

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

E. COLİ'DE HETEROLOG ANTOSİYANİN SENTEZİNDE
JAPON GENTİANASI GLUTATYON TRANSFERAZININ
ETKİSİ

TUGAY TÜRKYILMAZ

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

E. COLİ'DE HETEROLOG ANTOSİYANİN SENTEZİNDE
JAPON GENTİANASI GLUTATYON TRANSFERAZININ
ETKİSİ

TUGAY TÜRKYILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM
DALI

DANIŞMAN: DOÇ. DR. HÜLYA AKDEMİR KOÇ

MAYIS 2025

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL

**EFFECT OF JAPANESE GENTIANA GLUTATHIONE
TRANSFERASE ON HETEROLOGOUS
ANTHOCYANIN SYNTHESIS IN E. COLI**

TUGAY TÜRKYILMAZ

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

ADVISOR: ASSOC. PROF. DR. HÜLYA AKDEMİR KOÇ

MAY 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 Tugay TÜRKYILMAZ'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
hayat arkadaşına*

ÖZET

Çiçekli bitkilerde var olan ve bu bitkilerin meyve, yaprak ve çiçeklerine kırmızı, mor ve mavi renk veren; suda çözünebilen bir pigment olan antosiyaninler hem bu geniş renk paletine sahip olmaları hem de insan sağlığı üzerindeki olumlu özellikleri nedeniyle doğal gıda boyası olarak kullanılabilirler.

Antosiyaninlerin şu anda büyük çaplı üretimi sürdürülebilirlik ve tedarik sorunlarına rağmen doğrudan ham bitki materyallerinden ekstraksiyon yoluyla yapılmaktadır. Ancak, bu yöntemle ekstraksiyon sırasında kullanılan yüksek sıcaklık, basınç ve pH gibi değişen parametreler, antosiyaninlerin bozunmasına neden olur. Ayrıca, ticari seviyede antosiyanin üretimi için geniş tarım arazilerine gereksinim duyulur ve bu koşullarda da elde edilen ürünün kalitesi mevsime, bölgeye, bitkinin türüne, hasat zamanına ve yetiştirme koşullarına göre değişkenlik gösterebilir. Antosiyanin eldesini ticari olarak anlamlı hale getirebilmek için bitki hücre süspansiyon kültürleri ile çalışmalar yapılmıştır. Yüksek üretim maliyetleri ve bitkilerde genetiği değiştirilmiş hücre hatları kullanılmasının gerektirdiği biyogüvenlik düzenlemeleri antosiyaninlerin bitki süspansiyon kültürlerinde üretimini dezavantajlı hale getirmektedir. Antosiyaninlerin kimyasal sentezi üzerine çalışmalar yapılmış olmakla birlikte bildirilen yöntemler sınırlı ve karmaşıktır.

Bu nedenle, mikrobiyal yollarla üretim endüstriyel açıdan önemli bir alternatif yol olarak karşımıza çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda, antosiyanin biyosentez yolağındaki enzimler *Escherichia coli* veya *Saccharomyces cerevisiae* gibi prokaryot ve ökaryot organizmalara aktarılıp antosiyanin heterolog antosiyanin sentezi gerçekleştirilse de ticari olarak istenilen üretim seviyelerine ulaşamamıştır.

Bitkilerde, antosiyaninle ilişkili glutatyon transferazları kodlayan genlerin (arGSTler) downregülasyonu veya işlev kaybına yol açan mutasyonların, bitkilerde antosiyanin birikiminde önemli düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. arGSTlerin bu potansiyel özelliklerinden yola çıkılarak mayada 2023 yılında yapılan bir çalışmada antosiyanin biyosentezi için tasarlanan *S. cerevisiae* hücrelerine farklı arGST kodlayıcı genlerin eklenmesi, siyanidin 3-O-glukozit (kırmızı-turuncu renkli antosiyanin) verimini büyük oranda arttırmıştır.

Tez kapsamında yapılan çalışmada, *E. coli* hücrelerinde heterolog antosiyanin üretimindeki etkisinin belirlenmesi için, GtGST (*Gentiana triflora* × *Gentiana scabra* GST) glutatyon transferaz geni, C3G rekombinantı hücrelere klonlanmıştır. C3G rekombinantı ve GST rekombinantı hücrelerdeki C3G üretiminin arttırılması için farklı inokülasyon oranları, IPTG uyarım zamanları, IPTG konsantrasyonları, karbon kaynağı, nitrojen kaynağı ve örnek toplama zamanları test edilerek optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. C3G varlığının doğrulanması ve miktar tayini için HPLC analizi yapılmıştır. Bu optimizasyonlar sonucunda, GST rekombinantlarında 70 mg/L siyanidin 3-O-glukozit elde edilerek, antosiyanin üretimi GST geni içermeyen C3G rekombinantı hücrelerin 5 katına çıkmıştır.

E. coli'de heterolog antosiyanin biyosentezine GST genlerinin klonlanması stratejisi, endüstriyel anlamda antosiyanin üretici soyların geliştirilmesi ve bu pigmentlerin gıda ve nutrasötik sektörlerde sürdürülebilir üretimi için umut vaat etmektedir. Bu tez çalışması 124Z462 numaralı TÜBİTAK araştırma projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antosiyanin, *E. coli*, Glutatyon Transferaz

ABSTRACT

Anthocyanins are water soluble pigments found in flowering plants and give red, purple, and blue colors. They are preferred as natural food colorants due to their wide color spectrum and their positive properties on human health. Their large-scale production is carried out directly from raw plant materials by extraction, despite sustainability and supply problems. Varying parameters such as high temperature, pressure and pH used during extraction of anthocyanins from raw plant materials can lead to the degradation of anthocyanins. Additionally, large scale anthocyanin production requires large agricultural lands, and the quality of the product may vary depending on the season, region, plant species, harvest time and cultivation conditions. Studies have been conducted on plant cell suspension cultures to make anthocyanin production commercially viable. High production costs and biosafety regulations required using genetically modified cell lines in plants make the production of anthocyanins in plant suspension cultures disadvantageous. Although studies have been conducted on the chemical synthesis of anthocyanins, the reported methods are limited and complex. So, microbial production is an important alternative for industrial use. In several studies, enzymes in the anthocyanin biosynthesis pathway were transferred to prokaryotic and eukaryotic organisms such as *Escherichia coli* or *Saccharomyces cerevisiae* enabling heterologous anthocyanin synthesis. But commercially desired production levels still could not be achieved. In plants, it has been determined that downregulation or loss-of-function mutations in genes encoding anthocyanin-related glutathione transferases (arGSTs) cause a significant decrease in anthocyanin accumulation. Based on the potential of arGSTs, a 2023 study introduced various arGST-encoding genes into engineered *S. cerevisiae* cells designed for anthocyanin biosynthesis, which led to a substantial increase in the yield of cyanidin 3-O-glucoside (a red-orange anthocyanin). In the thesis study, the glutathione transferase gene *GtGST* (from *Gentiana triflora* × *Gentiana scabra*) was cloned into C3G recombinant *Escherichia coli* cells to determine its effect on heterologous anthocyanin production. Optimization studies were carried out to increase C3G production in both C3G and GST recombinant cells by testing different inoculation ratios, IPTG induction times, IPTG concentrations, carbon and nitrogen sources, and sampling times. HPLC analysis was performed to confirm the presence and quantify the amount of C3G. As a result of these optimizations, 70 mg/L of cyanidin 3-O-glucoside was obtained in GST recombinants, representing a fivefold increase compared to C3G recombinants lacking the GST gene. The strategy of cloning GST genes for heterologous anthocyanin biosynthesis in *E. coli* holds promise for the development of industrial anthocyanin-producing strains and for the sustainable production of these pigments in the food and nutraceutical sectors. This thesis was carried out within the scope of the TÜBİTAK research project number 124Z462.

Keywords: Anthocyanin, *E. coli*, Glutathione Transferase

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasını yapmama olanak sağlayan danışmanım Doç. Dr. Hülya AKDEMİR KOÇ'a, çalışmalarım boyunca yaptığı değerli katkıları, hoşgörüsü, desteği ve ilgisi için teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca sorularımı cevapsız bırakmayan Dr. Hüseyin BALCI'ya, Dr. Gamze ŞEKER'e ve Prof. Dr. Nuri Öztürk'e teşekkür ederim.

Bu tez çalışması 124Z462 numaralı TÜBİTAK araştırma projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Bilim İnsanı Destekleme ve Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2210/A Ulusal Yüksek Lisans/Yüksek Lisans Burs Programı'na Yüksek Lisans öğrenimimde burs sağladıkları için teşekkür ederim.

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

Laboratuvarda birlikte çalıştığımız, deney süreçlerinde yardımını ve desteğini esirgemeyen Zeynep KOÇAK'a, Esra KAYNAK'a, Sena USTA'ya ve İlayda YILMAZ'a teşekkür ederim.

Beni her kararında destekleyen, yanımda olan, bana yol gösteren hayat arkadaşım Ceylin KARATEPE'ye teşekkür ederim.

Maddi ve manevi her zaman yanımda olan, beni hiç yalnız bırakmayan canım annem İlknur YAVUZIRMAK'a ve canım anneannem Fadime YAVUZIRMAK'a destekleri için teşekkür ederim.

Yüksek lisans ve tez süresince yanımda olup hayatı daha çekilir kılarak bu tezin ortaya çıkmasında büyük rolleri olan minik dostlarım Balım'a, Papatya'ya ve Kuki'ye 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. Antosiyaninler	2
1.1.1. Antosiyaninlerin Kimyasal Yapısı	3
1.2. Antosiyaninlerin Biyosentezi	5
1.3. Doğal ve Sentetik Renklendiriciler	8
1.4. Antosiyanin Üretim Yöntemleri	14
1.5. Antosiyaninlerin Mikrobiyal Üretimi	16
1.6. Glutasyon S-Transferaz Enziminin Antosiyanin Sentezindeki Önemi	18
1.6.1. <i>GtGST</i> Glutasyon Transferazı	22
1.7. Tezin Amacı	24
2. MATERYAL	25
2.1. Kimyasallar	25
2.2. Kitler ve Enzimler	27
2.3. Cihazlar	27
2.4. Besiyerleri ve Çözeltiler	28
2.4.1. Improved Buffer	28
2.4.2. 50× TAE Buffer	29
2.4.3. LB Broth ve LB Agar	29
2.4.4. AMM (Andrew's Magic Media) Besiyeri Bileşenleri	29
2.5. <i>GtGST</i> Glutasyon S-Transferaz Geninin Sentezi	32
2.6. C3G Rekombinantı ve GST Rekombinantı Hücrelerin Transformasyonu	33
2.7. -20 °C ve -80 °C Gliserol Stoklarının Hazırlanması	34
3. YÖNTEM	35
3.1. Kompetan Hücre Hazırlanması	35
3.2. <i>E. coli</i> DH5α Hücrelerine pUC67- <i>GtGST</i> Plazmitinin Transformasyonu	36
3.3. Miniprep Protokolü	36
3.4. Klonlama Protokolü	37
3.5. Klonların Doğrulanması	39
3.5.1. Restriksiyon Enzim Kesimi ile Klonların Doğrulanması	39
3.5.2. PCR ile Doğrulama	40
3.6. GST Rekombinantı ve Siyanidin 3-O-Glukozit Üreticisi (C3G) <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Hücrelerinin Hazırlanması	41
3.7. Büyüme Eğrisinin Hazırlanması	43
3.8. Substrat, IPTG ve HPLC Çözeltilerinin Hazırlanması	43

3.9. Kùltür Şartları Optimizasyonu	43
3.10. HPLC Analizi	44
3.11. C3G'nin UV-VIS Karakterizasyonu	45
4. BULGULAR	46
4.1. Glutasyon Transferaz Geni <i>GtGST</i> 'nin Klonlanması ve Transformasyonu	46
4.1.1 pUC57- <i>GtGST</i> İçeren <i>E. coli</i> DH5α Hùcrelerinin Plazmit İzolasyon Sonucu	46
4.1.2. <i>GtGST</i> Geninin pCDM4 Plazmitine Klonlanması	46
4.2. pCDM4- <i>GtGST</i> Klonlarının Molekùler Doğrulanması	48
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	49
4.2.3. PCR ile Klonların Doğrulanması	50
4.3. Kontrol Grubu ve GST Klonu <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Hùcrelerinin Transformasyonu	50
4.4. C3G Üreticisi <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Hùcrelerinin Büyüme Eğrisi	51
4.5. Hùcre Kùltüründen Elde Edilen C3G'nin UV-VIS Karakterizasyonu	52
4.6 C3G Standartlarıyla Yapılan Kalibrasyon Eğrisi	53
4.7. Siyanidin 3-O-glukozit (C3G) Üretimi İçin Kùltür Şartlarının Optimize Edilmesi	54
4.7.1. Kùltür Hacim Oranının C3G Üretimine Etkisi	54
4.7.2. C3G Üretiminin Arttırılmasında Kùltürlerin İnokülasyonun Oranının Etkisi	55
4.7.3. Farklı IPTG Uyarım Zamanlarının (Post-İndüksiyon) C3G Üretimine Etkisi	56
4.7.4. Farklı IPTG Konsantrasyonlarının C3G Üretimine Etkisi	57
4.7.5. Farklı Glukoz, Farklı IPTG ve Farklı Örnek Toplama Zamanlarının C3G Üretimine Etkisi	59
4.7.6. Farklı Nitrojen Kaynaklarının C3G Üretimine Etkisi	61
4.7.7. Farklı Şeker Kaynaklarının C3G Üretimine Etkisi	63
5. TARTIŞMA	64
KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ	90
TEZ ÇALIŞMASI KAPSAMINDA YAPILAN YAYINLAR	91

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	: di-Amonyum Fosfat
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	: Amonyum Molibdat
μl	: Mikrolitre
$^\circ\text{C}$	: Santigrat derece
Bp	: Baz Çifti
$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot \text{HCl}$	: Tiamin Hidroklorür
C3G	: Cyanidin-3-O-glucoside/ Siyanidin 3-O-glukozit
CaCl_2	: Kalsiyum Klorür
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	: Kalsiyum Klorür Dihidrat
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	: Bakır (II) Sülfat Pentahidrat
dk	: Dakika
DMF	: N,N-dimetilformamid
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	: Demir (II) Sülfat Heptahidrat
g	: Gram
GST	: Glutasyon S-transferaz
GtGST	: <i>Gentiana triflora</i> Glutasyon S-transferaz
H_3BO_3	: Borik Asit
HCl	: Hidroklorik asit
IPTG	: İzopropil- β -D-tiyogalaktopiranozit
K_2HPO_4	: Potasyum Fosfat Dibazik
K_2SO_4	: Potasyum Sülfat
KH_2PO_4	: Potasyum Fosfat Monobazik
KOH	: Potasyum Hidroksit
L	: Litre
LB	: Luria Bertani Besiyeri
M	: Molar
mg	: Miligram
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	: Magnezyum Klorür Heksahidrat
MgSO_4	: Magnezyum Sülfat
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
MnCl_2	: Mangan Klorür
MOPS	: 4-Morpholinepropan Sülfonik Asit
NaCl	: Sodyum Klorür
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	: Sodyum Dihidrojen Fosfat Dihidrat
NH_4Cl	: Amonyum Klorür
sa	: Saat
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TAE	: Tris Bazı, Asetik Asit ve EDTA
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	: Çinko Sülfat Heptahidrat

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1: Bitkilerde bulunan fenolik bileşenler.	2
Şekil 1.2: Antosiyaninlerin genel yapısı.	3
Şekil 1.3: En çok bulunan antosiyanidinlerin kimyasal yapısı.	4
Şekil 1.4: Doğada en çok bulunan antosiyanin çeşitleri.	4
Şekil 1.5: Antosiyanin biyosentez yolağı.	6
Şekil 1.6: Antosiyaninlerin pH bağımlı kimyasal yapıları	13
Şekil 1.7: GtGST'nin Neighbor-Joining yöntemi ile oluşturulmuş filogenetik ağacı.	23
Şekil 2.1: GtGST'nin kodon optimize gen dizilimi.	33
Şekil 2.2: C3G üretimi için kullanılan plazmitler.	34
Şekil 4.1: <i>E. coli</i> DH5α hücrelerinden elde edilen pCDM4 plazmitlerinin <i>NdeI</i> ve <i>KpnI</i> ile kesim sonucunun %1'lik agaroz jel analizi.	47
Şekil 4.2: <i>E. coli</i> DH5α hücrelerinden elde edilen pUC57-GtGST plazmitlerinin <i>NdeI</i> ve <i>KpnI</i> ile kesim sonucunun %1'lik agaroz jel analizi.	47
Şekil 4.3: <i>XhoI</i> ile enzim kesimi ile doğrulama.	49
Şekil 4.4: <i>NdeI</i> ve <i>KpnI</i> enzim kesimi ile klonların doğrulanması.	49
Şekil 4.5: PCR ile klonların doğrulanması.	50
Şekil 4.6: C3G rekombinantı ve GST rekombinantı hücrelerden elde edilen C3G örnekleri.	51
Şekil 4.7: GST rekombinantı <i>E. coli</i> BL21 (DE3) hücrelerinin büyüme eğrisi grafiğı.	52
Şekil 4.8: C3G rekombinantı <i>E. coli</i> BL21 (DE3) hücrelerinin büyüme eğrisi grafiğı.	52
Şekil 4.9: Hücre kültüründen elde edilen C3G'nin UV-VIS karakterizasyonu.	53
Şekil 4.10: C3G standardı kalibrasyon eğrisi.	54
Şekil 4.11: Kültür hacim oranının C3G üretimine etkisi.	55
Şekil 4.12: Amino asit kaynağıının C3G üretimine etkisi.	56
Şekil 4.13: Farklı inokülasyon oranlarının C3G rekombinantı ve GST rekombinantı hücrelerde C3G üretimine etkisi.	57
Şekil 4.14: 0,05 mM IPTG ile farklı uyarım zamanlarının C3G üretimine etkisi.	58
Şekil 4.15: 0,1 mM IPTG ile farklı uyarım zamanlarının C3G üretimine etkisi.	59
Şekil 4.16: %1 inokülasyon ve farklı IPTG oranlarının C3G üretimine etkisi.	60
Şekil 4.17: %2,5 inokülasyon ve farklı IPTG oranlarının C3G üretimine etkisi.	60
Şekil 4.18: %2 glukoz ve farklı IPTG oranlarının C3G üretimine etkisi.	62
Şekil 4.19: %4 glukoz ve farklı IPTG oranlarının C3G üretimine etkisi.	63

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1: Kimyasal ve sarf malzemelerin listesi.	25
Tablo 2.2: Tez kapsamında kullanılan kitler, enzimler, belirteçler.	27
Tablo 2.3: Cihazların listesi.	28
Tablo 2.4: LB broth içeriği.	29
Tablo 2.5: LB agar içeriği.	29
Tablo 2.6: 10X tuz çözeltisi.	30
Tablo 2.7: Mikronütrient çözeltisi.	31
Tablo 2.8: 10X MOPS çözeltisi içeriği.	31
Tablo 2.9: %2 Glukoz içeren AMM besiyeri bileşenleri (1 litre için).	32
Tablo 3.1: Tez kapsamında kullanılan bakteri soyları ve vektörler.	35
Tablo 3.2: Restriksiyon enzim kesim tepkimesi.	37
Tablo 3.3: Ligasyon tepkimesi.	39
Tablo 3.4: pCDM4-GtGST plazmitinin <i>NdeI-KpnI</i> restriksiyon enzimi ile kesimi.	40
Tablo 3.5: pCDM4-GtGST plazmitinin <i>XhoI</i> restriksiyon enzimi ile kesimi.	40
Tablo 3.6: PCR protokolü reaktantları.	41
Tablo 3.7: PCR döngüsü.	41
Tablo 3.8: GST geninin C3G üreten hücrelere aktarımı	42
Tablo 3.9: C3G üretiminin arttırılması için yapılan optimizasyonlar.	44
Tablo 3.10: HPLC analizinde kullanılan hareketli fazların oranları.	45
Tablo 4.1: pUC57-GtGST içeren <i>E. coli</i> DH5α hücrelerinin plazmit izolasyonuna ait nanodrop ölçüm sonuçları.	46
Tablo 4.2: GtGST geni ve pCDM4 plazmitinin agaroz jelden izolasyonu ile elde edilen DNA konsantrasyonları.	48

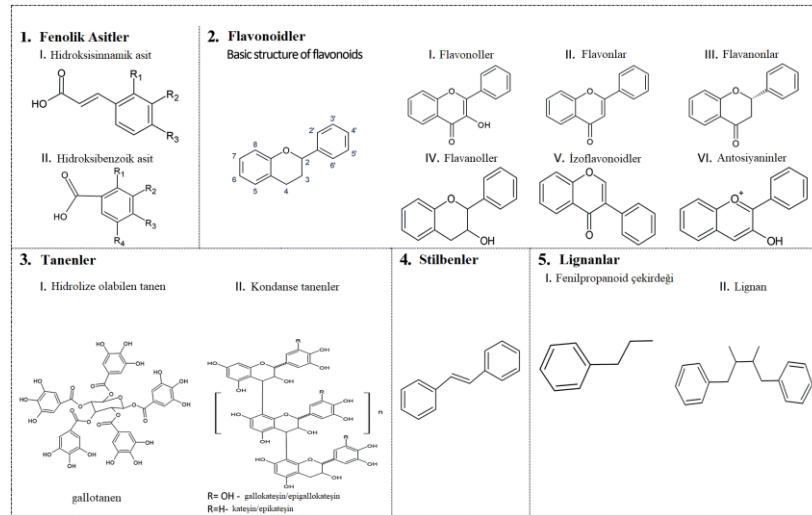
1. GİRİŞ

Canlıların hücrelerinde madde ve enerji değişimiyle elde ettikleri metabolitler yaşamsal gereklilik açısından ikiye ayrılır **(Demain ve Fang, 2000)**. Bunlardan, nükleik asit, protein, lipit ve karbonhidratlar “birincil metabolitler” olup, canlının varlığını ve yaşamını devam ettirmesi amacıyla ürettiği ve kullandığı moleküllerdir **(Demain ve Fang, 2000)**. “İkincil metabolitler” ise doğrudan canlının yaşamını devam ettirmesi için gerekli olmasa da çevreye olan uyumunun artırılmasında organizmaya avantaj sağlayan moleküllerdir **(Demain ve Fang, 2000)**.

Fenolik bileşikler, bitkilerde en çok bulunan ikincil metabolitler olup bu zamana kadar 8000’den farklı çeşidi tanımlanmıştır. Bitkilerin çeşitli kısımlarında bulunan fenolik bileşenler, renklenme, tat ve stres direnci gibi çok çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli roller oynar. Doğal antioksidan, antimikrobiyal, antikarsinogenik ve antienflamatuvar etkinliklerinden dolayı bitki fenolikleri hem araştırma ve hem de kullanımları açısından en ilgi çekici sekonder metabolitlerdendir.

Fenolik bileşikler temelde bir veya daha çok hidroksil grup içeren bir aromatik halkadan oluşur ve kimyasal yapılarına göre, flavonoidler, fenolik asitler, tanninler, fenolik stilbenler ve fenolik lignanlar olmak üzere beş ana gruba ayrılırlar **(Alu’datt vd., 2017; Zhang vd., 2022)**.

Bitkilerdeki ikincil metabolitlerden olan flavonoidler iki aromatik halka ve bir oksijenli heterosiklik halka içeren bir fenolik bileşiktir **(Zhang vd., 2022)**. Fenolik bileşikler arasında en çok molekül çeşitliliğine sahip olan flavonoidlerin bitkilerde özellikle renklenme ve bitki-etkileşimi ile alakalı farklı görevleri tanımlanmıştır **(Zhang vd., 2022)**. Flavonoidler, UV ışınlarını absorbe ederek DNA bozulmasını engeller; çiçek ve meyvelerin renklenmesini sağlayarak tozlaşma ve tohum dağıtılmasına yardımcı olarak çoğalma şansını artırır; böceklerin ve otçulların bitkiyi yemesini engeller, patojenlere karşı toksik etki sağlar; antioksidan ve stres toleransı gibi etkileri vardır; legümlerin nodül oluşumunu sağlarlar **(Zhang vd., 2022)**. Doğada en çok bulunan flavonoidler; antosiyaninler, flavonoller, flavonlar, flavanonlar, flavanoller ve izoflavonlardır **(Şekil 1.1) (Zhang vd., 2022)**.



Şekil 1.1: Bitkilerde bulunan fenolik bileşenler (Albuquerque, Heleno, vd., 2021).

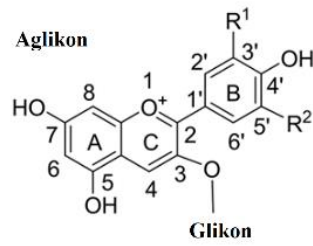
1.1. Antosiyaninler

Birçok bitki türünün içerdiği antosiyanini (Harborne, 1998) bir terim olarak 1835 yılında ilk kez Alman eczacı Ludwig Clamor Marquart tarafından, Die Farben der Blüthen adlı eserde Grekçe “anthos” (çiçek) ve “kyanos” (mavi) sözcüklerinin bir araya getirilerek çeşitli çiçeklerin mavi renkli pigmentini ayırt etmek için kullanılmıştır (Marquardt, 1835; Patra vd., 2022). 1913 yılında Richard Willstätter ve Arthur Stoll izole ettikleri pigmentlerin flavonoid türevleri olduğunu ortaya koydular. Alexander Robertson ve Robert Robinson kendilerine 20 sene sonra Nobel Kimya ödülünü kazandıracak olan 1927’deki çalışmaları ile antosiyaninlerin kimyasal yapılarını ve biyosentez yollarını açıkladılar (Robertson ve Robinson, 1927).

Çiçek, gövde, yapraklar, kökler ve meyveler dahil tüm bitki dokularında bulunan antosiyaninler; kırmızı, mavi ya da mor renk veren suda çözünebilen vakuoler pigmentlerin en büyük türüdür. Antosiyaninler; tahıllar, soğan gibi kök bitkileri, lahanalar, fasulyeler, kırmızı meyveler ve kırmızı şarapta bolca bulunur (Zhang vd., 2022). *In vitro* çalışmalar antosiyaninlerin, syncytial virüs, parainfluenza virüsü, herpes simplex, adenovirüs ve rotavirüsün replike olmalarını engellediklerini göstermiştir (Pour vd., 2019). Antosiyanince zengin meyve ve sebzeler, antioksidan özellikleri sayesinde kardiyovasküler hastalıkları, kanseri, diyabeti ve diğer kronik rahatsızlıkları azaltarak insan sağlığına fayda sağlar (Hu vd., 2020; Putta vd., 2017; Smeriglio vd., 2016; Sunil ve Shetty, 2022; Wallace vd., 2016).

1.1.1. Antosiyaninlerin Kimyasal Yapısı

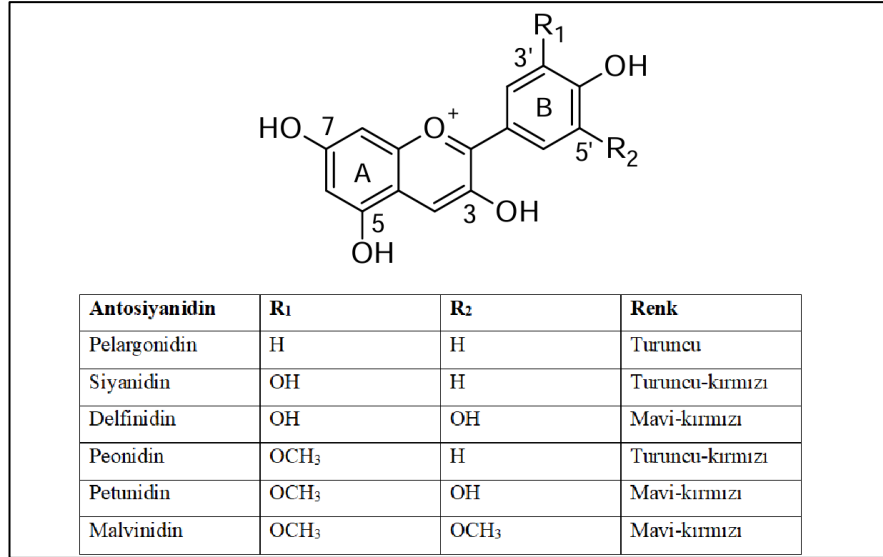
Antosiyaninler, 2 fenil halkası (A ve B halkaları, **Şekil 1.2**) ve bir heterosiklik pyran'ın (C halkası) A halkası ile birleşmiş bir karbon iskelete sahip antosiyanidin glukozitlerdir (**Castañeda-Ovando vd., 2009a**). Antosiyaninler, suda çözünme ve pH'ye göre renk değiştirme özelliklerini sağlayan, diğer flavonoidlerde olmayan flavylum katyonunu içerir (**Şekil 1.4**) ve antosiyanidin adı verilen şekerless (aglikon) yapıların şekerle birleşmesiyle meydana gelirler.



Glikon = D-glukoz, D-galaktoz, D-ksiloz, L-ramnoz, L-arabinoz

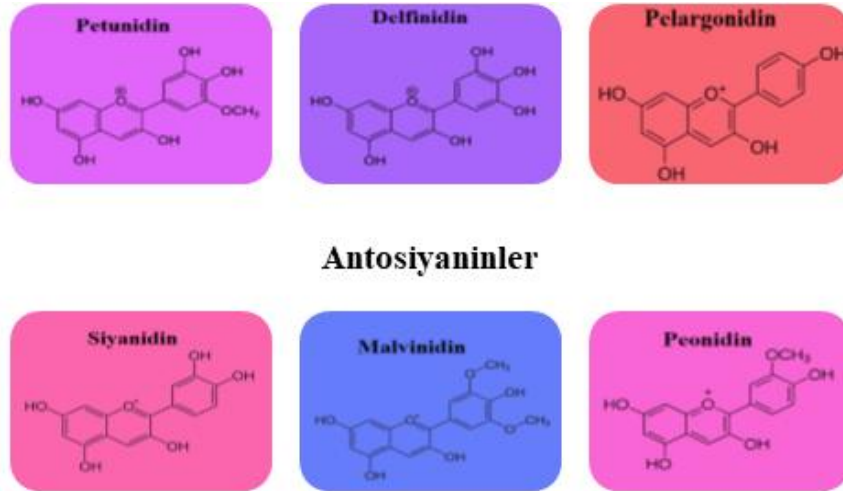
Şekil 1.2: Antosiyaninlerin genel yapısı (**Patra vd., 2022**).

Farklı hidroksil (-OH) ve metoksi (-OCH₃) gruplarıyla çeşitlenebilen siyanidin, pelargonidin, delphinidin, peonidin, malvinidin ve petunidin gibi aglikonlara sitoplazmada bulunan glukoziltransferazlar D-glukoz, L-ramnoz, L-arabinoz, D-galaktoz ve D-ksiloz gibi şekerler ekleyerek (**Pina vd., 2012**) çeşitli renk ve çözünürlükte antosiyaninler oluşur (**Şekil 1.3**). Eklenen şekerler genellikle 3-OH olmakla birlikte 5- veya 7- pozisyonları gibi antosiyanidinlerin farklı bölgelerine bağlanabilir (**Pina vd., 2012**).



Şekil 1.3: En çok bulunan antosiyanidinlerin kimyasal yapısı (Jing, 2006; Miguel, 2011).

Meyve ve sebzelerdeki antosiyanidinlerin dağılım oranları siyanidin %50, delfinidin %12, pelargonidin %12, peonidin %12, petunidin %7 ve malvidin %7'dir (Şekil 1.4) (Castañeda-Ovando vd., 2009b). Doğada var olan 27 antosiyanidinden bu 6'sı şimdiye kadar bildirilmiş tüm antosiyaninlerin %92'sini oluşturur (Houghton vd., 2021a; Nunez ve Magnuson, 2013).



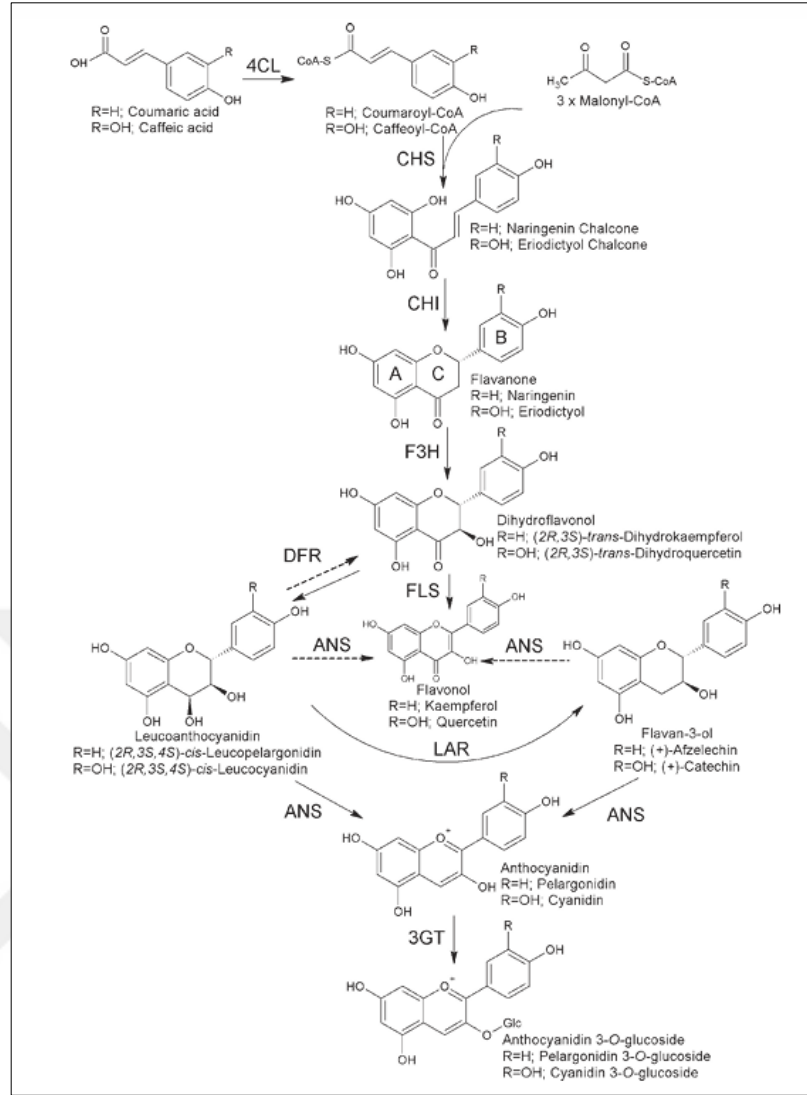
Şekil 1.4: Doğada en çok bulunan antosiyanin çeşitleri (Anthocyanins - Definition, Benefits, Sources, 2025).

B halkasına hidroksil veya metoksil grupların eklenmesiyle antosiyanidinlerin en yüksek ışık soğurma dalga boyu değişir ve bu da renklerinin turuncudan (pelargonidin) mavi-mora (malvidin) dönmesine neden olur (Sasaki ve Nakayama, 2015). B

halkasına daha fazla hidroksil grubunun eklenmesi, belirli koşullar altında antosiyaninlerin görünür ışıktaki en yüksek ışık soğurma dalga boyunu (λ_{max}) genellikle arttırır. Bu yüzden %1 HCl içeren metanol çözeltisinde pelargonidin 3-O-glukozitin değeri 510, siyanidin 3-O-glukozitin 530 ve delfinidin 3-O-glukozitin ise 543 nm'dir (Houghton vd., 2021b; Santiago vd., 2014).

1.2. Antosiyaninlerin Biyosentezi

Antosiyaninler farklı miktarlarda olmakla birlikte bitkilerin yaprak, çiçek, meyve, kök, gövde ve dallarında üretilirler. Temel flavanoid öncül molekülleri olan fenilalanin, şikimat/arogenate yolağından sağlanırken, malonil-CoA Krebs döngüsünden sağlanır (Davies, 2009). Daha sonra bu iki öncül, bir dizi enzimatik adımla modifiye edilerek antosiyaninleri üretecek flavonoid omurgasını oluşturmak üzere birleşir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5: Antosiyanin biyosentez yolağı (CHS, chalcone sentaz; CHI, chalcone izomeraz; F3H, flavanon 3-hidroksilaz; DFR, dihidroflavonol 4-reduktaz; ANS, antosiyanidin sentaz; 3GT, 3-O-glukoziltransferaz; FLS, flavonol sentaz) (Yan vd., 2008).

Antosiyanin biyosentezi fenilpropanoid yolağında, fenilalaninin 4-kumaroil-CoA'ya dönüştürülmesiyle başlar (Sunil ve Shetty, 2022). Chalcone sentaz (CHS), bir 4-kumaroil-CoA molekülü ile 3 adet malonil-CoA molekülünden naringenin chalcone sentezler (Durbin vd., 2000; Tian vd., 2006). Chalcone-flavanon isomeraz enzimi (CHI), naringenin chalcone'u stereospesifik izomeri olan naringenin flavanone'a dönüştürür. Flavanone 3-hidroksilaz (F3H) ile naringenin 3. pozisyonundan hidroksilenerek dihidrokaempferole dönüştürülür. F3'H (Flavonoid 3'-hidroksilaz) flavanoid B halkasını hidroksilleyerek dihidrokuersetini, F3'5'H (Flavonoid 3',5'-hidroksilaz) yine flavanoid B halkasını hidroksilleyerek dihidromirisetini meydana getirirler. Dihidroflavonol olan, dihidrokuersetin, dihidrokaempferol ve

dihidromirisetin DFR enzimi (dihidroflavonol 4-redüktaz) ile renksiz moleküller olan lükosiyanidin, lükopelargonidin ve lükodelfinidine dönüştürler. Sonrasında da antosiyanidin sentaz (ANS) enzimiyle renksiz olan lükosiyanidin, lükopelargonidin ve lükodelfinidin lükooantosiyanidinleri; renkli olan siyanidin, pelargonidin ve delfinidin antosiyanidinlerine dönüştürler **(Davies, 2009; Sunil ve Shetty, 2022)**.

Kararsız olan antosiyanidinler biyosentezlerinden sonra, sitozolde açılasyon, metilasyon ve glukozilasyon ile daha kararlı hale getirilirler. UDP-glukoz flavonoid glukosiltransferaz (UFGT ya da A3GT) enzimi, kararsız ara moleküller olan antosiyanidin ve lükooantosiyanidinleri 3-O-pozisyonlarına glukoz ekleyerek bu moleküllerin daha kararlı hale gelmesini sağlar **(Tanaka vd., 2008)**. Siyanidin 3-O-glukozit (C3G), delfinidin 3-O-glukozit (D3G) ve pelargonidin 3-O-glukozit (P3G) birbirlerinden B halkalarındaki hidroksil grup sayısına göre ayrılırlar. Bazı durumlarda da bu hidroksil grupların O-metil transferaz ile O-metillenmeleriyle malvinidin, peonidin ve petunidin gibi diğer antosiyanidinler üretilir **(Davies, 2009; Sunil ve Shetty, 2022)**.

Endoplazmik retikulumun sitoplazmik yüzeyinde üretilen antosiyaninler depolanma için vakuollere taşınır. Antosiyaninlerin, vakuollere taşınmasıyla alakalı şu anda üç ayrı tez vardır: Flavonoid/H⁺ antiporter ile, vezikül trafficking ile ve glutatyon S-transferazlar aracılığıyla **(Patra vd., 2022; Zhang vd., 2006; Zhao, 2015a; Zhao ve Dixon, 2010)**. Antosiyaninler vakuolde dört moleküler tür olarak bulunur ve bu moleküller dengededir. Bu moleküller flavylium cation, quinoidal base, carbinol pseudo base ve chalcone pseudo base'tir **(Prior ve Wu, 2006)**. Membran taşıyıcı temelde multidrug and toxic extrusion (MATE) transporterları ve ATP binding cassette (ABC) protein transporterlardan oluşur **(Francisco vd., 2013; Marinova vd., 2007)**. "Vesicle trafficking" ile taşınma mekanizmasında ise antosiyaninler endoplazmik retikulumdan köken alan vezikül benzeri yapıların içinde bir araya gelir ve bu yapıların vakuollerle birleşmesiyle vakuol içine taşınmış olur **(Ichino vd., 2014; Poustka vd., 2007)**. Tüm canlılarda var olan GST'ler ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, flavonoid metabolizasyonu, biyotik ve abiyotik stres cevaplarında kritik bir rol oynar **(Agrawal vd., 2002; Loyall vd., 2000; Moons, 2005; Pearson, 2005)**. GST'ler glutatyon konjugasyonlarını çeşitli elektrofilik bileşiklere katalizleyen dimerik enzimlerdir **(Dixon, Laphorn, vd., 2002)**. GST gen ailesi Tau, dehydro ascorbate reductase (DHAR), tetrachloro hydroquinone dehalogenase (TCHQD),

elongation factor 1 gamma (EF1G), Theta, Zeta, ve Phi olmak üzere 7 alt aileye (subfamily) ayrılır (Dixon, Lapthorn, vd., 2002). Antosiyanin taşınmasıyla ilişkili GST'lerden Tau alt ailesinden ZmBz2 hariç diğerleri bitkiye özgü Phi alt ailesindendirler (Kitamura vd., 2004a; Xue vd., 2022).

1.3. Doğal ve Sentetik Renklendiriciler

Yazı öncesi dönemlerden beri boyar maddeler süslemede, günlük yaşamda ve dini ritüellerde insanlar için çok önemli bir yer edinmiştir. Çeşitli mineral, liken, böcek ve hatta deniz salyangozlarının kabuklarının boyar madde olarak kullanılmasına ek olarak geniş bir renk yelpazesi sağladığı için bitki özleri de kullanılmıştır.

Doğada renkler meyve ve sebzelerin kalitesi hakkında bilgi veren temel belirteçlerdir. İnsanlar da diğer hayvanlar gibi tüketecekleri gıdaları öncelikle renkleriyle yargılar ve buna göre seçim yaparlar. Nüfusun artması ve işlenmiş gıda çeşitliliğinin çoğalması, yiyecek ve içecekleri daha cazip hale getirmek için renklendirici kullanımını artırmıştır. 18. ve 19. yüzyılda turşu ve yeşil sebzeler için bakır tuzu, tatlılara sarı ve kırmızı renk vermek için kurşun tuzu, kırmızı şekerlemeler için cıva sülfür, pastacılık ve baharatlarda arsenik ve cıva bileşenlerinin kullanımı ise 1925 yılında arsenik, kurşun, cıva gibi ağır metallerin yasaklanmasına kadar sürmüştür.

19. yüzyılın sonlarında kömür katranından elde edilen ve tekstil ile boya sanayisinde kullanılan sentetik boyalar, zamanla gıda sektörüne de girmiştir. Sentetik boyalar, genellikle petrokimyasal bileşiklerden, yani petrol türevlerinden elde edilir. Ancak, günümüzde çeşitli sağlık sorunlarına yol açtığı tespit edilen bu boyalar, yasal düzenlemelere tabidir. Şu anda yalnızca belirli sentetik boyaların kullanımına izin verilmekte olup, bu izinler AB, ABD ve diğer ülkelerde farklılık göstermektedir.

Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi'ne (FDA) göre bir renklendirici veya gıda boyası bir gıda, ilaç, kozmetik veya insan bedenine uygulandığında kendi başına veya tepkime ile renklendirebilme özelliğine sahip olan herhangi bir boya, pigment veya maddeye denir (Color Additives - Information for Consumers | FDA, 2025.; Novais vd., 2022).

Renklendiricilerin kimyasal yapıları, kökenleri ve kullanım amaçlarına göre sınıflandırmaları yapılmıştır. Bu sınıflandırmalar; kökene (doğal, doğala özdeş veya yapay; organik veya inorganik), çözünürlüğe (çözünür veya çözünmez) ve

örtücülüğüne (şeffaf veya opak) göre yapılır. Renklendiriciler genellikle doğal veya yapay olmalarına göre sınıflandırılırlar. Doğal boyalar bitki dokularında (kurkumin, karotenoidler, antosiyaninler, betalainler veya klorofiller), hayvan hücrelerinden (karminik asit ve kermesik asit), mikroorganizmaların metabolizmalarından (karotenoidler ve klorofiller) veya mineral kaynaklardan (titanyum dioksit veya kalsiyum karbonat) elde edilirken, yapay boyalar doğada bulunmazlar ve kimyasal yollarla üretilirler (**Albuquerque, Oliveira, vd., 2021; Novais vd., 2022**).

Günümüzde Avrupa Birliği'nde Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından onaylanmış 11 yapay gıda renklendiricisi bulunmaktadır. Bunlardan 6 tanesi için 2007 yılındaki Southampton çalışması ile “çocuklarda dikkat eksikliği ve hiperaktiviteye neden olabilir.” etiketi ile satışa sunulması zorunluluğu getirilmiştir. Tez kapsamında üretmeyi planladığımız, C3G (siyanidin 3-O-glukozit) kırmızı renkli bir pigment olduğu için bu bağlamda sadece AB’de onaylı 4 kırmızı sentetik boyaya ait literatür bilgisi verilmiştir: Ponceau 4R (E 124), Eritrosin (E 127), Allura Red AC (E 129) ve Carmoisine (E 122)’yi kullanım alanları, sağlık riskleri ve yasal durumları aşağıda ayrıntıları ile açıklanmıştır.

Ponceau 4R (E 124): Cochineal Red A, Brilliant Scarlet 4, New Coccine gibi farklı adlandırmaları da olan suda çözünebilen, kırmızı, anyonik monoazo boyadır (**Amchova vd., 2015**). Avrupa Birliği kimi sosis türleri, aromalı kremler, hardal aromalı meyveler, diyetetik gıdalar ve gıda takviyeleri, kızartmalık harçlar, somon yerine kullanılan ürünler, balık yumurtası, hardal, bitkisel protein bazlı et ve balık alternatifleri, alkollü içecekler, aromalı fermente süt ürünleri, şekerlemeler, sakız, süsleme, kaplama ve dolgu malzemeleri, et için süsleme ve kaplamalar, aromalı içecekler ve tatlılar gibi ürünlerde kullanımına izin vermektedir (**Lehto vd., 2017**). Üreme ve nörodavranışsal toksisite üzerine yapılan çalışmada erkek sıçanların ilk nesillerinde bilişsel bozukluklar kaydedilmiştir. Yapılan bu çalışmanın sınırlayıcı faktörü olarak dişi sıçanlarda tutarlı sonuçların bulunmamış olması, her gruptaki denek hayvan sayısının az olması ve verilen dozun çok yüksek olması sayılabilir (**Amchova vd., 2015; T. Tanaka, 2006**). Bir başka çalışmada farklı dozlarda Ponceau 4R’nin DNA hasarına etkisi fareler üzerinde incelenmiştir. Bu çalışmada çekirdek DNA’sının migrasyonunun çeşitli organlarda önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir ama çalışmanın yazarları bu etkinin sitotoksik nedenle olmayabileceği sonucuna varmışlardır (**Amchova vd., 2015; Tsuda vd., 2001**). EFSA paneli bu sonuçları önemli görüp bu

alanda daha çok çalışmanın yapılmasını önermiştir (**Aguilar vd., 2009; Amchova vd., 2015**). 2007’de McCann ve arkadaşları (**McCann vd., 2007**) tarafından yapay gıda boyalarının çocukların davranışları üzerindeki zararlı etkileri üzerine yürütülen ve genellikle Southampton çalışması olarak bilinen çalışma sonucunda Avrupa Birliği tartrazine, Quinoline Yellow, Sunset Yellow, Ponceau 4R, Allura Red ve carmoisine içeren gıdalara çocuklarda hiperaktivite ve dikkat bozukluğuna yol açabilir etiketi zorunluluğu getirilmiştir (**Lehto vd., 2017**). Öte yandan bu boya, ABD’de onaylı değildir (**Lehto vd., 2017**).

Eritrosin (E 127): Kırmızı ksantan bir boyadır (**Amchova vd., 2015**). Avrupa Birliği’nde kuru, şekerlenmiş kirazlarda kullanımında izinliyken Amerika Birleşik Devletleri’nde gıdalarda daha geniş bir kullanım alanı bulmaktadır (**Lehto vd., 2017**). Avrupa Birliği’ndeki gerçek tüketim alışkanlıklarına göre yapılan çalışmada ortalama tüketim miktarının riskli olan dozdan çok daha az olduğunu ortaya koymuştur (**Amchova vd., 2015**). Toksikokinetik veriler Eritrosinin mide-bağırsak yolunda iyi absorbe edilemediğini ortaya koymuştur (**Amchova vd., 2015**). Eritrosinin 4 iyot atomuna sahip olması dolayısıyla tiroid bezini negatif etkileme potansiyeline sahiptir (**Amchova vd., 2015**). Sıçanlarda üreme toksisitesi üzerine yapılan bir çalışmada Eritrosinin T4’ü T3’e dönüştürmesinden dolayı hipofiz bezinde TRH salgılanmasını arttırdığı gözlenmiştir. Bu Eritrosine maruz kalmış kemirgenlerde (rodent) tiroid tümörlerinin artışına yol açabilir (**Amchova vd., 2015; Jennings vd., 1990**). EFSA paneli, Avrupa Birliği’nde maruz kalınan Eritrosin miktarının azlığı ve yapılan klinik çalışmaların düşük dozlarda Eritrosinin zararlı etkilere neden olmamasından dolayı belirlenmiş olan günlük kabul edilebilir doz miktarında bir değişiklik yapmamıştır (**Amchova vd., 2015**).

Allura Red AC (E 129): Kırmızı, suda çözünebilen aniyonik monoazo bir boyadır (**Amchova vd., 2015**). Avrupa Birliği’nde kırmızı meyve reçelleri (preserves of red fruit), kahvaltılık soslar, burger etleri, şarküteri etleri (luncheon meat), önceden pişirilmiş kabuklu deniz ürünleri, bitter vino ve bitter gazozda kullanımı onaylıdır (**Lehto vd., 2017**). ABD’de ise gıdaların genelinde onaylıdır (**Lehto vd., 2017**). Ponceau 4R ve Karmoisin gibi Avrupa Birliği’nde çocuklarda hiperaktivite ve dikkat bozukluğuna yol açabilir etiketiyle satılmak zorundadır (**Lehto vd., 2017**).

Carmoisine (E 122): Kırmızı, suda çözünebilen, aniyonik monoazo boyadır (**Amchova vd., 2015**). Azorubin olarak da bilinir (**Amchova vd., 2015**). Avrupa

Birliği’nde aromalı işlenmiş peynirlerde, kırmızı meyve reçellerinde, balık ve kabuklu karışımlarında/macunlarında, önceden pişirilmiş kabuklularda, amerikano, bitter vino ve bitter gazozda kullanımı onaylıdır ancak ABD’de onaylı değildir (**Lehto vd., 2017**). Duyarlı bireylerde onaylanmış dozda dahi deri ve solunum tepkimelerine nadiren de olsa yol açabilir (**Amchova vd., 2015; Charrondiere vd., 2009**). İnsan ve bovin serum albüminine bağlandığı görölmüşse de (**Amchova vd., 2015; Basu ve Kumar, 2014; Masone ve Chanforan, 2015**) Karmoisin’in genel maruziyet miktarları endişe edilecek seviyenin altındadır (**Amchova vd., 2015**). Ponceau 4R ve Allura Red AC boyalarında olduğu gibi Avrupa Birliği’nde “çocuklarda hiperaktivite ve dikkat bozukluğuna yol açabilir” etiketiyle satılmak zorundadır (**Lehto vd., 2017**).

Yukarıdaki özet bilgilerde de görölebileceği üzere, bu 4 kırmızı yapay renklendirici AB’de belirli koşullar ile onaylıyken diğer ölkelerdeki onay durumu da değişiklik göstermektedir.

Doğal renklendiriciler doğada halihazırda bulunan boyar maddelerdir. Bunlar bitkilerin meyve, sebze, tohum, kök ve çiçeklerinden; Koşinil böceği gibi hayvanlardan, alg ve mantarlar gibi mikroorganizmalardan elde edilebilirler (**Coultate ve Blackburn, 2018**). Son yıllarda, doğal renklendiriciler tüketicilerde sentetik renklendiricilere göre daha güvenilir ve sağlıklı kabul edildiğinden daha çok tercih edilmeye başlanmıştır (**Coultate ve Blackburn, 2018**).

Kırmızı renk verici doğal gıda boyaları için koşinil (E120), antosiyanin, betalain ve anka sayılabilir (**Coultate ve Blackburn, 2018**). Koşinil (E120), kaktüslerin üstündeki yaprak biti benzeri böceklerden (*Dactylopius coccus*) elde edilen, kullanımı MÖ. 2000’lere dayansa da (**Pearlstein vd., 2015**) kayıtlara da ilk olarak 1520’de Hernan Cortes’in geçirdiği (**Cortés, 1908**) bir boyar maddedir. Koşinil ve koşinilden üretilen karmin doğal kaynaklı olmalarına karşın üretimi maliyetlidir ve daha da önemlisi böcek kaynaklı olduğu için Musevi, Müslüman ve vegan tüketicilerce tercih edilmezler. Bu sebeplerle kimyasal üretimi hedeflenmişse de ekonomik olarak uygun değildir. Koşinil ve karmin FDA tarafından onaylı boyar maddelerdir (**eCFR :: 21 CFR Part 73 -- Listing of Color Additives Exempt from Certification, 2025**). Anka, özellikle Uzak Doğu Asya ölkelerinde buharda pişirilmiş pirinç veya diğer nişasta içeren gıdalarda *Monascus* cinsine ait çeşitli küflerin yetiştirilmesiyle elde edilen kırmızı renkli bir gıda boyasıdır (**Pintea, 2008**). Küf kültürlerinden boyanın eldesi için herhangi bir işlem uygulanmadan pirinç doğrudan kurutularak toz haline

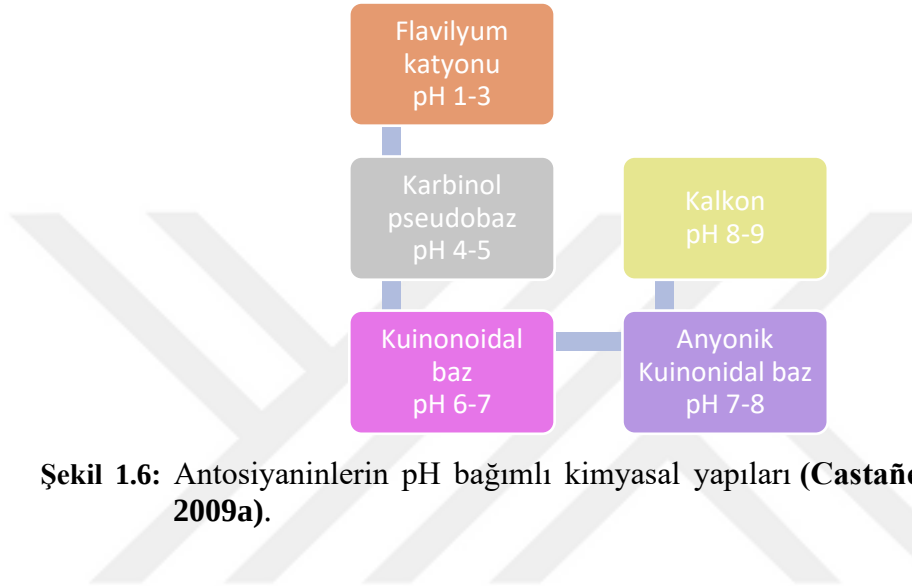
getirilip gıdalarda renklendirici olarak kullanılır. Her ne kadar doğal olsa da mantarın diğer metabolitlerini de içermesi mümkündür. Çeşitli tarım ürünlerindeki fungal toksinlerin tüketicide sağlık sorunları oluşturduğu bilindiği için anka ile renklendirilen gıdalar da olası sağlık sorunları oluşturabilir. Her ne kadar Uzak Doğu Asya’da yaygın olarak kullanılsa da çok daha tanımlı ve regüle üretim süreçleri ve çeşitli hayvan türlerinde geniş testler gerektireceği için FDA ve EFSA ankayı yasalaştırmak için isteksizdir **(Coultate ve Blackburn, 2018)**.

Diğer bir doğal renklendirici olan antosiyaninler, genellikle turuncu-kırmızı renkli flavylum tuzları olarak asidik ortamda elde edilirler **(Chen ve Hrazdina, 1981)**. Diğer pigmentlere ek olarak bitki renk ekspresyonunda önemli bir rolü olan antosiyaninler; meyve, çiçek yaprağı ve kimi sebzelere kırmızı, mor ve mavi renklerini verir **(Carpentier vd., 2009)**. En çok karşılaşılan glukozidik formları ile pelargonidin, siyanidin, peonidin, delfinidin, petunidin ve malvinidin pigmentlerinin maksimum ışık absorpsiyonları 505 ila 530 nm’ler arasındadır **(Chen ve Hrazdina, 1981)**. Doğada 20’den fazla antosiyanidin (aglikon yapıda yani şeker içermeyen) keşfedilmiş olması ve bunların çeşitli glukozilasyonlara uğrayabilmeleri ile doğada toplamda 600’den fazla antosiyanin keşfedilmiştir **(Andersen ve Markham, 2005)**. Klorofil b ile aynı dalga boyundaki ışık soğurumu yaptığı için bitki dokularının korunmasına yardımcı olur **(Stintzing ve Carle, 2004)**.

Antosiyaninlerin renkleri temel olarak içerdikleri hidroksil gruplarının sayıları ve metilasyon dereceleri ile bağlı olan şekerlerin doğası, sayısı ve pozisyonu ile belirlenir **(Mazza ve Brouillard, 1990)**. Bitkilerdeki görülen renk çeşitliliği ise daha çok bitki dokusunda bulunan metal iyonları ve/veya diğer fenolik bileşiklerle oluşan komplekslerden kaynaklanır. Antosiyaninlerin; Avrupa, ABD, Japonya ve diğer birçok ülkede doğal gıda boyası olarak kullanımına onay verilmiştir **(Nollet ve Toldrá, 2012)**. Üzüm kabuğu özütünün boyar madde olarak kullanılması yüz seneden önceye dayanır **(Francis, 1999)**. ABD’de ise üzüm renk özütü FDA tarafından içecek dışı gıda kullanımı ile sınırlandırılmıştır **(eCFR :: 21 CFR Part 73 -- Listing of Color Additives Exempt from Certification, 2025)**.

Antosiyanin kromoforunun iyonizasyonuna bağlı olarak ışık Emiliminde yaşadığı değişimler, antosiyaninlerin sağladığı renkte değişime neden olmaktadır. **Şekil 1.6** antosiyaninlerin farklı pH’larda değişen kimyasal yapısını göstermektedir. Antosiyaninler, bulundukları ortamın pH’ı 3’ün üzerine çıktıkça renksiz karbinol

pseudobase yapısına dönüşmeye başlarlar ve bu da antosiyaninlerin kırmızı rengini kaybetmesine neden olur. Nötr pH'a yaklaşıldıkça anhydrobase'in mor ve sonrasında mavi formları baskın hale gelir **(Coultae ve Blackburn, 2018)**. Bu da bir gıda boyası olarak antosiyaninin bir pH indikatörü olarak kullanılmasının önünü açar. Böylece satışıdaki ürünlerin yalnızca çekiciliğini arttırmaz ayrıca taze ve bozulmamış olduğunu da gösterir.



Şekil 1.6: Antosiyaninlerin pH bağımlı kimyasal yapıları **(Castañeda-Ovando vd., 2009a)**.

Antosiyaninler çeşitli meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunur. Antosiyanini en yüksek miktarda bulunduran meyveler mürver, aronya, yaban mersini, Amerikan yaban mersini, ahududu, üzüm, nardır **(Cevallos-Casals ve Cisneros-Zevallos, 2003; Delgado-Vargas ve Paredes-López, 2002; Kriventsov ve Arendt, 1981; Lamikanra, 1989; Makus ve Ballinger, 1973; Mazza ve Miniati, 2018; Sunil ve Shetty, 2022; Wu vd., 2006)**. Antosiyaninler; siyah havuç, mor mısır, siyah fasülye, kırmızı lahana, mor tatlı patates ve patlıcan gibi koyu renkli yiyeceklerde de bulunur **(Cevallos-Casals ve Cisneros-Zevallos, 2003; Sunil ve Shetty, 2022; Wu vd., 2006)**.

Siyah havuçlarda bulunan antosiyaninlerin pK_a değerleri nötr pH'a doğru kaydığı için daha geniş bir yelpazede, nötr pH'ta dahi bozulmadan kalan bir gıda boyası olarak kullanılabilme potansiyeli taşımaktadırlar. Kırmızı lahana özütlerinde bulunan antosiyaninler ise glukozitlerin hidroksisinamik ve hidroksibenzoik asit ile yüksek oranda açılmesi **(Kammerer vd., 2004)** ile oluşan intramoleküler kopigmentasyonun etkileriyle mavi renk üretebilirler **(Ahmadiani vd., 2014)**. Bu

durum, antosiyaninlere daha yüksek pH'ta ısıya karşı daha fazla kararlılık sağlar **(Coultate ve Blackburn, 2018; Sudan ve Rupasinghe, 2015)**.

Antosiyaninler diğer polifenolik bileşiklerle etkileşime girerek (ko-pigmentasyon) daha mavi, parlak ve yoğun bir görünüm elde edebilir ve bu ışık uyarımlı yıkım yollarına karşı antosiyaninlerin daha kararlı hale gelmelerine yardımcı olur **(Bordignon-Luiz vd., 2007)**. Antosiyaninlerin kendileriyle, kendilerinin açillenmiş halleriyle veya metal-antosiyanin kompleksleriyle oluşturdukları bu kopigmentasyonlar non-kovalent kompleksler olup mavi, mor ve kırmızı gibi renklerin çiçeklerde, meyvelerde ve bunlardan elde edilen ürünlerdeki kararlılığını sağlayan ana mekanizma olduğu gösterilmiştir **(Coultate ve Blackburn, 2018; Trouillas vd., 2016)**.

Yapay gıda boyalarındaki aksine, potansiyel gıda renklendiricisi olarak kullanılabilecek antosiyaninler üzerine yapılan çalışmalar, bu pigmentlerin insan sağlığına zararlı olmadıkları **(McGhie ve Walton, 2007)** ve hatta tüketilmeleriyle anti-inflamatuvar ve anti-karsinogenik etkinlikler, kalp-damar hastalıklarında azalma, obezitenin kontrolü ve diyabetin azaltılması gibi yararlı etkilerle de ilişkilendirilmektedir **(He ve Giusti, 2010)**.

1.4. Antosiyanin Üretim Yöntemleri

Gıda endüstrisinde doğal antosiyaninlerin kullanımındaki kısıtlar; antosiyaninlerin düşük kararlılığı, depolama koşulları, formülasyonlar ve farklı işleme koşullarındaki renk kayıplarıdır. Antosiyaninlerin kararlılığı son derece değişkenlik göstermektedir. Özellikle saf antosiyaninler daha kararsızdır ve bozulmaya eğilimlidir **(C. L. Zhao vd., 2017)**. Antosiyaninin işlenme koşulları son üründe istenmeyen tat, renk ve kokuya da sebep olmaktadır **(Castañeda-Ovando vd., 2009a)**.

Antosiyaninlerin doğal gıda kaynaklarından eldesi genellikle yüksek sıcaklık, basınç ve pH gibi doğal pigmentlerin ve antioksidanların kaybına neden olacak koşullarda yapılır. Yüksek miktarda üretim için geniş tarım arazilerinin gerekmesi; antosiyanin konsantrasyonunun mevsime, bölgeye, bitkinin türüne, hasat zamanına ve yetiştirme koşullarına göre değişmesi ve yüksek saflıkta üretimin görece zorluğu gibi nedenlerle bitkilerden antosiyaninin doğrudan eldesi, mikrobiyal hücre fabrikaları ve *in vitro* kültürlerle göre dezavantajlıdır **(Zhu vd., 2017)**. Ayrıca antosiyaninler bitkiden çeşitli

kimyasal yapılara sahip farklı tipte heterojen molekül karışımı olarak elde edilebilir **(Zha ve Koffas, 2017)**. Bitkilerden ekstraksiyon için yeni yöntemler üzerine çalışılıyor olmakla birlikte, maserasyon ve Soxhlet ekstraksiyonu gibi geleneksel yöntemler zaman alıcı ve yüksek hacimlerde çözücü gerektirdiği için maddi açıdan dezavantajlıdır **(Chemat vd., 2017; C. Y. Wang ve Chen, 2006)**.

Bitki hücre süspansiyon kültürleri, kontrollü şartlarda bitki hücrelerinde antosiyanin üretimi için kullanılabilir **(Cress vd., 2015, 2016)**. Bu üretim metodu, uygun hücre hatlarının geliştirilmesi, biyoreaktör koşullarının optimizasyonu ve fermentasyonun büyük ölçeğe taşınmasını hedef alır. Bu bağlamda üzüm, Cleome gülü, tatlı patates, aspen, yabani havuç gibi bitkilerden antosiyanin üreten hücre hatları elde edilmeye çalışıldıysa da halihazırda ekonomik olarak verimli bir sistem elde edilememiştir **(Jones vd., 2015; Skjoedt vd., 2016)**. Bitki süspansiyon hücre kültürlerinden elde edilen antosiyaninler üretilen hücrelerin toplam kuru ağırlığının %10'una kadar çıksa da belirli bir tip antosiyanin eldesi genelde düşük olmaktadır **(Corrales vd., 2008; P. Xu vd., 2014)**. Süspansiyon hücre kültürlerindeki en önemli zorluklardan biri de antosiyanin üretiminin zamanla düşmesine neden olan hücre kararsızlıklarıdır **(Corrales vd., 2008)**. Temel mekanizmalar tam olarak anlaşılamamış olsa da olası nedenlerden biri yetersiz hücre farklılaşmasıdır. Hızlı büyüyen farklılaşmamış hücreler antosiyanin üretemez. Bunlara ek olarak yüksek üretim maliyetleri, müşteri tarafından çok fazla onaylanmaması ve özellikle genetiği değiştirilmiş hücre hatlarından elde edilen moleküllerin sıkı biyogüvenlik düzenlemeleri bitki süspansiyon hücre kültürlerinin antosiyanin üretiminde kullanımını kısıtlar **(Angelov ve Gotcheva, 2017; Davies ve Deroles, 2014)**. Bu kısıtlamalar doğrudan ekonomik rekabeti ve endüstrileşme için gerekli olan yatırımı etkiler **(Zha ve Koffas, 2018)**.

Bu yüzden, daha yüksek verimde ve kararlı yapıda antosiyanin eldesi için antosiyaninlerin biyosentezi ve bunu düzenleyen moleküler mekanizmalar aydınlatılarak üretim için bitki doku kültürü ve mikroorganizmalarda heterolog üretim ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır **(Espinosa-Leal vd., 2018; Ruta ve Farcasanu, 2019)**. Özellikle mikrobiyal üretim, mikroorganizmaların görece daha düşük maliyetle, kontrollü ve hızlı büyümeleri ve metabolizma mühendisliği için birçok farklı genetik aracın geliştirilmesi nedeniyle, kimyasal sentez, bitkiden doğrudan ekstraksiyon ya da bitki hücre kültürlerinde üretime kıyasla daha fazla avantaja sahiptir **(Chouhan vd., 2017; Pandey vd., 2016a; Sunil ve Shetty, 2022)**.

Prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmalarda şimdiye kadar terpenoidler, alkaloidler ve flavonoidler gibi birçok bitki kökenli bileşikler üretilmiştir (Chemler ve Koffas, 2008; Y. Li ve Smolke, 2016; Paddon ve Keasling, 2014). Flavonoidlerin ilk kez 2003 yılındaki mikrobiyal üretiminden (Y. Wang vd., 2011) sonra flavanonlardan karmaşık yapılı antosiyaninlere kadar birçok bileşik metabolizma mühendisliği yoluyla düzenlenmiş mikroorganizmalarda üretilmiştir (Pandey vd., 2016b). Ayrıca doğal olmayan flavanoidlerin de belirli substratlarla besleme yoluyla mikrobiyal üretimi yapılmıştır (Fowler vd., 2011; Leonard vd., 2008). Tüm bu çalışmalarda kullanılan mikroorganizmalar hedef ürünün en iyi üretimi için metabolik olarak düzenlenmiştir (Zha ve Koffas, 2017).

Mikrobiyal üretimde etkin ürünlerin alınabilmesi için uygun mikrobiyal konakçı hücre hattının seçilmesi önemlidir. Birçok mikrobiyal hücre hattından *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae* metabolik ağlarının iyi anlaşılmış olması ve genetik mühendislik için gerekli araçlarının var olması nedeniyle bu iki grubun yapılan çalışmalarda daha çok tercih edilmelerine neden olmuştur (Lee vd., 2019; Zhou vd., 2024a).

1.5. Antosiyaninlerin Mikrobiyal Üretimi

E. coli'nin iyi karakterize edilen genetik, fizyolojik ve biyokimyasal yapısı, genetik manipülasyona olanak tanınması, iyi bilinen ve görece basit büyüme koşulları (örneğin anaerobik büyüme hızı, birçok substratı kullanabilmesi gibi), genetik mühendislik araçlarının varoluşu dolayısıyla endüstriyel model mikroorganizma olarak iyi bir seçim olarak karşımıza çıkmaktadır (Marienhagen ve Bott, 2013; Zhou vd., 2024a).

Antosiyanin üretimi için Yan ve arkadaşları (Yan vd., 2005a) pET vektörünü kullanarak *Musca domestica*'dan flavanon 3 β -hidroksilaz, *Anthurium andraeanum*'dan dihidroflavonol 4-redüktaz, *M. domestica*'dan antosiyanidin sentaz ve *Petunia hybrida*'dan flavonoid 3-O-glukoziltransferaz genlerini *E. coli* JM109'a aktararak *E. coli*'de ilk defa antosiyanin üretimini gerçekleştirdiler (Yan vd., 2005a; Zhou vd., 2024a). Renkli olmayan naringenin ve eridokityol gibi flavanonlardan kararlı, glukozillenmiş antosiyaninler üretmek amacıyla dört basamaklı bir yolak oluşturmuşlardır. *Malus domestica*'dan flavanon 3 β -hidroksilaz, *Anthurium andraeanum*'dan dihidroflavonol 4-redüktaz, *Malus domestica*'dan antosiyanidin

sentaz (ANS) ve *Petunia hybrida*'dan UDP-glukoz:flavonoid-3-O-glukoziltransferaz iki aşamalı PCR yöntemiyle her biri önce *trc* promotörü ve kendi bakteriyel ribozom-bağlanma bölgesi kontrolü altına alınmış sonrasında sırasıyla pK184 vektörüyle klonlanmıştır. Bu yollara sahip olan *E. coli* hücreleri naringenin veya eriodiktyol öncüllerini kullanarak sırasıyla pelargonidin 3-O-glukozit (5,6 µg/l) veya siyanidin 3-O-glukozite (6,0 µg/l) dönüştürmüşlerdir (**Yan vd., 2005b**).

Yine *E. coli*'de yapılan çalışmada, Jones ve arkadaşları (**Andrew Jones vd., 2017**) glukozdan başlayarak antosiyanin üretimini gerçekleştirmek için polikültür tekniğini kullanmışlar ve antosiyanin biyosentez yolağında yer alan 15 enzim ve transkripsiyon faktör genlerini 4 ayrı *E. coli* soyuna paylaştırarak pelargonidin 3-O-glukozit pigmentinin üretimini gerçekleştirmişlerdir (**Andrew Jones vd., 2017; Zhou vd., 2024a**). Bu sayede uzun metabolik yolların fonksiyonel olarak ifade edilmesini ve birbirine bağlanmasını sağlarken metabolik yükün de dağıtılmasını amaçlayarak *de novo* pelargonidin 3-O-glukozit üretimi (9,5 mg/l) gerçekleştirilmiştir (**Andrew Jones vd., 2017**).

Shrestha ve arkadaşları (**Shrestha vd., 2019a**) , BglBricks sistemini kullanarak *E. coli* BL21 (DE3) suşunu düzenlemişlerdir. Bu suşa, *Petunia hybrida*'dan antosiyanidin sentaz (ANS), *Arabidopsis thaliana*'dan siyanidin 3-O-glukoziltransferaz (3GT), glukokinaz (glk), fosfoglukomutaz (pgm2), glukoz 1-fosfat üridilil transferaz (galU) ve glukoz taşıyıcı protein (glf) genleri eklenmiştir. Genlerin farklı promotörlere (pBR181, pBRT_{trc} ve pBRUV5) sahip çoklu monositronik operonlarla ve farklı promotör güçleriyle (PT7, PlacUV5 ve P_{trc}) optimizasyonu yapılarak 36 saat içinde yaklaşık 439 mg/L konsantrasyonda C3G üretimi yapılarak bugüne kadar rapor edilen en yüksek verimi sağlamışlardır (**Shrestha vd., 2019a**).

S. cerevisiae, bitkilerde antosiyaninlerin depolandığı vakuollere benzer organellere sahiptir. Bitki enzimleri genellikle translasyon sonrası modifikasyonlarla aktif hale gelirler. Prokaryotlarda translasyon sonrası modifikasyonlar gerçekleşmezken ökaryotlar bu modifikasyonları yapabildikleri için bitki enzimlerini daha etkili bir şekilde kullanabilirler (**Zhou vd., 2024b**). Eichenberger ve arkadaşları (2018) (**Eichenberger vd., 2018**) bitki genlerini *S. cerevisiae*'ye aktararak glukozdan üç farklı antosiyanin üretebilen bir suş geliştirmişlerdir. Bu suş, 1,55 mg/l konsantrasyonda siyanidin 3-O-glukozit, 0,85 mg/l konsantrasyonda pelargonidin 3-O-glukozit ve 1,86 mg/l konsantrasyonda delfinidin 3-O-glukozit üretmiştir (Zhou vd.,

2024b). Bu sayede antosiyaninlerin *de novo* biyosentezi ilk kez mayada elde edilmiştir (Eichenberger vd., 2018).

Zha ve arkadaşları 2018 yılında (Zha vd., 2018) *E. coli*'de yapılmış olan antosiyanin biyosentez çalışmalarını diğer bir prokaryotik mikroorganizma olan *Corynebacterium glutamicum*'da gerçekleştirmişlerdir. *Petunia hybrida*'dan alınan antosiyanidin sentaz (ANS) ve *Arabidopsis thaliana*'dan alınan 3-O-glukoziltransferaz (3GT) genleri *C. glutamicum* ATCC 13032 suşunda, katekinden C3G eldesi için eksprese edilmişlerdir. Yapılan optimizasyonlar UDP-glukoz varlığının artırılmasıyla yaklaşık 40 mg/l C3G üretimi elde edilerek, herhangi bir genetik düzenlenme uygulanmamış başlangıç suşuna göre 100 katın üzerinde artış elde edilmiştir. Bu çalışmayla ilk kez ucuz bir flavonoid öncülü olan katekinden siyanidin 3-O-glukozitin (Şekil 1.5) *C. glutamicum*'da üretimi gerçekleştirilmiştir (Zha vd., 2018).

Antosiyanin sentez yolağındaki enzimler genel olarak en yüksek etkinliklerini pH 5-7 aralığında göstermektedirler. Antosiyaninlerin en kararlı oldukları ve parlak renklere sahip oldukları ortam pH'sı ise 1-3 değerleridir. Çoğu enzimin etkinliği için 20-30 °C arası optimumdur. Bu aralığın dışına çıkıldığında enzimler denatüre olup etkinlik kaybedebilirler. Ama, mikrobiyal hücreler genellikle 5-7 pH değerleri arasında, enzim aktivitesi için optimal değerlerin bulunduğu aralıkta büyürler (Zhou vd., 2024c). Antosiyanin üretimi sırasında ortamın pH'ı düşme eğilimi gösterdiği için Gram negatif konak *E. coli*'ye kıyasla, Gram pozitif anaerobik bakteri *Lactococcus lactis*'in antosiyanin sentezinde kullanılması avantaj sağlayabilir. Ancak yine de iki aşamalı kültür (önce görece yüksek pH'da sonra düşük pH'da üretim gibi) *E. coli*'de geliştirilecek farklı yöntemlerle bu sorunun önüne geçilebildiği kanıtlanmıştır (Yan vd., 2008).

1.6. Glutasyon S-Transferaz Enziminin Antosiyanin Sentezindeki Önemi

Glutasyon S-transferazlar (glutasyon transferazlar) doğadaki en önemli detoksifiye edici enzimleridir (Hernández Estévez vd., 2020). Ökaryotlarda ve prokaryotlarda şimdiye kadar etkinlikleri çalışılmış olan (Wilce ve Parker, 1994; Wongsantichon ve Ketterman, 2005) GST'ler çoklu gen aileleriyle kodlanan geniş bir protein ailesidir (Dixon vd., 2002; Wilce ve Parker, 1994). Glutasyon S-transferazlar elektrofilik bileşiklere ribozomda üretilmeyen bir tripeptit olan glutasyon (GSH; γ -Glu-Cys-Gly)

ekler ve çeşitli tepkimeleri katalizleyerek daha çözünebilir peptit türevleri oluşmasını sağlar **(Chronopoulou ve Labrou, 2009; Cummins vd., 2013; Dixon ve Edwards, 2010; Edwards vd., 2011; Edwards ve Dixon, 2005; Hernández Estévez vd., 2020; Kampranis vd., 2000; Labrou vd., 2015)**. GST'ler farklı substratlarla çeşitli tepkimeler katalizlerler **(Chronopoulou ve Labrou, 2009; Mannervik, 2012)**. Birincil ve ikincil metabolizma, stres metabolizması, herbisit detoksifikasyonu, sinyal iletiminde rol alma; ozon hasarlarına, ağır metallere, xenobiyotilere ve mikrobik enfeksiyonlara karşı bitkiyi koruma; antosiyanin taşıma ve birikimi; hidroperoksit detoksifikasyonu; auksin homeostasisi; tirozin metabolizması ve apoptizi düzenleme gibi çeşitli düzenleyici işlevlerde görev alır **(Benekos vd., 2010; Chronopoulou ve Labrou, 2009; Cummins vd., 2011, 2013; Dixon vd., 2010; Edwards ve Dixon, 2005; Esmaili vd., 2009; Gill ve Tuteja, 2010; Hernández Estévez vd., 2020; Hu, 2014; Sharma vd., 2014; Yu ve Powles, 2014)**.

Sitozolik GST üst ailesi (superfamily) 13,000'den fazla eşsiz sekanstan oluşur **(Mashiyama vd., 2014)** ve bu sekanslar bitkiler, hayvanlar, mantarlar ve bakterilerde 36 sınıfa gruplanırlar **(Hernández Estévez vd., 2020; Y. J. Liu vd., 2013)**. Öte yandan, bitki GST'leri 10 ayrı sınıfa ayrılmıştır: GSTU (Tau), GSTF (Phi), GSTL (Lambda), GSTT (Theta), GSTZ (Zeta), DHAR (dehidroaskorbat reduktaz), TCHQD (tetrakloro hidrokinon dehalogenaz), EF1B γ (elongasyon faktör 1B) **(Liu vd., 2013)**. Bitki GST'lerinin çoğu tau ve phi sınıflarına aittir. Phi, tau, DHAR ve lambda GST'leri bitkilere özgüdür **(Hernández Estévez vd., 2020)**.

Bitki GST'leri diğer GST'lerin olduğu gibi N-terminal domain ve C-terminal domain olmak üzere iki domainli bir katlanma örüntüsüne sahiptir. Korunmuş N-terminal domaine'e göre C-terminal domain sekans ve topoloji olarak detaylıdır ve bu bitki GST'lerinin çeşitli hidrofobik substratlara özel olmalarına yol açar **(Axarli vd., 2009b, 2009a; Hernández Estévez vd., 2020)**.

GST ile ilgili bitkilerde yapılan bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir: Domates LeGSTU2 genini yüksek oranda ifade eden (overekspresyon) transgenik Arabidopsis bitkilerinde kuraklığa ve tuzluluğa karşı dayanıklılık gözlenmiştir **(Xu vd., 2015)**. DHAR enzim ailesi üyelerinin ışık ve kuraklığın da dahil olduğu stres koşullarında bitkilerde askorvik asitin sentezine katkıda bulunduğu gözlenmiştir **(Tang ve Yang, 2013)**. OsDHAR1 yüksek sıcaklığa karşı korunmada ve bitkilerin antioksidan kapasitelerini arttırmada rol alır **(Urano vd., 2000)**. L tipi üyeler ağır metal stresine

karşı güçlü bir tepki göstermektedirler. OsGSTL2 bitkideki antioksidan sistemi etkileyerek *Arabidopsis thaliana*'nın ağır metal stresine karşı toleransını artırır (Kumar vd., 2013). Z tipi üyeler bitki tirozin katabolizmasında rol alırlar ve tuzluluk ve düşük sıcaklığa tepki olarak uyarılırlar. ThGSTZ1 geninin overekspresyonu, *A. thaliana*'nın tuz kuraklık ve tuz toleransını, reaktif oksijen türlerini uzaklaştırarak artırır (Yang vd., 2014). Mısır bitkisinde mutant Bronze-2 (Bz2) ile defektif antosiyanin birikimi ilk kez gözlemlendi. Böylece Bz2 ile kodlanan GST'nin antosiyanin-3-O-glukozit ve glutatyona bağlanma özelliği olduğu öne sürülmüştür. Daha sonrasında bu GST'nin, flavonoid bileşiklerin taşınmasına teşvik edici bir işlevi olduğu öne sürülmüştür (Marrs vd., 1995). Diğer bitkilerde bulunan Bz2 homologları, GST'nin antosiyanin taşımasındaki işlevinin yüksek derecede korunduğunu göstermektedir (Kong vd., 2024; Qiu vd., 2024; Yin vd., 2023)

Antosiyanin biyosentez yolağının sondan bir önceki adımında 3,4-cis-leukoantosiyanidinler'den antosiyanidinler'e geçişin Fe/ α -ketoglutarat bağımlı dioksijenaz bir enzim olan antosiyanidin sentaz tarafından katalizlendiği düşünülmektedir (Chaves-Silva vd., 2018; Eichenberger vd., 2023; Preuß vd., 2009). ANS'nin protein kristal yapısı (Wilmouth vd., 2002), biyokimyasal analizler (Turnbull vd., 2003, 2004; Welford vd., 2001; Zhang vd., 2019) ve izotopla işaretlenmiş öncüllerin bitkilere verilmesiyle yapılan çalışmalar (Heller vd., 1985); ANS'nin leukoantosiyanidinlerde C-3 pozisyonuna α -yüzeyinden hidroksilasyon gerçekleştirdiğini öne sürmektedir. Ancak, ortaya çıkan kararsız ürün olan flavan-3,3,4-triol genellikle epidihidrokuersetin, dihidrokuersetin ve kuersetin gibi yan ürünlere dönüşürken (Zhang vd., 2019), antosiyanidine dönüşüm yalnızca *in vitro* bir yan reaksiyon olarak görülmüş (Turnbull vd., 2003, 2004; Zhang vd., 2019) ya da metabolik mühendislikle düzenlenmiş mikroorganizmalarda (Eichenberger vd., 2018; Yan vd., 2005b) gözlemlenmiştir (Eichenberger vd., 2023).

Antosiyaninlerin sentez yolağındaki tartışmalı konulardan bir diğeri ise, antosiyaninle ilişkili glutatyon transferazların moleküler işlevleridir (Chanoca vd., 2015; J. Zhao, 2015b). Yapılan çalışmalarda, arGST'lerin knock out mutasyonları veya downregülasyonları sonucunda birçok bitkide antosiyanin birikiminde ciddi azalmalar görülmüştür (Alfenito vd., 1998; Cao vd., 2021; Cheng vd., 2015; Jiang vd., 2019a; Kitamura vd., 2004b; Liu vd., 2019; Luo vd., 2018; Shao vd., 2021; Sun vd., 2012; Tasaki vd., 2020a). *Fragaria vesca*'da (çilek) RAP geninin geçici baskılanması

yaprak saplarında antosiyanin miktarını azaltmıştır (Luo vd., 2018). *Prunus persica*'da (şeftali) bir arGST düzenleyici gen olan Riant'a 2 baz çifti eklenmesi beyaz çiçek oluşumuna yol açmıştır (Cheng vd., 2015). Bu fenotipler, bazı durumlarda pigmentlerin sitoplazmada yanlış konumlanması (Marrs vd., 1995) veya vezikül benzeri yapılarda birikmesi (Gomez vd., 2011; Sun vd., 2012) ile de ilişkilidir. Antosiyaninle ilişki glutatyon transferazların model substrat olan 1-kloro-2,4-dinitrobenzen'e (CDNB) glutatyon transfer edebildiği gösterilmiştir, buna rağmen glutatyonun antosiyaninlere bağlandığı ligandlar laboratuvarında da bitkilerde de gözlemlenmemiştir (Li vd., 2011; Mueller vd., 2000; Sun vd., 2012). Ama, antosiyaninle ilişkili glutatyon transferazların çeşitli flavonoidlere *in vitro* bağlanabildiği (Liu vd., 2019; Mueller vd., 2000; Sun vd., 2012) ve antosiyanince zengin dokuların zar yapılarında lokalize oldukları bitkilerde (Gomez vd., 2011; Sun vd., 2012) gözlemlenmiştir. Bu araştırma sonuçları arGST'lerin antosiyaninleri kararlı hale getirerek vakuole taşıyan taşıyıcılara yönlendirdiği bir hipotez olan "ligandin modelini" desteklemektedir (Chanoca vd., 2015; Mueller vd., 2000; Sun vd., 2012).

Ancak mısırdan alınan bir arGST olan ZmBZ2 cDNA'sının petunyadaki karşılık gelen PhAN9 genini tamamlayabilmesi ve tersinin de geçerli olması gibi bazı bitki çalışmaları bu ligandin modeliyle tam olarak açıklanamamaktadır (Eichenberger vd., 2023). Mısırdaki oluşan pigmentli aleuron veya petunyada oluşan pigmentli korolla bölgeleri sadece mor renkte değil, merkezde koyu mor ve çevresinde daha açık renkli ama yine pigmentli hücreler içermektedir (Alfenito vd., 1998). Bu durum arGST'lerin yalnızca hücre içi taşımada rol almadığını düşündürmektedir (Eichenberger vd., 2023).

Eichenberger ve arkadaşları 2023 yılında yayınladıkları çalışmada (Eichenberger vd., 2023) biyokimyasal, yapısal ve hesaplamalı verilere dayanarak arGST'lerin antosiyanin biyosentez yolağında katalitik bir role sahip olduklarını göstermişlerdir. Çalışmada, arGST'lerin yarı kararlı ANS ürünü olan flavan-3,3,4-triol veya flavan-3-on-4-ol bileşiklerini, siyanidinin 4-hidrat formu olan flav-2-en-3,4-diol'e dönüştürmek için glutatyon bağımlı Brønsted baz mekanizması kullandığı öne sürülmüştür (Eichenberger vd., 2023).

Eichenberger ve arkadaşları (2023) antosiyaninle ilişkili GST'lerin katalitik etkinliklerinin ökaryotik hücrelerdeki antosiyanin biyosentezi için de anahtar role sahip olduğunu göstermek için *S. cerevisiae* hücrelerinin metabolizma mühendisliği

ile antosiyanin yolağındaki ilk kararlı bileşik olan siyanidin 3-O-glukoziti üretmesini sağlamak için üç plazmitli strateji kullanmışlardır (**Eichenberger vd., 2023**). Bilinen antosiyanin yolağı için, öncesinde *S. cerevisiae*'de iyi çalıştığı bilinen enzimler seçilerek bitkilerden 9 GST ile ayrı ayrı klonlanmışlardır. Antosiyanin ile ilişkili olmayan GST'lere sahip olan soylar, kontrol hücrelerle elde edilene benzer sonuçları verirken antosiyaninle ilişkili GST'leri içeren soylar kontrole göre antosiyanin üretimini 36,5 kata kadar arttırmışlardır (**Eichenberger vd., 2023**).

Başka bir çalışmada ise, antosiyaninlerin vakuollere taşınmasını sağlayan glutatyon S-transferazlardan (**Jiang vd., 2019b**) *MdGSTF6* geni, *S. cerevisiae*'ye aktarıldığında ise antosiyaninlerin %90'ından fazlası vakuol bulunmadığı için doğrudan hücre dışına atılmıştır (**Xu vd., 2022; Zhou vd., 2024c**). Bu strateji ise endüstriyel üretim süresince hücre içinden ekstraksiyona alternatif bir yöntem olarak denenebilir.

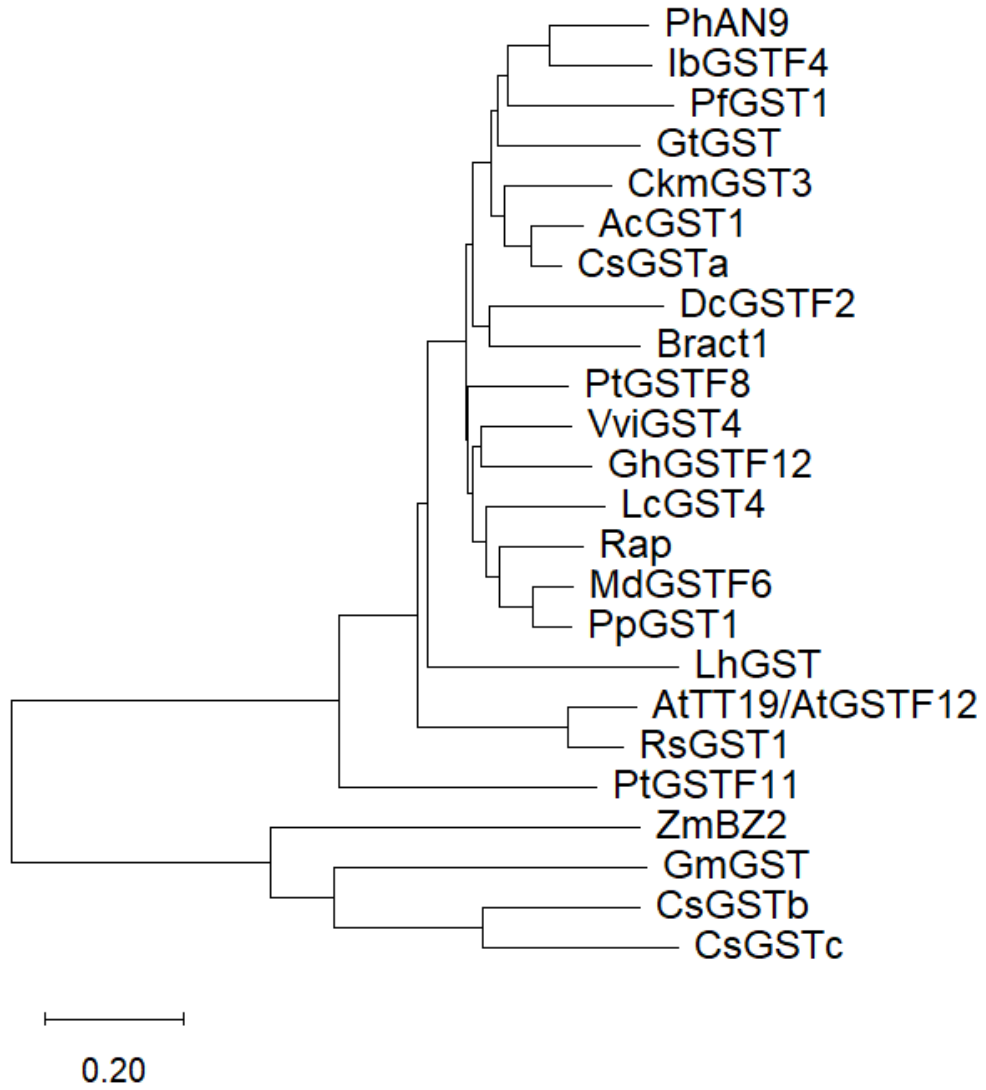
1.6.1. GtGST Glutatyon Transferazı

Tez kapsamında siyanidin 3-O-glukozit üretiminin artırılmasında Japon gentianasının Albireo (*Gentiana triflora* × *Gentiana scabra*) çeşidinin antosiyanin ilişkili glutatyon transferazı GST1-2 kullanılmıştır. Tez kapsamında bu gen, GtGST olarak belirtilmiştir.

Japon gentianasının Albireo (*Gentiana triflora* × *Gentiana scabra*) çeşidinin yapraklarındaki mavi pigmentasyon, poliaçilasyona sahip bir antosiyanin olan gentiodelfin pigmentinden kaynaklanmaktadır. Tasaki ve arkadaşlarının 2020'de yayınlanan çalışma, antosiyanin ilişkili GST1'in (GtGST) çiçek ve yapraklardaki gentiodelfinin birikmesinden sorumlu olduğunu ortaya koymuştur (**Tasaki vd., 2020b**). GtGST'nin yapılan filogenetik analizi sonucunda Phi tipi GST olduğu ortaya çıkmıştır (**Tasaki vd., 2020b**). Phi tipi diğer antosiyanin ilişkili GST'lerle arasındaki dizi benzerliği %53 ila %66 arasındadır: RAP (%66), VvGST4 (%66), AN9 (petunia) (%65), DcGSTF2 (%62), MdGSTF6 (%66), CkmGST3 (%68) ve TT19 (%53) (**Tasaki vd., 2020b**) (Şekil 1.7). Antosiyanin ilişkili GST'lerde korunan amino asitlerin GtGST'de korunduğu gözlenmiştir (**Tasaki vd., 2020b**).

Şekil 1.7'de Neighbor-Joining yöntemi ile oluşturulmuş filogenetik ağaç bulunmaktadır (**Saitou ve Nei, 1987**). Dal uzunlukları evrimsel uzaklıkların filogenetik ağacı oluşturmak için kullanılan birimlerle ölçeklendirilmiştir. Evrimsel

uzaklıklar Poisson düzeltme yöntemi (**Zuckerandl ve Pauling, 1965**) kullanılarak hesaplanmış ve her bölgede gerçekleşen amino asit değişim sayısı birim olarak alınmıştır. Analitik işlem 24 amino asit dizisini kapsamıştır. Her dizi çifti için tüm belirsiz pozisyonlar çıkarılarak, veri seti 263 pozisyondan oluşturulmuştur. Analizler MEGA12 (**Kumar vd., 2024**) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1.7: *GtGST*'nin Neighbor-Joining yöntemi ile oluşturulmuş filogenetik ağacı.

Tasaki ve arkadaşlarının 2020'de yayınladıkları çalışmada *GtGST* geni CRISPR/Cas9 genom düzenleme yöntemiyle mutasyona uğratılan Japon gentiana soylarında yabancı türe göre daha açık renkte renklenme ve beyaza yakın renklenme görülmüş ve gentiodelfin miktarındaki azalma ise HPLC ve spektrofotometre analizi ile doğrulanmıştır (**Tasaki vd., 2020b**). Gözlemlenen fenotiplerin *GtGST* yokluğundan

kaynaklandığının doğrulanması için complementation assay ile mutant soylarda *GtGST*'nin geçici ekspresyonuyla yabani soylardaki fenotip tekrardan elde edilmiştir (**Tasaki vd., 2020b**). Antosiyanin üretiminin düşük sıcaklıklar, yoğun ışık maruziyeti, ozmotik stres ve patojen enfeksiyonu gibi çeşitli nedenlerle uyarılabileceği için aynı çalışmada yabani ve mutant soylar yüksek şeker içeren besi yerinde büyütülmüşlerdir. Yabani soylar yüksek siyanidin-3-glukozit birikimi nedeniyle kırmızıya dönerken mutant soylar ya beyaza yakın renklenmiş ya da açık kırmızı renk almışlardır (**Tasaki vd., 2020b**). Böylece antosiyanin biyosentetik yolağı etkin olsa da *GtGST* aracılığı ile taşınmanın gentiana bitkilerindeki antosiyanin birikimi için önemi gösterilmiştir (**Tasaki vd., 2020b**).

1.7. Tezin Amacı

Bu tezin amacı, bitkilerde doğal olarak üretilen ve doğal gıda renklendiricisi olarak kullanılma potansiyeline sahip kırmızı renkli siyanidin 3-*O*-glukoziti (C3G) pigmentinin mikrobiyal konakçı olarak seçilen *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinde yüksek oranda eldesi için stratejiler geliştirmektir. Daha önce, antosiyanin biyosentezi bu konakçıda test edilmiş olsa da GST geninin antosiyanin biyosentezindeki etkisine dair bir çalışma gerçekleştirilmemiştir. Bu bağlamda tez kapsamında, C3G üretiminden sorumlu olan genleri taşıyan plazmit (yüksek katalitik aktivitesinden dolayı *Petunia hybrida*'nın antosiyanidin sentaz geni (PhANS) ve siyanidini bölgeye özgü glukozile ettiği için *Arabidopsis thaliana*'nın flavonoid-3-*O*-glukoziltransferaz (At3GT) genini içeren pETM6 plazmiti), antosiyanin üretimindeki etkisinin belirlenebilmesi için *GtGST* genini [Japon gentianasının Albireo çeşidinin (*Gentiana triflora* × *Gentiana scabra*) glutatyon transferaz geni] içeren pCDM4 plazmiti ile kotransforme edilerek *E. coli* hücrelerine aktarılmıştır. AMM besiyerinde inokülasyon oranları, IPTG konsantrasyonları ve uyarım zamanları, şeker ve nitrojen kaynakları örnek toplama zamanları gibi parametreler değiştirilerek C3G üretimi optimize edilmiştir. Tez kapsamında uygulanan stratejinin, farklı organizmalarda heterolog antosiyanin biyosentezinin optimize edilmesinde farklı bir bakış açısı getirmesi beklenmektedir.

2. MATERİYAL

Tez çalışması kapsamında siyanidin 3-O-glukozit (C3G) üretiminin artırılması için *E. coli* hücrelerine klonlama ve transformasyon yapılmış, sonrasında da besiyeri ve kültür koşullarının değiştirilmesi ile C3G üretimi optimize edilmiştir.

2.1 Kimyasallar

Tez kapsamında kullanılan kimyasallar ve kimyasalların üretici firmaları **Tablo 2.1**'de gösterilmektedir.

Tablo 2.1: Kimyasal ve sarf malzemelerin listesi.

Kimyasal adı	Kimyasal markası- Katalog numarası
48-Derin kuyulu plaka (5 ml)	VWR (732-3797)
Agar	Bacto™ agar 214010
Amonyum Klorür (NH ₄ Cl)	AFG Bioscience 184934-1KG
Amonyum Molibdat ((NH ₄) ₂ MoO ₄)	Merck 277908
Ampisilin	Sigma-Aldrich A9393-5G
Asetik Asit	Merck 100063
Asit Hidrolize Kazein	LabM- Q33034/054
Bakır (II) Sülfat Pentahidrat CuSO ₄ .5H ₂ O CuSO ₄	AFG Bioscience 260976-1KG
Borik asit (H ₃ BO ₃)	AFG Bioscience 373848-1KG
Çinko Sülfat Heptahidrat ZnSO ₄ .7H ₂ O	AFG Bioscience 408022-1KG
D(+)-Glucose, Anhydrous	AFG 294126
Demir (II) Sülfat Heptahidrat (FeSO ₄ .7H ₂ O)	AFG Bioscience 335074-1KG
Derin kuyulu plaka kapağı (plate seal)	VWR (60941-086)
di-Amonyum Fosfat (NH ₄) ₂ HPO ₄	Tekkim 310823294001-1KG
DMSO	Sigma-Aldrich 472301
EDTA	AFG Bioscience 399168-1KG
GtGST glutatyon S-transferaz geni (sentetik)	GenScript

Tablo 2.1 devam: Kimyasal ve sarf malzemelerin listesi.

Kimyasal adı	Kimyasal markası- Katalog numarası
HCl	Merck- K39100514
IPTG	neoFroxx 1122GR005
Kalsiyum Klorür Dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	AFG Bioscience 347762-1KG
Kasamino asit	LabM Q33034/054
Magnezyum Klorür Heksahidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	AFG Bioscience / 223905-1KG
Mangan Klorür (MnCl_2)	Merck 105927
Morpholinopropane Sulphonic and Extra pure (MOPS)	AFG Bioscience 355532
N,N-Dimethylformamide	Sigma 59H364315
Nutrient broth	Merck 1.05443.0500
Pepton	Merck 1.07214.0500
Potasyum Fosfat Dibazik Anhydrous (K_2HPO_4)	AFG Bioscience 321171-1KG
Potasyum Fosfat Monobazik Anhydrous (KH_2PO_4)	AFG Bioscience 292188-1KG
Potasyum Hidroksit KOH	Sigma-Aldrich 06005
Potasyum Sülfat (K_2SO_4)	Carlo Erba 474167-1KG
Siyanidin 3-O-glukozit klorür	GLPBIO-GN10743
Sodyum Klorür NaCl	Sigma-Aldrich S5886
Streptomisin	Sigma-Aldrich S9137
SYBR safe	Invitrogen S33102
Tiamin Hidroklorür ($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$)	AFG Bioscience 402129-25G
Tris Base	neoFroxx 1115KG001
Trisin	BioShop / TRI001.100
Yeast ekstrakt	Bacto TM 212750

2.2. Kitler ve Enzimler

Tez kapsamında; GST geninin klonlanması, *E. coli* hücrelerine transformasyonu ve klonların doğrulanması sırasında kullanılan kitler, enzimler ve DNA belirteçleri **Tablo 2.2**'de verilmiştir.

Tablo 2.2: Tez kapsamında kullanılan kitler, enzimler, belirteçler.

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

2.3. Cihazlar

Tez kapsamında kullanılan cihazlar **Tablo 2.3**'te sunulmuştur.

Tablo 2.3: Cihazların listesi.

Cihaz adı	Cihaz markası ve modeli
+4 °C ve -20 °C buzdolabı	Arçelik
-80 °C derin dondurucu	ESCO Lexicon II ULT Freezer
Agaroz jel görüntüleme cihazı	Azure Biosystem, c600
Buz makinesi	Vosko
HPLC	Shimadzu – DGU-20A5R
Masa üstü santrifüj	VWR, Microsent 17R
Mikrodalga fırın	Beko 1550
Otoklav	Hirayama, Hicla HVE-110
PCR cihazı	Thermocycler Biometra
pH metre	Hana Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter
Santrifüj	Beckman Coulter TM – Microfuge 18 centrifuge
Soğutmalı santrifüj	Gyrozen 1248R
Soğutmalı santrifüj	Scanspeed Falkon Santrifüj-1580R
Steril kabin	Heraeus Hera Safe HS 12
Tartı	Precisa 1200C ve Shimadzu AUW220D

2.4. Besiyerleri ve Çözeltiler

Tez kapsamında gerçekleştirilen klonlama, transformasyon ve hücre kültürü basamaklarında kullanılan çözelti ve besiyerleri aşağıda verilmiştir.

2.4.1. Improved Buffer

Kompetan hücre hazırlanması için improved buffer, 5 mL CaCl₂ ve 50 ml LB karıştırılması ile hazırlanmış ve 0,22 µL’lik filtre ile steril edilmiştir.

2.4.2. TAE Buffer (50×)

50×'lik TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) tamponu 242 g Tris-base, 57,1 mL asetik asit ve 100 ml 0,5M EDTA'nın karıştırılıp 1 litreye distile su ile tamamlanması ile elde edilmiştir. Agaroz jelde kullanılırken tampon 1×'e sulandırılarak kullanılmıştır.

2.4.3 LB Broth ve LB Agar

LB broth'un hazırlanması için Kimyasallar saf suda çözülüp 1 L hacme tamamlanmıştır. 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (**Tablo 2.4**). LB agarın hazırlanması için agar hariç kimyasallar saf suda çözülüp 1L hacme tamamlanıp agar eklenmiştir. 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (**Tablo 2.5**).

Tablo 2.4: LB broth içeriği.

İçerik	Miktar
Nutrient broth	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	8 g
Tris base	0,52 g

Tablo 2.5: LB agar içeriği.

İçerik	Miktar
Nutrient broth	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	8 g
Agar	15 g

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

E. coli hücrelerinde C3G üretiminin optimizasyonu için kullanılan AMM besiyerinin hazırlanışına dair ayrıntılı bilgi aşağıda verilmiştir.

10X tuz çözeltisinin hazırlanması için hassas terazide ilgili kimyasallar tartıldıktan sonra beher içine eklenerek, 300 ml suda manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Mezürde hacim 500 mL'ye tamamlandıktan sonra shot şişeye aktarıldı. Daha sonra AMM besiyeri içinde $MgSO_4$ 'ın çökmemesi için fosforik asit (Sigma) ile pH 6.49'a ayarlandı. Filtre sterilizasyonu (0,45 μm şırınga ucu filtre ile) yapılarak, oda sıcaklığında saklanmıştır (**Tablo 2.6**).

Tablo 2.6: 10X tuz çözeltisi içeriği.

İçerik	Miktar
KH_2PO_4	17,5 g
$KHPO_4$	25 g
$(NH_4)_2HPO_4$	17,5 g

1 M $CaCl_2$ çözeltisinin hazırlanması için 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'in hazırlanması için 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 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ çözeltisinin hazırlanması için 246,47 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ tartıldıktan sonra önce 700 mL suda çözdürüldü. Mezür ile hacmi 1000 mL'ye tamamlanıp tamamlandı ve manyetik karıştırıcıda tekrar homojenize hale getirildi. Ardından laminar akışlı kabinde filtre sterilizasyonu yapılarak ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

%50'lik glukoz çözeltisinin hazırlanması için 100 g glukoz tartıldıktan sonra 80 mL suda çözdürüldü. Mezür ile hacmi 200 mL'ye tamamlanıp manyetik karıştırıcı ile homojen hale getirildi. Ardından laminar akışlı kabinde filtre sterilizasyonu yapılarak ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Mikronütrient çözeltisinin hazırlanması için **Tablo 2.7**'deki ilgili kimyasallar hassas terazide tartılıp beher içine alındı ve 40 mL suda çözdürüldü. Mezürde hacim su ile 50

mL'ye tamamlandı. Ardından laminar akışlı kabinde filtre sterilizasyonu yapıldı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Tablo 2.7: Mikronütrient çözeltisi içeriği.

İçerik	Miktar
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,009 g
H_3BO_3	0,063 g
CuSO_4	0,006 g
MnCl_2	0,040 g
ZnSO_4	0,007 g

10X MOPS çözeltisinin hazırlanması için 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 µl/L mikronütrient karışımdan eklendi. Manyetik karıştırıcıda homojenize hale getirilip hacmi 1000 mL'ye tamamlandı. Ardından laminar akışlı kabinde filtre sterilizasyonu yapıldı ve 50 mL'lik falkon tüplere ayrıldı. Sonrasında -20°C'de muhafaza edildi (**Tablo 2.8**).

Tablo 2.8: 10X MOPS çözeltisi içeriği.

İçerik	Miktar
MOPS	83,72 g
Tricine	7,17 g
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,03 g
NH_4Cl	5,10 g
K_2SO_4	0,48 g
MgCl_2	1,10 g
NaCl	29,20 g

1000 X ampisilin çözeltisinin hazırlanması için 0,80 g ampisilin tartıldıktan sonra 10 mL suda vorteks ile çözülmüştür. Filtre sterilizasyonu ile 1,5 mL'lik eppendorflara aktarıldıktan sonra -20°C'de muhafaza edilmiştir.

1000 X streptomisin çözeltisinin hazırlanması için 0,50 g streptomisin tartıldıktan sonra 10 mL suda vorteks ile çözdürüldü. Filtre sterilizasyonu ile 1,5 mL'lik eppendorflara aktararak -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Yukarıda belirtilen tüm çözeltiler hazırlandıktan sonra, **Tablo 2.9**'da belirtilen ölçülerde karıştırılarak AMM besiyeri hazırlanmıştır.

Tablo 2.9: %2 Glukoz içeren AMM besiyeri bileşenleri (1 litre için).

Stok Çözeltileri	Hacim
10× Tuz Stok Çözeltisi	100 mL
50% Glukoz 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

Laminar akışlı kabinde, CaCl₂'ün çökmemesi için öncelikle su eklenerek çözelti hazırlanmaya başlandı. 10× Tuz Stok Çözeltisi ve %50'lik glukoz çözeltisi eklendikten sonra optimizasyon koşuluna uygun miktarda kazaminoasit eklendi. Sonrasında diğer içerikler de eklenip çözelti hazırlandı.

2.5. Glutasyon S-Transferaz Geninin (GtGST) Sentezi

Gentiana triflora × *Gentiana scabra* Albireo bitkisine ait GtGST glutasyon S-transferaz (GST) geni, *Nde*I (5' ucu) ve *Kpn*I (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**'deki gibidir.

5. Optimized Sequence (Optimized Sequence Length:642, GC%:54.91)

```
GCGGTGAAGGTTTATGGTCCGGTTACCGCGGGTTGCCCGCAGCGTGTGATCGTTTGCCTGATTGAGATGGGTGTG
GAGTTCGAAACCGTTCACATCGACCTGGTTAGCGGCGAACACAAGAAACCGGATTTCTGCTGCTGCAGCCGTTT
GGTCAAGTGCCGGTTATCGAGGACGGCGATTTCCGTCTGTTTGAAGCCGTGCGATTGTGCGTTACTATGCGGCG
AAGTATGCGGACAAAGGTCCGAACCTGCTGGGCACCACCCTGGAGGAAAAGCGGCGGTTGACCAGTGGCTGGAA
GTGGAAGGCCACAACCTTAACGATCTGGTGGTTGCCGTGGTTCTGCAAATCGAGGTGCTGCCGCGTATGGGTATT
CCGACCGACAGCAGCGTGGTTCAGGATACCATTAAACAAGCTGCAAAACGTGCTGGATGTTTACGAGCAACGTCTG
AGCCGTAGCAAATATCTGGCGGGCGACGAATTCACCATCGCGGATATGTGCCACCTGCCGGGTATTAATTTCTG
ACCACCGACGGTGGCGTTGGCGATCTGATCAAGGAACGTAAGCGTGAATCCTGGTGGCGGACATTAGCAGC
CGTCCGGCGTGAAGAAAGTTCTGGATCTGATGAAGAAATAA
```

Şekil 2.1: GtGST'nin kodon optimize gen dizilimi.

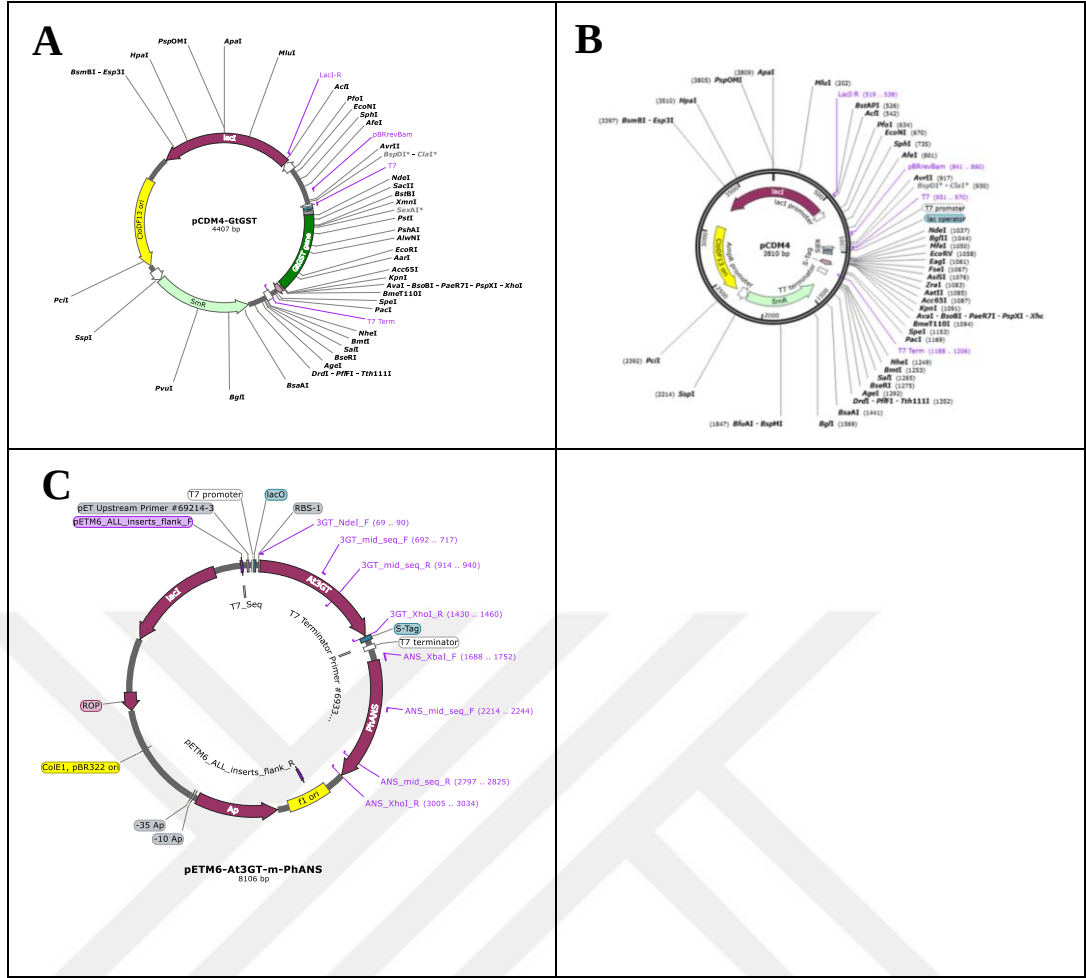
2.6. C3G Rekombinantı ve GST Rekombinantı Hücrelerin Transformasyonu

Tez kapsamında, C3G rekombinantı ve GST rekombinantı olarak iki grup hücre hazırlanmıştır.

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

GST rekombinantı: E. coli BL21 (DE3) - pETM6-At3GT-m-PhANS ve pCDM4-GtGST

Kullanılan plazmitler Şekil 2.2'de ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 2.2: C3G üretimi için kullanılan plazmitler (A: pCDM4-GtGST, B: pCDM4, C: pETM6-At3GT-m-PhANS).

C3G rekombinantı ve GST rekombinantı hücreleri hazırlamak için ilgili plazmitler ayrı ayrı *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine transforme edilmiştir.

2.7. -20 °C ve -80 °C Gliserol Stoklarının Hazırlanması

Hücreler dirençli olduğu antibiyotigi içeren LB agar besiyerine çizgi metodu ile ekilip 37 °C’de inkübe edilmiştir. Gece boyu büyüyen hücrelerden tek koloni alınıp hücrelerin dirençli olduğu antibiyotigi içeren 3 mL LB besiyerine ekilip 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Gece boyu büyüyen hücrelerden -20 °C stoğu için 625 µL steril %80 gliserol + 375 µL kültür, -80 °C stoğu için 375 µL steril %80 gliserol + 625 µL hücre kültüründen eklenip stoklanmıştır.

3. YÖNTEM

Tez kapsamında stoklama ve ekspresyon için kullanılan bakteri soyları ve vektörler **Tablo 3.1**'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Tez kapsamında kullanılan bakteri soyları ve vektörler.

Bakteri soyu ya da vektör ismi	Özellikleri	Kullanılan antibiyotik	Kaynakça
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F ⁻ , ϕ80d lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, recA1, endA1, hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺), phoA, supE44λ ⁻ , thi ⁻ , 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	Xu vd., 2012a
pETM6-At3GT-PhANS	pETM6 with At3GT and PhANS, monocistronic	Ampisilin	Cress vd., 2017
pCDM4	CloDF13, Str ^r , with ePathBrick feature	Streptomisin	P.Xu vd., 2012a

Glutatyon S-transferaz geni (*GtGST*) sentetik olarak sentezlenmiş ve pUC57 vektörü içine klonlanmış bir şekilde temin edilmiştir. *E. coli* DH5α kompetan hücreleri hazırlanmış ve *GtGST* genini içeren pUC57 plazmiti kompetan hücrelere transforme edilmiştir. Bu hücrelerden plazmit izolasyonu gerçekleştirilip pUC57-*GtGST* plazmitleri *NdeI* ve *KpnI* enzimleri ile kesilip agaroz jelde yürütülerek *GtGST* geni jelden izole edilmiştir. Elde edilen gen pCDM4 ekspresyon vektörüne klonlanarak *E. coli* DH5α hücrelerine transforme edilerek stoklanmıştır.

3.1. Kompetan Hücre Hazırlanması

pUC57-*GtGST* vektörlerini *E. coli* DH5α hücrelerine transforme etmek için ilgili hücreler CaCl₂ ısı şoku yöntemiyle kompetan hale getirilmesi için -80 °C stoktan alınan *E. coli* DH5α hücreleri antibiyotiksiz LB Agar içeren petri kaplarına ekildi ve 37°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün katı besiyerinden alınan tek

koloni 50 ml antibiyotiksiz LB besiyerinde 37°C’de 200 rpm’de OD600 değeri 0,65 aralığına gelene kadar inkübe edilmiştir. Metabolizmayı yavaşlatıp bölünmeyi durdurmak için bakteriler steril santrifüj tüplerine aktararak 5 dakika buzda soğutulmuştur. 1000 g’de 4°C’de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet, 20 ml’lik improved buffer ile resuspense edilmiş ve 5 dakika buzda bekletildikten sonra 1000 g’de 4°C’de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Tekrardan süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet 20 mL’lik improved buffer ile resuspense edilmiş ve 5 dakika buzda bekletildikten sonra 1000 g’de 4°C’de 6 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet üzerine 4 mL taze improved buffer eklenip çözündürülerek -80°C’ye stoklanmıştır.

3.2. *E. coli* DH5α Hücrelerine pUC57-GtGST Plazmitinin Transformasyonu

45 µL kompetan *E. coli* DH5α hücresi içeren eppendorf tüplere, 100 ng pUC57-GtGST eklenerek 20 dakika buzda, 50 saniye 42°C su banyosunda, sonrasında 2 dakika buzda bekletilmiştir. 950 µL LB besiyeri eklenip 50 dakika 37°C’de bekletilip 2000 g’de 4 dakika santrifüj edilmiştir. 800 µL’lik süpernatant uzaklaştırılıp, pellet çözündürülüp 20 mL LB Agar besiyerine (80 µg/mL ampisilin) ekilerek 37°C’de inkübe edilmiştir. Oluşan tek kolonilerden alınarak 5 mL’lik LB besiyerinde (80 µg/mL ampisilin) 37°C’de 200 rpm’de sıvı gece boyu inkübe edilmiştir. Sonrasında pUC57-GtGST plazmiyle transforme olmuş *E. coli* DH5α hücreleri -20 °C ve -80 °C’ye stoklanmıştır.

3.3. Miniprep Protokolü

pUC57-GtGST vektörünü içeren *E. coli* DH5α hücrelerinden vektörlerin eldesi için Monarch® Plasmid Miniprep Kit NEB #T1010S/L kullanılmıştır. Bu yöntem standart hücre süspansiyonunu, alkalın lizisi ve nötralizasyon adımlarını kullanarak hücrelerden plazmitin eldesini sağlar.

pUC57-GtGST vektörleriyle transforme olmuş *E. coli* DH5α hücreleri gece boyu LB besiyerinde büyütüldükten sonra, 3.500 g’de 20 dakika 4°C’de santrifüjlenip süpernatantı uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti 200 µL kit içeriğindeki Plasmid Resuspension Buffer (B1) ile resuspense edilmiştir. Hücreler 200 µL kit içeriğindeki

Plasmid Lysis Buffer (B2) ile 1 dakika inkübe edilip liziz edilmiştir. Lizat, kit içeriğindeki 400 µL'lik Plasmid Neutralization Buffer (B3) ile 2 dakika inkübe edilip nötralize edilmiştir. 5 dakika 16.000 g'de santrifüj edilip süpernatant spin column'a aktarılıp 16.000 g'de 1 dakika inkübe edilip flow-through atılmıştır. RNA'ları, proteinleri ve endotoksinleri uzaklaştırması için kolona 200 µL kit içeriğindeki Plasmid Wash Buffer 1 eklenip 16.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolona 400 µL kit içeriğindeki Plasmid Wash Buffer 2 eklenip 16.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Plazmitleri elde etmek için kolon 1,5 mL'lik microfuge tüpüne alınıp 30 µL ddH₂O kolona eklenip 1 dakika inkübe edilmiş, sonrasında da 16.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

3.4. Klonlama Protokolü

GtGST geninin etkisinin belirlenmesi için bu gen ekspresyon vektörü pCDM4'e klonlanmıştır. Bu amaçla, öncelikle *GtGST* geni içinde bulunduğu pUC57-*GtGST* plazmitinden çıkarılarak pCDM4 vektörüne klonlanmıştır. Her iki plazmit bu amaçla, *NdeI* ve *KpnI*-HF restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Reaktantlar **Tablo 3.2**'de gösterildiği miktarda eklenip pipetlenerek karıştırılmıştır. 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Enzimlerin inaktivasyonu için kesim sonrasında 20 dakika 65°C'de bekletilmiştir.

Tablo 3.2: Restriksiyon enzim kesim tepkimesi.

Reaktantlar	pUC57- <i>GtGST</i>	pCDM4
DNA (1000 ng)	7 µL	15 µL
rCutsmart Buffer (10X)	3 µL	3 µL
<i>NdeI</i> (20 U/mL)	1 µL	1 µL
<i>KpnI</i> (20 U/mL)	1 µL	1 µL
dH ₂ O	18 µL	10 µL
Toplam	30 µL	30 µL

NdeI ve *KpnI* restriksiyon enzimleriyle kesilen pUC57-*GtGST* ve pCDM4 vektörleri 1× TAE tamponu ile hazırlanmış %1'lik agaroz jel elektroforezine 1 kb DNA belirteci ile yüklenip belirtecin bantları açılana kadar 110 volt'ta 30-45 dakika yürütülmüştür.

GtGST genini ve pCDM4 vektörlerini içeren jel kısımları steril bistüri ile kesilerek 1,5 mL'lik microcentrifuge tüplerine aktarılmıştır. Gen ve vektörün jelden ekstraksiyonu için Eco Pure Gel Extraction Kit kullanılmıştır. Jellerin ağırlıkları ölçülüp jel ağırlığına göre kullanılacak buffer miktarları hesaplanmıştır. Her 100 mg jel için 300 µL EcoPure Bağlanma tamponu eklenip 10 dakika süre için 55°C'lik sıcak su banyosuna konarak 2 dakikada bir vortekslendi. Çözünen jellere her 100 mg agaroz jel için 150 µL izopropanol eklendi. Çözelti kolona aktarılarak 16.000 g'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Flow-through atılıp 700 µL EcoPure Yıkama tamponu kolona eklenip 16.000 g'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Flow-through atılarak boş kolon 16.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon 1,5 mL'lik eppendorf tüpe aktararak üzerine 30 µL ddH₂O eklendi ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 16.000 g'de santrifüjlenerek elde edilen DNA -20 °C'ye kaldırıldı.

Jelden elde edilen *GtGST* geni ve pCDM4 vektörünün ligasyonu T4 DNA ligaz (NEB T4 DNA Ligase M0202S) enzimi ile gerçekleştirilmiştir. Tablo 3.3'e göre 50 ng pCDM4'e 1/3 oranda *GtGST* geni, 1× ligasyon tamponu ve 1 µL T4 DNA ligaz enzimi ile gece boyu 16 °C'de inkübe edilmiştir.

DNA parçalarının konsantrasyonları nanodrop ile tayin edildi. Birbirini tamamlayan kesim noktalarına sahip lineer pCDM4 vektörü ve *GtGST* geni ligasyon için kullanılmıştır: Ligasyon işlemi için T4 DNA ligaz enzimi kullanılmıştır. T4 DNA ligaz protokolüne göre ligasyon oranları hesaplanmıştır (3.1). 50 ng pCDM4 ile 1:3 molar oran verecek şekilde *GtGST* 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'de 10 dakika inaktivasyon yapıldı.

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

Tablo 3.3: Ligasyon tepkimesi.

Reaktantlar	Hacimler
Insert DNA (<i>GtGST</i>) (50 ng)	6,25 µL
Vector DNA (pCDM4) (37,5 ng)	1,75 µL
T4 DNA Ligaz buffer	2 µL
dH ₂ O	10 µL
T4 ligaz	1 µL

pCDM4-*GtGST* ligasyon ürünleri önceki adımlarda yapıldığı gibi CaCl₂ metodu ile kompetan *E. coli* DH5α hücrelerine aktarılmıştır. Bunun için 2,5 µL pCDM4-*GtGST* plazmiti 50 µL kompetan hücreye transforme edilmiştir. 50 mg/mL streptomisin içeren besiyerinde büyütülen koloniler 50 mg/ml streptomisin içeren LB sıvı besiyerinde 37 °C’de 16 saat büyütülmüştür. Büyütülen kültürlerden hem -20 °C ve -80 °C gliserol stokları atılmış hem de klonların enzim kesimi ve PCR ile doğrulanması için plazmit izolasyonu yapılmıştır.

3.5. Klonların Doğrulanması

3.5.1. Restriksiyon Enzim Kesimi ile Klonların Doğrulanması

Klonların doğrulanması için elde edilen plazmitler tekli ve ikili olarak restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. İkili kesim için **Tablo 3.4**’te verilen miktarlarla *NdeI* ve *KpnI* restriksiyon enzimleriyle yapılmıştır. Reaktantlar 37 °C’deki su banyosunda 45 dakika inkübe edilmiştir. %1’lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir.

Tablo 3.4: pCDM4-GtGST plazmitinin *NdeI-KpnI* restriksiyon enzimi ile kesimi.

Reaktantlar	Miktar
DNA (1000 ng)	5 µL
rCutsmart buffer	2 µL
<i>NdeI</i> restriksiyon enzimi (20 U/mL)	1 µL
<i>KpnI</i> restriksiyon enzimi (20 U/mL)	1 µL
dH ₂ O	11 µL
Toplam	20 µL

Klonların *NdeI-KpnI* enzimleri ile doğrulaması yapıldıktan sonra *XhoI* restriksiyon enzimi ile tekli kesimi **Tablo 3.5**'e göre yapılmıştır. Reaktantlar 37°C'deki su banyosunda 45 dakika inkübe edilmiştir. %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir.

Tablo 3.5: pCDM4-GtGST plazmitinin *XhoI* restriksiyon enzimi ile kesimi.

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

3.5.2. PCR ile Doğrulama

pCDM4-GtGST vektörleriyle transforme edilen *E. coli* DH5α hücreleri ayrıca koloni PCR yöntemi ile de doğrulanmıştır. Bunun için İntron Taq DNA Polimeraz (Kat. No. 30221847), T7 forward (F-5'-TAATACGACTCACTATAGGG) ve T7 reverse (R-5'-GCTAGTT ATTGCTCAGCGG) primerleri ile **Tablo 3.6**'ya göre hazırlanan reaktantlarla **Tablo 3.7**'daki döngüye göre PCR yapılmıştır. PCR ürünleri %1'lik agaroz jele 10 µl DNA ve 2 µl yürütme boyası olacak şekilde GeneRuler 1Kb Plus

DNA belirteci ile birlikte yüklenip 80 volt'ta yürütölüp analiz edilmiştir. Kontrol olarak ayrıca boş pCDM4 plazmiti de T7 primerleri ile çoğaltılmıştır.

Tablo 3.6: PCR protokolü reaktantları.

i-Taq PCR Protokol Reaktantları	Hacim
10 × PCR buffer	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µL
dNTP (200 µM)	2 µL
Plazmit DNA (100 ng) (pCMD4- <i>GtGST</i>)	1 µL
Forward T7 primer (250 nM)	1 µL
Reverse T7 primer (250 nM)	1 µL
i-Taq DNA polimeraz	1 µL
dH ₂ O	14 µL
Toplam	25 µL

Tablo 3.7: PCR döngüsü.

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

3.6. GST Rekombinantı ve Siyanidin 3-O-Glukozit Üreticisi (C3G) *E. coli* BL21 (DE3) Hücrelerinin Hazırlanması

Yapılan bu tez çalışmasıyla GST geninin (*GtGST*) C3G üretimine olan etkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinde C3G üretiminde Prof. Dr. Mattheos A. G. Koffas'ın hediye ettiği ampisilin direnç geni içeren pETM6-At3GT-PhANS plazmiti kullanılmıştır. *GtGST* geni streptomisin direnç geni barındıran pCDM4 plazmitine klonlandığından GST rekombinantı ve C3G

rekombinantı hücrelerin kültür koşullarının benzer olabilmesi için kontrol grubu hücrelere ayrıca boş pCDM4 plazmiti eklenmiştir (Cress vd., 2017).

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

C3G üreticisi pETM6-At3GT-m-PhANS ve boş pCDM4 plazmitleri önceki anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine CaCl₂ ısı şoku metodu ile aktarılmıştır (Yöntem 3.2). Transformantlar 80 µg/ml ampisilin ve 50 µg/ml streptomisin içeren LB agar besiyerine yayma ekim yöntemi ile ekilip gece boyu 37 °C’de inkübe edildi. Her iki plazmitteki antibiyotik direnç genlerine duyacağı ihtiyaçtan dolayı büyüyen koloniler transformant kabul edildi.

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

C3G üreticisi pETM6-At3GT-m-PhANS ve GtGST genini taşıyan pCDM4-GtGST plazmitleri önceki anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine CaCl₂ ısı şoku metodu ile aktarılmıştır (Yöntem 3.2). Transformantlar 80 µg/ml ampisilin ve 50 µg/ml streptomisin içeren LB agar besiyerine yayma ekim yöntemi ile ekilip gece boyu 37 °C’de inkübe edildi. Her iki plazmitteki antibiyotik direnç genlerine duyacağı ihtiyaçtan dolayı büyüyen koloniler transformant kabul edildi.

Her iki grup için tek kolonilerden LB besiyerinde 37 °C’de gece boyu çalkalamalı inkübatörde kültür başlatılıp ertesi gün -20 °C ve -80 °C stokları yapılmıştır.

Tablo 3.8: GST geninin C3G üreten hücelere transformasyonu.

	Nanodrop ölçümleri	Transformasyon için kullanılan miktar (pCDM4-genler)	Transformasyon PhANS miktarı	Kompetan Hücre Miktarı
GtGST	189,2 ng/µL	1,3 µL	1,7 µL	50 µL
pCDM4	125,1 ng/µL	1,8 µL	1,7 µL	50 µL

C3G rekombinantı *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri C3G üretici plazmit olan pETM6-At3GT-m-PhANS’yi ve boş pCDM4 plazmitine sahiptir. Tez kapsamında C3G üretimine etkisini değerlendirmek istediğimiz GtGST içeren hücreler ise C3G üretici pETM6-At3GT-m-PhANS plazmiti ve pCDM4-GtGST plazmitlerini içeren *E. coli* BL21 (DE3) hücreleridir.

3.7. Büyüme Eğrisinin Hazırlanması

15 mL'lik Falcon tüp içerisinde 3 mL LB besiyerinde (50 µg/mL streptomisin ve 80 µg/mL ampicilin) gece boyu büyütülen pETM6-At3GT-m-PhANS ve pCDM4-GtGST plazmitlerine sahip C3G üreticisi *E. coli* BL21 hücrelerinden 200 µL alınıp 100 mL'lik Erlen içerisindeki 20 mL'lik AMM besiyerine (50 µg/mL streptomisin ve 80 µg/mL ampicilin) aktararak 37°C'de 200 rpm'de büyütüldü. Çeşitli sürelerde OD₆₀₀'de absorbans değerleri ölçülerek büyüme eğrisi grafiği hazırlandı.

3.8. Katekin Substratı, IPTG ve HPLC Çözeltilerinin Hazırlanması

- Katekin (50 g/L): C3G'nin üretildiği AMM besiyerinde substrat olarak kullanılan katekin çözeltisi, 500 mg katekinin [(+) Catechin Hydrate] 10 mL DMF:Etanol'de (8/2) çözülmesiyle elde edilmiştir. 1,5 mL'lik eppendorf tüplerde -20 °C'de saklanmıştır.
- IPTG (50 mM): C3G'nin üretilmesi için hücreleri uyarmada kullanılan IPTG, 50 mM'lık son hacim için 0,12 g toz IPTG'nin 10 mL ampul suda çözülüp filtre sterilizasyonu yapılmasıyla elde edilmiştir. 1,5 mL'lik eppendorf tüplerde -20 °C'de saklanmıştır.
- HPLC solventleri: HPLC analizinde kullanılan A ve B çözeltileri aşağıdaki şekilde hazırlanmışlardır.

A Çözeltisi: %0,1 formik asit içeren asetonitril çözeltisi için 1 ml formik asit 1000 ml asetonitril ile karıştırıldı.

B Çözeltisi: %0,1 formik asit içeren asetonitril çözeltisi için 1 ml formik asit 1000 ml ultra saf su ile karıştırıldı.

3.9. Kültür Şartları Optimizasyonu

GtGST rekombinantı ve C3G rekombinantı *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinin C3G üretimi için öncelikle hücreler -20 °C stoklarından 80 mg/L ampicilin ve 50 mg/L streptomisin içeren LB besiyerinde 37 °C, 175 rpm çalkalamada ön kültüre alınmışlardır. 16 saat büyümeden sonra 5 mL hacimli 48 kuyulu plakalarda (VWR) 1 mL AMM besiyerine inoküle edilmişlerdir. Plakalar steril kültür kapaklarıyla (VWR 60941-086) kapatılarak 37 °C'de 3,5 saat 175 rpm'de büyütülmüşlerdir. 3,5 saatin

ardından ekspresyon için hücrelere IPTG ve katekin verilip 225 rpm’de 30 °C’de inkübe edilmişlerdir. Kültürün farklı zamanlarında HPLC analizi için kültürden alınan örnek hacmine eş hacimde metanol:HCl (MeOH:HCl – 100/1) ile karıştırılıp vortekslenmiş ve 2.000 g’de 15 dakika santrifüj edilerek üst sıvı HPLC analizine alınmıştır.

C3G rekombinantı ve GST rekombinantı hücrelerde C3G üretiminin arttırılması için yapılan optimizasyonlar **Tablo 3.9**’da özetlenmiştir.

Tablo 3.9: C3G üretiminin arttırılması için yapılan optimizasyonlar.

İnokülasyon oranları %0,5 inokülasyon %1 inokülasyon %2,5 inokülasyon %5 inokülasyon %7,5 inokülasyon	IPTG uyarım zamanı 3,5 sa 4,5 sa 5,5 sa	IPTG konsantrasyonu 50 µM 100 µM 500 µM 1000 µM
Glukoz veya sükroz konsantrasyonları %2 veya %4	Örnek toplama zamanları 18 sa 21 sa 24 sa	Farklı nitrojen kaynakları Kasaminoasit (CA) (2 g/L – 4g/L), CA + pepton 2 g/L, maya eksrakı 2 g/L)

3.10. HPLC Analizi

HPLC analizi için, C3G üreticisi hücreler optimize şartlarda büyütülüp bu kültürlerden örnekler alınıp, eşit hacimde (1:1) metanol:HCl (100:1) çözeltisi ile karıştırılıp vortekslenmiş ve 2.000 g’de 15 dakika santrifüj edilerek üst sıvı alınmıştır. 20 µL, 1,5 mL’lik HPLC vialleri içindeki insertlere (İsolab I.097.05.111.100) aktarıldı. Shimadzu DGU-20A5R HPLC UV cihazı kullanıldı. Ters faz Zorbax SB-C18, 5 µm, 4,6×150 mm kolonda 0,5 mL/dk akış hızında 10 µL örnek enjeksiyonuyla 520 nm’de ölçüm yapılmıştır. Hareketli faz olarak %0,1 formik asit içeren asetonitril (A) çözeltisi ve %0,1 formik asit içeren ultra saf su (B) çözeltisi kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 35 °C’de sabit tutulmuştur. Kullanılan hareketli fazların oranları **Tablo 3.10**’daki gibidir.

Tablo 3.10: HPLC analizinde kullanılan hareketli fazların oranları.

Süre	A Çözeltisi	B Çözeltisi
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

Kalibrasyon eğrisi için MeOH:HCl'de (100/1) çözülmüş C3G standardından 4,875 mg/L, 9,75 mg/L, 19,5 mg/L, 39 mg/L ve 78 mg/L konsantrasyonlarındaki 5 standart hazırlanarak kullanıldı. Bu amaçla ilk olarak, 5 mg Siyanidin 3-O-glukozit klorür (GLP BIO) 1 mL saf DMSO'da çözülmüş daha sonra MeOH:HCl (100/1) ile seri dilüsyon yapılarak standartlar hazırlanmıştır. Tüm standartlar daha sonra -20 °C'de saklanmıştır.

3.11. C3G'nin UV-VIS Karakterizasyonu

C3G pigmentinin en çok absorpsiyon yaptığı dalga boyunun belirlenebilmesi için UV-VIS spektrofotometrisi yapılmıştır. GtGST rekombinantı ve C3G rekombinantı *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri öncelikle -20 °C stoklarından 80 mg/L ampisilin ve 50 mg/L streptomisin içeren LB besiyerinde 37 °C, 175 rpm çalkalamada ön kültüre alınmışlardır. 16 saat büyümeden sonra 5 ml hacimli 48 kuyulu plakalarda (VWR) 1 mL AMM besiyerine inoküle edilmişlerdir. Plakalar steril kültür kapaklarıyla (VWR 60941-086) kapatılarak 37 °C'de 3,5 saat 175 rpm'de büyütülmüşlerdir. 3,5 saatin ardından ekspresyon için hücrelere IPTG ve katekin verilip 225 rpm'de 30 °C'de inkübe edilmişlerdir. Kültürün farklı zamanlarında HPLC analizi için kültürden alınan örnek hacmine eş hacimde metanol-HCl (MeOH:HCl – 100/1) ile karıştırılıp vortekslenmiş ve 4.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek 200 µl üst sıvı spektrofotometrik analiz için 96 kuyucuklu plakaya eklendi. UV-VIS ölçümü 1 nm dalgaboyu aralıklarıyla 420 nm-650 nm arasında yapıldı.

4. BULGULAR

4.1 Glutasyon Transferaz Geni *GtGST*'nin Klonlanması ve Transformasyonu

GtGST geni kodon optimize olarak sentezlenmiş ve pUC57 vektörü içerisinde temin edilmiştir. *GtGST* geninin ekspresyon vektörü olan pCDM4 içerisine klonlanması için yapılan çalışmalara ait bulgular aşağıda sunulmuştur.

4.1.1. pUC57-*GtGST* İçeren *E. coli* DH5 α Hücrelerinin Plazmit İzolasyon Sonucu

pUC57 vektörü içerisinde satın alınan *GtGST* genlerinin ekspresyon vektörü olan pCDM4 içerisine klonlanması için pUC57-*GtGST* vektörü kompetan hale getirilmiş *E. coli* DH5 α hücrelerine transforme edilip stoklanmış, sonrasında bu hücrelerden Monarch® Plasmid Miniprep kiti ile plazmitler elde edilmiştir. Aynı şekilde stoklanmış olan pCDM4 içeren *E. coli* DH5 α hücrelerindeki plazmitler de Monarch® Plasmid Miniprep kiti ile edilmiştir. İzolasyon sonucunda elde edilen plazmitlerin plazmit DNA konsantrasyonları ve nükleik asit saflığını belirten A260/A280 nanodrop ölçüm sonuçları **Tablo 4.1**'de verilmiştir.

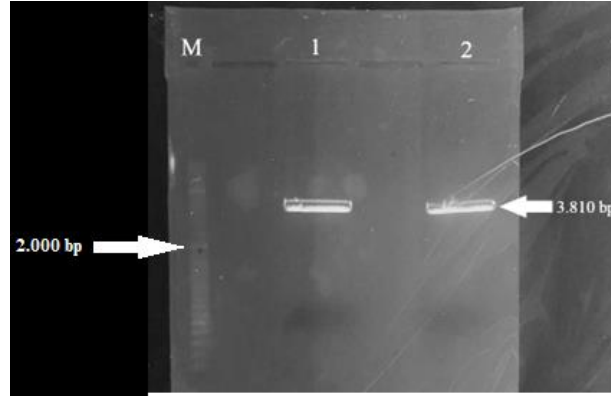
Tablo 4.1: pUC57-*GtGST* içeren *E. coli* DH5 α hücrelerinin plazmit izolasyonuna ait nanodrop ölçüm sonuçları.

Gen ve Plazmit İsimleri	Nanodrop Ölçümleri	A260/A280
<i>GtGST</i>	379,6 ng/ μ L	1,83
pCDM4-1	128,9 ng/ μ L	1,80
pCDM4-2	135,1 ng/ μ L	1,83

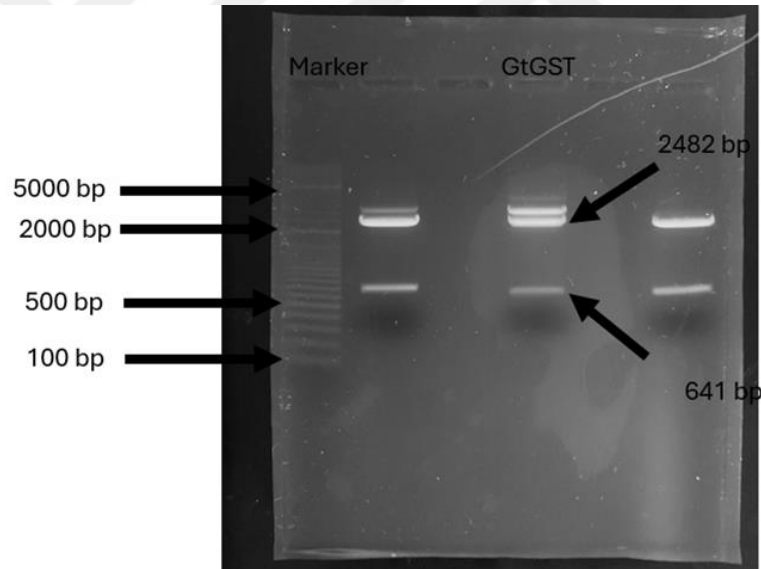
4.1.2. *GtGST* Geninin pCDM4 Plazmitine Klonlanması

Elde edilen bu plazmitler, *Nde*I (New England Biolabs *Nde*I Restriction Enzyme R0111S) ve *Kpn*I-HF (New England Biolabs *Kpn*I-HF Restriction Enzyme R3142S)

restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve **Şekil 4.1** ve **Şekil 4.2**'de görüldüğü gibi %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür.



Şekil 4.1: *E. coli* DH5 α hücrelerinden elde edilen pCDM4 plazmitlerinin *Nde*I ve *Kpn*I ile kesim sonucunun %1'lik agaroz jel analizi. M: DNA belirteci (Marker: 100 bp + 500 bp DNA ladder Thermo scientific, O'RangeRuler), 1 ve 2: pCDM4 plazmiti.



Şekil 4.2: *E. coli* DH5 α hücrelerinden elde edilen pUC57-*GtGST* plazmitlerinin *Nde*I ve *Kpn*I ile kesim sonucunun %1'lik agaroz jel analizi. M: DNA belirteci (100 bp + 500 bp DNA ladder Thermo scientific, O'RangeRuler), *GtGST*: kesilmiş pUC57-*GtGST* plazmiti.

Bantlar beklendikleri büyüklüklerde görüntülenmiştir ve pCDM4 ile *GtGST* bantları Monarch DNA Gel Extraction kiti ile jelden izole edilmiş ve DNA konsantrasyonları nanodrop ölçümü ile belirlenmiştir (**Tablo 4.2**).

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

Gen ya da plazmit adı	DNA konsantrasyonu (ng/ μ L)
<i>GtGST</i>	6 ng/ μ L
pCDM4-1	29 ng/ μ L
pCDM4-2	28 ng/ μ L

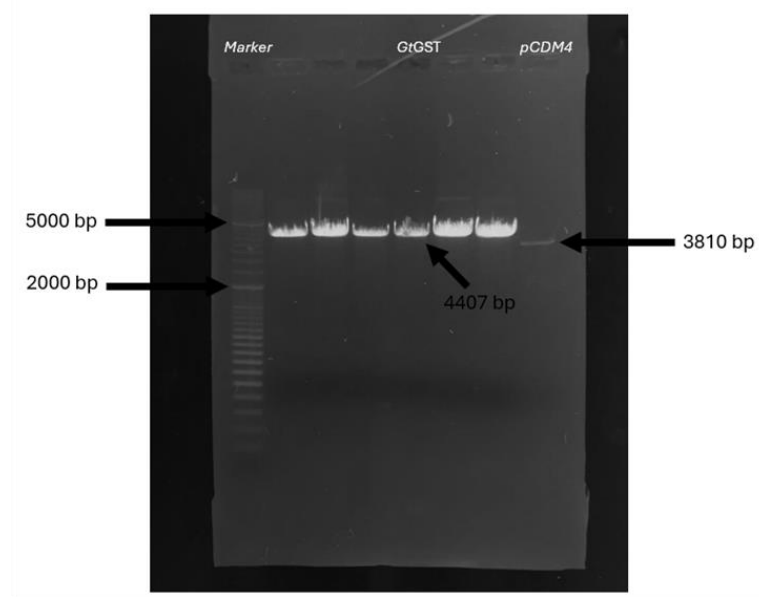
NdeI ve *KpnI*-HF kesimi sonucunda oluşan yapışkan uçlara sahip lineer pCDM4 vektörü ve *GtGST* geni ligasyon reaksiyonuyla birleştirilmiş ve pCDM4-*GtGST* olarak isimlendirilen ligasyon ürünleri kompetan *E. coli* DH5 α hücreleri içine CaCl₂ ısı şoku metodu ile aktararak 50 μ g/mL streptomisin içeren LB besiyerine ekilmiştir. Transformasyon işleminin ardından koloniler elde edilmiştir.

4.2. pCDM4-*GtGST* Klonlarının Moleküler Doğrulanması

E. coli DH5 α hücrelerine pCDM4-*GtGST* vektörlerinin transformasyonunun doğrulanması için oluşan koloniler sıvı besiyerinde büyütülerek kit ile plazmit izolasyonu yapılmış ve elde edilen plazmitlerin doğrulanması için restriksiyon enzim kesimi (tekli ve ikili) ve PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

4.2.1. *XhoI* Restriksiyon Enzim Kesimi ile Klonların Doğrulanması

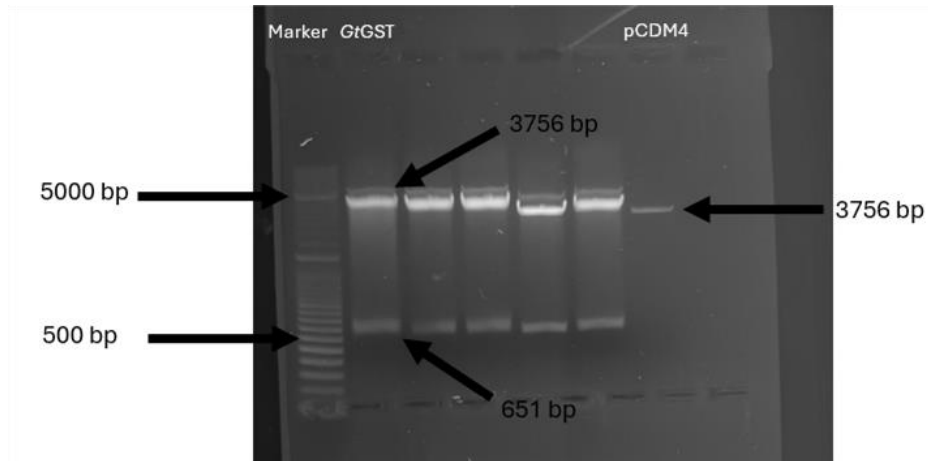
XhoI enzim kesimi sonucunda pCDM4-*GtGST* için 4407 bp boyutunda, pCDM4 için 3810 bp boyutunda bantlar elde edilerek klonlama doğrulanmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: *XhoI* ile enzim kesimi ile doğrulama (Marker: O'RangeRuler 100 bp+500 bp DNA Ladder ready-to-use).

4.2.2. *KpnI* ve *NdeI* Restriksiyon Enzim Kesimi ile Klonların Doğrulanması

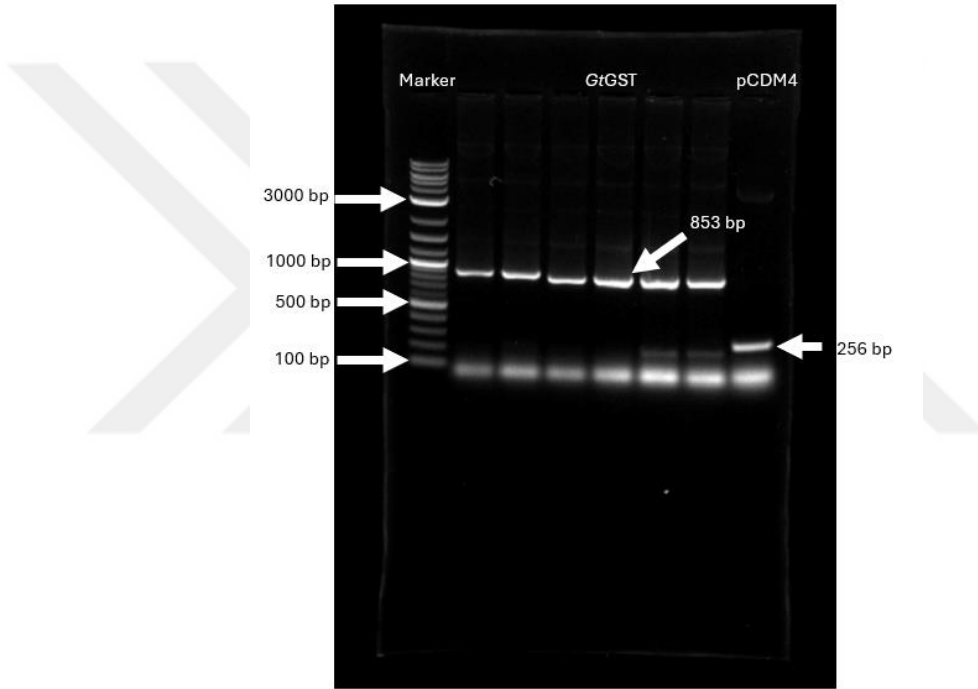
NdeI ve *KpnI* enzimleri ile kesim sonucunda pCDM4-*GtGST* için 3756 bp ve 651 bp (*GtGST*'yi içeren) boyutlarda, pCDM4 için ise 3756 bp boyutunda (54 bp'lık ikinci bant jel dışında kalmıştır) bantlar elde edilerek klonlama doğrulanmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: *NdeI* ve *KpnI* enzim kesimi ile klonların doğrulanması (Marker: O'RangeRuler 100 bp+500 bp DNA Ladder ready-to-use).

4.2.3. PCR ile Klonların Doğrulanması

pCDM4-GtGST vektörleriyle transforme edilen *E. coli* DH5 α hücreleri ayrıca PCR yöntemi ile de doğrulanmıştır. Bunun için iTaq DNA polimerase enzimi, T7 primerleri ile PCR yapılmıştır. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde analiz edilmiştir. **Şekil 4.5**'te gösterilen jel görüntüsü, pCDM4-GtGST plazmitinin ilgili geni içerdiğini PCR sonucunda beklenen 853 baz çiftlik bant ve pCDM4 plazmitinin T7 primerleri ile PCR'ı sonucunda vermesi gereken 256 baz çiftlik bant ile klonun doğruluğu onaylanmıştır.



Şekil 4.5: PCR ile klonların doğrulanması.

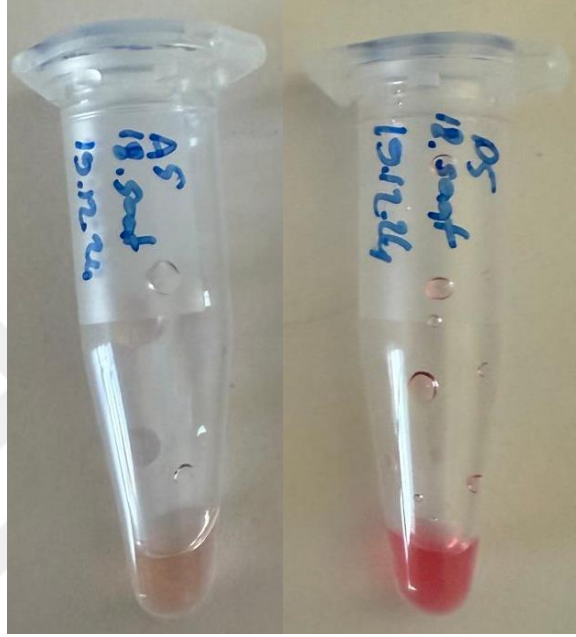
4.3. C3G Rekombinantı ve GST Rekombinantı *E. coli* BL21 (DE3) Hücrelerinin Transformasyonu

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

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

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

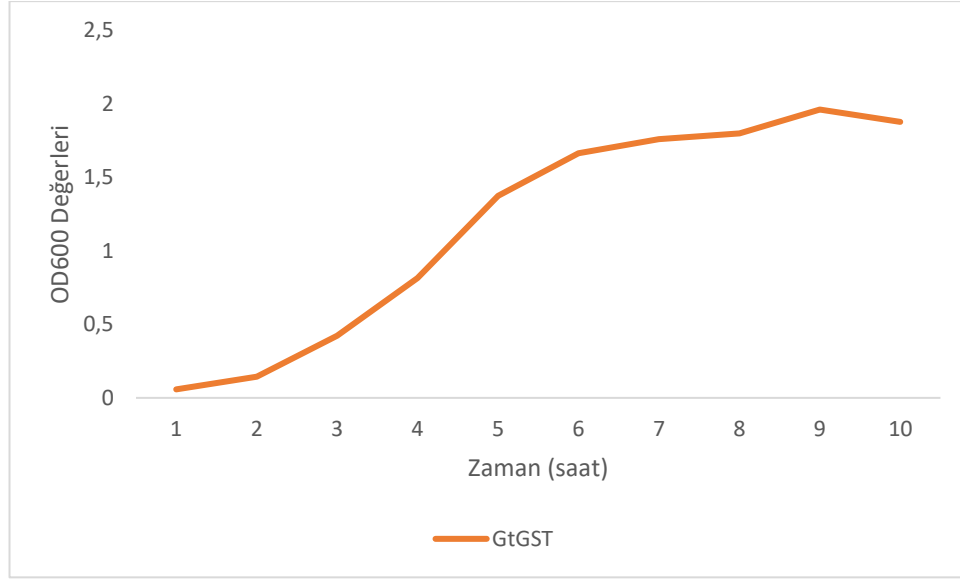
C3G rekombinantı ve GST rekombinantı C3G üreticisi hücreleri hazırlamak için ilgili plazmitler ayrı ayrı *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine transforme edildikten sonra 80 µg/mL ampicilin ve 50 µg/mL streptomisin içeren LB agar besiyerine aktarılmıştır. Her iki antibiyotigi de içeren besiyerinde büyüeyebilen kolonilerin ilgili plazmitleri taşıdığı bu şekilde doğrulanmıştır. Üretim sonucunda elde edilen antosiyaninler **Şekil 4.7**'de gösterilmiştir.



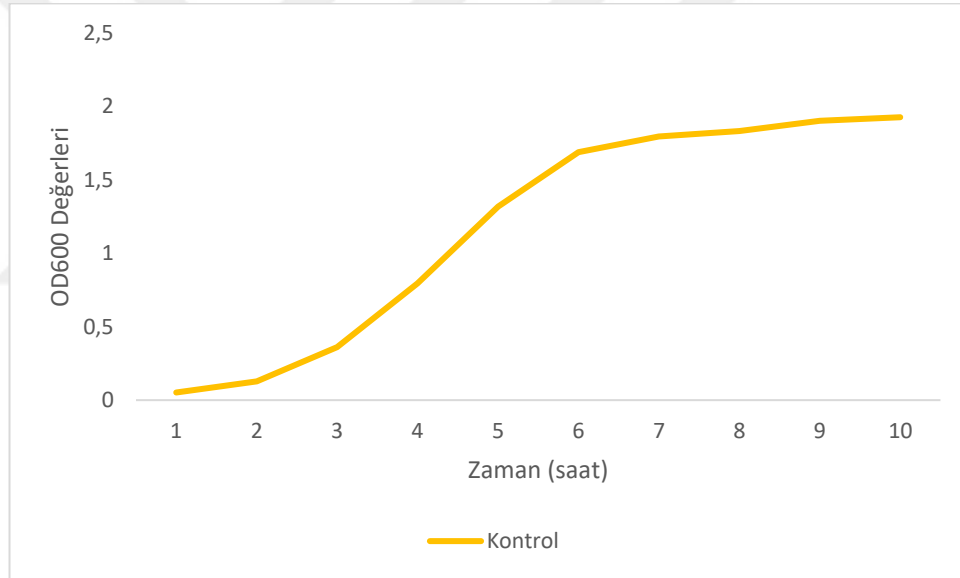
Şekil 4.6: C3G rekombinantı (sol) ve GST rekombinantı (sağ) hücrelerden elde edilen C3G örnekleri.

4.4. Siyanidin 3-O-Glukozit (C3G Üreticisi) *E. coli* BL21 (DE3) Hücrelerinin Büyüme Eğrisi

C3G üretiminin optimizasyonu öncesinde %2 glukoz, 2 g/L casaminoacid, 50 µg/ml streptomisin ve 80 µg/ml ampicilin içeren AMM besiyerine ekilerek 37°C'de 200 rpm'de büyütülen C3G rekombinantı ve GST rekombinantı *E. coli* BL21 hücrelerinin çeşitli zamanlarda alınmış OD₆₀₀ absorbans değerleriyle hazırlanmış büyüme eğrisi grafikleri **Şekil 4.8** ve **Şekil 4.9**'da verilmiştir. Sonuçlar, hücrelerin 3. saatten sonra logaritmik fazda olduğunu ve 7. saat sonrasında durağan faza geçmeye başladığını göstermektedir.



Şekil 4.7: GST rekombinantı *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinin büyüme eğrisi grafiği.

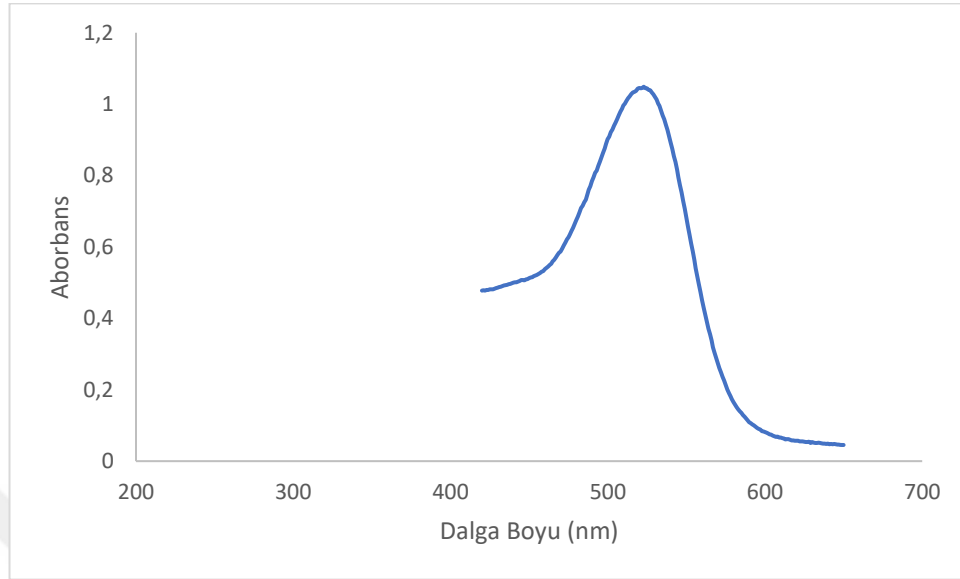


Şekil 4.8: C3G rekombinantı *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinin büyüme eğrisi grafiği.

4.5. Hücre Kültüründen Elde Edilen C3G'nin UV-VIS Karakterizasyonu

C3G pigmentinin maksimum ışık absorpsiyonunun ($\lambda_{\max}$) belirlenebilmesi için kültürden toplanan örnekler eşit hacimde metanol:HCl (100:1) ile karıştırılıp vortekslenmiş ve 2.000 g'de 15 dakika santrifüj edilerek üst sıvı alınmıştır. Alınan bu örneklerin daha sonra UV-VIS spektrofotometrisi yapılmıştır. UV-VIS karakterizasyonları, 1 nm aralıklarla ve 420-650 nm arasında ölçülerek maksimum ışık

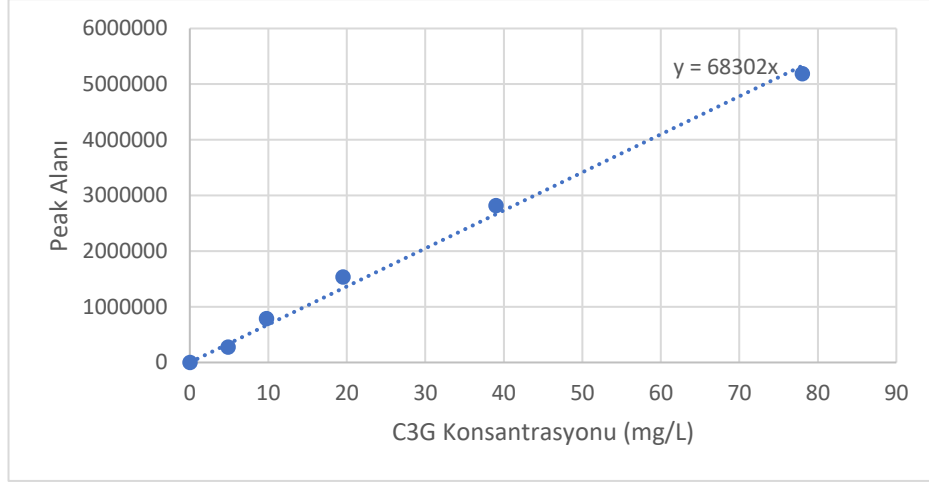
absorbsiyonları ($\lambda_{\max}$) belirlenmiştir (Şekil 4.10). Elde edilen sonuç, C3G plazmitinin maksimum absorbansının 520 nm olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.9: Hücre kültüründen elde edilen C3G'nin UV-VIS karakterizasyonu.

4.6 C3G Standartlarıyla Yapılan Kalibrasyon Eğrisi

Satın alınan C3G standardından 4,875 mg/L; 9,75 mg/L; 19,5 mg/L; 39 mg/L; 78 mg/L konsantrasyonların HPLC analiziyle saptanan absorbans değerlerinden, örneklerimizin konsantrasyonunu hesaplamak için kalibrasyon eğrisi çıkarılmıştır (Şekil 4.11).

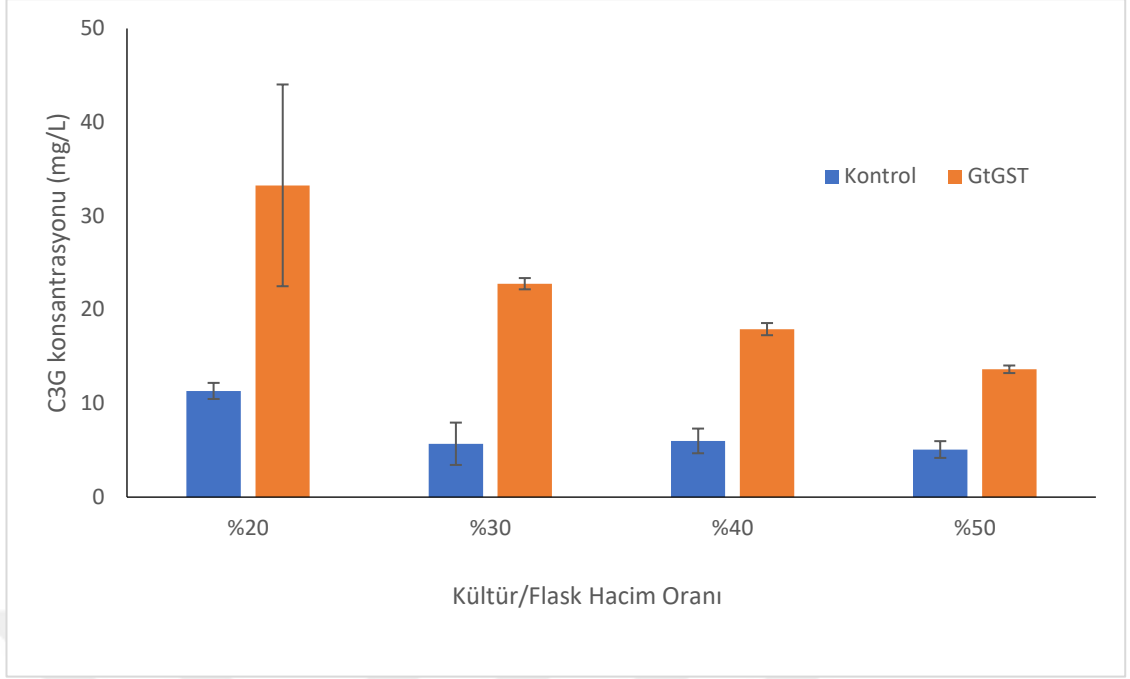


Şekil 4.10: C3G standardı kalibrasyon eğrisi.

4.7. Siyanidin 3-O-glukozit (C3G) Üretimi İçin Kültür Şartlarının Optimize Edilmesi

4.7.1. Kültür Hacim Oranının C3G Üretimine Etkisi

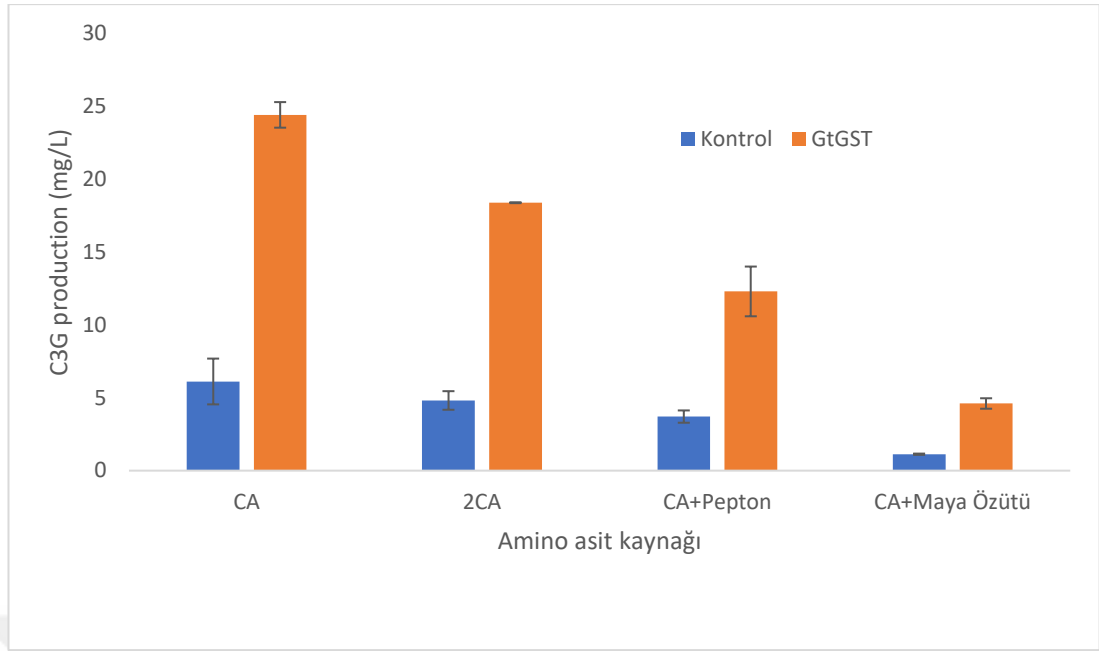
Kültür koşulları optimizasyonunda farklı kültür hacim oranlarının siyanidin 3-O-glukozit üretimindeki etkisini gözlemleyebilmek için %2 glukoz ve 2 g/L kasaminoasit (CA) içeren hacmen %20, %30, %40 ve %50 AMM medium'a (5 mL'lik 48 kuyucuklu plakalar içerisine 1 mL, 1,5 mL, 2 mL veya 2,5 mL olacak şekilde AMM besiyeri), 16 saat büyümüş hücrelerden hacmen %2,5 inokülasyon yapıldı. İnokülasyonun 3,5. saatinde 1 g/L kateşin öncül molekülü eklenip 0,05 mM IPTG ile uyarıldıktan 24 saat sonra örnekler toplandı. C3G konsantrasyonları Şekil 4.12'de verilmiştir. En yüksek C3G üretimi (C3G rekombinantı 11,32 mg/L C3G ve GST rekombinantlarında 33,26 mg/L) %20 kültür hacim oranında elde edilmiştir. En düşük C3G üretimi ise (kontrolde 5,07 mg/L ve GST rekombinantında 13,63 mg/L) %50 kültür hacim oranında elde edilmiştir. Sonuçlardan yola çıkılarak, bütün optimizasyon çalışmalarına %20 kültür hacim oranı ile optimizasyona devam edilmiştir.



Şekil 4.11: Kültür hacim oranının C3G üretimine etkisi.

4.7.2. Farklı Nitrojen Kaynaklarının C3G Üretimine Etkisi

Farklı amino asit kaynağı ve miktarının C3G üretimine etkisini denemek için 2 g/L kasaminoasit (CA), 4 g/L kasaminoasit (2CA), 2 g/L kasaminoasit + 2 g/L pepton (CA + pepton), 2 g/L kasaminoasit + 2 g/L maya özütü (CA + yeast extract) içeren AMM besiyerleri kullanılmıştır. Bunun için %2 glukoz içeren hacmen %20'lik AMM besiyerine %2,5'luk ön kültür inokülasyonu yapılmıştır. İnokülasyonun 3,5. saatinde 1 g/L katekin öncül molekülü eklenip 0,05 mM IPTG konsantrasyonu ile uyarıldıktan 24 saat sonra örnekler toplanmıştır. C3G konsantrasyonları **Şekil 4.13**'de verilmiştir. Bu koşullar altında 2 g/L kasaminoasit içeren besiyerinde GST rekombinantı (24,4 mg/L) C3G rekombinantının (6,11 mg/L) 4 katı C3G üreterek en çok C3G üretimini sağlamıştır.



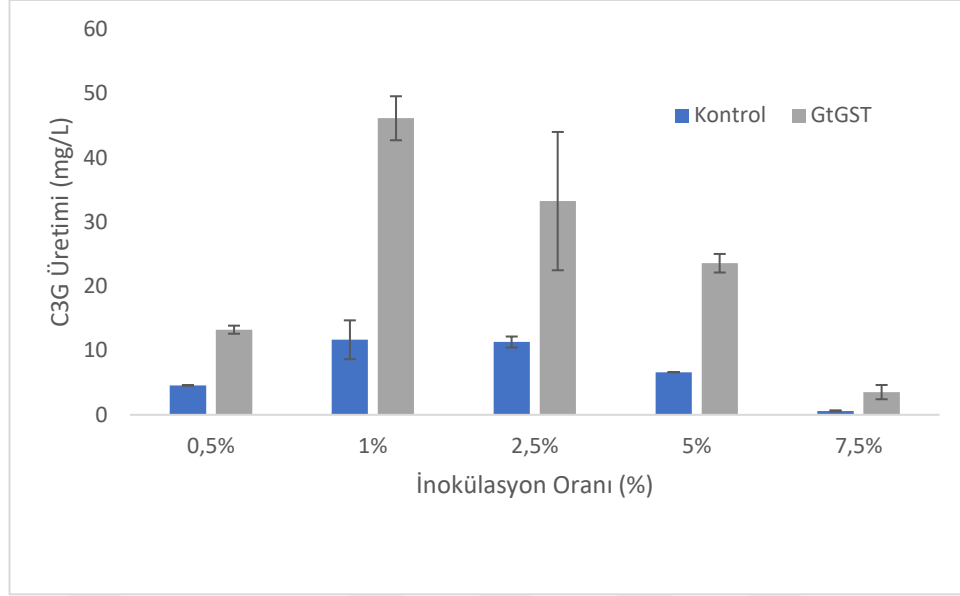
Şekil 4.12: Amino asit kaynağının C3G üretimine etkisi.

4.7.3. C3G Üretiminin Arttırılmasında Kültürlerin İnokülasyon Oranının Etkisi

Kültür koşulları optimizasyonu için C3G rekombinantı ve GST rekombinantı hücreler, %2 glukoz ve 2 g/L kasaminoasit 80 µg/mL ampisilin ve 50 µg/mL streptomisin içeren AMM besiyerine hacmen %0,5; %1; %2,5; %5 ve %7,5 oranında inoküle edilmiştir. İnokülasyonun 3,5. saatinde 1 g/L kateşin öncül molekülü eklenip 0,05 mM IPTG ile uyarıldıktan 24 saat sonra örnekler toplanarak C3G oranı HPLC ile analiz edilmiştir.

En yüksek C3G üretimi GST rekombinantı hücrelerde %1 inokülasyon oranında (46,15 mg/L) elde edilirken, ikinci en yüksek C3G üretimi %2,5 inokülasyon (33,26 mg/L) oranı ile sağlanmıştır. En düşük C3G üretimi ise %7,5 inokülasyon ile başlatılan kültürde gerçekleşmiştir.

GtGST rekombinantı hücrelerle C3G rekombinantı hücrelerinin C3G üretiminin farklı inokülasyonlardaki karşılaştırma grafiği **Şekil 4.14**'te verilmiştir. C3G rekombinantına kıyasla GST rekombinantı hücrelerde C3G üretimi %1 inokülasyonda yaklaşık 4 kata, %2,5 inokülasyonda ise yaklaşık 3 kata çıkmıştır. Elde edilen en yüksek değerler %1 inokülasyonda Kontrol grubunda 11,68 mg/L, GST rekombinantında 46,15 mg/L iken en düşük değerler %7,5 inokülasyonda Kontrol grubunda 0,61 mg/L, GST rekombinantında 3,53 mg/L'dir.

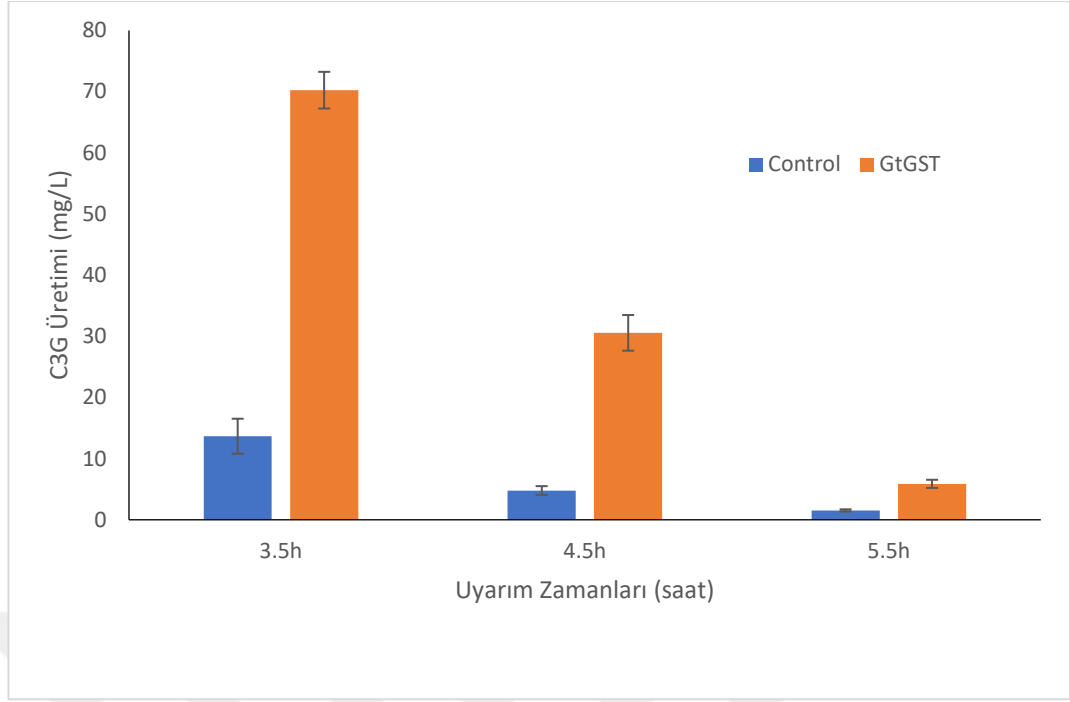


Şekil 4.13: Farklı inokülasyon oranlarının C3G rekombinantı ve GST rekombinantı hücrelerde C3G üretimine etkisi.

4.7.4. Farklı IPTG Uyarım Zamanlarının (Post-İndüksiyon) C3G Üretimine Etkisi

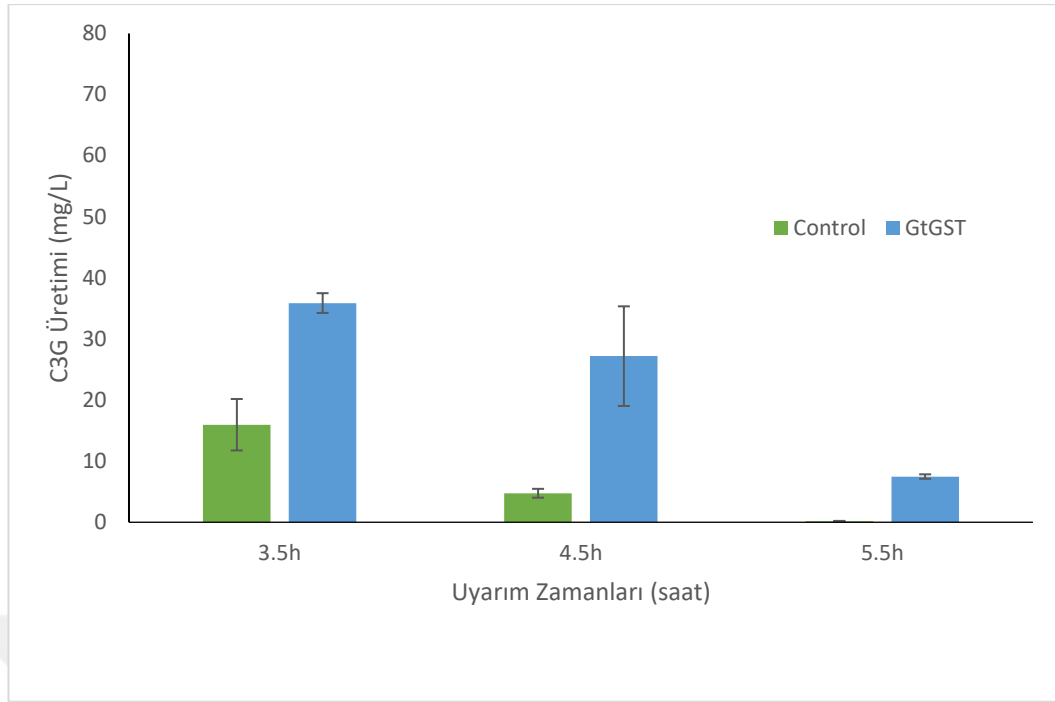
Bir sonraki kültür koşulu optimizasyonu adımı için, kültürler AMM besiyerine inoküle edildikten sonra farklı zamanlarda (3,5; 4,5 ve 5,5 saat sonra), IPTG ile uyarılarak C3G üretimi üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Bunun için %2 glukoz ve 2 g/L kasaminoasit içeren hacmen %20'lik AMM besiyerine %2,5'luk ön kültür inokülasyonu yapılmıştır. İnokülasyonun 3,5; 4,5 ve 5,5. saatlerinde 1 g/L katekin öncül molekülü eklenip hücreler iki farklı (0,05 mM ve 0,1 mM) IPTG konsantrasyonları ile uyarılmıştır. 24 saat sonra kültür örnekleri toplanarak C3G oranı HPLC ile analiz edilmiştir (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).

Bu koşullar altında 3,5. saatte 0,05 mM IPTG ile uyarım en fazla C3G üretimini 70,24 mg/L konsantrasyon ile sağlamıştır. 4,5 ve 5,5 sonra uyarılan hücrelerdeki üretimler ise sırasıyla 40,56 mg/L ve 5,87 mg/L'dir. Kontrol grubundaki en yüksek üretim 3,5. saatteki uyarımla 13,66 mg/L olup GST rekombinantı hücreler 5 katı üretim yapmıştır.



Şekil 4.14: 0,05 mM IPTG ile farklı uyarım zamanlarının C3G üretimine etkisi.

3,5; 4,5 ve 5,5. saatlerdeki uyarımlar 0,1 mM IPTG ile yapıldığında da en yüksek C3G üretim oranı 35,87 mg/L ile 3,5. saatte uyarılan GST rekombinantı hücrelerde elde edilmiştir. 4,5 ve 5,5. saatlerdeki uyarımlarda ise 27 mg/L ve 7,47 mg/L ile düşüş yaşanmıştır.



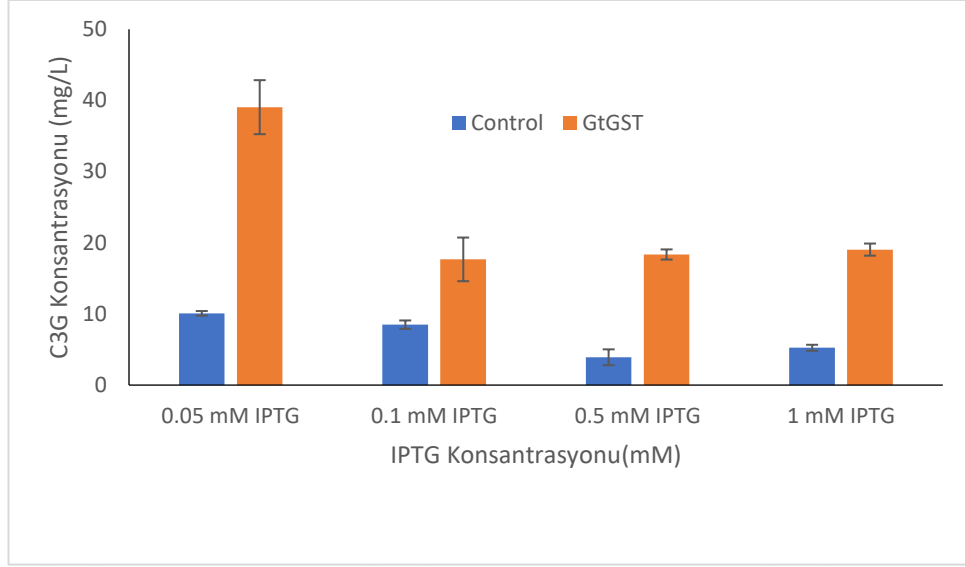
Şekil 4.15: 0,1 mM IPTG ile farklı uyarım zamanlarının C3G üretimine etkisi.

Sonraki çalışmalarda, IPTG uyarım saati olarak en iyi C3G üretim sonucu elde edilen 3,5. saat ile devam edilmiştir.

4.7.5. Farklı IPTG Konsantrasyonlarının C3G Üretimine Etkisi

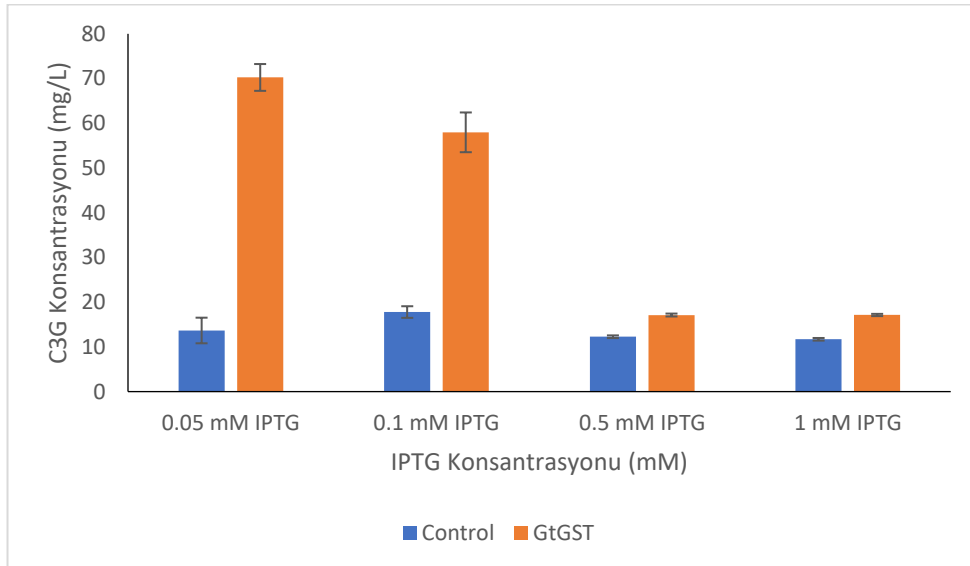
Kültür koşulları optimizasyonu için en iyi üretimi yapan %1 ve %2,5'luk inokülasyon oranlarında farklı IPTG konsantrasyonlarının C3G üretimine etkisi denenmiştir. Bunun için 2 g/L kasaminoasit içeren hacmen %20'lik AMM besiyerine ekilmiştir. Ekimden 3,5 saat sonra 1 g/L katekin öncül molekülü eklenip hücrelerin farklı konsantrasyonlarda (0,05 mM; 0,1 mM; 0,5 mM ve 1 mM) IPTG ile uyarımları yapılmıştır. İnkübasyondan 24 saat sonra kültür örnekleri toplanıp C3G konsantrasyonları HPLC analizi ile saptanmıştır.

%1 inokülasyonda C3G rekombinantı ve GST rekombinantı hücrelerin farklı IPTG konsantrasyonlarıyla uyarımları ile üretilen C3G konsantrasyonları **Şekil 4.17'**da verilmiştir. Elde edilen en yüksek C3G konsantrasyonu 0,05 mM IPTG ile uyarımda GST transformantlarında 39 mg/L, C3G rekombinantında ise 10 mg/L olmuştur. Artan IPTG konsantrasyonları C3G üretiminde azalmaya neden olmuştur. GST rekombinantı C3G rekombinantının 4 katı C3G üretmiştir.



Şekil 4.16: %1 inokülasyon ve farklı IPTG oranlarının C3G üretimine etkisi.

%2,5 inokülasyonda C3G rekombinantı ve GST rekombinantı hücrelerin farklı IPTG konsantrasyonlarıyla uyarımları ile üretilen C3G konsantrasyonları **Şekil 4.18'**de verilmiştir. Elde edilen en yüksek C3G konsantrasyonu 0,05 mM IPTG ile uyarımda GST transformantlarında 70 mg/L, C3G rekombinantında ise 13,66 mg/L olmuştur. GST rekombinantı hücreler, C3G rekombinantının 5 katı C3G üretmiştir.



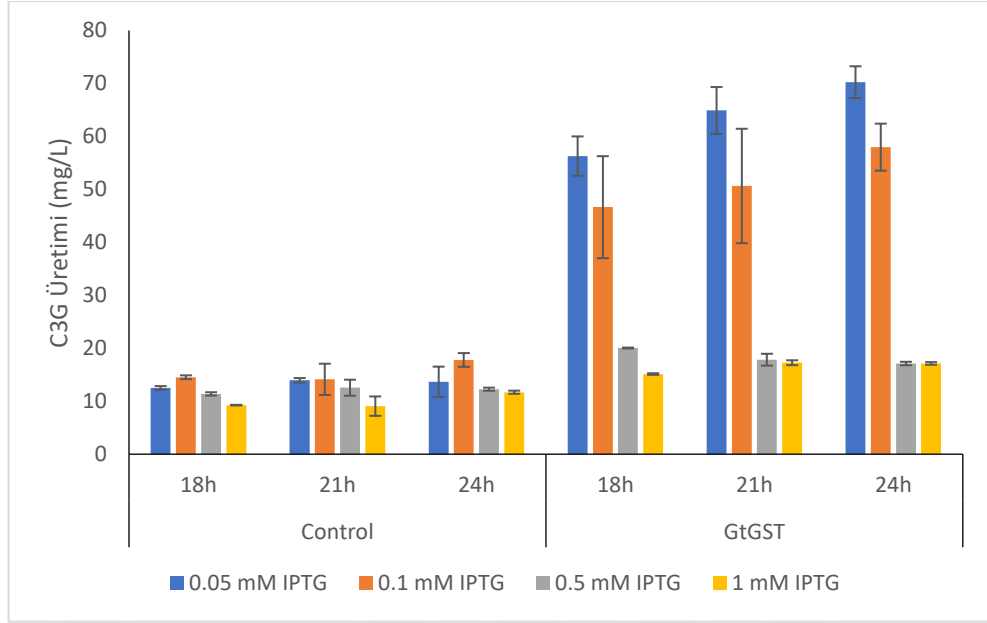
Şekil 4.17: %2,5 inokülasyon ve farklı IPTG oranlarının C3G üretimine etkisi.

4.7.6. Farklı Glukoz Konsantrasyonları, Farklı IPTG Konsantrasyonları ve Farklı Örnek Toplama Zamanlarının C3G Üretimine Etkisi

Bu aşamaya kadar yapılan optimizasyonlar sonucunda en yüksek C3G üretimi GST rekombinantları %2,5 inokülasyon oranında aşılandığında elde edilmiştir.

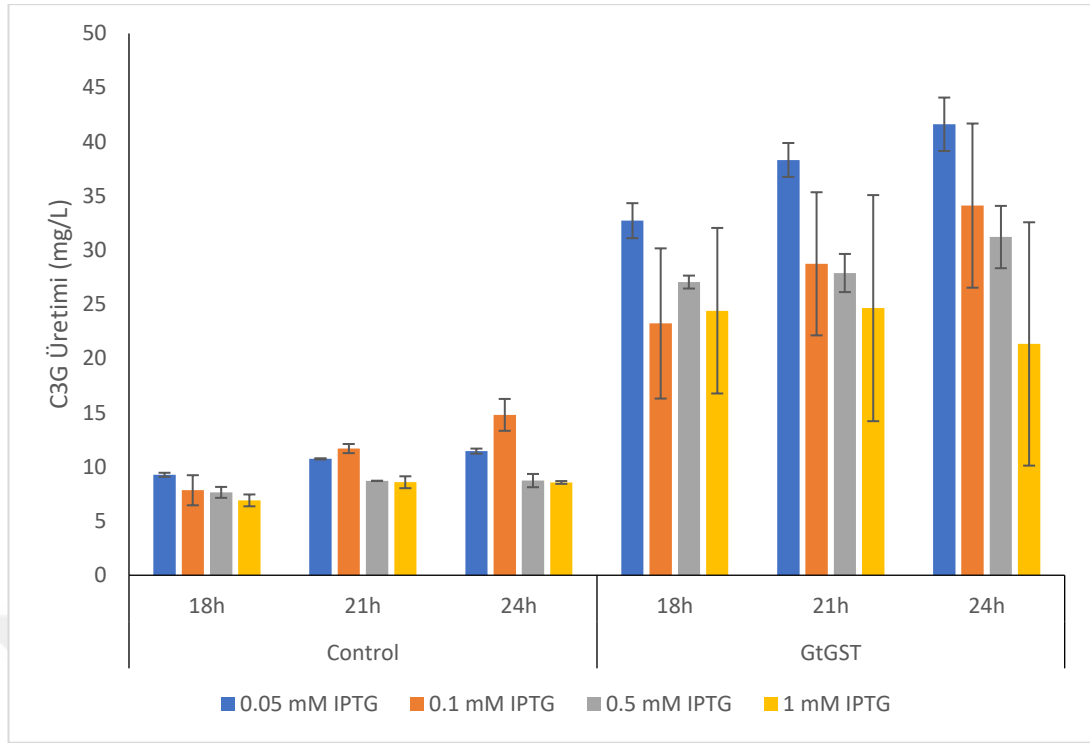
Kültür koşulları optimizasyonu için %2 ve %4 glukoz içeren AMM besiyerinde, farklı IPTG miktarlarında, farklı inkübasyon sürelerindeki siyanidin 3-O-glukozit üretimi denenmiştir. Bunun için 2 g/L kasaminoasit içeren hacmen %20'lik AMM medium'a, hacmen %2,5'luk gece boyu büyümüş hücre inokülasyonu yapılmıştır. İnokülasyonun 3,5. saatinde 1 g/L katekin öncül molekülü eklenip 0,05 mM; 0,1 mM; 0,5 mM ve 1 mM IPTG ile uyarıldıktan 18, 21 ve 24 saat sonra örnekler toplanmıştır. C3G konsantrasyonları **Şekil 4.19** ve **Şekil 4.20**'da verilmiştir.

%2 glukoz içeren AMM besiyerine ekilen C3G rekombinantı ve GST rekombinantı hücrelerdeki en yüksek C3G üretimi 0,05 mM IPTG ile uyarılan GST rekombinantlarında elde edilmiştir. 18, 21 ve 24. saatte alınan örneklerdeki C3G konsantrasyonları 56,28 mg/L, 64,89 mg/L, 70,24 mg/L olarak ölçülmüştür. Inkübasyon periyodunun artmasıyla C3G eldesi artmıştır. C3G rekombinantındaki en yüksek C3G eldesi 0,1 mM IPTG uyarımıyla 24 saatlik inkübasyonla 17,79 mg/L olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.18: %2 glukoz ve farklı IPTG oranlarının C3G üretimine etkisi.

%4 glukoz içeren AMM besiyerine ekilen C3G rekombinantı ve GST rekombinantı hücrelerdeki en yüksek C3G üretimi 0,05 mM IPTG ile uyarılan GST rekombinantlarında elde edilmiştir. 24. saatte C3G konsantrasyonu 41,61 mg/L olarak ölçülmüştür. C3G rekombinantındaki en yüksek C3G eldesi 0,1 mM IPTG uyarımıyla 24 saatlik inkübasyonla 14,80 mg/L olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.19: %4 glukoz ve farklı IPTG oranlarının C3G üretimine etkisi.

%2 ve %4 glukoz içeren AMM besiyerlerinde büyütülen GST rekombinantlarında en yüksek C3G eldesi %2 glukoz içeren AMM besiyerinde büyütülen hücrelerin 0,05 mM IPTG ile uyarılıp 24 saat inkübasyonunun sonunda örnek alınmasıyla elde ettiği saptanmıştır (70,24 mg/L).

4.7.7. Karbon Kaynağı Olarak Sükrozun C3G Üretimine Etkisi

Farklı şeker kaynağının C3G üretimine etkisini gözlemlemek için GST rekombinantı ve C3G rekombinantı hücreler %2 sükroz veya %4 sükroz içeren AMM besiyerlerinde büyütülmüşlerdir. Bunun için hacmen 2 g/L kasaminoasit içeren farklı şeker kaynağına sahip AMM besiyerlerine hacmen %2,5'luk hücre inokülasyonu yapılmıştır. Ekimin 3,5. saatinde 1 g/L katekin öncül molekülü eklenip 0,05 mM IPTG ile uyarılan hücrelerden 24 saat sonra örnekler toplanmıştır. %2 ve %4 sükroz içeren besiyerlerinde büyütülen C3G rekombinantı hücrelerden alınan örneklerin HPLC analizinde C3G tespit edilememiş, GST rekombinantı hücrelerden alınan örneklerde ise %2 sükrozda büyüyenlerde 0,12 mg/L, %4 sükrozda büyüyenlerde ise 0,69 mg/L C3G elde edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Gıda endüstrisinin gelişmesi ve işlenmiş gıdaların artmasıyla gıdaları daha çekici hale getiren gıda boyalarının kullanımı artmıştır. Bu gıda boyaları çeşitli pH değerlerine, kuruluğa ve tuz oranlarına sahip gıdalarda uzun süreli raf ömürlerine paralel olarak bozunmadan kalabilmelidirler. Gıda endüstrisinin ihtiyaçlarına göre öne çıkan yapay ve doğal gıda boyalarından yalnızca bir kısmı resmi sağlık otoritelerince onaylanıp gıdalarda belirli dozlarda kullanımlarına izin verilmiştir. Kimyasal yollarla üretilen yapay gıda renklendiricilerinden yalnızca 11'i Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından onaylanmıştır. (McCann vd., 2007) Southampton çalışması olarak da bilinen çalışma sonucunda Avrupa Birliği'nde izinli olan 11 gıda boyasından 6'sı olan tartrazin, Quinoline Yellow, Sunset Yellow, Ponceau 4R, Allura Red AC ve karmoisin'e "çocuklarda dikkat eksikliği ve hiperaktiviteye neden olabilir." etiketi ile satışa sunulma zorunluluğu getirilmiştir (Lehto vd., 2017). Tez kapsamında üretmeyi planladığımız C3G (siyanidin 3-O-glukozit), bitkilerde üretilen kırmızı renkli doğal bir pigment olup, günümüzde gıda renklendiricisi olarak Avrupa Birliği'nde kullanımına izin verilen yapay kırmızı renklendiriciler ise Ponceau 4R, Eritrosin, Allura Red AC ve Karmoisin'dir. Ancak, bu yapay renklendiricilerle alakalı yapılmış olan çalışmalardan bazıları tüketicilerin bunları kullanmaya temkinli olmasına neden olmuştur.

Yapay renklendiriciler çeşitli pH ve içerikteki gıdalarda stabil kalabilecek yapıya sahip olmaları; üretim yöntemlerinin kolay, hızlı ve dolayısıyla ucuz olmalarına rağmen bahsi geçen çalışmalardan dolayı tüketiciler tarafından daha az tercih edilmeye başlanmışlardır. Bu da tüketici talepleri doğrultusunda, üreticileri sağlık açısından risk içermeyen doğal renklendiricilerini kullanmaya yönlendirmiştir. Kırmızı renkli doğal gıda boyaları arasında koşinil, antosiyanin, betalain ve anka sayılabilir (Coulter ve Blackburn, 2018). Koşinil ve koşinilden elde edilen karmin *Dactylopius coccus* böceğinden elde edilmektedir. Üretimi maliyetlidir ve böcek kaynaklı olduğu için Anka, *Monascus* cinsine ait küflerin buharda pişirilmiş nişasta içeren yiyecekler üzerinde yetiştirilmesiyle elde edilir (Pintea, 2008). Her ne kadar doğal olsa da mantar metabolitlerini içereceği ve fungal toksinlerin tüketicide sağlık sorunları oluşturduğu bilindiği için genel olarak kabul görmüş bir renklendirici değildir. Doğal gıda boyası

olarak bitki kaynaklı olmaları dolayısıyla betalain ve antosiyaninler daha geniş kitlelerce tercih edilmektedirler.

Antosiyaninler, bitkilerde yaygın olarak üretilen ikincil metabolitler olup flavonoid sınıfından fenolik bileşiklerdir. Bitkilere kırmızı, mor ve mavi renklerini verir. Son zamanlarda antosiyanin içeriği ve sağlığa yararlarından dolayı antosiyanince zengin yiyeceklere rağbet artmıştır. Bunun yanı sıra antosiyaninlerin eldesi ve doğal gıda boyası olarak kullanım potansiyelleri de bu alandaki araştırmaların artmasına neden olmuştur.

Hem geniş renk paletine sahip olması hem de insan sağlığı açısından güvenilir bir doğal gıda renklendiricisi olarak kullanılabilecek antosiyaninlerin artan tüketici talepleri karşısında yüksek oranda üretilebilmeleri için kullanılabilecek yöntemler, kimyasal sentez, bitkilerden doğrudan ekstraksiyon, bitki hücre süspansiyonlarında üretim ve son olarak mikrobiyal konakçılarda üretim şeklinde sıralanabilir.

Antosiyanin üretimi için henüz ticari düzeyde bir üretim yöntemi geliştirilememiştir. Öte yandan doğal gıda renklendiricisi pazarı, 2025 yılında 2,25 milyar dolar iken bu oranın 10 yıl içerisinde 3,5 milyar doları aşması beklenmektedir (**Natural Food Colors Market Size, Growth ve Forecast, 2033, 2025**). Bu nedenlerle, araştırmacılar daha yüksek verimde ve kararlı yapıda antosiyanin eldesi için mikroorganizmalarda heterolog üretim ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (**Espinosa-Leal vd., 2018; Ruta ve Farcasanu, 2019**). Yapılan çalışmalarda, antosiyanin biyosentez yolağındaki enzimler *E. coli* veya *S. cerevisiae* gibi prokaryot ve ökaryot organizmalara aktarılıp antosiyanin üretiminin artırılması amaçlanmaktadır.

Bu amaçla yapılan çalışmada *E. coli*'de ilk kez antosiyaninleri bir mikroorganizmada üreterek antosiyaninlerin mikrobiyal üretimindeki yolu açmışlardır (**Yan vd., 2005b**).

2017'de yapılan çalışmada ilk kez glukozdan başlayarak antosiyaninin karmaşık mikrobiyal biyosentezini gerçekleştirmişlerdir (**Andrew Jones vd., 2017**).

2018'de yapılan bir çalışmada *E. coli*'de yapılmış olan antosiyanin biyosentez çalışmalarını diğer bir prokaryotik mikroorganizma olan *Corynebacterium glutamicum*'da gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmayla, ilk kez ucuz bir flavonoid öncülü olan katekinden siyanidin 3-O-glukozitin *C. glutamicum*'da üretimi gerçekleştirilmiştir (**Zha vd., 2018**).

Shrestha ve arkadaşları 2019 yılında yayınlanan çalışmalarında, *E. coli* BL21 (DE3)'te siyanidin 3-O-glukozit üretimini iyileştirmek için çoklu monosistronik ve çok değişkenli vektörler tasarlamışlardır. Birden fazla genin bio-brick sistemi kullanılarak bir araya getirilerek tek bir vektörde farklı promotörler altında ifade edilmesi sağlanmıştır. 36 saatlik inkübasyonun sonunda yaklaşık 439 mg/L C3G üretimi sağlanmıştır (**Shrestha vd., 2019b**).

Antosiyaninin heterolog üretimi sadece prokaryotik organizmalarda değil aynı zamanda ökaryotik organizmalarda da denenmiştir. Eichenberger ve arkadaşları 2018 yılında yayınladıkları çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* türü mayada 1,55 mg/l konsantrasyonda siyanidin 3-O-glukozit, 0,85 mg/l konsantrasyonda pelargonidin 3-O-glukozit ve 1,86 mg/l konsantrasyonda delfinidin 3-O-glukozit üretilmiştir (**Eichenberger vd., 2018**).

Antosiyaninlerin mikrobiyal üretimi ile ilgili yapılan ve son 20 yıla yayılan bu çalışmalar umut vadeditici olsa da ticari düzeyde antosiyanin üretimi, sentetik boyalara alternatif olarak kullanılabilmesi için hala istenilen seviyelere ulaşamamıştır.

Eichenberger ve arkadaşları 2023 yılında yayınladıkları çalışmada arGST'lerin antosiyanin biyosentez yolağında katalitik bir role sahip olduklarını göstermişlerdir. Aynı çalışmada ayrıca *S. cerevisiae* üretim suşlarında arGST'lerin birlikte eksprese edilmesiyle kontrole göre siyanidin 3-O-glukozit üretimi 36,5 kata kadar çıkarılmıştır (**Eichenberger vd., 2023**).

Bu gerekçe ve çalışmalardan yola çıkılarak tez kapsamında *E. coli*'deki heterolog antosiyanin üretimini arttırmak için ilk defa bir GST geni, antosiyanin üreticisi (C3G) rekombinantı hücrelere klonlanarak incelenmiştir. Bu amaçla, tez kapsamında Koffas Lab (**Cress vd., 2017**) tarafından katekin öncülünden siyanidin 3-O-glukozit (C3G) üretimi için tasarlanan plazmit kullanılmıştır. Japon gentianasının Albireo çeşidinin (*Gentiana triflora* × *Gentiana scabra*) glutatyon transferaz geninin (GtGST) kullanılmasına karar verilmiş ve bu gen sentetik olarak kodon optimize halde sentezlenmiş ve pCDM4 plazmitine klonlanmıştır. C3G üretimi için, C3G rekombinantı *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri ilgili plazmitlerle transforme edilmiş ve AMM besiyerinde çeşitli koşullar denenerek antosiyanin üretimindeki etkisi GST geni içermeyen C3G rekombinantı hücrelerle karşılaştırılarak test edilmiştir.

Tez kapsamında yapılan çalışmalar, antosiyanin biyosentez yolağına GST geni eklenmesinin denenen tüm optimizasyon koşullarında C3G rekombinantına görece, antosiyanin üretimini yüksek oranda arttırdığını göstermiştir.

Optimizasyon için denenen koşullardan biri uyarım saatlerindeki farklılıklardır. Bu amaçla büyüme eğrisine göre hücrelerin logaritmik fazda olduğu 3,5; 4,5; ve 5,5 saatlerinde uyarımlar yapılmıştır. Bu üç saatte de hücreler logaritmik fazda olmalarına karşın en yüksek C3G konsantrasyonu 3,5. saatte uyarılan hücrelerden elde edilmiştir. Bu sonuç hücrelerin 3,5. saatte logaritmik fazın başında olmalarıyla canlı ve büyüme aşamasında olmalarıyla daha yüksek verim elde edilmesi açısından uyumludur.

Tez kapsamında, kullanılan antosiyanin üretici enzimleri kodlayan antosiyanidin sentaz geni (*PhANS*) ve flavonoid-3-Oglukoziltransferaz geni (*At3GT*) hücrede yüksek kopya sayısı bulunduran pETM6 plazmitinde (**Xu vd., 2012b**) bulunmaktadır. Glutasyon transferaz geni (*GtGST*) ise hücrede düşük kopya sayılı pCDM4 plazmitine (**Xu vd., 2012c**) klonlanmıştır. Optimizasyon için denenen koşullardan bir diğeri de farklı miktarlarda IPTG ile uyarımlardır. Bu IPTG miktarları 0,05 mM; 0,1 mM; 0,5 mM ve 1 mM'dır. IPTG konsantrasyonunun artışı sırasında çok kopya sayılı plazmitin yüksek oranda eksprese olması metabolik yükü artırabileceği için hücre strese girebilir ve hücre ölümü yaşanıp üretim azalabilir (**Gomes vd., 2020**). Tez kapsamında yapılan deneyin bulguları da bu bağlamda beklenen sonucu vermiştir. En yüksek oranda (70,2 mg/L) C3G eldesi 0,05 mM IPTG ile uyarılan hücrelerde olmuşken IPTG miktarı arttıķa C3G eldesi (17,1 mg/L) azalmıştır. Buna rağmen Koffas Lab (**Cress vd., 2017**) tarafından katekin öncülünden siyanidin 3-O-glukozit (C3G) retimi için plazmitin tasarlandığı çalışmada tüm denemeler 1 mM IPTG ile yapılmıştır (**Cress vd., 2017**).

Optimizasyon için denenen koşullardan bir diğeri de kültür periyodunun farklı zamanlarında C3G veriminin belirlenmesi için örnek toplamadır. Bu amaçla hücrelerin uyarımından 18, 21 ve 24 saat örnekler toplanmıştır. Bu örneklerdeki en yüksek C3G eldesi GST rekombinantlarının uyarımından 24 saat sonra alınan örneklerde olmuştur. 0,05 mM IPTG ile uyarımda 18, 21 ve 24 saatlerde alınan örneklerde kontrol grubunda sırasıyla 12,5 mg/L, 14 mg/L, 13,6 mg/L; GST rekombinantlarında sırasıyla 56,3 mg/L, 64,9 mg/L, 70,2 mg/L C3G elde edilmiştir. GST rekombinantlarının, C3G rekombinantına göre zaman içerisindeki üretim farkı, GST geninin düşük kopya sayılı pCDM4 plazmitinde olmasından ve düşük kopya sayılı olduğu için enzim birikiminin zamanla olacak olmasından kaynaklanabilir. Bu koşullar için zaman içerisinde üretilen

C3G'nin birikeceği ama ortam koşullarına göre antosiyaninlerin en stabil hallerinin asidik ortamda olduğu için (Heredia vd., 1998) bir kısmının da yıkılacağı göz önünde bulundurulmalıdır. Koffas Lab (Cress vd., 2017) tarafından katekin öncülünden siyanidin 3-O-glukozit (C3G) üretimi için plazmitin tasarlandığı çalışmada örnekler 18-22 saatte toplanmıştır (Cress vd., 2017).

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda, karbon kaynağı olarak öncelikle glukoz kullanılmıştır. Farklı oranlarda (%2 veya %4) glukoz içeren AMM besiyerinde büyütülen hücreler (0,05 mM) IPTG ile uyarılarak, uyarımlarından 24 saat sonra C3G analizi için toplanmıştır. %2 ve %4 glukozda büyüyen hücrelerden sırasıyla 70,2 mg/L ve 41,6 mg/L C3G elde edilmiştir. Bu koşullarda daha fazla karbon kaynağı ile daha çok ürün eldesi beklense de katabolit baskılanma nedeniyle %2 glukozda daha çok C3G eldesi mümkün olmuştur (Is T7 expression subject to catabolite repression in BL21(DE3) and derivative strains? | NEB, 2025).

Tez kapsamında, C3G üreticisi *E. coli* hücrelerinin büyütülmesi ve antosiyanin üretimindeki etkisinin belirlenmesi için kullanılan diğer bir karbon kaynağı da sükrozdur. Sükroz, bir glukoz molekülü ve bir fruktoz molekülünün bir araya gelmesiyle oluşan bir disakkarittir. Sadece bitkiler tarafından üretilir. Şeker kamışından rafine edilmesi ucuz olduğu için endüstriyel mikrobiyal üretim açısından tercih edilen bir hammaddestir (Bruschi vd., 2014; Renouf vd., 2008). Optimizasyon için denenen koşullardan bir diğeri %2 ve %4 sükroza sahip AMM besiyerlerinde C3G eldesidir. C3G rekombinantında HPLC analizinde C3G tespit edilememiş, GST rekombinantlarında ise 0,12 mg/L ve 0,69 mg/L gibi düşük konsantrasyonlarda C3G tespit edilmiştir. Bu durum, *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinin sükroz içeren besiyerinde glukozla kıyasla çok daha yavaş büyümeleriyle örtüşmektedir (Sovic vd., 2024). *E. coli* BL21 DE3 hücreleri sükroz metabolizmasına sahip olmadığı için sükrozu metabolize etmesi için metabolizma mühendisliğine ihtiyaç duyulmaktadır. Bir çalışmada *E. coli* W suşundan cscAKB operonunu taşıyan p15aCSCx plazmitinin *E. coli* BL21 DE3 suşuna aktarılmasıyla sükroz metabolizması yapabilir hale gelmiştir (Bruschi vd., 2014).

Tez çalışması kapsamında, GST geninin antosiyanin biyosentez verimini arttırma üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi için farklı besiyeri ve kültür koşulları denenmiştir. Yapılan optimizasyon denemeleri sonucundaki en ideal koşullarda (%2 glukoz, 2 g/L kazamino asit, %2,5 inokülasyon, 0,05 mM IPTG, 3,5. sa uyarım, 1 g/L

catekin, 24 sa inkübasyon) GST transformantında 70 mg/L, kontrol grubunda ise 13,66 mg/L siyanidin 3-O-glukozit üretilmiştir. Yapılan denemeler, GST rekombinantı hücrelerin kontrol grubu yani GST genini içermeyen hücrelere göre 5 kat daha fazla antosiyanin ürettiğini göstermiştir.

Eichenberger ve arkadaşları (2023) yaptıkları çalışmada, *S. cerevisiae*'de farklı arGST'ler kullanarak C3G üretimini 36,5 kata kadar artış sağlamışlardır **(Eichenberger vd., 2023)**. Tez kapsamında kullanılan *GtGST* bu çalışmada kullanılmamasına ve farklı enzimlerle bir sistem kurulmasına karşın prokaryot ve ökaryotlardaki hücresel farklılıkların C3G eldesindeki farklılıklara neden olabileceği söylenebilir. Bitkilerde antosiyanin sentezinin endoplazmik retikulumun yüzeyinde metabolon denen membran ilişkili enzim kompleksleriyle gerçekleştiği düşünülmektedir **(Nakayama vd., 2019)**. *S. cerevisiae* bitkilerde antosiyaninlerin depolandığı yerler olan vakuollere benzer organellere sahiptir. Ayrıca prokaryotlarda transkripsiyon sonrası modifikasyonlar gerçekleşmezken ökaryotlar bu modifikasyonları yapabildikleri için bitki enzimlerini daha etkili bir şekilde kullanabilirler **(Kim vd., 2011; Zhou vd., 2024b)**. GST geninin tez kapsamında görülen etkisinin, *S. cerevisiae*'deki kadar yüksek olmamasının nedeni bu şekilde açıklanabilir.

Tez kapsamında yapılan bu çalışmayla GST enzimi heterolog antosiyanin üretimi için ilk defa *E. coli*'de kullanılarak C3G üretimini C3G rekombinantına göre yaklaşık 5 kata (70 mg/L) çıkarmıştır. Bu çalışma, mikrobiyal hücre fabrikası olarak *E. coli*'de antosiyanin biyosentezinde GST genlerinin de kullanılabileceğini göstermesi açısından önemlidir.

Sonuç:

Antosiyaninlerin sağlık açısından güvenilir bir gıda renklendiricisi olarak sentetik renklendiricilere alternatif olarak kullanılabilmeleri, bu pigmentlerin endüstriyel düzeyde üretilibilmeleri ile mümkündür. Bitkilerden doğrudan eldesi, bitki hücre süspansiyonu ve kimyasal üretim gibi üretim yöntemleri, çeşitli nedenlerle endüstri boyutu için kısıtlamalara sahiptir. Öte yandan, daha hızlı ve düşük maliyetle üretilibilmeleri için genetik ve metabolizma mühendisliği yoluyla geliştirilecek mikrobiyal konakçılarda bu pigmentlerin üretilmeleri ile ilgili yapılan akademik çalışmalar hızla ilerlemekte ve umut vaat etmektedir. Antosiyaninle ilişkili glutatyon transferazların (ArGST) bitkilerde antosiyanin biyosentezi ve taşınması sırasındaki

bilinen işlevlerinin yanı sıra mayada bu GST genlerinin heterolog antosiyanin üretiminde de farklı katalitik işlevleri olduğu kanıtlanmıştır. Bu nedenle, tez kapsamında *E. coli*'deki antosiyanin biyosentezini arttırmak için ilk defa antosiyaninle ilişkili glutatyon transferazın antosiyanin üretimi üzerindeki etkisi denenmiştir. Bunun için heterolog antosiyanin üretimindeki etkisinin belirlenmesi için, Japon gentianasının Albireo çeşidinin (*Gentiana triflora* × *Gentiana scabra*) glutatyon transferaz geni (GtGST), pCDM4 plazmitine klonlanarak C3G rekombinantı hücrelere transforme edilmiştir. Yaptığımız çalışmada, GST rekombinantı hücreler (GtGST içeren), C3G rekombinantı hücrelere görece 5 kat daha fazla siyanidin 3-O-glukozit üretmişlerdir. Antosiyaninin heterolog üretimindeki bu yeni yaklaşım, antosiyanin biyosentezinin endüstriyel boyuta geçmesi için umut vaat etmektedir.

KAYNAKLAR

Agrawal, G. K., Jwa, N. S., & Rakwal, R. (2002). A pathogen-induced novel rice (*Oryza sativa* L.) gene encodes a putative protein homologous to type II glutathione S-transferases. *Plant Science*, 163(6), 1153-1160. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00331-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00331-X)

Aguilar, U. R., Charrondiere, B., Dusemund, P., Galtier, J., Gilbert, D. M., Gott, S., Grilli, R., Guertler, J., Koenig, C., Lambré, J.-C., Larsen, J.-C., Leblanc, A., Mortensen, D., Parent-Massin, I., Pratt, I. M. C. M., Rietjens, I., Stankovic, P., Tobback, T., & Verguieva, R. A. W. (2009). Scientific Opinion on the re-evaluation of Ponceau 4R (E 124) as a food additive. *EFSA Journal*, 7(11), 1328. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2009.1328>

Ahmadiani, N., Robbins, R. J., Collins, T. M., & Giusti, M. M. (2014). Anthocyanins contents, profiles, and color characteristics of red cabbage extracts from different cultivars and maturity stages. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(30), 7524-7531.

Albuquerque, B. R., Heleno, S. A. 8., Oliveira, M. B. P. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2021). Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. *Food & Function*, 12(1), 14-29. <https://doi.org/10.1039/D0FO02324H>

Albuquerque, B. R., Oliveira, M. B. P. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2021). Could fruits be a reliable source of food colorants? Pros and cons of these natural additives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(5), 805-835. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1746904>

Alfenito, M. R., Souer, E., Goodman, C. D., Buell, R., Mol, J., Koes, R., & Walbot, V. (1998). Functional Complementation of Anthocyanin Sequestration in the Vacuole by Widely Divergent Glutathione S-Transferases. *The Plant Cell*, 10(7), 1135-1149. <https://doi.org/10.1105/TPC.10.7.1135>

Alu'datt, M. H., Rababah, T., Alhamad, M. N., Al-Mahasneh, M. A., Almajwal, A., Gammoh, S., Ereifej, K., Johargy, A., & Alli, I. (2017). A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. *Food Chemistry*, 218, 99-106. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.09.057>

Amchova, P., Kotolova, H., & Ruda-Kucerova, J. (2015). Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(3), 914-922. <https://doi.org/10.1016/J.YRTPH.2015.09.026>

Andersen, O. M., & Markham, K. R. (2005). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRC press.

Andrew Jones, J., Vernacchio, V. R., Collins, S. M., Shirke, A. N., Xiu, Y., Englaender, J. A., Cress, B. F., McCutcheon, C. C., Linhardt, R. J., Gross, R. A., & Koffasa, M. A. G. (2017). Complete Biosynthesis of anthocyanins using E. Coli polycultures. *mBio*, 8(3). https://doi.org/10.1128/MBIO.00621-17/SUPPL_FILE/MBO003173344ST2.DOCX

Angelov, A., & Gotcheva, V. (2017). Safety assessment and regulations for food ingredients derived from plant in vitro systems. İçinde *Bioprocessing of plant in vitro systems*. Springer Cham.

Anthocyanins - Definition, Benefits, Sources. (2025.). Geliş tarihi 24 Nisan 2025, gönderen <https://sciencenotes.org/anthocyanins-definition-benefits-sources/>

Axarli, I., Dhavala, P., Papageorgiou, A. C., & Labrou, N. E. (2009a). Crystal structure of Glycine max glutathione transferase in complex with glutathione: investigation of the mechanism operating by the Tau class glutathione transferases. *Biochemical Journal*, 422(2), 247-256. <https://doi.org/10.1042/BJ20090224>

Axarli, I., Dhavala, P., Papageorgiou, A. C., & Labrou, N. E. (2009b). Crystallographic and Functional Characterization of the Fluorodifen-inducible Glutathione Transferase from Glycine max Reveals an Active Site Topography Suited for Diphenylether Herbicides and a Novel L-site. *Journal of Molecular Biology*, 385(3), 984-1002. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2008.10.084>

Basu, A., & Kumar, G. S. (2014). Study on the interaction of the toxic food additive carmoisine with serum albumins: A microcalorimetric investigation. *Journal of Hazardous Materials*, 273, 200-206. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2014.03.049>

Benekos, K., Kissoudis, C., Nianiou-Obeidat, I., Labrou, N., Madesis, P., Kalamaki, M., Makris, A., & Tsaftaris, A. (2010). Overexpression of a specific soybean GmGSTU4 isoenzyme improves diphenyl ether and chloroacetanilide herbicide tolerance of transgenic tobacco plants. *Journal of Biotechnology*, 150(1), 195-201. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2010.07.011>

Bordignon-Luiz, M. T., Gauche, C., Gris, E. F., & Falcão, L. D. (2007). Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *LWT-Food Science and Technology*, 40(4), 594-599.

Bruschi, M., Krömer, J. O., Steen, J. A., & Nielsen, L. K. (2014). Production of the short peptide surfactant DAMP4 from glucose or sucrose in high cell density cultures of *Escherichia coli* BL21(DE3). *Microbial Cell Factories*, 13(1), 99. <https://doi.org/10.1186/S12934-014-0099-Y>

Cao, Y., Xu, L., Xu, H., Yang, P., He, G., Tang, Y., Qi, X., Song, M., & Ming, J. (2021). LhGST is an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in Asiatic hybrid lilies (*Lilium* spp.). *Plant Cell Reports*, 40(1), 85-95. <https://doi.org/10.1007/S00299-020-02615-Y/FIGURES/7>

Carpentier, S., Knaus, M., & Suh, M. (2009). Associations between lutein, zeaxanthin, and age-related macular degeneration: an overview. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49(4), 313-326.

Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. de L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009a). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859-871. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.09.001>

Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. de L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009b). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859-871. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.09.001>

Cevallos-Casals, B. A., & Cisneros-Zevallos, L. (2003). Stoichiometric and Kinetic Studies of Phenolic Antioxidants from Andean Purple Corn and Red-Fleshed Sweetpotato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), 3313-3319. <https://doi.org/10.1021/JF034109C>

Chanoca, A., Kovinich, N., Burkel, B., Stecha, S., Bohorquez-Restrepo, A., Ueda, T., Eliceiri, K. W., Grotewold, E., & Otegui, M. S. (2015). Anthocyanin vacuolar inclusions form by a microautophagy mechanism. *Plant Cell*, 27(9), 2545-2599. <https://doi.org/10.1105/TPC.15.00589>,

Charrondiere, R., Dusemund, B., Galtier, P., Gilbert, J., Gott, D., Grilli, S., Guertler, R., Koenig, J., Lambré, C., Larsen, J., Leblanc, J., Mortensen, A., Parent-Massin, D., Pratt, I., Rietjens, I., Stankovic, I., Tobback, P., Verguieva, T., & Woutersen, R. (2009). Scientific Opinion on the re-evaluation of Azorubine/Carmoisine (E 122) as a food additive. *EFSA Journal*, 7(11), 1332. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2009.1332>

Chaves-Silva, S., Santos, A. L. dos, Chalfun-Júnior, A., Zhao, J., Peres, L. E. P., & Bedito, V. A. (2018). Understanding the genetic regulation of anthocyanin biosynthesis in plants – Tools for breeding purple varieties of fruits and vegetables. *Phytochemistry*, 153, 11-27. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2018.05.013>

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2016.06.035>

Chemler, J. A., & Koffas, M. A. (2008). Metabolic engineering for plant natural product biosynthesis in microbes. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(6), 597-605. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2008.10.011>

Chen, L.-J., & Hrazdina, G. (1981). Structural aspects of anthocyanin-flavonoid complex formation and its role in plant color. *Phytochemistry*, 20(2), 297-303.

Cheng, J., Liao, L., Zhou, H., Gu, C., Wang, L., & Han, Y. (2015). A small indel mutation in an anthocyanin transporter causes variegated colouration of peach flowers.

Journal of Experimental Botany, 66(22), 7227-7239.
<https://doi.org/10.1093/JXB/ERV419>

Chouhan, S., Sharma, K., Zha, J., Guleria, S., & Koffas, M. A. G. (2017). Recent advances in the recombinant biosynthesis of polyphenols. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 300654. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02259/PDF>

Chronopoulou, E., & Labrou, N. (2009). Glutathione Transferases: Emerging Multidisciplinary Tools in Red and Green Biotechnology. *Recent Patents on Biotechnology*, 3(3), 211-223.
<https://doi.org/10.2174/187220809789389135/CITE/REFWORKS>

Color Additives - Information for Consumers | FDA. (2025). Geliş tarihi 30 Mart 2025, gönderen <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/color-additives-information-consumers>

Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., & Tauscher, B. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(1), 85-91. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2007.06.002>

Cortés, H. (1908). .. *the Five Letters of Relation from Fernando Cortes to the Emperor Charles V*.

Coultate, T., & Blackburn, R. S. (2018). Food colorants: Their past, present and future. *Coloration Technology*, 134(3), 165-186.

Cress, B. F., Jones, J. A., Kim, D. C., Leitz, Q. D., Englaender, J. A., Collins, S. M., Linhardt, R. J., & Koffas, M. A. G. (2016). Rapid generation of CRISPR/dCas9-regulated, orthogonally repressible hybrid T7-lac promoters for modular, tuneable control of metabolic pathway fluxes in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 44(9), 4472-4485. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW231>

Cress, B. F., Leitz, Q. D., Kim, D. C., Amore, T. D., Suzuki, J. Y., Linhardt, R. J., & Koffas, M. A. G. (2017). CRISPRi-mediated metabolic engineering of *E. coli* for O-methylated anthocyanin production. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/S12934-016-0623-3/FIGURES/6>

Cress, B. F., Toparlak, O. D., Guleria, S., Lebovich, M., Stieglitz, J. T., Englaender, J. A., Jones, J. A., Linhardt, R. J., & Koffas, M. A. G. (2015). CRISPathBrick: Modular Combinatorial Assembly of Type II-A CRISPR Arrays for dCas9-Mediated Multiplex Transcriptional Repression in *E. coli*. *ACS Synthetic Biology*, 4(9), 987-1000. https://doi.org/10.1021/ACSSYNBIO.5B00012/SUPPL_FILE/SB5B00012_SI_001.PDF

Cummins, I., Dixon, D. P., Freitag-Pohl, S., Skipsey, M., & Edwards, R. (2011). Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug Metabolism Reviews*, 43(2), 266-280. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.552910>

Cummins, I., Wortley, D. J., Sabbadin, F., He, Z., Coxon, C. R., Straker, H. E., Sellars, J. D., Knight, K., Edwards, L., Hughes, D., Kaundun, S. S., Hutchings, S. J., Steel, P. G., & Edwards, R. (2013). Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(15), 5812-5817. https://doi.org/10.1073/PNAS.1221179110/SUPPL_FILE/SD01.XLSX

Davies, K. M. (2009). Modifying anthocyanin production in flowers. *Anthocyanins: biosynthesis, functions, and applications*, 49-80.

Davies, K. M., & Deroles, S. C. (2014). Prospects for the use of plant cell cultures in food biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 133-140. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2013.12.010>

Delgado-Vargas, F., & Paredes-López, O. (2002). Natural colorants for food and nutraceutical uses. *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*, 1-305. <https://doi.org/10.1201/9781420031713/NATURAL-COLORANTS-FOOD-NUTRACEUTICAL-USES-FRANCISCO-DELGADO-VARGAS-OCTAVIO-PAREDES-LOPEZ/RIGHTS-AND-PERMISSIONS>

Demain, A. L., & Fang, A. (2000). The Natural Functions of Secondary Metabolites. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 69, 1-39. https://doi.org/10.1007/3-540-44964-7_1

Dixon, D. P., Davis, B. G., & Edwards, R. (2002). 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*, 277(34), 30859-30869. <https://doi.org/10.1074/JBC.M202919200>

Dixon, D. P., & Edwards, R. (2010). Roles for Stress-inducible Lambda Glutathione Transferases in Flavonoid Metabolism in Plants as Identified by Ligand Fishing. *Journal of Biological Chemistry*, 285(47), 36322-36329. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.164806>

Dixon, D. P., Laphorn, A., & Edwards, R. (2002). Plant glutathione transferases. *Genome Biology* 2002 3:3, 3(3), 1-10. <https://doi.org/10.1186/GB-2002-3-3-REVIEWS3004>

Dixon, D. P., Skipsey, M., & Edwards, R. (2010). Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 71(4), 338-350. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2009.12.012>

Durbin, M. L., McCaig, B., & Clegg, M. T. (2000). Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome. *Plant molecular evolution*, 79-92.

eCFR :: 21 CFR Part 73 -- Listing of Color Additives Exempt from Certification. (2025.). Geliş tarihi 06 Mart 2025, gönderen <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-A/part-73>

- Edwards, R., & Dixon, D. P. (2005). Plant Glutathione Transferases. *Methods in Enzymology*, 401, 169-186. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)01011-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)01011-6)
- Edwards, R., Dixon, D. P., Cummins, I., Brazier-Hicks, M., & Skipsey, M. (2011). *New Perspectives on the Metabolism and Detoxification of Synthetic Compounds in Plants*. 125-148. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9852-8_7
- Eichenberger, M., Hansson, A., Fischer, D., Dürr, L., & Naesby, M. (2018). De novo biosynthesis of anthocyanins in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 18(4). <https://doi.org/10.1093/FEMSYR/FOY046>
- Eichenberger, M., Schwander, T., Hüppi, S., Kreuzer, J., Mittl, P. R. E., Peccati, F., Jiménez-Osés, G., Naesby, M., & Buller, R. M. (2023). The catalytic role of glutathione transferases in heterologous anthocyanin biosynthesis. *Nature Catalysis* 2023 6:10, 6(10), 927-938. <https://doi.org/10.1038/s41929-023-01018-y>
- Esmaili, M., Shahrtash, M., Moosavi, F., Mohsenzadeh, S., & Mohabatkar, H. (2009). Plant glutathione S-transferase function. *Paper Presentation Proc. 6th Natl. Biotechnol. Congress Iran Tehran Iran*.
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta* 2018 248:1, 248(1), 1-18. <https://doi.org/10.1007/S00425-018-2910-1>
- Fowler, Z. L., Shah, K., Panepinto, J. C., Jacobs, A., & Koffas, M. A. G. (2011). Development of Non-Natural Flavanones as Antimicrobial Agents. *PLOS ONE*, 6(10), e25681. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0025681>
- Francis, F. J. (1999). Anthocyanins and betalains. İçinde *Colorants* (ss. 55-66). Eagan Press: St. Paul, MN.
- Francisco, R. M., Regalado, A., Ageorges, A., Burla, B. J., Bassin, B., Eisenach, C., Zarrouk, O., Vialet, S., Marlin, T., Chaves, M. M., Martinoia, E., & Nagy, R. (2013). ABCC1, an ATP Binding Cassette Protein from Grape Berry, Transports Anthocyanidin 3-O-Glucosides. *The Plant Cell*, 25(5), 1840-1854. <https://doi.org/10.1105/TPC.112.102152>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2010.08.016>
- Gomes, L., Monteiro, G., & Mergulhão, F. (2020). The Impact of IPTG Induction on Plasmid Stability and Heterologous Protein Expression by *Escherichia coli* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 576, 21(2), 576. <https://doi.org/10.3390/IJMS21020576>
- Gomez, C., Conejero, G., Torregrosa, L., Cheynier, V., Terrier, N., & Ageorges, A. (2011). In vivo grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST. *Plant Journal*, 67(6), 960-970. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3113X.2011.04648.X;CTYPE:STRING:JOURNAL>

Harborne, A. J. (1998). *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Springer science & business media.

He, J., & Giusti, M. M. (2010). Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual review of food science and technology*, 1(1), 163-187.

Heller, W., Britsch, L., Forkmann, G., & Grisebach, H. (1985). Leucoanthocyanidins as intermediates in anthocyanidin biosynthesis in flowers of *Matthiola incana* R. Br. *Planta*, 163(2), 191-196. <https://doi.org/10.1007/BF00393505/METRICS>

Heredia, F. J., Francia-Aricha, E. M., Rivas-Gonzalo, J. C., Vicario, I. M., & Santos-Buelga, C. (1998). Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes—I. pH effect. *Food Chemistry*, 63(4), 491-498. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00051-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00051-X)

Hernández Estévez, I., Rodríguez Hernández, M., Hernández Estévez, I., & Rodríguez Hernández, M. (2020). “Plant Glutathione S-transferases: An overview”. *PLGen*, 23, 100233. <https://doi.org/10.1016/J.PLGENE.2020.100233>

Houghton, A., Appelhagen, I., & Martin, C. (2021a). Natural Blues: Structure Meets Function in Anthocyanins. *Plants* 2021, Vol. 10, Page 726, 10(4), 726. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10040726>

Houghton, A., Appelhagen, I., & Martin, C. (2021b). Natural Blues: Structure Meets Function in Anthocyanins. *Plants* 2021, Vol. 10, Page 726, 10(4), 726. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10040726>

Hu, M., Du, J., Du, L., Luo, Q., & Xiong, J. (2020). Anti-fatigue activity of purified anthocyanins prepared from purple passion fruit (*P. edulis* Sim) epicarp in mice. *Journal of Functional Foods*, 65, 103725. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2019.103725>

Hu, T. (2014). A glutathione s-transferase confers herbicide tolerance in rice. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 14(2), 76-81. <https://doi.org/10.1590/1984-70332014V14N2A14>

Ichino, T., Fuji, K., Ueda, H., Takahashi, H., Koumoto, Y., Takagi, J., Tamura, K., Sasaki, R., Aoki, K., Shimada, T., & Hara-Nishimura, I. (2014). GFS9/TT9 contributes to intracellular membrane trafficking and flavonoid accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 80(3), 410-423. <https://doi.org/10.1111/TPJ.12637>

Is T7 expression subject to catabolite repression in BL21(DE3) and derivative strains? | NEB. (2025). Geliş tarihi 27 Nisan 2025, gönderen https://www.neb.com/en/faqs/2018/10/11/is-t7-expression-subject-to-catabolite-repression-in-bl21-de3-and-derivative-strains?srsId=AfmBOoq_Cs9ycJh-KdI2wOBsSX97vAgC92PtNh4ApPgdcX0OvQ3Bomq1

Jennings, A. S., Schwartz, S. L., Balter, N. J., Gardner, D., & Witorsch, R. J. (1990). Effects of oral erythrosine (2',4',5',7'-tetraiodofluorescein) on the pituitary-thyroid axis

in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 103(3), 549-556. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(90\)90327-Q](https://doi.org/10.1016/0041-008X(90)90327-Q)

Jiang, S., Chen, M., He, N., Chen, X., Wang, N., Sun, Q., Zhang, T., Xu, H., Fang, H., Wang, Y., Zhang, Z., Wu, S., & Chen, X. (2019a). MdGSTF6, activated by MdMYB1, plays an essential role in anthocyanin accumulation in apple. *Horticulture Research*, 6(1), 40. https://doi.org/10.1038/S41438-019-0118-6/41973300/41438_2019_ARTICLE_118.PDF

Jiang, S., Chen, M., He, N., Chen, X., Wang, N., Sun, Q., Zhang, T., Xu, H., Fang, H., Wang, Y., Zhang, Z., Wu, S., & Chen, X. (2019b). MdGSTF6, activated by MdMYB1, plays an essential role in anthocyanin accumulation in apple. *Horticulture Research*, 6(1), 40. https://doi.org/10.1038/S41438-019-0118-6/41973300/41438_2019_ARTICLE_118.PDF

Jing, P. (2006). *PURPLE CORN ANTHOCYANINS: CHEMICAL STRUCTURE, CHEMOPROTECTIVE ACTIVITY AND STRUCTURE/FUNCTION RELATIONSHIPS*.

Jones, J. A., Vernacchio, V. R., Lachance, D. M., Lebovich, M., Fu, L., Shirke, A. N., Schultz, V. L., Cress, B., Linhardt, R. J., & Koffas, M. A. G. (2015). EPathOptimize: A combinatorial approach for transcriptional balancing of metabolic pathways. *Scientific Reports*, 5, 11301. <https://doi.org/10.1038/srep11301>

Kammerer, D., Carle, R., & Schieber, A. (2004). Quantification of anthocyanins in black carrot extracts (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) and evaluation of their color properties. *European Food Research and Technology*, 219, 479-486.

Kampranis, S. C., Damianova, R., Atallah, M., Toby, G., Kondi, G., Tsiachlis, P. N., & Makris, A. M. (2000). A Novel Plant Glutathione S-Transferase/Peroxidase Suppresses Bax Lethality in Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29207-29216. <https://doi.org/10.1074/JBC.M002359200>

Kim, Y. H., Kwon, T., Yang, H. J., Kim, W., Youn, H., Lee, J. Y., & Youn, B. (2011). Gene engineering, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction of cytochrome P450 p-coumarate-3-hydroxylase (C3H), the Arabidopsis membrane protein. *Protein Expression and Purification*, 79(1), 149-155. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2011.04.013>

Kitamura, S., Shikazono, N., & Tanaka, A. (2004a). TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 37(1), 104-114. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2003.01943.X>

Kitamura, S., Shikazono, N., & Tanaka, A. (2004b). TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in Arabidopsis. *Plant Journal*, 37(1), 104-114. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2003.01943.X>;WGROU:STRING:PUBLICATION

Kong, Y., Wang, H., Qiu, L., Dou, X., Lang, L., Bai, J., Kong, Y., Wang, H., Qiu, L., Dou, X., Lang, L., & Bai, J. (2024). Anthocyanin contents and molecular changes in

rose petals during the postanthesis color transition. *Ornamental Plant Research* 2024 1:e020, 4(1). <https://doi.org/10.48130/OPR-0024-0019>

Kriventsov, V. I., & Arendt, N. K. (1981). *Anthocyanins of pomegranate juice*.

Kumar, S., Asif, M. H., Chakrabarty, D., Tripathi, R. D., Dubey, R. S., & Trivedi, P. K. (2013). Expression of a rice Lambda class of glutathione S-transferase, OsGSTL2, in *Arabidopsis* provides tolerance to heavy metal and other abiotic stresses. *Journal of Hazardous Materials*, 248-249(1), 228-237. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2013.01.004>

Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Sanderford, M., Sharma, S., Tamura, K., & Ursula Battistuzzi, F. (2024). MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 12 for Adaptive and Green Computing. *Molecular Biology and Evolution*, 41(12), 1-9. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAE263>

Labrou, N. E., Papageorgiou, A. C., Pavli, O., & Flemetakis, E. (2015). Plant GSTome: structure and functional role in xenome network and plant stress response. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 186-194. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2014.12.024>

Lamikanra, O. (1989). Anthocyanins of *Vitis rotundifolia* hybrid grapes. *Food Chemistry*, 33(3), 225-237. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(89\)90016-2](https://doi.org/10.1016/0308-8146(89)90016-2)

Lee, S. Y., Kim, H. U., Chae, T. U., Cho, J. S., Kim, J. W., Shin, J. H., Kim, D. I., Ko, Y. S., Jang, W. D., & Jang, Y. S. (2019). Author Correction: A comprehensive metabolic map for production of bio-based chemicals. *Nature Catalysis* 2019 2:10, 2(10), 942-944. <https://doi.org/10.1038/s41929-019-0358-8>

Lehto, S., Buchweitz, M., Klimm, A., Straßburger, R., Bechtold, C., & Ulberth, F. (2017). Comparison of food colour regulations in the EU and the US: a review of current provisions. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34(3), 335-355. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1274431>

Leonard, E., Yan, Y., Fowler, Z. L., Li, Z., Lim, C. G., Lim, K. H., & Koffas, M. A. G. (2008). Strain improvement of recombinant *Escherichia coli* for efficient production of plant flavonoids. *Molecular Pharmaceutics*, 5(2), 257-265. https://doi.org/10.1021/MP7001472/ASSET/IMAGES/MEDIUM/MP-2007-001472_0004.GIF

Li, X., Gao, P., Cui, D., Wu, L., Parkin, I., Saberianfar, R., Menassa, R., Pan, H., Westcott, N., & Gruber, M. Y. (2011). The *Arabidopsis* tt19-4 mutant differentially accumulates proanthocyanidin and anthocyanin through a 3' amino acid substitution in glutathione S-transferase. *Plant, Cell & Environment*, 34(3), 374-388. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3040.2010.02249.X>

Li, Y., & Smolke, C. D. (2016). Engineering biosynthesis of the anticancer alkaloid noscapine in yeast. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS12137>

- Liu, Y. J., Han, X. M., Ren, L. L., Yang, H. L., & Zeng, Q. Y. (2013). Functional Divergence of the Glutathione S-Transferase Supergene Family in *Physcomitrella patens* Reveals Complex Patterns of Large Gene Family Evolution in Land Plants. *Plant Physiology*, 161(2), 773-786. <https://doi.org/10.1104/PP.112.205815>
- Liu, Y., Qi, Y., Zhang, A., Wu, H., Liu, Z., & Ren, X. (2019). Molecular cloning and functional characterization of AcGST1, an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in kiwifruit (*Actinidia chinensis*). *Plant Molecular Biology*, 100(4-5), 451-465. <https://doi.org/10.1007/S11103-019-00870-6/FIGURES/7>
- Loyall, L., Uchida, K., Braun, S., Furuya, M., & Frohnmeyer, H. (2000). Glutathione and a UV Light-Induced Glutathione S-Transferase Are Involved in Signaling to Chalcone Synthase in Cell Cultures. *The Plant Cell*, 12(10), 1939-1950. <https://doi.org/10.1105/TPC.12.10.1939>
- Luo, H., Dai, C., Li, Y., Feng, J., Liu, Z., & Kang, C. (2018). Reduced Anthocyanins in Petioles codes for a GST anthocyanin transporter that is essential for the foliage and fruit coloration in strawberry. *Journal of Experimental Botany*, 69(10), 2595-2608. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERY096>
- Makus, D. J., & Ballinger, W. E. (1973). Characterization of Anthocyanins During Ripening of Fruit of *Vaccinium corymbosum*, L. Cv. Wolcott1. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 98(1), 99-101.
- Mannervik, B. (2012). Five Decades with Glutathione and the GSTome. *Journal of Biological Chemistry*, 287(9), 6072-6083. <https://doi.org/10.1074/JBC.X112.342675>
- Marienhagen, J., & Bott, M. (2013). Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. *Journal of Biotechnology*, 163(2), 166-178. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2012.06.001>
- Marinova, K., Pourcel, L., Weder, B., Schwarz, M., Barron, D., Routaboul, J. M., Debeaujon, I., & Kleina, M. (2007). The Arabidopsis MATE Transporter TT12 Acts as a Vacuolar Flavonoid/H⁺-Antiporter Active in Proanthocyanidin-Accumulating Cells of the Seed Coat. *The Plant Cell*, 19(6), 2023-2038. <https://doi.org/10.1105/TPC.106.046029>
- Marquardt, C. (1835). *Die Farben der Blüthen*. Habicht.
- Marrs, K. A., Alfenito, M. R., Lloyd, A. M., & Walbot, V. (1995). A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2. *Nature* 1995 375:6530, 375(6530), 397-400. <https://doi.org/10.1038/375397a0>
- Mashiyama, S. T., Malabanan, M. M., Akiva, E., Bhosle, R., Branch, M. C., Hillerich, B., Jagessar, K., Kim, J., Patskovsky, Y., Seidel, R. D., Stead, M., Toro, R., Vetting, M. W., Almo, S. C., Armstrong, R. N., & Babbitt, P. C. (2014). Large-Scale Determination of Sequence, Structure, and Function Relationships in Cytosolic Glutathione Transferases across the Biosphere. *PLOS Biology*, 12(4), e1001843. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1001843>

Masone, D., & Chanforan, C. (2015). Study on the interaction of artificial and natural food colorants with human serum albumin: A computational point of view. *Computational Biology and Chemistry*, 56, 152-158. <https://doi.org/10.1016/J.COMPBIOLCHEM.2015.04.006>

Mazza, G., & Brouillard, R. (1990). The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry*, 29(4), 1097-1102.

Mazza, G., & Miniati, E. (2018). Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains*, 1-362. <https://doi.org/10.1201/9781351069700/ANTHOCYANINS-FRUIT-VEGETABLES-GRAINS-GIUSEPPE-MAZZA-MINIATI/RIGHTS-AND-PERMISSIONS>

McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., Kitchin, E., Lok, K., Porteous, L., Prince, E., Sonuga-Barke, E., Warner, J. O., & Stevenson, J. (2007). 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. *Lancet*, 370(9598), 1560-1567. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61306-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61306-3)

McGhie, T. K., & Walton, M. C. (2007). The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Molecular nutrition & food research*, 51(6), 702-713.

Miguel, M. G. (2011). Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, : (Issue), 07-15. https://japsonline.com/abstract.php?article_id=117&sts=2

Moons, A. (2005). Regulatory and Functional Interactions of Plant Growth Regulators and Plant Glutathione S-Transferases (GSTs). *Vitamins and Hormones*, 72, 155-202. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(05\)72005-7](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05)72005-7)

Mueller, L. A., Goodman, C. D., Silady, R. A., & Walbot, V. (2000). AN9, a Petunia Glutathione S-Transferase Required for Anthocyanin Sequestration, Is a Flavonoid-Binding Protein. *Plant Physiology*, 123(4), 1561-1570. <https://doi.org/10.1104/PP.123.4.1561>

Nakayama, T., Takahashi, S., & Waki, T. (2019). Formation of flavonoid metabolons: Functional significance of protein-protein interactions and impact on flavonoid chemodiversity. *Frontiers in Plant Science*, 10, 460916. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00821/BIBTEX>

Natural Food Colors Market Size, Growth & Forecast, 2033. (t.y.). Geliş tarihi 30 Nisan 2025, gönderen <https://www.imarcgroup.com/natural-food-colors-market>

Nollet, L. M. L., & Toldrá, F. (2012). *Food analysis by HPLC*. CRC press.

Novais, C., Molina, A. K., Abreu, R. M. V., Santo-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R., Pereira, C., & Barros, L. (2022). Natural Food Colorants and Preservatives: A Review, a Demand, and a Challenge. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(9), 2789-

2805.

https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.1C07533/ASSET/IMAGES/LARGE/JF1C07533_0004.JPEG

Nunez, M., & Magnuson, B. (2013). Basic Anthocyanin Chemistry and Dietary Sources. *Anthocyanins in Health and Disease*, 13-89. <https://doi.org/10.1201/B15554-2>

Paddon, C. J., & Keasling, J. D. (2014). Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. *Nature Reviews Microbiology* 2014 12:5, 12(5), 355-367. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3240>

Pandey, R. P., Parajuli, P., Koffas, M. A. G., & Sohng, J. K. (2016a). Microbial production of natural and non-natural flavonoids: Pathway engineering, directed evolution and systems/synthetic biology. *Biotechnology Advances*, 34(5), 634-662. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2016.02.012>

Pandey, R. P., Parajuli, P., Koffas, M. A. G., & Sohng, J. K. (2016b). Microbial production of natural and non-natural flavonoids: Pathway engineering, directed evolution and systems/synthetic biology. *Biotechnology Advances*, 34(5), 634-662. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2016.02.012>

Patra, S., Makhal, P. N., Jaryal, S., More, N., Rao Kaki, V., & History, A. (2022). Anthocyanins: Plant-based flavonoid pigments with diverse biological activities ARTICLE INFO ABSTRACT. *Int. J. Plant Bas. Pharm*, 2(1), 118-127. <https://ijpbp.com>

Pearlstein, E., MacKenzie, M., Kaplan, E., Howe, E., & Levinson, J. (2015). Tradition and Innovation, Cochineal and Andean Keros. *A Red Like No Other: How Cochineal Colored the World*. New York: Skira Rizzoli, 44-51.

Pearson, W. R. (2005). Phylogenies of Glutathione Transferase Families. *Methods in Enzymology*, 401, 186-204. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)01012-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)01012-8)

Pina, F., Melo, M. J., Laia, C. A. T., Parola, A. J., & Lima, J. C. (2012). Chemistry and applications of flavylum compounds: a handful of colours. *Chemical Society Reviews*, 41(2), 869-908.

Pintea, A. M. (2008). Food colorants derived from natural sources by processing. *Food Colorants-chemical and functional properties* (ed. Socaciu C). CRC Press, Taylor and Francis, 329-347.

Pour, P. M., Fakhri, S., Asgary, S., Farzaei, M. H., & Echeverría, J. (2019). The Signaling Pathways, and Therapeutic Targets of Antiviral Agents: Focusing on the Antiviral Approaches and Clinical Perspectives of Anthocyanins in the Management of Viral Diseases. *Frontiers in pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2019.01207>

Poustka, F., Irani, N. G., Feller, A., Lu, Y., Pourcel, L., Frame, K., & Grotewold, E. (2007). A Trafficking Pathway for Anthocyanins Overlaps with the Endoplasmic Reticulum-to-Vacuole Protein-Sorting Route in Arabidopsis and Contributes to the

Formation of Vacuolar Inclusions. *Plant Physiology*, 145(4), 1323-1335.
<https://doi.org/10.1104/PP.107.105064>

Preuß, A., Stracke, R., Weisshaar, B., Hillebrecht, A., Matern, U., & Martens, S. (2009). Arabidopsis thaliana expresses a second functional flavonol synthase. *FEBS Letters*, 583(12), 1981-1986.
<https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2009.05.006>;WEBSITE:WEBSITE:FEBS;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER

Prior, R. L., & Wu, X. (2006). Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research*, 40(10), 1014-1028. <https://doi.org/10.1080/10715760600758522>

Putta, S., Yarla, N. S., Peluso, I., Tiwari, D. K., Reddy, G. V., Giri, P. V., Kumar, N., Malla, R., Rachel, V., Bramhachari, P. V., Reddy D, R. S., Bade, R., Mannarapu, M., Barreto, G. E., Lu, D.-Y., Tarasov, V. V., Chubarev, V. N., Ribeiro, F. F., Scotti, L., ... Bishayee, A. (2017). Anthocyanins: Multi-Target Agents for Prevention and Therapy of Chronic Diseases. *Current pharmaceutical design*, 23(41), 6321-6346.
<https://doi.org/10.2174/1381612823666170519151801>

Qiu, L., Chen, K., Pan, J., Ma, Z., Zhang, J., Wang, J., Cheng, T., Zheng, T., Pan, H., & Zhang, Q. (2024). Genome-wide analysis of glutathione S-transferase genes in four Prunus species and the function of PmGSTF2, activated by PmMYBa1, in regulating anthocyanin accumulation in Prunus mume. *International Journal of Biological Macromolecules*, 281, 136506. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2024.136506>

Renouf, M. A., Wegener, M. K., & Nielsen, L. K. (2008). An environmental life cycle assessment comparing Australian sugarcane with US corn and UK sugar beet as producers of sugars for fermentation. *Biomass and Bioenergy*, 32(12), 1144-1155.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2008.02.012>

Robertson, A., & Robinson, R. (1927). XXXVIII.—Experiments on the synthesis of anthocyanins. Part II. The synthesis of 3-and 7-glucosidoxylflavylium salts. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 242-247.

Ruta, L. L., & Farcasanu, I. C. (2019). Anthocyanins and Anthocyanin-Derived Products in Yeast-Fermented Beverages. *Antioxidants 2019, Vol. 8, Page 182*, 8(6), 182.
<https://doi.org/10.3390/ANTIOX8060182>

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
<https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A040454>

Santiago, M. C. P. de A., Gouvêa, A. C. M. S., Godoy, R. L. de O., Borguini, R. G., Pacheco, S., Nogueira, R. I., Nascimento, L. da S. de M. do, & Freitas, S. P. (2014). Analytical standards production for the analysis of pomegranate anthocyanins by HPLC. *Brazilian Journal of Food Technology*, 17(1), 51-57.
<https://doi.org/10.1590/BJFT.2014.008>

- Sasaki, N., & Nakayama, T. (2015). Achievements and Perspectives in Biochemistry Concerning Anthocyanin Modification for Blue Flower Coloration. *Plant and Cell Physiology*, 56(1), 28-40. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCU097>
- Shao, D., Li, Y., Zhu, Q., Zhang, X., Liu, F., Xue, F., & Sun, J. (2021). GhGSTF12, a glutathione S-transferase gene, is essential for anthocyanin accumulation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Science*, 305, 110827. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2021.110827>
- Sharma, R., Sahoo, A., Devendran, R., & Jain, M. (2014). Over-Expression of a Rice Tau Class Glutathione S-Transferase Gene Improves Tolerance to Salinity and Oxidative Stresses in *Arabidopsis*. *PLOS ONE*, 9(3), e92900. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0092900>
- Shrestha, B., Pandey, R. P., Darsandhari, S., Parajuli, P., & Sohng, J. K. (2019a). Combinatorial approach for improved cyanidin 3-O-glucoside production in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/S12934-019-1056-6/FIGURES/7>
- Shrestha, B., Pandey, R. P., Darsandhari, S., Parajuli, P., & Sohng, J. K. (2019b). Combinatorial approach for improved cyanidin 3-O-glucoside production in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/S12934-019-1056-6/FIGURES/7>
- Skjoedt, M. L., Snoek, T., Kildegaard, K. R., Arsovska, D., Eichenberger, M., Goedecke, T. J., Rajkumar, A. S., Zhang, J., Kristensen, M., Lehka, B. J., Siedler, S., Borodina, I., Jensen, M. K., & Keasling, J. D. (2016). Engineering prokaryotic transcriptional activators as metabolite biosensors in yeast. *Nature Chemical Biology* 2016 12:11, 12(11), 951-958. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2177>
- Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocco, E., & Trombetta, D. (2016). Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins. *Phytotherapy research : PTR*, 30(8), 1265-1286. <https://doi.org/10.1002/PTR.5642>
- Sovic, L., Malihan-Yap, L., Tóth, G. S., Siitonen, V., Alphand, V., Allahverdiyeva, Y., & Kourist, R. (2024). Sucrose as an electron source for cofactor regeneration in recombinant *Escherichia coli* expressing invertase and a Baeyer Villiger monooxygenase. *Microbial Cell Factories*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/S12934-024-02474-2>
- Stintzing, F. C., & Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 15(1), 19-38. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2003.07.004>
- Sudan, S., & Rupasinghe, H. P. V. (2015). Antiproliferative activity of long chain acylated esters of quercetin-3-O-glucoside in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Experimental Biology and Medicine*, 240(11), 1452-1464.

- Sun, Y., Li, H., & Huang, J. R. (2012). Arabidopsis TT19 Functions as a Carrier to Transport Anthocyanin from the Cytosol to Tonoplasts. *Molecular Plant*, 5(2), 387-400. <https://doi.org/10.1093/MP/SSR110>
- Sunil, L., & Shetty, N. P. (2022). Biosynthesis and regulation of anthocyanin pathway genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(5), 1783-1798.
- Tanaka, T. (2006). Reproductive and neurobehavioural toxicity study of Ponceau 4R administered to mice in the diet. *Food and Chemical Toxicology*, 44(10), 1651-1658. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2006.05.001>
- Tanaka, Y., Sasaki, N., & Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54(4), 733-749.
- Tang, Z. X., & Yang, H. L. (2013). Functional divergence and catalytic properties of dehydroascorbate reductase family proteins from *Populus tomentosa*. *Molecular Biology Reports*, 40(8), 5105-5114. <https://doi.org/10.1007/S11033-013-2612-5/FIGURES/9>
- Tasaki, K., Yoshida, M., Nakajima, M., Higuchi, A., Watanabe, A., & Nishihara, M. (2020a). Molecular characterization of an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in Japanese gentian with the CRISPR/Cas9 system. *BMC Plant Biology*, 20(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/S12870-020-02565-3/FIGURES/7>
- Tasaki, K., Yoshida, M., Nakajima, M., Higuchi, A., Watanabe, A., & Nishihara, M. (2020b). Molecular characterization of an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in Japanese gentian with the CRISPR/Cas9 system. *BMC Plant Biology*, 20(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/S12870-020-02565-3/FIGURES/7>
- Tian, L., Kong, W. F., Pan, Q. H., Zhan, J. C., Wen, P. F., Chen, J. Y., Wan, S. B., & Huang, W. D. (2006). Expression of the chalcone synthase gene from grape and preparation of an anti-CHS antibody. *Protein expression and purification*, 50(2), 223-228.
- Trouillas, P., Sancho-García, J. C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M., & Dangles, O. (2016). Stabilizing and modulating color by copigmentation: Insights from theory and experiment. *Chemical reviews*, 116(9), 4937-4982.
- Tsuda, S., Murakami, M., Matsusaka, N., Kano, K., Taniguchi, K., & Sasaki, Y. F. (2001). DNA Damage Induced by Red Food Dyes Orally Administered to Pregnant and Male Mice. *Toxicological Sciences*, 61(1), 92-99. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/61.1.92>
- Turnbull, J. J., Nagle, M. J., Seibel, J. F., Welford, R. W. D., Grant, G. H., & Schofield, C. J. (2003). The C-4 stereochemistry of leucocyanidin substrates for anthocyanidin synthase affects product selectivity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13(21), 3853-3857. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(03\)00711-X](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(03)00711-X)
- Turnbull, J. J., Nakajima, J. I., Welford, R. W. D., Yamazaki, M., Saito, K., & Schofield, C. J. (2004). Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate-dependent oxygenases of

flavonoid biosynthesis: Anthocyanidin synthase, flavonol synthase, and flavanone 3 β -hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(2), 1206-1216. <https://doi.org/10.1074/JBC.M309228200/ASSET/E11D7228-7B22-4C0D-9866-550B1CEF3DF8/MAIN.ASSETS/GR9.JPG>

Urano, J., Nakagawa, T., Maki, Y., Masumura, T., Tanaka, K., Murata, N., & Ushimaru, T. (2000). Molecular cloning and characterization of a rice dehydroascorbate reductase. *FEBS Letters*, 466(1), 107-111. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01768-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01768-8)

Wallace, T. C., Slavin, M., & Frankenfeld, C. L. (2016). Systematic Review of Anthocyanins and Markers of Cardiovascular Disease. *Nutrients*, 8(1), 32. <https://doi.org/10.3390/NU8010032>

Wang, C. Y., & Chen, B. H. (2006). Tomato pulp as source for the production of lycopene powder containing high proportion of cis-isomers. *European Food Research and Technology*, 222(3), 347-353. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0058-2>

Wang, Y., Chen, S., & Yu, O. (2011). Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4), 949-956. <https://doi.org/10.1007/S00253-011-3449-2/METRICS>

Welford, R. W. D., Turnbull, J. J., Claridge, T. D. W., Prescott, A. G., & Schofield, C. J. (2001). Evidence for oxidation at C-3 of the flavonoid C-ring during anthocyanin biosynthesis. *Chemical Communications*, 18(18), 1828-1829. <https://doi.org/10.1039/B105576N>

Wilce, M. C. J., & Parker, M. W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1205(1), 1-18. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)90086-8](https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)90086-8)

Wilmouth, R. C., Turnbull, J. J., Welford, R. W. D., Clifton, I. J., Prescott, A. G., & Schofield, C. J. (2002). Structure and mechanism of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Structure*, 10(1), 93-103. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00695-5/ASSET/0DF54F52-2E34-42DF-8093-DC5E028FEB82/MAIN.ASSETS/GR6.JPG](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00695-5/ASSET/0DF54F52-2E34-42DF-8093-DC5E028FEB82/MAIN.ASSETS/GR6.JPG)

Wongsantichon, J., & Ketterman, A. J. (2005). Alternative Splicing of Glutathione S-Transferases. *Methods in Enzymology*, 401, 100-116. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)01006-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)01006-2)

Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2006). Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 4069-4075. https://doi.org/10.1021/JF060300L/SUPPL_FILE/JF060300LSI20060328_032812.PDF

Xu, J., Xing, X. J., Tian, Y. S., Peng, R. H., Xue, Y., Zhao, W., Yao, Q. H., & Zhang, H. (2015). Transgenic *Arabidopsis* Plants Expressing Tomato Glutathione S-

Transferase Showed Enhanced Resistance to Salt and Drought Stress. *PLOS ONE*, 10(9), e0136960. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0136960>

Xu, P., Li, L., Zhang, F., Stephanopoulos, G., & Koffas, M. (2014). Improving fatty acids production by engineering dynamic pathway regulation and metabolic control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(31), 11299-11304. https://doi.org/10.1073/PNAS.1406401111/SUPPL_FILE/PNAS.1406401111.SAPP.PDF

Xu, P., Vansiri, A., Bhan, N., & Koffas, M. A. G. (2012a). EPathBrick: A synthetic biology platform for engineering metabolic pathways in *E. coli*. *ACS Synthetic Biology*, 1(7), 256-266. https://doi.org/10.1021/SB300016B/SUPPL_FILE/SB300016B_SI_001.PDF

Xu, P., Vansiri, A., Bhan, N., & Koffas, M. A. G. (2012b). EPathBrick: A synthetic biology platform for engineering metabolic pathways in *E. coli*. *ACS Synthetic Biology*, 1(7), 256-266. <https://doi.org/10.1021/SB300016B>

Xu, P., Vansiri, A., Bhan, N., & Koffas, M. A. G. (2012c). EPathBrick: A synthetic biology platform for engineering metabolic pathways in *E. coli*. *ACS Synthetic Biology*, 1(7), 256-266. <https://doi.org/10.1021/SB300016B>

Xu, S., Li, G., Zhou, J., Chen, G., & Shao, J. (2022). Efficient production of anthocyanins in *Saccharomyces cerevisiae* by introducing anthocyanin transporter and knocking out endogenous degrading enzymes. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 899182. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2022.899182/BIBTEX>

Xue, L., Huang, X., Zhang, Z., Lin, Q., Zhong, Q., Zhao, Y., Gao, Z., & Xu, C. (2022). An Anthocyanin-Related Glutathione S-Transferase, MrGST1, Plays an Essential Role in Fruit Coloration in Chinese Bayberry (*Morella rubra*). *Frontiers in Plant Science*, 13, 903333. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.903333/BIBTEX>

Yan, Y., Chemler, J., Huang, L., Martens, S., & Koffas, M. A. G. (2005a). Metabolic Engineering of Anthocyanin Biosynthesis in *Escherichia coli*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 71(7), 3617-3623. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3617-3623.2005>

Yan, Y., Chemler, J., Huang, L., Martens, S., & Koffas, M. A. G. (2005b). Metabolic engineering of anthocyanin biosynthesis in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3617-3623. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3617-3623.2005/ASSET/79BD4CBE-53DC-4514-9EDC-FCC6123988F4/ASSETS/GRAPHIC/ZAM0070555830003.JPEG>

Yan, Y., Li, Z., & Koffas, M. A. G. (2008). High-yield anthocyanin biosynthesis in engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(1), 126-140. <https://doi.org/10.1002/BIT.21721;WGROU:STRING:PUBLICATION>

Yang, G., Wang, Y., Xia, D., Gao, C., Wang, C., & Yang, C. (2014). Overexpression of a GST gene (ThGSTZ1) from *Tamarix hispida* improves drought and salinity tolerance

by enhancing the ability to scavenge reactive oxygen species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 117(1), 99-112. <https://doi.org/10.1007/S11240-014-0424-5/FIGURES/7>

Yin, X., Gao, Z., Sun, S., Zhang, L., Irfan, M., Chen, L., Yin, X., Gao, Z., Sun, S., Zhang, L., Irfan, M., & Chen, L. (2023). Insights into microRNA regulation of flower coloration in a lily cultivar Vivian petal. *Ornamental Plant Research* 2023 1:9, 3(1). <https://doi.org/10.48130/OPR-2023-0009>

Yu, Q., & Powles, S. (2014). Metabolism-Based Herbicide Resistance and Cross-Resistance in Crop Weeds: A Threat to Herbicide Sustainability and Global Crop Production. *Plant Physiology*, 166(3), 1106-1118. <https://doi.org/10.1104/PP.114.242750>

Zha, J., & Koffas, M. A. G. (2017). Production of anthocyanins in metabolically engineered microorganisms: Current status and perspectives. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2(4), 259-266. <https://doi.org/10.1016/J.SYNBIO.2017.10.005>

Zha, J., & Koffas, M. A. G. (2018). Anthocyanin Production in Engineered Microorganisms. *Biotechnology of Natural Products*, 81-97. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67903-7_4

Zha, J., Zang, Y., Mattozzi, M., Plassmeier, J., Gupta, M., Wu, X., Clarkson, S., & Koffas, M. A. G. (2018). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for anthocyanin production. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/S12934-018-0990-Z/FIGURES/7>

Zhang, H., Wang, L., Deroles, S., Bennett, R., & Davies, K. (2006). New insight into the structures and formation of anthocyanic vacuolar inclusions in flower petals. *BMC Plant Biology*, 6(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-29/FIGURES/6>

Zhang, J. R., Trossat-Magnin, C., Bathany, K., Delrot, S., & Chaudière, J. (2019). Oxidative Transformation of Leucocyanidin by Anthocyanidin Synthase from *Vitis vinifera* Leads only to Quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(13), 3595-3604. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.8B06968/SUPPL_FILE/JF8B06968_SI_001.PDF

Zhang, Y., Cai, P., Cheng, G., & Zhang, Y. (2022). A Brief Review of Phenolic Compounds Identified from Plants: Their Extraction, Analysis, and Biological Activity. *Natural Product Communications*, 17(1). https://doi.org/10.1177/1934578X211069721/ASSET/790FCBB5-7380-4C7A-B54A-AB6969DAF4B1/ASSETS/IMAGES/LARGE/10.1177_1934578X211069721-FIG1.JPG

Zhao, C. L., Yu, Y. Q., Chen, Z. J., Wen, G. S., Wei, F. G., Zheng, Q., Wang, C. De, & Xiao, X. L. (2017). Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. *Food Chemistry*, 214, 119-128. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.07.073>

Zhao, J. (2015a). Flavonoid transport mechanisms: how to go, and with whom. *Trends in plant science*, 20(9), 576-585.

Zhao, J. (2015b). Flavonoid transport mechanisms: How to go, and with whom. *Trends in Plant Science*, 20(9), 576-585. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2015.06.007/ASSET/A59A9BD2-B045-4DB9-B05A-5D11F2211DA9/MAIN.ASSETS/GR2.SML>

Zhao, J., & Dixon, R. A. (2010). The 'ins' and 'outs' of flavonoid transport. *Trends in Plant Science*, 15(2), 72-80. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2009.11.006>

Zhou, W., Ding, W., Wu, X., Sun, J., & Bai, W. (2024a). Microbial synthesis of anthocyanins and pyranoanthocyanins: current bottlenecks and potential solutions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2369703>

Zhou, W., Ding, W., Wu, X., Sun, J., & Bai, W. (2024b). Microbial synthesis of anthocyanins and pyranoanthocyanins: current bottlenecks and potential solutions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2369703>

Zhou, W., Ding, W., Wu, X., Sun, J., & Bai, W. (2024c). Microbial synthesis of anthocyanins and pyranoanthocyanins: current bottlenecks and potential solutions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2369703>

Zhu, L., Huang, Y., Zhang, Y., Xu, C., Lu, J., & Wang, Y. (2017). The growing season impacts the accumulation and composition of flavonoids in grape skins in two-crop-a-year viticulture. *Journal of Food Science and Technology*, 54(9), 2861-2870. <https://doi.org/10.1007/S13197-017-2724-3/TABLES/3>

ZUCKERKANDL, E., & PAULING, L. (1965). Evolutionary Divergence and Convergence in Proteins. *Evolving Genes and Proteins*, 97-166. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-2734-4.50017-6>

ÖZGEÇMİŞ

2016 yılında İzmir Bornova Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. 2017 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Temel Bilimler Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitiminden 2023 yılında mezun oldu. Aynı yıl Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen yüksek lisans eğitimine devam etmektedir. Tübitak 2210-A Yurtiçi Yüksek Lisans bursu almaya hak kazandı.



TEZ ÇALIŞMASI KAPSAMINDA YAPILAN YAYINLAR

Türkyılmaz T, Akdemir H, Glutasyon Transferazın (*GtGST*), *E. coli*'deki Heterolog Antosiyanin Sentezindeki Etkisi, GTÜ 8. Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu.

