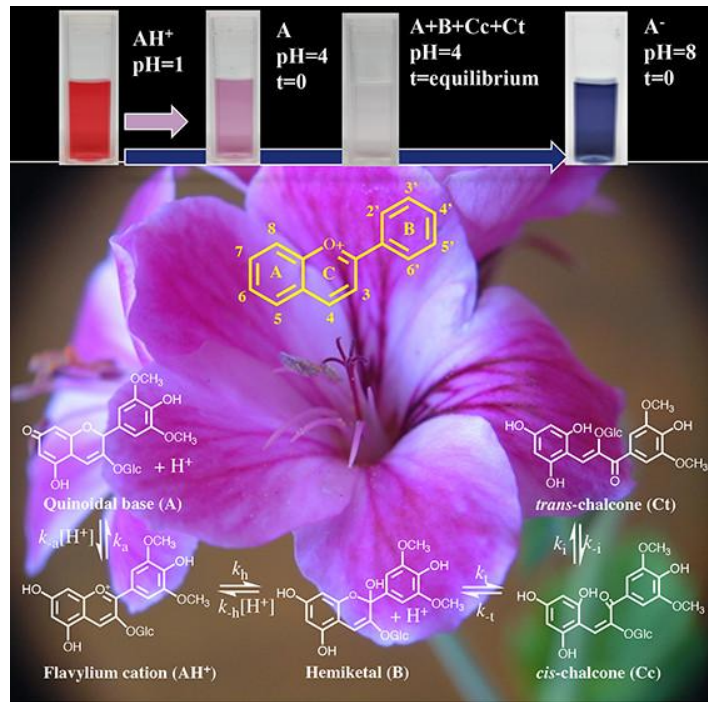
Şekil 1.2: Antosiyanin Biyosentez Yolağı
Dihidrokaempferol (DHK), dihidrokuersetin (DHQ), dihidromirisetin (DHM), lökopelargonidin (LPE), lökosiyanidin (LCY), lökodelfinidin (LDE), pelargonidin (PEL), siyanidin (CYA), delfinidin (DEL), bunların glikozillenmiş halleri olan pelargonidin-3-O-glukozit (P3G), siyanidin-3-O-glukozit (C3G), delfinidin-3-O-glukozit (D3G); ayrıca kaempferol (KAE), kuersetin (QUE), mirisetin (MYR), afzelekin (AFZ), katekin (CAT), gallokatekin (GAL). Bu bileşiklerin dönüşümünü sağlayan enzimler ise DFR, ANS, 3GT, FLS ve LAR'dır [22].

ANS'nin etkisiyle oluşan renkli antosiyanidinlerin ardından, bu bileşiklerin vakuolde kararlı hâle gelmesi için açılasyon, metilasyon ve glikozilasyon işlemleri gerekir. Bu işlemler, kararsız antosiyanidinlerin biyosentezinden sonra sitozolde gerçekleşir. Antosiyanidinler (ACD) ve 3,4-cis-leukoantosiyanidinler (LCD) kararlı olmayan ara ürünlerdir; bu nedenle, 3-O-glikozil transferaz (A3GT) enzimi tarafından, 3-O pozisyonundan glikozillenerek stabilize edilirler [13].

Siyanidin-3-*O*-glukozit (C3G), delfinidin-3-*O*-glukozit (D3G) ve pelargonidin-3-*O*-glukozit (P3G) temel antosiyaninlerdir ve B halkasında bulunan hidroksil grubu sayısına göre birbirlerinden farklıdır. Bazı durumlarda, bu hidroksil grupları *O*-metil transferaz enzimiyle *O*-metilasyona uğrar ve malvidin, peonidin ve petunidin gibi diğer antosiyanidinler oluşur. Bu bileşikler özellikle yaban mersini, kırmızı üzüm ve çilek gibi meyvelerde yaygın olarak bulunur [23].

1.4. Antosiyanin Stabilizasyonu

Antosiyaninlerin stabilitesi, antosiyanin pigmentinin türüne, kopigmentasyona, ışığa, sıcaklığa, pH'ya, metal iyonlarına, enzimlere, oksijene ve antioksidanlara bağlıdır [24]. Antosiyanidin stabilitesi ayrıca, antosiyanidin yapısındaki B halkası (Şekil 1.1a) ve varlığındaki hidroksil veya metoksil gruplardan etkilenir [25]. Bu grupların, çözelti içindeki antosiyanidin stabilitesini azalttığı bilinmektedir. Antosiyaninlerin rengi, çözelti pH'sına bağlıdır; bu durum, antosiyanin moleküler yapısının iyonik doğasından kaynaklanmaktadır [24]. Asidik koşullarda, bazı antosiyaninler kırmızı görünür. Nötr pH'da antosiyaninler mor bir ton alırken, pH artışıyla renk maviye döner. Antosiyaninlerin kırmızı renkli pigmentleri büyük ölçüde flavilyum katyonu formundadır [26] (Şekil 1.3).



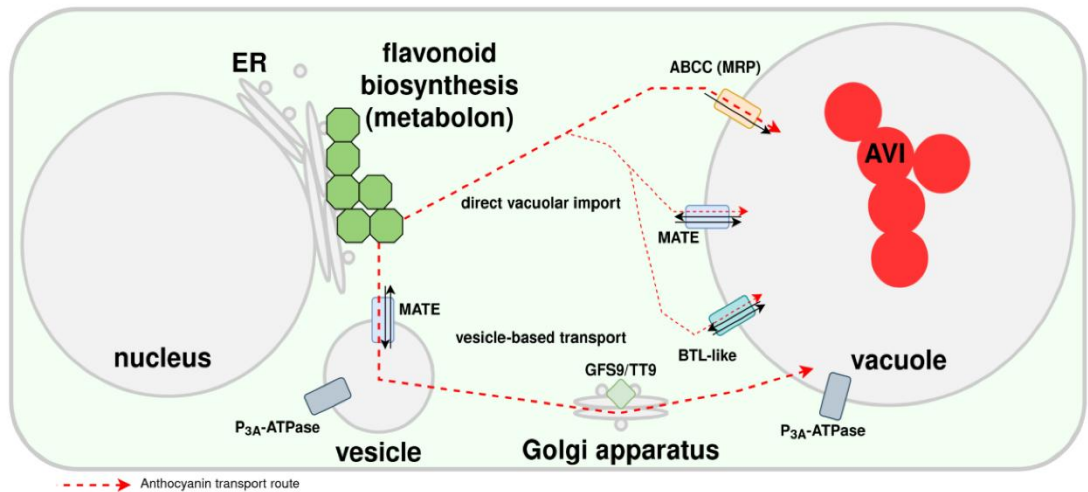
Şekil 1.3: Antosiyanin flavilyum katyonu [27].

Bu antosiyaninler, düşük pH'lı çözeltilerde daha stabildir. Düşük pH'da oluşan flavilyum katyonu, antosiyaninin suda yüksek oranda çözünmesini sağlar. Suyun konsantrasyonundaki azalma, flavilyum katyonunun deprotonasyon hızını artırarak renk stabilitesini azaltır [28]. pH dışında, antosiyanin tannin polimerizasyonu da düşük pH'da renk stabilitesini artırabilir [29]. pH artışında ise, renksiz karbinol pseodobaz ve kalkon yapıları oluşur, ardından anyonik kinonoid türleri meydana gelir. Bu durum, flavilyum iyonunun hidrasyon reaksiyonu arasındaki kinetik ve termodinamik rekabetten kaynaklanır [30]. Bu mavi kinonoid türleri, düşük pH'da stabildir. pH 4–5 arası bir antosiyanin çözeltisi, az miktarda flavilyum katyonu ve kinonoid anyon nedeniyle çok az renk tonuna sahiptir [31]. Nötr pH'da, rezonans stabilizasyonlu kinonoid anyonlar (antosiyaninlerin mor rengi) kinonoid türlerin daha fazla deprotonasyonu sonucu oluşur. Bir tamponlu çözelti içindeki flavilyum katyonunun öngörülen pKa'sı 1–3, kinonoid baz ve kalkonun pKa'sı 4–5, kinonoid ve kalkon monoanyonların pKa'sı ise 7.5–8.0'dır [32]. Flavilyum katyonu ve kinonoid bazı suda kırmızı, kinonoid monoanyon ve dianyon ise mor ve mavi olarak gözlemlenebilir. Düşük pH (örneğin pH 1) koşullarında peonidin (3-O-metile edilmiş antosiyanin) vişne kırmızısı bir ton sergiler, ancak pH 8'de rengi koyu maviye döner. Antosiyaninlerin açılması, flavilyum katyonlarının oranını artırarak antosiyanin pigmentinin kırmızılığını pH artışında bile korumaya yardımcı olur [31]. Çoğu antosiyanin pigmenti, bazlara kıyasla asidik koşullarda yüksek stabiliteye sahiptir ve yüksek pH'da bozulma meydana gelir. Örneğin, siyanidin ve delfinidin asidik koşullarda daha stabildir.

1.5. Antosiyanin Taşınması

Antosiyaninler, bitkilerde endoplazmik retikulumun (ER) sitoplazma tarafında üretilir ve uzun süreli depolama için merkezi vakuole taşınmaları gerekmektedir [33] (**Şekil 2**). Antosiyaninlerin hücre içi taşınmasına ilişkin ayrıntılar, önceki çalışmaların çelişkili sonuçlar vermesi nedeniyle tam olarak aydınlatılamamıştır. Farklı ABCC proteinlerinin, antosiyaninlerin zar boyunca taşınmasında rol oynadığı bildirilmiştir [34–36]. Ancak, antosiyaninlerin ER'den alınıp oradan vakuole transfer edilip edilmediği veya sitoplazma aracılığıyla taşındıktan sonra merkezi vakuole alınıp alınmadığı net değildir [33]. Mekanizma, bitki türleri arasında farklılık gösterebilir

veya her iki yol da antosiyanin taşınmasına katkıda bulunabilir. *A. thaliana*'da proantosiyanidin pigmentasyonunda kritik bir faktör olarak keşfedilen TT19 adlı vezikül ile ilişkili protein, antosiyanin taşınmasının da veziküller aracılığıyla gerçekleştiğini önermektedir [37]. MATE (TT12) taşıyıcılarının da potansiyel antosiyanin taşıyıcıları olarak önerilmesine rağmen, bazı çalışmalar MATE'lerin antosiyanin değil, proantosiyanidin öncüllerini taşıdığını ileri sürmektedir [38]. Daha önce, TT19 adlı bir GST'nin, antosiyanin taşınması sırasında bir "ligandin" yani koruyucu protein işlevi gördüğü varsayılmıştır [37,39,40]. Ancak, son zamanlarda yapılan bir çalışma, antosiyaninle ilişkili GST'nin (arGST) siyanidin sentezinde enzimatik bir işlev gösterdiğini ortaya koymuştur [1]. Bu bulgu, arGST'nin antosiyanin taşınmasındaki rolünü tamamen ortadan kaldırmaz; aksine, antosiyanin taşınması ile ilgili önceki gözlemlerin alternatif bir açıklamasını sunar. Antosiyaninlerin başarılı bir şekilde taşınması, merkezi vakuolde gerçekleşen ek modifikasyon reaksiyonları (örneğin, şeker eklenmesi) nedeniyle kritik öneme sahiptir. Hücre içindeki antosiyanin lokalizasyonu, bitkinin fenotipik görünümünü etkileyebilir. Antosiyanin kümeleri hızla dağılabilir ve bu durum bitki organının renk değişikliğine neden olabilir. Vakuolardaki pH değişiklikleri, antosiyaninlerin görünümünü hızla değiştirebilir [41]. Araştırmalar, antosiyaninlerin hücre içi taşınması hakkında önemli bilgiler sunsa da bitki hücreleri arasındaki veya farklı organlar arasındaki taşınması konusunda çok az bilgi bulunmaktadır [33]. Tüm bitki hücrelerinin fenilalanin bazlı antosiyanin sentezleme yeteneğine sahip olması göz önüne alındığında, hücreler arası taşınmanın biyolojik olarak ne kadar önemli olduğu tartışmalıdır.



Şekil 1.4: Antosiyanin Taşınması [42].

1.6. Doğal ve Sentetik Boyalar

Gıda endüstrisinde, gıda ürünlerinin başarılı ticarileştirilmesi ve pazarlanması yalnızca fiyat ve kaliteye bağlı değildir; aynı zamanda tüketicilerin ürünlerin şekil ve renk açısından cazibesine de büyük ölçüde bağlıdır. Bu bağlamda, özellikle çocukların hedef kitle olduğu durumlarda, gıda maddelerinin renk, şekil ve kokusunu daha çekici ve hoş hale getirmek için çeşitli gıda katkı maddeleri kullanılmaktadır. Tüketicinin ilgisini çekmek için günümüzde uygulanan en stratejik yöntemlerden biri, gıda maddelerinin farklı tonlarda gösterilmesidir. Buna bağlı olarak, sanayi gıda ürünlerine, istenen yapay renkleri vermek amacıyla (doğal veya sentetik) çeşitli gıda boyaları eklenmektedir; örneğin, gazlı içecekler, konserve meyveler, tatlılar, jelatin ve süt ürünleri gibi ürünlerde kullanılmaktadır. On yıllardır, doğal boyaların işleme sırasında kararsız ve kolay bozulan özellikleri nedeniyle, üreticiler tarafından sentetik boyalar tercih edilmiştir [43,44]. Sentetik boyalar ise yüksek su çözünürlüğü, stabil renk, düşük üretim maliyetleri ve minimal mikrobiyolojik kontaminasyon gibi avantajlara sahiptir [45]. Ancak, bu pigmentlerin sürekli tüketilmesinin, olumsuz etkileri nedeniyle ciddi sağlık sorunlarına yol açabileceği gösterilmiştir. Örneğin, azo boyalar (Amaranth, Allura Red, Ponceau 4R gibi) aşırı tüketildiğinde çocuklarda alerji, astım, ürtiker, anjiyoödem, hiperaktivite ve dikkat eksikliği, migren, anksiyete, nörolojik işlevlerde bozulma, sitotoksik, kanserojen ve ksenoestrogenik etkiler, ayrıca lökötrien B4 sentezinde artış ve tedavi edilemeyen genetik hastalıklara neden olabilir [46–48]. Öte yandan, Eritrosin gibi Ksantan boyaların aşırı miktarda kullanılması, alerjiler, böbrek veya tiroid bozuklukları, bronşiyal sorunlar, astım, davranış bozuklukları, kusma, hiperaktivite, merkezi sinir sistemi bozuklukları ve hemolitik bozukluklara yol açabilir [49].

Bu bağlamda, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu (EFSA), tüketiciler için güvenli kabul edilen seviyeleri sağlamak ve bu pigmentlerin kısa ve uzun vadeli kullanımındaki olumsuz etkileri önlemek amacıyla bu pigmentlerin tüketimine izin veren düzenlemeleri yürürlüğe koymuştur. Gıda sentetik boyalarının kabul edilebilir günlük alım (ADI) değeri, zararlı olmadan kilogram başına günlük tüketilebilecek madde miktarını gösteren bir ölçüttür [50]. Ayrıca, bu gıda boyalarının gıda ürünlerinin içerik listelerine dahil edilmesini kolaylaştırmak amacıyla, Codex Gıda Katkı Maddeleri Komitesi (CCFA), gıda katkı maddelerinin içerik listelerinde, katkı maddesinin spesifik adının (genellikle uzun ve

karmaşık kimyasal yapıya sahip) yerine üç basamaklı bir sayı olarak listelenmesini sağlayan Uluslararası Gıda Katkı Maddeleri Numaralandırma Sistemi (INS)'ni oluşturmuştur [46,50].

Bitkilerden elde edilen antosiyaninler, gıda katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Gıda katkı maddesi E163, üzüm kabuğu gibi meyve antosiyaninlerinden türetilen ticari katkı maddelerinden biridir ve mor renkte reçel, şekerleme ve içecek üretiminde kullanılmaktadır. Son zamanlarda sentetik gıda boyaları, özellikle nörolojik fonksiyonlar ve davranışsal etkiler açısından insan sağlığına olan olumsuz etkileri ve güvenlik endişeleri nedeniyle kamuoyunun dikkatini çekmiştir. Toplam 153, üç yaşındaki ve 144 sekiz ila dokuz yaşındaki çocuğu içeren bir klinik çalışmada, sodyum benzoat (E211) ile birlikte diyetle tüketilen, gün batımı sarısı (E110), karmosin (E122), tartarazin (E102), ponceau 4R (E124), kinolin sarısı (E104) ve Allura red AC (E129) içeren yapay renklerin, normal çocuklarda hiperaktivitenin önemli ölçüde artmasına ve bu durumun en az orta çocukluk dönemine kadar devam etmesine yol açtığı rapor edilmiştir [51]. Bu bulgu, sentetik gıda boyalarına alternatif olarak antosiyanin gibi doğal gıda boyalarının araştırılmasına büyük ilgi uyandırmıştır. Günümüzde yoğurt içecekleri ve bazı karışık meyve sularında antosiyanin bazlı boyaların kullanımı giderek yaygınlaşırken, bazı şirketler hâlâ ürünlerinde sentetik boyaları kullanmaktadır; ancak, bu sentetik boyalar aşırı tüketildiğinde toksik etkiler gösterebilir. Son zamanlarda, açılasyonlu antosiyaninler, açılasyonsuz antosiyaninlere göre yüksek stabiliteleri nedeniyle gıda endüstrisinde tercih edilen boyar maddeler arasında yer almaktadır [52]. Ayrıca, örneğin mürdüm eriği ve diken erik gibi belirli meyvelerden, yüksek miktarda açılasyonsuz antosiyanin nispeten düşük maliyetle üretilmekte ve bu ürünler gıda endüstrisinde boyar madde olarak kullanılma potansiyeline sahiptir.

Allura Red, Amaranth, Ponceau 4Rc, Carmoisine ve Eritrosin gibi sentetik kırmızı boyalar, yüksek sıcaklık koşullarında stabil olmaları, düşük üretim maliyetleri ve yoğun kırmızı renkleri nedeniyle dünya genelinde gıda endüstrisinde en yaygın kullanılan kırmızı renklendirici ajanlardır [53]. Bu nedenle, potansiyel alerjileri veya olumsuz etkileri önlemek amacıyla kontrollü dozlarda uygulanmaları gerektiği göz önünde bulundurularak, gıdaların tüketiciler için çekici ve cazip hale getirilmesi amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır.

E129 (Allura red AC), $C_{18}H_{14}N_2Na_2O_8S_2$ kimyasal formülüne sahip bir azo boyasıdır [43,54]. Bu boya, 6-hidroksi-2-naftalin sülfonik asit ve 5-amino-4-metoksi-2-toluen sülfonik asidin karıştırılmasıyla sentezlenir [55]. Allura kırmızısı, gıda, içecek, şuruplar, tatlılar, şekerlemeler, fırın ürünleri, dondurma ve içeceklerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda ürünlerinde Allura kırmızısının kabul edilebilir günlük alım (ADI) değeri 7 mg/kg olarak belirlenmiştir [54]. Ancak bu boya karaciğer ve böbrekler üzerinde toksik etkilere sahiptir ve özellikle çocuklarda astım, alerjiler, kanser, beyin hasarı ve dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu (DEHB) gibi sağlık sorunlarına neden olabilmektedir [43,54,55].

E124 (Ponceau 4R), $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$ kimyasal formülüne sahiptir [56]. Ponceau 4R, toz içeceklerde, süt ürünlerinde ve birçok üründe düşük maliyetli olması, iyi su çözünürlüğü, düşük mikrobiyolojik kontaminasyon riski ve yüksek stabilitesi nedeniyle kullanılmaktadır. FAO ve WHO'ya göre Ponceau 4R'nin ADI değeri 4 mg/kg olarak belirlenmiştir [57,58]. Ancak Ponceau 4R, toksik ve kanserojen aromatik halka yapıları ile azo fonksiyonel gruplar içerdiğinden aşırı tüketildiğinde alerjiler, nörolojik toksisiteler ve kanser gibi olumsuz sağlık etkilerine neden olabilmektedir [56,58].

E122 (Carmoisine), $C_{20}H_{12}N_2Na_2O_7S$ kimyasal formülüne sahiptir [59]. Karmosin, şekerlemeler, cipsler, dondurmalar ve gazlı içecekler gibi çeşitli gıda ürünlerinde renk verici olarak kullanılır. WHO ve FAO'ya göre karmosinin ADI değeri 4 mg/kg olarak belirlenmiştir [59]. Ancak yapılan araştırmalar karmosinin çocuklarda hiperaktiviteye, bazı bireylerde alerjik reaksiyonlara ve hayvanlarda kansere neden olabileceğini göstermiştir. Son yıllarda Avrupa Birliği ve ABD'de karmosinin gıda ve kozmetik ürünlerinde kullanımı yasaklanmıştır, ancak gelişmekte olan bazı ülkelerde hâlâ ticari olarak kullanılmaktadır [60,61].

E127 (Eritrosin), $C_{20}H_{14}Na_2O_5$ kimyasal formülüne sahiptir [62,63]. Eritrosin, meyve aromalı içeceklerde, keklerde, şekerlemelerde ve gazlı içeceklerde renk verici olarak kullanılır. WHO'ya göre Eritrosin'in ADI değeri 0.01 mg/kg olarak belirlenmiştir. Ancak eritrosin alerjilere, anemiye, kansere, nörotoksisiteye, DNA hasarına ve tiroid bozukluklarına neden olabilmektedir [64]. Bu nedenle gıda ürünlerinde kullanımının kontrol edilmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak, sentetik gıda boyalarının sağlık üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle antosiyanin gibi doğal bazlı renklendiricilere olan talep artmaktadır. Antosiyaninler, gıda, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde sentetik boyalara alternatif olarak kullanılabilecek umut verici doğal pigmentlerdir. Doğal Gıda Boyaları Pazarının büyüklüğü, 2025'te 2,25 milyar USD olarak tahmin edilmekte olup, 2030'a kadar %8,47'lik bileşik yıllık büyüme oranı (CAGR) ile 3,37 milyar USD'ye ulaşması beklenmektedir (2025-2030 tahmin döneminde)[65].

Doğal gıda boyaları endüstrisi, tüketici tercihleri ve sürdürülebilirlik girişimleri doğrultusunda önemli bir dönüşüm yaşamaktadır. BASF'in 2022 raporuna göre, Asya-Pasifik bölgesindeki tüketicilerin yaklaşık %80'i yapay içeriklerin olumsuz sağlık etkilerinin farkına varmış durumda ve tüketicilerin %65'i yapay renklendiriciler içeren gıdalardan aktif olarak kaçınmaktadır. Bu artan farkındalık, büyük gıda üreticilerini ürünlerini yeniden formüle etmeye yönlendirmiş ve doğal gıda boyaları çözümlerinde yeniliklere yol açmıştır. Şirketler, yapay renklere alternatif, ısı ve pH stabilitesine sahip doğal gıda boyaları kaynaklarını keşfetmek amacıyla araştırma ve geliştirmeye giderek daha fazla yatırım yapmaktadır. Gelişmiş ülkelerdeki tüketiciler, üreticilerin kullandığı ürün formülasyonlarını ve doğal gıda bileşenlerinin kalitesini belirlemede giderek daha donanımlı hale gelmiştir. 2022'de Natural Food Colors Association (NATCOL) tarafından yayınlanan bir çalışmaya göre, küresel tüketicilerin yaklaşık %60'ı yapay renklendiriciler içermeyen ürünleri görmek istediklerini belirtirken, son yıllarda doğal gıda boyası lansmanlarının oranı %77'den fazla artmıştır. Bu artan farkındalık, Kellogg's, General Mills, Nestlé SA, Campbell Soup ve Kraft Heinz gibi büyük gıda şirketlerini ürün formülasyonlarından yapay katkı maddeleri ve renklendiricileri sınırlama taahhüdüne yöneltmiştir. Örneğin, Nestlé, Butterfinger ürününün renk kaynağını Yellow 5 ve Red 40'tan, achiote ağacı tohumlarından elde edilen Annatto'ya değiştirmiştir [65].

1.7. Glutasyon Transferazlar (GST)

Flavonoidler, bitkiler karasal ortama geçiş yaptığından beri var olarak evrimleşmiş ve çeşitli fizyolojik süreçlerde rol oynamışlardır. Flavonoidler sitozolde sentezlenir ve depolanmak üzere vakuole veya biyoaktif moleküller olarak işlev gösterebilecekleri diğer hedeflere taşınırlar. Flavonoid biyosentezinin, depolanmasının ve işlevlerinin farklı yerlerde gerçekleşmesi, flavonoidlerin biyolojik rollerini yerine getirmeleri için

verimli taşınım mekanizmalarını gerektirir. Ancak, flavonoidlerin hücre içindeki dağılımı, taşınımı ve depolanmasına dair kanıtlar yakın zamanlarda ortaya konulmuştur [66,67]. Bitki hücrelerinde flavonoid taşınımı için vezikül trafiği, membran taşıyıcıları ve GST aracılı mekanizma olmak üzere üç farklı mekanizma vardır [67]. Son 10 yıl içinde, yeni biyokimyasal özelliklere ve *in planta* biyolojik işlevlere sahip flavonoid taşıyıcılarının fonksiyonel karakterizasyonu da dahil olmak üzere, flavonoidlerin vakuol içi birikim mekanizmalarının anlaşılmasında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir [35,68,69].

Glutasyon S-transferazlar (GST'ler), yaygın enzimlerin büyük bir ailesini oluşturur; topluca, fotosentetik bitki hücrelerindeki çözünebilir proteinin yaklaşık %1'ini teşkil eder [70,71]. GST'ler, hayvanlara uygulanan birçok ilaç ve bitkilere uygulanan herbisitler dahil olmak üzere çeşitli eksojen substratın detoksifikasyonu için gereklidir [72,73]. Enzim çeşitliliği, çok sayıda aile üyesi ve GST'lerin 20 ila 30 kDa'lık alt birimlerden oluşan homo ve heterodimerler olarak işlev görmesiyle yansıtılır. Ekonomik öneme sahip herbisitler ve safenerler (herbisitlerin olumsuz etkisinden bitkiyi koruyan katkı maddesi), bitki GST'lerinin substratları olarak ilgi odağı olmuştur.

GST'lerin, çeşitli abiyotik ve biyotik stres direnci ve bitki gelişim aşamalarında işlevlerinin olduğu belirlenmiştir [74,75]. Bitkilerde iyi incelenmiş detoksifikasyon reaksiyonları, nihayetinde glutasyon (GSH) ile konjugatlanmış substratların vakuole sekestrasyonuna (ayrılmasına, birikmesine) yol açar. Ancak, GST'lerin endojen bileşiklerle olan fonksiyonu hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu durum dikkat çekicidir çünkü bitkiler, potansiyel GST substratları olan sayısız toksik sekonder metabolit sentezler. Bu bileşiklerin bitkinin hayatta kalabilmesi için farklı hücre bölümlerine yerleşmesi gerekmektedir [76]. Bugüne kadar, sadece üç tür mekanizmanın antosiyanin ve flavonoid taşımada yer aldığı varsayılmaktadır: glutasyon S-transferaz (GST), vezikül taşıma ve membran taşıyıcıları [77]. Ancak, bu farklı ama birbirini dışlamayan mekanizmaların antosiyaninlerin kompermentalizasyonu için nasıl birlikte çalıştığı sorusu hala cevaplanmamıştır. GST'ler (Glutasyon S-transferazlar), tripeptit glutasyonun (γ -glutamil-sisteinil-glisin; GSH), reaktif elektrofilik bir merkez içeren bir ko-substrata (R-X) transferini katalizleyerek, polar bir S-glutasyonillenmiş reaksiyon ürünü (R-SG) oluşumunu sağlar.

GST'ler, bitkilerde büyük bir gen ailesi tarafından kodlanır ve bu enzimler, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ve stres yanıtları dahil olmak üzere çok işlevli özelliklere sahiptir [78,79]. Dizi benzerlikleri, immünolojik karakterizasyonlar, kinetik özellikler ve genomik yapısal organizasyona göre bitki GST'leri 10 alt sınıfa ayrılır: Phi, Tau, Lambda, Dehidroaskorbat Redüktaz (DHAR), Tetraklorohidrokinon (TCHQD), Uzama Faktörü-1 Gamma (EF1G), Zeta, Theta, Hemerythrin ve Iota [80]. Bu sınıflar arasında, Phi sınıfı bitkilere özgüdür ve yakın zamanda antosiyanin taşınmasında rol oynadığı öne sürülmüştür [37]. Gen delesyonu ve mutagenizasyon yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalar, GST'lerin antosiyaninlerin muhtemel en önemli taşıyıcıları olduğunu gösterilmiştir. Örneğin, mısırda bir GST (Bronze-2, Bz2) geninin eksikliği, yalnızca antosiyaninlerde büyük bir azalmanın meydana gelmesine değil, aynı zamanda antosiyaninlerin taşınmaması nedeniyle mısırın görülebilir renginin kaybolmasına da neden olmuştur [34]. Benzer şekilde, birçok çalışma, GST fonksiyonunun kaybının, bitkilerde görünür pigment birikiminin kaybına yol açabileceğini göstermiştir. Bu, petunyada *PhAN9* [39], üzümde *VvGST4* [81], sıklamende *CkmGST4* [82], liçide *LcGST4* [83], elmada *MdGST* [84], şeftalide *Riant* [85] ve *Arabidopsis*'te *AtTT19* [37] ile gösterilmiştir.

AN9, petunyadan (*Petunia hybrida*) elde edilen bir glutatyon S-transferaz (GST) enzimidir ve antosiyaninlerin sitoplazmadaki sentez yerinden alınıp, kalıcı olarak vakuolde depolanması sürecinde etkin bir şekilde dışa taşınması için gereklidir. Pek çok yabancı bileşik (ksenobiyotik) için, kovalent olarak bağlanmış bir glutatyon (GSH) etiketi, bu moleküllerin vakuolden ayrılmak üzere tanınmasını sağlar ve bu tanıma, tonoplasta lokalize olmuş ATP-bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcısı tarafından gerçekleştirilir [39].

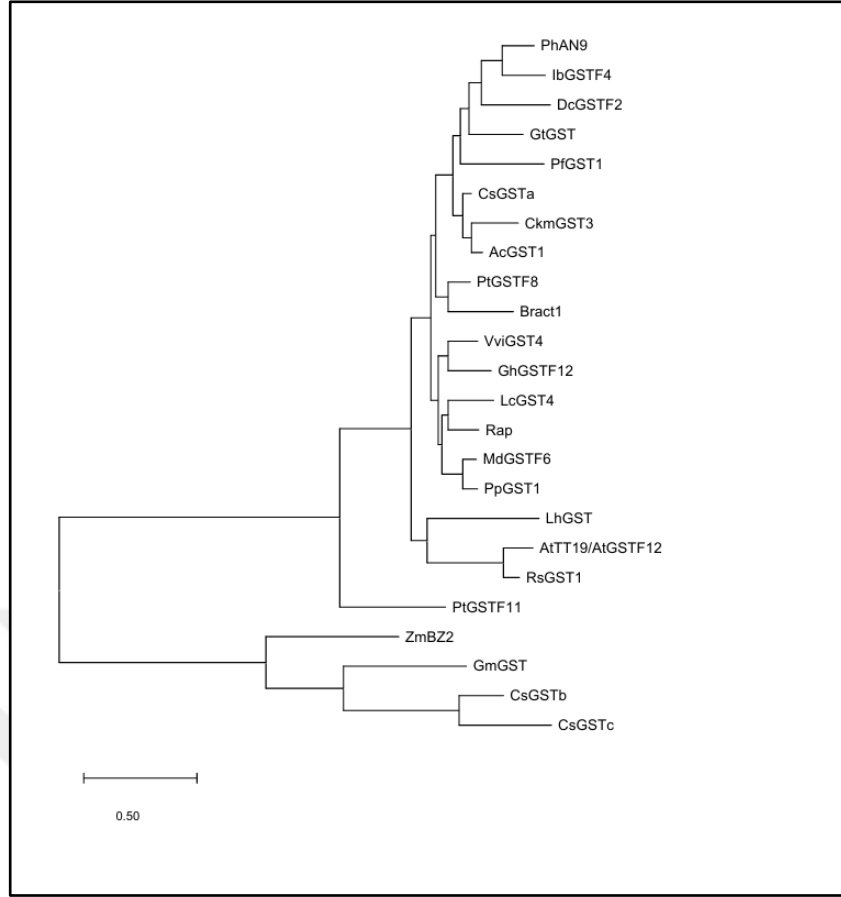
1.8. *PhAN9* GST Enziminin Filogenetik Sınıflandırılması

Filogenetik ağaç, biyolojik taksonlar arasındaki evrimsel ve filogenetik ilişkileri fiziksel veya genetik özelliklerine dayanarak gösteren ağaç benzeri bir grafiksel temsildir [86–88]. Dğümler (nodes) ve dallardan (branches) oluşan bir filogenetik ağaçta, dğümler taksonomik birimleri temsil ederken, dallar bu birimler arasındaki tahmini zaman ilişkilerini gösterir [89,90]. Filogenetik ağaç çıkarımı için kullanılan iki ana yöntem kategorisi bulunmaktadır [91] Mesafeye dayalı (distance-based) yöntemler (NJ yöntemi ve UPGMA yöntemi gibi) [92]. Bu yöntemler, önce özellik

matrisini mesafe matrisine dönüştürerek türler arasındaki evrimsel mesafeleri temsil eder ve ardından kümeleme algoritmalarını kullanarak incelenen türleri analiz eder ve filogenetik ağacı oluşturur [93]. Karaktere dayalı (character-based) yöntemler (parsimoni yöntemi ve olasılık yöntemi gibi) [94,95] Bu yöntemler genellikle çok sayıda varsayımsal ağaç üretir ve ardından belirli kriterlere göre en uygun ağacı seçer (MP yöntemi, ML yöntemi ve BI yöntemi gibi algoritmalarla dayanarak) [96].

Parsimoni yöntemi açık bir model varsayımına sahip değilken, olasılık yöntemi belirli bir sabit dizi evrim modeli ve olasılık fonksiyonu içerir [97]. Mesafeye dayalı yöntemler her zaman tek bir evrim ağacı üretirken, parsimoni ve olasılık yöntemleri en uygun ağacı oluşturana kadar birçok varsayımsal ağaç oluşturur ve değerlendirir [90].

Filogenetik analiz, evrimsel ilişkileri ortaya koyarak protein veya gen ailelerinin sınıflandırılmasına yardımcı olan güçlü bir araçtır. GST enzim ailesi, farklı organizmalarda geniş bir yayılım göstermekte olup, çok çeşitli metabolik süreçlerde rol almaktadır. Bu nedenle, tez çalışmamı kapsamında incelenen GST geninin (*PhAN9*) filogenetik analizi, bu genlerin bitkilerdeki evrimsel konumunu belirlemek, heterolog sistemlerde işlevsel rollerini anlamak ve benzer enzimlerle olan ilişkisini ortaya çıkarmak açısından önemlidir. Özellikle Phi ve Tau sınıfı GST'ler çoğunlukla bitkilerde bulunur ve detoksifikasyon süreçlerinin yanı sıra antosiyanin taşıma ve birikimi gibi işlevlerde görev alırlar. Maksimum likelihood (ML) yöntemiyle oluşturulmuş filogenetik ağaç (**Şekil 1.5**), GST proteinlerinin evrimsel yakınlığını ortaya koymaktadır. Özellikle IbGSTF4 ve *PhAN9* arasındaki filogenetik mesafenin nispeten kısa olması, bu iki genin muhtemelen benzer substratlara bağlanabildiğini ve benzer metabolik süreçlerde rol alabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 1.5: *PhAN9* Glutasyon S-Transferazın (GST) Soy Ağacı (ML:Maximum Likelihood) yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur).

1.9. Mikroorganizmalarda Antosiyanin Üretimi

Bitkilerde ikincil metabolitler olarak flavonoidlerin üretimi, yüksek düzeyde düzenlenmiş olup dokuya özgü bir şekilde gerçekleşmektedir. Gelişimsel ya da çevresel uyarılar olmaksızın, bitkilerde flavonoid birikimi genellikle sınırlı düzeyde kalmaktadır. Flavonoidlerin ticari olarak büyük ölçüde bitkilerden elde edilmesi, bu sınırlı birikimin önemli bir üretim zorluğu oluşturmasına neden olmaktadır [98]. Ayrıca, bazı önemli flavonoid bileşikleri, kültürü güç olan veya uzun büyüme dönemleri gerektiren bitki türlerinden ekstrakte edilmektedir; bu durum da üretim maliyetlerini daha da artırmaktadır. Her ne kadar bazı flavonoid bileşiklerinin kimyasal sentezi mümkün olsa da toksik kimyasal çözücülerin kullanılması ve zorlu reaksiyon koşullarının gerekliliği, bu yüksek değerli bileşiklerin *de novo* sentezini önemli ölçüde kısıtlamaktadır. Ayrıca, aktif moleküllerin oluşumu için gerekli olan

glikozilasyonlar ve kiral sentez gibi spesifik modifikasyonlar da kimyasal sentez süreçlerinde önemli zorluklar teşkil etmektedir [99,100].

Doğal kimyasalların üretimi için mikroorganizmaların mühendisliği, endüstriyel ihtiyaçları karşılamada umut verici ve sürdürülebilir bir yöntemdir. Bu sebeplerle, flavonoid üretimi amacıyla fenilpropanoid yolağının metabolik mühendisliği yoluyla geliştirilmesi ve optimizasyonu hem akademik hem de endüstriyel alanda yoğun ilgi gören bir araştırma alanı haline gelmiştir. Tarım bitkilerinin veya özel türlerin genetik mühendisliği, flavonoid üretim veriminin artırılmasını hedeflerken; mikrobiyal sistemlerin mühendisliği ise flavonoid biyosentez yollarının yeniden yapılandırılması yoluyla fermantasyon teknolojilerinden yararlanarak belirli bileşiklerin kontrollü koşullar altında sürekli üretimini amaçlamaktadır. Her iki yaklaşım da önemli farmasötik etkinliğe sahip yeni flavonoid bileşiklerinin üretimi için kullanılabilmektedir.

Metabolik mühendislikte en yaygın kullanılan sistem olan *E.coli*, naringenin, kaempferol ve katekin gibi doğal flavonoidlerin biyosentezi için kapsamlı şekilde modifiye edilmiştir [101–104]. Daha sonrasında, bu konak mikroorganizma çeşitliliği *Saccharomyces cerevisiae* ve *Streptomyces venezuelae* gibi organizmaları da kapsayacak şekilde genişletilmiştir [104,105]. Yakın zamanda ise, amino asit üreten bir bakteri olan *Corynebacterium glutamicum*'un, stilben ve flavanon üretimi için de kullanılabileceği bildirilmiştir [106].

Flavonoid sınıfına ait polifenollerin önemli üyeleri olan antosiyaninler, büyük endüstriyel ve ticari değerleri nedeniyle uzun süredir ilgi görmektedir. 2005 yılında, Yan ve arkadaşları, *Malus domestica*'dan flavanon 3-hidroksilaz (F3H) ve ANS genlerini, *Anthurium andraeanum*'dan DFR genini ve *Petunia hybrida*'dan flavonoid 3-O-glukoziltransferaz (F3GT) genini *E. coli*'ye klonlayıp eksprese etmişlerdir[107]. Bu rekombinant *E. coli* suşu, sırasıyla naringenin ve eriodiktiol öncüllerini kullanarak 6,0 µg/L siyanidin 3-O-glukozid ve 5,6 µg/L pelargonidin 3-O-glukozid üretmiştir [107]. Daha sonraki çalışmalarda, bitki kaynaklı enzimlerin seçimi, UDP-glukoz havuzunun optimizasyonu, öncül alımının düzenlenmesi ve üretim sürecinin iyileştirilmesi sayesinde üretim verimi büyük ölçüde artırılmıştır. Sonuç olarak, afzelechin ve katekin öncülleri kullanılarak pelargonidin 3-O-glukozid üretimi 113 mg/L'ye, siyanidin 3-O-glukozid üretimi ise 350 mg/L'ye ulaşmıştır [108–110].

Önemli kimyasalların, mikrobiyal hücre fabrikası olarak kullanılan *E. coli*, antosiyanin üretimi için en uygun sistemlerden biri olarak kabul edilmektedir. *E. coli*'de metabolik mühendislik yöntemleriyle flavonoid üretimi, biyosentetik kofaktörlerin artırılması yoluyla verimliliği geliştirmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin, antosiyanin sentezi için gereken şeker verici UDP-glikoz, antosiyaninlerin sentezinde kritik rol oynar. UDP-glikoz biyosentetik geninin, antosiyanin sentaz-3-O-glukoziltransferaz (ANS-3GT) ile füzyonlanmış haliyle yüksek oranda eksprese edilmesi, *E. coli*'de daha yüksek antosiyanin konsantrasyonlarına ulaşılmasını sağlamıştır [111]. Ek olarak, UDP-glikoz yollarının silinmesi sonrasında da verimlilikte artış gözlemlenmiştir [112].

Kombinatoryal (bütünleştirici) biyosentetik yaklaşım, *E. coli*'de ahududu üretiminde antosiyanin ve 5-deoksi-flavanon üretimi için de uygulanmıştır [111,113]. Antosiyaninler, F3H, DFR, ANS ve 3GT genlerinin eksprese edilmesiyle naringenininden sentezlenir. Genetik mühendisliği yoluyla geliştirilen *E. coli*'deki en yüksek naringenin üretimi 421.6 mg/L [114], kaempferol ise 57 mg/L olarak belirlenmiştir [115].

Lim ve ark. [110]'in çalışmasına göre, öncül fazlalığı, substrat seviyesi ve gen ekspresyon seviyelerinin kontrol edilmesiyle *E. coli*'de 122.3 mg/L siyanidin elde edilmiştir. Başka bir güncel çalışmada, *E. coli* BL21 hücrelerinde kırmızı renkli C3G (siyanidin 3-O-glukozit) üretimini iyileştirmek amacıyla çoklu monosistronik ve çok değişkenli vektörler tasarlanmış ve 439 mg/L C3G verimine ulaşılmıştır [116]. Yan ve ark. ([101] kültür pH'sını optimize etmek, rasyonel manipülasyon yapmak ve füzyon protein oluşturmak suretiyle *E. coli*'de 78.9 mg/L P3G (pelargonidin 3-O-Glikozit) üretmiştir. Ayrıca, antosiyanin peonidin 3-O-glukozidinin (56 mg/L) üretimi, O-metilasyonlu antosiyanin üretiminin mühendislik yaklaşımlarıyla elde edilmiştir [117]. Üretim verimi, genetik mühendisliği yoluyla tasarlanan *E. coli* hücrelerinde dışa atım pompalarının (örneğin, TolC delesyonu veya YadH overekspresyonu) etkinliğinin değiştirilmesi yoluyla, antosiyaninlerin birikmesi ve taşınması optimize edilerek artırılabilir [108,118].

Mikroorganizmalarda antosiyanin biyosentez yolunun oluşturulması ve mühendisliği, bitki enzimlerinin eşzamanlı eksprese edilmesini içerir. Gen ortologları farklı bitkilerde aynı reaksiyonu katalize eder, ancak bu enzimler farklı kinetik ve termodinamik özellikler sergileyebilir [118]. Bu durum, mikroorganizmalarda

heterolog ekspresyon sırasında çeşitli metabolik davranışlara ve hedef bileşiklerin üretim seviyelerinde değişikliklere neden olabilir. Bu nedenle, farklı türlerden enzim taraması ve seçimi, antosiyaninler ve diğer flavonoidlerin üretimini artırmak için önemli bir stratejidir [102]. Örneğin, Yan ve arkadaşları dört farklı bitkiden alınan ANS enzimlerinin in vivo aktivitelerini karşılaştırmış ve *E. coli*'de en yüksek siyanidin üretiminin *Petunia hybrida* kaynaklı ANS ile elde edildiğini göstermiştir [102]. Benzer şekilde, *E. coli*'de naringenin üretimi, upstream yolak enzimlerinin (4CL, CHS ve CHI gibi) farklı homologlarının karşılaştırılmasıyla optimize edilmiştir [103]. Farklı kaynaklardan alınan enzim kombinasyonları naringenin veriminde önemli farklılıklar göstermiştir [103]. Benzer bir strateji resveratrol üretimi için de kullanılmıştır [119]. Ancak uygun bir enzim sistemi kurulduktan sonra bile, mikroorganizmalarda yüksek verimli antosiyanin üretimi her zaman garanti edilmemektedir, çünkü bitki kökenli enzimlerin prokaryotik hücrelerde heterolog ekspresyonu genellikle genetik mühendislik modifikasyonları gerektirir. Örneğin, *Catharanthus roseus* kaynaklı bir P450 enzimi olan F3'5'H'nin prokaryotik ekspresyonu için, 5' ucundaki dört kodon çıkarılmış, beşinci kodon başlangıç kodonuyla değiştirilmiş ve altıncı kodon lösinden alanine değiştirilmiştir [120]. Daha sonra bu yeniden tasarlanmış F3'5'H, *C. roseus*'tan türetilmiş kısaltılmış bir P450 redüktaz ile birleştirilerek bir kimerik hidroksilaz oluşturulmuş ve kuersetin üretimi sağlanmıştır [120]. Metabolik yolaktaki bireysel enzimlerin modifikasyonlarının yanı sıra, ardışık adımlarda görev alan birden fazla enzimin birleşik ekspresyonu da antosiyanin üretimini artırmada etkili bir yöntemdir. Örneğin, *Arabidopsis thaliana* kaynaklı F3GT enziminin *Petunia hybrida* kaynaklı ANS'nin N-terminaline pentapeptid bir bağlayıcı ile füzyon edilmesi sonucu, ayrı ayrı eksprese edilen enzimlere kıyasla çok daha yüksek siyanidin 3-O-glukozit (C3G) verimi elde edilmiştir [102]. Bu kimerik enzim kompleksinin, kararsız siyanidin ara ürününün lokal konsantrasyonunu artırarak onu hızlıca F3GT'ye aktardığı ve böylece siyanidinin bozulmasını önleyerek üretim verimini artırdığı düşünülmektedir.

Antosiyaninlerin mayada heterolog üretimi ile ilgili yapılan çalışmada, heterolog GST ekspresyonunun antosiyanin üretiminde, lökoantosiyanidin dioksigenaz enziminin ürünü olan flavan-3,3,4-triol'ün siyanidine dönüşümünde gerekli olan dehidrasyon reaksiyonunun katalitik aktivitesinde etkisi olduğu ve antosiyanin üretiminde 36,5 kat verim artışını sağladığı kanıtlanmıştır. Benzer şekilde, bu tez çalışması kapsamında, *E.coli*'de PhAN9 (*Petunia hybrida* AN9) glutatyon S-transferazının heterolog

antosiyenin biyosentezini arttırmasındaki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda, tez çalışması kapsamında *E. coli*'de antosiyenin üretiminin arttırılması için; antosiyenin taşınması ve birikmesinde önemli rolleri olduğu bilinen *PhAN9* glutatyon transferazı, GST geni olarak seçilmiş ve *E. coli*'de daha önce tasarlanmış antosiyenin (C3G) üreticisi rekombinant hücrelere klonlamıştır. Literatürde, *E. coli*'de GST ekspresyonunun heterolog antosiyenin üretimine etkisi ile ilgili şu ana değin yapılan çalışmanın olmaması bu çalışmanın özgünlük değerini arttırmaktadır.



2. MATERİYAL

Tez çalışması kapsamında, siyanidin-3-O-glukozit (C3G) üretiminin arttırılması için *E. coli* hücrelerinde klonlanma ve transformasyonu çalışmaları yapılmıştır. Genetik mühendislik yoluyla değiştirilen hücrelerde daha sonra C3G üretiminin arttırılması için besiyeri ve kültür koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

2.1. Kullanılan Kimyasallar

Tez kapsamında kullanılan kimyasallar ve üretici firmaları Tablo 2.1’de gösterilmektedir.

Tablo 2.1: Tez kapsamında kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler.

Kimyasal adı	Kimyasal markası- Katalog numarası
Ampisilin	Sigma-Aldrich A9393-5G
Streptomisin	Sigma-Aldrich S6501-5G
Casamino acid	LabM Q33034/054
Peptone	Merck 1.07214.0500
Trisin	BioShop / TRI001.100
Magnezyum Klorür Hexahidrat (MgCl ₂ .6H ₂ O)	AFG Bioscience / 223905-1KG
Potasyum Hidroksit KOH	Sigma-Aldrich / 06005
Amonyum Chloride (NH ₄ Cl)	AFG Bioscience 184934-1KG
Sodyum Klorür NaCl	Sigma-Aldrich
Asit Hidrolize Kazein	LabM- Q33034/054
D (+)-Glucose, Anhydrous	AFG 294126
Morpholinopropane Sulphonic and Extra pure (MOPS)	AFG Bioscience 355532
Demir (II) Sülfat Heptahidrat (FeSO ₄ .7H ₂ O)	AFG Bioscience 335074-1KG

Tablo 2.1: Tez kapsamında kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler (devamı).

Demir (II) Sülfat Heptahidrat (FeSO ₄ .7H ₂ O)	AFG Bioscience 335074-1KG
Potasyum Sülfat (K ₂ SO ₄)	Carlo Erba 474167-1KG
Amonyum Molibdat (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	Sigma Aldrich M1819-10G
Borik Asit (H ₃ BO ₃)	AFG Bioscience 373848-1KG
Bakır (II) Sülfat Pentahidrat (CuSO ₄ .5H ₂ O)	AFG Bioscience 260976-1KG
Mangan Klorür (MnCl ₂)	Sigma Aldrich 244589-50G
Çinko Sülfat Heptahidrat (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	AFG Bioscience 408022-1KG
Potasyum Fosfat Monobasic Anhydrous (KH ₂ PO ₄)	AFG Bioscience 292188-1KG
Potasyum Fosfat Dibasic Anhydrous (K ₂ HPO ₄)	AFG Bioscience 321171-1KG
di-Amonyum Fosfat (NH ₄) ₂ HPO ₄	Tekkim 310823294001-1KG
Kalsiyum Klorür Dihidrat (CaCl ₂ 2H ₂ O)	AFG Bioscience 347762-1KG
Thiamine Hidroklorür (C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS.HCl)	AFG Bioscience 402129-25G
Tris Base	neoFroxx 1115KG001
Asetik Asit	Merck 100056
nutrient broth	Merck 1.05443.0500
EDTA	AFGSCI 399168
Yeast extract	Bacto TM 212750
Agar	Bacto TM agar 214010
Cyanidin-3-O-glucoside chloride	GLPBİO-GN10743
IPTG	neofroxx 1122GR005
N,N-Dimethylformamide	Sigma 59H364315
HCl	Merck- K39100514
DMSO	Merck 102952
<i>PhNA9</i> glutatyon S-transferaz geni (sentetik)	GenScript

Tablo 2.1: Tez kapsamında kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler (devamı).

Acetonitril	Sigma 1.00030.2500
SYBR safe	Invitrogen S33102
Formik asit	Lachema 30587
HPLC vial	Agilent Technologies 5190-9062
HPLC vial insert	İsolab I.097.05.111.100
HPLC vial kapak	Agilent Technologies 5190-9067
HPLC kolon	Agilent Technologies Zorbax SB-C18 (4.6 × 150 mm, 5 µm)
48-Derin kuyulu plate (5 mL)	VWR (732-3797)
Derin kuyulu plate kapağı (plate seal)	VWR (60941-086)
SYBR safe	Invitrogen S33102

2.2. Kullanılan Kitler ve Enzimler

Tez kapsamında, GST geninin klonlanması ve klonların doğrulanması aşamasında kullanılan kitler, enzimler, DNA belirteçleri Tablo 2.2’de sunulmuştur.

Tablo 2.2: Klonlama ve klonların doğrulanması aşamasında kullanılan kitler, enzimler, belirteçler.

Kit, Enzim ya da Belirteç adı	Üretici firma/Katalog numarası
<i>Nde</i> I	NEB R0111S
<i>Kpn</i> I-HF	NEB R3142S
<i>Xho</i> I	NEB R0146S
T4 DNA ligaz	NEB M0202S
Taq DNA polimeraz	İNtron -30221847
100 bp + 500 bp DNA belirteci	O’RangeRuler
1 kb plus DNA belirteci	NEB N0550G
rCutsmart Buffer (10X)	NEB B6004S
Miniprep İzolasyon kiti	Monarch T1010S/L
Jel izolasyon kiti	EcoPURE E5003

2.3. Kullanılan Cihazlar

Tez kapsamında kullanılan cihazlar Tablo 2.3'te sunulmuştur.

Tablo 2.3: Tez kapsamında kullanılan cihazlar.

Cihaz adı	Cihaz markası ve modeli
HPLC	Shimadzu – DGU-20A5R
Buz makinesi	Vosko
Agaroz Jel Görüntüleme Cihazı	Azure Biosystem, c600
Otoklav	Hirayama, Hicla HVE-110
Tartı	Precisa 1200C
pH Metre	Hana Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter
Su banyosu	GFL 1083
Mikrodalga Fırın	Beko 1550
-80 °C derin dondurucu	Esco Lexicon ULT Freezer
Steril Kabin	Heraus Hera Safe HS 12
+4 °C ve -20 °C Buzdolabı	Arçelik
Masa Üstü Santrifüj	VWR, Microsent 17R
Soğutmalı Santrifüj	Gyrozen 124BR
Soğutmalı Santrifüj	Scanspeed Falkon Santrifüj-1580R
Tartı	Shimadzu AUW220D
Santrifüj	Beckman Coulter TM – Microfuge 18 centrifuge
PCR	Thermocycler Biometra

2.4. Besiyerleri ve Solüsyonlar

Tez kapsamında klonlama, transformasyon ve hücre kültürü aşamalarında kullanılan solüsyon ve besiyerleri aşağıda sunulmuştur.

2.4.1. Kompetan Hücre Improved Tampon

Hücre transformasyonunda, kompetan hücre hazırlanmasında kullanılan improved buffer hazırlamak için, 5 mL CaCl_2 ve 50 mL LB ile steril koşullarda karıştırılarak 55 mL olarak hazırlandı. Kullanılan solüsyonlar öncesinde 0.45 μm şırınga filtre ile steril edildi.

2.4.2. 50× TAE Buffer

Agaroz jelde kullanılmak üzere TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) tamponu 50× olarak aşağıdaki şekilde hazırlanmış, daha sonra 1×'e seyreltilerek kullanıldı.

Bu amaçla, 242 g Tris-base, 57,1 mL asetik asit ve 100 mL 0.5M EDTA ile karıştırılmış ve çözelti hacmi 1 litreye distile su ile tamamlandı.

2.4.3. LB Besiyeri ve LB Agar Besiyeri

E. coli hücrelerinin klonlanması, transformasyonu ve önkültürleri sürecince kullanılan LB broth ve LB agar besiyerleri aşağıdaki şekilde hazırlandı.

LB broth:

-10 g nutrient broth

-5 g yeast extract

-8 g NaCl

-0,52 g Tris base

Tüm kimyasallar, 800 mL suda iyice çözüldükten sonra, mezürde hacim 1000 mL'e tamamlandı ve şişelere aktarım yapıldı. Sterilizasyon için otoklava atılarak 121°C'de 15 dakika boyunca steril edildi.

LB Agar:

-10 g nutrient broth

-5 g yeast extract

-8 g NaCl

-15 g agar

Agar hariç tüm maddeler 800 mL suda, manyetik karıştırıcıda manyetik balık yardımıyla çözüldü. Sonrasında mezürde hacim 1000 mL'e tamamlandı ve steril şişelere aktarım yapıldı. Son olarak agar eklenip, sterilizasyon için otoklava atılarak 121°C'de 15 dakika boyunca steril edildi.

2.4.4. AMM (Andrew's Magic Media) Besiyeri Bileşenleri

Tez kapsamında, genetik mühendislik yoluyla değiştirilmiş *E. coli* hücrelerinde C3G üretimi için AMM besiyeri kullanılmıştır. AMM besiyerinin hazırlanışı aşağıda ayrıntılarıyla verilmiştir.

10X Tuz çözeltisi (500mL):

-17,5 g KH_2PO_4

-25 g KHPO_4

-17,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Hassas terazide ilgili kimyasallar tartıldıktan sonra beher içine eklenerek, 300 mL suda manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Mezürde hacim 500 mL'ye tamamlandıktan sonra steril şişeye aktarıldı. Daha sonra fosforik asit (Sigma) ile pH 6.49'a ayarlandı. Filtre sterilizasyonu (0.45µm şırınga ucu filtre ile) yapılarak, oda sıcaklığında saklanmıştır.

1 M CaCl_2 Çözeltisi (100 mL):

14,70 g CaCl_2 tartılıp suda çözülüp, mezürde hacim 100 mL'ye tamamlandıktan sonra otoklava atılarak 121°C'de 15 dakika boyunca steril edilmiştir. Kullanıma kadar oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

0,5 g/L Thiamine HCL Çözeltisi (20 mL)

0,01 g thiamine HCL tartılıp 20 mL su içinde çözülmüştür. Filtre sterilizasyonu (0.45 µm şırınga ucu filtre ile) yapıldıktan sonra, eppendorflara aktarılmış ve eppendorflar alüminyum folyo ile kaplanıp (çözeltinin ışık hassasiyeti olduğu için) -20°C' de muhafaza edilmiştir.

1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Çözeltisi (1000 mL):

246,47 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tartıldıktan sonra önce 700 mL suda çözdürüldü. Mezür ile hacmi 1000 mL'e tamamlanıp tamamlandı ve manyetik karıştırıcıda tekrar homojenize

hale getirildi. Ardından laminar akışlı kabinde filtre sterilizasyonu yapılarak ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

%50 Glikoz Çözeltisi:

100 g glikoz tartıldıktan sonra 80 mL suda çözdürüldü. Mezür ile hacmi 200 mL'e tamamlanıp manyetik karıştırıcı ile homojen hale getirildi. Ardından laminar akışlı kabinde filtre sterilizasyonu yapılarak ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Mikronütrient Çözeltisi (50 mL):

-0,009 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$

-0,063 g H_3BO_3

-0,006 g CuSO_4

-0,040 g MnCl_2

-0,007 g ZnSO_4

İlgili kimyasallar hassas terazide tartılıp beher içine alındı ve 40 mL suda çözdürüldü. Mezürde hacim su ile 50 mL'e tamamlandı. Ardından laminar akışlı kabinde filtre sterilizasyonu yapıldı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

10X MOPS Çözeltisi:

-83,72 g MOPS

-7,17 g Tricine

-0,03 g $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$

- 5,10 g NH_4Cl

-0,48 g K_2SO_4

-1,10 g MgCl_2

-29,20 g NaCl

MOPS ve Trisin tartılıp 800 mL suda çözdürüldü. 10 M KOH ile (10-20 mL) pH'ı 7.4'e ayarlandı ve sırasıyla ilgili kimyasallar tartılıp çözeltiye eklendi. 200 $\mu\text{L/L}$ mikronütrient karışımdan eklendi. Manyetik karıştırıcıda homojenize hale getirilip hacmi 1000 mL'e tamamlandı. Ardından laminar akışlı kabinde filtre sterilizasyonu yapıldı ve 50 mL'lik falkon tüplere ayrıldı. Sonrasında -20°C 'ta muhafaza edildi.

1000X Antibiyotik Çözeltisi (10 mL):

Ampisilin: 0.80 g ampisilin tartıldıktan sonra 10 mL suda vorteks ile çözülmüştür. Filtre sterilizasyonu ile 1.5 mL'lik eppendorflara aktarıldıktan sonra -20°C'ta muhafaza edilmiştir.

Streptomisin: 0.50 g streptomisin tartıldıktan sonra 10 mL suda vorteks ile çözdürüldü. Filtre sterilizasyonu ile 1.5 mL'lik eppendorflara aktarılarak -20°C'ta muhafaza edilmiştir.

Yukarıda belirtilen tüm çözeltiler hazırlandıktan sonra, Tablo 2.4.'de belirtilen ölçülerde karıştırılarak AMM besiyeri hazırlanmıştır.

Tablo 2.4: AMM Besiyeri bileşenleri (1 litre için).

<i>Stok Çözeltileri</i>	<i>Hacim</i>
10× Tuz Stok Çözeltisi	100 mL
50% Glikoz Çözeltisi	40 mL
1 M MgSO ₄ Çözeltisi	1 mL
0,5 g/L Thiamine HCl Çözeltisi	1 mL
10X MOPS Çözeltisi	100 mL
1 M CaCl ₂ Çözeltisi	0,1 mL
Ampisilin	1 mL
Streptomisin	1 mL
dH ₂ O	756,9 mL

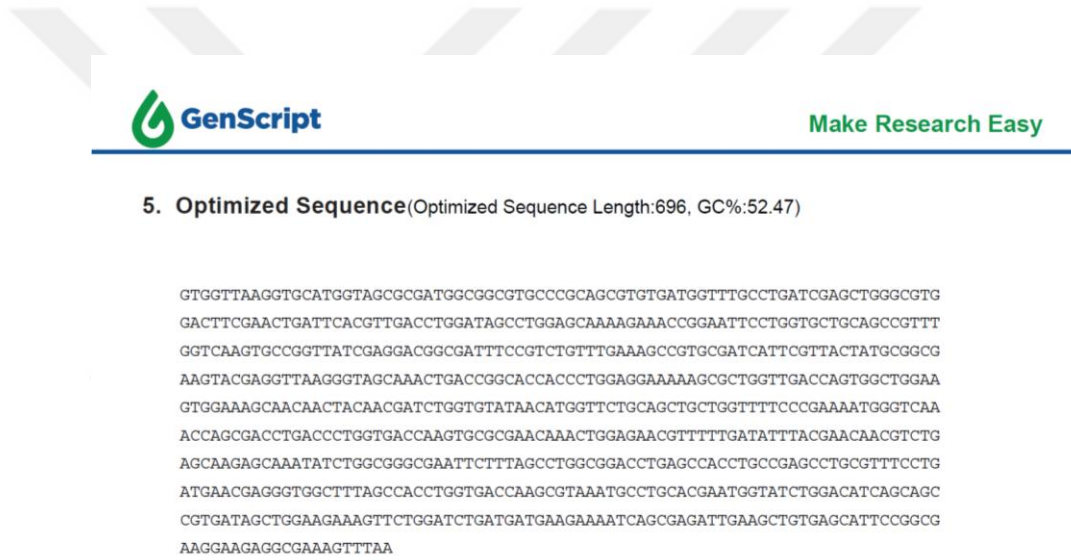
İlk adımda dH₂O, tuz stok çözeltisi ve ardından glikoz çözeltisi eklendi (ilk olarak suyun eklenme nedeni ileriki adımlarda eklenecek çözeltileri karıştırdıktan sonra çökelti olmaması içindir). Glikoz çözeltisi eklendikten sonra 2 g/L kasaminoasit eklendi. CaCl₂ çözeltisini ekledikten sonra çökelti olmaması için yeterli miktarda su olduğu kontrol edildi.

pH çok yüksekse, MgSO₄ eklenmesi çökelmeye neden olmaktadır. Bunu önlemek için, 10× tuz stok çözeltisini konsantre fosforik asit ile pH 6.3 veya 6.6'ya ayarlandı.

1000 mL AMM medium hazırlamak için ilk olarak laminar akışlı kabinde 1 L'lik şişeye su eklendi. Tuz stok çözeltisi ve glikoz çözeltisi eklendikten sonra 2 g kazaminoasit eklendi. Diğer çözeltiler de sırasıyla eklenip besiyeri hazırlandı.

2.5. PhAN9 Glutasyon S-Transferaz Geninin Sentezi

Petunia hybrida bitkisine ait PhAN9 glutasyon S-transferaz (GST) geni, *NdeI* (5' ucu) ve *KpnI* (3' ucu) restriksiyon enzim kesim bölgelerini içerecek şekilde sentetik olarak sentezlenmiş, ekspresyon verimliliğini artırmak amacıyla *Escherichia coli* için kodon optimizasyonu uygulanmış ve pUC57 vektörüne klonlanmış olarak GenScript firmasından temin edilmiştir. Kodon optimize gen dizilimi **Şekil 2.1**'de gösterilmiştir:



Şekil 2.1: PhAN9 kodon optimize gen dizilimi.

2.6. Gliserol Stok Hazırlama

Deneyler süresince elde edilen hücrelerin stokları şu şekilde hazırlandı: Direnç gösterdiği antibiyotiğe göre LB agar besiyerine tek koloni gelecek şekilde çizgi metodu ile ekim yapıldı. Gece boyu 37°C'ye inkübasyona bırakıldı, sonrasında ilgili antibiyotiği içeren 3 mL LB besiyerine gece boyu inkübasyona bırakılan petriden tek koloni alınıp eklenerek gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra -20°C ve -80°C stokları hazırlandı. -20°C stoğu için 625 µL steril %80 gliserol + 375 µL kültürden eklendi. -80°C stok için de 375 µL steril %80 gliserol + 625 µL hücre kültüründen eklendi. Sonrasında ilgili yerlere muhafaza edilmek üzere kaldırıldı.

3. YÖNTEM

Tez kapsamında, GST geninin klonlanması ve transformasyonunda ve son aşamada da C3G üretiminde kullanılan plazmit ve bakteri soylarına ait ayrıntılı bilgiler Tablo 3.1.'de sunulmuştur.

Tablo 3.1: Tez kapsamında kullanılan bakteri soyu ve plazmitler.

Bakteri soyu ya da vektör ismi	Özellikleri	Kullanılan antibiyotik	Kaynakça
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ , ϕ 80d lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, recA1, endA1, hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺), phoA, supE44 λ ⁻ , thi ⁻¹ , gyrA96, relA1	-	Novagen
<i>Escherichia coli</i> BL21 Star TM (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm rne131 lon hsdS _B (r _B -m _B ⁻) λ (DE3)	-	Invitrogen
pETM6	ePathBrick expression vector, Cole1 ori, AmpR	Ampisilin	[121]
pETM6-At3GT-PhANS	pETM6 with At3GT and PhANS, monocistronic	Ampisilin	[117]
pCDM4	CloDF13, Str ^r , with ePathBrick feature	Streptomisin	[121]

Tez kapsamında kullanılmak üzere, glutatyon S-transferaz geni (*PhAN9*) sentetik olarak sentezlenmiş ve pUC57 vektörü içinde klonlanmış olarak temin edilmiştir. İlgili geni, ekspresyon vektörümüz olarak kullanılacak pCDM4 plazmitine klonlamak üzere kompetan hücre hazırlanmış (*E. coli* DH5 α), daha sonra *PhAN9* genini içeren pUC57 plazmiti kompetan hücrelere transforme edilerek plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. pUC57-PhAN9 plazmitleri daha sonra *Nde*I ve *Kpn*I enzimleri ile kesilerek içerisinde agaroz jelde yürütülerek *PhAN9* geni jelden izole edildi. Son

olarak, bu gen ekspresyon vektörü olan pCDM4 içine klonlanarak *E. coli* DH5 α hücrelerine transforme edilmiştir. pCDM4-PhAN9 plazmitini içeren stok hücreler hazırlanmasına ilişkin izlenen tüm protokol aşağıda ayrıntıları ile verilmiştir.

3.1. *E. coli* DH5 α Kompetan Hücre Hazırlanması

Klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere kompetan hücre hazırlanmıştır. Bu amaçla izlenen protokol şu şekildedir: *E. coli* DH5 α hücreleri, -80°C'tan stoklarından alınarak LB agar içeren petri kaplarına ekilerek 37°C'ta gece boyu büyütüldü. Kompetan hücre hazırlamak üzere, bu petriden tek bir koloni alınarak 50 mL LB besiyeri içeren erlen kültür kaplarına öze yardımı ile ekildi. 37 °C'ta 200 rpm inkübe edilerek OD600 değeri yaklaşık 0,6 (3,5 saat sonunda) olduktan sonra hücreler, steril santrifüj tüplerine aktararak 5 dakika buzda inkübe edilerek soğutuldu. 3000 RCF/1000G de 4°C'ta 10 dakika boyunca santrifüj yapıldıktan sonra üst sıvı uzaklaştırılarak pellet, 20 mL (2,5 ml CaCl₂ içeren, 25 mL'lik LB besiyeri) improved buffer ile resüspanse edildikten sonra 5 dakika buzda bekletilerek soğutuldu. Sonrasında 1000 g'de 4°C'ta 10 dakika boyunca santrifüj yapıldıktan sonra üst sıvı uzaklaştırılarak pellet, 20 ml (2,5 ml CaCl₂ içeren, 25 mL'lik LB besiyeri) improved buffer ile resüspanse edildi. Ardından 5 dakika buzda bekletilip 1000 g'de 4°C'ta 6 dakika boyunca santrifüj yapılarak üst sıvı uzaklaştırıldı. Son olarak, pellet üzerine 4 mL taze improved buffer eklenerek homojen bir şekilde çözülerek eppendorf tüplere paylaştırılarak sonrasında kullanılmak üzere -80°C'ta saklandı.

3.2. pUC57-PhAN9 Plazmitinin *E. coli* DH5 α Hücrelerine Transformasyonu

pUC57-PhAN9 plazmiti, son konsantrasyonu 25 ng/ μ l veya 100 ng/ μ l olacak şekilde, 45 μ l kompetan hücre (*E. coli* DH5 α) içeren eppendorf tüplere eklendi. Eppendorf tüpler, transformasyon işlemi için öncelikle buzda 20 dakika bekletildikten sonra, 45-50 saniye 42 °C'ta su banyosunda hızla inkübe edilip hemen sonra 2 dk daha buzda bekletildi. İlgili plazmit ve kompetan hücrelerin üzerine 950 μ l LB eklendikten sonra 50 dakika boyunca 37 °C'ta 200 rpm'de çalkalamalı inkübatörde büyümeye bırakıldı. 2000 g'de 4 dakika santrifüjün ardından 900 μ l üst sıvı uzaklaştırılıp kalan sıvıda (100 uL) pellet çözdürülüp antibiyotikli (ampisilin 80 μ g/mL) LB agar besiyerine ekimi yapılmıştır. 37 °C'ta 16 saat inkübasyonun ardından, oluşan tek koloniler 80 μ g /mL

ampisilin içeren sıvı LB besiyerine aktararak (15 mL falkon tüplere 3 mL LB eklenmiştir) 37 °C'ta 200 rpm'de büyütülmüştür. 16 saat inkübasyonun ardından pUC57-PhAN9 plazmidini içeren *E. coli* DH5α hücrelerinin -20 °C ve -80 °C stok solüsyonları hazırlanmıştır.

3.3. Plazmit İzolasyonu

Tez kapsamında gerçekleştirilen tüm plazmit izolasyonları NEB marka miniprep plazmit izolasyon kiti (Monarch® Plasmid Miniprep Kit NEB #T1010S/L) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

pUC57-PhAN9 plazmitini içeren *E. coli* DH5α Hücrelerinden plazmit izolasyonu için kullanılan kit protokolüne ait ayrıntılar aşağıda verilmiştir:

pUC57-PhAN9 plazmidini içeren *E. coli* DH5α hücrelerinin stok solüsyonlarından alınan hücreler ampisilin içeren 3 mL LB besiyerinde 37 °C' ta 200 rpm'de gece boyu büyütüldükten sonra, 4 °C'ta 4000 rpm 20 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra pelletler 200 µl B1 tamponunda çözündürüldü. Ardından 200 µl B2 lizis tamponu eklenip 5-6 kez nazikçe ters-yüz edildi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyonun ardından 400 µl B3 nötralizasyon buffer eklenip, 2 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. 5 dakika boyunca 16.000 g hızında santrifüj yapıldı. Üst sıvı pellete dokunmadan dikkatlice çekilip kit içerisinde yer alan kolona aktarılıp 1 dakika boyunca santrifüj yapıldı. Altta kalan sıvı uzaklaştırılıp, 200 µl plazmit yıkama tamponu 1 eklenip tekrar 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra altta kalan sıvı uzaklaştırılmıştır. 400 µl plazmit yıkama tamponu 2 eklenip 1 dakika daha santrifüj yapıldıktan sonra sıvı uzaklaştırıldı. Kolon yeni steril eppendorf tüpe aktarıldıktan sonra son olarak 30 µl nükleaz free su eklenip santrifüj yapıldıktan sonra plazmit izolasyonu tamamlanmıştır.

3.4. Moleküler Klonlama

Tez kapsamında, C3G üretiminde glutatyon S-transferaz *PhAN9* geninin etkinliği, pCDM4 ekspresyon plazmitine klonlandıktan sonra test edilmiştir. pUC57 vektörü içerisinde yer alan *PhAN9* geni, pCDM4 ekspresyon vektörüne klonlanmıştır: Klonlama için bu amaçla, boş pCDM4 vektörü ve kodon optimize *PhAN9* genini içeren pUC57-PhAN9 vektörü, *NdeI* ve *KpnI*-HF enzimleri ile kesilmiştir (Tablo 3.2).

Belirtilen plazmitlerden 1 ng, 1× rCut Smart Buffer ve 1'er µL enzim ile final hacmi 30 µL olacak şekilde bir araya getirilerek ve 37°C'ta 15 dakika inkübe edilmiştir. Kesimin ardından enzim 65°C'da 20 dakikada ısı uygulaması ile inaktivasyon gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.2: Restriksiyon enzim kesim reaksiyonu.

pUC57-PhAN9 için	Miktar	pCDM4 için	Miktar
DNA (1000 ng)	7 uL	DNA (1000 ng)	15 uL
rCutsmart Buffer (10X)	3 uL	rcutsmart buffer	3 uL
<i>NdeI</i> (20 U)	1 uL	<i>NdeI</i> (20 U)	1 uL
<i>KpnI</i> (20 U)	1 uL	<i>KpnI</i> (20 U)	1 uL
dH ₂ O	18 uL	dH ₂ O	10 uL
Toplam	30 uL	Toplam	30 uL

Kesilen plazmitler, %1'lik agaroz jele (1× TAE tamponu ile hazırlanmış) yüklenip, 1 kb DNA belirteci ile beraber 110 volt'ta 30-45 dakika, DNA belirteç bantları iyice ayrılana kadar yürütülmüştür. DNA bantlarının ayrılmasının gerçekleştirilmesi ile kodon optimize genleri temsil eden bantlar ve lineer hale gelmiş pCDM4'ü temsil eden bantlar, fazla jel almamaya dikkat edilerek temiz bistüri ucu ile jelden kesilmiş ve ayrı mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.

Bu bantların jelden geri kazanımı Eco Pure Gel extraction Kit ile protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Kit protokolüne ait ayrıntılar aşağıda verilmiştir:

İlgili bantlar fazla jel almamaya dikkat edilerek steril bistüri ucu ile jelden kesilip daha öncesinde boş ağırlığı tartılan 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. 100 mg agaroz jel için 300 µL EcoPure Bağlanma tamponu eklendi. Jelin çözünmesi için 10 dakika 55°C' de her 2-3 dakikada bir kısaca vortekslenerek inkübe edildi. Tamamen çözüldükten sonra her 100 mg agaroz jel kesiti için 150 µL izopropanol eklendi ve iyice karıştırıldı. Elde edilen örnek kolona aktarıldı ve oda sıcaklığında 30 saniye 14.000 rpm'de santrifüj yapıldı. Üst sıvı uzaklaştırıldı ve 700 µL EcoPure yıkama tamponu kolona eklendi. Oda sıcaklığında 30 saniye 14.000 rpm'de santrifüj yapıldı. Üst sıvı uzaklaştırıldı ve boş kolon oda sıcaklığında 14.000 rpm'de 1 dakika boyunca

santrifüj yapıldı ve yıkama tamponu tamamen uzaklaştırıldı. Kolon yeni 1.5 mL’lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 30 µL nükleaz-free su eklendi ve kolon oda sıcaklığında 1 dakika boyunca inkübe edildi. Oda sıcaklığında 30 saniye 14.000 rpm’de santrifüj yapıldı. Kolon uzaklaştırıldı ve elde edilen DNA’lar -20°C’ye kaldırıldı.

DNA parçalarının konsantrasyonları nanodrop ile tayin edildi. Birbirini tamamlayan kesim noktalarına sahip lineer pCDM4 vektörü ve *PhAN9* geni ligasyon için kullanılmıştır: Ligasyon işlemi için T4 DNA ligaz (NEB) kullanılmıştır. T4 DNA ligaz protokolüne göre ligasyon oranları hesaplanmıştır. 50 ng pCDM4 ile 1:3 molar oran verecek şekilde *PhAN9* geni, 1× ligasyon tamponu içinde bir araya getirildikten sonra, 1 µL T4 DNA ligaz enzim eklenmiş ve bu karışım 16-18 saat 16°C inkübe edilmiştir (Tablo 3.3). Sonrasında 65 °C’ ta 10 dakika inaktivasyon yapıldı. Ligasyon hesaplaması şu şekilde yapılmıştır (3.1)

$$\text{gereken insert kütlesi (g)} = \text{istenen insert /vektör mol oranı} \times \text{vektörün kütlesi (g)} \times \text{insert uzunluğunun vektör uzunluğuna oranı} \quad (3.1)$$

Tablo 3.3: Ligasyon reaksiyonu bileşenleri.

Reaktanlar	<i>PhAN9</i>
Insert DNA (50 ng)	3,75 uL
Vektör DNA (pCDM4) (37,5 ng)	1,75 µL
T4 Ligaz buffer	2 µL
dH ₂ O	12,50 µL
T4 ligaz	1 µL

3.5. pCDM4 Vektörüne Glutasyon S-transferazların Transformasyonu

pCDM4-*PhAN9* olarak isimlendirilen ligasyon ürünleri (plazmit), takip eden günde kompetan *E. coli* DH5α hücreleri içine CaCl₂ ısı şoku metodu ile aktarılmıştır (Bu amaçla, 2.5 µL ya da 5 µL pCDM4-*PhAN9* plazmit ile 50 µL kompetan hücre transforme edilmiştir). LB agar + 50 µg/mL streptomisin besiyerinde seçilen pozitif

koloniler daha sonra LB + 50 µg/mL streptomisin sıvı besiyerinde çalkalamalı inkübatörde bir gece boyunca büyütülmüştür. Büyüyen kültürlerden hem plazmit izolasyonu yapılmıştır hem de -80°C gliserol stokları hazırlanmıştır. İzole edilen plazmitlerin pozitif klon olup olmadığı hem restriksiyon enzim kesimi (tekli ve ikili kesim) hem de PCR yapılarak belirlenmiştir.

3.6. pCDM4-*PhAN9* Klonlarının Doğrulanması

C3G üretiminin arttırılmasındaki etkinliği test edilecek olan glutatyon S-transferaz *PhAN9* geninin pCDM4 plazmitine klonlanması sonucu pCDM4-*PhAN9* plazmiti elde edilmiştir. İlgili plazmitin klonladığımız geni içerip içermediğinin doğrulanması için hem restriksiyon enzim kesimi hem de PCR reaksiyonu aşağıda ayrıntıları verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.6.1 Restriksiyon Enzim Kesimi ile Klonların Doğrulanması

Plazmit izolasyonu yapılan klon adaylarının doğrulanması için ikili ve tekli enzim kesimi gerçekleştirilmiştir. İkili enzim kesim için *NdeI* ve *KpnI* restriksiyon enzimleri kullanılmış olup kesim protokolü Tablo 3.4'te belirtilen oranlarda yapılmıştır.

Tablo 3.4: pCDM4-*PhAN9* plazmitinin ikili restriksiyon enzim kesimi (*NdeI*-*KpnI*).

pCDM4- <i>PhAN9</i>	Miktar
DNA (1000 ng)	5 uL
rCutsmart Buffer (10X)	2 uL
<i>NdeI</i> (20 U)	1 uL
<i>KpnI</i> (20 U)	1 uL
dH ₂ O	11 uL
Toplam	20 uL

Tablo 3.4'te verilen bileşenler karıştırılarak, reaksiyon ürünleri 45 dakika 37°C su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 20 µL kesim ürünü 4 µL yürütme boyası karışımı kuyulara yüklenerek %1 agaroz jelde yürütülmüştür.

Elde edilen kolonilerin ikili enzim kesimi ile doğrulaması yapıldıktan sonra, *XhoI* enzimi ile de tekli kesimi yapıp klon doğrulaması gerçekleştirilmiştir. *XhoI* restriksiyon enzimi ile kesim protokolü Tablo 3.5’te belirtilen oranlarda yapılmıştır.

Tablo 3.5: pCDM4-PhAN9 plazmitinin tekli restriksiyon enzim kesimi (*XhoI*).

pCDM4-PhAN9	Miktar
DNA (1000 ng)	5 µL
rCutsmart Buffer (10X)	2 µL
<i>XhoI</i> (20 U)	1 µL
dH ₂ O	12 µL
Toplam	20 µL

Tablo 3.5’te verilen bileşenler karıştırılarak, reaksiyon ürünleri 45 dakika 37°C su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra her bir kesim ürünü 20 µL olacak şekilde yüklenerek %1 agaroz jelde yürütülmüştür.

3.6.2 PCR ile Klonların Doğrulanması

Restriksiyon enzimleri ile kesim yapılarak klonların doğrulanmasından sonra elde edilen kolonilerin doğrulanması için T7 primerleri ile PCR yapılmıştır. pCDM4+ PhAN9 vektörlerini içeren *E. coli* DH5α hücrelerinde *PhAN9* geninin varlığının doğrulanması için PCR protokolü gerçekleştirilmiştir. PCR çalışmasında klonlama bölgesini sınırlayan T7 primerleri (F-5’-TAATACGACTCACTATAGGG ve R-5’-GCTAGTT ATTGCTCAGCGG) kullanıldı. İntron Taq DNA Polimeraz (Kat. No. 30221847) enzimi ile gerçekleştirilen PCR çalışmasında kullanılan bileşenlerin ayrıntılı içerikleri Tablo 3.6’da sunulmuştur. Kontrol olarak da boş pCDM4 vektörü aynı şekilde T7 primerleri ile çoğaltılmıştır.

Tablo 3.6: PCR Protokolü Bileşenleri.

i-Taq PCR Protocol	Miktar
10 × PCR buffer	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µL
dNTP (200 µM)	2 µL
Plazmit DNA (100 ng) (pCMD4-PhAN9)	1 µL
Forward T7 primer (250 nM)	1 µL
Reverse T7 primer (250 nM)	1 µL
i-Taq DNA	1 µL
dH ₂ O	14 µL
Toplam	25 µL

PCR döngüsü aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.7).

Tablo 3.7: PCR döngü programı.

Program	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	95	5 dakika	-
Denatürasyon	95	30 saniye	×30 döngü
Bağlanma	50	30 saniye	
Uzama	72	1 dakika	
Son Uzama	72	10 dakika	

Elde edilen PCR ürünleri %1 agaroz jele yüklendi (10 µL DNA 2 µl yürütme boyası (loading dye) ile karıştırıldı) ve DNA belirteci (GeneRuler 1Kb Plus) ile 1×TAE tampon ile 80 V' da 40 dakika yürütüldükten sonra, PCR reaksiyonu sonucu elde edilen bantlar belirtece göre kıyaslanarak, beklenen DNA bandını veren koloniler pozitif klon olarak değerlendirilmiştir.

3.7. C3G Rekombinantı ve GST Rekombinantı C3G Üreticisi *E. coli* BL21 (DE3) Hücrelerinin Hazırlanması

Tez çalışmasının amacı, GST geninin (*PhAN9*) C3G üretimine olan etkisinin belirlenmesidir. Bu amaçla C3G rekombinantı hücreler olarak GST genini içermeyen C3G üreticisi hücreler kullanılacaktır.

Tez kapsamında, *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinde C3G üretiminin heterolog olarak gerçekleştirilmesinde kullanılacak olan pETM6-At3GT-PhANS plazmiti (ampisilin direnç geni barındıran), Prof. Dr. Mattheos A. G. Koffas tarafından hediye edilmiştir [117].

GST geni streptomisin direnç genine sahip pCDM4 plazmiti içinde yer aldığından, kültür koşullarının benzer şekilde olabilmesi için C3G rekombinantı hücrelere ayrıca pCDM4 plazmiti eklenmiştir. Özetle, tez kapsamında kullanılan C3G rekombinantı hücreler ve GST rekombinantı hücrelerimiz şu şekildedir.

C3G rekombinantı *E. coli* hücreleri, C3G üreticisi plazmit (pETM6-At3GT-m-PhANS) ve boş pCDM4 plazmitini taşımaktadır.

GST rekombinantı hücreler ise, C3G üreticisi (pETM6-At3GT-m-PhANS) plazmite ek olarak pCDM4-PhAN9 plazmitini taşıyacak şekilde kotransforme edilerek hazırlanmıştır. Kullanılan plazmitler **Şekil 3.1**'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

C3G rekombinantı hücre: E. coli BL21 (DE3) - pETM6-At3GT-m-PhANS + pCDM4

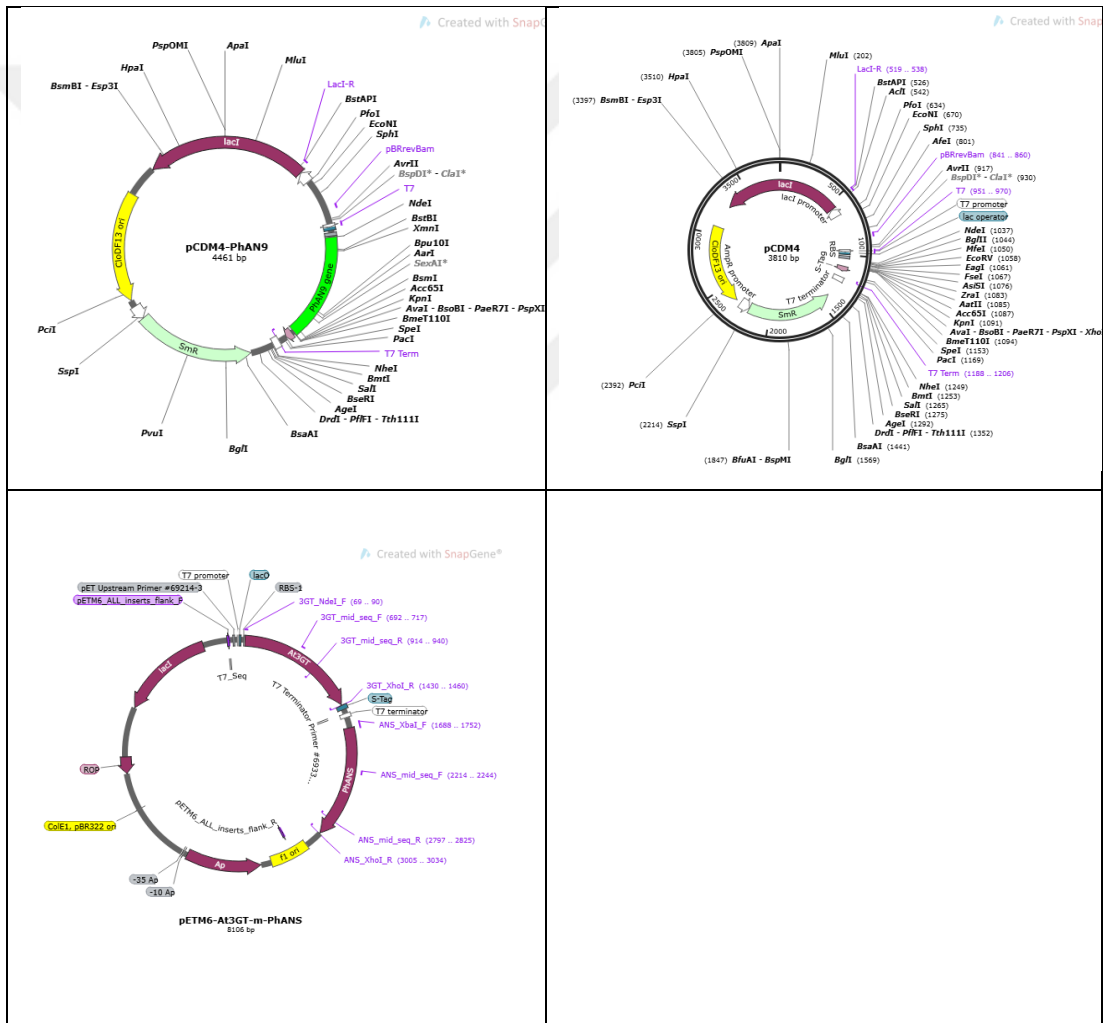
GST rekombinantı hücre: E. coli BL21 (DE3) - pETM6-At3GT-m-PhANS + pCDM4-**PhAN9**

C3G rekombinantı hücreler: pETM6-At3GT-m-PhANS ve pCDM4 plazmitleri, daha önceden hazırlanan kompetan *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine CaCl₂ ısı şoku metodu aktarılmışlardır (Yöntem 3.2). Aktarım sonucu pETM6-At3GT-PhANS ve pCDM4 plazmitini içeren kolonilerin seçilimi için bu hücreler, LB agar + 80 mg/mL ampisilin ve 50 mg/mL streptomisin besiyeri içeren petrilere yayma ekim ile ekildi. Bir gece boyunca 37°C sıcaklıkta inkübasyon sonucu oluşan koloniler, pozitif koloniler olarak kabul edildi.

GST rekombinantı hücreler: *PhAN9* genini taşıyan pCDM4-PhAN9 plazmiti ve siyanidin-3-*O*-glukozit (C3G) üreticisi pETM6-At3GT-m-PhANS plazmitinin ko-transformasyonu, daha önceden hazırlanan kompetan *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine

CaCl₂ ısı şoku metodu ile benzer şekilde gerçekleştirilmiştir. Aktarım sonucu hem pETM6-At3GT-PhANS hem de pCDM4-PhAN9 vektörlerini içeren kolonilerin seçilimi için bu hücreler LB agar + 80 µg/mL ampicilin + 50 µg/mL streptomisin besiyeri içeren petrilere yayma ekim ile ekildi. Bir gece boyunca 37°C sıcaklıkta inkübasyon sonucu oluşan koloniler her iki plazmide de sahip pozitif koloniler olarak kabul edildi.

Hem C3G rekombinantı hücreler hem de GST rekombinantı hücelere ait klonlar daha sonra ilgili antibiyotikleri içeren sıvı LB besiyerinde büyütülüp, gliserol stokları hazırlanarak -20°C ve -80°C’te saklanmıştır.



Şekil 3.1: C3G üretimi için kullanılan plazmitler.

Tablo 3.8: GST genlerinin C3G üreten hücrelere aktarımı.

	Nanodrop ölçümleri	Transformasyon için kullanılan miktar (pCDM4-genler)	Transformasyon PhANS miktarı	Kompetan Hücre Miktarı
PhAN9 5-1	205,4 ng/ µL	1,2 µL	1,7 µL	50 µL
pCDM4-2	125,1 ng/ µL	1,8 µL	1,7 µL	50 µL

3.8. C3G Rekombinantı *E. coli* BL21 (DE3) Hücrelerinin Büyüme Eğrisinin Hazırlanması

GST rekombinantı *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinin -20 °C'ta sıvı stoğundan alınan hücreler öncelikle ampisilin (80 µg/L) ve streptomisin (50 µg/L) içeren LB agar besiyerine ekildi. Daha sonra oluşan tek koloniler, 3 mL LB sıvı besiyeri (80 µg/L ampisilin ve 50 µg/L streptomisin içeren) 15 mL'lik falkon tüplere ekildi. Sıvı kültür, 37 °C'ta 200 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 18 saat büyütüldü. Büyüme eğrisinin hazırlanması için, LB besiyerinde gece boyu büyütülen hücrelerden 200 uL alınarak bu hücreler aynı antibiyotikleri içeren (80 µg/L ampisilin ve 50 µg/L streptomisin) 20 mL AMM besiyerine (100 mL'lik erlen) ekildi ve 37 °C'ta 200 rpm'de çalkalamalı inkübatöre aktarıldı. Her saat başında mikropalakaya 200 µL örnek eklenerek spektrofotometrede hücrelerin OD600 ölçümü yapıldı. Yapılan ölçümler sonucunda büyüme eğrisi grafiği oluşturulmuştur.

3.9. Katekin Substratı, IPTG ve HPLC Çözeltilerinin Hazırlanması

Rekombinant hücrelerde, AMM besiyerinde substrat olarak katekin kullanarak (Şekil 1.2) C3G üretilmiştir. Öncül molekül olarak kullanılan katekin (50g/L) şu şekilde hazırlanmıştır: Ticari olarak alınan katekin [(+) Catechin Hydrate] 500 mg hassas terazide tartıldıktan sonra, 10 mL DMF: Etanol (8:2) ile çözündürülmüş ve 1.5 ml'lik eppendorf tüplere 1 mL olacak şekilde dağıtılarak kullanıma kadar -20 °C' ta muhafaza edilmiştir.

C3G üretiminde, hücrelerin uyarımı için kullanılacak olan IPTG son konsantrasyonu (50 mM) olacak şekilde aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır: 0.12 g IPTG 10 mL ampul

suda çözdürölüp filtre sterilizasyonu yapıldı. 1.5 ml'lik eppendorflara 1 mL olacak şekilde ayrılarak -20 °C' ta kullanıma kadar muhafaza edilmiştir.

HPLC analizinde kullanılacak Solvent A ve Solvent B aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

Solvent A: %1 formik asit içeren asetonitril çözeltisi için 1 ml formik asit ölçölüp sonrasında asetonitril ile hacmi 1000 mL'e tamamlandı.

Solvent B: %1 formik asit içeren ultra saf su çözeltisi için 1 ml formik asit ölçölüp sonrasında ultra saf su ile hacmi 1000 mL'e tamamlandı.

3.10. Siyanidin 3-O-Glukozit (C3G) Üretimi için Kültür Şartlarının Optimize Edilmesi

C3G rekombinantı ve GST rekombinantı *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinde C3G üretiminin optimizasyonu için tez kapsamında AMM besiyeri kullanılmıştır. Bu amaçla, -20°C stoklarından ilgili hücreler öncelikle gerekli antibiyotikleri içeren (80µg/L ampicilin ve 50 µg /L streptomisin içeren) LB besiyerinde, 175 rpm ön kültüre alınmışlardır. 16 saat inkübasyonun sonunda, 5 mL derinliğinde 48 kuyucuklu plakalara (VWR) 1 mL AMM besiyeri eklenip gece boyu büyüyen kültürler inoküle edilmiştir. Plakalar steril kültür kapakları ile kapatılmışlardır (VWR 60941-086). Kültürler öncelikle yaklaşık 3.5 saat, 37°C'ta büyütölmesinin ardından, IPTG uyarımı ve katekin substratının eklenmesinin ardından ekspresyon için hücreler 30 °C' ta 225 rpm'de inkübasyona alındı. Kültürün farklı zaman aralıklarında örnekler toplanıp, HPLC analizi için şu şekilde hazırlanmıştır: Bu bağlamda, büyüyen kültürlerden örnekler alınırken 50 µL kültür üzerine eşit hacimde 50 µL metanol-HCl (MeOH:HCl - 100:1) eklenmiştir. Örnekler vortekslendikten sonra 15 dakika 4000 rpm santrifüj edilip üst sıvı steril eppendorfa aktarılarak HPLC analizine alınmıştır.

Tez kapsamında yapılan optimizasyon denemeleri şu şekildedir:

-Farklı inokulum oranları kültürden (%0,5 inokulum- 5 µL, %1 i inokulum – 10 µL, %2,5 inokulum – 25 µL, %5 inokulum – 50 µL, %7,5 inokulum - 75 µL)

-Farklı IPTG uyarım zamanları (3.5h, 4.5h, 5.5.h)

- Farklı IPTG konsantrasyonları (50 μ M – 1 μ L, 100 μ M – 2 uL, 500 μ M – 10 μ L, 1000 μ M – 20 μ L)
- Farklı glukoz konsantrasyonları (%2 ve %4 glukoz)
- Farklı sükroz konsantrasyonları (%2 ve %4 sükroz)
- Farklı örnek toplama zamanları (18h, 21h, 24h)
- Farklı nitrojen kaynakları (CA: kasaminoasit (2 g/L – 4g/L), CA + pepton 2 g/L, maya ekstraktı 2 g/L)

3.11. HPLC Analizi

Kültür periyodu sonunda kültürler, eşit hacimde MeOH:HCl (100:1) ile karıştırılarak 4000 rpm’de 15 dakika santrifüjlendikten sonra, süpernatantlar eppendorf tüplere aktarıldı. HPLC analizi için 1.5 mL’lik HPLC vialları içerisine öncelikle insertler (İsolab I.097.05.111.100) yerleştirildi. Eppendorfa aktarılan (C3G içeren) örneklerden 20 uL alınıp vial içerisinde bulunan insertlere aktarıldı.

HPLC analizi için Zorbax SB-C18, 5 μ m, 4,6 $\times$ 150 mm kolon kullanılmış, 0.5 mL/min akış hızında 520 nm’de ölçüm gerçekleştirilmiştir. HPLC analizinde, mobil faz olarak Solvent A (%0,1 formik asit içeren asetonitril) ve Solvent B (%0,1 formik asit içeren ultra saf su) kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 35°C’de sabit tutuldu. Mobil fazların akış hızı 0.5 mL/dakika olarak kullanılmıştır. 30 dk’lık HPLC yürütme metodu şu şekildedir (Tablo 3.9) [122].

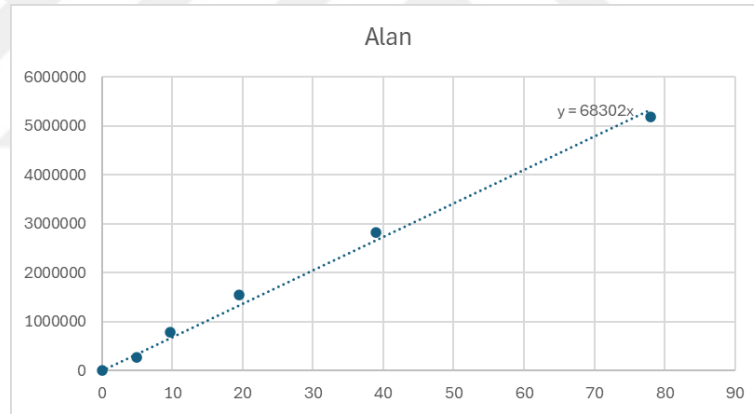
Tablo 3.9: C3G analizinde kullanılan HPLC programı.

Dakika	Solvent A	Solvent B
0-3 dk	%10	%90
3-20 dk	%35	%65
20-21 dk	%70	%30
21-27 dk	%100	%0
27-30 dk	%10	%90

3.12. HPLC C3G Standardı Hazırlama

GLPBİO'dan temin edilen siyanidin-3-O-glucoside chloride ilk olarak DMSO (saf) içerisinde çözündürüldü. 5 mg C3G, 1 mL DMSO içerisinde çözündürülerek konsantrasyonu 5000 mg/L'ye getirildi. Standartları hazırlamak için DMSO'da çözündürülen C3G'nin daha sonra MeOH:HCl (100:1) ile seri dilüsyonu yapıldı ve sırasıyla 2500 mg/L, 1250 mg/L, 625 mg/L, 312.5 mg/L, 156 mg/L, 78 mg/L, 39 mg/L, 19,5 mg/L, 9.75 mg/L, 4,875 mg/L konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı. Hazırlanan standartlar kullanıma kadar -20°C'ta saklandı.

Konsantrasyon tayini için 5 farklı konsantrasyonda (4.875 mg/L, 9.75 mg/L, 19.5 mg/L, 39 mg/L ve 78 mg/L) hazırlanan C3G'nin HPLC analizi sonucunda hazırlanan kalibrasyon eğrisi GST rekombinantı ve C3G rekombinantı hücrelerdeki C3G analizinde kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Miktar tayini için Siyanidin 3-O-glukozitin 5 farklı konsantrasyonu kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

3.13. Hücre Kültüründen Elde Edilen C3G'nin UV-VİS Karakterizasyonu

UV-VIS karakterizasyonları, 1 nm aralıklarla ve 420-650 nm arasında ölçülerek maksimum ışık absorpsiyonu (λ_{max}) C3G ile karşılaştırılarak belirlendi. Bunun için 96 kuyucuklu plaka ve mikroplaka okuyuculu spektrofotometre kullanıldı. Her bir molekülden 200 μ L 2'şer tekrarlı olacak şekilde 96 kuyucuklu plakanın kuyucuklarına aktarıldı ve plaka okuyucu spektrofotometrede belirtilen dalga boyları arası absorbans

değerleri alındı. Bu okumalar sonrası her bir molekül için dalgaboyu-absorbans grafikleri oluşturuldu.

C3G pigmentinin maksimum ışık absorpsiyonunun (λ_{max}) belirlenebilmesi için UV-Vis spektrofotometrisi yapılmıştır. C3G rekombinantı hücreler ve GST rekombinantı *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinde C3G üretiminin optimizasyonu için AMM besiyeri kullanılmıştır. Bu amaçla, -20°C stoklarından ilgili hücreler öncelikle gerekli antibiyotikleri içeren LB besiyerinde 175 rpm ön kültüre alınmışlardır. 16 saat inkübasyonun sonunda, 5 mL derinliğinde 48 kuyucuklu plakalara (VWR) 1 mL AMM medium eklenip gece boyu büyüyen kültürler inoküle edilmiştir. Plakalar steril kültür kapakları ile kapatılmışlardır (VWR 60941-086). Kültürler öncelikle yaklaşık 3,5h 37°C'ta büyütülmesinin ardından, IPTG uyarımı ve katekin substratının eklenmesinin ardından ekspresyon için hücreler 30 °C' ta 225 rpm'de inkübasyona alındı. 24 saat sonucunda 100 µL kültüre 100 µL MeOH:HCl (100:1) eklenip vorteks yapıldı. 15 dakika 4000 rpm santrifüj edilip 200 µL üst sıvı, spektrofotometrik analiz için mikropalakaya eklendi. UV-Vis ölçümü 1 nm dalgaboyu aralıklarıyla 420 nm-650 nm arasında yapıldı ve dalgaboyu-absorbans grafiği elde edilmiştir.

3.14. Agaroz Jel Elektroforezi

Yapılan kesimden elde edilen DNA'nın tespiti için agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır. Jelin hazırlanması için 30 mL 1× TAE tamponuna 0.3 g agaroz eklenerek mikrodalga fırında 5 dakika boyunca eritilmiştir. Eritilme süresince belirli aralıklarda mikrodalga fırın açılarak karışım çalkalanmıştır. Eritilen agaroz solüsyonu bir miktar soğuduktan sonra içine 3 µL RedSafe (fluoresan DNA boyası) eklenmiş ve bu karışım tarakla desteklenmiş bir elektroforez tankına dökülmüş, ardından 20 dakika boyunca jelin donması beklenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Glutasyon Transferaz Geni *PhAN9*'un Klonlanması ve Transformasyonu

pUC57 plazmiti içinde yer alan *PhAN9* GST geninin ekspresyon vektörüne klonlanması için yapılan çalışmalara ait bulgular aşağıda sunulmuştur.

4.1.1. pUC57-*PhAN9* içeren *E. coli* DH5 α Hücrelerinin Plazmit İzolasyon Sonucu

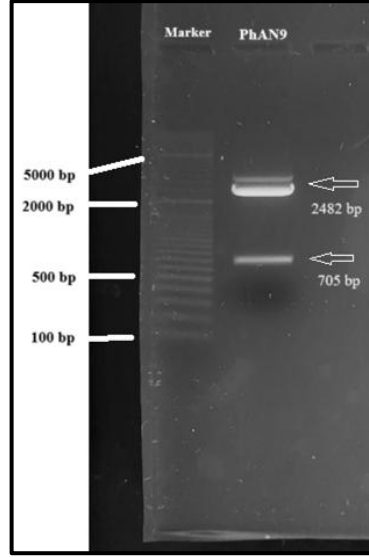
pUC57 vektörü içerisinde yer alan *PhAN9* hücreleri *E. coli* DH5 α hücrelerine transforme edildikten sonra, bu plazmitlerin izolasyonu Monarch® Plasmid Miniprep kiti kullanılarak başarıyla gerçekleştirilmiştir. Plazmit izolasyonu sonunda elde edilen plazmitlerin nanodrop ölçüm sonuçları (plazmit DNA konsantrasyonları ve nükleik asit saflığını belirten A260/A280) Tablo 4.1.'de sunulmuştur.

Tablo 4.1: pUC57-*PhAN9* içeren *E. coli* DH5 α Hücrelerinin Plazmit İzolasyonuna ait nanodrop ölçüm sonuçları.

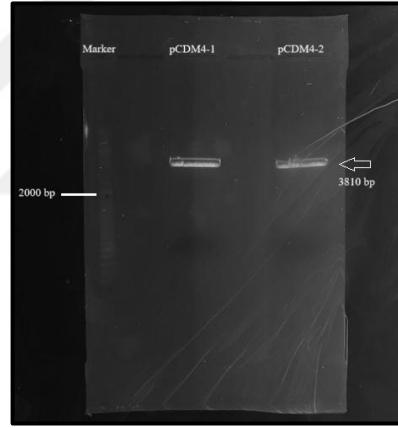
Gen isimleri	Nanodrop ölçümleri	A260/A280
<i>PhAN9</i>	278,6 ng/ μ L	1,82
pCDM4-1	128,9 ng/ μ L	1,80
pCDM4-2	135,1 ng/ μ L	1,83

4.1.2. *PhAN9* geninin pCDM4 plazmitine klonlanması

pUC57 vektörü içerisinde yer alan *PhAN9* geninin, pCDM4 ekspresyon vektörüne klonlanması için pUC57-*PhAN9* plazmiti ve boş pCDM4 vektörü *Nde*I ve *Kpn*I-HF enzimleri ile kesilmiştir. pUC57-*PhAN9* plazmitinin *Nde*I ve *Kpn*I enzimleri ile kesimine ait agaroz jel görüntüsü **Şekil 4.1**'de verilmiştir. *E. coli* DH5 α hücre içerisinde bulunan boş pCDM4 vektörünün *Nde*I ve *Kpn*I enzimleri ile kesimine ait agaroz jel görüntüsü **Şekil 4.2**'de verilmiştir.



Şekil 4.1: *E. coli* DH5 α hücrelerinden elde edilen pUC57-*PhAN9* plazmitlerinin *Nde*I ve *Kpn*I ile kesim sonucunun %1'lik agaroz jel analizi. *PhAN9*:pUC57-*PhAN9* plazmiti) (Marker: 100 bp + 500 bp DNA ladder Thermo scientific, O'RangeRuler).



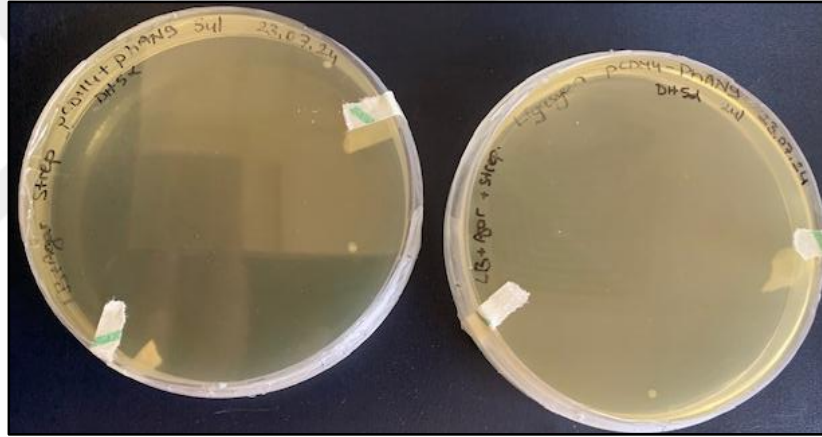
Şekil 4.2: *E. coli* DH5 α hücrelerinden elde edilen pCDM4 plazmitlerinin *Nde*I ve *Kpn*I enzim kesim sonucu jel analizi. Marker: DNA belirteci (Marker: 100 bp + 500 bp DNA ladder Thermo scientific, O'RangeRuler), pCDM4-1 / pCDM4-2: pCDM4 plazmiti.

pUC57-*PhAN9* plazmiti ve boş pCDM4 vektörü *Nde*I ve *Kpn*I enzim kesiminden sonra jel yürütülmüş ve jellerden *PhAN9* geni **Şekil 4. 1**'de altta gösterilen bant) ve boş pCDM4 (kesilmiş) plazmitleri, Monarch DNA Gel Extraction kiti jelden izole edilmiş ve nanodrop ile DNA konsantrasyonları belirtilmiştir (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2: *PhAN9* geni ve pCDM4 plazmitinin agaroz jelden izolasyonu ile elde edilen DNA konsantrasyonları.

Gen ya da plazmit adı	DNA konsantrasyonu
<i>PhAN9</i>	10 ng/ μ L
pCDM4-1	29 ng/ μ L
pCDM4-2	28 ng/ μ L

Jelden izolasyonun ardından, birbirini tamamlayan kesim noktalarına sahip lineer pCDM4 vektörü ve *PhAN9* geni ligasyon için kullanılmış ve ligasyon ürünleri (pCDM4-*PhAN9* olarak isimlendirilen plazmit) kompetan *E. coli* DH5 α hücreleri içine ısı şoku metodu ile aktararak, LB + 50 μ g/mL streptomisin besiyerine ekilmiştir. Transformasyon işleminin ardından toplamda 3 koloni elde edilmiştir (**Şekil 4.3**)



Şekil 4.3: *E. coli* DH5 α hücrelerinin pCDM4-*PhAN9* ile transformasyonu sonucunda, LB + 50 μ g/mL streptomisin besiyerinde elde edilen koloniler.

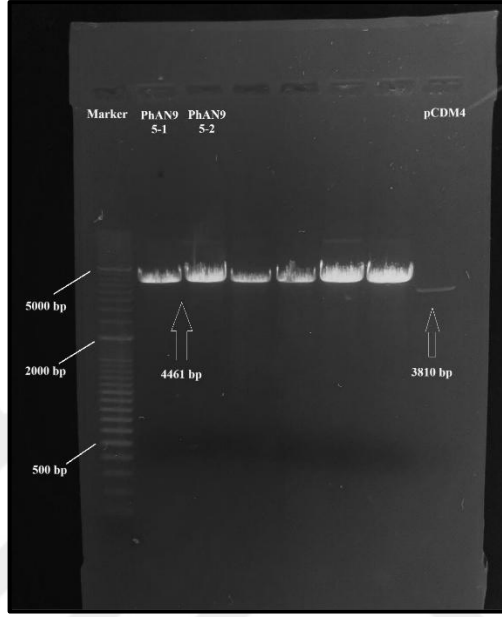
4.2. pCDM4-*PhAN9* Klonlarının Moleküler Doğrulanması

Transformasyon işleminin ardından elde edilen koloniler sıvı besiyerinde büyütülerek (pCDM4-*PhAN9* plazmitini içeren *E. coli* DH5 α hücreleri) kit ile plazmit izolasyonu yapılarak yaklaşık 205 ng/ μ L plazmit elde edilmiştir.

Elde edilen plazmitler daha sonra moleküler klonlamanın doğrulanması için kullanılmıştır. Klonların doğrulanması için tekli restriksiyon enzim kesimi, ikili restriksiyon enzim kesimi ve koloni PCR ile doğrulama yapılmıştır.

4.2.1. *XhoI* restriksiyon enzim kesimi ile klonların doğrulanması

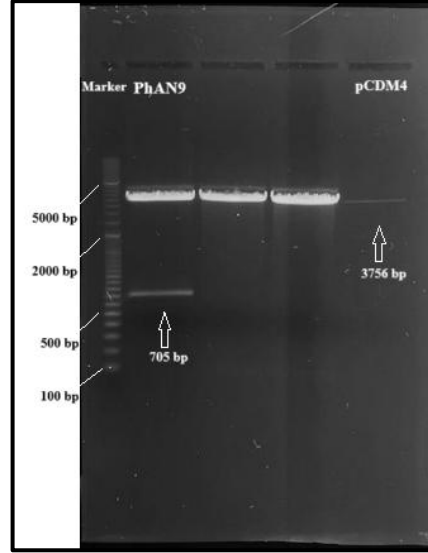
XhoI enzimi ile kesim sonucunda 4461 bp boyutunda bant elde edilerek *PhAN9* geninin pCDM4 plazmitine klonladığı doğrulanmıştır (Şekil 4.4). pCDM4 plazmitinin kesimi ile ise 3810 bp boyutunda bat elde edilmiştir.



Şekil 4.4: *XhoI* ile enzim kesimi ile doğrulama (Marker: O'RangeRuler 100 bp+500 bp DNA Ladder ready-to-use, *PhAN9* 5-1/ 5-2: pCDM4 vektörüne klonlanan *PhAN9* genini içeren tahmini klon, pCDM4: Boş pCDM4 vektörünü içeren plazmit).

4.2.2. *KpnI* ve *NdeI* restriksiyon enzim kesimi ile klonların doğrulanması

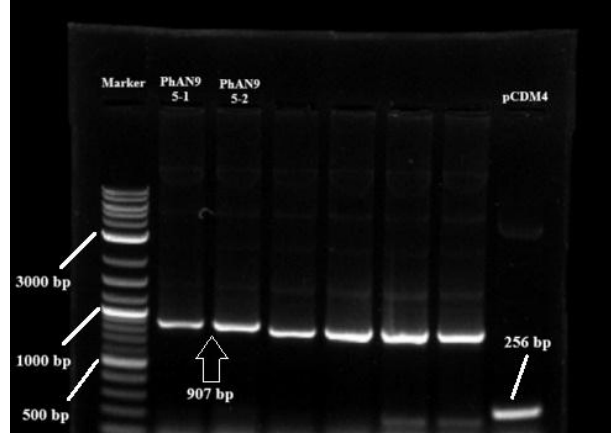
NdeI ve *KpnI* enzimleri ile kesim sonucunda 3756 bp ve 705 bp (*PhAN9*'u içeren) boyutlarında beklenen bantlar *PhAN9* geninin pCDM4 plazmitine klonlandığı doğruladı (Şekil 4.5). pCDM4 plazmitinin kesimi ile ise 3756 bp boyutunda bant elde edilmiştir (54 bp'lik ikinci bant jel dışında kalmıştır).



Şekil 4.5: *NdeI* ve *KpnI* enzim kesimi ile klonların doğrulanması (Marker: O'RangeRuler 100 bp+500 bp DNA Ladder ready-to-use) *PhAN9* 5-1: *pCDM4* vektörüne klonlanan *PhAN9* genini içeren tahmini klon, *pCDM4*: Boş *pCDM4* vektörünü içeren plazmit).

4.2.3. PCR ile klonların doğrulanması:

Klonların doğrulanması için ayrıca T7 primerleri kullanılarak PCR ile doğrulama yapılmıştır. İlgili PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen DNA'lar agaroz jelde görüntülenerek bant büyüklükleri belirlenmiştir. **Şekil 4.6'**ta görüldüğü üzere, PCR reaksiyonu sonucunda beklenen bant büyüklükleri (GST rekombinant hücrelerde *PhAN9* genini için 907 bp'lik bant ve kontrol amacıyla kullanılan boş *pCDM4* vektöründen beklenen 256 bp boyutunda bant) agaroz jelde elde edilerek klonların doğrulanması tamamlanmıştır.



Şekil 4.6: PCR ile klon tayini (Marker: 1 kb plus DNA ladder NEB, PhAN9 5-1/ 5-2: GST rekombinant hücrelerde *PhAN9* genini içeren tahmini klon, pCDM4: kontrol amacıyla kullanılan boş pCDM4 vektörü).

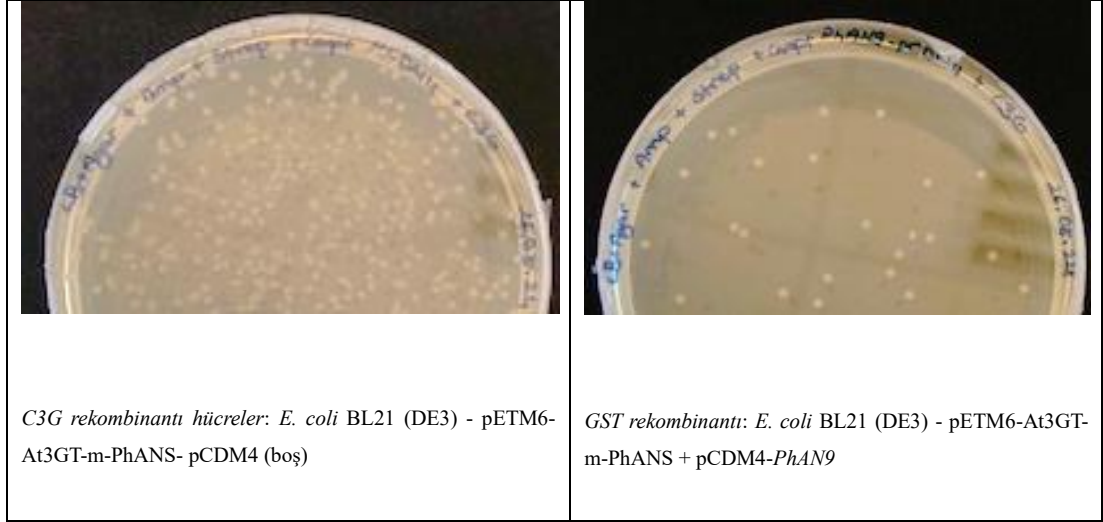
4.3. C3G Rekombinantı ve GST Rekombinantı Hücrelerin *E.coli* BL21 (DE3) Hücrelerine Transformasyonu

Tez kapsamında, C3G üreticisi hücreler olarak iki grup hücre hazırlanmıştır.

C3G rekombinantı hücreler: *E. coli* BL21 (DE3) - pETM6-At3GT-m-PhANS-pCDM4 (boş)

GST rekombinantı hücreler: *E. coli* BL21 (DE3) - pETM6-At3GT-m-PhANS + pCDM4-*PhAN9*

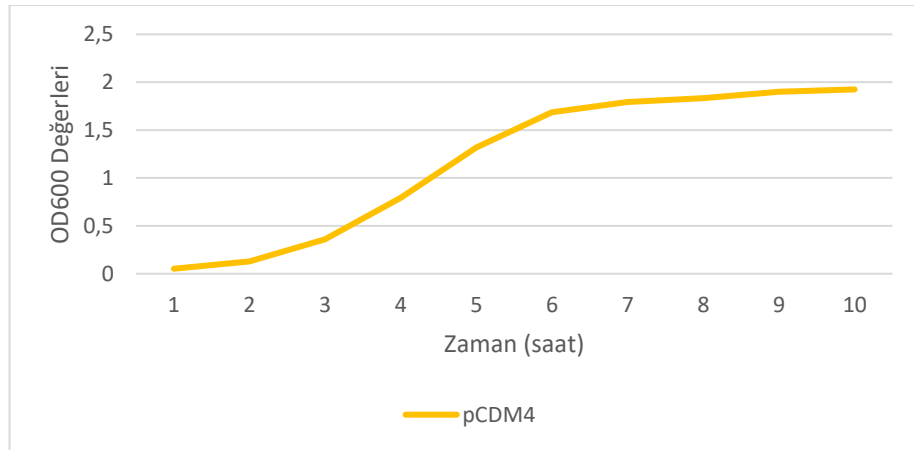
C3G rekombinantı hücreler ve GST rekombinantı hücreleri hazırlamak için ilgili plazmitler ayrı ayrı *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine transforme edildikten sonra LB agar + 80 µg/mL ampicilin + 50 µg/mL streptomisin besiyeri içeren petrilerde inkübe edilmiştir. Her iki antibiyotiği de içeren besiyerinde büyüeyebilen kolonilerin her iki hücre grubunda da ilgili plazmitleri taşıdığı doğrulanmıştır (Şekil 4.7).



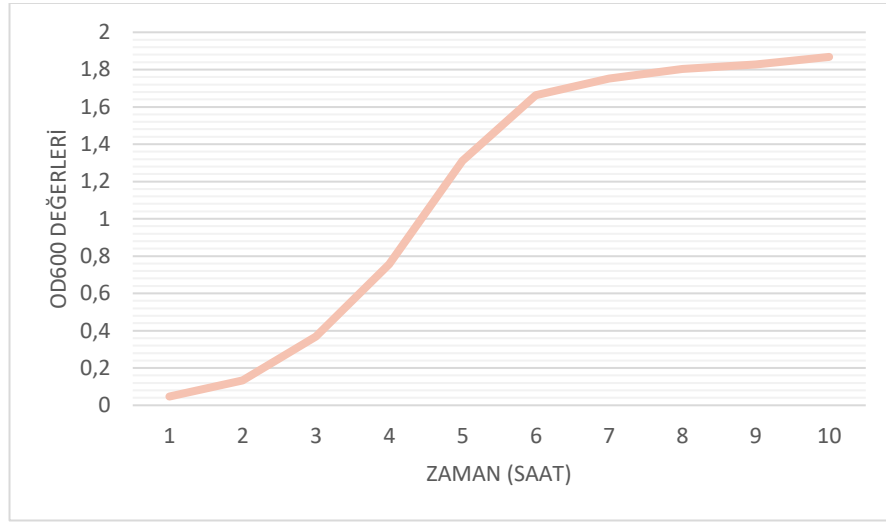
Şekil 4.7: C3G rekombinantı hücreler ve GST rekombinantı hücrelerin, *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinin transformasyonu sonucu elde edilen koloniler.

4.4. C3G Üreticisi *E.coli* BL21 (DE3) Hücrelerinin Büyüme Eğrisi

C3G üretiminin optimizasyonu öncesinde ilk olarak, C3G üreticisi C3G rekombinantı hücreler ve GST rekombinantı *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinin büyüme grafiği hazırlanmıştır. Bu amaçla, hücreler 80 µg/mL ampisilin + 50 µg/mL streptomisin içeren AMM besiyerinde büyütülerek, 10 saat boyunca her saat başında spektrofotometrede OD600 ölçümleri alınarak büyümeleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.8 - Şekil 4.9). Elde edilen sonuçlar *PhAN9* genini içeren GST rekombinantı (*PhAN9*) hücrelerin 3. saatten sonra logaritmik fazda olduğu, 7. saat sonrasında durağan faza geçmeye başladığını göstermektedir.



Şekil 4.8: C3G rekombinantı *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinin büyüme Eğrisi.



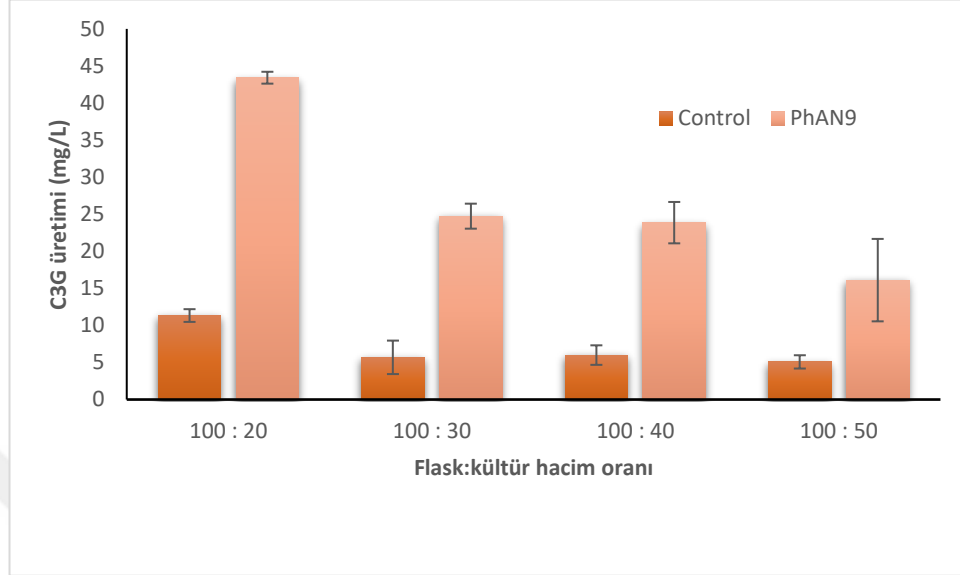
Şekil 4.9: GST rekombinantı (*PhAN9*) *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinin büyüme Eğrisi.

4.5 Siyanidin 3-O-Glukozit (C3G) Üretimi için Kültür Şartlarının Optimize Edilmesi

4.5.1. Havalandırma Oranının C3G Üretimine Etkisi

Havalandırma oranının C3G üretimi üzerindeki etkisinin belirlenmesi için, C3G rekombinantı ve GST rekombinantı (*PhAN9*) hücreler farklı havalandırma oranlarında AMM besiyerinde kültüre alınmıştır. Bu amaçla, 5 mL'lik 48 kuyucuklu plakalar içerisine, flask:kültür hacim oranı 100:20, 100:30, 100:40, 100:50 olması için sırasıyla 1 mL, 1,5 mL, 2 mL veya 2.5 mL olacak şekilde AMM besiyeri eklenmiştir. %2.5 oranında hücre inokülasyonunun ardından, hücreler 3.5 saat büyütüldükten sonra, substrat olarak 1 g/L katekin eklenmiş ve 0.05 mM IPTG ile uyarımı yapılarak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, hücreler çöktürülerek üst sıvı toplanmış ve eşit hacimde MeOH:HCl (100:1) ile karıştırılarak, C3G konsantrasyonları HPLC analizi ile tayin edilmiştir (Şekil 4.10). En yüksek C3G üretimi hem C3G rekombinantı hücreler hem de GST rekombinantı hücreler flask:kültür hacim oranı 100:20 yani havalandırma oranı %80 olduğunda elde edilmiştir. Belirtilen havalandırma oranında, C3G rekombinantı hücrelerde 11.32 mg/L C3G ve GST rekombinantı hücrelerde 43.41 mg/L C3G elde edilmiştir. En düşük C3G oranı ise (C3G rekombinantı hücrelerde 5.07 mg/L ve GST rekombinantı hücrelerde 16.1 mg/L) flask:kültür hacim oranı 100:50 yani havalandırma oranı %50 olduğunda elde edilmiştir (Şekil 4.10).

Elde edilen sonuçlara göre, en iyi C3G üretimi ile sonuçlanan 100:20 flask:kültür hacim oranı yani %80 havalandırma ile optimizasyon denemelerine devam edilmiştir.

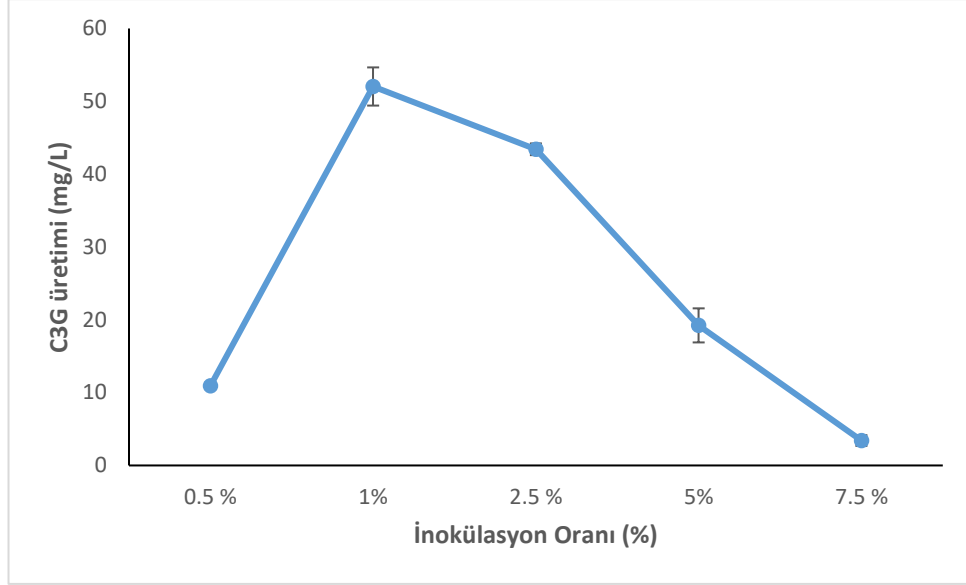


Şekil 4.10: C3G rekombinantı hücreler ve GST rekombinantı (*PhAN9*) hücrelerde havalandırma oranının C3G üretimine etkisi.

4.5.2. C3G Üretiminin Arttırılmasında Kültürlerin İnokülasyon Oranının Etkisi

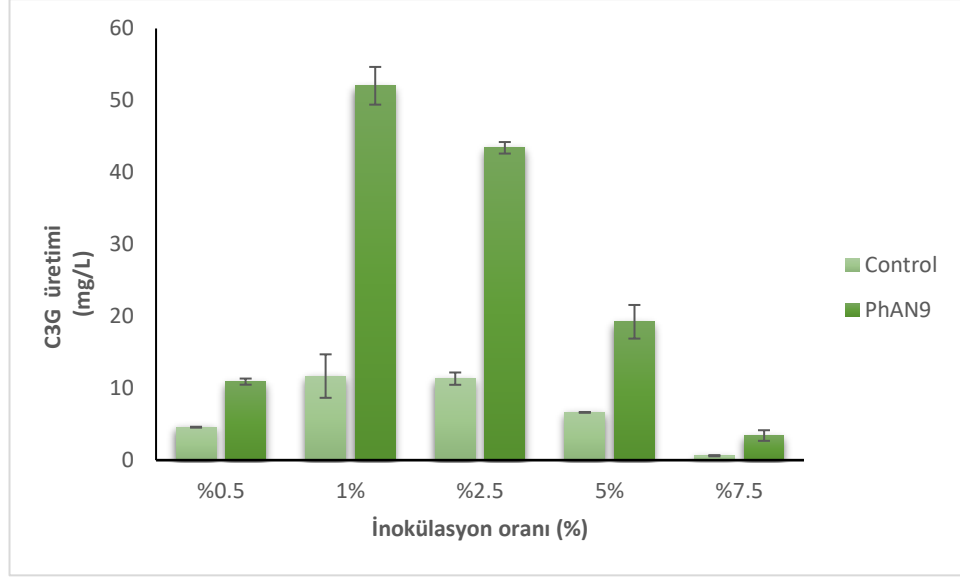
C3G rekombinantı hücreler ve GST rekombinantı (*PhAN9*) hücrelerde, C3G üretiminin optimizasyonu için bakteri kültürlerinin inokulum miktar (aşılama oranlarının) etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, 80 µg/mL ampisilin + 50 µg/mL streptomisin içeren AMM besiyerine hücreler % 0.5, % 1, %2.5, % 5 veya % 7.5 oranında inoküle edilmiştir. Hücreler 3.5 saat büyütüldükten sonra, substrat olarak 1 g/L katekin eklenmiş ve 0.05 mM IPTG ile uyarımı yapılarak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, hücreler çöktürülerek üst sıvı toplanmış ve eşit hacimde MeOH:HCl (100:1) ile karıştırılarak, C3G konsantrasyonları HPLC analizi ile tayin edilmiştir (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12).

Şekil 4.10'da gösterildiği gibi, en yüksek C3G üretimi GST rekombinantı (*PhAN9*) hücrelerde %1 inokulum oranında (52.03 mg/L) elde edilirken, ikinci en yüksek C3G üretimi %2.5 inokulum (43.41 mg/L) oranı ile sağlanmıştır. En düşük C3G üretimi ise %7.5 inokulum ile başlatılan kültürde gerçekleşmiştir.



Şekil 4.11: GST rekombinantı (*PhAN9*) hücrelerde farklı inokulum oranlarının C3G üretimine etkisi.

Şekil 4.12’de ise C3G üretiminin, C3G rekombinantı hücreler ile karşılaştırılmasına ait veriler sunulmuştur. C3G rekombinantı hücrelerde, artan inokulum değerlerinde (%1 veya %2.5) C3G üretiminin görece arttığı ancak daha yüksek inokulum denemelerinde bu oranın azaldığı belirlenmiştir. C3G rekombinantı hücreler ve GST rekombinantı (*PhAN9*) hücreler karşılaştırıldığında, C3G rekombinantı hücrelere kıyasla GST genini içeren GST rekombinantı (*PhAN9*) hücrelerde C3G üretiminin %1 inokulum için 4.45 kat arttığı, %2.5 inokulumda ise 3.83 kat arttığı belirlenmiştir. C3G rekombinantı hücrelerde %1 inokulumda 11.68 mg/L C3G üretimi sağlanırken, GST içeren hücrelerde 52.03 mg/L C3G üretimi elde edilmiştir. İnokülasyon demelerinde en düşük C3G üretimi ise %7.5 inokulumda C3G rekombinantı hücreler ve deney grubunda sırasıyla; 0.61 mg/L, 3.41 mg/L olarak elde edilmiştir.

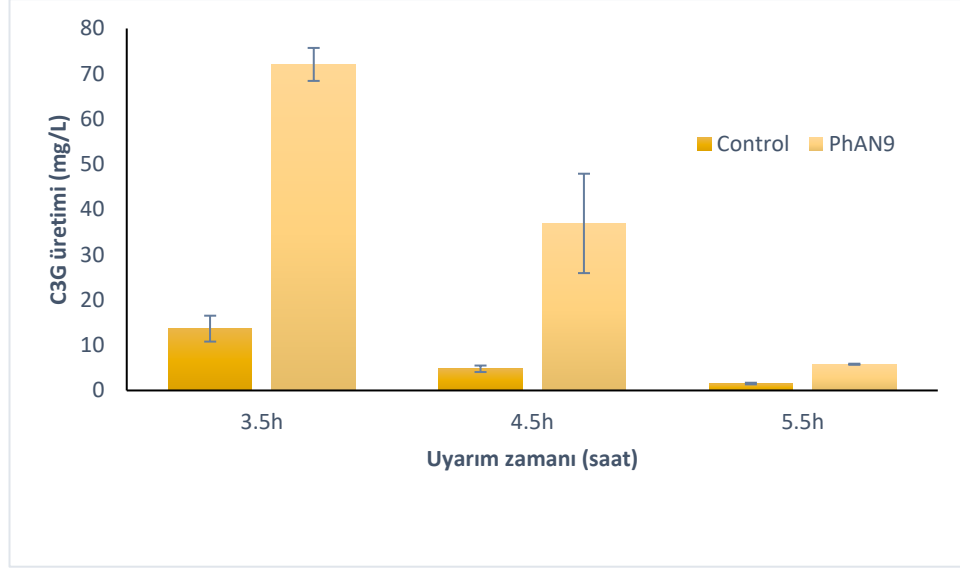


Şekil 4.12: C3G rekombinantı hücreler ve GST rekombinantı (*PhAN9*) hücrelerde farklı inokulum oranlarının C3G üretimine etkisi.

4.5.3. Farklı IPTG Uyarım Zamanlarının (post-indüksiyon) C3G Üretimine Etkisi

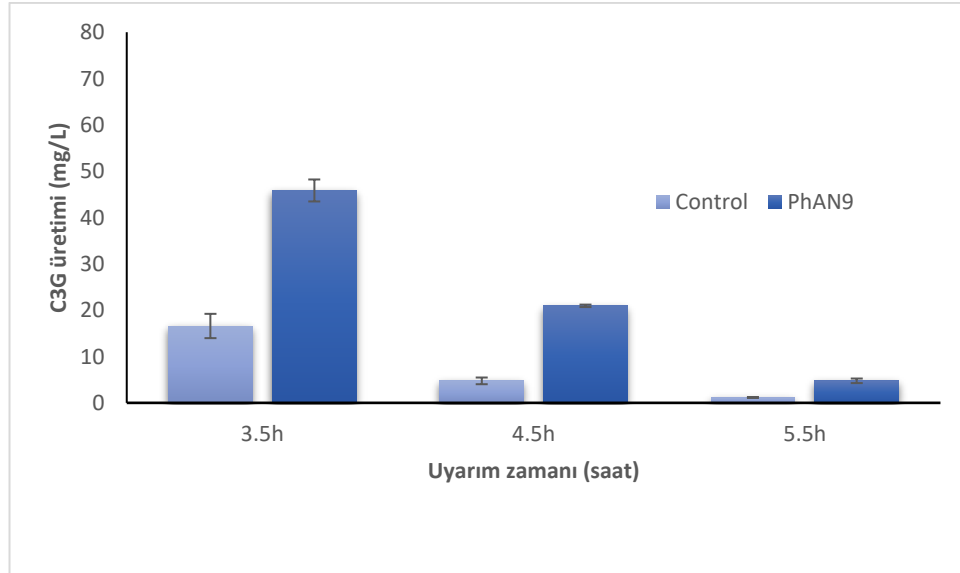
C3G üretiminin optimizasyonunda, IPTG uyarım saatini belirlemek için yapılan çalışmada büyüme eğrisi grafiği (Şekil 4.9) göz önünde bulundurularak, hücreler AMM besiyerine %2.5 inokulum oranında ekilip büyütüldükten sonra 3.5 4.5 ve 5.5 saat sonra IPTG ile uyarılmışlardır. IPTG uyarımı için 0.05 mM ve 0.1 mM olmak üzere 2 farklı konsantrasyon kullanılmıştır. Uyarımın ardından hücreler, 24 saat inkübe edilip sonrasında çöktürülerek üst sıvı toplanmış ve eşit hacimde MeOH:HCl (100:1) ile karıştırılarak, C3G konsantrasyonları HPLC analizi ile tayin edilmiştir (Şekil 4.13 ve 4.14).

Şekil 4.13'te gösterildiği üzere, en yüksek C3G üretimi GST rekombinantı (*PhAN9*) hücrelerde 3.5 saatte 0.05 mM IPTG uyarımı yapılan kültürlerde 72.06 mg/L olarak belirlenmiştir. 4.5 saat ve 5.5 saatteki üretim sırasıyla, 36.92 mg/L ve 5.79 mg/L olarak belirlenmiştir. C3G rekombinantı hücrelerde elde edilen en yüksek C3G üretimi 3.5 saatte uyarılan hücrelerde 13.6 mg/L olarak belirlenmiştir. GST rekombinantı(*PhAN9*) bu hücrelerde C3G rekombinantı hücrelere görece neredeyse 5 katlık bir artış belirlenmiştir.



Şekil 4.13: Farklı IPTG (0.05 mM) uyarım saatlerinin (3.5h, 4.5h, 5.5h) C3G üretimi üzerindeki etkisi.

IPTG uyarım zamanları 0.1 mM IPTG oranı ile gerçekleştirildiğinde benzer şekilde en yüksek C3G üretim oranı (45.84 mg/L) 3.5 saat sonra uyarılan GST rekombinantı (*PhAN9*) hücrelerde gerçekleşmiştir (**Şekil 4.14**). Daha ileri uyarım zamanlarında ise C3G üretimini keskin bir şekilde düşüş göstermiştir (4.5h uyarımda 20.93 mg/L ve 5.5.h uyarımda 5.75 mg/L C3G elde edilmiştir).



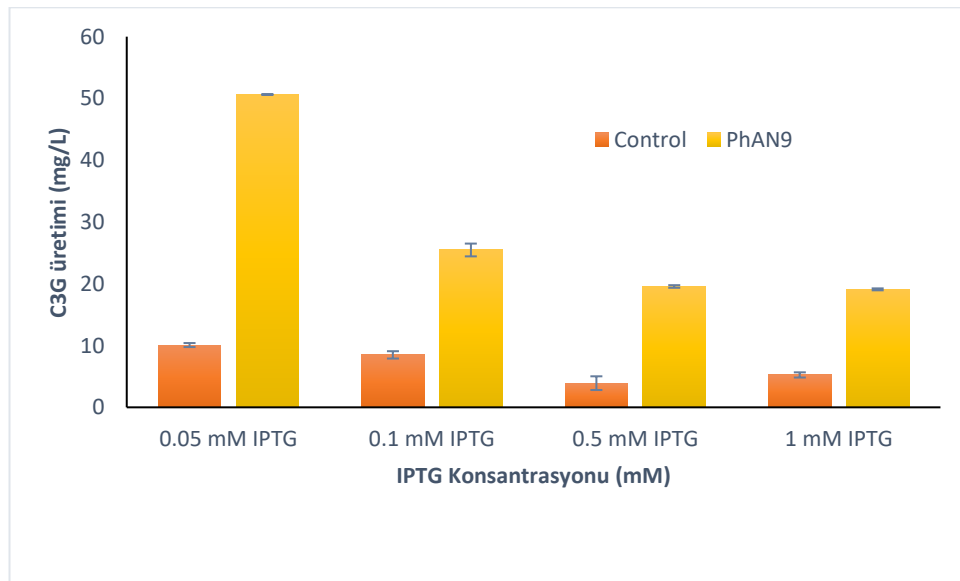
Şekil 4.14: Farklı IPTG (0.1 mM) uyarım saatlerinin (3.5h, 4.5h, 5.5h) C3G üretimi üzerindeki etkisi.

Elde edilen sonuçlara göre, en iyi C3G üretimi ile sonuçlanan IPTG uyarım zamanı 3.5h ile optimizasyon denemelerinin devam edilmesine karar verilmiştir.

4.5.4. Farklı IPTG konsantrasyonlarının C3G üretimine etkisi

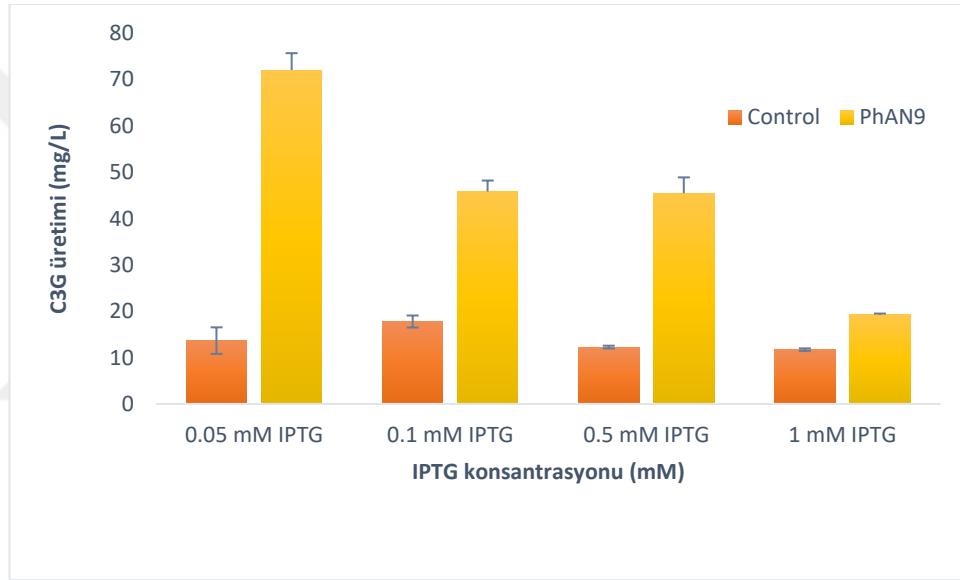
Bulgular 4.5.2.'de gösterildiği üzere, %1 ve %2.5 inokulum oranlarında daha yüksek C3G üretimi elde edildiği için, farklı IPTG konsantrasyonlarının C3G üretimindeki etkisi hem %1 inokulum hem de %2.5 inokulum oranında denenmiştir. Bu amaçla, farklı oranlarda inoküle edilen hücreler %2 glukoz içeren AMM besiyerinde kültüre alınarak 3.5h sonra farklı IPTG konsantrasyonlarında (0.05 mM, 0.1 mM, 0.5 mM ve 1 mM) uyarımları yapılmıştır. İnkübasyon periyodunun (24 saat) ardından kültür örnekleri toplanıp HPLC analizi yapılarak C3G konsantrasyonları belirlenmiştir.

Şekil 4.15 %1 inokulum oranında C3G rekombinantı hücreler ve GST rekombinantı hücreleri (*PhAN9*) hücrelerin farklı IPTG konsantrasyonları ile uyarımları sonucunda elde edilen C3G üretim oranlarını göstermektedir. Elde edilen veriler, en yüksek C3G üretiminin 0.05 mM IPTG ile uyarım sonucunda GST rekombinantı hücrelerinde (50.6 mg/L) ve C3G rekombinantı hücrelerde ise (10.08 mg/L) olduğunu göstermiştir. Artan IPTG konsantrasyonları daha düşük C3G üretimi ile sonuçlanmıştır. C3G rekombinantı hücreler ile karşılaştırıldığında GST rekombinantı hücreler bu optimizasyon koşullarında neredeyse 5 kata kadar C3G üretiminde artışa neden olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.15: %1 inokulum miktar ve farklı IPTG oranlarının C3G üretimine etkisi.

Şekil 4.16 ise %2.5 inokulum oranında C3G rekombinantı hücreler ve GST rekombinantı (*PhAN9*) hücrelerin farklı IPTG konsantrasyonları ile uyarımları sonucunda elde edilen C3G üretim oranlarını göstermektedir. Elde edilen veriler, en yüksek C3G üretiminin benzer şekilde 0.05 mM IPTG ile uyarım yapılan GST rekombinantı hücreleri (*PhAN9*) hücrelerde olduğu belirlenmiştir. GST rekombinantı hücreleri (*PhAN9*) hücreler 72.06 mg/L C3G üretirken benzer koşullarda büyütülen C3G rekombinantı hücreler 13.66 mg/L C3G üretmiştir. Bu da C3G rekombinantı hücrelere görece yaklaşık olarak 5.27 kat artışa denk gelmektedir.



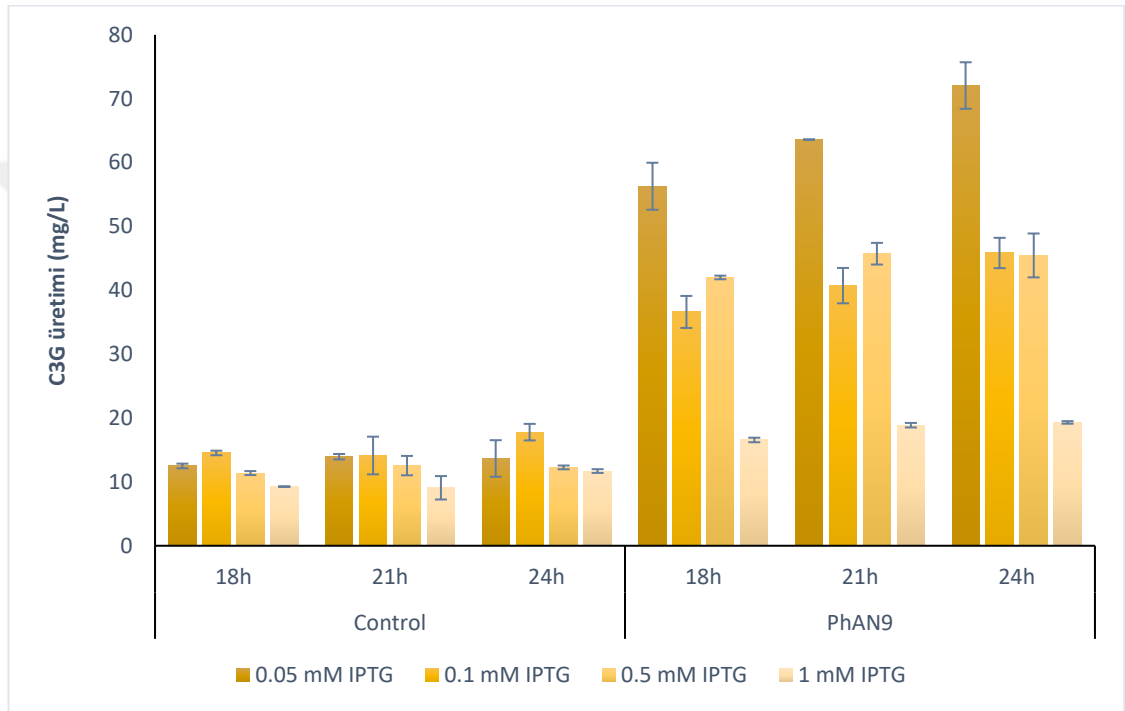
Şekil 4.16: %2.5 inokulum miktar ve farklı IPTG oranlarının C3G üretimine etkisi.

4.5.5. Farklı Glukoz ve IPTG Konsantrasyonları ile Farklı Örnek Toplama Zamanlarının C3G Üretimine Etkisi

Bu aşamaya kadar yapılan optimizasyonlar sonucunda en yüksek C3G üretimi GST rekombinantı hücreler %2.5 inokulum oranında aşılandığında elde edilmiştir.

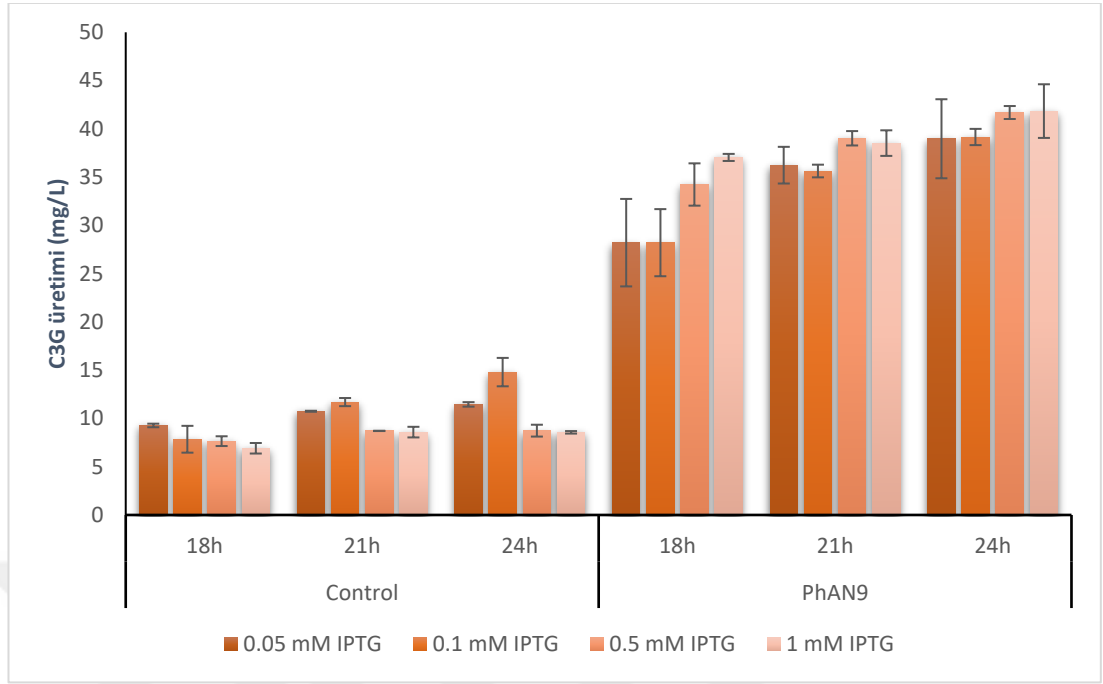
Farklı inkübasyon sürelerindeki C3G üretim oranının belirlenebilmesi için, kültürler %2.5 inokulum oranında, %2 veya %4 glukoz içeren AMM besiyerine aşılanarak farklı IPTG konsantrasyonlarında uyarımları yapılarak inkübe edilmişler ve inkübasyonun 18., 21. ve 24. saatlerinde kültür örnekleri toplanmıştır. HPLC analizleri sonucunda elde edilen C3G oranları %2 glukoz içeren AMM besiyeri için Şekil 4.17’de ve %4 glukoz içeren AMM besiyeri için Şekil 4.18’de sunulmuştur.

Şekil 4.17'de sunulduğu şekilde, %2 glukoz içeren AMM besiyerinde büyütülen kültürlerde en yüksek C3G üretimi 0.05 mM IPTG ile uyarılan GST rekombinantı hücrelerde elde edilmiş ve 18., 21. ve 24. saatlerdeki üretim sırasıyla; 56.28 mg/L, 63.29 mg/L ve 72.06 mg/L olarak belirlenmiştir. Artan inkübasyon periyotlarının C3G üretiminde kademeli artışa neden olduğu belirlenmiştir. C3G rekombinantı hücrelerin ise maksimum C3G üretim oranı 17,79 mg/L olarak, 0.1 mM IPTG ile uyarımda 24 saat inkübasyonun ardından elde edilmiştir.



Şekil 4.17: %2 glukoz içeren AMM besiyerinde farklı IPTG oranları ve kültür periyodu sürelerinin C3G üretimine etkisi.

Artan glukoz konsantrasyonunun (%4) etkisinin C3G üretimindeki etkisini belirlemek için yapılan denemelerde, en yüksek C3G üretimi GST rekombinantı (*PhAN9*) hücrelerde 1 mM IPTG ile uyarımı sonucunda 41.83 mg/L olarak belirlenmiştir (**Şekil 4.18**). %4 glukoz içeren AMM besiyerinde büyütülen hücrelerin öte yandan farklı IPTG konsantrasyonlarında uyarıldıklarında C3G üretimlerinde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Diğer bir deyişle, farklı IPTG konsantrasyonlarının C3G üretim belirgin bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. C3G rekombinantı hücrelerin ise maksimum C3G üretim oranı 14.8 mg/L olarak, 0.1 mM IPTG ile uyarımda 24 saat inkübasyonun ardından elde edilmiştir.

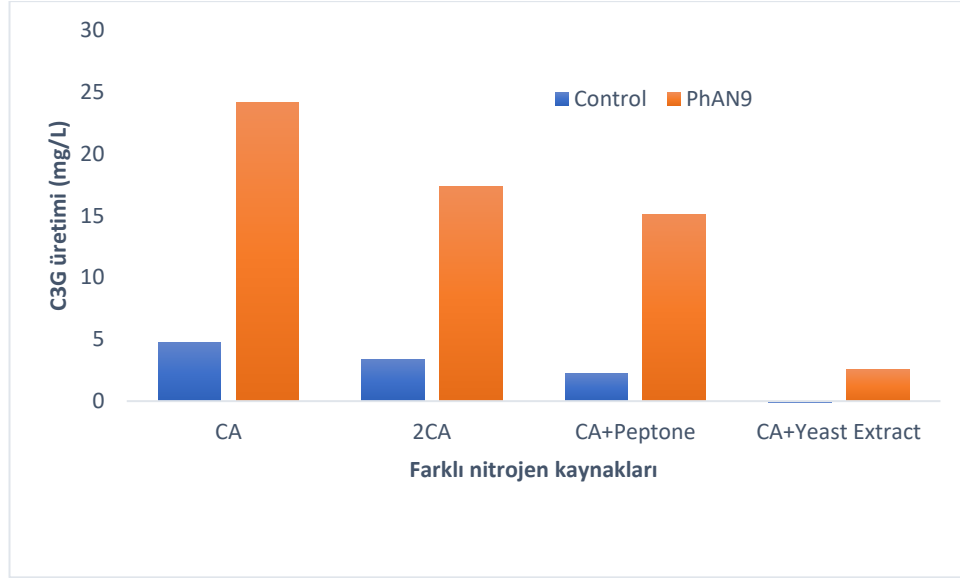


Şekil 4.18: %4 glukoz içeren AMM besiyerinde farklı IPTG oranları ve kültür periyodu sürelerinin C3G üretimine etkisi.

%2 glukoz ve %4 glukoz içeren AMM besiyerinde büyütülen GST rekombinantı hücrelerde C3G üretimi karşılaştırıldığında en yüksek C3G veriminin %2 glukoz içeren besiyerinde büyütülen ve 0.05 mM IPTG ile uyarılıp 24 saat inkübe edilen GST rekombinantı hücrelerde elde edildiği belirlenmiştir (72,0g mg/L).

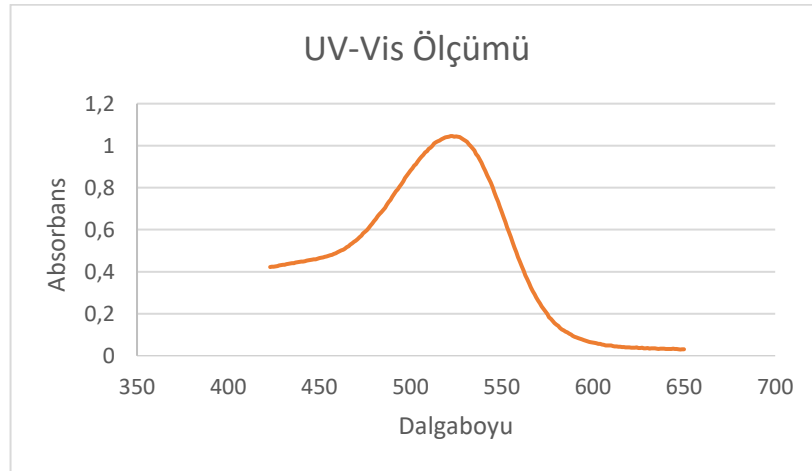
4.5.6. Farklı nitrojen kaynaklarının C3G üretimine etkisi

Farklı nitrojen kaynaklarının C3G üretimi üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada, kasaminoasit (CA) kullanılan ortamda maksimum C3G üretimi (24,13 mg/L) elde edilmiştir. CA'yı takiben, iki kat konsantrasyonda kasaminoasit içeren ortam (2CA), kasaminoasit ile pepton kombinasyonu (CA+Peptone) ve kasaminoasit ile maya ekstresi kombinasyonu (CA+Yeast Extract) sırasıyla daha düşük C3G üretim değerleri göstermiştir. Artış gösterilen veya farklılaştırılan nitrojen kaynaklarının C3G üretimini belirgin bir şekilde arttırmadığı; aksine üretimde kademeli bir düşüşe neden olduğu gözlemlenmiştir.



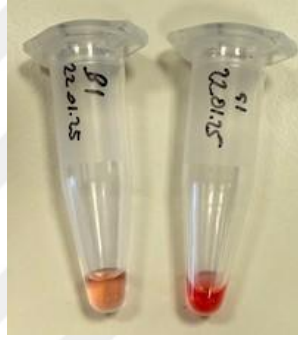
Şekil 4.19: %2 Glikoz içeren AMM besiyerinde farklı Nitrojen kaynaklarının C3G üretimine etkisi.

Bu çalışmada, %2 glikoz içeren AMM besiyerinde büyütülen hücrelerden elde edilen C3G (Siyanidin-3-glukozit) ekstraktının UV-Vis spektroskopik analizi gerçekleştirilmiştir. Ölçümler sonucunda, maksimum absorbans (λ_{max}) 520 nm olarak tespit edilmiştir. Bu değer, literatürde C3G için bildirilen karakteristik absorbans değerleriyle uyum içerisinde. Ayrıca, HPLC analiz sonuçları da C3G'nin 520 nm'de elüsyon gösterdiğini ortaya koymuş ve UV-Vis verileriyle güçlü bir örtüşme göstermiştir. Bu durum, elde edilen ekstraktın saf ve spesifik olduğunu desteklemektedir.



Şekil 4.20: %2 Glikoz içeren AMM besiyerinde büyütülen hücrelerden elde edilen C3G'nin UV-Vis ölçümü.

Buna karşılık, farklı konsantrasyonlarda süktroz eklenerek gerçekleştirilen deneylerde anlamlı düzeyde antosiyanin üretimi gözlemlenememiştir. Süktroz varlığında antosiyanin sentezinin yetersiz kalması, karbon kaynağının türüne bağılı olarak sekonder metabolit üretiminde farklı metabolik regülasyon mekanizmalarının etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuç, glikozun antosiyanin biyosentezi üzerindeki pozitif etkisinin, süktroz tarafından sağlanamadığını ve karbon kaynağı seçiminin metabolit üretiminde kritik bir parametre olduğunu ortaya koymaktadır. Tez kapsamında, AMM besiyerinde uyarımı yapılıp büyütölen hücreler tarafından üretilen kırmızı renkli antosiyanin **Şekil 4.21**'de gösterilmiştir.



Şekil 4.21: C3G rekombinantı hücrelerden (sol) ve GST rekombinantı hücrelerden (sağ) elde edilen kırmızı renkli Siyanidin 3-*O*-Glukozit örnekleri.

5. TARTIŞMA

Günümüzde, rekombinant bakterilerden elde edilen antosiyaninlerin maliyeti hâlâ bitkisel ekstraksiyonla elde edilenlere kıyasla oldukça yüksektir ve bunun en önemli nedenlerinden biri, göreceli olarak düşük verimdir. Bu düşük verim, mikrobiyal konakçılara dahil edilen biyosentetik yolların düşük etkinlikleri ve zayıf üretim kapasiteleri ile ilişkilendirilmektedir [118]. Bu nedenle, antosiyaninlerin mikrobiyal üretiminde, biyosentetik yolların potansiyelini en üst düzeye çıkarırken aynı zamanda antosiyanin yüksek oranda üretiminin mikrobiyal konakçı üzerindeki olumsuz etkilerini bir dizi düzenleme ve optimizasyon aracılığıyla en aza indirmek olacaktır [118]. Son yıllarda, genom dizileme ve DNA sentez teknolojilerinin hızla gelişmesi sayesinde, yeni enzimler ve biyosentetik yollar keşfedilmiş; mevcut bilgiler ışığında anahtar enzimlerin yeniden tasarlanması ile mikroorganizmalarda yaygın antosiyaninlerin üretimini sağlayacak yeni biyosentetik yolların inşası mümkün hale gelmiştir [118,123–125].

Antosiyaninler, bitkilerde pigmentasyonun yanı sıra çeşitli fizyolojik ve ekolojik rollere sahip olan flavonoid ailesine ait polifenolik bileşiklerdir. Doğada doğal olarak bulunan bu pigmentler, çeşitli çiçeklerde, sebzelerde, meyvelerde ve tahıl tanelerinde yaygın şekilde bulunur [126,127]. Antosiyaninler, çevresel pH seviyesine bağlı olarak siyah, mavi, mor veya kırmızı renkte görünebilir [128,129]. Ayrıca antosiyaninler güçlü antioksidan [130], antikanser [131] ve antidiyabetik [132] özellikleri ile sağlık açısından olumlu etkilere sahiptirler. Bitkilere kırmızı, mor ve mavi tonları veren bu pigmentler, özellikle çiçekler, meyveler ve yapraklarda yoğun olarak bulunur ve bitkilerin çevresel streslere karşı adaptasyonunda da önemli bir koruma sağlar.

Son yıllarda bitkilerden elde edilen antosiyaninler gibi doğal pigmentlerin, gıda katkı maddesi olarak kullanılabilme potansiyelinin incelenmesi en çok çalışılan konulardan biri haline gelmiştir. Günümüzde yaygın bir şekilde kullanılan sentetik gıda boya ile yapılan çalışmalar özellikle nörolojik fonksiyonlar ve davranışsal etkiler açısından insan sağlığını olumsuz etkilediğini göstermektedir. Çeşitli kuruluşlarca onaylı olarak piyasada kullanılan Amaranth, Allura Red, Ponceau 4R gibi sentetik azo boyaların aşırı tüketildiğinde çocuklarda alerji, astım, ürtiker, anjioödem, hiperaktivite ve dikkat eksikliği, migren, anksiyete, nörolojik işlevlerde bozulma, sitotoksik, kanserojen ve

ksenosestrojenik etkiler, ayrıca lökotrien B4 sentezinde artış ve tedavi edilemeyen genetik hastalıklara neden olabileceği belirlenmiştir [46–48]. Sentetik gıda boyaları ile ilgili bu endişe verici sonuçlar, tüketici talepleri doğrultusunda üreticileri gıda renklendiricisi olarak antosiyanin gibi doğal gıda renklendiricilerinin kullanımına yönlendirmektedir.

Antosiyaninin heterolog organizmalarda biyosentezi ile ilgili onlarca çalışma yapılmasına karşın henüz ticari düzeyde bir üretim kapasitesine ulaşılamamıştır. Antosiyaninlerin mikrobiyal konakçılarda yüksek oranda üretiminin sağlanması için farklı bitkisel kaynaklardan antosiyanin biyosentez genlerinin ekspresyonu, farklı öncül moleküllerin kullanılması, polikültür, UDP-glukoz biyosentez yollarının iyileştirilmesi ve enzim mühendisliği stratejilerinin uygulanması gibi stratejiler geliştirilmiştir [118,133]. Mayada heterolog antosiyanin sentezi ile ilgili yapılan son çalışmada [134], biyokimyasal ve yapısal analizler aracılığıyla, daha önce yalnızca antosiyanin taşınmasında rol aldığı düşünülen antosiyaninle ilişkili GST'lerin, lökoantosiyanidin dioksigenaz enziminin ürünü olan flavan-3,3,4-triol'ün siyanidine dönüşümünde gerekli olan dehidrasyon reaksiyonunu katalize ettiği gösterilmiştir [134]. Yapılan çalışma sonucunda, GST rekombinantı maya hücrelerinin C3G rekombinantı hücreler göre 36.5 kat daha fazla antosiyanin ürettiği belirlenmiştir. Tez çalışması kapsamında, *E. coli*'de daha önce tasarlanmış antosiyanin (C3G) üreticisi rekombinant hücrelere klonlanan *PhAN9* (*Petunia hybrida* AN9) glutatyon S-transferazının (GST) kırmızı renkli siyanidin 3-O-glukozit (C3G) pigmentinin biyosentezini arttırmasındaki etkisi incelenmiştir. Bu amaçla üretimin arttırılması için besiyeri ve kültür koşulları bazında çeşitli optimizasyonlar yapılmıştır. Yapılan tüm denemelerde, GST rekombinantı hücrelerin, C3G rekombinantı hücrelere görece daha çok antosiyanin (C3G) pigmenti üretmiştir.

Tez çalışması kapsamında, farklı IPTG konsantrasyonlarının C3G üretimi üzerindeki etkileri değerlendirilmiş ve en yüksek verimin 0.05 mM IPTG kullanımı (miktar verelim mg/L) ile elde edildiği belirlenmiştir. Daha yüksek IPTG konsantrasyonları (0.1 mM, 0.5 mM ve 1 mM) (miktar verelim en düşük kaç indii üretim oranı diye) ile yapılan uygulamalarda ise üretim miktarında belirgin bir düşüş gözlemlenmiştir. *Escherichia coli*, hem temel hem de uygulamalı araştırmalarda en yaygın kullanılan mikrobiyal konakçılardan biridir [135]. Tez kapsamında kullanılan *E. coli* BL21(DE3) suşu, indüklenabilir T7 RNA polimeraz temelli bir ekspresyon sistemine sahiptir. Bu

sistem, protein üretim düzeylerinin kolayca C3G rekombinantı hücreler edilmesini ve düzenlenmesini sağlar; bu sebeple bu suş laboratuvar ortamında yaygın şekilde kullanılır hâline gelmiştir [135–138]. Bu suş, pET veya türevi vektörler ile transforme edilerek özellikle rekombinant protein ekspresyonu gibi sayısız çalışmada tercih edilmiştir [121,139]. Son yıllarda ise, metabolik mühendislik ve sentetik biyoloji gibi gelişen alanlarda, farklı biyosentetik yollar aracılığıyla sentezlenen çeşitli metabolitlerin heterolog ekspresyonu için hücresel üretim fabrikaları olarak kullanılmaya başlanmıştır [121,140–143].

Mikrobiyal konakçılar heterolog ekspresyon için bu şekilde manipüle edildiklerinde, örneğin hücrenin metabolik kapasitesinin yüksek düzeyde protein üretimi için yönlendirilmesiyle konak organizmada “metabolik yük” veya “metabolik baskı” oluşabilir [144]. Bu yük, genellikle amino asitler, rRNA, ATP ve redüksiyon gücü gibi metabolik öncüllerin aşırı tüketimiyle, hücre için gerekli olmayan yabancı proteinlerin sentezine harcanmasıyla ilişkilendirilir [145]. Ayrıca, heterolog genleri ve seçici direnç belirteçlerini taşıyan plazmitlerin enerji gerektiren zorlu bakımı ve replikasyonu da bu yüke katkıda bulunabilir [146–148]. Ek olarak, yabancı proteinlerin hücredeki metabolik ağlarla etkileşime girmesi, kültür bileşenlerinin (örneğin IPTG' nin kendisi ve hücre içine alımı) neden olduğu uyumsuzluklar gibi farklı koşullar metabolik yük ile ilişkilendirilmektedir [149,150]. Yapılan çalışmada IPTG oranının yükselmesine eşdeğer olarak C3G üretimindeki azalış bu nedenle yüksek IPTG'nin hücresel stres ve toksik etki oluşturmamasından kaynaklı olabilir [151]. Öte yandan, test edilen en düşük IPTG konsantrasyonunda en yüksek C3G miktarının elde edilmesi, ticari ölçekte C3G üretim amacı göz önünde bulundurulduğunda daha düşük maliyet gerektirmesi de avantaj olarak görülmektedir.

Tez kapsamında, GST rekombinantı hücrelerde, flask:kültür hacim oranının değiştirilmesiyle farklı havalandırma koşullarının C3G üretimi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, havalandırma oranı arttıkça C3G üretiminde (43.41mg/L) artış olduğunu ortaya koymaktadır. Çözünmüş oksijenin antosiyanin üretimi üzerinde çift yönlü bir etkisi vardır [118]. Bir yandan, oksijen ANS (antosiyanidin sentaz) enziminin işlevi için kritik öneme sahiptir; öte yandan ise, oksijen antosiyaninleri okside edebilir[118]. ANS (antosiyanidin sentaz enzimi) 2-oksoglutarat ve demir bağımlı bir oksijenaz olduğu için ortamdaki oksijen oranı antosiyanin üretimi açısından önemli bir etmendir [152]. Bu nedenle, optimal oksijen

kritik bir öneme sahiptir. Mikrobiyal eriodiktiol dönüşümüne yönelik bir çalışmada, çözünmüş oksijen konsantrasyonunun artırılmasıyla katekin sentezinde iyileşme sağlandığı ve bunun artan NADPH düzeyiyle ilişkili olabileceği belirtilmiştir [102]. Ancak oksijenin antosiyanin üretimi üzerindeki etkisiyle ilgili doğrudan bir çalışma bulunmamaktadır.

Post-indüksiyon zamanının C3G üretimi üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen çalışmada, kültür periyodunun farklı zamanlarında IPTG uyarımı (3.5h, 4.5h, 5.5h) gerçekleştirilerek üretim verimi üzerindeki sonuçları karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular, 3.5 saatlik post-indüksiyon süresinin, 4.5 ve 5.5 saatlik post-indüksiyon sürelerine kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek C3G üretimi (72.06 mg/L) sağladığını ortaya koymuştur. Bu durum, 3.5 saatlik sürede hücrel metabolizmanın hâlâ aktif bir sentez kapasitesine sahip olduğunu (3.5 saat OD600: 0.6, 4.5 saat OD600:1, 5.5 saat OD600: 1.3) buna karşın daha uzun sürelerle ilerledikçe metabolik yükün artması ve hücrel stres faktörlerinin devreye girmesiyle üretim veriminin azaldığını göstermektedir [153].

Escherichia coli, farklı karbon ve azot kaynaklarını kullanarak büyüyebilme yeteneğine sahip olsa da, bazı kaynaklara karşı tercih gösterir. *E. coli*, glikozu diğer karbon kaynaklarına kıyasla öncelikli olarak tüketir; bu durum, fosfoenolpirüvat-fosfotransferaz sistemi (PTS sistemi) olarak bilinen bir şeker taşıma sistemiyle ilişkili olan karbon katabolit baskısı (Carbon Catabolite Repression, CCR) aracılığıyla düzenlenir [154]. Gliserol ise PTS dışı bir karbon kaynağıdır ve genellikle yaygın şekilde kullanılır; çünkü biyodizel sentezi sırasında yan ürün olarak elde edilir [155].

Azot kaynaklarında ise, *E. coli*, büyümek için çeşitli azot bileşiklerini kullanabilse de, öncelikli olarak inorganik amonyumu tercih eder [156]. Ayrıca, karbon ve azot kaynakları arasında, TCA döngüsünün önemli ara ürünlerinden biri olan α -ketoglutarat aracılığıyla bir bağlantı kurulduğu bildirilmiştir. Bu molekül, amonyak ile glutamat sentezi için gereklidir [157,158].

Bu bağlamda tez kapsamında karbon kaynağı olarak öncelikle farklı glikoz oranlarının (%2 veya %4) antosiyanin üretimi üzerindeki etkisi araştırıldığında, GST rekombinantı hücrelerin %2 glikoz içeren AMM besiyerinde daha yüksek oranda C3G ürettikleri belirlenmiştir (72.06 mg/L). Ancak glikoz oranı %4'e çıkarıldığında üretim miktarında belirgin bir azalma gözlemlenmiştir (38.9 mg/L). Bu durum, yüksek glikoz

konsantrasyonlarının *E. coli* hücrelerinde karbon katabolit baskılaması mekanizmasını tetiklediğini düşündürmektedir. Özellikle yüksek düzeyde glikoz varlığında, hücre metabolizma sekonder metabolit üretimi yerine hücre büyümesini desteklemeye yönelmekte, böylece antosiyanin biyosentezi gibi enerji ve öncül gerektiren süreçler baskılanmaktadır [159]. Ayrıca, fazla glikoz ortamında glikoliz hızlanmakta ve aşırı ATP üretimi hücresel dengenin bozulmasına yol açarak oksidatif stres oluşturabilmekte, bu da rekombinant proteinlerin ve dolayısıyla antosiyanin üretiminin azalmasına sebep olabilmektedir [160]. Görece düşük glikoz varlığında daha yüksek C3G verimi elde edilmesi ticari ölçekte önemli bir avantaj sağlamaktadır.

C3G üretimi için yapılan çalışmalarda besiyerleri kasaminoasit gibi nitrojen kaynaklarınca desteklenmiştir [107]. Yan vd (2007) yılında %0.4 glikoz içeren M9 besiyeri ile yapılan çalışmada 70 mg/L C3G üretimi sağlamışlardır [101]. Cress vd (2017) tarafından yapılan çalışmada %2 glikoz ve 2g/L kasaminoasit içeren AMM besiyerinde 51 mg/L P3G (Peonidin 3-O Glikozit) elde edilmiştir [117]. Zha vd (2018) ise *Corynebacterium glutamicum* 'da C3G üretimi 20 g/L glikoz ve 2 g/L kasamino asit ile zenginleştirilmiş AMM besiyerini kullanmış ve optimize edilen kültür koşullarında maksimum C3G verimi 41.7 mg/L'ye ulaşmıştır [107]. Aynı çalışmada kasaminoasit miktarı iki katına çıkarıldığında ise üretim belirgin şekilde azalmıştır [107]. Tez çalışması kapsamında yapılan çalışmada, kasaminoasitlerin optimum bir nitrojen kaynağı olarak C3G üretimini desteklemesi, onların bakteriyel hücreler tarafından kolayca kullanılabilir serbest amino asit formunda bulunmalarından kaynaklanabilir. Amino asitlerin doğrudan absorbe edilmesi, hücresel metabolizmanın hızlanmasına ve ikincil metabolitlerin (örneğin C3G gibi antosiyanin türevlerinin) sentezine olumlu katkı sağlamaktadır [161]. Ayrıca, kasaminoasitlerin, karbon ve enerji metabolizmasına doğrudan katılabilmesi, ikincil metabolit üretimi için prekürsör havuzunu zenginleştirmiş olabilir [162].

Bununla birlikte, kasaminoasit oranı iki katına çıkarıldığında (2CA ortamı), ortamda artan azot konsantrasyonu hücrelerde büyümeye yönelik metabolik bir kaymaya sebep olmuş ve ikincil metabolit üretimini baskılamış olabilir. Bu durum, "nitrojen baskılaması" (nitrojen represyonu) kavramı ile açıklanabilir [163]. Mısırdan yapılan bir çalışmada, pepton ve maya ekstresi gibi karmaşık nitrojen kaynaklarının kullanıldığı ortamlarda ise, bu bileşiklerin sindirimi için hücrelerin daha fazla metabolik enerji harcaması gerekmiş ve bu durum C3G üretim verimliliğini düşürmüş olabileceği

düşünülmektedir [164]. Yapılan çalışma C3G üretiminde kullanılan nitrojen kaynağının tipi ve miktarının titizlikle optimize edilmesi gerektiğini göstermekte; aşırı veya karmaşık azot kaynaklarının sekonder metabolit üretimi üzerinde baskılayıcı etki oluşturabileceğini vurgulamaktadır.

Tez kapsamında tasarlanan organizmalarda elde edilen siyanidin 3-O-glukozit (C3G) pigmentinin UV-Vis karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. UV-Vis ile elde edilen spektrumda 520 nm'de keskin bir tepe gözlenmesi, C3G'nin ortamda baskın bir pigment olduğunu göstermektedir. Absorbans değerinin 600 nm üzerindeki bölgelerde oldukça düşük olması, bozulma ürünlerinin veya polimerleşmiş formasyonların minimal düzeyde olduğunu ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, UV-Vis spektroskopisi, hızlı, düşük maliyetli ve güvenilir bir ön tarama yöntemi olarak C3G tayininde kullanılabilirken, HPLC analizi bu bulguları destekleyerek ekstraktın yapısal bütünlüğünü ve saflığını doğrulamıştır.

Son yıllarda, flavonoidlerin doğal biyosentez yolları hakkında bilgi birikiminin artması ve sentetik biyoloji ile metabolik mühendisliğin hızla gelişmesiyle, doğrudan öncül maddelerden veya yenilenebilir karbon kaynaklarından flavonoid üretmek için çok sayıda mikrobiyal hücre fabrikası kurulmuştur [165,166]. Ancak, bu kimyasalların ticari ve endüstriyel ölçekte üretimi henüz başarılammıştır; çünkü ürün titre, verim ve üretkenliği hâlâ düşüktür. Flavonoid üretimini mikroorganizmalarda önemli ölçüde artırmak için bazı zorlukların üstesinden gelinmesi gerekmektedir. Flavonoid biyosentez yollarında yer alan enzimler, özellikle sitokrom P450'ler ve postmodifikasyon enzimleri, genellikle redoks partnerlerine bağımlıdır, düşük enzim aktivitesi ve zayıf seçicilik gösterir [167,168]. Bu durum, üretim verimliliğini ciddi biçimde sınırlar. Bu yüzden, bazı verimli bakteriyel non-P450 oksijenazlar ve hidroksilazların esnekliğinden faydalanarak bitki kaynaklı P450 enzimlerinin yerini alması umut verici bir alternatif olarak görülmektedir [169].

E. coli'de eksprese edilen P450'lerin çoğu düşük aktiviteye sahiptir ve metabolitleri doğru tanıyamaz. Çünkü antosiyanin üretim zinciri P450 enzimleriyle ilerleyemeyince, ara ürünler birikir veya istenilen son ürün (örneğin siyanidin 3-O-glukozid) üretilemez. Flavonoid biyosentez yolları, uzun reaksiyon basamakları ve karmaşık düzenleyici mekanizmalar içerir. Bu da üretim verimini önemli ölçüde sınırlar. Bu engeli aşmak için bazı araştırmacılar, tüm biyosentez yolunu bağımsız konak suşlara bölerek metabolik yükü dağıtan ko-kültür veya polikültür sistemleri

oluşturmayı denemiştir [170–172]. Ancak yaptığımız tez çalışmasında biyosentez basamağı flavon-3-ol ile başlamasından kaynaklı P450 enzimlerinin işlevsizliğinden dolayı bir üretim düşüklüğü olmamaktadır. Çünkü P450 enzimleri antosiyanin biyosentez yolağının erken aşamalarında daha etkin rol oynarlar.

Başka bir antosiyanin verimini etkileyen etmen, biyosentez yollarındaki öncül maddelerin (özellikle aromatik amino asitler ve malonil-CoA) yetersizliğidir [168,173]. Ancak bu öncül maddeler, hücre büyümesini destekleyen temel metabolik yolların da ara ürünleridir. Bu nedenle, karbon akışının merkezi metabolizma ile yabancı (heterolog) biyosentez yolları arasında hassas bir şekilde dengelenmesi gerekir. Son zamanlarda, hücre büyümesi ile ürün sentezini dengelemek için karbon akışını ince ayarla düzenleyen dinamik düzenleyici elemanların oluşturulması, mikrobiyal sentez verimliliğini artırmada güçlü bir araç olarak öne çıkmıştır [166,174].

Antosiyaninler, fenilpropanoid yolu ve flavonoid yolu aracılığıyla sitozolde sentezlenir. Antosiyanin biyosentezinde yer alan enzimlerin endoplazmik retikulumun sitoplazmik yüzeyine yerleştiği öne sürülmüştür [38]. Ancak, antosiyaninlerin parlak renklerini sergileyebilmesi için asidik vakuollere depo edilmesi gerekir. Antosiyanin biyosentezi hakkında çok şey bilinse de vakuollere taşınmalarıyla ilgili adımlar yeterince anlaşılmamıştır. Şu ana kadar, genetik ve biyokimyasal kanıtlar, antosiyaninlerin taşınmasında hem multidrug ve toksik bileşik dışarı atımı (MATE) hem de ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılarının yer aldığını desteklemektedir [34,35,69]. MATE ve ABC taşıyıcılarına ek olarak, glutatyon S-transferaz (GST) enzimlerinin de antosiyanin taşıma mekanizmalarında yer aldığı bildirilmiştir [67]. Bitkisel sistemlerde GST (Glutayon S-Transferaz) ailesinin üyeleri, yalnızca detoksifikasyon süreçlerinde değil, aynı zamanda sinyal iletimi, oksidatif stres yanıtı ve antosiyanin stabilizasyonu gibi birçok kritik biyolojik süreçte de aktif rol oynamaktadır. Bu enzimler, hücre içi homeostazın sürdürülmesi için reaktif oksijen türleri (ROS) seviyelerinin kontrolünde önemli görevler üstlenir [175]. *PhAN9* geni, *Petunia hybrida* türünde antosiyanin taşınmasında kritik rol oynayan bir glutatyon S-transferaz (GST) ailesi üyesidir. GST proteinleri, antosiyanin molekülleri ile kompleks oluşturarak onların vakuole güvenli bir şekilde aktarılmasına aracılık eder. Filogenetik analiz sonuçlarına göre, *PhAN9* geni, diğer bitkisel Glutatyon S-Transferaz (GST)

genleriyle yüksek derecede ilişkili bir grupta konumlanmıştır. Özellikle *IbGSTF4*, *DcGSTF2* ve *GtGST* genleriyle yakın bir filogenetik ilişki sergilemektedir.

Özellikle *IbGSTF4* geni gibi spesifik GST üyeleri, bitkilerde fenilpropanoid yolları ve flavonoid biyosenteziyle doğrudan ilişkilidir. *IbGSTF4*'ün antosiyanin taşıyıcı proteini olarak işlev gördüğü ve bu pigmentlerin vakuollere taşınmasında kilit rol oynadığı gösterilmiştir [37]. Bu taşınma süreci, antosiyanin stabilitesinin sağlanması açısından kritik öneme sahiptir, zira sitozolik ortamda serbest antosiyaninlerin kararsızlığı, oksidatif degradasyon riskini artırmaktadır [67]. Öte yandan GST'lerin oksidatif stres yanıtı üzerindeki etkileri, çeşitli çalışmalarda detaylı şekilde ele alınmıştır. Örneğin, *Arabidopsis thaliana*'da yapılan çalışmalar, bazı GST izoformlarının H_2O_2 gibi ROS'ları doğrudan temizleyerek stres toleransını artırdığını ortaya koymuştur [176]. Bu bağlamda, GST'lerin yalnızca metabolit taşıyıcıları değil, aynı zamanda hücrel redoks dengesinin koruyucuları olduğu anlaşılmaktadır.

Yine, GST'lerin sinyal iletimi üzerindeki etkileri de göz ardı edilemez. Bazı GST proteinleri, MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) sinyal yolları ile etkileşerek, hücrel yanıt mekanizmalarının düzenlenmesinde görev almaktadır [71]. Bu durum, bitkilerin çevresel stres koşullarına adaptasyonunda GST'lerin çok yönlü roller üstlendiğini desteklemektedir. Gelecekte yapılacak olan daha ileri fonksiyonel karakterizasyon çalışmaları, *PhAN9*'un biyolojik işlevlerinin detaylandırılmasına ve ilgili metabolik ağların çözülmesi açısından önemlidir.

Petunia hybrid'da bulunan *PhAN9* glutatyon S-transferazı, bu bağlamda, bir taşıyıcı görevi üstlenmektedir. Özellikle, *PhAN9*'un yokluğunda ya da işlev kaybı mutasyonlarında, *Petunia hybrid* bitkisinde antosiyanin birikiminin dramatik şekilde azaldığı ve çiçeklerin soluk renklere sahip olduğu gösterilmiştir [39,177]. Bu durum, *PhAN9*'un antosiyanin taşınmasında etkili bir aracı olduğunu kanıtlamaktadır.

Mikrobiyal konakçılarda antosiyanin üretimindeki en yeni stratejilerden birisi de GST genlerinin kullanılması olmuştur (Maya 2023 makalesini ekle). Tartışma kısmının ilk kısmında da belirtildiği üzere, GST genlerinin antosiyanin biyosentetik yolağında farklı bir katalitik işlevi olduğu kanıtlanmıştır. Tez çalışması kapsamında, *E.coli*' de antosiyanin üretimi üzerindeki etkisinin belirlenmesi için; antosiyanin taşınması ve birikmesinde önemli rolleri olduğu bilinen glutatyon transferaz geni *PhAN9* alınıp *E.*

coli'de daha önce tasarlanmış olan antosiyanin rekombinantı *E. coli* BL21 (DE3) hücrelere klonlanmıştır.

Yapılan optimizasyonlar sonrasında, *E. coli*'de *PhAN9* genini taşıyan GST rekombinantı hücrelerde C3G rekombinantı hücrelere görece antosiyanin üretiminde tam 5 kat artış gözlemlenmiştir. Görece düşük glikoz varlığında ve düşük IPTG konsantrasyonunda daha yüksek C3G verimi elde edilmesi ticari ölçekte önemli bir avantaj sağlamaktadır ve aynı zamanda C3G üretiminde kullanılan nitrojen kaynağının tipi ve miktarının titizlikle optimize edilmesi gerektiğini göstermekte; aşırı veya karmaşık azot kaynaklarının sekonder metabolit üretimi üzerinde baskılayıcı etki oluşturabileceğini vurgulamaktadır. *E. coli*' de yapılan çalışmanın daha önce uygulanmamış olması bu çalışmanın özgünlük değerini arttırmaktadır. Sonuç olarak, antosiyanin biyosentez yolağının daha iyi aydınlatılması, yapılan yeni çalışmalarla bilinen genlerin daha önceden tanımlanan işlevlerine yeni katalitik rollerin eklenmesi ile elde edilen bilginin genetik ve metabolizma mühendisliği alanındaki yeni teknolojilerle birleştirildiğinde flavonoidler gibi önemli bitki metabolitlerinin daha verimli ve ekonomik üretimi için yeni ve heyecan verici fırsatların doğması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Eichenberger M, Schwander T, Hüppi S, Kreuzer J, Mittl PRE, Peccati F, et al. The catalytic role of glutathione transferases in heterologous anthocyanin biosynthesis. *Nat Catal* 2023;6:927–38. <https://doi.org/10.1038/s41929-023-01018-y>.
- [2] Patra S, Makhal PN, Jaryal S, More N, Rao Kaki V, History A. Anthocyanins: Plant-based flavonoid pigments with diverse biological activities ARTICLE INFO ABSTRACT. vol. 2. 2022.
- [3] Pina F, Basílio N, Parola AJ, Melo MJ, Oliveira J, de Freitas V. The Triumph of the blue in nature and in Anthropocene. *Dyes and Pigments* 2023;210. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.110925>.
- [4] Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM. Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr Res* 2017;61. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>.
- [5] Wallace TC, Giusti MM. Anthocyanins—nature’s bold, beautiful, and health-promoting colors. *Foods* 2019;8. <https://doi.org/10.3390/foods8110550>.
- [6] Câmara JS, Locatelli M, Pereira JAM, Oliveira H, Arlorio M, Fernandes I, et al. Behind the Scenes of Anthocyanins—From the Health Benefits to Potential Applications in Food, Pharmaceutical and Cosmetic Fields. *Nutrients* 2022;14. <https://doi.org/10.3390/nu14235133>.
- [7] Mannino G, Gentile C, Ertani A, Serio G, Berteà CM. Anthocyanins: Biosynthesis, distribution, ecological role, and use of biostimulants to increase their content in plant foods—a review. *Agriculture (Switzerland)* 2021;11:1–25. <https://doi.org/10.3390/agriculture11030212>.
- [8] Gould KS. Nature’s Swiss Army Knife: The Diverse Protective Roles of Anthocyanins in Leaves. 2004.
- [9] Burns KC, Dalen JL. Foliage color contrasts and adaptive fruit color variation in a bird-dispersed plant community. *Oikos* 2002;96:463–9. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2002.960308.x>.
- [10] Hamilton WD, Brown SP. Autumn tree colours as a handicap signal. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2001;268:1489–93. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1672>.
- [11] Salamon I, Sezer ENŞ, Kryvtsova M, Labun P. Antiproliferative and antimicrobial activity of anthocyanins from berry fruits after their isolation and freeze-drying. *Applied Sciences (Switzerland)* 2021;11:1–14. <https://doi.org/10.3390/app11052096>.
- [12] Holton’ TA, Cornish EC. Genetics and Biochemistry of Ant hocyanin Biosynthesis. vol. 7. 1995.

- [13] Tanaka Y, Ohmiya A. Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. *Curr Opin Biotechnol* 2008;19:190–7. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.02.015>.
- [14] Durbin ML, Mccaig B, Clegg MT. Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome. vol. 42. 2000.
- [15] Tian L, Kong WF, Pan QH, Zhan JC, Wen PF, Chen JY, et al. Expression of the chalcone synthase gene from grape and preparation of an anti-CHS antibody. *Protein Expr Purif* 2006;50:223–8. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.06.003>.
- [16] Ageorges A, Fernandez L, Vialet S, Merdinoglu D, Terrier N, Romieu C. Four specific isogenes of the anthocyanin metabolic pathway are systematically co-expressed with the red colour of grape berries. *Plant Science* 2006;170:372–83. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.09.007>.
- [17] Goto-Yamamoto N, Wan GH, Masaki K, Kobayashi S. Structure and transcription of three chalcone synthase genes of grapevine (*Vitis vinifera*). 2002.
- [18] Sparvoli F, Martin C, Scienza A, Gavazzi G, Tonelli C. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). vol. 24. 1994.
- [19] Li P, Chen B, Zhang G, Chen L, Dong Q, Wen J, et al. Regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis by *Medicago truncatula* bHLH transcription factor MtTT8. *New Phytologist* 2016;210:905–21. <https://doi.org/10.1111/nph.13816>.
- [20] Zhang Y, Hu W, Peng X, Sun B, Wang X, Tang H. Characterization of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in two strawberry genotypes during fruit development in response to different light qualities. *J Photochem Photobiol B* 2018;186:225–31. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.07.024>.
- [21] Gargouri M, Manigand C, Maugé C, Granier T, Langlois D'Estaintot B, Cala O, et al. Structure and epimerase activity of anthocyanidin reductase from *Vitis vinifera*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2009;65:989–1000. <https://doi.org/10.1107/S0907444909025013>.
- [22] Xu S, Li G, Zhou J, Chen G, Shao J. Efficient production of anthocyanins in *Saccharomyces cerevisiae* by introducing anthocyanin transporter and knocking out endogenous degrading enzymes. *Front Bioeng Biotechnol* 2022;10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.899182>.
- [23] Davies KM. Modifying Anthocyanin Production in Flowers. *Anthocyanins*, Springer New York; 2008, p. 49–80. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77335-3_3.
- [24] Turturică M, Oancea AM, Râpeanu G. ANTHOCYANINS: NATURALLY OCCURRING FRUIT PIGMENTS WITH FUNCTIONAL PROPERTIES. vol. 39. 2015.

- [25] Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández M de L, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem* 2009;113:859–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>.
- [26] Błkowska-Barczak A. ACYLATED ANTHOCYANINS AS STABLE, NATURAL FOOD COLORANTS-A REVIEW. vol. 14. 2005.
- [27] Cruz L, Basílio N, Mateus N, De Freitas V, Pina F. Natural and Synthetic Flavylum-Based Dyes: The Chemistry behind the Color. *Chem Rev* 2022;122:1416–81. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00399>.
- [28] Coutinho IB, Freitas A, Maçanita AL, Lima JC. Effect of water content on the acid-base equilibrium of cyanidin-3-glucoside. *Food Chem* 2015;172:476–80. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.060>.
- [29] Sims CA, Morris JR. A comparison of the color components and color stability of red wine from Noble and Cabernet Sauvignon at various pH levels. *Am J Enol Vitic* 1985;36:181–4.
- [30] Fossen T, Cabrita L, Andersen M. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. n.d.
- [31] Khoo HE, Chew LY, Ismail A, Azlan A. Anthocyanins in purple colored fruits. *Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources and Health Benefits* New York: Nova Science Publisher 2012:133–52.
- [32] Asenstorfer RE, Iland PG, Tate ME, Jones GP. Charge equilibria and pKa of malvidin-3-glucoside by electrophoresis. *Anal Biochem* 2003;318:291–9. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(03\)00249-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(03)00249-5).
- [33] Pucker B, Selmar D. Biochemistry and Molecular Basis of Intracellular Flavonoid Transport in Plants. *Plants* 2022;11. <https://doi.org/10.3390/plants11070963>.
- [34] Goodman CD, Casati P, Walbot V. A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. *Plant Cell* 2004;16:1812–26. <https://doi.org/10.1105/tpc.022574>.
- [35] Francisco RM, Regalado A, Ageorges A, Burla BJ, Bassin B, Eisenach C, et al. ABCC1, an ATP binding cassette protein from grape berry, transports anthocyanidin 3-O-glucosides. *Plant Cell* 2013;25:1840–54. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.102152>.
- [36] Behrens CE, Smith KE, Iancu C V., Choe J yong, Dean J V. Transport of Anthocyanins and other Flavonoids by the Arabidopsis ATP-Binding Cassette Transporter AtABCC2. *Sci Rep* 2019;9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37504-8>.
- [37] Kitamura S, Shikazono N, Tanaka A. TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in

Arabidopsis. *Plant Journal* 2004;37:104–14. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01943.x>.

[38] Zhao J, Dixon RA. MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3'-O-glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in medicago truncatula and arabidopsis. *Plant Cell* 2009;21:2323–40. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.067819>.

[39] Mueller LA, Goodman CD, Silady RA, Walbot V. AN9, a Petunia Glutathione S-Transferase Required for Anthocyanin Sequestration, Is a Flavonoid-Binding Protein 1. 2000.

[40] Sun Y, Li H, Huang JR. Arabidopsis TT19 functions as a carrier to transport anthocyanin from the cytosol to tonoplasts. *Mol Plant*, vol. 5, Oxford University Press; 2012, p. 387–400. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr110>.

[41] Verweij W, Spelt C, Di Sansebastiano G Pietro, Vermeer J, Reale L, Ferranti F, et al. An H⁺ P-ATPase on the tonoplast determines vacuolar pH and flower colour. *Nat Cell Biol* 2008;10:1456–62. <https://doi.org/10.1038/ncb1805>.

[42] Grünig N, Horz JM, Pucker B. Diversity and Ecological Functions of Anthocyanins 2024. <https://doi.org/10.20944/preprints202408.2272.v1>.

[43] Mehmandoust M, Pourhakkak P, Hasannia F, Özalp Ö, Soylak M, Erk N. A reusable and sensitive electrochemical sensor for determination of Allura red in the presence of Tartrazine based on functionalized nanodiamond@SiO₂@TiO₂; an electrochemical and molecular docking investigation. *Food and Chemical Toxicology* 2022;164. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113080>.

[44] Stozhko NY, Khamzina EI, Bukharinova MA, Tarasov A V. An Electrochemical Sensor Based on Carbon Paper Modified with Graphite Powder for Sensitive Determination of Sunset Yellow and Tartrazine in Drinks. *Sensors* 2022;22. <https://doi.org/10.3390/s22114092>.

[45] Shaikshavali P, Reddy TM, Lakshmi Narayana A, Hussain OM, Venkataprasad G, Venu Gopal T. A powerful electrochemical sensor based on Fe₃O₄ nanoparticles-multiwalled carbon nanotubes hybrid for the effective monitoring of sunset yellow in soft drinks. *Journal of Food Measurement and Characterization* 2020;14:3319–32. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00569-z>.

[46] Amchova P, Kotolova H, Ruda-Kucerova J. Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2015;73:914–22. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.026>.

[47] Kolozof PA, Florou AB, Spyrou K, Hrbac J, Prodromidis MI. In-situ tailoring of the electrocatalytic properties of screen-printed graphite electrodes with sparked generated molybdenum nanoparticles for the simultaneous voltammetric determination of sunset yellow and tartrazine. *Sens Actuators B Chem* 2020;304. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127268>.

- [48] Lellis B, Fávaro-Polonio CZ, Pamphile JA, Polonio JC. Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. *Biotechnology Research and Innovation* 2019;3:275–90. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2019.09.001>.
- [49] Arvand M, Pourhabib A, Asadi M. Template-based synthesis of uniform bimetallic nickel-tin oxide hollow nanospheres as a new sensing platform for detection of erythrosine in food products. *Sens Actuators B Chem* 2018;255:1716–25. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.08.189>.
- [50] Kaya SI, Cetinkaya A, Ozkan SA. Latest advances on the nanomaterials-based electrochemical analysis of azo toxic dyes Sunset Yellow and Tartrazine in food samples. *Food and Chemical Toxicology* 2021;156. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112524>.
- [51] Mccann D, Barrett A, Cooper A, Crumpler D, Dalen L, Grimshaw K, et al. Articles Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *WwwThelancetCom* 2007;370. <https://doi.org/10.1016/S0140>.
- [52] Giusti MM, Wrolstad RE. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochem Eng J*, vol. 14, Elsevier; 2003, p. 217–25. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00221-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00221-8).
- [53] Li G, Wu J, Jin H, Xia Y, Liu J, He Q, et al. Titania/electro-reduced graphene oxide nanohybrid as an efficient electrochemical sensor for the determination of allura red. *Nanomaterials* 2020;10. <https://doi.org/10.3390/nano10020307>.
- [54] Zhang K, Zeng H, Feng J, Liu Z, Chu Z, Jin W. Screen-printing of core-shell Mn₃O₄@C nanocubes based sensing microchip performing ultrasensitive recognition of allura red. *Food and Chemical Toxicology* 2022;162. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112908>.
- [55] Rovina K, Siddiquee S, Shaarani SM. Extraction, analytical and advanced methods for detection of Allura Red AC (E129) in food and beverages products. *Front Microbiol* 2016;7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00798>.
- [56] de Moraes PB, Hudari FF, Silva JP, Zanoni MVB. Enhanced detection of ponceau 4R food dye by glassy carbon electrode modified with reduced graphene oxide. *J Braz Chem Soc* 2018;29:1237–44. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170219>.
- [57] Blanco E, Arias L, Vázquez L, del Pozo M, Sánchez L, Petit-Domínguez MD, et al. Sensor based on diamond nanoparticles and WS₂ for ponceau 4R and tartrazine determination: Influence of green solvents employed for WS₂ exfoliation. *FlatChem* 2020;23. <https://doi.org/10.1016/j.flatc.2020.100185>.
- [58] Qin Z, Zhang J, Liu Y, Wu J, Li G, Liu J, et al. A simple but efficient

voltammetric sensor for simultaneous detection of tartrazine and ponceau 4R based on TiO₂/electro-reduced graphene oxide nanocomposite. *Chemosensors* 2020;8. <https://doi.org/10.3390/CHEMOSENSORS8030070>.

[59] Micheletti L, Coldibeli B, Salamanca-Neto CAR, Almeida LC, Sartori ER. Assessment of the use of boron-doped diamond electrode for highly sensitive voltammetric determination of the azo-dye carmoisine E-122 in food and environmental matrices. *Talanta* 2020;220. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121417>.

[60] Tajik S, Lohrasbi-Nejad A, Mohammadzadeh Jahani P, Askari MB, Salarizadeh P, Beitollahi H. Co-detection of carmoisine and tartrazine by carbon paste electrode modified with ionic liquid and MoO₃/WO₃ nanocomposite. *Journal of Food Measurement and Characterization* 2022;16:722–30. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01201-4>.

[61] Chebotarev AN, Pliuta K V., Snigur D V. Determination of Carmoisine onto Carbon-Paste Electrode Modified by Silica Impregnated with Cetylpyridinium Chloride. *ChemistrySelect* 2020;5:3688–93. <https://doi.org/10.1002/slct.202000518>.

[62] Nayak DS, Shetti NP. A novel sensor for a food dye erythrosine at glucose modified electrode. *Sens Actuators B Chem* 2016;230:140–8. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.02.052>.

[63] Zhao X, Hu W, Wang Y, Zhu L, Yang L, Sha Z, et al. Decoration of graphene with 2-aminoethanethiol functionalized gold nanoparticles for molecular imprinted sensing of erythrosine. *Carbon N Y* 2018;127:618–26. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2017.11.041>.

[64] Mohamed AM, Fouad FH, Raouf Fayek G, El Sayed KM, Ahmed MN, Mahmoud RZ, et al. Recent advances in electrochemical sensors based on nanomaterials for detection of red dyes in food products: A review. *Food Chem* 2024;435. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137656>.

[65] . n.d. <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-natural-food-colorants-market> (accessed April 30, 2025).

[66] Grotewold E, Davies K. Trafficking and sequestration of anthocyanins. *Nat Prod Commun* 2008;3:1934578X0800300806.

[67] Zhao J, Dixon RA. The “ins” and “outs” of flavonoid transport. *Trends Plant Sci* 2010;15:72–80. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.006>.

[68] Zhao J, Huhman D, Shadle G, He XZ, Sumner LW, Tang Y, et al. MATE2 mediates vacuolar sequestration of flavonoid glycosides and glycoside malonates in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 2011;23:1536–55. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.080804>.

[69] Gomez C, Conejero G, Torregrosa L, Cheynier V, Terrier N, Ageorges A. In vivo grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the

contribution of anthoMATE transporters and GST. *The Plant Journal* 2011;67:960–70.

[70] Hayes JD, Pulford DJ, Tew KD. The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST* and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance. vol. 30. 1995.

[71] Marrs KA. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu Rev Plant Biol* 1996;47:127–58.

[72] Sandermann Jr H. Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem Sci* 1992;17:82–4.

[73] Coleman JOD, Randall R, Blake-Kalff MMA. Detoxification of xenobiotics in plant cells by glutathione conjugation and vacuolar compartmentalization: a fluorescent assay using monochlorobimane. *Plant Cell Environ* 1997;20:449–60.

[74] Lo Piero AR, Puglisi I, Petrone G. Gene isolation, analysis of expression, and in vitro synthesis of glutathione S-transferase from orange fruit [*Citrus sinensis* L.(Osbeck)]. *J Agric Food Chem* 2006;54:9227–33.

[75] Lo Piero AR. The state of the art in biosynthesis of anthocyanins and its regulation in pigmented sweet oranges [(*Citrus sinensis*) L. Osbeck]. *J Agric Food Chem* 2015;63:4031–41.

[76] Walbot V. Sources and consequences of phenotypic and genotypic plasticity in flowering plants. *Trends Plant Sci* 1996;1:27–32.

[77] Zhao J. Flavonoid transport mechanisms: How to go, and with whom. *Trends Plant Sci* 2015;20:576–85. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.06.007>.

[78] Loyall L, Uchida K, Braun S, Furuya M, Frohnmeyer H. Glutathione and a UV Light-Induced Glutathione S-Transferase Are Involved in Signaling to Chalcone Synthase in Cell Cultures. vol. 12. 1939.

[79] Kumar Agrawal G, Jwa N-S, Rakwal R. A pathogen-induced novel rice (*Oryza sativa* L.) gene encodes a putative protein homologous to type II glutathione S-transferases. 2002.

[80] Liu YJ, Han XM, Ren LL, Yang HL, Zeng QY. Functional divergence of the glutathione S-transferase supergene family in *Physcomitrella patens* reveals complex patterns of large gene family evolution in land plants. *Plant Physiol* 2013;161:773–86. <https://doi.org/10.1104/pp.112.205815>.

[81] Pérez-Díaz R, Madrid-Espinoza J, Salinas-Cornejo J, González-Villanueva E, Ruiz-Lara S. Differential roles for VviGST1, VviGST3, and VviGST4 in proanthocyanidin and anthocyanin transport in *Vitis vinifera*. *Front Plant Sci* 2016;7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01166>.

- [82] Kitamura S, Akita Y, Ishizaka H, Narumi I, Tanaka A. Molecular characterization of an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in cyclamen. *J Plant Physiol* 2012;169:636–42. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.12.011>.
- [83] Hu B, Zhao J, Lai B, Qin Y, Wang H, Hu G. LcGST4 is an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in Litchi chinensis Sonn. *Plant Cell Rep* 2016;35:831–43. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1924-4>.
- [84] El-Sharkawy I, Liang D, Xu K. Transcriptome analysis of an apple (*Malus × domestica*) yellow fruit somatic mutation identifies a gene network module highly associated with anthocyanin and epigenetic regulation. *J Exp Bot* 2015;66:7359–76. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv433>.
- [85] Cheng J, Liao L, Zhou H, Gu C, Wang L, Han Y. A small indel mutation in an anthocyanin transporter causes variegated colouration of peach flowers. *J Exp Bot* 2015;66:7227–39. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv419>.
- [86] Sanderson MJ, Driskell AC. The challenge of constructing large phylogenetic trees. *Trends Plant Sci* 2003;8:374–9. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00165-1](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00165-1).
- [87] Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, Brown CT, Probst AJ, Castelle CJ, et al. A new view of the tree of life. *Nat Microbiol* 2016;1. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48>.
- [88] Abaza S. What is and why do we have to know the phylogenetic tree? *Parasitologists United Journal* 2020;13:68–71. <https://doi.org/10.21608/puj.2020.35843.1082>.
- [89] AJ D, CS B, SSN M, JK L. Applied aspects of methods to infer phylogenetic relationships amongst fungi. *Mycosphere* 2020;11:2652–76. <https://doi.org/10.5943/MYCOSPHERE/11/1/18>.
- [90] Zou Y, Zhang Z, Zeng Y, Hu H, Hao Y, Huang S, et al. Common Methods for Phylogenetic Tree Construction and Their Implementation in R. *Bioengineering* 2024;11. <https://doi.org/10.3390/bioengineering11050480>.
- [91] Wang Z, Sun J, Gao Y, Xue Y, Zhang Y, Li K, et al. Fusang: a framework for phylogenetic tree inference via deep learning. *Nucleic Acids Res* 2023;51:10909–23. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad805>.
- [92] Balaban M, Jiang Y, Roush D, Zhu Q, Mirarab S. Fast and accurate distance-based phylogenetic placement using divide and conquer. *Mol Ecol Resour* 2022;22:1213–27. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13527>.
- [93] Vaz C, Nascimento M, Carriço JA, Rocher T, Francisco AP. Distance-based phylogenetic inference from typing data: A unifying view. *Brief Bioinform* 2021;22. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa147>.

- [94] Coorens THH, Spencer Chapman M, Williams N, Martincorena I, Stratton MR, Nangalia J, et al. Reconstructing phylogenetic trees from genome-wide somatic mutations in clonal samples. *Nat Protoc* 2024;19:1866–86. <https://doi.org/10.1038/s41596-024-00962-8>.
- [95] Scossa F, Fernie AR. Ancestral sequence reconstruction - An underused approach to understand the evolution of gene function in plants? *Comput Struct Biotechnol J* 2021;19:1579–94. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.03.008>.
- [96] Ojha KK, Mishra S, Singh VK. Computational molecular phylogeny: concepts and applications. *Bioinformatics* 2022;67–89.
- [97] Kapli P, Yang Z, Telford MJ. Phylogenetic tree building in the genomic age. *Nat Rev Genet* 2020;21:428–44. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0233-0>.
- [98] Wang Y, Chen S, Yu O. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;91:949–56. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3449-2>.
- [99] Lim SS, Jung SH, Ji J, Shin KH, Keum SR. Synthesis of flavonoids and their effects on aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2001;53:653–68.
- [100] Mavel S, Dikic B, Palakas S, Emond P, Greguric I, de Gracia AG, et al. Synthesis and biological evaluation of a series of flavone derivatives as potential radioligands for imaging the multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1/MRP1). *Bioorg Med Chem* 2006;14:1599–607.
- [101] Yan Y, Li Z, Koffas MAG. High-yield anthocyanin biosynthesis in engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 2008;100:126–40. <https://doi.org/10.1002/bit.21721>.
- [102] Zhao S, Jones JA, Lachance DM, Bhan N, Khalidi O, Venkataraman S, et al. Improvement of catechin production in *Escherichia coli* through combinatorial metabolic engineering. *Metab Eng* 2015;28:43–53. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.12.002>.
- [103] Jones JA, Vernacchio VR, Sinkoe AL, Collins SM, Ibrahim MHA, Lachance DM, et al. Experimental and computational optimization of an *Escherichia coli* co-culture for the efficient production of flavonoids. *Metab Eng* 2016;35:55–63. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.01.006>.
- [104] de Pascual-Teresa S, Moreno DA, García-Viguera C. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence. *Int J Mol Sci* 2010;11:1679–703. <https://doi.org/10.3390/ijms11041679>.
- [105] Goossens A, Häkkinen ST, Laakso I, Oksman-Caldentey K-M, Inzé D. American Society of Plant Biologists (ASPB) Secretion of Secondary Metabolites by ATP-Binding Cassette Transporters in Plant Cell Suspension Cultures. vol. 131. 2003.

- [106] Marrs KA, A, Mark R., Lloyd AM, Walbot V. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2 1995;375:397–400.
- [107] Zha J, Zang Y, Mattozzi M, Plassmeier J, Gupta M, Wu X, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for anthocyanin production. *Microb Cell Fact* 2018;17:1–13.
- [108] Dunlop MJ, Dossani ZY, Szmidt HL, Chu HC, Lee TS, Keasling JD, et al. Engineering microbial biofuel tolerance and export using efflux pumps. *Mol Syst Biol* 2011;7. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.21>.
- [109] Yazaki K. Transporters of secondary metabolites. *Curr Opin Plant Biol* 2005;8:301–7. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.03.011>.
- [110] Lim CG, Wong L, Bhan N, Dvora H, Xu P, Venkiteswaran S, et al. Development of a recombinant *Escherichia coli* strain for overproduction of the plant pigment anthocyanin. *Appl Environ Microbiol* 2015;81:6276–84. <https://doi.org/10.1128/AEM.01448-15>.
- [111] Yan Y, Huang L, Koffas MAG. Biosynthesis of 5-deoxyflavanones in microorganisms. *Biotechnol J* 2007;2:1250–62. <https://doi.org/10.1002/biot.200700119>.
- [112] He XZ, Li WS, Blount JW, Dixon RA. Regioselective synthesis of plant (iso)flavone glycosides in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008;80:253–60. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1554-7>.
- [113] Beekwilder J, Van der Meer IM, Sibbesen O, Broekgaarden M, Qvist I, Mikkelsen JD, et al. Microbial production of natural raspberry ketone. *Biotechnol J* 2007;2:1270–9. <https://doi.org/10.1002/biot.200700076>.
- [114] Wu J, Du G, Chen J, Zhou J. Enhancing flavonoid production by systematically tuning the central metabolic pathways based on a CRISPR interference system in *Escherichia coli*. *Sci Rep* 2015;5. <https://doi.org/10.1038/srep13477>.
- [115] Yang SM, Han SH, Kim BG, Ahn JH. Production of kaempferol 3-O-rhamnoside from glucose using engineered *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2014;41:1311–8. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1465-9>.
- [116] Shrestha B, Pandey RP, Darsandhari S, Parajuli P, Sohng JK. Combinatorial approach for improved cyanidin 3-O-glucoside production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 2019;18. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1056-6>.
- [117] Cress BF, Leitz QD, Kim DC, Amore TD, Suzuki JY, Linhardt RJ, et al. CRISPRi-mediated metabolic engineering of *E. coli* for O-methylated anthocyanin production. *Microb Cell Fact* 2017;16. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0623-3>.

- [118] Zha J, Koffas MAG. Production of anthocyanins in metabolically engineered microorganisms: Current status and perspectives. *Synth Syst Biotechnol* 2017;2:259–66. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.10.005>.
- [119] Lim CG, Fowler ZL, Hueller T, Schaffer S, Koffas MAG. High-yield resveratrol production in engineered *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:3451–60.
- [120] Leonard E, Yan Y, Koffas MAG. Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*. *Metab Eng* 2006;8:172–81. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2005.11.001>.
- [121] Xu P, Vansiri A, Bhan N, Koffas MAG. EPathBrick: A synthetic biology platform for engineering metabolic pathways in *E. coli*. *ACS Synth Biol* 2012;1:256–66. <https://doi.org/10.1021/sb300016b>.
- [122] Akdemir H, Silva A, Zha J, Zagorevski D V., Koffas MAG. Production of pyranoanthocyanins using *Escherichia coli* co-cultures. *Metab Eng* 2019;55. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.05.008>.
- [123] Jiang H, Wood K V., Morgan JA. Metabolic engineering of the phenylpropanoid pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:2962–9. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.2962-2969.2005>
- [124] Pyne ME, Narcross L, Martin VJJ. Engineering plant secondary metabolism in microbial systems. *Plant Physiol* 2019;179:844–61. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01291>.
- [125] Hwang E Il, Kaneko M, Ohnishi Y, Horinouchi S. Production of plant-specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:2699–706. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2699-2706.2003>.
- [126] Wrolstad RE. Anthocyanin pigments—Bioactivity and coloring properties. *J Food Sci* 2004;69:C419–25.
- [127] Jackman RL, Yada RY, Tung MA, Speers RA. Anthocyanins as food colorants—a review. *J Food Biochem* 1987;11:201–47.
- [128] Heredia FJ, Francia-Aricha EM, Rivas-Gonzalo JC, Vicario IM, Santos-Buelga C. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes—I. pH effect. *Food Chem* 1998;63:491–8.
- [129] Torskangerpoll K, Andersen ØM. Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chem* 2005;89:427–40.
- [130] Miguel MG. Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *J Appl Pharm Sci* 2011;7–15.

- [131] Bowen-Forbes CS, Zhang Y, Nair MG. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of Food Composition and Analysis* 2010;23:554–60.
- [132] Mojica L, Berhow M, de Mejia EG. Black bean anthocyanin-rich extracts as food colorants: Physicochemical stability and antidiabetes potential. *Food Chem* 2017;229:628–39.
- [133] Jones JA, Vernacchio VR, Collins SM, Shirke AN, Xiu Y, Englaender JA, et al. Complete Biosynthesis of Anthocyanins Using *E. coli* Polycultures 2017. <https://doi.org/10.1128/mBio>.
- [134] Eichenberger M, Schwander T, Hüppi S, Kreuzer J, Mittl PRE, Peccati F, et al. The catalytic role of glutathione transferases in heterologous anthocyanin biosynthesis. *Nat Catal* 2023;6:927–38. <https://doi.org/10.1038/s41929-023-01018-y>.
- [135] Marisch K, Bayer K, Cserjan-Puschmann M, Luchner M, Striedner G. Evaluation of three industrial *Escherichia coli* strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production. *Microb Cell Fact* 2013;12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-58>.
- [136] Studier FW, Moffattf BA. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. vol. 189. 1986.
- [137] Choi JH, Keum KC, Lee SY. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chem Eng Sci* 2006;61:876–85. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2005.03.031>.
- [138] Balzer S, Kucharova V, Megerle J, Lale R, Brautaset T, Valla S. A comparative analysis of the properties of regulated promoter systems commonly used for recombinant gene expression in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 2013;12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-26>.
- [139] Tolia NH, Leemor &, -Tor J. Strategies for protein coexpression in *Escherichia coli*. vol. 3. 2006.
- [140] Akhtar MK, Jones PR. Construction of a synthetic YdbK-dependent pyruvate:H₂ pathway in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Metab Eng* 2009;11:139–47. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.01.002>.
- [141] Wu J, Du G, Zhou J, Chen J. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for (2S)-pinocembrin production from glucose by a modular metabolic strategy. *Metab Eng* 2013;16:48–55. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.11.009>.
- [142] Xu P, Gu Q, Wang W, Wong L, Bower AGW, Collins CH, et al. Modular optimization of multi-gene pathways for fatty acids production in *E. coli*. *Nat Commun* 2013;4. <https://doi.org/10.1038/ncomms2425>.
- [143] Fang MY, Zhang C, Yang S, Cui JY, Jiang PX, Lou K, et al. High crude violacein production from glucose by *Escherichia coli* engineered with interactive

control of tryptophan pathway and violacein biosynthetic pathway. *Microb Cell Fact* 2015;14. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0192-x>.

[144] Glick BR. 0734-9750(95)00004-6 Metabolic Load and Heterologous Gene Expression. vol. 13. 1995.

[145] Ramchuran SO, Holst O, Karlsson EN. Effect of postinduction nutrient feed composition and use of lactose as inducer during production of thermostable xylanase in *Escherichia coli* glucose-limited fed-batch cultivations. *J Biosci Bioeng* 2005;99:477–84. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.477>.

[146] Jones KL, Kim S-W, Keasling JD. Low-Copy Plasmids can Perform as Well as or Better Than High-Copy Plasmids for Metabolic Engineering of Bacteria. vol. 2. 2000.

[147] Ramchuran SO, Holst O, Karlsson EN. Effect of postinduction nutrient feed composition and use of lactose as inducer during production of thermostable xylanase in *Escherichia coli* glucose-limited fed-batch cultivations. *J Biosci Bioeng* 2005;99:477–84. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.477>.

[148] Silva F, Queiroz JA, Domingues FC. Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv* 2012;30:691–708. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.12.005>.

[149] Kosinski MJ, Rinas U, Bailey JE. Isopropyl-i-D-thiogalactopyranoside influences the metabolism of *Escherichia coli*. vol. 36. 1992.

[150] Perfeito L, Ghozzi S, Berg J, Schnetz K, Lässig M. Nonlinear fitness landscape of a molecular pathway. *PLoS Genet* 2011;7. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002160>.

[151] Sørensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 2005;115:113–28. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.08.004>.

[152] Wilmouth RC, Turnbull JJ, Welford RWD, Clifton IJ, Prescott AG, Schofield CJ. Structure and Mechanism of Anthocyanidin Synthase from *Arabidopsis thaliana*. vol. 10. 2002.

[153] Lecina M, Sarró E, Casablancas A, Gòdia F, Cairó JJ. IPTG limitation avoids metabolic burden and acetic acid accumulation in induced fed-batch cultures of *Escherichia coli* M15 under glucose limiting conditions. *Biochem Eng J* 2013;70:78–83. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.10.006>.

[154] Lozano Terol G, Gallego-Jara J, Sola Martínez RA, Cánovas Díaz M, De Diego Puente T. Engineering protein production by rationally choosing a carbon and nitrogen source using *E. Coli* BL21 acetate metabolism knockout strains. *Microb Cell Fact* 2019;18. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1202-1>.

- [155] Clomburg JM, Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: A platform for renewable fuels and chemicals. *Trends Biotechnol* 2013;31:20–8. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.10.006>.
- [156] Reitzer L. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annual Reviews in Microbiology* 2003;57:155–76.
- [157] Commichau FM, Forchhammer K, Stülke J. Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:167–72. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.01.001>.
- [158] Bren A, Park JO, Towbin BD, Dekel E, Rabinowitz JD, Alon U. Glucose becomes one of the worst carbon sources for *E. coli* on poor nitrogen sources due to suboptimal levels of cAMP. *Sci Rep* 6: 2–11 2016.
- [159] Lee S-Y. High cell-density culture of *e.coli* 1996;14:95–108.
- [160] Andersent KB, Von Meyenburg K. Are Growth Rates of *Escherichia coli* in Batch Cultures Limited by Respiration? vol. 144. 1980.
- [161] Patnaik R. Engineering complex phenotypes in industrial strains. *Biotechnol Prog*, vol. 24, 2008, p. 38–47. <https://doi.org/10.1021/bp0701214>.
- [162] Santos CNS, Koffas M, Stephanopoulos G. Optimization of a heterologous pathway for the production of flavonoids from glucose. *Metab Eng* 2011;13:392–400. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.02.002>.
- [163] Nair A, Sarma SJ. The impact of carbon and nitrogen catabolite repression in microorganisms. *Microbiol Res* 2021;251. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126831>.
- [164] Feng W, Xue W, Zhao Z, Wang H, Shi Z, Wang W, et al. Nitrogen Level Impacts the Dynamic Changes in Nitrogen Metabolism, and Carbohydrate and Anthocyanin Biosynthesis Improves the Kernel Nutritional Quality of Purple Waxy Maize. *Plants* 2024;13. <https://doi.org/10.3390/plants13202882>.
- [165] Zhu S, Wu J, Du G, Zhou J, Chen J. Efficient synthesis of eriodictyol from l-tyrosine in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2014;80:3072–80. <https://doi.org/10.1128/AEM.03986-13>.
- [166] Wu J, Zhang X, Zhou J, Dong M. Efficient biosynthesis of (2S)-pinocembrin from D-glucose by integrating engineering central metabolic pathways with a pH-shift control strategy. *Bioresour Technol* 2016;218:999–1007. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.066>.
- [167] Stahlhut SG, Siedler S, Malla S, Harrison SJ, Maury J, Neves AR, et al. Assembly of a novel biosynthetic pathway for production of the plant flavonoid fisetin in *Escherichia coli*. *Metab Eng* 2015;31:84–93. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.07.002>.

- [168] Delmulle T, De Maeseneire SL, De Mey M. Challenges in the microbial production of flavonoids. *Phytochemistry Reviews* 2018;17:229–47.
- [169] Sheng H, Sun X, Yan Y, Yuan Q, Wang J, Shen X. Metabolic Engineering of Microorganisms for the Production of Flavonoids. *Front Bioeng Biotechnol* 2020;8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.589069>.
- [170] Wang R, Zhao S, Wang Z, Koffas MA. Recent advances in modular co-culture engineering for synthesis of natural products. *Curr Opin Biotechnol* 2020;62:65–71. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.09.004>.
- [171] Thuan NH, Chaudhary AK, Van Cuong D, Cuong NX. Engineering co-culture system for production of apigenin in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2018;45:175–85. <https://doi.org/10.1007/s10295-018-2012-x>.
- [172] Ganesan V, Li Z, Wang X, Zhang H. Heterologous biosynthesis of natural product naringenin by co-culture engineering. *Synth Syst Biotechnol* 2017;2:236–42. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.08.003>.
- [173] Koopman F, Beekwilder J, Crimi B, Van Houwelingen A, Hall RD, Bosch D, et al. De novo production of the flavonoid naringenin in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. 2012.
- [174] Wu J, Yu O, Du G, Zhou J, Chen J. Fine-tuning of the fatty acid pathway by synthetic antisense RNA for enhanced (2S)-naringenin production from L-tyrosine in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2014;80:7283–92. <https://doi.org/10.1128/AEM.02411-14>.
- [175] Dixon DP, Davis BG, Edwards R. Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants: identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 2002;277:30859–69.
- [176] Sappl PG, Carroll AJ, Clifton R, Lister R, Whelan J, Harvey Millar A, et al. The *Arabidopsis* glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. *The Plant Journal* 2009;58:53–68.
- [177] Alfenito MR, Souer E, Goodman CD, Buell R, Mol J, Koes R, et al. Functional Complementation of Anthocyanin Sequestration in the Vacuole by Widely Divergent Glutathione S-Transferases. vol. 10. 1998.

ÖZGEÇMİŞ

Zeynep (AKYOL) KOÇAK, 2017 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Temel Bilimler Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2022 yılında tamamlayarak 2023 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı ve eğitimi devam etmektedir. Yüksek lisans süresince Tübitak 2210-A Yurtiçi Yüksek Lisans bursu almaya hak kazandı.



TEZ METNİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

Akyol Z, Akdemir H, Heterolog Antosiyanin Biyosentezinin Arttırılmasında *PhAN9* Glutasyon Transferazın Rolü (The Role of *PhAN9* Glutathione Transferase in Enhancing Heterologous Anthocyanin Biosynthesis), GTÜ 8. Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu



