



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK
LİSANS
TEZİ**

**UV MUTAJENEZ YÖNTEMİNİ
KULLANARAK *S.cerevisiae* MAYASINDA
BETA KAROTEN VE LİKOPEN
MİKTARININ ARTIRILMASI**

KÜBRA ASLAN

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

OCAK 2018



**UV MUTAJENEZ YÖNTEMİNİ KULLANARAK *S.cerevisiae* MAYASINDA
BETA KAROTEN VE LİKOPEN MİKTARININ ARTIRILMASI**

Kübra ASLAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2018

Kübra ASLAN tarafından hazırlanan “UV Mutajenez Yöntemini Kullanarak *Saccharomyces cerevisiae* Mayasında Beta karoten ve Likopen Miktarının Artırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Emine Sevda MENEVŞE

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Başkan : Doç. Dr. Hacer İlke ÖNEN

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

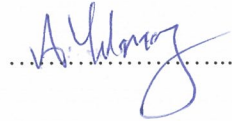
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Doç. Dr. Akın YILMAZ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Hitit Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Tez Savunma Tarihi: 24/01/2018

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Kübra ASLAN
24.01.2018

UV MUTAJENEZ YÖNTEMİNİ KULLANARAK *S.cerevisiae* MAYASINDA BETA KAROTEN VE LİKOPEN MİKTARININ ARTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Kübra ASLAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2018

ÖZET

Karotenler bazı bakteriler, algler ve bitkilerin yapısında bulunan, pigment olarak adlandırılan organik yapıli maddelerdir. Karotenlerin bitkiler için fotosentezde rol almasının yanı sıra diğ er canlılarda da görme, kemik gelişimi, deride renk oluşumu gibi görevleri bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan bazı araştırmalar ise karotenlerin antioksidan, antitümör ve antienflamatuar etkilerinin de bulunduğ unu ortaya koymuştur. Canlılar için bu kadar öneme sahip karotenler günümüzde yalnızca bazı kimyasal yollarla veya ana organizmadan masraflı ve zor metodlarla elde edilebilmektedir. Günümüzde metabolik mühendislik çalışmalarıyla canlılar için önemli olan birçok madde model organizmalar tarafından üretilebilmektedir. *S.cerevisiae* mayasında beta karoten ve likopen üretimi de son yılların gözde metabolik mühendislik çalışmalarından biridir. Bu konuyla ilgili yapılan önceki çalışmalarda normal koşullarda beta karoten ve likopen üretimi yapamayan *S.cerevisiae* mayasına bitkilerde karoten üretimini sağlayan genler aktarılarak bu genlerin ekmek mayasında ifadesi sağlanmış ve az miktarlarda beta karoten ve likopen üretimi yapılabilmekmiştir. Bu araştırmada *S.cerevisiae* mayasında kolay ve ekonomik yollarla üretilen beta karoten ve likopen üretiminin UV mutajenez yöntemiyle artırılması amaçlandı. Bu yöntem AB tarafından kabul edilmiş bir yöntemdir ve GDO kapsamına girmemektedir. Farklı sürelerde UV'ye maruz bırakılan maya hücreleri farklı renklerde çok sayıda koloniler üretti. Fenotipik tarama sonucunda elde ettiğimiz bu koloniler içerisinde koyu renkli ve sağlıklı olanlar seçildi. Bu seçilen koloniler sıvı besi yerinde büyütülerek 3 gün boyunca OD ölçümü yapıldı ve büyüme eğrileri oluşturuldu. Bu suşlardan karoten ekstraksiyonu yapılarak total karoten miktarları, HPLC yöntemiyle suştaki spesifik karoten miktarları tayin edildi. 100 µj/2 sn 6-6 suşunda 725,6764 mg/ml beta karoten, yine aynı suşt a 68 mg/ml likopen ve 100 µj/2 sn 6-5 suşunda 7 µg/g total karoten üretimi gözlenmiştir. Ancak tüm suşlar deney ve kontrol grubu olarak Wilcoxon testiyle analiz edilmiş ve deney grubunda anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Bilim Kodu : 1055.1

Anahtar Kelimeler : Beta karoten, likopen, *S.cerevisiae*, UV mutajenez, maya

Sayfa Adedi : 123

Danışman : Prof. Dr. Emine Sevda MENEVŞE

INCREASING AMOUNT OF BETA CAROTENE AND LYCOPENE IN *S.cerevisiae* BY UV MUTAGENESIS

(M. Sc. Thesis)

Kübra ASLAN

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

January 2018

ABSTRACT

Carotenoids are organic matters named pigments inside some bacteria, algae and plants. Carotenoids play a great role in photosynthes for plants besides participate in seeing, developing bone, colouring in skin for other organisms. Recent studies reveal antitumor, antiinflamatur, antioxidane effects of carotenoids. Important for all organisms carotenoids can get only by some chemical ways or hard and expensive extraction from host organisms. Nowadays many matters have importance for organisms can produced by model organisms with metabolic engineering applications. Producing beta carotene and lycopene in *S.cerevisiae* is one of the most popular metabolic engineering study in recent years. In previous studies related this subject transferring genes produced carotenoids from plants to *S.cerevisiae* can not produce carotenoids naturally and expressed this genes in yeast and produced in small quantities beta carotene and lycopene. Purpose of this study is increasing amount of beta carotene and lycopene produced with easy and economic ways in *S.cerevisiae* by UV mutagenesis. This method is approved by AB and is not GDO. Yeast cells are exposed to UV with different times constitute lots of colonies with different colours. Dark orange and healthy colonies are choosen among other colonies by fenotipic screening. These colonies are incubated liquid media also OD measuring are made during three days and made OD curves. Total carotenoids amount is calculated by made extraction of carotenoids from these yeast cells and specific carotenoid amount is designated in these strains by HPLC method. 725,6764 mg/ml beta carotene and 68 mg/ml licopene are produced by 100 µj/2 sn 6-6 and 7 µg/g total carotenoid is produced by 100 µj/2 sn 6-5. However all strains are analyzed by Wilcoxon test as control and treatment group and is not observed remarkable difference between them.

Science Code :1055.1

Key Words : Beta carotene, lycopene, *S.cerevisiae*, UV mutagenesis, Yeast

Page Number : 123

Advisor : Prof. Dr. Emine Sevda MENEVŞE

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında yapılmıştır.

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tezimin her aşamasında değerli bilgilerini ve katkılarını benden esirgemeyen saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Emine Sevdâ MENEVŞE'ye

Tüm yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgileriyle yolumu aydınlatan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma,

Deneysel çalışmalarında bana çok yardımda bulunan, tüm bilgilerini benimle her daim paylaşan Dr. Bilge ÖZAYDIN'a

Tezimin verilerinin düzenlenmesinde sağladığı desteklerden dolayı Arş. Gör. Funda Demirtaş KORKMAZ 'a

UV mutajenez uygulamasında yardımını esirgemeyen Dr. Nuray GÜNDÜZ' e,

Tezimin biçimsel düzenlemelerinde bana yardımcı olan sevgili ağabeyim Coşkun ASLAN'a

Hayatımın her aşamasında yanımda olan duaları ve motivasyonu ile beni her daim destekleyen sevgili annem İmran ASLAN'a,

Her zaman yanımda maddi ve manevi destekçim olan kıymetli babam Hasan Hüseyin ASLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karotenoidler.....	3
2.1.1. Karotenoidlerin yapısı.....	3
2.1.2. Gıdalarda bulunan karotenoid çeşitleri	5
2.1.3. Karotenoidlerin insan sağlığı açısından önemi	8
2.1.4. Karotenoidlerin emilimi ve günlük kullanım miktarları	15
2.2. Metabolik Mühendislik	19
2.2.1. Metabolik mühendisliğin kullanım alanları	21
2.2.2. Metabolik mühendislikte kullanılan model organizmalar ve elde edilen ürünler	22
2.3. UV Mutajenez	25
2.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Ekmek Mayası)	29
2.4.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nin evrimsel kökeni.....	31
2.4.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nin hücresel yapısı ve hayat döngüsü	32
2.4.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nin genetik yapısı.....	35
2.4.4. Model organizma olarak <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37

Sayfa

3. GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. Gereçler	41
3.1.1. Kullanılan cihazlar	41
3.1.2. Kullanılan kimyasallar	42
3.1.3. Kullanılan sarf malzemeleri	42
3.1.4. Kullanılan ölçüm sistemleri	43
3.1.5. Kullanılan suş	45
3.2. Çözeltilerin Hazırlanışı	45
3.2.1. YPD sıvı besiyerinin hazırlanması.....	45
3.2.2. YPD katı besiyerinin hazırlanması	46
3.2.3. %40'lık dekstrozu çözeltisinin hazırlanması	46
3.2.4. %0,2'lik pyrogallol çözeltisinin hazırlanması.....	46
3.2.5. %3'lük gliserol içeren YPD katı besiyeri hazırlanması	47
3.2.6. %15'lik gliserol içeren YPD sıvı besiyerinin hazırlanması	47
3.2.7. HPLC mobil faz çözeltilerinin hazırlanması.....	47
3.2.8. %60'lık potasyum hidroksit (KOH) çözeltisinin hazırlanması	47
3.3. Yöntemler.....	48
3.3.1. UV mutajenez işleminin uygulanması	48
3.3.2. UV mutajenez sonucu oluşan kolonilerin fenotipik taranması ve tek koloni ekim yapılması	52
3.3.3. Seçilen suşların sıvı besiyerinde büyütülerek büyüme eğrilerinin çizilmesi	53
3.3.4. Sıvı besiyerinde büyütülen suşların liyofilizatörde kurutulması.....	56
3.3.5. Sıvı besiyerinde büyütülen suşlardan karoten ekstre edilmesi.....	57
3.3.6. HPLC yöntemiyle hücrede üretilen spesifik karoten miktarının belirlenmesi	60
3.4. İstatistiksel Analiz	62

Sayfa

4. BULGULAR	65
4.1. UV Mutajenez Deneylerinin Sonuçlarının Değerlendirilmesi	65
4.2. UV Mutajenez Deneyi Sonucunda Oluşan Kolonilerin Fenotipik Taranmasının Sonuçları.....	72
4.3. Seçilen Suşların Sıvı Besiyerinde Büyütülmesinin Sonuçları ve Büyüme Eğrileri.....	75
4.4. Sıvı Besiyerinde Büyütülen Suşlardan Karoten Ekstre Edilmesinin Sonuçları ..	84
4.5. Suşların HPLC Analizlerinin Sonuçları	89
4.5.1. Suşların HPLC ölçümlerinin istatistiksel analizi ve ortalama β - karoten, likopen miktarları	93
5. TARTIŞMA	99
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	105
KAYNAKLAR	109
EKLER.....	121
Ek-1. <i>S. cerevisiae</i> 'de izoprenoidlerin ve karotenlerin sentezlendiği mevalonat yolağı	122
ÖZGEÇMİŞ	123

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Karotenoidler için kullanılan çözücüler, maksimum dalga boyları (λ_{max}) ve spesifik absorpsiyon katsayıları ($A_{1cm}^{1\%}$).....	4
Çizelge 2.2. Bazı gıdalarda bulunan karotenoid çeşitleri ve miktarları ($\mu g/100g$).....	6
Çizelge 2.3. Gıda işleme süreci boyunca karotenoidlerin stabilitesi (taze gıdalar).....	7
Çizelge 2.4. Yiyeceklerin hazırlanması ve pişirilmesi sürecinde karotenoidlerin stabilitesi (taze gıdalar).....	8
Çizelge 2.5. Bazı karotenoid izomerleri ve provitamin A aktiviteleri.....	9
Çizelge 2.6. İnsan kan plazmasındaki bazı karotenoid türlerinin konsantrasyonları ($\mu mol/L$)	17
Çizelge 2.7. İnsanlar için günlük önerilen β -karoten ve bazı vitamin miktarlarının yaşa ve cinsiyete göre dağılımı.....	18
Çizelge 2.8. Haploid ve diploid maya hücrelerinin büyüklüğü ve içeriğindeki farklılıklar	34
Çizelge 3.1. UV mutajenez deneyinin 20 kat olarak yapılan seri dilüsyon basamağının şematik gösterimi.....	49
Çizelge 3.2. UV mutajenez deneyinde 10 kat olarak yapılan seri dilüsyon basamağının şematik gösterimi	51
Çizelge 4.1. Suşların sıvı besiyerinde ilk defa büyütülmesi sırasında ölçülen 24, 48, 72 saat OD değerleri	76
Çizelge 4.2. Seçilen suşların sıvı besiyerinde ikinci kez büyütülmesinde kullanılan başlangıç kültürlerin OD değerleri ve başlangıç kültürden alınan miktarlar.....	77
Çizelge 4.3. Seçilen suşların sıvı besiyerinde büyütülmesinin ikinci uygulaması sırasında ölçülen 0, 24, 48, 72 saat OD değerleri	78
Çizelge 4.4. Tekrarlı büyüme (2.büyütme) ölçümlerinin grup içi ve gruplar arası karşılaştırma analizi.....	80
Çizelge 4.5. Seçilen suşların sıvı besiyerinde üçüncü kez büyütülmesinde kullanılan başlangıç kültürlerin OD değerleri ve başlangıç kültürden alınan miktarlar.....	81
Çizelge 4.6. Seçilen suşların sıvı besiyerinde büyütülmesinin üçüncü uygulaması sırasında ölçülen 0, 24, 48, 72 saat OD değerleri	81

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.7. Tekrarlı büyüme (3.büyütme) ölçümlerinin grup içi ve gruplar arası karşılaştırma analizi	83
Çizelge 4.8. 2. ve 3. büyütme deneylerinde 0, 24, 48, 72 saat OD değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları	84
Çizelge 4.9. Karoten ekstraksiyonu deneyinin ilk uygulamasında kullanılan örneklerin toplam, tüp ve net maya ağırlıkları	85
Çizelge 4.10. Karoten ekstraksiyonu deneyinin ilk uygulaması sonucunda elde edilen OD değerleri ve total karoten miktarları	86
Çizelge 4.11. Karoten ekstraksiyonu deneyinin ikinci uygulamasında kullanılan örneklerin toplam, tüp ve net maya ağırlıkları	86
Çizelge 4.12. Karoten ekstraksiyonu deneyinin ikinci uygulaması sonucunda elde edilen OD değerleri ve total karoten miktarları	87
Çizelge 4.13. Karoten ekstraksiyonu deneyinin iki uygulaması sonucu elde edilen total karoten miktarlarının ortalamaları ve standart sapmaları	87
Çizelge 4.14. Total karoten ölçümlerinin grup içi ve gruplar arası karşılaştırma analizi	89
Çizelge 4.15. Karoten ekstraksiyonu deneyinin ilk uygulamasında elde edilen spesifik beta karoten miktarları	90
Çizelge 4.16. Karoten ekstraksiyonu deneyinin ilk uygulamasında elde edilen spesifik likopen miktarları	91
Çizelge 4.17. Karoten ekstraksiyonu deneyinin ikinci uygulamasında elde edilen spesifik beta karoten miktarları	91
Çizelge 4.18. Karoten ekstraksiyonu deneyinin ikinci uygulamasında elde edilen spesifik likopen miktarları	92
Çizelge 4.19. HPLC analizi sonucu 1. ve 2. ekstraksiyonda elde edilen spesifik β -karoten miktarları, ortalamaları ve standart sapmaları	94
Çizelge 4.20. HPLC β -karoten ölçümlerinin grup içi ve gruplar arası karşılaştırma analizi	95
Çizelge 4.21. HPLC analizi sonucu 1. ve 2. ekstraksiyonda elde edilen spesifik likopen miktarları, ortalamaları ve standart sapmaları	96
Çizelge 4.22. Likopen ölçümlerinin grup içi ve gruplar arası karşılaştırma analizi	97

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. β -karotenin kimyasal yapısı.....	5
Şekil 2.2. Likopenin kimyasal yapısı.....	5
Şekil 2.3. Asetil CoA bileşiğinin yer aldığı TCA döngüsü ve bu bileşikten üretilen biyoteknolojik ürünler	25
Şekil 2.4. UV'nin DNA'da oluşturduğu hasarlardan siklobütan pirimidin dimeri ve 6-4 pirimidin pirimidon fotoürünün oluşumu.....	26
Şekil 2.5. UV tarafından oluşturulan mutasyonun yavru hücrelere aktarılması.....	28
Şekil 2.6. Ökaryotik canlılar arasında mayaların evrimsel konumu.....	31
Şekil 2.7. <i>S.cerevisiae</i> 'nin hayat döngüsü	34
Şekil 4.1. Suşların sıvı besiyerinde 2. kez büyütülmesinde 0, 24, 48, 72 saat grup içi analizi	80
Şekil 4.2. Suşların sıvı besiyerinde 3. kez büyütülmesinde 0, 24, 48, 72 saat grup içi analizi	83
Şekil 4.3. Suşların sıvı besiyerinde 2. ve 3. büyütülmelerinde alınan OD değerlerinin ortalamaları ile oluşturulan büyüme eğrisi	84
Şekil 4.4. Karoten ekstraksiyonu sonucu elde edilen kuru hücre ağırlığı (kha) olarak total karoten miktarları	88
Şekil 4.5. 1. ve 2. karoten ekstraksiyonunda elde edilen total karoten miktarlarının grup içi analizi	89
Şekil 4.6. 250 -700 nm arasında kaydedilen karotenlerin HPLC profilleri	92
Şekil 4.7. Suşların HPLC analizi sonucu bilgisayar ekranında oluşan pikler	93
Şekil 4.8. HPLC ölçümlerine göre spesifik β -karoten miktarları	94
Şekil 4.9. 1. ve 2. karoten ekstraksiyonu HPLC ölçümlerine göre spesifik β -karoten miktarlarının grup içi analizi	95
Şekil 4.10. HPLC ölçümlerine göre spesifik likopen miktarları	96
Şekil 4.11. 1. ve 2. karoten ekstraksiyonu HPLC ölçümlerine göre spesifik likopen miktarlarının grup içi analizi	98

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. A vitamininin vücuttaki formları	15
Resim 2.2. Rekombinant DNA oluşturma basamakları.....	19
Resim 2.3. Metabolik mühendislikle ana organizmadan alınan genin model organizmada ifade edilmesiyle istenilen ürünün elde edilmesi	20
Resim 2.4. Metabolik mühendisliğin kullanıldığı endüstri dalları	22
Resim 2.5. Metabolik mühendislik yoluyla <i>S.cerevisiae</i> 'den elde edilen ürünlerden bazıları [99]	23
Resim 2.6. UV'ye bağlı DNA hasarları ve mutasyonların hücrenin farklı bölgelerine göre dağılımı	29
Resim 2.7. Tomurcuklanan maya hücresinin ışık mikroskopundaki görüntüsü	33
Resim 2.8. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nin mitokondriyal kromozom yapısı	36
Resim 2.9. Genetik olarak modifiye edilmiş <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nin katı agar üzerinde oluşturduğu koloniler	38
Resim 3.1. Spektroskopik analizlerde kullanılan UV/VIS spektrofotometre	44
Resim 3.2. <i>S.cerevisiae</i> hücrelerinde bulunan spesifik karoten miktarlarının tayininde kullanılan HPLC cihazı	44
Resim 4.1. UV mutajenez deneyinin üçüncü uygulamasında elde edilen koloniler	66
Resim 4.2. UV mutajenez deneyinin dördüncü uygulamasında elde edilen koloniler	69
Resim 4.3. UV mutajenez deneyinin üçüncü uygulamasında seçilen koloniler	73
Resim 4.4. UV mutajenez deneyinin dördüncü uygulamasında seçilen kolonilerin tek koloni ekimlerinin sonuçları	74
Resim 4.5. UV mutajenez deneyinin dördüncü uygulaması sonucunda seçilen kolonilerin yama ve sıvama ekimleri	75
Resim 4.6. Suşların sıvı besiyerinde ilk defa büyütülmesinin kültür ve peletleri	77
Resim 4.7. Suşların sıvı besiyerinde ikinci defa büyütülmesinin kültür ve peletleri	79
Resim 4.8. Suşların sıvı besiyerinde üçüncü defa büyütülmesinin kültür ve peletleri	82

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
λ	Dalga boyu
μm	Mikrometre
μmol	Mikromol
μM	Mikromolar
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μj	Mikrojul
mM	Milimolar
mg	Miligram
ml	Mililitre
g	Gram
L	Litre
dk	Dakika
sn	Saniye
cm^2	Santimetrekare
cm^{-1}	Dalga sayısı
m^2	Metrekare
nm	Nanometre

Kısaltmalar	Açıklamalar
AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ATP	Adenozin trifosfat

Kısaltmalar**Açıklamalar**

CoA	Koenzim A
CRP	C-Reaktif Protein
Crt	Karoten Geni
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FPP	Farnesil difosfat
GDO	Genetiği Değiştirilmiş Organizma
GPP	Geranil difosfat
GGPP	Geranil Geranil difosfat
GRAS	Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen
HMG	Hidroksi Metil Glutaril
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
OD	Optik Yoğunluk
pH	Hidrojenin Gücü
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
UNAM	Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Karotenoidler, asırlardan beri insanların ve hayvanların beslenmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Bazı bakteriler, algler ve mantarlar tarafından sentezlenen karotenler organik yapılı pigmentlerdir. Klorofil, ksantofil gibi bitkiler için fotosentez ve renk oluşumunda görevli pigment olarak bilinen karotenoidlerin yanı sıra beta karoten, likopen, astaksantin zeaksantin gibi pek çok karotenoid de doğada mevcuttur. Günümüzde gıda ve kozmetik endüstrisinde tat ve renk verici olarak kullanılması başta olmak üzere karotenler pek çok endüstri kolunda aranan maddeler arasındadır. İnsan sağlığı açısından karotenler A vitamininin öncül maddesi olması, deride renk oluşumu, kemik gelişimi, görme gibi pek çok fonksiyonu yerine getirebilmektedir. Kanseri başta olmak üzere, bazı koroner hastalıklara karşı koruyucu etkisi tespit edilen karotenlerle ilgili yapılan çalışmalarda son yıllarda bir artış gözlenmektedir [1]. Bu karotenler içerisinde güçlü antioksidan etkileri sayesinde beta karoten, likopen ve astaksantin dikkat çekmektedir [2].

Doğada karotenler gibi yüksek değere sahip pek çok metabolit ana organizmadan düşük miktarlarda elde edilebilmektedir. Biyosentez yollarının keşfedilmesi ve metabolik mühendislik alanındaki gelişmeler bu değerli ürünlerin model organizmalardan elde edilebileceğini göstermiştir [3]. Bu model organizmalar içerisinde *S.cerevisiae* diğer model organizmalara göre pek çok avantaja sahiptir. Ekmek mayasının genetik olarak kolay işlenebilmesi, mutant suşlarının oluşturulmasının, izolasyonunun ve analizin yapılmasının görece kolay olması, birçok geninin delesyonunun yapılarak genetik yapısının büyük bir kısmının çözülmüş olması, kimyasal besiyerlerinde, fermentörde büyütülmesinin kolay olması ve birçok endüstriyel ürünün eldesinde başarılı sonuçlar vermesi *S.cerevisiae*'yi bu çalışmalar için uygun bir organizma haline getirmiştir [4]. *S.cerevisiae* doğal koşullarda karoten sentezleyemez. Ancak β -karoten ve likopen sentezinde yapıtaşı olarak kullanılan geranil geraniol piro fosfat (GGPP) maddesinin sentezini gerçekleştirir. Bu madde *S.cerevisiae*'de hücre duvarını güçlendirmek için kullandığı ergosterolün yapısına katılan bir maddedir ve ekmek mayasında bulunan mevalonat yolağında sentezlenmektedir. Mevalonat yolağı ekmek mayasının sterol, ubikinon ve dolikol sentezlediği hayati derecede öneme sahip bir yoldur [5]. Mevalonat yolağı kullanılarak β -karoten ve likopen sentezine dair çalışmalarda kırmızı maya *X. dendrorhous*'dan alınan karoten genleri *S.cerevisiae*'de ifade edilerek yüksek miktarlarda β -karoten üretimi sağlanmıştır [6]. Sonrasında yapılan genetik modifikasyonlar ve gen delesyonları ile üretilen β -karoten miktarı artırılabilmiştir [7].

Bu çalışmada UV mutajenez yöntemi kullanılarak mevalonat yolağı güçlendirilmiş *S.cerevisiae* mayasında üretilen β -karoten ve likopen miktarının artırılması amaçlanmıştır. UV mutajenez UV ışığına maruz bırakarak maya genomunda rastgele mutasyonlara sebep olan bir yöntemdir. Bu yöntem AB tarafından kabul görmektedir ve GDO olarak değerlendirilmemektedir. Farklı sürelerde UV'ye maruz bırakılan suş farklı renklerde ve büyüklüklerde koloniler oluşturmuştur. Fenotipik tarama yapılarak bu koloniler içerisinde en sağlıklı ve koyu turuncu renkli olanlar seçilerek, birkaç kere tek koloni ekimi yapılmıştır. Tek koloni ekimi sonucunda renkleri ve sağlık durumu stabil olan suşlar sıvı besiyerinde büyütülerek OD ölçümü yapılmıştır.

Karoten ekstraksiyonunun ardından total karoten ve HPLC yöntemiyle spesifik karoten miktarları tayin edildi. Yapılan çalışmalar sonucunda β -karoten ve likopen miktarlarında artış gözlenmiştir. β -karoten ve likopenin güçlü antioksidan etkiye sahip olmaları kanser başta olmak üzere pek çok kronik hastalık, kalp damar hastalıklarının tedavisinde kullanılabilir olması β -karoten ve likopenin önemini artırmaktadır. Ayrıca balık ve tavuk yemlerinde renklendirici olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde bu konuyla ilgili yapılan pek fazla çalışma bulunmaması ve β -karoten ve likopen üretiminin hem gıda sanayinde hem de yem sanayinde geniş kullanım alanlarına sahip olması bizi bu çalışmayı yapmaya sevk etmiştir.

UV mutajenez sonrasında kullandığımız suшта bir genetik tarama yapılmaması bu çalışmanın temel sınırlılığıdır. Mutasyonun hangi gende gerçekleştiği tespit edilememiştir. Bu çalışma temel alınarak yapılacak çalışmalarda genomun sekanslatılmasıyla mutasyonun hangi gende gerçekleştiği belirlenebilir. Ancak uygulanan her ekstra yöntem maliyeti artırarak bu çalışmanın temel amacı olan kolay ve ekonomik yoldan istenilen ürünün elde edilmesi hedefinden uzaklaşılmasına sebep olmaktadır. Bu sınırlılığın dışında UV mutajenez sonucunda kolonilerin oluşmasının beklenmesi oluşan kolonilerin defalarca tek koloni ekim yapılarak seçilmesi ve sıvı besiyerinde büyütülmesi için geçen zaman ise bu çalışmanın bir başka sınırlılığıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karotenoidler

Karotenoidler doğal olarak oluşan bileşikler içerisinde en fazla çeşide sahip olan pigment grubudur. Yağda çözünebilen renk ve tad verici maddelerdir. Bitkilerde fotosentezde görev almalarının yanı sıra metabolik reaksiyonlar sonucu oluşabilen zararlı bileşiklerin detoksifiye edilmesinde rol almaktadır. Ayrıca bitkilerde karotenoid bileşikleri ışığı soğurma ve membran stabilizasyonu işlevlerini yerine getirmektedir [8].

Hayvanlar karotenoid sentezleyemedikleri için doğada bulunan karotenoidleri besinler aracılığıyla alarak ve dokularında modifiye ederek kullanmaktadır [9]. Karotenoidler daha çok kırmızı, sarı, turuncu renkli sebze ve meyvelerde bulunmaktadır. Ayrıca yeşil bitkilerde çeşitli karotenoidler bulunabilmektedir. Ancak yeşil bitkilerdeki klorofil, karotenoidlerin rengini baskılayarak bitkinin yeşil renkli görünmesine neden olur [8].

Doğada 600 kadar karotenoid bileşiği mevcut olup, bunlardan yalnızca 40 kadarı insan beslenmesinde rol almakta, bu karotenoidlerinde 20 kadarı insan dokusunda ve kanında ölçülebilmekte ve bu ölçülebilen karotenoidler genellikle α -karoten, β -karoten, likopen, lütein ve kriptoksantinden oluşmaktadır [10].

Doğada en çok bulunan, bazı sentetik ve doğal yollarla sentezlenen karotenoidlerin başında α -karoten, β -karoten, likopen, lütein, kriptoksantin, zeaksantin, nero sporen, astaksantin gelmektedir [10].

2.1.1. Karotenoidlerin yapısı

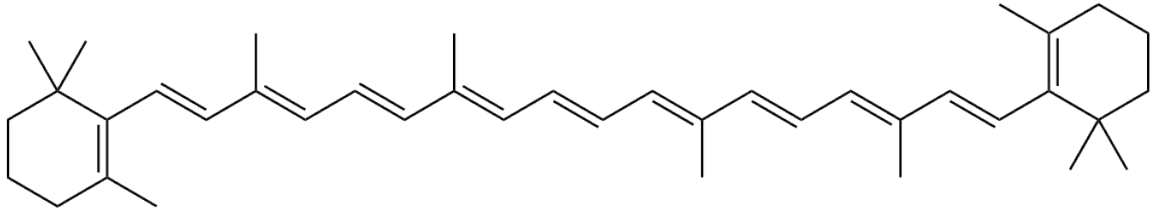
Karotenoidlerin birçoğu 40 karbon içeren tetraterpenoid grubuna dahil edilmektedir [11]. Karotenoid bileşikleri metil grupları bağlı olan alifatik bir zincir ve karotenoidlere rengini veren çift bağ yapılarından oluşmaktadır. Karotenoidler kimyasal yapılarına göre hidrokarbon karotenoidler ve ksantofiller olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Hidrokarbon karotenoidlere örnek olarak α -karoten, β -karoten ve likopen verilebilir [12]. Ksantofiller ise polar özellikte ve farklı formlarda oksijen atomu bulunduran bileşiklerdir. Bunlara örnek olarak da β -kriptoksantin, zeaksantin ve lütein verilebilir [12]. Aynı zamanda karotenoidler halka yapısı bulundurup bulundurmadıklarına göre siklik ve asiklik karotenoidler olarak

ikiye ayrılmaktadır. Fitoen ve likopen asiklik karotenoidlere örnek iken, α -karoten, β -karoten ve γ -karoten ise siklik karotenoidlere örnektir [12]. Bitkisel ve hayvansal gıdalarda bulunan karotenoidler genellikle proteinlere bağlı olarak veya yağda çözünmüş ester bileşikleri olarak bulunmaktadır [10]. Karotenoidler yapılarında çift bağ bulundurmalarına bağlı olarak ısı ve ışıktan kolayca etkilenebilen bileşiklerdir. Bu çift bağların kırılması veya yerlerinin değişmesi karotenoid bileşiklerinin kimyasal yapısının bozulmasına sebep olabilmektedir. α -karoten, β -karoten ve likopen apolar bileşiklerdir ve hidrokarbon yapıdadır. Bu sebeple suda çözünmezler. Kloroform, benzen, yağ, karbon disülfid ve hekzan karotenoidlerin çözülmesinde sıklıkla kullanılan çözücülerdir (Çizelge 2.1.). Karotenoidlerin kaynama noktaları 130-220 °C arasında değişmektedir [13]. Karotenoidler 430-480 nm dalga boylarında absorbsiyon vermektedir [14].

Çizelge 2.1. Karotenoidler için kullanılan çözücüler, maksimum dalga boyları (λ_{max}) ve spesifik absorbsiyon katsayıları ($A_{1cm}^{%1}$) [15]

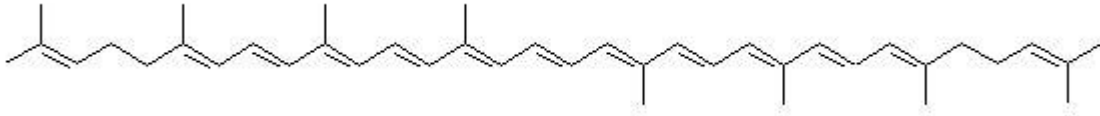
KAROTENOİD	ÇÖZÜCÜ	λ_{max} (nm)	$A_{1cm}^{%1}$
β -karoten	Hekzan	450	2560
Likopen	Hekzan	472	3450
α -karoten	Hekzan	444	2800
Zeaksantin	Hekzan	451	2480
β -kriptoksantin	Hekzan	451	2460
Lutein	Etanol	445	2550

Bizim çalışmamızda üretimi artırılmaya çalışan karotenoidlerden biri olan β -karoten ise doğada cis ve trans geometrik izomer yapısında bulunabilmektedir (Şekil 2.1.). β -karotenin iki farklı izomerini doğada farklı kaynaklardan elde etmek mümkündür. Ancak all-trans izomerleri genellikle ticari ürün olarak kullanılmakta ve bu sebeple kimyasal olarak da üretilmektedir [16]. Çoğu kaynakta tamamen trans formunda bulunan β -karotenin, yeşil bir alg türü olan *Dunaliella salina*'da 9-cis izomer formu mevcuttur. Bu yeşil alg türü için β -karoten güçlü ve yoğun ışık, nitrojen eksikliği gibi aşırı stres koşullarından korunmak için üretilen sekonder bir metabolittir [17]. Bu yeşil alg türündeki 9-cis izomeri dışında β -karotenin 272 farklı cis izomeri bulunmuştur [14]. Cis izomerler kristal yapıda olmamaları ve çözünübilirlik seviyelerinin yüksek olmasına bağlı olarak all-trans izomerlere göre daha avantajlı durumdadır [16]. Cis izomerler UV spektrumunda 300-350 nm arasında ışımaya verir ve renk yoğunluğu cis durumdaki çift bağın konumundan etkilenmektedir [12].



Şekil 2.1. β -karotenin kimyasal yapısı [17]

Likopen ise sağlık açısından faydalarından dolayı tüketicilerin gözdesi haline gelmiş bir karotenoiddir [18]. Yapısal değişkenlik sağlayan uzun konjuge 11 çift bağlı sistem yapısı sayesinde alifatik bir yapı kazanmıştır (Şekil 2.2). Yapısındaki çift bağlardan dolayı likopen cis veya trans formda olabilmektedir. Ancak doğada genellikle trans formda bulunmaktadır. Isı, ışık ve kimyasal reaksiyonlar sayesinde mono veya poli izomerizasyon gerçekleşmekte bu da likopenin trans formuna göre daha dayanıklı olan cis formuna dönüşmesini sağlamaktadır [19, 20].



Şekil 2.2. Likopenin kimyasal yapısı [21]

2.1.2. Gıdalarda bulunan karotenoid çeşitleri

Karotenoidler günümüzden yaklaşık üç milyar yıl önce ilk olarak bakterilerde ortaya çıkarılmış pigment bileşiklerindendir [19, 22]. Karotenoidler insan vücudunda temel olarak A vitamini öncülüğü rolünü oynarlar. Meyve ve sebzeler önemli karotenoid kaynaklarıdır ve karotenoidleri genelde sarı ve turuncu mikrobileşikler olarak ihtiva ederler (Çizelge 2.2.) [23, 24]. Meyveler de sebzeler gibi karotenoid içermesine rağmen, miktar olarak daha az karotenoid bulundurmaktadır [12]. Sebzelerde β -karoten ve lütein baskın karotenoid çeşitleri olmasının yanı sıra çeşitli miktarlarda violaksantin, zeaksantin ve neoksantin bulunmaktadır [25]. Karotenoidler hayvansal gıdalarda da bulunabilmektedir. Örneğin yumurta sarısı, balık, kümes hayvanları ve kabuklu deniz hayvanlarında kriptoksantin, astaksantin gibi karotenoidler mevcuttur.

Çizelge 2.2. Bazı gıdalarda bulunan karotenoid çeşitleri ve miktarları ($\mu\text{g}/100\text{g}$) [26]

Meyve -Sebze	β -karoten	α -karoten	Likopen	Kriptoksantin	Lutein, Zeaksantin
Taze elma	26	-	-	-	45
Taze kayısı	3,5	-	5	-	-
Kuşkonmaz	449	9	-	-	640
Yeşil pancar	2,6	3	-	-	7700
Taze marul	700	1	-	-	1900
Kırmızı lahana	15	1	-	-	26
Taze havuç	8	3,6	-	-	260
Karnabahar	8	-	-	-	33
Kereviz	710	-	-	-	3,6
Sarı mısır	51	50	-	-	780
Yeşil fasulye	630	44	-	-	740
Portakal	39	20	-	149	14
Kırmızı biber	2200	60	6,8	-	-
Ispanak	4100	-	-	-	12,6
Mandalina	38	20	-	106	20
Domates	520	-	3100	-	100

Meyve ve sebzelerin karotenoid içeriği bitkinin türü, aldığı ışık ve azot miktarı, toprağın yapısı, uygulanan tarımsal yöntemler, bitkinin genotipi ve meyvenin olgunluğuna göre değişiklik göstermektedir [27]. Karotenoidler bitkilerin fotosentetik kısımlarında, meyvelerde yağ damlacıkları halinde veya havuç ve domatesteki gibi yarı kristalize halde bulunabilirler. Hücre zarının yapısına katılabilirler. Bir karotenoid molekülünün zardaki yerleşimi karotenoidin yapısına ve membranın kompozisyonuna bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir [28]. β -karoten ve likopen membran yüzeyine paralel uzanmakta veya zarın hidrofobik öz kısmında bulunmaktadır [29, 30].

Gıda işlenmesi sürecinde karotenoidlerde meydana gelen değişiklikler

Gıdalarda işlenme, depolanma ve hazırlanma gibi pek çok aşama karotenoid içeriğini ve izomer yapısını etkilemektedir (Çizelge 2.3.). Bu etkilerin karotenoidlerin biyoyararlanımına katkıları değişiklik göstermektedir [31]. Karotenoidler doymamış yapılarına bağlı olarak oksidasyona uğrayabilmekte, pişirme sırasında fazla ısı uygulanması, depolanan ortamın ısısı, ışığı, nemi, pH'sı ve depolama süresinin uzunluğu gibi faktörler başta olmak üzere pek çok faktör karotenoidlerin kimyasal yapısını ve gıdalardaki karotenoid miktarlarını etkileyebilmektedir [19]. Örneğin ısıl işlem uygulanması karotenoidlerin trans formundan cis formuna dönüşmesine sebep olabilmektedir [32]. Isıl

işleme karşı epoksi yapısına sahip karotenoidler (neoksantin, violaksantin) hidrokarbon yapıya sahip karotenoidlerden (β -karoten, likopen, nero sporen) daha duyarlıdır. Örneğin yeşil fasulye 1 saat kaynatıldığında β -karoten ve lütein miktarı değişmezken, violaksantin ve neoksantin de grede olmaktadır [25]. Bununla birlikte karotenoidler farklı pişirme metodlarına karşı genellikle stabil bir yapı göstermektedir (Çizelge 2.4.). Karotenoidler pişirme sürecinden önce protein veya diğer bileşiklerle bir arada bulunurlar ve böylece okside olmazlar. Pişirme süreciyle birlikte proteinler denatüre olur dolayısıyla karotenoidler daha kolay ekstre edilebilmekte ve insanlar için kolayca yararlanılabilir hale gelebilmektedir [12]. Yeşil sebzelerde pişirme işlemi lüteinde %24, β -karotende ise %38 oranında bir artışa sebep olmuştur [15]. İşlenmiş bir sebzedende elde edilen β -karoten miktarı, aynı miktardaki işlenmemiş veya çiğ sebzedende elde edilen β -karoten miktarından daha fazladır [31].

Likopenin ise temel kaynağı domatestir ve likopen ihtiyacının %80'i işlenmiş domates ürünlerinden karşılanmaktadır [33]. Likopen hem taze gıdalarda hem de ısı işlem görmüş gıdalarda all-trans izomer yapısındadır [34, 35]. Isıl işlem boyunca β -karoten izomerizasyon gösterirken, likopen ekstrem sıcaklıklarda bile izomerizasyona karşı daha dayanıklıdır [31]. Termal ve mekanik işleme sayesinde likopen insanlar için daha faydalı hale gelmektedir. Bununla birlikte gıda işlenmesi ve pişirilmesi likopende kayda değer bir izomerizasyona neden olmamaktadır [31].

Çizelge 2.3. Gıda işleme süreci boyunca karotenoidlerin stabilitesi (taze gıdalar) [31]

Uygulanan işlem	Gıda	β -karoten%	Likopen%	Lütein%
Kızgın yağda pişirme	Çiğ havuç dilimleri	100	-	-
Kurutularak kızartma	Çiğ havuç dilimleri	91	-	-
Kısmen kurutarak kızartma	Çiğ havuç dilimleri	79	-	-
Pastörizasyon	Domates, ısı işlem görmüş ekstrakt	114	103	93
Otoklav sterilizasyonu	Domates, salça	97	137	97
Sıkma	Niştasta içeren ekstrakt	8	-	-
Fırında kurutma (10 saat 65 °C)	İspanak	72	-	-
Güneşte kurutma (10 saat)	İspanak	43	-	-

Taze brokoli, ıspanak ve yeşil fasulye yaklaşık olarak 5 dakika mikrodalga fırında pişirildiğinde β -karoten içeriğinin %100 korunduğu gösterilmiştir [36]. Taze veya konserve domatesten domates sosu yapmak için pişirme sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Orta sıcaklıkta 8 dakika pişirilen domateslerde likopen miktarında değişiklik gözlenmemiştir [36]. Fazla pişirme süresi ve fazla sıcaklıkta, ağız açık bir tencerede oksijen varlığında

pişirilen domateslerde likopen kaybı görülebilmektedir [31]. Pişirme sürecinde oksidasyon olması likopen kaybı yaşanmasında birinci faktördür [33].

Çizelge 2.4. Yiyeceklerin hazırlanması ve pişirilmesi sürecinde karotenoidlerin stabilitesi (taze gıdalar) [31]

Piştirme yöntemi	Yiyecek	β -karoten%	Likopen%	Lütein%
Su içinde mikrodalgada (6 dakika)	Brüksel lahanası	85	-	88
Susuz mikrodalgada	Brokoli	105	-	116
Buharda piştirme	Ispanak	102	-	92
Orta ısıda piştirme (8 dakika)	Domates	107	112	115
Kaynatma(9 dakika)	Yeşil fasulye	115	-	103
Kaynatma(1 saat)	Yeşil fasulye	112	-	107
Haşlama(5 dakika)	Ispanak	92	-	-
Karıştırarak piştirme (açık tencere 30 dakika)	Ispanak	98	-	-
Düdüklü tencere (10 dakika)	Ispanak	99	-	-
Dondurarak saklamak (polietilen poşette)	Ispanak	83	-	-
Dondurarak saklamak (poşetsiz)	Ispanak	99	-	-

2.1.3. Karotenoidlerin insan sağlığı açısından önemi

Karotenoidlerin insan sağlığı üzerinde etkilerinden bahsedildiğinde akla ilk olarak A vitamini öncüsü olmaları gelmektedir. Bununla birlikte yapılan epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar karotenoidler açısından zengin besinlerin sıklıkla tüketilmesinin sarı nokta hastalığına, kansere, kardiyovasküler hastalıklara, oksijen kaynaklı serbest radikallerin hasarlarına bağlı olarak ortaya çıkan çok sayıda patolojik duruma karşı koruyucu etkisi olabileceğini ortaya koymuştur [37-40]. Ayrıca karotenoidler bağışıklık cevabı oluşmasında, hücreler arası iletişimde, DNA hasarına karşı hücreleri koruma konusunda da etkilidir [41].

Karotenoidlerin insan vücudundaki temel aktiviteleri provitamin A işlevi görmeleridir. A vitamini ise görme, büyüme, hücrel farklılaşma gibi pek çok fizyolojik fonksiyonu yerine getirmektedir [10]. 1900'lü yılların başında Moore yaptığı çalışmada sarı renkli gıdalarla beslenen ratlarda karotenoidlerin renksiz A vitaminine dönüşebildiğini göstermiştir [42]. Doğada 600'den fazla karotenoid bulunmasına rağmen bunlardan 50 tanesi provitamin A olarak görev yapar. Bununla birlikte dünya nüfusunun A vitamini gereksiniminin büyük çoğunluğu karotenoidlerden karşılanmaktadır. İnsanlar tarafından tüketilen sebzeler ve meyvelerdeki β -karoten temel A vitamini kaynağı olarak işlev görmektedir [43]. β -karoten yapısında iki tane β iyonon halkası bulundurmasına bağlı olarak en yüksek provitamin A

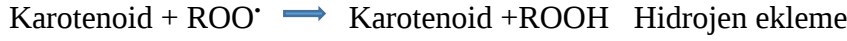
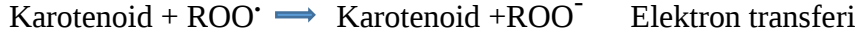
aktivitesine sahiptir. β -karoten dışında α -karoten, γ -karoten ve β -kriptoksantin de provitamin A olarak görev yapan diğer karotenoidlerdir [14]. β -karotenin izomer yapısı provitamin A görevi üzerinde etkili bir faktördür. β -karoten doğada genellikle all-trans izomer yapısında iken işlenmiş gıdalarda cis izomer yapısındadır. Ancak bir veya daha fazla çift bağın cis izomere dönüşmesi provitamin A aktivitesini önemli derecede düşürmektedir [43].

Çizelge 2.5. Bazı karotenoid izomerleri ve provitamin A aktiviteleri [42, 44]

İzomer	Provitamin A Aktivitesi%
All trans β -karoten	100
9-cis- β -karoten	38
13-cis- β -karoten	53
15-cis- β -karoten	30-50
All trans α -karoten	50-54
9-cis- α -karoten	13
γ -karoten	42-50
β -kriptoksantin	50-60

Karotenoidler güçlü antioksidan etkiye sahip olan bileşiklerdir. Yiyeceklerden, gıda renklendiricilerden ve diğer besin kaynaklarından alınan karotenoidler tekli oksijenleri yok ederek ve serbest radikalleri uzaklaştırarak antioksidan görevi yapmaktadır [45]. Epidemiyolojik çalışmalardan alınan birçok sonuca göre β -karoten yönünden zengin gıdaların tüketilmesiyle β -karoten etkili bir antioksidan olarak davranmakta ve akciğer kanseri ve diğer bazı kanser türlerinin görülme riskini azaltmaktadır [46]. Vücutta normal metabolizma sırasında veya bazı dış etkenler nedeniyle (sigara, karsinojenler, yanlış beslenme) tekli oksijen bileşikleri, peroksil radikali ($\text{ROO}^\cdot$), hidrojen peroksit radikali (H_2O_2) ve serbest radikaller oluşabilmektedir. Bu bileşikler DNA'ya zarar vererek kanser başta olmak üzere pek çok kronik hastalığa sebep olabilen bileşiklerdir. İnsan vücudunda bu bileşiklerle baş edebilmek için katalaz, peroksidaz, glutatyon peroksidaz gibi çeşitli enzimler bulunmaktadır. Bu enzimlerin etkin bir şekilde çalışması için karotenoidlerin, fenolik bileşiklerin, E ve C vitamininin ve esansiyel iz elementlerin (Se, Cu, Zn) besinler yoluyla alınması gerekmektedir [47]. Karotenoid molekülünün antioksidan özelliği doğrudan veya dolaylı olarak karotenoid molekülünün yapısıyla ve okside edilecek molekülün türüyle paralellik göstermektedir. Örneğin, likopen açık kimyasal yapısından dolayı β -karotene oranla daha kolay bir şekilde karbon merkezli radikal yapısına dönüşebilmektedir. Ksantofiller (lütein, zeaksantin) karotenoidlere kıyasla peroksit radikalleriyle savaşıma konusunda daha az etkin bileşiklerdir. Aynı zamanda bir karotenoid molekülünün antioksidan özelliği tekli oksijen moleküllerini ve serbest radikalleri yok etme yeteneğiyle

doğrudan ilişkilidir [48]. Karotenoidler serbest radikaller ile üç şekilde etkileşime girebilmektedir: Bu yollar elektron transferi, hidrojen ekleme, radikal bir yapı eklemeydir [49, 50].



Karotenoid bileşiklerinde çift bağ sayısı arttıkça antioksidan aktivite de artmaktadır. Karotenoidler arasında en güçlü antioksidan aktiviteye likopen sahipken, β -karoten ve β -kriptoksantin likopeni takip etmektedir [51].

Kısmi basınç, karotenoid miktarı gibi faktörlerde karotenoidlerin antioksidan özelliğini etkilemektedir. Düşük kısmi O_2 basıncında β -karoten peroksil radikallerinin zincirlerini kırarak antioksidan etki gösterirken, yüksek O_2 basıncında antioksidan özelliğini yitirmekte, hatta oksidasyona bağlı olarak oksidasyon hızlandırıcı etki göstermektedir [52]. α -tokoferol ise yüksek O_2 basıncında daha etkin bir antioksidan aktiviteye sahiptir. Bu iki farklı karotenoid O_2 basıncı farkından dolayı farklı dokularda antioksidan etki gösterebilir. β -karoten lipid peroksidasyonu sonucu oluşan tersiyer bütül hidroperoksite ve DNA hasarına karşı koruyucu etki de göstermektedir. β -karoten ve likopen yalnızca 1-2 μM gibi düşük dozlarda hücreleri DNA hasarına karşı korumaktadır. Bu doz 4 μM çıkarıldığında koruyucu etki azalmış, en yüksek doz 10 μM uygulandığında ise DNA hasarına karşı koruyucu etki tamamen yok olmuştur. HepG2 hücrelerinde yüksek dozda β -karoten H_2O_2 kaynaklı DNA hasarına karşı hücreleri koruma da etkinlik gösterememiştir [53].

Kanserin önüne geçilmesinde karotenoidler önemli fitokimyasal bileşiklerdir. Yeterli miktarda domates, havuç, marul, kıvırcık tüketiminin akciğer kanseri riskini azalttığı gözlenmiştir [10]. Bol miktarda vitamin A alınması ve serum veya plazma β -karoten miktarının fazla olması ile düşük akciğer kanseri riski arasında güçlü bir ilişki bulunmuştur [46]. Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda lütein ve likopenin akciğer kanserini azaltmada daha etkili olduğu saptanmıştır.

Gelişmiş ülkelerde kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türü göğüs kanseridir [54]. Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen kanıtlara göre hem provitamin A etkisi gösteren

hem de göstermeyen karotenoidler göğüs kanserinin gelişmesi ve ilerlemesinin önlenmesinde faydalı etkilere sahiptir [55, 56]. Karotenoidler hücre döngüsünün normal bir şekilde ilerlemesini, hücre farklılaşmasını düzenleyerek ve gerektiğinde hücreyi apoptoza yönlendirerek antitümör madde görevi görmektedir [54].

Kanser kaynaklı ölüm vakaları arasında gelişmiş ülkelerde ve ABD’de üçüncü sırada gelen kolon kanseri aynı zamanda kadınlar ve erkekler arasında en sık görülen dördüncü kanser türüdür [57, 58]. Hücre kültürü çalışmaları kolon kanserli hücre hatları üzerinde karotenoidlerin yararlı biyolojik etkiye sahip olduklarını ortaya koymuştur. Bu etkinin mekanizması ise karotenoidlerin antioksidan özellikleri ve hücre döngüsünü düzenleyici etkileri ile açıklanmaktadır [59, 60].

Dünyada kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türleri arasında ikinci sırada serviks kanseri gelmektedir [61]. Gözlemsel epidemiyolojik çalışmalar servikal kanserin ilerlemesi ve görülme riskini azaltmada karotenoidlerin ve meyve sebze tüketiminin faydalı bir role sahip olduğunu göstermişlerdir [54].

Erken safhalarda teşhis edilemeyen ovaryum kanseri ABD’li kadınlar arasında kansere bağlı ölüm vakaları arasında dördüncü sırada gelmektedir [57, 58]. Ovaryum kanseri ile karotenoidler arasındaki ilişkiyi gösteren vaka kontrol çalışmalarından altı tanesinde sebze ve meyve tüketiminin ovaryum kanserine karşı koruyucu etkisi olduğunu, dört tanesinde ise karotenoid tüketiminin koruyucu etkisi olduğunu saptanmıştır [62, 63].

Erkekler arasında ABD’de en sık görülen kanser türü prostat kanseridir [57, 58]. Özellikle likopenin prostat kanserinin ilerlemesini durdurucu etkiye sahip olduğu belirlenmiştir [54]. Hücre kültürü sistemlerinde likopene maruz bırakılan hücreler kontrolsüz çoğalmayı önleyici ve apoptotik etkilere sahip olmaktadır veya likopen hücrede farklılaşmayı tetiklemektedir [64]. Likopenin serum prostat spesifik antijeni (PSA) düzeyini %20 oranında azalttığı ortaya konulmuştur [10].

Kansere bağlı ölüm vakaları arasında ağız boşluğu, farinks ve larinks kanserleri de son yıllarda artış göstermektedir. Yapılan vaka kontrol ve kohort çalışmalar ile karotenoid, sebze ve meyve tüketiminin sigara kullanan kişiler gibi yüksek risk gruplarında bile bu kanser türleri için koruyucu etkisi olduğu ortaya konulmuştur [65, 66].

Beslenme yoluyla karotenoid, sebze ve meyve alımı ve serum β -karoten konsantrasyonunun artışının özafagus ve mide kanserlerinden koruyucu etkiye sahip olduğu belirlenmiştir [61, 65]. İnsan gastrik tümör hücre hattıyla (HGC 27) yapılan çalışmada likopenin güçlü antitümör etkiye sahip olduğu ve HGC27 hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir [67].

Karotenoidlerin antitümör etkisi, konneksin, faz II enzimleri, siklin, siklin bağımlı kinaz ve diğer inhibitörler gibi temel fonksiyonlarda yer alan bazı proteinlerin üretilmesinde karotenoidlerin değişikliklere sebep olmasından ileri gelmektedir. Proteinlerin üretilmesindeki bu değişiklikler karotenoidlerin ligand bağımlı nüklear reseptörler gibi transkripsiyon faktörleri sayesinde transkripsiyonda değişime neden olduğu hipotezini desteklemektedir. Karotenoidlerin transkripsiyon faktörleriyle ilişkiye girmesi hücre büyümesinin inhibe olmasını sağlamaktadır [68]. HL-60 lösemili hücre hattıyla yapılan çalışmada düşük dozda likopen ile dihidroksi vitamin D₃'ün sinerjistik etki göstererek kontrolsüz hücre çoğalmasını baskıladığı ve hücre farklılaşmasını indüklediği saptanmıştır [69]. Birçok çalışma yüksek dozda karotenoidin (20 μ M) apoptozisi tetikleyerek hücreyi ölüme götürdüğünü göstermiştir [68]. Adenokarsinoma hücre hattı ve premyelositik hücrelerle yapılan çalışmada β -karotenin hücre bölünmesini inhibe ettiği, hücre döngüsünü G₂/M fazında tuttuğu ve hücreyi apoptozise yönlendirdiği gözlenmiştir [59]. Likopenin göğüs kanserli hastalarda artış gösteren insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I) ile ilişkiye girdiği veya IGF-I miktarının kandaki seviyesini düşürdüğü saptanmıştır [68]. Aynı zamanda karotenoidler hücreler arası boşluklarda bağlantı sağlayarak hücrelerarası iletişim de rol almaktadır. İnsan kan ve dokularında bulunan temel karotenoidlerden β -karoten, kriptoksantin, zeaksantin ve lüteinin hücreler arası iletişimde oldukça etkili olduğu saptanmıştır [68]. Likopenin ise insan oral tümör hücre hattı KB-1'in çoğalmasını inhibe ettiği ve hücreler arası iletişimi güçlendirdiği ortaya çıkarılmıştır [70]. Karotenoidler karsinojenleri detoksifiye eden glutatyon peroksidaz ve glutatyon-S-transferaz gibi enzimlerin etkinliğini artırmaktadır [71, 72]. Ayrıca karotenoidler aflatoksin B1 ve benzopren gibi mutajenik ve karsinojenik bileşiklerin yok edilmesinde rol oynamaktadır [73].

Epidemiyolojik çalışmalarda elde edilen önemli bulgulardan biri de, bol miktarda sebze, meyve tüketen kişilerde koroner kalp hastalıkları ve felç dahil birçok kalp-damar hastalığı görülme riskinin düşük olmasıdır [74]. Total karotenoid, spesifik karotenoid, plazma ve

serum karotenoidleri ölçülerek yapılan bir çalışmada karotenoidlerin kardiyovasküler hastalıkları önleyici etkisi ortaya konmuştur [75]. Karotenoidler kalp ve damar hastalıklarının pek çok yoldan önüne geçebilmektedir. Antioksidan etkilerinin yanı sıra C-reaktif protein veya damar hastalıklarının diğer belirteçleri gibi enflamatuvar belirteçlerle karotenoidler arasında sıkı bir bağlantı mevcuttur. Karotenoidler enflamasyonu önleyerek de kalp damar sağlığını koruyabilmektedir [75]. Serum likopen düzeyinde azalma ile sirozlu hastalarda görülen yüksek tansiyon ve lenfatik dolaşım düzensizlikleri arasında ilişki saptanmıştır [19].

1900'lü yıllarda maymunların maküler dokusundan elde edilen sarı pigmentin spektroskopik ve kimyasal özelliklerinin $C_{40}H_{56}$ yapısında en az bir oksijen atomu içeren izopren yapılı ve bitkilerde bolca bulunan ksantofil karotenoidiyle uyum gösterdiği bulunmuştur [76]. Retinada bulunan karotenoidler uzun vadeli göz sağlığı için önemli katkılara sahiptir. Retinanın göz çukuru bölgesinde lütein ve zeaksantin 1mM oranında bulunmaktadır. Bu miktar insan vücudunun herhangi bir yerinde bulunan en yüksek karotenoid miktarıdır [76]. Epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen bulgular göz dokusundaki lütein ve zeaksantin karotenoidlerinin yaşa bağlı makular dejenerasyon, göz bozuklukları ve merkezi katarakta karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda karotenoidlerin diabetes mellitus ile beraber seyreden retinopati riskini düşürdüğü saptanmıştır [77]. Gözde az miktarda bulunan likopenin yaşa bağlı makular dejenerasyona karşı koruyucu etki göstermesi ise şaşırtıcı bir sonuçtur [45]. 372 kişiyle yapılan bir çalışmada plazma lütein miktarıyla posterior subkapsular katarakt olgusu arasında %50 oranında bir azalma saptanmış ancak vitamin C ve E, β -kriptoksantin arasında böyle bir ilişki belirlenememiştir [78].

Bakteri, hayvanlar ve insanlar ile yapılan çalışmalarda karotenoidlerin cildin ışığa duyarlılığını azalttığı veya önlediği gösterilmiştir. β -karoten ve kantaksantin ışık hassasiyetiyle ilgili bir hastalık olan eritropoietik protoporfiriyanın ve diğer ışık hassasiyetiyle ilgili hastalıkların tedavisinde oldukça etkili bileşiklerdir [79]. Bu pigmentler ışık hassasiyeti semptomlarını ortaya çıkaran hücresel hasarı engellemektedir [79]. Deride karotenoidler serbest radikalleri, tekli oksijen bileşiklerini ve diğer zararlı reaktif oksijen bileşiklerini yok ederek antioksidan etki göstermektedir [76]. Derideki karotenoid miktarıyla plazmadaki karotenoid miktarı arasında güçlü bir ilişki vardır. Sigara içenlerde içmeyenlere göre derideki karotenoid miktarı daha düşüktür [76].Yapılan gözlemsel epidemiyolojik çalışmalarda β -karoten ile beslenmenin deri kanserini önlemede rolü olduğu ortaya

çıkarılmıştır [61, 65]. Karotenoidler bazal korumayı artırabilir ve böylece deride UV ışığının hasarına karşı savunma görevi üstlenmektedir [80]. Güneşlenme gibi aşırı güneş ışığına maruz kalma durumlarında karotenoidlerin koruyucu etkisi yeterli olmamaktadır [80].

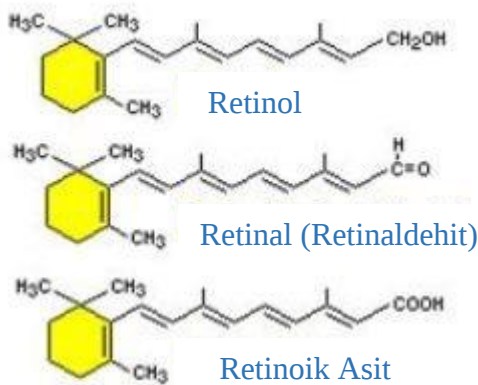
İmmün sistem bir immün cevabın oluşması için temel olarak doğru hücre-hücre iletişimine bağlı olmasından ötürü immün hücrelerin bütünlüğü gereklidir [81]. Karotenoidlerin bu hücre bütünlüğünü sağlama konusunda yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Karotenoidler reaktif oksijen bileşiklerinin hücre membranlarında ve reseptörlerde oluşturduğu hasarı azaltarak veya redoksa duyarlı transkripsiyon faktörlerinin aktivitelerini etkileyerek ve sitokin ve prostoglandinlerin üretimi ile immün hücre fonksiyonlarını düzenleyerek immün hücrelerin bütünlüğünü sağlamaktadır [81]. Ayrıca vitamin A eksikliği viral hastalıklara sebep olabilmektedir.

Ayrıca domateste bol miktarda bulunan likopenin osteoblast hücrelerinde hücre farklılaşmasında ve gelişmesinde uyarıcı etkilere sahip olduğu ve osteoklast şekillenmesinde görev aldığı saptanmıştır [10]. Vitamin C, E ve β -karoten osteoporozun gelişimini yavaşlatmaktadır. Ayrıca likopenin spermleri oksidatif hasardan koruduğu sperm kalitesini artırdığı gözlenmiştir [19]. Likopen kan-beyin bariyerini geçebilmektedir. Serum likopen konsantrasyonuyla Alzheimer, parkinson, vasküler demans hastalıkları arasında sıkı bir ilişki olduğu saptanmıştır [19]. Düzenli olarak domates tüketmeyle çocuklar başta olmak üzere insanlarda solunum yolu enfeksiyonları ve ishale bağlı ölüm vakalarında %48'lik bir azalma sağlanmıştır [82]. Likopen tüketiminin amfizeme karşı koruyucu etkisi olduğu Japonlar üzerinde gösterilmiştir [19]. Bunun dışında Avusturya Kriz Önleme Merkezi tarafından yapılan bir çalışmada serum α - tokoferol ve likopen düzeylerinin düşmesiyle mikroanjiyopati riskinde artış saptanmıştır. Zeaksantin ise lipogenezi inhibe ederek, hücrelerarası lipid içeriğini, adiposit büyüklüğünü ve yağ ağırlığını azaltarak obeziteyi önlemektedir [83]. Diyabetik ratlarda L-karnitin ve lütein karışımıyla yapılan tedavide yağ asitlerinin ve diyabetin yıkıcı etkileri iyileştirilmiştir [84]. Fazla yağlı besinlerle beslenen farelerle yapılan çalışmada likopenin IL-1 β , TNF α ve CRP seviyelerinin artmasını engellediği ve insülin direncine karşı yararlı etkileri olduğu saptanmıştır [85].

2.1.4. Karotenoidlerin emilimi ve günlük kullanım miktarları

Karotenoidler beslenme yoluyla alındıktan sonra gıda yüzeyinden serbest hale geçmektedir. Midede daha küçük lipid molekülleri haline gelen karotenoidlerin asıl sindirimi ince bağırsağın duodenum kısmında pankreatik lipaz enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. Karotenoidler yağda çözünen hidrofobik bileşikler olduğu için sindirimleri sırasında safra tuzlarına ihtiyaç vardır [12]. Safra tuzları karotenoidlerin emilimine ve A vitaminine dönüşmesine yardımcı olmaktadır.

İnsanlarda gıda yoluyla alınan karotenoidlerin yaklaşık olarak %5-50'si emilebilmektedir. Bu miktar diğer vitamin ön maddelerinin emiliminden daha azdır. Karotenoidlerin emilimini diyetle yağ asitlerinin, proteinin varlığı ve safra tuzlarının bulunması etkilemektedir. Fazla miktarda karotenoid tüketimi emilimi azaltmaktadır. Bunlar dışında gastrik pH, gıdadaki A vitamini miktarı ve A vitamininin konumu, genetik faktörler, yaş, cinsiyet gibi faktörler karotenoidlerin emilimini etkilemektedir [43]. Bazı gıda katkı maddeleri ve α -tokoferol de karotenoidlerin emilimini etkileyebilmektedir [10]. Bağırsak parazitlerinin varlığında karotenoidlerin emilimi yeterince olmamakta ve A vitamini yetersizliğine bağlı olarak gece körlüğü, kseroftalmi, kemik bozukluğu ve bazı metabolik bozukluklar ortaya çıkabilmektedir [10]. Karotenoidler insan, sığır ve maymun gibi canlılarda bağırsak mukozasında emildikten sonra bir kısmı A vitamininin öncül formu retinale dönüşürken bir kısmı da değişmemiş halde periferel dokularda ve dolaşımda bulunabilmektedir. Retinal ise yağ asitleri varlığında retinole dönüşmekte hücrelerde ise A vitamininin aktif formu retinoik aside çevrilmektedir (Resim 2.1.) [86]. Retinol üremde, retinal görmede, retinoik asitse büyüme ve farklılaşmada görev almaktadır. Retinol hemen retinil esterlere dönüşmektedir.



Resim 2.1. A vitamininin vücuttaki formları [87, 88]

İlk zamanlarda β -karotenin karaciğerde A vitaminine dönüştüğü düşünülürken daha sonra özdeş iki ratla yapılan çalışmada ^{14}C radyoaktif atomuyla işaretlenmiş β -karoten intraperitoneal olarak ratlara verilmiş radyoaktif retinal, retinol ve A vitaminine incebağırsakta rastlanmıştır [43]. β -karotenin A vitaminine dönüştüğü temel kısım incebağırsak olmasına karşılık, karaciğer, testis ve diğer dokulardan bazıları da alternatif olarak görev yapabilmektedir. Bağırsak hücrelerine pasif difüzyonla alınan karotenoidler şilomikron halinde lenf damarlarıyla karaciğere getirilmekte ve burada az miktarda çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL) ile çoğunlukla da düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL) ile tekrar dolaşıma verilmektedir. Bağırsak hücrelerinde retinole dönüştürülen karotenoidler retinil esteri olarak şilomikronlara yüklenmektedir. Karaciğerdeki sitokrom P450 enzimleri retinolün ve retinoik asidin polar metabolitlere yıkımında görev yapmaktadır [20].

Vücutta karotenoidlerin emiliminden sonraki en önemli adım provitamin A karotenoidlerin A vitaminine dönüşmesi olayıdır. Karotenoid molekülü emilimin ardından merkezindeki 15,15' çift bağından 15,15' monooksijenaz enzimi tarafından ikiye ayrılmaktadır. Bu yolla A vitamini oluşturmak merkezi kırılma olarak adlandırılmaktadır. Merkezi kırılma yöntemiyle 1 mol β -karotenden 2 mol retinal oluşmakta iken, α -karotenden ve γ -karotenden 1 mol retinal oluşmaktadır [43]. Bu durum α -karoten ve γ -karotenin β -karotenin yarısı kadar provitamin A aktivitesine sahip olduğu bulgularını desteklemektedir. Bu yöntem alternatif olarak ekzantrik kırılmada ise karotenoid molekülü bir ucundaki polien zincirden progresif bir ayrılma ile farklı zincir uzunluklarına sahip birkaç tane β -apokarotenoid molekülü oluşturmakta ve sonuçta 1 molekül vitamin A ortaya çıkmaktadır [43]. Ayrıca karotenoidler serbest radikaller tarafından üretilen lipooksijenaz enzimi tarafından yıkılabilmektedir. Linoleik asit veya linoleik asit hidroperoksit varlığında β -karoten lipooksijenaz tarafından rastgele olarak parçalanmaktadır [43].

Diyet yoluyla veya karotenoid açısından zengin besin kaynaklarının tüketilmesiyle vücutta alınan karotenoidlerin emiliminin ardından kandaki karotenoidler lipoproteinler halinde birirmektedir. Kandaki lipoprotein konsantrasyonu %100'e ulaşabilmektedir. Bu konsantrasyon artışı lipoprotein bulunduran deri, karaciğer, adipoz, beyin, testis, böbrek, akciğer, prostat gibi dokularda karotenoidlerin alınmasını ve depolanmasını sağlamaktadır [89]. İnsan plazmasında bulunan karotenoidlerin %90'dan fazlasını β -karoten, likopen, β -

kriptoksantin, lütein ve α -karoten oluşturmaktadır. Bunun dışında zeaksantin, β -karoten ve likopenin farklı izomerleri bulunmaktadır (Çizelge 2.6.).

Çizelge 2.6. İnsan kan plazmasındaki bazı karotenoid türlerinin konsantrasyonları ($\mu\text{mol/L}$) [90]

Karotenoid	Genç Erkek	Genç Kadın	Yaşlı Erkek	Yaşlı Kadın
Lütein	0,22 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,03	0,38 $\pm$ 0,05	0,25 $\pm$ 0,03
Lütein izomerleri	0,06 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,01
α -karoten	0,09 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,07	0,20 $\pm$ 0,04
All-trans β -karoten	0,44 $\pm$ 0,07	0,80 $\pm$ 0,17	1,51 $\pm$ 0,41	0,78 $\pm$ 0,10
Kriptoksantin	0,34 $\pm$ 0,03	0,54 $\pm$ 0,09	1,04 $\pm$ 0,24	0,54 $\pm$ 0,11
All-trans likopen	0,38 $\pm$ 0,05	0,37 $\pm$ 0,06	0,41 $\pm$ 0,06	0,28 $\pm$ 0,02
Zeaksantin	0,03 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,00
13-cis- β -karoten	0,03 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,01
13-cis-likopen	0,12 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,01
9-cis-likopen	0,07 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,00

İnsan kan plazmasındaki β -karotenin neredeyse tamamı all-trans formdayken, total plazma likopen miktarının %50'si cis likopen izomerleridir [31]. Cis-likopen organik çözücülerde daha çözünür olduğu için kolayca emilebilen ve şilomikron halinde taşınabilen izomerlerdir. Cis-likopen genellikle serum ve diğer dokularda birirmektedir. Testis, ovaryum, adrenal bezler, karaciğer ve meme dokusunun vücuttaki diğer dokulardan daha fazla likopen içerdiği bulunmuştur [10]. Doku ve dolaşımdaki karotenoid miktarlarına bakıldığında, all-trans β -karotenin daha çok dolaşımda, cis β -karotenin ise daha çok çevre dokularda bulunduğu saptanmıştır [10]. Bu durum ise sebze ve meyve tüketimiyle değişkenlik gösterebilmektedir.

Karotenoidler insanda kan plazması dışında anne sütü ve serumda bol miktarda bulunmaktadır. Doğumdan sonra salgılanan ilk sütteki sarı renk süt yağlarıyla birlikte bulunan karotenoidlerden kaynaklanmaktadır. İlk süt salımı boyunca anne sütündeki karotenoidlerin %50'si β -karoten, β -kriptoksantin, α -karoten gibi provitamin A karotenoidlerinden oluşmakta ve bu karotenoidler bebeğin vitamin A ihtiyacının önemli bir kısmını karşılamaktadır [91].

Vücutta ihtiyaç duyulmadan β -karoten retinale dönüşmemekte veya aktivitesi düşük olmaktadır (Çizelge 2.7.). Alınan β -karotenin ortalama olarak %33'ü A vitaminine dönüşmektedir. Gıdalardaki A vitamini değerlerini ve provitamin A özelliğine sahip karotenoidlerin A vitamini aktivitelerini ifade etmek için Amerikan Ulusal Araştırma Konseyi tarafından retinol eşdeğeri (RE) hesaplanmıştır. β -karotenin A vitamini aktivitesi 1/6 retinole eşdeğer iken α -karoten ve β -kriptoksantin bunun yarısı kadar retinole eşdeğerdir.

Çizelge 2.7. İnsanlar için günlük önerilen β -karoten ve bazı vitamin miktarlarının yaşa ve cinsiyete göre dağılımı [10]

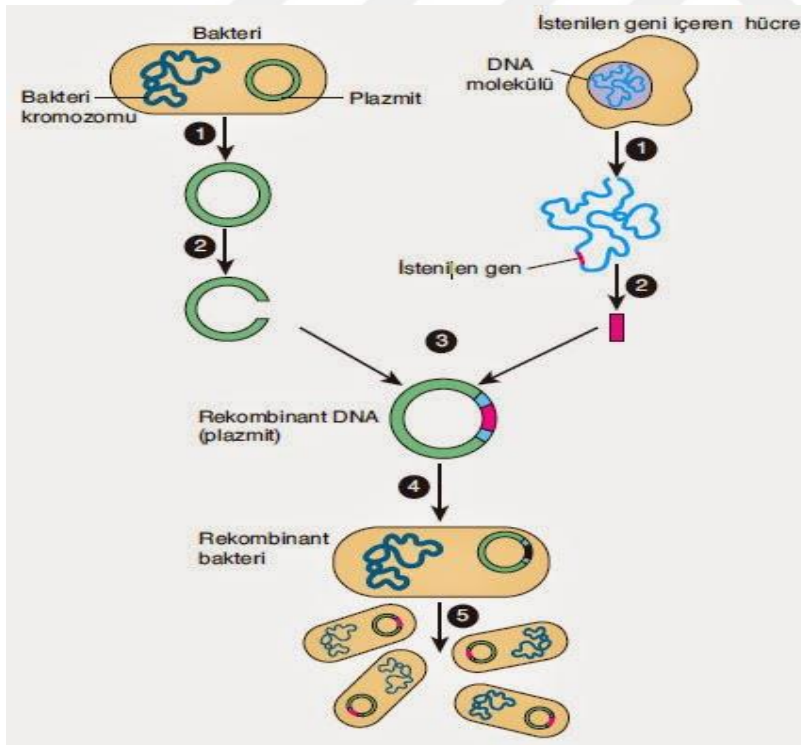
Vitamin	Erkek			Kadın		
	20-39 yaş	40-59 yaş	≥ 60 yaş	20-39 yaş	40-59 yaş	≥ 60 yaş
β -karoten (RE)	377 $\pm$ 36,4	537 $\pm$ 51,4	559 $\pm$ 47,3	522 $\pm$ 69,0	554 $\pm$ 47,3	507 $\pm$ 34,2
VitaminA (RE)	878 $\pm$ 40,6	1115 $\pm$ 80,2	1117 $\pm$ 61,5	961 $\pm$ 74,4	945 $\pm$ 52,8	997 $\pm$ 58,5
VitaminC (mg)	102 $\pm$ 4,5	107 $\pm$ 6,0	110 $\pm$ 7,5	85 $\pm$ 5,9	91 $\pm$ 5,3	99 $\pm$ 3,8
VitaminE (mg)	10,4 $\pm$ 0,47	10,4 $\pm$ 0,44	9,2 $\pm$ 0,45	8,2 $\pm$ 0,32	9,1 $\pm$ 0,41	7,6 $\pm$ 0,24

Besinlerle alınan karotenoidler içinde en fazla paya 3 mg/gün ile likopen sahipken, onu 2-3 mg/gün ile β -karoten ve lütein takip etmekte, ardından da β -kriptoksantin ve α -karoten gelmektedir [78]. Besinlerle alınan likopenin %10-30'u kadarı emilebilmektedir. Karotenoid tüketimi toplumlar arasında gıda hazırlama, işleme, pişirme kültürlerinin farklılıkları ve mevsime bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir [20]. Japonya, Malezya, İspanya gibi ülkeler karotenoid tüketiminde başı çekmektedir.

Yüksek dozda karotenoid alınması ise derinin stratum korneum tabakasında karotenoid birikmesi sonucu derinin sarımsı bir renk almasına sebep olabilmektedir. Bu duruma karotenoderma adı verilmektedir. Karotenoidler de A vitamini gibi yağda çözünen bileşikler olduğu için idrarla atılamamakta ancak dışkı yoluyla atılmaktadır. Yağda çözünen vitaminlerin fazlası karaciğerde depolanırken aşırı miktarda alımı zehir etkisi yaratabilmektedir. Hamilelerde ise A vitamini alımına dikkat edilmekte günlük dozun 6 mg'ı geçmemesi gerekmektedir. Bunun yerine β -karoten kullanabilmektedir. Yüksek miktarda havuç veya havuç suyu tüketmek (1 kg/gün) adet düzensizliklerine ve kanda nötrofil lökositlerinin aşırı azalmasına yol açabilmektedir. Sigara kullananlarda, alkol bağımlılarında bol miktarda β -karoten alımına bağlı olarak akciğer kanseri görülme oranında artış saptanmıştır. Sigara ve alkol kullananlar da β -karoten alımı P450 enzimlerini indükleyerek, retinoik asidin sinyalizasyon mekanizmasını bozarak ve RAR β geninin ifadesini değiştirerek akciğer, karaciğer ve diğer dokuları etkilemektedir [92]. Epidemiyolojik çalışmalar sadece sebze ve meyve tüketiminin plazmadaki karotenoid seviyesini düşürdüğünü, dolayısıyla kanser, yaşa bağlı makular dejenerasyon, kalp-damar hastalıkları, bağışıklık sisteminin zayıflaması gibi durumlara yol açtığını göstermiştir [41].

2.2. Metabolik Mühendislik

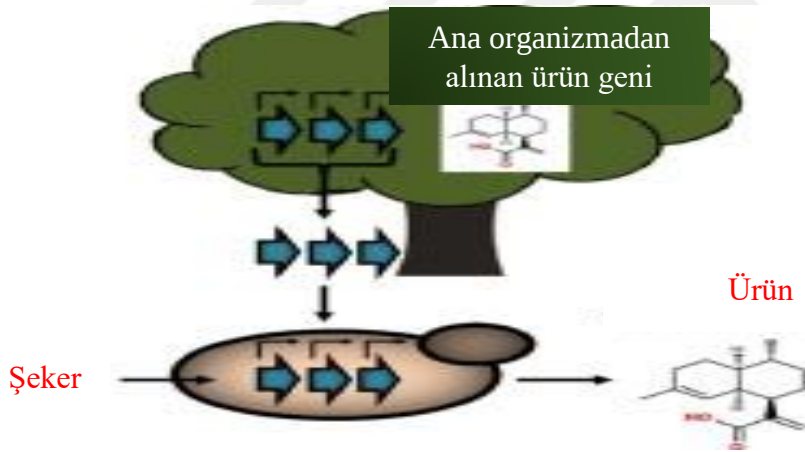
Metabolik mühendislik ilk kez 1991 yılında Mikrobiyoloji dergisinde tanımlanmış genetiğin bir yan dalıdır [3]. Sanayi uygulamalarına yönelik bazı canlıların metabolik yollarının manipüle edilmesi olan metabolik mühendislik rekombinant DNA teknolojisine dayanmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi çok sayıda DNA parçasını tek bir DNA da birleştirme işlemidir. Rekombinant DNA teknolojisi temelde DNA'yı kesme, ligasyon, transformasyon, plazmid izolasyonu, PCR gibi araçları kullanmaktadır. Klonlama da rekombinant DNA teknolojisinde sık kullanılan işlemlerdendir. Rekombinant DNA oluşumunda ilk olarak istenilen gen bölgesi ana organizmadan restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmekte, vektör olarak kullanılacak plazmid de aynı enzimle kesildikten sonra istenilen gen plazmide aktarılmaktadır. Bu elde edilen DNA, rekombinant DNA veya kimera olarak anılmaktadır. Elde edilen rekombinant DNA bakteri gibi kolay çoğalan bir canlıya verilir ve istenilen genin ürününden çok sayıda elde edilmiş olur (Resim 2.2) [93]. İnsülin, büyüme hormonu gibi insan için önem arz eden maddeler bu yolla üretilen ilk ürünlerdendir.



Resim 2.2. Rekombinant DNA oluşturma basamakları [94]

Metabolik mühendisliğin temel amacı, biyoteknolojik işlemlerle üretim kapasitesini artırmak, hücre özelliklerini değiştirerek toplam verimi artırmak, çevre koşullarını spesifik olarak genetik kontrol altına almaktır (Resim 2.3.). Belirli sorunları çözmek için büyük

entegre sistemlerde bazı cihazların monte edilmesi, kullanılan model organizmalarda metabolik yolağın daha aktif hale gelmesi için genetik düzenlemeler yapılması sıklıkla kullanılan metodlardır. DNA'nın yapısı, sistem biyolojisi ve canlılardaki metabolik yolakların mekanizmasının iyice anlaşılması ve sentetik biyolojideki ilerlemeler sayesinde metabolik mühendislik de gelişmiştir. Bu bilim dallarındaki ilerlemeler sayesinde bir ürünü elde etmek için bazı canlılar fabrika hücre haline getirilmiştir [95]. Fabrika hücreler metabolik mühendislik ve sentetik biyoloji kullanılarak oluşturulmakta veya dizayn edilmektedir. Bu iki bilim dalı hücresel fenotipin tahmin edilebilmesi için kantitatif ve model organizmaya bağlı aynı biyomühendislik yöntemlerini kullanmaktadır [96]. Ayrıca metabolik mühendislik metabolik yolakların akışını etkileyebilen enzimatik reaksiyonların aktivitesini değiştirebilen genetik modifikasyonları kullanmaktadır. Bu genetik modifikasyonlar gen silinmesi, yabancı DNA'yı kodlayan rekombinant DNA kasetinin verilmesi veya genin yeri değiştirilerek ifadesinin değiştirilmesi şeklinde gerçekleştirilebilmektedir [95].



Resim 2.3. Metabolik mühendislikle ana organizmadan alınan genin model organizmada ifade edilmesiyle istenilen ürünün elde edilmesi [3]

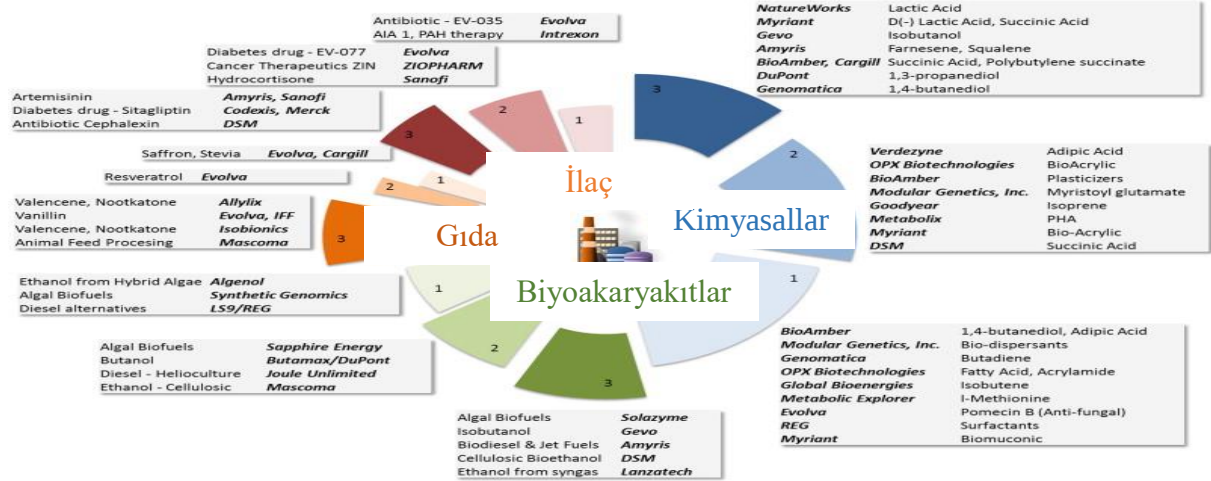
Metabolik mühendislik metabolik yolakların iyi bir şekilde analiz edilmesini de gerektirmektedir. Metabolik mühendislik daha çok bir fabrika hücrenin veriminin artırılması, iyileştirilmesi gibi bir amaca sahipken, sentetik biyoloji yeni baştan fabrika hücre oluşturmayı hedeflemektedir.

2.2.1. Metabolik mühendisliğin kullanım alanları

İklimsel değişikliklerin temel sebeplerinden biri olarak görülen fazla akaryakıt tüketimine bağlı olarak alternatif ve çevre dostu akaryakıt kaynaklarının üretilmesi ihtiyacı hissedilmektedir. Aynı zamanda farklı mevsimlerde olgunlaşan bitkilerden masraflı ve zor koşullarda elde edilen kozmetik ürünlerini, ilaçları, gıda renklendiricilerini, besin kaynaklarını elde edebilmek için alternatif yöntemlere ihtiyaç vardır. Örneğin, kanser tedavisinde kullanılan bir ilaç olan taksolün 130 kg'ı için 1000 ton porsuk ağacı kabuğu kullanılmakta yani 500 000 porsuk ağacının kesilmesi gerekmektedir. Metabolik mühendislik yoluyla ana organizmadan bu değerli ürünleri kodlayan genler alınarak çeşitli genetik modifikasyonlar yapılmış model organizmalara aktarılmakta, daha ekonomik, daha kolay ve daha fazla miktarlarda istenilen ürün elde edilebilmektedir. Eski zamanlarda bitkiler gibi kompleks canlılardan elde edilen pek çok bileşik bugün metabolik mühendislik sayesinde bakteriler ve mayalar gibi basit canlılardan elde edilebilmektedir [95].

Birçok biyoteknoloji şirketi ve kimyasal madde üretimi yapan şirket, laboratuvarlarda üretilen başarılı araştırmaları destekleyerek endüstriyel üretime geçmektedir. Bu üretimler ise daha çevre dostu, daha ekonomik ve klasik kimyasal yöntemlerle üretilen ürünlerden daha üstün özelliklere sahip kimyasalları tercih eden tüketiciler tarafından desteklenmektedir [95]. Endüstriyel biyoteknoloji ve biyomühendislikteki son yıllarda yaşanan gelişmeler ve başarılı yeni uygulamalar *beyaz biyoteknoloji* olarak adlandırılan bir dalın gelişmesine yardımcı olmuştur. Beyaz biyoteknoloji çeşitli yararlı kimyasallar üretilmesinde organizmaların kullanılması veya bazı zararlı, toksik maddelerin yok edilmesinde farklı organizmaların kullanılmasıdır. Faydalı kimyasal bileşiklerin endüstriyel olarak üretilmesi metabolik mühendislik yoluyla üretilen fabrika hücrelere olan bağımlılığı artırmaktadır [95].

Metabolik mühendislik kimyasal madde, akaryakıt, gıda ve eczacılık gibi geniş bir endüstriyel sektör yelpazesini etkileyebilen bir bilim dalıdır (Resim 2.4). Bu ürünlerin üretilmesinde üç temel safha bulunmaktadır. İlk olarak ürün laboratuvarlarda model organizmalardan küçük ölçeklerde elde edilmekte, daha sonra pilot uygulaması yapılmakta ve en son olarak da büyük ölçeklerde endüstriyel olarak üretilmektedir [95].



Resim 2.4. Metabolik mühendisliğin kullanıldığı endüstri dalları [95]

Metabolik mühendislikteki sürekli gelişmelerin fabrika hücrelerin üretilmesine ve kullanılmasına olan ilgiyi daha da artıracakı düşünülmektedir [95].

2.2.2. Metabolik mühendislikte kullanılan model organizmalar ve elde edilen ürünler

Metabolik mühendislikte kullanılan canlılar *fabrika hücre* adını almaktadır. Bir canlının fabrika hücre olarak kullanılabilmesi için yüksek osmotik toleransa sahip olmak, çevreye az zararlı olmak, geniş pH toleransına sahip olmak, genetik olarak kolay manipüle edilebilmek, geniş bir veri tabanına sahip olmak gibi özellikleri taşıması gerekmektedir. Bir fabrika hücrenin performansı titre, verim, üretkenlik gibi kimyasal üretim ölçütlerine bağlı olarak belirlenir [95]. Metabolik mühendislikte sıklıkla kullanılan fabrika hücreler *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae*'dir. Bu mikrobiyal fabrika hücreler bitki hücre kültürleriyle kıyaslandığında daha hızlı bir şekilde çoğalmaktadır. Bu durum metabolik mühendislik çalışmalarında mikrobiyal fabrika hücreleri tercih eden araştırmacılara kolaylık sağlamaktadır. *E.coli* metabolik mühendisliğin temelini oluşturan prensiplerin geliştirilmesinde, ticari amaçlı kimyasal madde üretiminde kullanılmış ve akademik camiada en çok çalışılmış bir türdür. Bu gram negatif bakteri türü insan ve diğer omurgalıların kalın bağırsağında yaşamakta, genetik olarak kolaylıkla manipüle edilebilmektedir. *E.coli* genomu dizilenen ilk organizmalardanır. *E.coli* günümüzde genellikle farklı organizmaların genlerinin klonlanmasında ve protein sentezinde, ayrıca genetik mutasyon oluşturulmuş kütüphanelerin üretilmesinde kullanılmaktadır [97]. *E.coli* karotenoid üretebilen bir canlı olmamasına rağmen son yıllarda metabolik mühendislik sayesinde karotenoid üretiminde de kullanılmaktadır. β -karoten ketolaz (crt W) ve β -karoten

hidroksilaz (crt Z) genlerinin *E.coli*'ye verilmesiyle birlikte antioksidan özelliği yüksek bir karotenoid olan astaksantinün üretimi sağlanmıştır [98].

Ayrıca *E.coli*'de β -karoten, likopen, zeaksantin, hidroksi yağ asitleri ve serbest yağ asitlerinin sentezi gerçekleştirilmiştir. Düşük pH toleransı sayesinde kolay kontamine olmayan *Saccharomyces cerevisiae*'de sıklıkla kullanılan fabrika hücrelerdendir. Yüksek derecede homolog rekombinasyon yeteneğine sahip olmasına bağlı olarak gen kasetlerini kolayca genomuna alabilmektedir [95]. Hidrokortizon *Saccharomyces cerevisiae*'de metabolik mühendislik yoluyla üretilen ilk üründür. Biyoplastik yapımında kullanılan D-laktik asit de metabolik mühendislik yoluyla üretilen maddeler arasındadır [95]. Farnesen, izobütanol, bisabolen gibi biyoyakıt ve dizel üretiminde kullanılan bileşikler, squalen gibi kişisel bakım ürünlerinde kullanılan maddeler ekmek mayasında üretilen diğer ürünlerdir. Ayrıca *Saccharomyces cerevisiae* β -karoten, astaksantin gibi karotenoidlerin, monotermen, sesquiterpen gibi bitkisel izoprenoidlerin, bütirik asit, 1-heksadekanol gibi yağ asidi alkollerinin, biyofarmasötik proteinlerin üretiminde fabrika hücre olarak kullanılmıştır (Resim 2.5.).



Resim 2.5. Metabolik mühendislik yoluyla *S.cerevisiae*'den elde edilen ürünlerden bazıları [99]

E.coli ve *S.cerevisiae* dışında denizlerde yaşayan bir alg türü olan *Dunaliella salina*'da yüksek miktarda astaksantin ve diğer ketokarotenoidlerin üretiminde önemli bir yere sahiptir

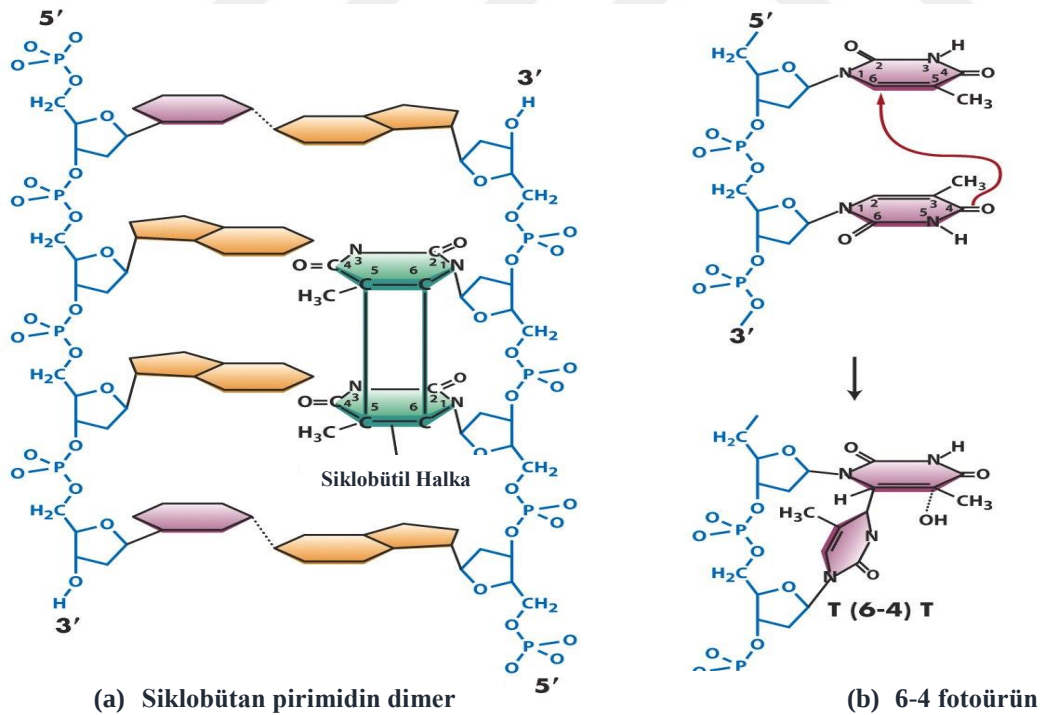
[100]. *Chlamydomonas reinhardtii* ve *Haematococcus pluvialis* karotenoid üretimi yapılan diğer alg türlerindendir.

Fabrika hücreler dizayn, inşa ve defalarca test edilme aşamalarından geçerek ortaya çıkarılmaktadır. Dayanıklılık gibi istenilen özelliklere sahip bir platform suşun seçilmesinin ardından dizayn aşamasında bu suşa istenilen özellikleri verecek istenilen ürünün oluşturulmasını sağlayacak genler platform suşa aktarılır [95]. Dizayn aşamasında metabolik yolak tamamen baştan inşa edilebilmekte veya yolakta görev alan genlerin ifadesini etkileyen genetik manipülasyonlar yapılabilmektedir [95]. Dizayn aşamasında, rastgele mutasyon, gen ifadesinin ve enzimlerin optimizasyonu, hücrenin fizyolojisinin optimizasyonu ve hücrenin dekore edilmesi gibi işlemler gerçekleştirilmektedir. Bu işlemler gerçekleştirilirken UV veya kimyasallarla rastgele mutasyon oluşturma, yüksek verimli klonlama, glikozilasyon gibi araçlar kullanılmaktadır [95]. Laboratuvarda dizayn edilen suş defalarca test edilip küçük ölçekte laboratuvar üretiminin ardından fermentörde büyük ölçekte üretime geçilmektedir.

Model organizmalardan fabrika hücre yaratma çalışmaları sırasında kompleks özelliklerin bu organizmalara kazandırılması gibi zorluklarla karşılaşılmasına bağlı olarak model organizma olmayan canlılardan fabrika hücre yapma girişimlerinde bulunulmuştur. Fotosentetik ve metanotrofik organizmalar karbon kaynağı olarak doğalgazı ve karbondioksidi kullandıkları için fabrika hücre olarak işlev görmeleri araştırmacılar için avantajlı bir durumdur.

Temiz enerji kaynakları, etkili ilaçlar ve aşılar, uzun ömürlü, herbisitlere karşı daha dayanıklı sebze ve meyveler, çevre temizliği ve geri dönüşüm sistemleri metabolik mühendislikle üretilmeye çalışılan diğer ürünlerdir. Metabolik mühendislik çalışmaları yalnızca istenilen ürünlerin konsantrasyonunu artırmamakta aynı zamanda ürünün ticari ve besinsel değerini artırmaya yarayan farklı canlılara ait metabolik yolları da kullanılabilir hale getirmektedir. Örneğin; şikimik asit, mevalonat ve non mevalonat yolağı terpenoidler, alkaloidler, flavonoidler ve antosiyanin gibi farklı sınıflarda bulunan bileşiklerin sentezlenmesinde görev almaktadır [101]. Bu bileşikler yapısal olarak çok farklılık göstermelerine rağmen, farmasötik, nutrasötik, parfüm, tatlandırıcı, boya ve pestisit üretiminde aynı derecede ticari öneme sahip bileşiklerdir.

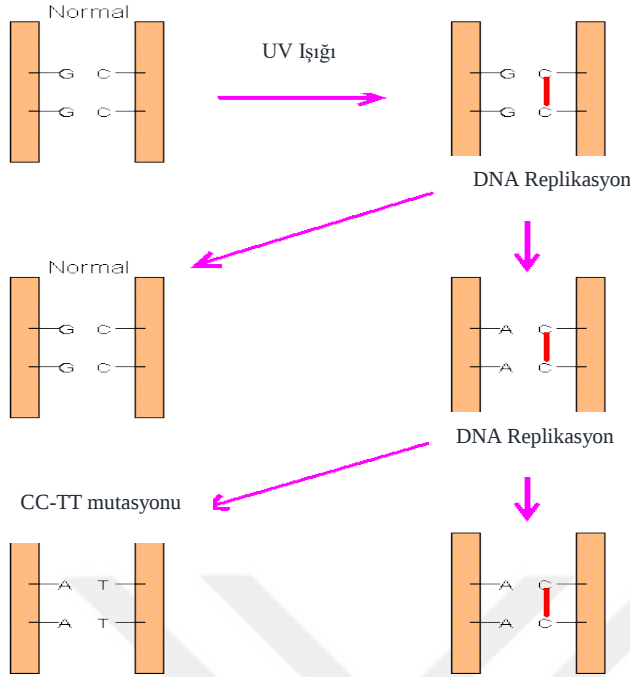
solar sistemden gelen UV'dir. UV ışığı dalga boylarına göre üç sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar UVA (320-400nm), UVB (290-320nm), UVC (200-290 nm)'dir [103]. UVB özellikle deride karsinojen etkisi yaratmaktadır. DNA'nın genetik materyal olarak kabul edilmediği yıllarda UV'nin hücrede letal etkiler yaratabildiği saptanabilmiştir. UV'nin etkisiyle DNA'da genellikle aynı iplikte siklobütan pirimidin dimeri ve 6-4 pirimidin pirimidon fotoürünü oluşmaktadır (Şekil 2.4.). DNA'nın doğrudan absorbe ettiği UV ışınının dalga boyu DNA'da hasar oluşturma da etkili bir faktördür. Genellikle 260 nm en yüksek siklobütan pirimidin dimeri ve 6-4 pirimidin pirimidon fotoürünün görüldüğü dalga boyudur [103]. Siklobütan pirimidin dimeri ve 6-4 pirimidin pirimidon fotoürünü genellikle DNA'da birikerek UV'ye bağlı mutasyonların oluşmasına neden olmaktadır [104]. Siklobütan pirimidin dimeri oluşumu sırasında UV dört üyeli siklobütıl halkası oluşumu için aynı DNA zincirindeki komşu pirimidinler arasında 5,6 nolu karbonların çift bağı üzerinde harekete geçerek siklobütan pirimidin dimeri oluşumunu teşvik etmektedir. 6-4 pirimidin pirimidon yapısı iki komşu pirimidinin C-6 ve C-4 atomları arasında oluşmaktadır. Çoğunlukla 5' CC 3' ve 5' TC 3' şeklinde gerçekleşmektedir [104].



Şekil 2.4. UV'nin DNA'da oluşturduğu hasarlardan siklobütan pirimidin dimeri ve 6-4 pirimidin pirimidon fotoürünün oluşumu [104]

UV tarafından dimerin 3' pozisyonunda fotoürünlerin karşısına yanlış bazlar eklenmektedir. Pirimidin dimerleri heliks yapısını bozmakta ve SOS sistemini aktifleştirmektedir. SOS

sistemi hücrede ağır mutasyonlar varlığında hücrenin apoptozdan kurtulmak için etkinleştirdiği bir sistemdir. SOS genleri özellikle DNA'nın replikasyonunu durduran etkenler tarafından aktifleştirilmektedir. UV'nin DNA'da oluşturduğu mutasyonlar arasında C-T transisyonu en sık rastlanandır ancak transversiyon, çerçeve kayması, büyük duplikasyonlar ve delesyonlarda oluşabilmektedir. Riboflavin, triptofan ve porfirin gibi bazı küçük moleküller tarafından oluşturulan serbest oksijen radikalleri radyasyona maruz kalmış hücrelerde UV'nin etkisiyle oksidatif strese de neden olabilmektedir. Serbest oksijen radikalleri DNA'da 8-hidroksiguanin ve timin glikol oluşumu veya zincir kırıkları gibi hasarlara sebep olmaktadır [105-107]. Serbest oksijen radikalleri hücrede DNA sentezinde kullanılan nükleotid havuzundaki nükleotidleri oksitleyerek 8-hidroksideoksiguanozin-trifosfat (8OH-dGTP) gibi nükleotidlerin oluşumunu etkilemektedir. Bu şekilde oluşan oksidatif DNA ve nükleotidler mutajen olarak tanımlanmaktadır. UV'den kaynaklanan kanser ile ilgili genlerdeki mutasyonlar DNA replikasyona girmeden önce onarılmamaktadır. Bu nedenle DNA onarım mekanizmaları UV'nin mutajenik etkisinin önüne geçilmesinde önemli bir faktördür. Xeroderma pigmentosum ve Cockayne sendromu gibi bazı genetik hastalıklarda DNA onarım mekanizmaları hasarlı olduğu için UV ışığına karşı aşırı hassasiyet söz konusu olabilmektedir. Cilt kanseri gibi bazı hastalıklarda ise UV tarafından oluşturulan pirimidin dimerlerini saptayıp DNA onarım mekanizmalarını aktifleştiren p53 ve p16 tümör baskılayıcı genlerde mutasyon söz konusudur. Bu genlerde mutasyon olması durumunda DNA'daki pirimidin dimerleri düzeltilememekte, DNA replikasyonu hatalı bir şekilde gerçekleşmekte, bu da yavru hücrelere hatalı DNA aktarılmasına sebep olmaktadır (Şekil 2.5.) [93].



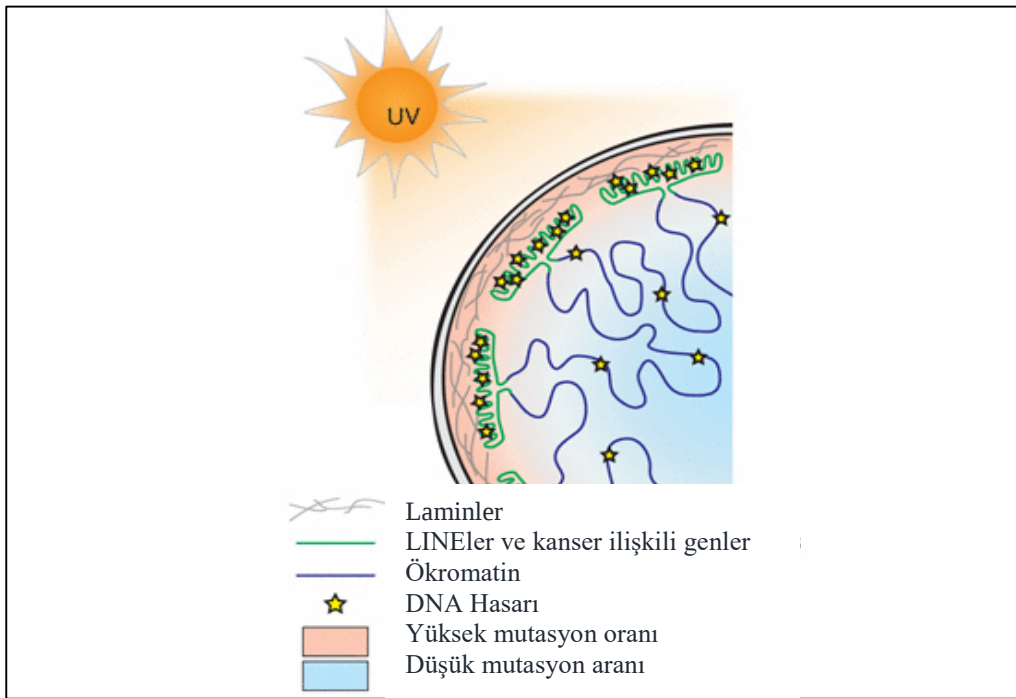
Şekil 2.5. UV tarafından oluşturulan mutasyonun yavru hücrelere aktarılması [108]

UV maruziyetinden sonra hücrede guaninin adeninle transisyonu, sitozinin timinle transisyonundan daha fazla görülen bir durumdur. *E.coli* hücrelerinde 6-4 pirimidin pirimidon fotoürünü daha sık görülürken, memeli hücrelerinde pirimidin dimerleri daha çok görülmektedir. UV'den kaynaklı pirimidin dimerleri genelde DNA'da sıcak bölge olarak bilinen yerlerde yoğun olarak bulunmaktadır. UV genellikle DNA'da birbirine komşu olan iki pirimidini etkilemektedir.

UV türleri DNA'da farklı hasarlara yol açabilmektedir. UVB daha çok deri hücrelerinde siklobütan pirimidin dimerleri ve 6-4 pirimidin pirimidon fotoürününün oluşumunu tetiklemektedir. Memeli hücreleri için siklobütan pirimidin dimerleri en büyük mutajenik etkiye sahiptir. Çünkü siklobütan pirimidin dimerleri DNA'nın yavaş onarılmasına, onarım esnasında mutasyonlu bölgelerin atlanılmasına sebep olabilmektedir [109-111]. DNA'da oluşan siklobütan pirimidin dimerlerinin %80'i UVB tarafından oluşturulmaktadır. UVA'nın ise daha çok DNA'da hasar oluşturan serbest oksijen radikallerinin oluşumunu indüklediği bilinmektedir. Ayrıca UVA'nın kemirgen hücrelerinde siklobütan pirimidin dimerlerinin oluşumunu etkilediği bulunmuştur. UVA hücrede flavin içeren oksidazları aktive ederek veya demir depo proteininden serbest demir iyonlarını salarak H_2O_2 oluşumunu da tetiklemektedir [112]. Guanin timin arasında transversiyon UVA etkisinde sıklıkla görülmektedir. Guanin adenin ve sitozin timin transisyonları da görülebilmektedir.

Tekli delesyon ve insersiyonlar UVA etkisinde en az görülen mutasyon çeşitleridir [112]. UVB ise UVA'dan daha fazla guanin adenin ve sitozin timin dimerlerine sebep olmaktadır. Tek bazda oluşan delesyon ve insersiyonlar ise UVB etkisinde en az görülen mutasyonlardır.

UV hücrede farklı bölgelerde farklı derecelerde mutasyonlara sebep olmaktadır (Resim 2.6.). Hücrede lamina bölgesi LINE dizileri (uzun dizi tekrarları) ve lamina bölgesindeki kanserle ilişkili genler UV'den kaynaklı mutasyonlara daha açıktır [113]. Ökromatin bölgesinde mutasyon görülme olasılığı azalmaktadır.



Resim 2.6. UV'ye bağlı DNA hasarları ve mutasyonların hücrenin farklı bölgelerine göre dağılımı [113]

2.4. *Saccharomyces cerevisiae* (Ekmek Mayası)

Saccharomyces cerevisiae meyvelerde, çiçeklerde veya şeker içeren herhangi bir ortamda yaşayabilen tek hücreli bir maya türüdür. Aynı zamanda maya hücreleri deri yüzeyinde yaşayabilmekte, sıcak kanlı hayvanlarla simbiyoz veya parazitik bir yaşam sürebilmektedir. Bazı maya türleri ise siyanobakteri ve yeşil alglerle mutualist yaşayarak likenleri oluşturmaktadır. Maya hücreleri ekstrem koşullarda yaşamayı başarabilmektedir. 55 °C sıcaklığa kadar dayanabilmekte, 12-40 °C sıcaklıkta çoğalabilmektedir. 2-8 arasında pH değerlerine tolerans gösterebilmektedir. Maya hücreleri %20 alkol konsantrasyonu ve 3 M şeker konsantrasyonuna dayanabilmektedir [114]. Ancak gelişme gösterdikleri ortamlar

genellikle inorganik tuzlar ve karbonhidrat içeren hafif asidik besiyerleridir. Bakterilere karşı doğal bir korumanın sağlanması için besiyeri pH'sının 3,5-5,4 aralığında asidik düzeyde olması gerekmektedir. Üreyebilmeleri için organik karbon gerekmektedir. Karbon kaynağı olarak da basit şekerleri, organik yağ asitlerini ve bazı polimerik bileşikleri kullanabilme özelliğine sahiptirler.

S.cerevisiae eski zamanlardan beri pirincin, buğdayın ve arpanın şekerini fermente ederek alkollü içeceklerin üretilmesinde ve ekmek yapımında hamurun kabarması için kullanılmaktadır. Ayrıca %50 protein içermesine ve folik asit, niasin ve B vitamini açısından zengin olmasına bağlı olarak vitamin desteği olarak tüketilmektedir [115]. Hamur yapımı esnasında mayanın yaptığı fermentasyon sonucu etanol ve karbondioksit oluşmaktadır. Oluşan etanol buharlaşmakta karbondioksit ise küçük baloncuklar içinde tutulmakta ve bunun sonucunda da hamur kabarmaktadır. Alkollü içecek üretiminde ise mayanın fermentasyonu doğal yaşam alanı olan üzüm bağlarında başlamıştır. Bugün hala bazı şarap üreticileri doğal suşları kullanmaktadır. Günümüzde daha modern fermentasyon ve izolasyon yöntemleri tercih edilmektedir. Ancak ticari olarak kullanılan maya türleri endüstriyel verimliliği arttırmak için yapılan genetik modifikasyonlardan dolayı doğal habitatlarda bulunan yabani maya türlerinden farklılık göstermektedir. Bazı endüstriyel mayalarda sentezlenen toksik bir madde, bu özelliğe sahip olmayan mayalar için öldürücüdür. Özellikle bira sektöründe karşılaşılan bu problem biranın oluşumunu durdurmakta aynı zamanda biraya kötü bir tat vermektedir. Fermentasyon işlemi bir seri tankın içinde aerobik koşullarda mayalara serbest oksijen veya hava verilmesi ile gerçekleştirilir. Fermentasyon sektöründe istenmeyen maya türleri ortama girdiğinde ürünün kalitesi düşebilmektedir. Bunun için bağışıklık kazanmış maya suşları oluşturulmaktadır. Endüstriyel alanda kullanılan mayalar bazı karakteristik özellikleri taşımaktadır. Şekeri yüksek düzeyde kullanabilmek, yüksek sıcaklığa dayanabilmek, alkol üretiminin fazla olması, iyi bir aroma oluşturabilmek, fermentasyonu hızlı gerçekleştirmek ve genetik stabilitesinin yüksek olması bu özelliklerden bazılarıdır. *S.cerevisiae* saatte yaklaşık olarak kendi ağırlığı kadar glikozu fermente edebilmektedir. Normal koşullar altında *S.cerevisiae* %18 alkol üretebilmekte, %15-%16'sı etanolden oluşmaktadır. İçki yapımında sülfür dioksit gibi kimyasallar da kullanılabilmektedir [115].

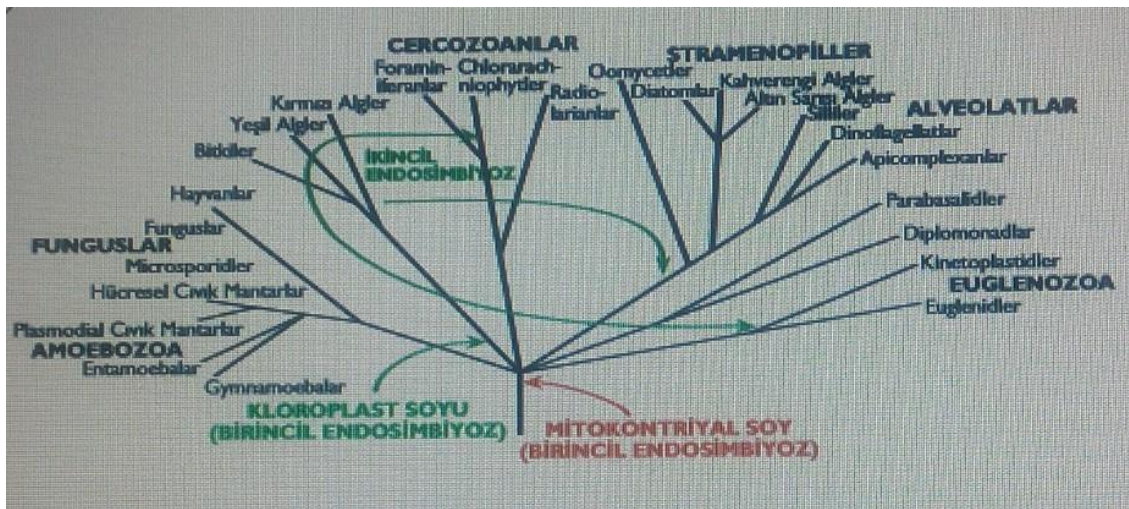
S.cerevisiae benzeri diğer bir maya türü olan *Candida albicans* ağızda, vajinada ve intestinal sistemde sıkça görülmektedir [115]. İnsan vücudunda doğal olarak yaşayabilmekte ve

herhangi bir enfeksiyona sebep olmamaktadır. Ancak bazı durumlarda hasta kişilerde veya bebeklerde enfeksiyona sebep olabilmektedir. Ağız içinde Candidiasis adı verilen mukozal yaralar ve tahribatlara sebep olan bir hastalığın etkenidir [115]. Ayrıca vajinada vajinitis hastalığına, AIDS'li ve kemoterapi alan hastalarda da çeşitli enfeksiyonlara sebep olabilmektedir.

2.4.1. *Saccharomyces cerevisiae*'nin evrimsel kökeni

MÖ.4000'li yıllardan beri ekmek ve bira yapımında kullanılan maya, insan için önemli bir organizmadır [97]. Bira üretimi bundan bin yıl önce bugün Irak toprakları olarak bilinen ve o yıllarda buğday üretiminin anavatanı olan Mezopotamya topraklarında başlamıştır [115]. Püre haline getirilen buğday, fermentasyon için gerekli aletlerin kullanılması ve maya suşlarının kültüre alınmasıyla bira yapımında kullanılan en eski materyal olmuştur. Louis Pasteur zamanına kadar maya kolonileri saflaştırılıp izole edilememiştir. Ancak Avrupalı bira üreticileri tarafından *S.cerevisiae* izole edilebilmiştir.

Maya hücreleri beş sınıftan oluşan sistematik ekolüne göre mantarlar alemine aittir (Şekil 2.6). Hücre duvarının kitinden oluşması ve peptidoglikan içermemesi, hücre zarındaki lipidlerin ester bağıyla birbirine bağlı olması ve diğer mantarlar gibi fotosentez yapamaması mantarlar alemine ait olduğunu göstermektedir. Ayrıca zarla çevrili bir çekirdeğinin ve zarlı organellerinin bulunması mayaların ökaryotik canlılar olduğunu göstermektedir [97].



Şekil 2.6.Ökaryotik canlılar arasında mayaların evrimsel konumu [116]

16S rRNA kullanılarak yapılan sistematik çalışmalarına göre mantarlar Chytridiomycetes, Zygomycetes, Glomeromycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes sınıflarından oluşmaktadır. *Saccharomyces*, *Candida* ve *Neurospora* gibi en çok bilinen maya türleri Ascomycetes sınıfına ait cinslerdir [117]. Ascomycetes sınıfı isimlerini yapısında bulundurduğu askus denilen spor keselerinden almaktadır. Bu spor keseleri içerisinde sekiz adet askospor oluşmaktadır ve bu askosporlar mayaların eşeyli üremesinde rol almaktadır [117]. Ascomycetes'lerin ekolojik rolleri ölü bitki materyallerinin ilkin parçalayıcıları olmaları ve orman ağaçları ile ektomikorizal etkileşim göstermektir. Ayırıştırıcılar olarak Ascomycetes'ler yaprak, ağaç parçaları ve diğer ölü bitki kısımları gibi ölü organik bileşiklerin parçalanmasına ve bu önemli bileşiklerin tekrar doğal döngüye girmelerine yardımcı olmaktadır. Pek çok maya basit inorganik besinleri kullanarak kendi aminoasit, yağ ve vitaminlerini sentezleyebilmektedir. Çoğu maya fakültatif aerobtur ve fermentatif metabolizma ve aerobik metabolizmaya sahiptirler [117].

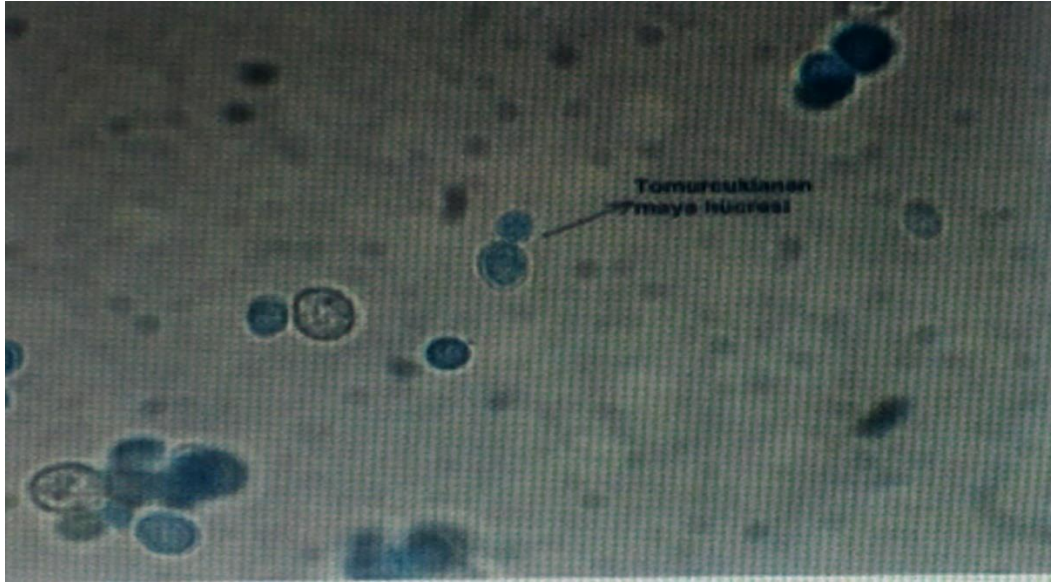
S.cerevisiae, *S.kluyveri* türü ile yakın akrabadır. *Saccharomyces carlsbergensis* ve *Saccharomyces bayanus* türleri *S.cerevisiae* ile yakından ilişkili bira ve şarap yapımında kullanılan maya türleridir [115].

2.4.2. *Saccharomyces cerevisiae*'nin hücresel yapısı ve hayat döngüsü

Maya hücreleri bakteriyel hücrelerden büyüklüğü, nükleus ve sitoplazmik vakuollerinin bulunması ve hücre duvarının gram boyası ile boyanmaması gibi özelliklerle farklılık göstermektedir. Küre ile silindir arasında farklı şekillerde ve boyutlarda olabilen maya hücreleri, tekli, ikili veya kısa zincirler ve topluluklar halinde bulunabilmektedir [97]. Hücre duvarları sert yapılıdır. Kitin dışında glukan ve mannan bulunmaktadır. Periplazmik aralıkta hidrolitik enzimler bulunmaktadır [114]. Hücre zarı ikili fosfolipid tabaka ve çeşitli proteinlerden oluşmaktadır. Çekirdeğin içinde çekirdekçik bulunmakta, depo ve sindirim organeli olarak vakuol görev almaktadır. Salgı yapma görevini endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı üstlenmiştir. Mitokondri oksijenli solunumu, peroksizom oksidatif degradasyonu gerçekleştirmektedir. Tipik ökaryot hücre yapısına sahip olan maya hücreleri ışık mikroskopuyla görülebilmektedir.

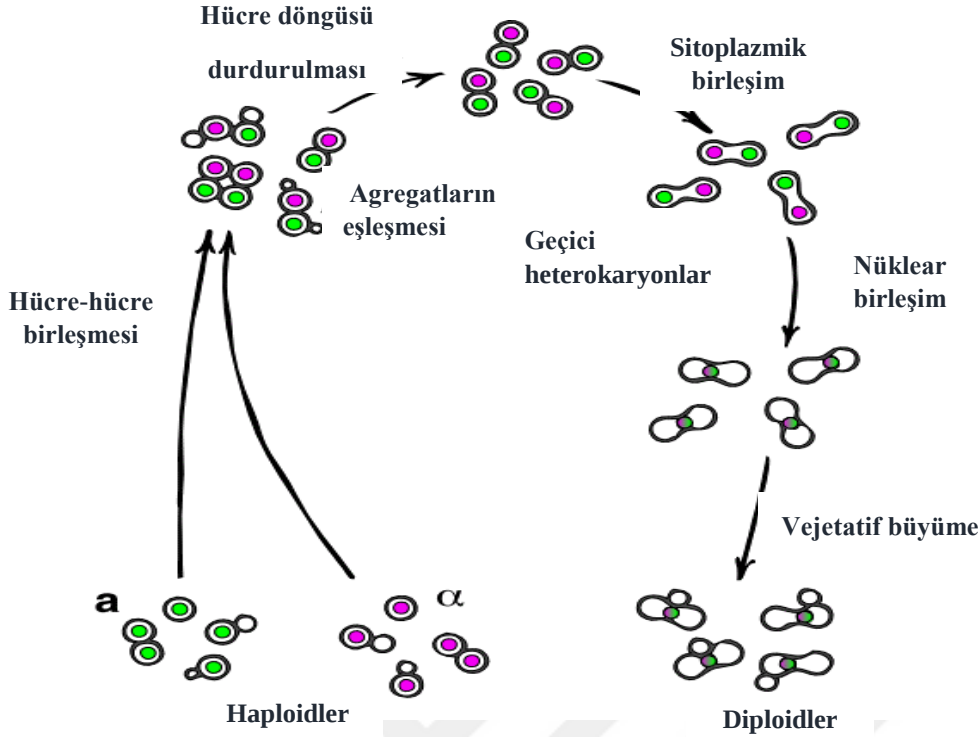
Maya hücrelerinin nesillerini devam ettirmeleri eşeysiz ve eşeyli üreme ile gerçekleşmektedir. Besin kaynaklarının bol olduğu durumlarda tomurcuklanma denilen

eşeysiz üreme görülmektedir (Resim 2.7.). Hücrenin bölünmesiyle genetik açıdan aynı olan iki yavru hücre oluşmaktadır. Çekirdek bölünmesinin ardından hücre duvarı oluşumu gerçekleşmekte, son olarak hücrelerin ayrılması görülmektedir. Haploid fazdaki hücrelerin tomurcuklanarak eşeysiz üremesi sırasında diploid faza göre daha fazla hücre oluşmaktadır. Bir hücre 20-30 defadan daha fazla tomurcuk üretemez. Ana hücrenin yaşı da tomurcuklanma sayısını belirleyen faktörlerdendir [115].



Resim 2.7. Tomurcuklanan maya hücresinin ışık mikroskopundaki görüntüsü [117]

Eşeyli üremede ise haploid ve diploid fazın birbirini takip ettiği bir döngü söz konusudur (Şekil 2.7.). Besin kaynaklarının az olduğu durumlarda diploid hücrenin mayoz bölünme geçirmesiyle dört tane genetik yapısı birbirinden farklı olan yavru haploid hücre oluşmaktadır. Haploid hücreler MAT a ve MAT α olmak üzere iki forma sahiptir. Hücrenin MAT a veya MAT α olacağı üçüncü kromozomdaki MAT (mating type=eşleşme türü) lokusundaki aleller tarafından belirlenmektedir [114]. MAT a lokusu a_1 transkripsiyonel faktörünü kodlarken, MAT α lokusu α_1 aktivatörü ve α_2 baskılayıcı faktörünü kodlamaktadır. Haploid hücreler peptid feromonlar üreterek eşleşmeyi sağlamaktadır. Eşeyssel iletişimde feromon sinyal alma yolağı büyük öneme sahiptir. Bu yolda G proteinine benzeyen feromona özgü reseptörler bulunmakta ve bu reseptörler a ve α faktörü bağlayabilmektedir. A ve α faktörü'nün reseptörlere bağlanmasıyla hücre döngüsünde değişiklikler olmakta hücre bölünmeye hazırlanarak G_1 fazına girmektedir [114].



Şekil 2.7. *S.cerevisiae* 'nin hayat döngüsü [114]

Doğada maya hücreleri genelde diploid olarak bulunmaktadır. Çünkü bu şekilde önemli genlerin mutasyona uğrayıp letal etki yaratmasının önüne geçilmektedir. Nitrojen eksikliği gibi durumlarda maya hücreleri spor üretmeye başlamaktadır. Sporlar uç koşullarda hayatta kalabilmektedir. Genomda biriken mutasyonların temizlenmesi için sporulasyon tercih edilen bir yöntemdir [114]. Mayozla alellerin yeni bir kombinasyonu oluşturularak çeşitlilik sağlanmaktadır. Bazı durumlarda ise haploid sporlar farklı tetralara ait hücrelerle eşleşerek genetik çeşitlilik oranını artırmaktadır [114].

Çizelge 2.8. Haploid ve diploid maya hücrelerinin büyüklüğü ve içeriğindeki farklılıklar [115]

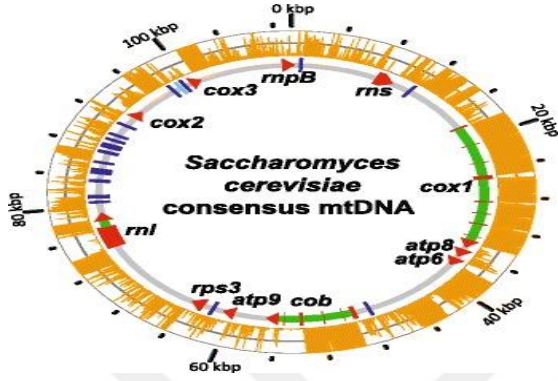
Özellik	Haploid Hücre	Diploid Hücre
Hacim(μm^3)	70	120
Yaş Ağırlık	60	80
Kuru Ağırlık	15	20
DNA	0,017	0,034
RNA	1,2	1,9
Protein	6	8
Lipit	0,6	0,8

Normal laboratuvar koşullarında *S.cerevisiae* 90 dakikada kendisinin iki katı kadar hücre oluşturmaktadır. Bu süre minimal besi yerinde 140 dakikayı bulmaktadır.

2.4.3. *Saccharomyces cerevisiae*'nin genetik yapısı

Saccharomyces cerevisiae'nin çekirdek genomu büyüklüğü 200-2200 kb arasında değişen 16 adet kromozomdan ve 13 milyon bazdan oluşmaktadır. Ayrıca 2 µm çapında bir plazmidi ve mitokondriyal DNA'sı bulunmaktadır. Haploid genom 12 500 kb büyüklüğündedir. Maya kromozomları yüksek ökaryotlarınkinden daha basit olmak üzere telomer ve sentromer bölgeleri içermektedir. 1996 yılında mayanın tüm genomu dizilenmiş, *Saccharomyces cerevisiae* genomu dizilenen ilk ökaryot canlı olmuştur [114]. Genom dizilemesinin ardından mikrodizilim(mikroarray), sıralı gen ifadesi analizi (SAGE), kapsamlı gen işlevi analizi, iki boyutlu protein haritaları, protein-protein etkileşimleri ve proteinle ilgili yöntemler olmak üzere moleküler biyoloji araştırmalarında kullanılan pek çok araç gereç keşfedilmiştir [97]. Maya genomunun yaklaşık olarak 6200 gen içerdiği bunların yaklaşık 5800'nün protein kodlayan gen olduğu tespit edilmiştir. Genlerin tek tek etkisini görebilmek için delesyon işlemi uygulanmıştır. *Saccharomyces cerevisiae* genomu diğer tek hücreli canlıların genomuyla kıyaslandığında daha sıkı bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. Maya genomunun %72'si kodlanan bölge iken insan genomunun sadece %2'si şifre vermektedir [115]. Maya genlerinin %30'unun fonksiyonu deneysel çalışmalar ile belirlenmiştir. Ancak %70'nin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Bu genlerin maya veya diğer organizmalardan alınan fonksiyonel gen ürünlerini yapısal olarak kodlayan genler veya karakterize edilen proteinlerin kodlanmasını sağlayan genler olduğu düşünülmektedir [115]. *S.cerevisiae* genomunun 140 adet rRNA, 40 adet snRNA ve 275 adet tRNA geni içerdiği bilinmektedir [118]. Maya genomunda iki gen arası bölge 200-1000 bp uzunluğundadır. Ayrıca hareketli DNA elementleri, retrotranspozonlar farklı *S.cerevisiae* suşlarında farklı pozisyonlarda bulunabilmektedir [115]. Mitokondriyal DNA mitokondri transkripsiyon mekanizmasında görev alan genleri kodlamakta, mitokondri proteinlerinin yaklaşık %15'ini kodlayabilmektedir (Şekil 2.8.) [115]. Petit olarak bilinen mutantlarda solunum metabolizmasında görev alan sitokrom b, sitokrom oksidaz, ATP sentaz gibi enzimleri kodlayan genler bulunmamaktadır. Buna rağmen petit mutantlar hayatta kalabilmekte, morfolojik olarak normal olmayan bir mitokondriyle hayatlarını sürdürebilmektedir. Ancak metabolizmaları çok yavaşlamaktadır. Hayatta kalmayı sağlayan genlerin çoğu kromozomal DNA tarafından kodlandığı için mitokondriyal mutasyonlar canlıyı çok fazla etkilememektedir. Fermentasyon için gerekli olan besin maddelerinin bulunmadığı, sadece gliserol veya etanol gibi karbon kaynağının bulunduğu besi yerinde mayanın büyütülmesi mitokondrisinde hasar olup olmadığını anlamak için kullanılan

yöntemlerdendir. 2 μ m çapındaki halkasal plazmid çoğu *S.cerevisiae* suşunda bulunmaktadır. cir suşu mutantlarında 2 μ m plazmid bulunmamaktadır. Ancak bu plazmidin fenotipte gözlenebilen bir etkisi yoktur [115]. Fakat kromozomal *nib 1* genindeki mutasyonla birlikte bu plazmidin eksikliği büyümeyi durdurmaktadır.



Resim 2.8. *Saccharomyces cerevisiae*'nin mitokondriyal kromozom yapısı [119]

S.cerevisiae ayrıca 20 S tek iplikli RNA içermektedir. Bu RNA, RNA bağımlı RNA polimeraz tarafından sentezlenmekte, bağımsız bir şekilde replike olmakta ve Mendel kalıtımına uymayan bir şekilde yavru hücrelere aktarılmaktadır [115].

Maya genleri genelde üç harf ve bir rakamdan oluşan bir sistemle adlandırılmaktadır. Yabani suş genleri genelde büyük harfle ve italik olarak yazılırken, çekinik mutant genler küçük harflerle italik olarak yazılmaktadır. Örneğin, *TPS1* (trihalo-6- fosfat sentaz geni) bir yabani tip gen iken *tps1* çekinik mutant gendir. Bir marker kullanılarak bir gen siliniyorsa bu durumda silinen genin yanına Δ işareti konur ve iki tane iki nokta üst üste konularak kullanılan markerın adı yazılır [114]. Örneğin, *tps1\Delta::HIS3* şeklindeki gösterim *tps1* geninin histidin 3 marker geniyle silindiğini göstermektedir. Genlerin bir de sistematik adı bulunmaktadır. Bu sistematik adlandırmaya göre maya kromozomları alfabedeki harflerle simgelenmiştir. Başta maya adının İngilizce karşılığı olan "yeast" kelimesinin baş harfi Y, ardından kromozom numarası harf olarak gösterilmekte, kromozomun sağ veya sol kolunu göstermek için L veya R harfi kullanılmaktadır. Sonra genin sentromere olan uzaklığını göstermek için santimorgan cinsinden üç tane numara ve Watson veya Crick ipliği dediğimiz DNA'nın hangi ipliğinde olduğunu gösteren W veya C harflerinden biri konularak genin sistematik adı oluşturulmaktadır [114]. Örneğin, *TPS1* geninin sistematik adı YBR126C'dir. Mitokondriyal genlerde isimlendirilirken bu sistem kullanılmaktadır. Gen adının başında *mt* sembolü yer alabilmektedir.

Birçok vektör mayanın genomunda insersiyon, delesyon ve genlerin ifadesi için kullanılabilir [115]. Birçok plazmid mayada mekik vektör görevi yapmaktadır. Bu plazmidler *E.coli*'den elde edilmekte mayanın genomunda amplifikasyonda görev almakta, genetik bileşenlerin yer değiştirmesinde rol almaktadır. En yaygın olarak kullanılan maya vektörleri pBR322 plazmidinden köken almaktadır [115]. Bu plazmid replikasyon bölgesi ve direnç genlerinden oluşan markerlar içermektedir. Bazı genetik markerlar ise oksotrofik mayalar oluşmasını sağlamaktadır. Sıklıkla kullanılan marker genler *HIS3*, *URA3*, *TRP1*, *LEU2*, *LYS2*, *ADE2* gibi markerlardır. Maya genomunda bazı genlerin etkisini artırmak veya yok etmek için bazı mutasyonlar yapılabilir. Mutasyonların fenotipe etkisi bir genin, proteinin veya metabolik yolağın aktivitesi üzerinden gözlemlenebilir. Mutantların bulunmasında selektif besi yerine ekilmiş suşlar taranmakta ve renk veya büyüme farklılığı gösteren kolonilerin mutant olduğu anlaşılmaktadır. Genetik analiz veya gen sekanslama yöntemleriyle de mutant suşlar bulunabilir. Laboratuvarda W303-1A, S288C, S1278b, SK1, BY4741 suşları sıklıkla kullanılan suşlardır.

2.4.4. Model organizma olarak *Saccharomyces cerevisiae*

İçki ve ekmek endüstrisinin yanı sıra *Saccharomyces cerevisiae* moleküler biyoloji ve genetik çalışmaları için ideal bir model organizmadır. Ticari öneme sahip proteinlerin üretilmesinde, ilaç taraması ve fonksiyonel analizlerde ve yüksek ökaryotik canlılarda uygulanamayan işlemlerin uygulanabilmesinde sıklıkla kullanılan bir model organizmadır. *S.cerevisiae* 'nin model organizma olarak popüler olmasını sağlayan bazı özellikleri vardır. *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin, diğer ökaryot organizmalarla kıyaslandığında daha kısa bir yaşam döngüsü vardır. Basit kültür ortamında üreyebilmeleri mayaların ekonomik canlılar olduğunun kanıtıdır [97]. Katı agar üzerine ekim yapıldığında kolaylıkla seçilebilen fenotipik olarak tarama imkanı veren ayrı koloniler halinde üremekte bu durumda maya ile çalışan araştırmacıların işini kolaylaştırmaktadır (Resim 2.8.).



Resim 2.9. Genetik olarak modifiye edilmiş *Saccharomyces cerevisiae*'nin katı agar üzerinde oluşturduğu koloniler [6]

İnsan sağlığı üzerine toksik etkileri yoktur. Bundan dolayı genel olarak güvenilir kabul edilen (GRAS) organizma statüsündedir. Gerekğinde haploid olarak üreyebilmeleri, mutasyon çalışan araştırmacılara kolaylık tanımaktadır [97]. Tek hücreli birçok organizmanın aksine *Saccharomyces cerevisiae* oldukça stabil bir haploid ve diploid safhaya sahiptir [115]. Bu sayede çekinik mutasyonlar kolayca izole edilebilmektedir. Genetik olarak kolay manipüle edilebilen *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri kolay kontamine olmazlar. Genomunun tamamının sekanslanması *Saccharomyces cerevisiae*'nin kullanıldığı genetik çalışmalara dayanak oluşturmaktadır. Besi ortamında antibiyotik kullanılmadığı için daha çevre dostu organizmalardır. Eski zamanlardan beri kullanılan bir organizma olmasına bağlı olarak hakkında geniş bir veri tabanı vardır. Ayrıca birçok hastalık ve türler arasında iyi korunmuş metabolik işlemlerin çalışılması için uygun bir organizmadır. *Saccharomyces cerevisiae* DNA'sı yüksek derecede transformasyona açık bir DNA'dır. DNA'sının transformasyona açık olması sayesinde birçok gen klonlama ve genetik mühendisliği tekniği kolayca uygulanabilmektedir. Plazmidin genoma doğrudan entegre edilmesi de maya çalışmalarında sıkça kullanılan bir yöntemdir. Homolog rekombinasyon olayının maya genomunda sıkça yaşanmasına bağlı olarak transforme edilen gen kaseti genoma kolayca entegre olabilmektedir [115]. Transformasyon birçok sentetik oligonükleotidin, birçok protein formunun sentezlenmesi için elverişli bir yöntemdir. Geliştirilen bu genetik yöntemler gen regülasyonunun anlaşılmasında, proteinlerin yapı-fonksiyon ilişkisinin saptanmasında, kromozom yapısı ve hücre biyolojisine dair diğer sorunların aydınlatılmasında kullanılmaktadır. Büyük DNA fragmentlerinin klonlanmasında yapay maya kromozomları (YAC) kullanılmaktadır. DNA'sında birçok marker taşıyabilmektedir. Maya genomuyla yapılan genetik çalışmalarda sıklıkla kullanılan birçok gen ve promoter

vardır. Bu genlerin bazıları özellikle seçilirken, bazıları isteğe bağlı olarak plazmid olarak suşlara verilmektedir. *URA3* ve *LYS2* bu genlerdendir. *URA3* ve *LYS2* urasil ve lizin aminoasitlerinin üretilmesini sağlayan hem pozitif hem de negatif seleksiyon özelliğine sahip genlerdir [115]. Pozitif seleksiyon *ura3* ve *lys2* mutantlarının seçici besiyerinde üremesinin gözlenmesiyle, negatif seleksiyon ise 5-floro-orotik asit ve α -aminoadipik asit üretilmesiyle selektif besiyerinde protrofik suşların büyümesinin engellenmesi şeklinde gerçekleşmektedir. *ADE1*, *ADE2*, *GAL1* promotörü, *lacZ* promotörü sıklıkla kullanılan diğer genler ve promotörlerdir.

S.cerevisiae'ye benzer bir tür olan bölünerek çoğalan *Schizosaccharomyces pombe* de model organizma olarak kullanılabilir. Ancak *Schizosaccharomyces pombe*'nin genomu çok iyi karakterize edilememiştir [115].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Çalışmamızda Gazi Üniversitesi bünyesinde bulunan:

- HPLC (Agilent 1200 series, ABD)
- Speedvac (Christ, Almanya)
- Çalkalayıcı (Biobase, Çin)
- Santrifüj (Heraeus, Almanya)
- Spektrofotometre (Tetra, Türkiye)
- Su banyosu (Thermofisher, ABD)
- İnkübatör (Daihan, Kore)
- Otoklav (Tomy, Japonya)
- Çeker ocak (Telstar, İspanya)
- Hassas terazi (Isolab, Almanya)
- Manyetik karıştırıcı (Thermoscientific, ABD)
- -80 °C buzdolabı (Labfreeze, Çin)
- +4°C buzdolabı (Ariston, Türkiye)
- Liyofilizatör (Christ, Almanya)
- Vorteks (Velp Scientifica, İtalya)
- Distile su cihazı (Merck Millipore, Almanya) kullanılmıştır.

Bu cihazların dışında Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM) bünyesinde bulunan UV fırını (UVP, Kanada) kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

- Potasyum Hidroksit (KOH) (Sigma-Aldrich, ABD)
- Pyrogallol (Sigma-Aldrich, ABD)
- Maya ekstraktı (Sigma-Aldrich, ABD)
- D-Glukoz (Sigma-Aldrich, ABD)
- Pepton (Merck, Almanya)
- Maya Nitrojen Baz (YNB) (Sigma-Aldrich, ABD)
- Agar (Sigma-Aldrich, ABD)
- Cam boncuk (Biospec, ABD)
- Gliserol (ZAG Kimya, Türkiye)
- Metanol (Sigma-Aldrich, ABD)
- Heksan (%99'luk) (Sigma-Aldrich, ABD)
- Tersiyer metil bütül eter (Sigma-Aldrich, ABD)

3.1.3. Kullanılan sarf malzemeleri

- 50 ml'lik, 100 ml'lik, 250 ml'lik erlen (Isolab, Almanya)
- Petri kapları (Türkplast, Türkiye)
- Ependorf (Isolab, Almanya)
- HPLC kolonu (YMC, Japonya)
- 10µl'lik, 200 µl'lik ve 1000 µl'lik mikropipetler (Biopette, ABD)

- Pipet uçları (Isolab, Almanya)
- 15 ml'lik santrifüj tüp (Isolab, Almanya)
- 50 ml'lik falkon tüp (Sarstedt, Almanya)
- Hücre dondurma tüpleri (Greiner, Avustralya)
- Eküvyon çubuğu (Tıpkimsan, Türkiye)
- 10ml'lik, 15ml'lik, 20 ml'lik cam deney tüpleri (China glass, Çin)
- 1 ml'lik, 5 ml'lik, 10 ml'lik cam pipet uçları (Ding Xin Yi, Çin)
- 500ml'lik, 1000 ml'lik laboratuvar şişeleri (Schott, Türkiye)
- Spektrofotometre küvetleri (Hellma, Almanya)
- Cam pastör pipetleri (Isolab, Almanya)
- Alüminyum folyo

3.1.4. Kullanılan ölçüm sistemleri

Spektroskopik analizler Gazi Üniversitesi bünyesinde bulunan Tetra T80+UV/VIS spektrofotometre (Türkiye) ile yapılmıştır (Resim 3.1.). UV/VIS spektrofotometreler organik ve inorganik malzemeleri kalitatif ve kantitatif olarak analiz edebilmektedir. Spektrofotometreler bir malzemenin absorbansı ışığın dalga boyuna, ışık yolu uzunluğuna ve konsantrasyonuna bağlı olduğunu belirten Lambert–Beer kanununa uygun şekilde tasarlanmıştır. Sıvı besiyerinde büyüyen maya hücrelerinin sayısının belirlemede ve total karoten miktarının saptanmasında kullanılmıştır.



Resim 3.1. Spektroskopik analizlerde kullanılan UV/VIS spektrofotometre[120]

Elde edilen *S.cerevisiae* kültürlerinin karoten bileşenlerinin saflaştırılmasında Agilent 1200 series (manuel enjeksiyon) (ABD) HPLC cihazı kullanılmıştır (Resim 3.2.). Bu cihazın modeli 6890N Network GC-System 7683 B Serves İnjektör 5975 Inert MSD'dir. HPLC cihazında UV ve RID dedektörleri mevcuttur. Metacarb 87H 300*7,8 mm, Metacarb 87C 300*7,8 mm, C₁₈ 250*4,6 mm, Zorbax C₁₈ 150*4,6 mm kolonları bulunmaktadır. Bunun dışında karotenlerin analizi için YMC silika C₃₀ kolonu kullanılmıştır.



Resim 3.2. *S.cerevisiae* hücrelerinde bulunan spesifik karoten miktarlarının tayininde kullanılan HPLC cihazı [121]

3.1.5. Kullanılan suş

Saccharomyces cerevisiae suşu CEN-PK-2-1c–MATa–Pcyc1-Erg20-Erg 9-NAT(Euroscarf, Almanya) idi [122]. Bu suş içerisinde *Xanthophyllomyces dendrorhous*'dan alınmış crt I-crt YB-crt E karoten genlerini içeren ve urasil markerı olarak URA3 genini taşıyan bir plazmid bulundurmaktadır (Ek 1). Buna ilave olarak tHMG1-Phxt7-crt-I-LEU2 kasetini taşımaktadır. Ayrıca bu suş HİS3 Δ yani histidin geni delesyonuna sahiptir (Bu suş Dr. Bilge ÖZAYDIN tarafından çalışmamıza hediye edilmiştir.)¹. Histidin plazmidi taşıyan suşun kullanılmamasının sebebi bu suş tüm deneyler boyunca YPD besiyerinde yani zengin besiyerinde büyütüleceği için histidin plazmidini kaybetme olasılığı yüksek bulunmuş bu sebeple o suş tercih edilmemiştir. Bu suş üzerinde farklı sürelerde UV uygulanarak mutasyon oluşturulmuştur. Deneyde kullanılan kontrol suşudur.

3.2. Çözeltilerin Hazırlanışı

Saccharomyces cerevisiae'de UV ile mutasyon yapılmasına bağlı olarak sıklıkla kullanılan besiyeri YPD adı verilen zengin besiyeri hazırlandı. Bu besiyerinin hem UV mutajenez işlemini uygularken katı besiyeri olarak agar halinde petrilerde hazırlanması hem de suşların büyümelerini gözlemlemek için sıvı besiyeri olarak hazırlanması uygun görülmüştür. YPD'nin dışında gliserol içeren YPD besiyeri, karoten ekstraksiyonu sırasında kullanılan pyrogallol ve potasyum hidroksit (KOH) çözeltileri ve HPLC sırasında kullanılan çözeltiler hazırlanmıştır.

3.2.1. YPD sıvı besiyerinin hazırlanması

YPD besiyerinin hazırlanmasında 500 ml'lik ve 1000 ml'lik cam şişeler kullanılmıştır. Ancak deneyde sıklıkla 1000 ml'lik şişelerde YPD hazırlanmıştır. 1000 ml YPD sıvı besiyeri için 20 gr pepton, 10 gr maya ekstraktı, 950 ml distile su kullanılmıştır [123]. Sterilizasyon 15 dakika olan sıvı programını seçerek otoklav yapılmıştır. Otoklavdan çıkan besiyerine biraz soğumasının ardından 50 ml steril %40'lık dekstroz çözeltisi eklenmiştir ve

¹ Bilge Özaydın bu suşu Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri UAM'daki çalışması sırasında elde etmiştir (2016). Şu an çalışmalarına Zymochem, Inc. 4 Anchor Dr. Suite 231 Emeryville, CA USA. 94608 adresinde devam etmektedir.

karıştırılmıştır. Hazırlanan besiyeri ışık almayan bir dolapta üzerine hazırlanma tarihi not edilerek muhafaza edilmiştir.

3.2.2. YPD katı besiyerinin hazırlanması

YPD katı besiyeri ise 1000 ml’lik erlenlerde hazırlanmış, kapağı alüminyum folyoyla kapatılarak otoklavlanmış, plastik petri kaplarına dökülerek kurumaya bırakılarak hazır hale getirilmiştir. YPD katı besiyeri için 20 gr pepton, 10 gr maya ekstraktı, 950 ml distile su, 20 gr agar kullanılmıştır. Sterilizasyon 15 dakika olan sıvı programı seçilerek otoklav yapılmıştır. Otoklavdan çıkan besiyerine biraz soğumasının ardından 50 ml %40’lık dekstroz eklenip karıştırılmıştır. Petrilere dökülerek hazır hale getirilmiştir. Petriler iyice kuruduktan sonra poşetlenip +4 °C buzdolabında saklanmıştır. Petrilerin üzerine hangi tarihte hazırlandığı not edilmiştir.

3.2.3. %40’lık dekstroz çözeltisinin hazırlanması

Dekstroz çözeltisi 500 ml’lik erlende hazırlanmış ve ağzına alüminyum folyo kapatılarak otoklavlanmıştır. %40’lık dekstroz çözeltisi olduğu için 500 ml için 200 gr D-glukoz tartıldı. Öncesinde 1000 ml’lik behere 250 ml distile su koyularak manyetik karıştırıcıda karıştırılmaya başlanmıştır. Sonra tartılan 200 gr D-glukoz suyun içine yavaş yavaş boşaltılarak karıştırma ve ısıtma işlemine devam edilmiştir. Buharlaşmaya engel olmak için çok fazla ısı verilmemiştir. İyice çözünen dekstroz çözeltisi bir mezüre boşaltılarak hacmi ölçülmüş ve üzerine 500 ml’ye tamamlanacak şekilde distile su eklenmiştir. Daha sonra mezürdeki çözelti 500 ml’lik cam şişeye boşaltılarak sterilizasyon 15 dakika olan sıvı programı seçilerek otoklav yapılmıştır. Otoklavdan çıkan dekstroz çözeltisi hazırlanma tarihi ve adı üzerine not edilerek ışık görmeyen bir dolapta muhafaza edilmiştir.

3.2.4. %0,2’lik pyrogallol çözeltisinin hazırlanması

Pyrogallol çözeltisi kolayca ışıktan etkilenebilen ve kolaylıkla bozulabilen bir çözelti olduğu için çok az miktarda hazırlanması uygun bulunmuştur. 50 ml’lik plastik tüplerde 0,01 gr pyrogallol stoğundan koyulmuş ve üzerine 50 ml %95’lik metanol çözeltisinden eklenmiş ve iyice vorteksenerek karıştırılmıştır. İçeriğinin tamamen çözünmesi önemlidir. İyice çözündüğünden emin olduğumuz pyrogallol çözeltisinin bilgileri yazılarak üzerine

etiketlenmiş ve pyrogallol çözeltisi alüminyum folyoya sarılarak ışık görmesi engellenmiştir. Işık görmeyen dolapta muhafaza edilmiştir.

3.2.5. %3'lük gliserol içeren YPD katı besiyeri hazırlanması

Bu besiyeri çok miktarda kullanılmadığından yalnızca 500 ml hazırlanıp petrilere dökülmesi uygun bulunmuştur. 500 ml YPD besiyeri için 10 gr pepton, 5 gr maya ekstraktı, 10 gr agar, 475 ml su kullanılarak sterilizasyon 15 dakika olan sıvı programında otoklav yapılmıştır. Otoklavdan çıkan çözeltiye biraz soğuduktan sonra %85'lik gliserol çözeltisinden 17,64 ml eklenmiş ve 25 ml %40'lık dekstroza eklenerek karıştırılmıştır. Daha sonra petrilere dökülerek kuruması sağlanmıştır. Kuruyan petrilere poşetlenerek üzerine bilgileri ve hazırlanma tarihi not edilerek +4 °C buzdolabında saklanmıştır.

3.2.6. %15'lik gliserol içeren YPD sıvı besiyerinin hazırlanması

Bu besiyeri de çok miktarda kullanılmamaktadır. 50 ml'lik plastik tüpler içerisinde yukarıda tarifi verilen YPD sıvı besiyerinden koyulmuş ve içerisine %85'lik gliserolden 8,9 ml ekleyerek vorteksle iyice karışması sağlanmıştır. Gliserolün iyice karışması bu çözelti için önemlidir. Gliserol bu çözeltide suşların dondurulup saklanması için kullanılmakta ve dondurup çözme esnasında maya suşlarının zarar görmesini engellemektedir. Daha sonra üzerine gerekli bilgiler kaydedilerek kontaminasyondan uzak bir ortamda muhafaza edilmiştir.

3.2.7. HPLC mobil faz çözeltilerinin hazırlanması

A, B ve C olmak üzere üç farklı mobil faz çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin hazırlanmasında 1000 ml'lik cam şişeler kullanılmıştır. A çözeltisi %98 metanol, %2 distile su içermektedir. B çözeltisi %95 metanol, %5 distile su içermektedir. C çözeltisi %100 tersiyer metil bütül eterden oluşmaktadır.

3.2.8. %60'lık potasyum hidroksit (KOH) çözeltisinin hazırlanması

100 ml olarak hazırlanan potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi için 60 mg KOH tartılmış ve 100 ml distile su içerisinde vortekslenerek çözölmüştür.

3.3. Yöntemler

3.3.1. UV mutajenez işleminin uygulanması

-80 °C’de dondurulmuş olarak bulunan UV mutajenez işlemi sırasında kullanılacak olan suş -80 °C buzdolabından çıkarılarak bu suştan YPD katı besiyerine tek koloni ekim yapılmıştır. 30 °C inkübatörde bu suşun tek koloni oluşturma süresi ortalama üç gündür. Üç gün sonra petride inceleme yapıldığında tek kolonilerin büyümüş olduğu görüldü. UV mutajenez işleminin uygulanmasından bir gün önce bu suştan tek, beyaz renkli olmayan sağlıklı olduğu düşünülen koloniden alınarak 50 ml’lik erlene içerisinde 10 ml YPD sıvı besiyeri olacak şekilde ekim yapılmıştır. Kapağı iyice kapatılarak ve alüminyum folyo kapağına 10 tane delik delinerek 30 °C çalkalayıcı inkübatörde 300 rpm’de bir gün büyütüldü. Ertesi gün çalkalayıcı inkübatörden alınan suшта kontaminasyon olup olmadığı kontrol edilerek UV mutajenez işlemine başlandı. UV mutajenez işleminin suş logaritmik fazda iken uygulanması yani hücrelerin hızlı bir şekilde bölündüğü evrede yapılması uygundur. Çünkü yapılan mutasyonun yavru hücrelere aktarılması gerekmektedir. Logaritmik fazdaki suшта UV mutajenez işlemi uygulandı. UV mutajenez işlemi için iki farklı protokol kullanılarak bir protokol oluşturulmuştur [124, 125]. Bu oluşturulan protokol üzerinde de dört defa tekrar eden UV mutajenez işlemi sırasında bazı değişiklikler yapılarak protokol optimize edilmiştir.

1. İlk olarak YPD katı besiyeri içeren 21 adet petri çıkarıldı. Bunlardan 3 tanesi kontrol olacağı için bunlara UV uygulanmadı. Geriye kalan 18 adet petriden 6 adedi set 1, 6 adedi set 2, 6 adedi set 3 olarak etiketlendi.
2. Başlangıç kültür olarak bir gün öncesinde büyütülen suş 15 ml’lik santrifüj tüpüne alınarak 4000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı dökülerek peletin üzerine 10 ml distile su eklendi ve peletin suyla iyice karışması için pipetaj yapılarak, hafifçe vortekslenerek peletin suda çözünmesi sağlandı. Yine 4000 rpm’de 2 dakika santrifüj yapılarak süpernatant kısmı döküldü. Bu aşamada protokolde kültürün 1 ml distile suyla yıkanması gerektiği yazmasına rağmen her petriye 150 µl kültür yayma ekim yapılacağı için bu şekilde 10 ml distile suyla tüm kültürün yıkanması daha elverişli bulunmuştur.

3. İki yıkamanın ardından 20 kat dilüe edilerek yani 950 μ l YPD besiyeri ve 50 μ l starter kültür bir spektrofotometre küvetine koyularak OD 600 nm'de OD ölçülmüştür. Ölçülen OD 0,718 çıkmış bu değer 20 ile çarpılarak gerçek OD değeri yaklaşık olarak 15 bulundu. Sonra OD üzerinden 1 ml'sinde ne kadar hücre bulunduğu hesaplandı. 1 OD ünitesi 1 ml'sinde 3×10^7 hücre bulunduğunu belirtmektedir. 15 OD ünitesinin 1 ml'sinde 45×10^7 hücre bulunduğu hesaplandı. Bir mikrolitrede ise $4,5 \times 10^5$ hücre bulunmaktadır. Bir mililitrede 2×10^4 hücre olacak şekilde bu başlangıç kültürden ne kadar kullanılması gerektiği hesaplanarak 45 μ l bulundu.
4. 10 kat seri dilüsyon yapılması planlandı. Ancak daha sonra 20 kat dilüe ederek seri dilüsyon yapılması yöntemi denendi. Bir tane 1,5 ml'lik ependorfa 955 μ l distile su ve 45 μ l kültürden koyuldu ve iyice vortekslendi. Böylece 2×10^4 hücre/ml kültürü hazırlanmış oldu. Bu kültür 10 kat yerine 20 kat dilüe ederek seri dilüsyon yapıldı. Yani alınan başka bir ependorfa 950 μ l distile su 50 μ l 2×10^4 hücre/ml kültürü eklendi ve vortekslendi. Bu işlemler esnasında pipetaj hatası yapılmamasına ve vorteksle iyice karıştırılarak kültürlerin eklenmesine özen gösterildi. Bu şekilde 4 kere 20 kat dilüe edilerek seri dilüsyon işlemi tamamlandı (Çizelge 3.1). Son dilüsyon işlemi gerçekleştirilirken 21 adet petriye 150 μ l ekim yapılacağı için 15 ml'lik tüplerde 4,5 ml distile su ve 500 μ l kültür kullanılarak dilüe edildi.

Çizelge 3.1. UV mutajenez deneyinin 20 kat olarak yapılan seri dilüsyon basamağının şematik gösterimi

2×10^4 hücre/ μ l	10^3 hücre/ μ l	10^2 hücre/ μ l	10^1 hücre/ μ l	10^0 hücre/ μ l
				
955 μ l ddH ₂ O + 45 μ l $4,5 \times 10^5$ hücre/ μ l olan starter	950 μ l ddH ₂ O + 50 μ l 2×10^4 hücre/ μ l olan kültür	950 μ l ddH ₂ O + 50 μ l 10^3 hücre/ μ l olan kültür	950 μ l ddH ₂ O + 50 μ l 10^2 hücre/ μ l olan kültür	4,5 ml ddH ₂ O + 500 μ l 10^1 hücre/ μ l olan kültür

5. Sonrasında 21 adet petriye alev başında 150 μ l kültür yayma ekim yapıldı. 10 kat seri dilüsyon sonucu 1 μ l'de 2 hücre 150 μ l'de ise 300 adet hücre bulunması

gerekmektedir. Ancak 20 kat seri dilüsyon yapılması sonucu 1 µl'de 1 hücre 150 µl'de 150 hücre bulunması beklenen sonuçtur.

6. 3 adet kontrol petrisi UV mutajenez işlemine tabi tutulmayacağı için ekim yapıldıktan sonra 30 °C inkübatörde büyümeye bırakıldı.
 7. Geriye kalan set 1, set 2 ve set 3 petrilerinin 1 saat içerisinde UV işlemine maruz bırakılması gerekmektedir. Çünkü hücreler bölünmeye başlarsa UV mutajenez işlemi sonucu mutant ve mutant olmayan koloniler oluşabilmektedir. Bu da petride mozaik bir görüntü oluşturmakta mutant kolonilerin belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Bu sebeple 1 saat içerisinde petriler UV mutajenez işlemi için UV fırının bulunduğu Bilkent Üniversitesi UNAM'a yetiştirildi.
 8. Bu fırında en az miktar olarak 100 µj/ cm² uygulanabilmektedir. Set 1 petrilere 100 µj/ cm² olarak 1 dakika, set 2 petrilere 100 µj/ cm² olarak 2 dakika, set 3 petrilere ise 100 µj/ cm² olarak 3 dakika UV uygulandı.
 9. Bu şekilde UV'ye maruz bırakılan petriler laboratuvara getirilerek 30 °C inkübatörde büyümeye bırakıldı. Üç gün sonra petriler kontrol edilerek koloni sayımı yapıldı.
- Birinci UV mutajenez sonucu oluşan kolonilerin sayımının yapılmasının ardından ilk UV mutajenez deneyinde kullanılan UV'ye maruz bırakma sürelerinin fazla olduğu düşünüldü. Bu sebeple ikinci UV mutajenez uygulanmasında süreler kısaltıldı. UV uygulaması öncesinde başlangıç kültürü büyütme aşaması bir önceki uygulamada olduğu gibi tekrar edildi. İkinci uygulamada spektrofotometre kuvetine 967 µl YPD besiyeri ve 33 µl kültür koyuldu ve böylece 30 kat dilüe edilerek kültürün OD'si ölçüldü. İlk UV uygulamasında 20 kat dilüe etmek az gelmiştir. Bu sefer OD sonucu 0,526 çıkmış gerçek OD değeri ise 15,78 bulunmuştur. Bu sefer ki uygulamada bir OD ünitesinin 1x10⁷ hücre içerdiği düşünülerek hesaplar yapıldı. Bu şekilde 1 ml kültürde ne kadar hücre olduğu hesaplandı. Böylece 15,78 OD ünitesi için 15,8x10⁴ hücre/µl sonucu bulunmuştur. 15,8x10⁴ hücre/µl olan kültürden 1 ml'sinde 2x10⁴ hücre olması için içerisinde 974 µl distile su bulunan ependorfa 126 µl eklenmesi gerektiği hesaplandı. Kültür eklenirken ve eklendikten sonra iyice vorteks yapılarak karışması sağlandı ve pipetleme aşamasının doğru bir şekilde yapılmasına dikkat edildi. Daha sonra yine 4 kere 20 kat dilüe edilerek seri dilüsyon yapıldı. Her petriye 150 µl kültür ekildi. Set 1 petrilere 100 µj/5 sn, set 2 petrilere 100 µj/15 sn ve set 3 petrilere 100 µj/30 sn olacak şekilde her sette 6 petri olmak

üzere 18 adet petriye UV uygulandı. UV uygulamasının ardından petriler 30°C inkübatörde büyümeye bırakıldı. Üç günün sonunda petriler kontrol edilerek koloni sayımı yapıldı. İkinci UV mutajenez uygulamasında da yeterince mutant koloni elde edilemedi. UV mutajenez uygulaması tekrar edildi. Bu UV mutajenez uygulamasında da petrilerin UV'ye tutulma sürelerinin daha kısa tutulmasına karar verildi. Bir gün önceden sıvı besiyerinde suşun büyütülmesi işlemi ilk iki uygulamadaki gibi tekrar edildi. 30 kat dilüe edilmiş bir şekilde OD ölçümü yapıldı. Ölçülen OD değeri 0,738 gerçek OD değeri ise 22 olarak hesaplandı. 1 OD ünitesinde 1 ml'de 1×10^7 hücre olduğu kabul edilerek 22 OD ünitesinde 22×10^4 hücre/ μ l olduğu bulundu. 1 ml'de 2×10^4 hücre olması için 91 μ l kültürün 909 μ l distile suyla karıştırılarak vortekslenmesi gerekmektedir. Bu deneyde 20 kat yerine 10 kat seri dilüsyon yapılmasına karar verildi (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. UV mutajenez deneyinde 10 kat olarak yapılan seri dilüsyon basamağının şematik gösterimi

2×10^4	2×10^3	2×10^2	2×10^1	2×10^0
				
909 μ l ddH ₂ O + 91 μ l 22×10^4 hücre/ μ l olan kültür	900 μ l ddH ₂ O + 100 μ l 2×10^4 hücre/ μ l olan kültür	900 μ l ddH ₂ O + 100 μ l 2×10^3 hücre/ μ l olan kültür	900 μ l ddH ₂ O + 100 μ l 2×10^2 hücre/ μ l olan kültür	4 ml ddH ₂ O + 1ml 2×10^1 hücre/ μ l olan kültür

Bu uygulamada 2 adet petri 100 μ j/1 sn, 6 adet petri 100 μ j/2 sn, 6 adet petri 100 μ j/3 sn, 3 adet 100 μ j/6 sn şeklinde olarak ve 3 adet kontrol olmak üzere toplam 20 tane petriye her birine 150 μ l kültür olacak şekilde yayma ekim yapıldı. Üç günün sonunda petriler kontrol edilerek koloni sayımı yapıldı.

Yeterince koyu renkli ve sağlıklı koloni elde edebilmek amacıyla UV mutajenez deneyi bir kez daha tekrarlandı. Önceki uygulamalarda olduğu gibi suş 10 ml YPD sıvı besiyerinde 30°C inkübatörde bir gün boyunca büyütüldü. 30 kat dilüe edilerek OD ölçümü yapıldı. OD sonucu 0,468 olarak elde edildi ve gerçek OD değerinin 14 olduğu hesaplandı. Bir OD ünitesinde 1 ml'de 1×10^7 hücre olmasına bağlı olarak 14 OD ünitesinde 14×10^4 hücre/ μ l olduğu hesaplandı. 1 μ l'de 2×10^4 hücre olmasını sağlamak için bir 1,5 ml'lik ependorf içerisine 858 μ l distile su ve 14×10^4 hücre/ μ l olan starter kültürden 142 μ l eklemek gerektiği

hesaplandı. Ekleme öncesi ve sonrasında kültürler vorteksle iyice karıştırıldı. Pipetleme hatası yapılmamaya dikkat edildi. Yine 10 kat olacak şekilde seri dilüsyon yapıldı. Seri dilüsyon işleminin ardından YPD katı besiyeri içeren 23 adet petri hazırlandı. Bu deneyde artık uygun UV süresinin 2-3 saniye olduğuna karar verildi. Bu sebeple sadece 2-3 saniye petrilere hazırlandı. Bunlardan 10 adedi set 1 100µj/2sn, 10 adedi set 2 100 µj/3sn olarak hazırlandı. 3 adedi ise kontrol petrisi olmuştur. Tüm petrilere 150 µl 2 hücre/µl kültürden yayma ekim yapıldı. UV işleminin ardından petriler 30 °C inkübatöre kaldırılarak büyümeye bırakıldı. Üç gün sonra petriler incelenerek koloni sayımı yapıldı.

3.3.2. UV mutajenez sonucu oluşan kolonilerin fenotipik taranması ve tek koloni ekim yapılması

UV mutajenez deneylerinin ardından üç gün içerisinde koloniler görünür hale gelmeye başlamaktadır. Ancak istenilen sağlıklı, koyu renkli kolonilerin görünür hale gelmesi yaklaşık 5 gün sürmektedir. Her UV mutajenez uygulamasının ardından üç gün sonra kontrol petrilерinde koloniler oluşmaktadır. Bu koloniler sayılarak not edildi. Beklenen koloni sayısı ile uyumlu olup olmadığı kontrol edildi. Diğer UV mutant kolonilerin oluşmasının ardından petriler incelendi. Çok kırmızı renkli olan kolonilerin petit olmasından şüphelenilmektedir. Yani mitokondrilerinde var olan bir bozukluktan dolayı oksidatif fosforilasyon esnasında asetil-CoA'nın Krebs döngüsünde kullanılmak yerine karoten sentezi için kullanılan mevalonat yolağına gönderildiği ve bu yüzden karoten miktarının artabileceği düşünülmektedir. Bu istenilen bir durum olmadığı için koyu renkli koloniler %3 gliserol içeren YPD katı besiyerine ekilerek petit olup olmadığı kontrol edildi. Test edilen kolonilerden %3 gliserol içeren besiyerinde büyüeyebilen koloniler seçilerek tek koloni ekim yapıldı. Gliserol içeren besiyerinde büyüeyebilmesi o koloninin mitokondriyal bir hasara sahip olmadığını, gliserolü oksidatif olarak tüketebildiğini göstermektedir. Tek koloni ekim yapılırken mümkün olduğunca tek bir koloniden alınarak YPD katı besiyerine tek koloni oluşacak şekilde konsantre bölgeden dilüe edilerek uzaklaştırıldı. Diğer bölgelere taşmamasına dikkat edilerek ekim tamamlandı. Ekim sonuçlarında kolonilerin büyüme hızları değişkenlik gösterebilmektedir. Ancak ortalama olarak üç gün sonunda koloniler tam olarak büyümüş hale gelebilmektedir. Seçilen koloniler tek koloni ekim yapılırken kontrol olarak kontrol petrilерinden aldığımız UV uygulanmamış suşla birlikte ekildi. Kontrol suşuyla mutant suşlar kıyaslanarak seçilecek suşlar belirlendi. Kıyaslama esnasında koloni büyüklüğü, koloninin rengi, büyüme hızı gibi faktörler dikkate alındı. Kontrole göre açık renkli olan

koloniler seçilmedi. Tek koloni ekim sırasında içerisinde çok fazla beyaz renkli koloni taşıyan suşlar sağlıklı olduğu gerekçesiyle elendi. Koloni büyüklüğünün de kontrol suşa yakın olmasına, küçük kolonili suşların seçilmemesine dikkat edildi. Suşlar genellikle 2 saniye ve 3 saniye UV'ye maruz bırakılmış suşlardı. Çünkü bu suşların diğerlerine göre daha sağlıklı olduğu düşünüldü. İdeal UV süresinin 2-3 saniye olduğuna karar verildi. Seçilen koloninin hem sağlıklı hem de koyu renkli olmasına özen gösterildi. Seçilen koloniler en az üç defa YPD katı besiyerine tek koloni ekilerek koloninin renk durumunu ve sağlıklı görünümünü koruyup korumadığı takip edildi. Renk durumu ve sağlıklı görünümü stabil olmayan suşlar elendi. Yeterince koyu renkli ve sağlıklı koloni olması için en az 100 koloninin taranması gerekmektedir. Bu kadar koloni elde edene kadar UV mutajenez deneyine devam edilmiştir. Çok sayıda koloni taranmış içlerinden renk durumu, koloni büyüklüğü, koloni sayısı stabil ve ideale yakın olan suşlar seçilerek dondurulmuştur. Dondurma işleminden önce dondurmaya karar verilen suşların YPD katı besiyerindeki stabilitesi üç defa test edildi. Bu suşlar dondurma işlemine hazırlanırken yeterli miktarda olmaları için YPD katı besiyerinde sıvama şeklinde tek koloni olmasına gerek duyulmadan ekildi. 30 °C inkübatörde büyütüldükten sonra eküvyon çubuğuyla mümkün olduğunca çok miktarda alınarak içerisinde %15 gliserol içeren 1 ml YPD besiyeri bulunan dondurma tüplerinde çözüldü. Gliserol suşların donma sırasında kristalleşmelerini engellemektedir. Suşların gliserollü besiyerinde iyice çözülmesi için vortekslendi ve -80 °C buzdolabında donmaya bırakıldı.

3.3.3. Seçilen suşların sıvı besiyerinde büyütülerek büyüme eğrilerinin çizilmesi

-80 °C buzdolabında dondurulan suşlar YPD katı besiyerine tek koloni oluşturacak şekilde çözüldü. 30 °C inkübatörde büyümeye bırakıldı. Üç gün sonunda büyüyen koloniler alınarak inceleme yapıldı. Kontrol olarak UV'ye maruz bırakılmayan suşta büyütüldü. Bu suşlar 3 kez YPD sıvı besiyerinde 3 gün boyunca 30 °C 300 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde büyütüldü.

- Seçilen suşların her biri için bir tane ve kontrol suş içinde bir tane olmak üzere 100 ml'lik erlenler alındı. Erlenlere 20 ml YPD sıvı besiyeri koyularak suşlardan eküvyon çubuğuyla tek koloni alınarak her suş için bir örnek ekildi. Kapaklarına 10 adet delik delinerek 30 °C 300 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde 3 gün boyunca büyütüldü.

- Her gün inokülasyonun yapıldığı saatte OD 600 nm’de OD ölçümü gerçekleştirildi. İlk gün OD ölçümü yapıldığında tüm suşların OD’si spektrofotometre kuvvetlerine 950 µl YPD besiyeri ve 50 µl kültür koyularak yani 20 kat dilüe edilerek ölçüldü. İlk gün OD ölçümünün ardından suşlar tekrar 30 °C 300 rpm’de çalkalayıcı inkübatörde büyümeye bırakıldı. İlk gün OD ölçümünün ardından bazı suşların OD’si diğerlerine ve kontrole göre düşük çıkmıştı. İkinci gün OD ölçümü yine aynı saatte yapıldı. İlk ölçümlerde OD’si düşük çıkan suşlar yine 20 kat, OD’si normal olan suşlar ise 967 µl YPD besiyerine 33 µl kültür eklenerek 30 kat dilüe edilmiş halde OD değerleri ölçüldü. Yine OD ölçümü yapıldıktan sonra suşların 30 °C 300 rpm’de çalkalayıcı inkübatörde büyütülmesine devam edildi. Üçüncü gün suşlar aynı saatte çalkalayıcı inkübatörden alınarak incelemesi yapıldı. Normal büyüme göstermeyen yavaş büyüyen suşlar 20 kat dilüe edilerek, normal büyüyen suşlar ise 975 µl YPD besiyerine 25 µl kültür eklenerek 40 kat dilüe edilmiş halde OD ölçümü gerçekleştirildi. Sonrasında suşlar yan yana dizilerek inceleme yapıldı. Tüm suşlar kontrol suşuyla OD değerleri ve renk koyuluğu bakımından kıyaslandı. Bazı suşlarda hücre ölümü gerçekleşmeye başlamış kültürün rengi siyahlaşmıştı. Suşların bazıları OD düşüklüğüne bağlı olarak, bazıları ise renk açıklığına bağlı olarak elendi. Elenen ve seçilen suşlar kendi aralarında grup haline getirilerek fotoğrafı çekildi. Sonrasında kontrolle kıyaslandığında OD’si ve rengi en az kontrol suş kadar iyi olan suşların toplanarak saklanmasına karar verildi. Bu işlem şu şekilde gerçekleştirilmiştir:
1. Suşların kültürleri 100 ml’lik erlenlerden 50 ml’lik falkonlara aktarıldı. Bu aşamada kültür kaybı yaşanmamasına dikkat edildi. 50 ml’lik falkonlardaki kültürler 4000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı döküldü. Peletin üzerine 10 ml otoklavlanmış distile su eklendi ve vorteksle iyice karıştırılarak peletin su içerisinde çözülmesi sağlandı.
 2. Bu kültür önceden hassas terazide tartılmış ağırlığı belirlenmiş ve numaralanmış 15 ml’lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Bu tüplerin üzerine içerisinde hangi suşun bulunduğu, hangi besiyerinde kaç gün büyütüldüğü ve toplanıp saklanma tarihleri not edildi. Yine 4000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı döküldü. Peletin üzerine 5 ml otoklavlanmış distile su eklenip yine iyice vortekslenerek pelet suda çözüldü. 4000 rpm’de 2 dakika santrifüj yapılmasının ardından süpernatant döküldü.

3. Peletlerin fotoğrafları çekildi. Sonrasında -80 °C buzbolabında donmaya bırakıldı.
4. Suşların toplanıp saklanması için OD'ler dilüsyon katsayıları ile çarpılarak gerçek OD değerleri hesaplandı. OD değerleri Windows Excel programına aktarıldı.

İlk büyütmenin ardından seçilen 5 adet mutant suş ve kontrol suşu iki kez daha sıvı besiyerinde büyütüldü. Sıvı besiyerinde iki kez büyütülen suşlar için aşağıdaki basamaklar uygulandı:

- 100 ml'lik erlenlere 20 ml YPD sıvı besiyerinden koyularak her erlene bir koloniden eküvyon çubuğuyla az miktarda alınarak ekim yapıldı. Kapaklara 10 adet delik delinerek 30 °C 300 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde 1 gün boyunca büyütüldü. Bu sefer inokülasyon işlemi bu kültürler üzerinden yapıldı. Yani başlangıç kültür yapılmış olundu. Her suştan 2 örnek büyütülmesine karar verildi. Bu büyütme işlemi 250 ml'lik erlende 50 ml YPD sıvı besiyeri içerisinde yapılacaktır.
- Başlangıç kültürler bir günün sonunda çalkalayıcı inkübatörden alınarak 20 kat dilüe edilerek spektrofotometrede OD 600 nm'de OD değerleri ölçüldü ve gerçek OD değerleri hesaplandı. Gerçek OD değerleri üzerinden son hacim 50 ml olacak, OD değeri 0,05 olacak şekilde şu anki başlangıç kültürden her erlene ne kadar eklenmesi gerektiği hesaplandı. Her suş için bu hesap yapıldı. Bulunan miktar kadar başlangıç kültür o suş için hazırlanan iki örneğe de eklendi. Eklenme yapılmadan önce başlangıç kültürün bulunduğu erlen karıştırılarak dibe çökmeler engellendi ve eklenme sonrası da kültür eklenen 250 ml'lik erlenler kültürün iyice besiyeriyle karışması için hafifçe karıştırıldı. Daha sonra kapaklarına yine 10 adet delik delinerek 30 °C 300 rpm'de çalkalayıcı inkübatöre kaldırıldı.
- 3 gün boyunca aynı saatte OD 600 nm'de OD ölçümü yapıldı. İlk gün tüm suşlar 20 kat dilüe edilerek OD ölçüldü. OD ölçümünün ardından 30 °C 300 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde büyütülmeye devam edildi. İkinci gün tüm suşlar 30 kat dilüe edilerek OD ölçümü yapıldı. 3. günde ise tüm suşlar spektrofotometre küvetlerine 980 µl YPD sıvı besiyeri içerisine 20 µl kültür koyularak 50 kat dilüe edilmiş halde OD ölçümü yapıldı.
- 3. günün sonunda tüm suşların fotoğrafları çekildi ve toplanarak saklandı. Her suş için yapılan iki örnekte toplanarak saklandı. İlk sıvı besiyerinde büyütme işleminde olduğu gibi suşlar toplandı. Yine peletlerin fotoğrafları çekildi ve -80 °C

buzdolabında donmaya bırakıldı. Suşların toplanmasının ardından OD değerleri dilüsyon katsayıları ile birlikte Windows Excel programına aktarıldı.

3.3.4. Sıvı besiyerinde büyütülen suşların liyofilizatörde kurutulması

Liyofilizatörde kurutma işlemi sıvı besiyerinde 3 gün boyunca büyütülüp toplanarak peleti elde edilmiş kültürler üzerinde uygulandı. Bu kültürlerden karoten ekstraksiyonu sırasında kullanılan peletlerin kurutulmuş şekilde olması gerekmektedir. Üretilen karoten miktarları kuru hücre ağırlığı başına ne kadar miktar olduğu belirtilerek hesaplanmıştır. Suşların 3 gün boyunca büyütülüp toplanması sırasında kullanılan su miktarının bir kısmı pelet içerisinde kalmaktadır. Bu su -80°C buzdolabında peletlerin dondurulması esnasında hücrelerin içinde donmaktadır. Bu suyun uzaklaştırılması için kullanılan liyofilizasyon işlemi maddenin kurutulması için süblimizasyon sürecine dayanan bir koruma yöntemidir. Buz haline gelmiş su, düşük basınç ortamında az miktarda sıcaklık artışı ile buharlaşabilmektedir [126]. Buharlaşma için yüksek derecede sıcaklıklara ihtiyaç duyulmamaktadır. Deneyde kullanılan liyofilizatörün (Christ 1-2 LD alpha plus, Kanada) toplam buz tutma kapasitesi 2,5 kg ve minimum yoğunlaştırıcı sıcaklığı -55°C 'dir. 8 adet liyofilizasyon flaskı, geniş ağızlı filtrelili şişeler, ampüller ve 3 ısıtmasız raflı kabinde viallerden oluşmaktadır [126]. Suşların liyofilizasyonu işlemi karoten ekstraksiyonu yapılmadan bir gün önce yapılmaktadır. Bir gün öncesinden 3 gün boyunca büyütülüp toplanan suşlar -80°C buzdolabından çıkarıldı. Üzerlerindeki ıslaklığın giderilmesi için silindi. 15 ml'lik santrifüj tüplerinde dondurulmuş olan suşların tüplerinin kapakları açılarak kapak yerine parafilm sarıldı. Parafilm üzerine 4 adet delik delindi. Kapakların açılmasının sebebi liyofilizasyon sırasında buharlaşmanın sağlanabilmesidir. Parafilm sarılan tüplerin kapakları üzerinde numaralar ve tüplerin üzerinde de aynı numaralar bulunmaktadır. Liyofilizasyon işlemi sonrası bu kapaklar ait olduğu tüpe tekrar kapatıldı. Liyofilizasyon öncesinde mod tuşundan ısıtma seçeneği seçilerek 30 dakika ısıtma yapıldı. 30 dakika sonunda tüpler getirilerek ana kurutmayla devam et tuşuna basılarak kurutma işlemine başlandı. Basınç 1 atm idi. Örnekler koyulurken vanaların kapalı olmasına dikkat edildi. 1 gün boyunca liyofilizatörde kuruyan örnekler çıkarılırken bekleme tuşuna basıldı ve pompa durunca vakumu boşaltmak için vanalardan biri yavaş yavaş açıldı. Kapak dikkatlice kaldırılarak örnekler alındı. Her tüpün kapağı ait olduğu tüpe kapatılarak karoten ekstraksiyonu öncesi suşlar ekstraksiyona hazır hale getirildi. Üç defa tekrar edilen suşların sıvı besiyerinde 3 gün büyütülmesi deneyinin her birinde elde edilen tüm suşlar karoten ekstraksiyonu öncesi liyofilizatörde kurutuldu.

3.3.5. Sıvı besiyerinde büyütülen suşlardan karoten ekstre edilmesi

Sıvı besiyerinde 3 gün boyunca, 3 defa büyütülen suşlar uygun bir şekilde toplanarak -80°C buzdolabında donduruldu. Sonrasında -80°C buzdolabından alınarak liyofilizatörde kurutuldu. Suşlardan karoten ekstraksiyonu yapılarak her suş için total karoten ve spesifik karoten miktarları hesaplandı. Ekstraksiyon için Verwaal ve arkadaşlarının 2007 yılına ait çalışmalarındaki protokol karoten ekstraksiyonu sırasında bazı değişikliklere uğratarak optimize edilmiş ve uygulanmıştır [6]. Karoten ekstraksiyonu deneyi iki defa uygulandı. Sıvı besiyerinde suşların büyütülmesi deneyinin ilk uygulamasında 20 ml kültür büyütüldüğü için ve başlangıç kültür üzerinden inokülasyon yapılmadığı için büyütülen ilk suşlardan karoten ekstre edilmemiştir. Suşların sıvı besiyerinde ikinci ve üçüncü defa büyütülmesi sonucunda toplanan tüm suşlardan karoten ekstre edildi. Karoten ekstraksiyonunda suş içindeki karotenleri tutmak için temel olarak kullanılan çözücü heksandır (C_6H_{14}). Heksan alifatik alkanlar grubuna ait renksiz, berrak, uçucu ve parlayıcı bir sıvıdır [127]. Suda çözünmez. Ham petrol arıtma işlemi sırasında yan ürün olarak elde edilmektedir. Maruz kalınması durumunda çeşitli sağlık sorunlarına sebep olabilen tehlikeli bir kimyasaldır [127]. Karotenler gibi organik ve hidrofobik bileşiklerin çözülmesinde sıklıkla kullanılan bir bileşiktir. Deneylerde %99'luk saf heksan kullanıldı. Çünkü heksanın saflık derecesi arttıkça çözücü olarak verimi artmaktadır. Karoten ekstraksiyonu öncesinde deneyde kullanılacak olan tüm cam tüpler, cam pipet uçları heksanla yıkanmaktadır. Çünkü su ve deterjan artığı olan tüplerde ekstraksiyon yapıldığında bu artıklar ölçümleri olumsuz etkilemektedir. Bu deneyler için özel vidalı kapaklı cam tüpler kullanılmıştır. 2. ve 3. karoten ekstraksiyonu sonucu belirlenen total karoten miktarlarının ortalama ve standart sapması hesaplanarak grafik oluşturulmuştur [7]. Maya hücreleri içerisinden karoten ekstraksiyonu şu şekilde yapılmıştır:

- Deneye başlamadan önce eldeki örnek sayısının 3 katı kadar cam tüp çıkarılarak suşların isimleri üzerine etiketlendi.
- -80°C buzdolabından çıkarılan örnekler liyofilize edilerek kurutulmuştu. Bu tüplerin üzerindeki ıslaklık silinerek hassas terazi de her örnek ayrı ayrı tartıldı. Toplam ağırlık olarak tüpün ve içindeki peletin ağırlığı ölçüldü. Daha sonra bu örnekler önceden tartılmış tüpler içerisinde toplanıp saklandığı için toplam ağırlıktan tüpün ağırlığı çıkarılarak net maya ağırlığı hesaplandı. Her suştan iki örnek olarak kültürler

sıvı besiyerinde büyütülmüştü. Bu iki örneğin maya ağırlığının birbiriyle uyumlu olmasına dikkat edildi.

- Suşların koyulacağı 3 set halinde hazırlanmış tüplerin birinci setinde her tüpe 500 µl cam boncuk koyuldu. Bu suşlar zengin besiyeri olan YPD içerisinde büyütüldüğü için fazla miktarda dilüe edilerek 1 ml'sinin kullanılması uygun bulunmuştur. Ancak maya ağırlığı diğer örneklerle göre düşük olan suşlardan birinin iki örneği de sadece 1 ml distile suyla çözülerek bu 1 ml örnek kullanıldı. Maya ağırlığı normal düzeyde olan suşların üzerine 6 ml distile su eklenerek su içerisinde pelet iyice çözüldü. Pelet görünmez oluncaya kadar çözüldükten sonra her örneğin 1 ml'si alınarak cam boncuk koyulan set 1 tüplerine her örnek üzerinde adı yazılı olan tüpe aktarıldı.
- Her örnek 2 dakika olacak şekilde 6 tur halinde toplamda her örnek 12 dakika vorteks yapıldı. Vorteks işlemi sırasında örneklerin kapağa kadar yükselip kapağa bulaşmamasına ve miktar kaybı yaşanmamasına dikkat edildi. Her tur arasında tüpler buz üzerinde bekletilerek soğuması sağlandı. Cam boncuklarla iyice dövülen maya suşlarının hücre duvarı zayıflatılmış oldu. Hücre duvarının zayıflatılmaya çalışılmasının amacı hücrelerden karotenlerin rahatlıkla hücre dışına çıkmasını sağlamaktır.
- Sonrasında her örneğe 2,5 ml %0,2'lik pyrogallol çözeltisinden eklendi. Ekleme aşamasından sonra her örnek 10 saniye vortekslendi. Pyrogallol tüm ekstraksiyon aşamaları boyunca kendisi gibi ısıya ve ışığa karşı duyarlı olan karotenleri korumaktadır.
- Pyrogallolün ardından her örneğe %60'lık KOH çözeltisinden 1,25 ml koyuldu. Her tüp 10 saniye vortekslendi. KOH çözeltisi sabunlaşma tepkimelerinde kullanılmaktadır. Sabunlaşma tepkimelerinde hücrede bulunan yağların ester bağları kırılarak yağlar, gliserole ve K⁺⁺(potasyum) tuzuna dönüştürülür. KOH çözeltisi kullanılmazsa yağlar, yağ asitleri ve gliserole dönüşür. Bu durumda da hücredeki organik ve hidrofobik bileşikler tutan heksan karotenlerden ziyade yağ asitlerini tutacaktır. Bu deneyin sağlıklı ilerleyişi açısından istenmeyen bir durumdur.
- KOH çözeltisinin eklenmesinin ardından tüm örnekler 75 °C sıcak su banyosunda 1 saat tutularak sabunlaşma tepkimesinin gerçekleşmesi sağlandı. Her 15 dakikada bir örnekler çıkarılarak 5-10 sn vorteks yapıldı.

- 1 saat sonunda örnekler alınarak her birinin üzerine 2 ml %99'luk heksan eklendi. 1 dakika vorteks yapıldı ve 2800 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüpte 3 faz oluştu. Dipteki faz cam boncukları, maya hücresinin parçalanması sonucu oluşan protein, karbonhidrat gibi hücresel atıkları içeriyordu. Üst kısım hücrenin içindeki karotenleri tutan ve bu yüzden sarı renk almış heksan idi. Bu kısım pastör pipetleriyle alınarak deney öncesinde hazırlanan 3 set tüpün ikinci setini oluşturan tüplere her örnek kendine ait olan tüpe gelecek şekilde aktarıldı. Bu işlem her örnek için 5 kere tekrar edildi. Her seferinde 2 ml heksan eklendi, 1 dakika vorteks yapıldı ve 2800 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılarak üst fazdaki heksan toplandı. Bu işlemler gerçekleştirilirken laboratuvar ışıkları kapalı bir şekilde çalışıldı. Heksanların toplandığı ikinci settteki tüplerin üzeri alüminyum folyoyla kapatıldı. Mümkün olduğunca sterilizasyona ve heksanın toplanması aşamasında miktar kaybı yaşanmamasına dikkat edildi. Böylece her örneğe 10 ml heksan eklenmiş ve santrifüj sonunda her örnekten 10 ml karotenleri tutmuş heksan elde edilmiş oldu.
- Elde edilen 10 ml çözelti 2800 rpm'de 2 dakika daha santrifüj edildi. Sonrasında bu 10 ml çözeltinin 8 ml'si alınarak son set vidalı kapaklı cam tüplere aktarıldı. Bu 8 ml çözelti speedvac aletinde 40 dakika kapakları açık bir şekilde tutularak içerisindeki heksanın uzaklaştırılması tüpte geriye karotenlerin kalması sağlandı.
- Bu arada geriye kalan 2 ml heksan çözeltisi üzerinden OD 449 nm'de OD ölçümü yapıldı. Kontrol örnek 900 µl heksana 100 µl elde edilen heksan çözeltisinden eklenerek yani 10 kat dilüe edilerek OD okundu. Diğer örnekler 950 µl heksana 50 µl elde edilen heksan çözeltisinden eklenerek yani 20 kat dilüe edilerek OD okundu. Elde edilen OD değerleri Windows Excel programına aktarılarak dilüsyon katsayıları ile birlikte gerçek OD değerleri hesaplandı. Oluşturulan standart eğri üzerinden total karoten miktarları belirlendi.
- 40 dakikanın sonunda tüpler speedvacden alınarak kapakları kapatılmış, alüminyum folyoya sarılmış ve üzerine ekstraksiyon bilgileri not edilmiş şekilde -80 °C buzdolabına kaldırıldı.

3.3.6. HPLC yöntemiyle hücrede üretilen spesifik karoten miktarının belirlenmesi

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), analitik ayırma tekniklerinden biridir. Kantitatif tayinlerde kolaylık sağlaması, duyarlılığı, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasında etkin olması HPLC yönteminin sık kullanılan analitik yöntemler arasında yer almasını sağlamıştır [128]. HPLC cihazında maddelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini temel alarak ayrışmasını sağlayan temel kısım kolondur. Kolon kolon fırını adı verilen bölüm içerisine takılır. Kolon fırını kolonu saklamak ve sıcaklığını sabit bir değerde tutmak için kullanılır [128]. Kolonlar genellikle camdan, çelikten yapılmaktadır. Kolonların içerisinde silika jel taban olarak kullanılmaktadır. Silika kimyasının iyi bilinmesi ve fabrikasyon işlemlerinin kolaylıkla kontrol altında tutulabilmesine bağlı olarak sıklıkla tercih edilmektedir [129]. Silika jeller dar ve çok gözenekli, yüzey alanlı ve düşük miktarda metal içeriğine sahiptir. Basıncın oluşturduğu mekanik etkiye karşı dirençlidir [129]. Genellikle karotenlerin HPLC yöntemiyle ayrıştırılması işlemlerinde C_{18} kolonu kullanılmaktadır. Ancak C_{18} kolonu izokratik veya gradient olarak ayrılmasında kullanılmaktadır. Geometrik ve pozisyonel izomerlerin ayrılmasında elverişli değildir. C_{30} kolon ise farklı karoten izomerlerinin ayrıştırılması, tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesinde büyük bir hassasiyet ve seçicilikle görev yapmaktadır [9]. Deneyde ters faz HPLC yöntemi C_{30} kolon (20x 4,6mm) ile birlikte kullanıldı. A, B, C olmak üzere üç farklı mobil faz hazırlandı. Mobil fazlar hazırlanırken sterilizasyona ve miktar kaybı yaşanmamasına özen gösterildi. A çözeltisi metanol ve distile sudan (%98:2 v/v), B çözeltisi metanol ve distile sudan (%95:5 v/v) ve C çözeltisi tersiyer metil bütıl eterden (%100) oluşmaktadır [9]. Suşların HPLC’de analizi şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

- Suşların içerisinde yüksek miktarda bulunduğu düşünülen β -karoten ve likopen için standart solüsyonlar hazırlandı. β -karoten 0,6 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde, likopen 0,4 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde heksanla dilüe edilerek standart çözeltiler hazırlandı. β -karoten 10 dakika ve likopen 15 dakikada pik oluşturdu. Standart ölçümler üzerinden standart eğri çizildi.
- Daha sonra iki ekstraksiyon sonucu elde edilen karotenler içeriğinin tamamen çözülmesine bağlı olarak heksanla farklı katsayılarla dilüe edilerek HPLC’de analiz edilecek hale getirildi.

- Çözeltiler hazırlandıktan sonra HPLC aletinin çalıştırılması yapıldı. İlk olarak HPLC aletinin bağlı olduğu bilgisayar açıldı.
- Üstten aşağıya kadar HPLC aletine ait tüm düğmeler açıldı.
- Bilgisayar ekranından "Instrument online" programı seçildi.
- A mobil fazı bağlandı. Bu bağlama işlemi esnasında şişe içerisinde hava kabarcığı oluşturmamaya dikkat edildi.
- Sonrasında kolon, kolon fırını içerisine bağlandı. Kolon bağlanırken kolonun iki ucundaki vidalar bağlandı sonra kolon HPLC içindeki kolon hattına yerleştirildi ve iki ucundan aparatlarla sabitlendi.
- Metod kısmından yeni metod seçildi ve akış başlatıldı. Akış hızı 1ml/dk. dir. Kolon sıcaklığı 20 °C ve dalga boyu 450 nm'dir.
- Pompanın düğmesi açılarak 5 dakika çalıştırıldı. Akış 50 µl 1ml/dk olacak şekilde ayarlandı.
- Sonra pompa kapatıldı ve 1 saat kolon yıkama işlemi başlatıldı. Kolon yıkanırken her 15 dakikada bir balans tuşuna basılarak referans değeri sıfırlandı.
- Ekrandaki sekans tuşu tıklandı ve sekans parametreleri seçildi. Alt dizini seçildi. Sekans tablosu açıldı ve örneklerin listesi başlatıldı.
- Sonrasında vial seçildi, örnek adı, metod adı belirlenerek sekans başlatıldı.
- Sekans tamamlandığında bilgisayar ekranında farklı karoten çeşitlerini gösteren pikler oluşmaktadır. Bu pikler farklı dakikalarda görünür hale gelmektedir. Farklı dakikalarda görünür hale gelen piklerin alan büyüklükleri her suşta bulunan farklı karoten miktarlarının hesaplanmasında kullanıldı. β-karoten ve likopenin hangi dakikada pik oluşturduğu bilindiği için bu piklerin hangi karotene ait olduğu saptanmıştır.
- Oluşan pikler suş isimleri ile birlikte Windows Excel programına aktarıldı. Standart ölçümler sonucu elde edilen standart eğri üzerinde oluşan $y=ax+b$ şeklindeki denklemden µg/ml cinsinden spesifik karoten miktarları hesaplandı. Bu denklemden

y değeri karoten miktarını x değeri pik alanını göstermektedir. Bu miktarlar ölçüm yapılmadan önce yapılan dilüsyon katsayıları ile çarpılarak gerçek karoten miktarları belirlendi. Bu ölçümlerin ortalaması ve standart sapması alınarak bir grafik oluşturuldu.

- Bilgisayar ekranında görünür hale gelen suşların HPLC analizi sonucu ortaya çıkan piklerin fotoğrafları çekildi.

Çizelge 3.3.'de görüldüğü gibi HPLC'de kullanılan yöntemde gradient elüsyon 0. dakikada %80 A ve %20 C çözeltisi olacak şekilde gerçekleştirildi. Ardından lineer gradient faz %60 A ve %40 C çözeltisinden olmak üzere 2. dakikada akış hızı 1.4 ml/dk. olacak şekilde gerçekleştirildi. 2.01. dakikada akış hızı 1 ml/dk. değişirken gradient de %60 B ve %40 C çözeltisi olacak şekilde değişti. Lineer gradient 12. dakikada %100 C çözeltisi kullanıldı. 13.dakikada başlangıç koşullarına geri dönüldü. Yeniden kalibrasyonu sağlamak 7 dakika sürmekte ve başlangıç koşulları kullanılmaktadır [9].

Çizelge 3.3. HPLC analizinde kullanılan metodun şematik gösterimi [9]

Süre (dk)	A çözeltisi	B çözeltisi	C çözeltisi
0	%80	%0	%20
2	%60	%0	%40
2.01	%0	%60	%40
12	%0	%0	%100
13	%80	%0	%20
20	%80	%0	%20

3.4. İstatistiksel Analiz

UV mutajenez deneyinin uygulamaları sonucunda seçilen suşların sıvı besiyerinde büyütülmesinin ardından ilk büyütme sonucunda bazı suşlar elenmiştir. 2. büyütme sonucu elde edilen OD değerleri kontrol ve deney olarak gruplar arası analiz edilmiştir. Bu analiz için Friedman testi yapılmıştır. Grup içi analiz olarak 0, 24, 48, 72 saat değerlerinin karşılaştırılması için Mann Whitney testi uygulanmıştır. 3. Büyütme için de aynı testler uygulanarak analiz yapılmıştır. P değerlerinin 0,05'den küçük olduğu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. HPLC ölçümleri sonucunda elde edilen spesifik β -karoten miktarları kontrol ve deney olarak gruplar arası analiz edilmek amacıyla Wilcoxon testi uygulanmıştır. İki karoten ekstraksiyonu sonucunun grup içi karşılaştırılması amacıyla Mann Whitney testi uygulanmıştır. Likopen miktarlarının analizi için de aynı testler

uygulanmıştır. Karoten ekstraksiyonu sonrası spektrofotometrede ölçüm yapılması ile elde edilen total karoten miktarları kontrol ve deney olarak gruplar arası analiz edilmek amacıyla Wilcoxon testine tabi tutulmuş, karoten ekstraksiyonu deneyinin iki uygulamasının karşılaştırılması olarak grup içi analizde Mann Whitney testi uygulanmıştır. P değeri­lerinin 0,05’den küçük olduğu değeri­ler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

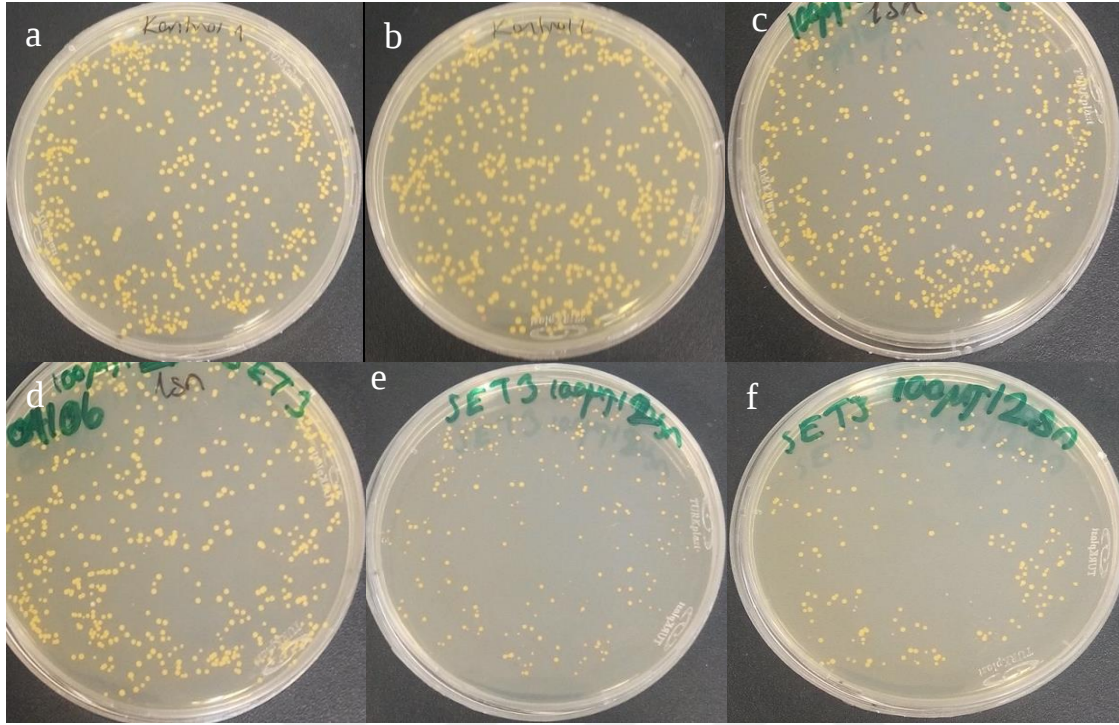




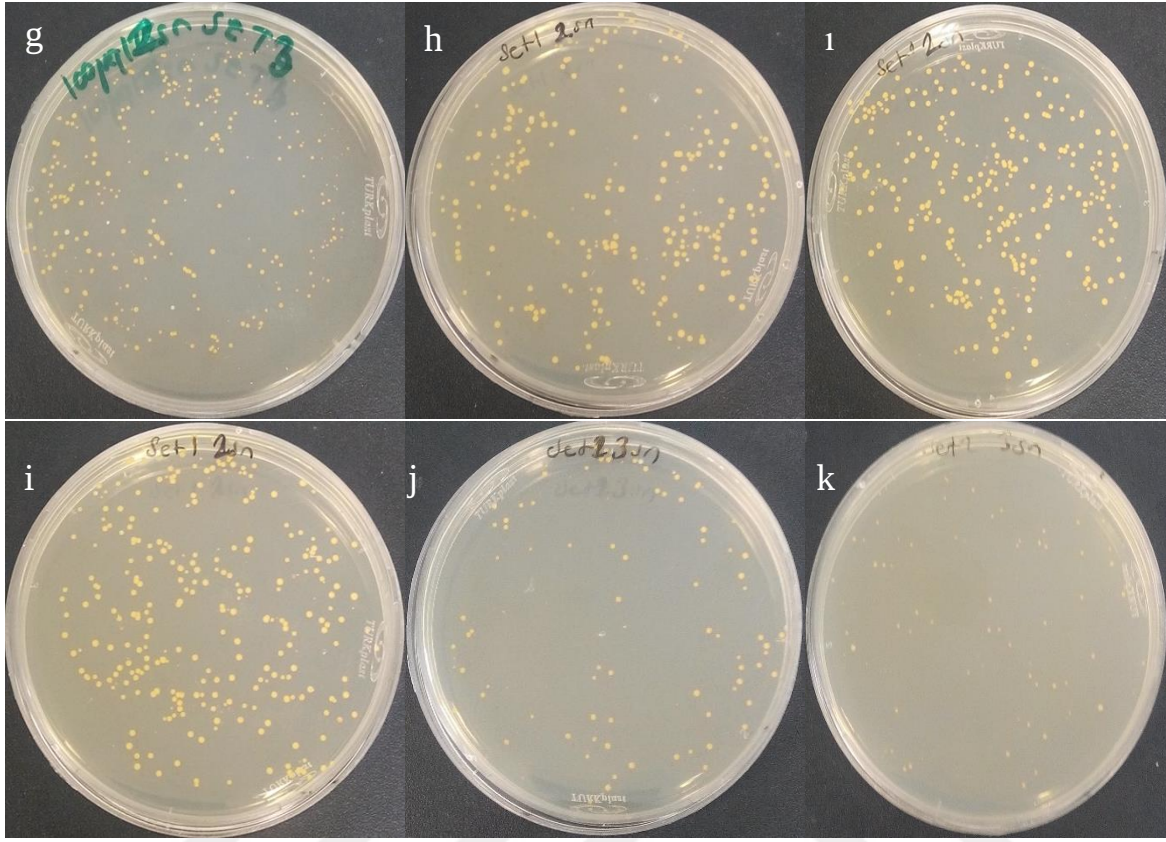
4. BULGULAR

4.1. UV Mutajenez Deneylerinin Sonuçlarının Değerlendirilmesi

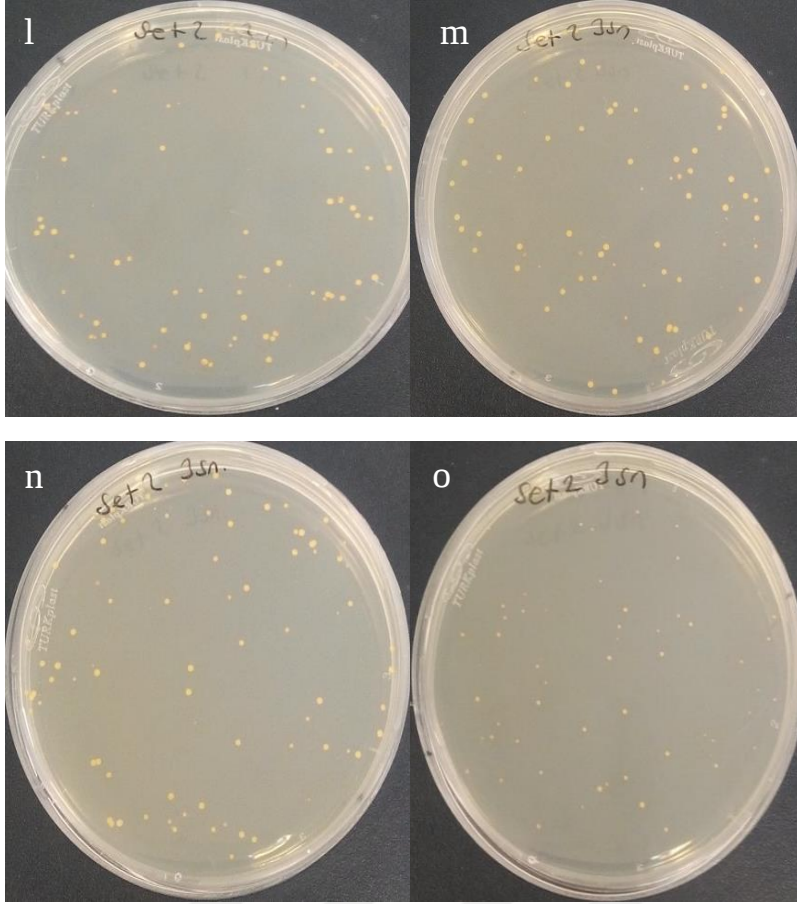
UV mutajenez deneyinin dört kere uygulanmasında her uygulamada farklı sayıda koloni elde edilmiştir. İlk uygulamada yapılan set 1 petrilere $100 \mu\text{j}/\text{cm}^2$ olarak 1 dakika, set 2 petrilere $100 \mu\text{j}/\text{cm}^2$ olarak 2 dakika, set 3 petrilere ise $100 \mu\text{j}/\text{cm}^2$ ise olarak 3 dakika UV uygulaması maya kolonileri için ölümcül olmuştur. UV mutajenez deneyinin ikinci uygulamasında petrilere UV'ye maruz bırakılma süreleri kısaltılmıştır. Set 1'in 6 petrisine $100 \mu\text{j}/5 \text{ sn}$, set 2'nin 6 petrisine $100 \mu\text{j}/15 \text{ sn}$ ve set 3'ün 6 petrisine $100 \mu\text{j}/30 \text{ sn}$ UV uygulanmıştır. Kontrol petrilere UV uygulaması yapılmamıştır. Ancak bu uygulamada kontrol petrilere ilk uygulamaya göre daha az sayıda koloni oluşmuştur. Kontrol petrilere 31, 48 ve 45 adet koloni oluşmuştur. Bu kadar az sayıda koloni oluşmasının sebebinin ilk uygulamada 1 OD ünitesinde 3×10^7 hücre/ μl şeklinde hesaplama yapılmasına rağmen bu uygulamada 1×10^7 hücre/ μl eşitliğinin temel alınması olduğu düşünülmektedir. Set 2 $100 \mu\text{j}/15 \text{ sn}$ UV ve set 3 $100 \mu\text{j}/30 \text{ sn}$ UV uygulaması sonucunda hiçbir koloni büyümesi gözlenmemiştir. Set 1 $100 \mu\text{j}/5 \text{ sn}$ UV uygulamasında ise 6 adet petriden toplam 10 adet koloni elde edilmiştir. Bu koloniler kontrolle kıyaslandığında koyu renkli olan kolonilerdir. Bu koloniler YPD katı besiyerine tek koloni ekim yapılarak renk ve sağlık durumu stabilitesi incelenmiştir. Bu kolonilerin kontrolle kıyaslandığında kontrolden daha koyu bir renge sahip olmamaları ve petit olmaları gerekçesiyle ilk tek koloni ekimden sonra elenmiştir. UV mutajenez deneyinin üçüncü uygulamasında UV süreleri daha da kısaltılmıştır. Sonuçta 2 adet petri $100 \mu\text{j}/1 \text{ sn}$, 6 adet petri $100 \mu\text{j}/2 \text{ sn}$, 6 adet petri $100 \mu\text{j}/3 \text{ sn}$, 3 adet $100 \mu\text{j}/6 \text{ sn}$ şeklinde UV'ye maruz bırakılmıştır (Resim 4.1.). Petrilere 3 gün sonra incelendiğinde kontrol petrilere 481, 473 ve 511 koloni oluşmuştur. Kontrol petrilere bu uygulamada fazla sayıda koloni oluşmasının nedeni 20 kat yerine 10 kat seri dilüsyon yapılarak yayma ekim uygulanmasıdır. Bu uygulama sonucunda çok sayıda koloni fenotipik olarak tarandı. $100 \mu\text{j}/1 \text{ sn}$ petrilere 1 tane koloni, $100 \mu\text{j}/2 \text{ sn}$ petrilere 29 koloni, $100 \mu\text{j}/3 \text{ sn}$ petrilere 25 koloni, $100 \mu\text{j}/6 \text{ sn}$ petrilere 5 koloni seçilmiştir. Seçilen bu koloniler YPD katı besiyerine tek koloni ekim yapılmış renk koyuluğunun ve sağlık durumunun stabilitesi izlenmiştir. Bu kolonilerin bir kısmının petit olduğu düşünülerek %3 gliserol içeren YPD besiyerinde büyümesi gözlenmiş petit olmadığına karar verilen suşların büyütülmesine devam edilmiştir.



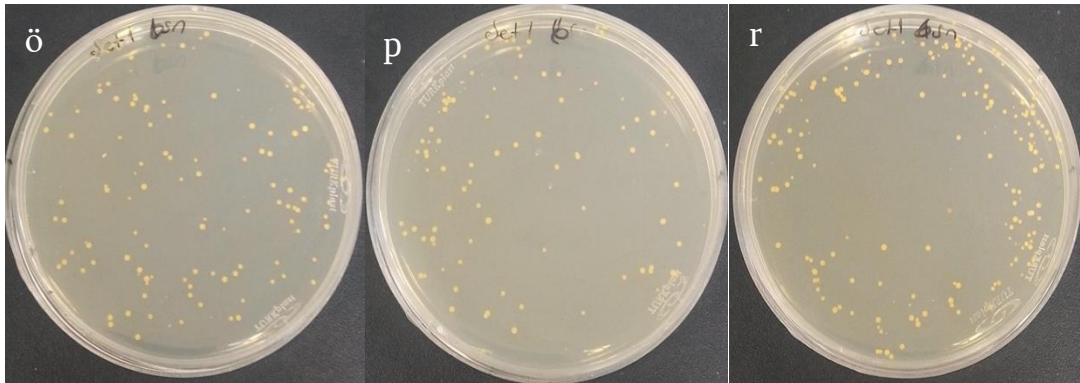
Resim 4.1. UV mutajenez deneyinin üçüncü uygulamasında elde edilen koloniler a. kontrol 1 petrisi b. kontrol 2 petrisi c. 100 μ j/1 sn-1 petrisi d. 100 μ j/1 sn-2 petrisi e. 100 μ j/2 sn-1 petrisi f. 100 μ j/2 sn-2 petrisi



Resim 4.1. (devam) UV mutajenez deneyinin üçüncü uygulamasında elde edilen koloniler g. 100 μ j/2 sn-3 petrisi h. 100 μ j/2 sn-4 petrisi ı. 100 μ j/2 sn-5 petrisi i. 100 μ j/2 sn-6 petrisi j. 100 μ j/3 sn-1 petrisi k. 100 μ j/3 sn-2 petrisi



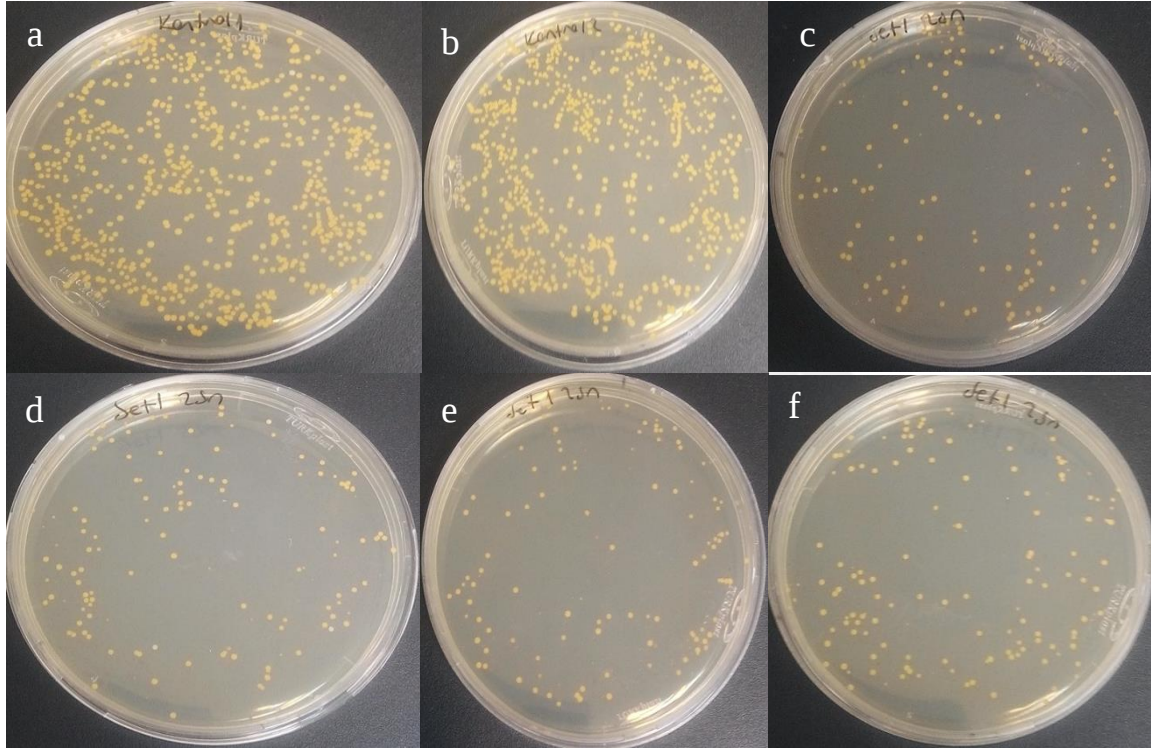
Resim 4.1. (devam) UV mutajenez deneyinin üçüncü uygulamasında elde edilen koloniler
 l. 100 μ j/3 sn-3 petrisi m. 100 μ j/3 sn-4 petrisi n. 100 μ j/3 sn-5 petrisi o. 100
 μ j/3 sn-6 petrisi



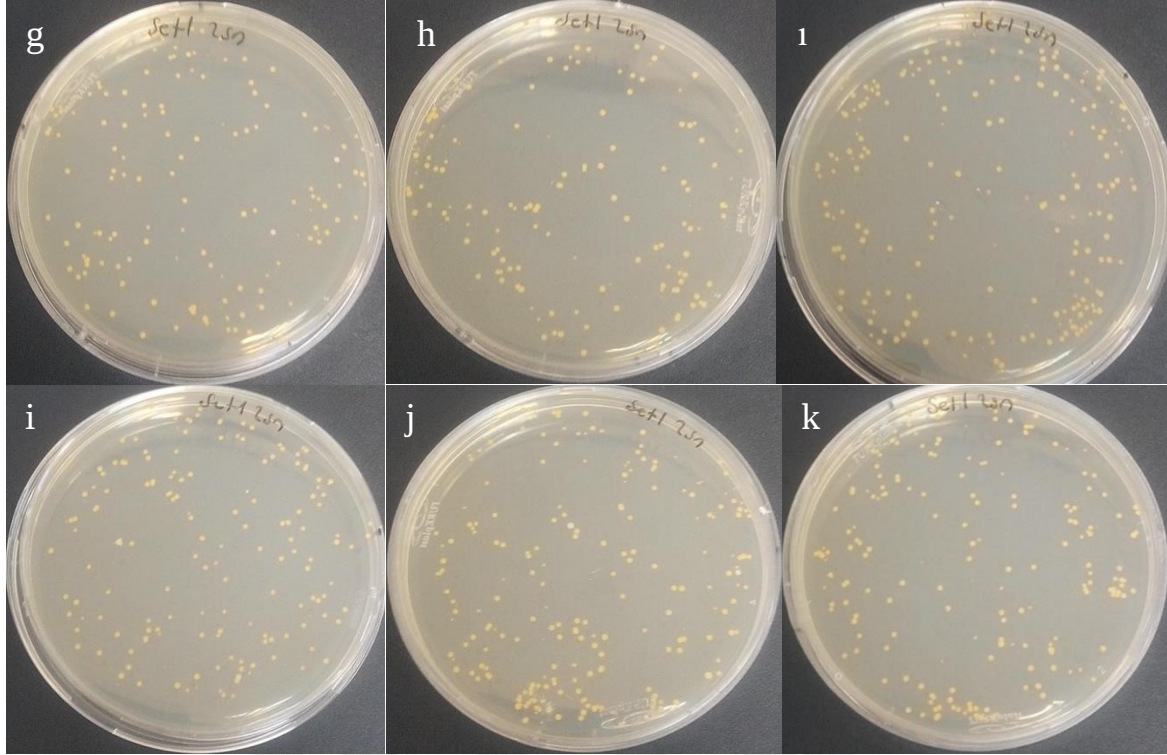
Resim 4.1. (devam) UV mutajenez deneyinin üçüncü uygulamasında elde edilen koloniler
 ö. 100 μ j/6 sn-1 petrisi p. 100 μ j/6 sn-2 petrisi r. 100 μ j/6 sn-3 petrisi

UV mutajenez deneyinin üçüncü uygulamasında 100 μ j/2 sn ve 100 μ j/3sn petrilerinde oluşan koloniler tercih edildi. Çünkü seçilen kolonilerin hem sağlıklı hem de koyu renkli olması istenmektedir. Az sürede UV'ye maruz bırakılan kolonilerin diğerlerine göre daha sağlıklı olacağı düşünülmüştür. Bu uygulamanın ardından uygun UV süresinin 2-3 sn olduğu tespiti yapılmıştır. Ancak seçilen kolonilerin hepsinin sağlık durumunun ve renk

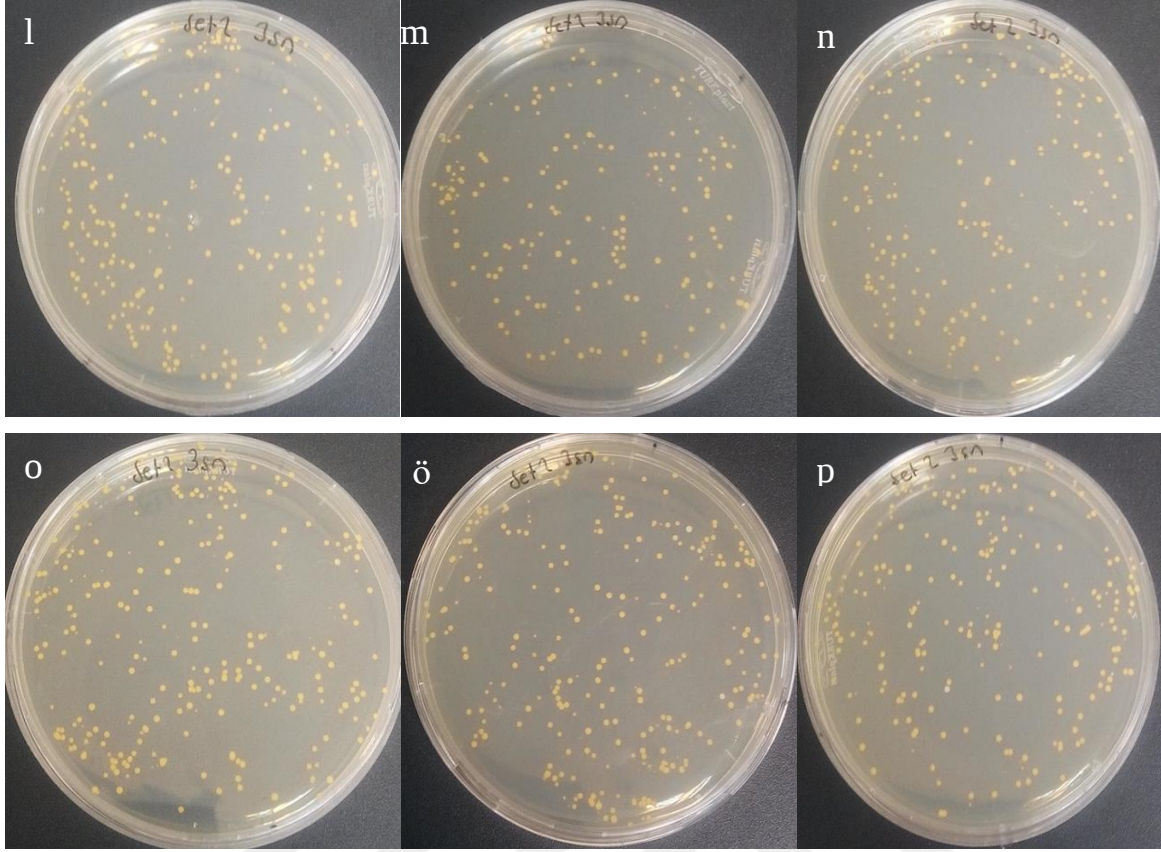
koyuluğunun stabilite gösteremeyeceği düşünülerek daha fazla koloni elde etmek amacıyla UV mutajenez deneyi bir kez daha tekrarlanmıştır. UV mutajenez deneyinin dördüncü uygulamasında 10 adet 100 μ j/2 sn ve 10 adet 100 μ j/3 sn petrisi oluşturulmuştur. Seri dilüsyon aşamasında yine 10 kat dilüsyon yapılarak yayma ekim yapılmıştır. Bunun sonucunda kontrol petrilerinde 769, 775, 805 koloni oluşmuştur. Kontrol petrilerinde fazla koloni oluşması bu hücrelerin UV mutant olmamalarıyla açıklanmaktadır (Resim 4.2.).



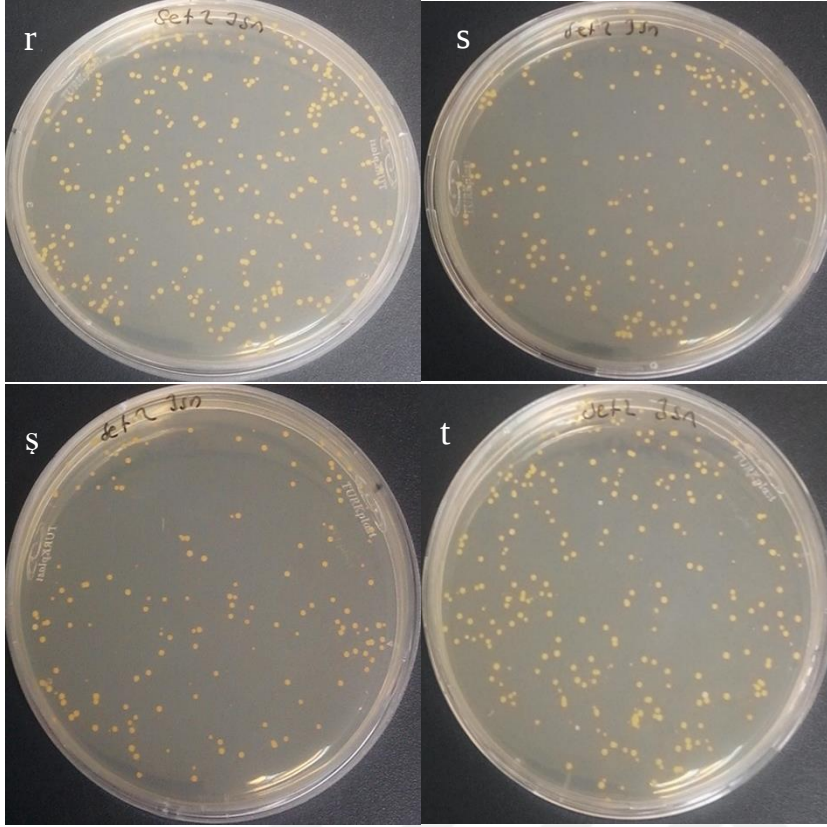
Resim 4.2. UV mutajenez deneyinin dördüncü uygulamasında elde edilen koloniler
a.kontrol 1 petrisi b. kontrol 2 petrisi c. 100 μ j/2 sn-1 petrisi d. 100 μ j/2 sn-2
petrisi e. 100 μ j/2 sn-3 petrisi f. 100 μ j/2 sn-4 petrisi



Resim 4.2. (devam) UV mutajenez deneyinin dördüncü uygulamasında elde edilen koloniler g. 100 μ j/2 sn-5 petrisi h. 100 μ j/2 sn-6 petrisi i. 100 μ j/2 sn-7 petrisi i. 100 μ j/2 sn-8 petrisi j. 100 μ j/2 sn-9 petrisi k. 100 μ j/2 sn-10 petrisi



Resim 4.2. (devam) UV mutajenez deneyinin dördüncü uygulamasında elde edilen koloniler
l. 100 μ j/3 sn-1 petrisi m. 100 μ j/3 sn-2 petrisi n. 100 μ j/3 sn-3 petrisi o. 100 μ j/3
sn-4 petrisi ö. 100 μ j/3 sn-5 petrisi p. 100 μ j/3 sn-6 petrisi



Resim 4.2. (devam)UV mutajenez deneyinin dördüncü uygulamasında elde edilen koloniler r. 100 μ j/3 sn-7 petrisi s. 100 μ j/3 sn-8 petrisi ş. 100 μ j/3 sn-9 petrisi t. 100 μ j/3 sn-10 petrisi

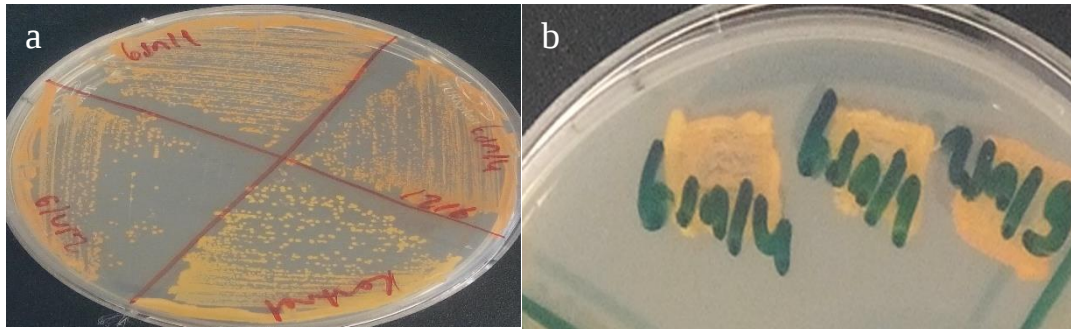
UV mutajenez deneyinin dört kez uygulamasının sonucunda çok sayıda koloni elde edilmiştir. Dördüncü uygulamadan da yeterince koloni elde edilmesine bağlı olarak UV mutajenez deneyi tekrarlanmamıştır.

4.2. UV Mutajenez Deneyi Sonucunda Oluşan Kolonilerin Fenotipik Taranmasının Sonuçları

UV mutant olan yeterli sayıda koloni oluşması için UV mutajenez deneyi dört defa tekrar edilmiştir. UV sonucu ilk mutant kolonilerin elde edilmesi ancak UV mutajenez deneyinin ikinci uygulaması sonucunda gerçekleşmiştir. UV mutajenez deneyinin dört uygulaması sonucu 219 koloni seçilerek YPD katı besiyerine ve %3 gliserol içeren YPD katı besiyerine ekilmiştir. Bunlardan büyük bir kısmı elenmiştir. 15 suş seçilerek YPD sıvı besiyerinde büyütme deneyine tabi tutulabilmiştir. Bu eleme aşamalarında en az 3 defa YPD katı besiyerinde tek koloni ekim yapılarak renk koyuluğunun ve sağlık durumunun stabilitesi gözlenmiştir. Bazı koloniler ise %3 gliserol içeren YPD katı besiyerinde üreyemedikleri yani

petit oldukları için elenmiştir. YPD sıvı besiyerinde suşların ilk büyütülmesinin ardından bir kısmı daha elenmiştir. UV mutajenez deneyinin üçüncü uygulamasında 2 adet petri 100 μ j/1 sn, 6 adet petri 100 μ j/2 sn, 6 adet petri 100 μ j/3 sn, 3 adet petri 100 μ j/6 sn şeklinde UV'ye maruz bırakılmıştır. UV mutajenez deneyinin üçüncü uygulamasının ardından 4-5 gün geçtikten sonra koyu renkli koloniler görünür hale gelmiştir. Bu uygulamada 100 μ j/1 sn kolonilerinden 1 adet, 100 μ j/2 sn kolonilerinden 29 adet, 100 μ j/3 sn kolonilerinden 25 adet, 100 μ j/6 sn kolonilerinden 13 adet koloni alınarak YPD katı besiyerine tek koloni ekim yapılmıştır.

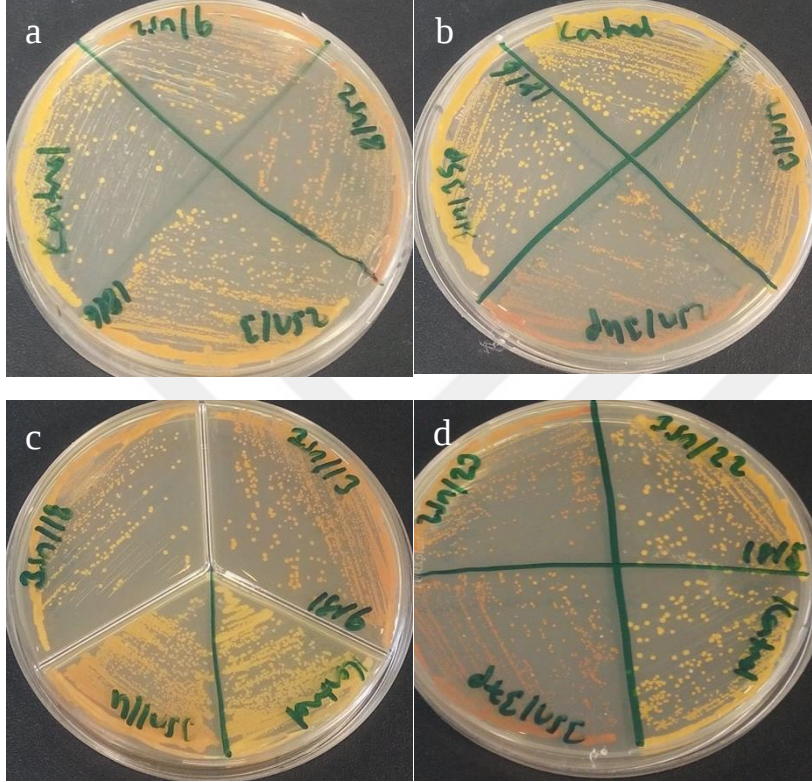
Sadece 100 μ j/2 sn 9, 100 μ j/6 sn 1 ve 4 nolu koloniler kontrolle kıyaslandığında daha koyu bir renge sahip olmalarına bağlı olarak tekrar YPD katı besiyerine tek koloni ekimi yapılmıştır. 2 gün sonra yine petrieler incelenmiştir ve bu kolonilerde renk koyuluğu ve sağlık durumu stabildir (Resim 4.3.). 3 kez YPD katı besiyerinde tek koloni ekim yapılarak renk ve sağlık durumunun stabilitesi gözlenen 100 μ j/2 sn 9, 100 μ j/6 sn 1 ve 4 nolu kolonilerin %15 gliserol içeren YPD sıvı besiyerine ekilerek dondurulması kararı verilmiştir. Bu koloniler dondurulmadan önce fazla miktarda elde edilmek amacıyla YPD katı besiyerine sıvama şeklinde ekilmiştir. 2 gün sonra petride büyüyen koloniler eküvyon çubuğuyla toplanarak 1 ml %15 gliserol içeren YPD sıvı besiyerine ekilmiştir.



Resim 4.3. UV mutajenez deneyinin üçüncü uygulamasında seçilen koloniler a.100 μ j/2 sn 9, 100 μ j/6 sn 1,4 nolu kolonilerin YPD katı besiyerine tek koloni ekimi b. 100 μ j/2 sn 9, 100 μ j/6 sn 1,4 nolu kolonilerin dondurulmadan önceki yama ekimi

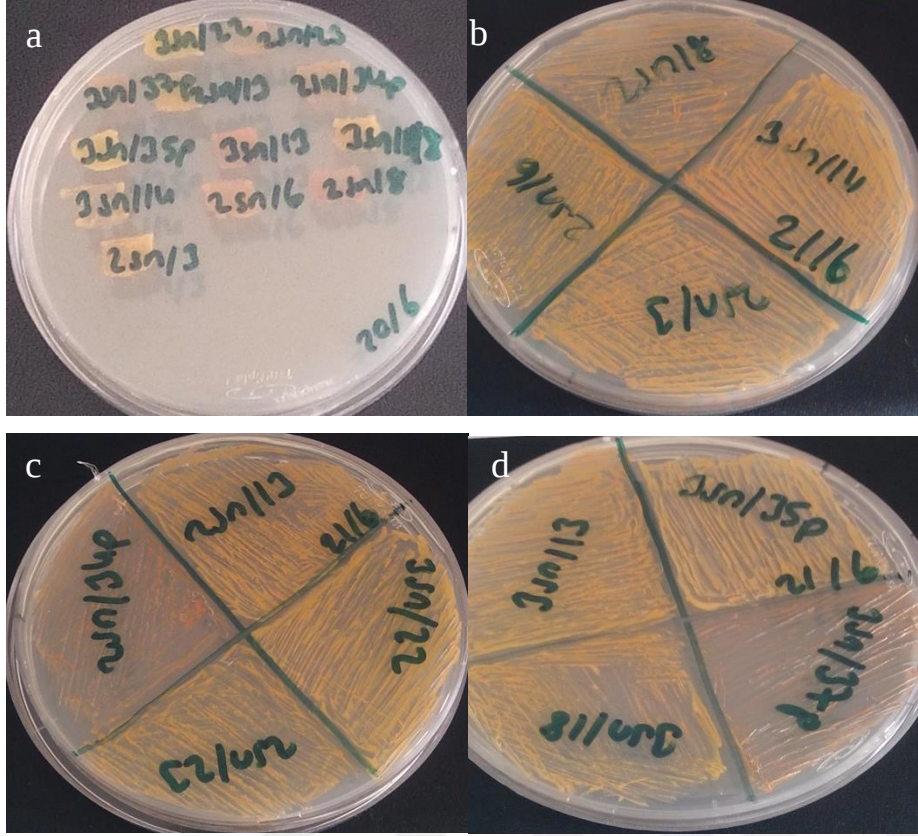
UV mutajenez deneyi sonucu ilk dondurulan koloniler bu kolonilerdir. UV mutajenezin üçüncü uygulamasında 68 koloni seçilmiş bu koloniler aşama aşama elenerek geriye sadece 3 koloninin dondurulması uygun görülmüştür. Ancak çalışmamızın amacına ulaşması için daha fazla koloni elde etmek gerekmektedir. Bu amaçla UV mutajenez deneyi bir kez daha tekrarlanmıştır. Bu uygulamada yalnızca 2 sn ve 3 sn UV süreleri kullanılmıştır. 10 adet YPD petriye 100 μ j/2 sn ve 10 adet YPD petriye 100 μ j/3 sn şeklinde UV uygulanmıştır. 4

gün sonra petriler kontrol edilmiş ve UV'ye maruz bırakılan petrilerden toplam 141 koloni seçilerek incelenmiştir. 100 μ j/2 sn 3, 6, 8, 13, 23, 34p nolu koloniler ve 100 μ j/3 sn 13, 14, 18, 22, 35p ve 37p nolu kolonilerin kontrole göre daha koyu renkli olması ve sağlıklı olmaları nedeniyle dondurulmasına karar verilmiştir (Resim 4.4.).



Resim 4.4. UV mutajenez deneyinin dördüncü uygulamasında seçilen kolonilerin tek koloni ekimlerinin sonuçları a. kontrol, 100 μ j/2 sn 3, 6, 8 nolu kolonilerin tek koloni ekimi b. kontrol, 100 μ j/2 sn 13, 34p, 100 μ j/3 sn 35p nolu kolonilerin tek koloni ekimi c. kontrol, 100 μ j/2 sn 13, 100 μ j/3 sn 14, 18 nolu kolonilerin tek koloni ekimi d. kontrol, 100 μ j/2 sn 23, 100 μ j/3 sn 22, 37p nolu kolonilerin tek koloni ekimi

Bu kolonilerin tamamı dondurulmadan önce seçilerek YPD katı besiyerine yama şeklinde ekilmiştir. Ertesi gün büyüyen koloni ekimleri yine YPD katı besiyerine sıvama şeklinde ekilmiştir. Büyüyen koloniler %15 gliserol içeren YPD sıvı besiyeri içerisine ekilerek donduruldu. UV mutajenez deneyinin dördüncü uygulaması sonucunda toplam 141 koyu renkli koloni seçilmiş bunlardan yalnızca 12 tanesi renk koyuluğunu ve sağlık durumunu stabil tutarak dondurulma aşamasına kadar gelebilmiştir (Resim 4.5.). UV mutajenez deneyinin üçüncü uygulaması sonucunda da 3 koloni dondurulmuştur. UV mutajenez deneyinin tüm uygulamaları sonucunda 15 koloni seçilerek dondurulmuştur. Bu kolonilerin renk koyuluğu ve sağlık durumu daha sonra YPD sıvı besiyerinde de test edilmiştir.



Resim 4.5. UV mutajenez deneyinin dördüncü uygulaması sonucunda seçilen kolonilerin yama ve sıvama ekimleri a. Dondurulmasına karar verilen 12 koloninin YPD katı besiyerindeki yama ekimi b. 100 μ j/2 sn 3, 6, 8 100 μ j/3 sn 14 nolu kolonilerin YPD katı besiyerindeki sıvama ekimi c. 100 μ j/2 sn 13, 23, 34p, 100 μ j/3 sn 22 nolu kolonilerin YPD katı besiyerindeki sıvama ekimi d. 100 μ j/3 sn 13, 18, 35p, 37p nolu kolonilerin YPD katı besiyerindeki sıvama ekimi

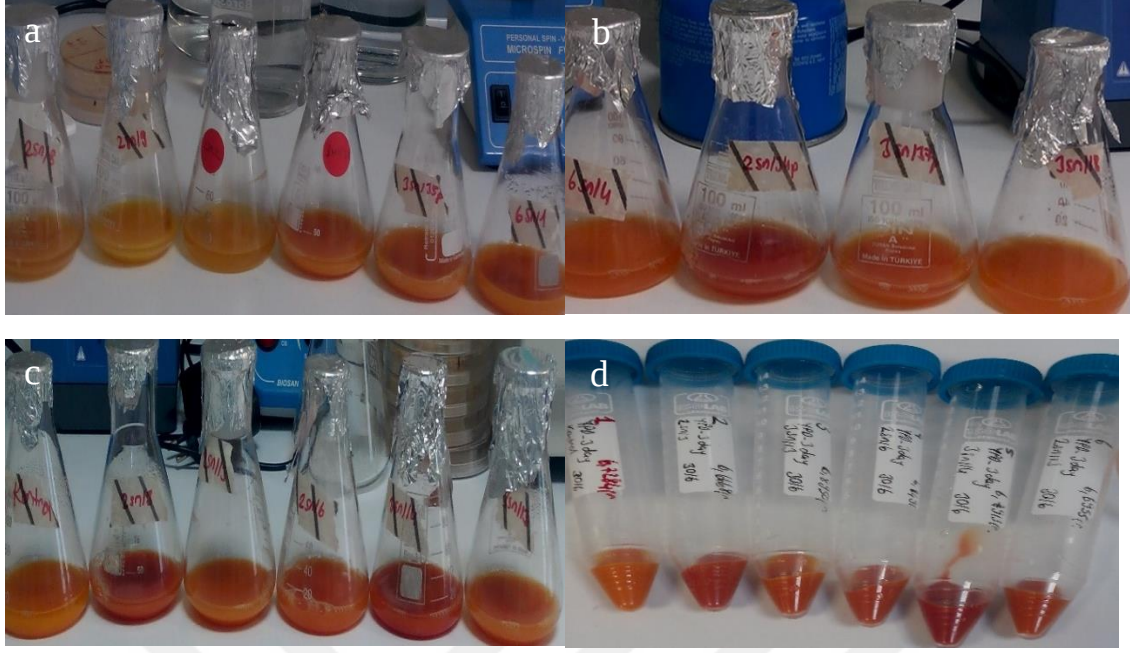
4.3. Seçilen Suşların Sıvı Besiyerinde Büyütülmesinin Sonuçları ve Büyüme Eğrileri

UV mutajenez deneyinin dört uygulaması sonucunda seçilen 15 koloni -80 $^{\circ}$ C buzdolabında dondurulmuştu. Dondurulan tüm koloniler kontrol suşla birlikte YPD katı besiyerine ekilmiştir. 3 gün sonra büyüyen koloniler 30 $^{\circ}$ C inkübatörden alınarak sıvı besiyerinde büyütülmüştür. 3 gün boyunca tüm suşların OD değerleri ölçülmüştür. Çizelge 4.1.'de görüldüğü gibi 72 saat ölçümlerinde OD değerleri azalmaya başlamıştır. Yani suşlar 3 günden fazla büyütüldüğünde OD değerleri düşmekte hücre ölümü gerçekleşmektedir.

Çizelge 4.1. Suşların sıvı besiyerinde ilk defa büyütülmesi sırasında ölçülen 24, 48, 72 saat OD değerleri

Suş Adı	24 Saat OD Değerleri	48 Saat OD Değerleri	72 Saat OD Değerleri
Kontrol	14,92	20,37	17,16
2 sn/3	12,18	34,5	17,24
2 sn/6	7,96	48,6	10,12
2 sn/8	6,54	7,05	1,16
2 sn/9	8,06	11,34	10,44
2 sn/13	12,34	18,51	15,48
2 sn/23	5,98	6,96	3,12
2 sn/34p	2,78	3,62	3,94
3 sn/13	7,7	41,82	9,48
3 sn/14	13,68	19,47	15,96
3 sn/18	4,98	6,32	4,22
3 sn/22	13,82	20,01	15,24
3 sn/35p	13,92	42,45	18,48
3 sn/37p	5,38	7,26	5,46
6 sn/1	9,32	21,72	14,48
6 sn/4	5,76	5,56	3,92

OD ölçümünün yapılmasının ardından tüm suşlar kontrolle kıyaslanarak renk açıklığı veya OD değerinin düşük olmasına bağlı olarak az büyüme gösteren bazı suşlar elenmiştir (Resim 4.6.). Bazı suşların ise rengi koyu olmasına rağmen OD değerlerinin düşük olmasına bağlı olarak sağlıklı suşlar olduğu düşünülmüştür. Rengi açık olduğu için elenen suşlar 100 µj/2 sn 8, 9, 23, 100 µj/3 sn 22, 35p, 100 µj/6 sn 1'dir. Bu suşlardan 100 µj/2 sn 8'de hücre ölümü gerçekleşmiş, kültürün rengi matlaşıp siyahlaşmaya başlamıştı. OD'si düşük sağlıklı suşlar 100 µj/2 sn 34p, 100 µj/3 sn 18, 37p, 100 µj/6 sn 4'dür. Kontrol, 100 µj/2 sn 3, 6, 13, 100 µj/3 sn 13, 14 suşları ise sıvı besiyerinde ilk büyütme sonucunda toplanarak saklanan suşlardır. Suşların sıvı besiyerinde ilk büyütmesinde kontrol dışında toplamda 15 suş büyütülmüş 3 günün sonunda bu suşlardan 10 tanesi OD düşüklüğü ve renk açıklığı nedenleriyle elenmiş geriye kalan 5 suş kontrol ile birlikte toplanarak saklanmıştır. Bu suşlar içinde hem OD yüksekliği hem de renk koyuluğu açısından en iyi gelişim gösteren suş ise 100 µj/3 sn 14'dür.



Resim 4.6. Suşların sıvı besiyerinde ilk defa büyütülmesinin kültür ve peletleri a.rengi açık olduğu için elenen 100 µj/2 sn 8, 9, 23, 100 µj/3 sn 22, 35p, 100 µj/6 sn 1 suşlarının kültürleri b. OD'si düşük olduğu için elenen 100 µj/6 sn 4, 100 µj/2 sn 34p, 100 µj/3 sn 37p,18 suşlarının kültürleri c. toplanıp saklamasına karar verilen kontrol, 100 µj/2 sn 3, 13, 6, 100 µj/3 sn 14, 13 suşlarının kültürleri d. toplanıp saklamasına karar verilen kontrol, 100 µj/2 sn 3, 100 µj/3 sn 13, 100 µj/2 sn 6, 100 µj/3 sn 14, 100 µj/2 sn 13 suşlarının peletleri

Seçilen suşların sıvı besiyerinde ikinci kez büyütülmesinde ilk büyütmenin sonucunda seçilen kontrol, 100 µj/2 sn 3, 6, 13, 100 µj/3 sn 13, 14 suşları kullanılmıştır. 1 gün önceden hazırlanan başlangıç kültürlerin OD'si ölçüldükten sonra başlangıç hacmi 50 ml ve başlangıç OD'si 0,05 olacak şekilde hesaplar yapıldı. Her suş için örneklere başlangıç kültürden ne kadar eklenmesi gerektiği belirlendi.

Çizelge 4.2. Seçilen suşların sıvı besiyerinde ikinci kez büyütülmesinde kullanılan başlangıç kültürlerin OD değerleri ve başlangıç kültürden alınan miktarlar

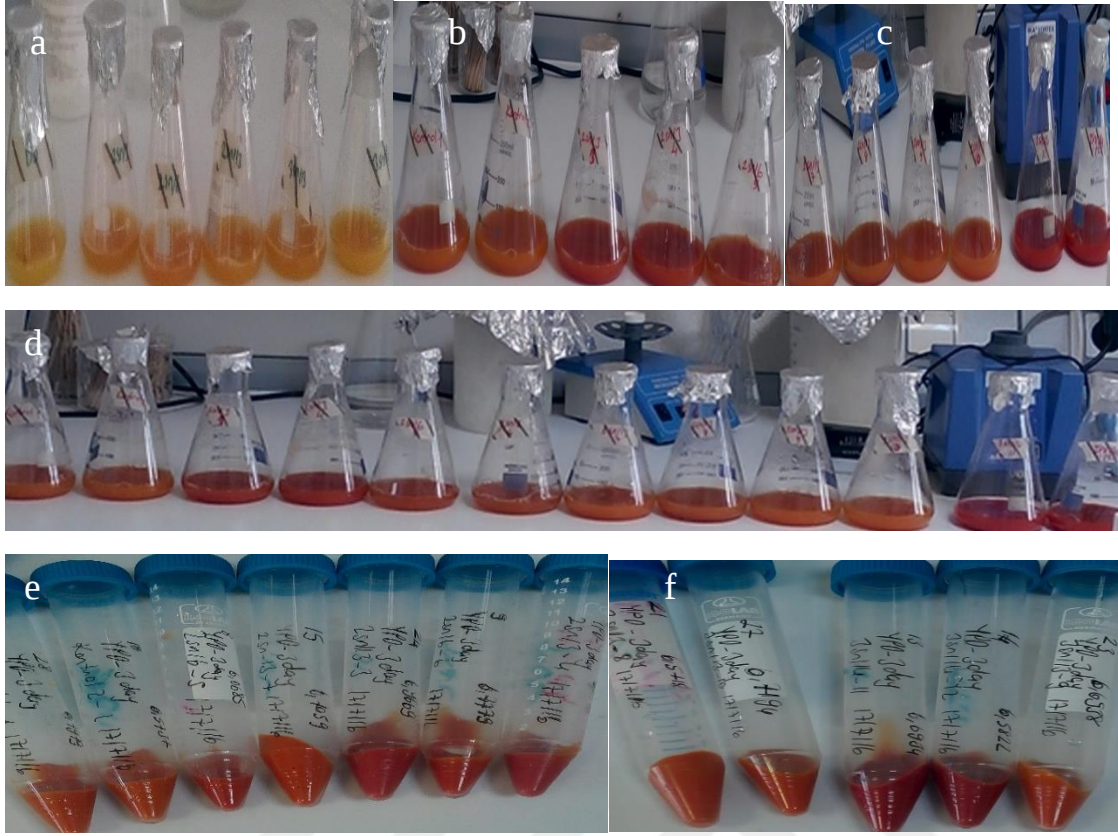
Suş Adı	OD Değeri	Kültürden Kullanılan Miktar (µl)
Kontrol	11,42	219
2 sn/3	6,98	358
2 sn/6	7,1	352
2 sn/13	7,74	322
3 sn/13	6,92	361
3 sn/14	8,16	306

3 gün boyunca OD değerleri ölçülerek Windows Excel programına aktarılmıştır (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. Seçilen suşların sıvı besiyerinde büyütülmesinin ikinci uygulaması sırasında ölçülen 0, 24, 48, 72 saat OD değerleri

Suş Adı	0 Saat	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Kontrol 1	0,05	12,5	14,49	18,5
Kontrol 2	0,05	12,34	15	16,2
2 sn/3-3	0,05	10,76	16,5	19,7
2 sn/3-4	0,05	11,06	16,26	20,45
2 sn/6-5	0,05	6,76	6,33	9,6
2 sn/6-6	0,05	7,22	7,17	11,15
2 sn/13-7	0,05	11,06	17,76	20
2 sn/13-8	0,05	11,5	18,24	22,75
3 sn/13-9	0,05	8,04	8,85	14,65
3 sn/13-10	0,05	8,1	9,09	14,35
3 sn/14-11	0,05	13,44	21,36	25,25
3 sn/14-12	0,05	13,12	20,97	26,8

Suşların isimlerinin yanında bulunan ikinci rakamlar suşların çalkalayıcı inkübatörde kaç numaralı yerde büyüdüğünü göstermektedir. İnkübatörün içinde hava üfleyen fan kısmına yakın olan suşlarda koyu renk gözlenebilmektedir. Oksijen varlığı beta karoten ve likopen üretimini etkileyebilmektedir. 3 gün boyunca OD'si ölçülen suşların hepsi 3. günün sonunda toplanarak -80 °C kaldırılmıştır (Resim 4.7.). Tüm suşlar içerisinde en koyu renge sahip suş yine 100 µj/3 sn 14'dür.



Resim 4.7. Suşların sıvı besiyerinde ikinci defa büyütülmesinin kültür ve peletleri a.kontrol, 100 μ j/2 sn 3, 6, 13, 100 μ j/3 sn 13, 14 suşlarının başlangıç kültürleri b.kontrol 1, kontrol 2, 100 μ j/2 sn 3-3, 3-4, 6-5 suşlarının kültürleri c. 100 μ j/2 sn 6-6, 13-7, 13-8, 100 μ j/3 sn 13-9, 13-10, 14-11, 14-12 suşlarının kültürleri d. kontrol 1, kontrol 2, 100 μ j/2 sn 3-3, 3-4, 6-5, 6-6, 13-7, 13-8, 100 μ j/3 sn 13-9, 13-10, 14-11, 14-12 suşlarının kültürlerinin toplu halde görünümü e. kontrol 1, kontrol 2, 100 μ j/2 sn 6-5, 13-7, 3-3, 6-6, 3-4 suşlarının peletleri f. 100 μ j/2 sn 13-8, 100 μ j/3 sn 13-10, 14-11, 14-12, 13-9 suşlarının peletleri

2. büyütme ölçümlerinin grup içi karşılaştırmasının analiz edilmesi amacıyla Mann Whitney ve gruplar arası karşılaştırmasının analiz edilmesi amacıyla Friedman testi yapılmıştır.

Gruplar arası karşılaştırma analizi sonuçlarına göre kontrol grubu ile deney grubu arasında 2. büyütme değerlerinin başlangıç, 24 saat, 48 saat ve 72 saat değerleri açısından anlamlı fark bulunmamaktadır.

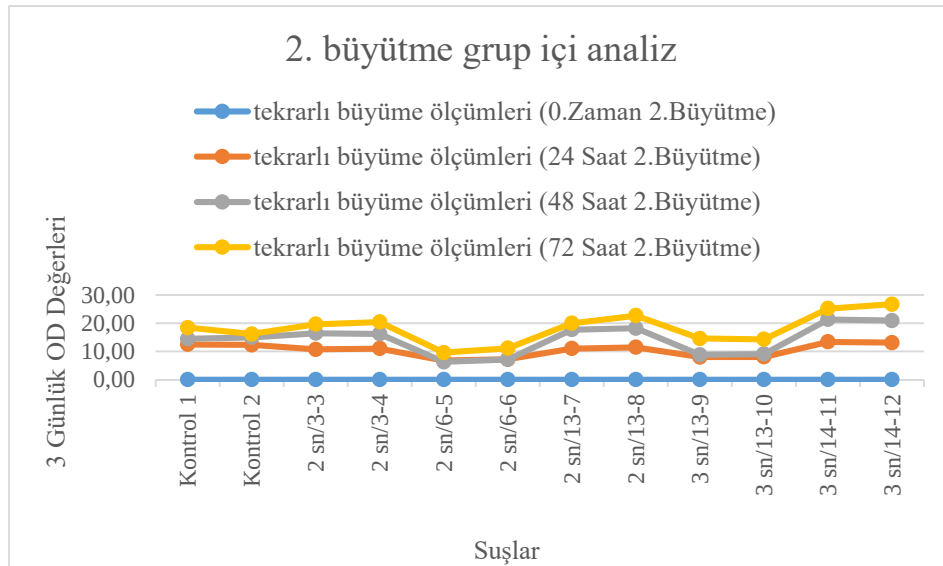
Gruplar içi karşılaştırma analizi sonuçlarına göre deney grubunda 2.büyütme değerlerinin başlangıç, 24 saat, 48 saat ve 72 saat değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$). Farklı zamanlardaki değerler incelendiğinde 24 saatte 2.büyümenin 12,42; 48 saatte 14,75 ve 72 saatte 17,35 olduğu görülmektedir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Tekrarlı büyüme (2.büyütme) ölçümlerinin grup içi ve gruplar arası karşılaştırma analizi

	Gruplar Arası					
	Kontrol		Deney		Karşılaştırma	
	Ort.	ss	Ort.	ss	U	p
Tekrarlı büyüme ölçümleri (0.Zaman 2.Büyütme)	0,05	0,00	0,05	0,00	10,000	1,000
Tekrarlı büyüme ölçümleri (24 Saat 2.Büyütme)	10,11	2,41	12,42	0,11	4,000	0,197
Tekrarlı büyüme ölçümleri (48 Saat 2.Büyütme)	14,25	5,79	14,75	0,36	8,000	0,667
Tekrarlı büyüme ölçümleri (72 Saat 2.Büyütme)	18,47	5,82	17,35	1,63	8,000	0,667
Grup İçi Karşılaştırma Testi (Ön Test-Son Test)	X^2	28,080	30,000			
	p	0,000	0,000*			

*p<0,05

İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arası analizde kontrol ve deney grubu arasında büyüme eğrileri açısından bir fark görülmemiştir. Yani deney grubunu oluşturan UV mutant suşlar da kontrol kadar sağlıklı suşlardır ve büyümeleri normal düzeyde seyretmektedir. 0, 24, 48, 72 saat OD değerleri arasında farklılık gözlenmesi 48 ve 72 saat büyütme değerlerinin artış göstermesi beklenen bir durumdur (Şekil 4.1.)



Şekil 4.1. Suşların sıvı besiyerinde 2. kez büyütülmesinde 0, 24, 48, 72 saat grup içi analizi

Kontrol, 100 µj/2 sn 3, 6, 13, 100 µj/3 sn 13, 14 suşları üçüncü kez YPD sıvı besiyerinde büyütülmüştür. Önceki büyütmelerde olduğu gibi 1 gün önceden başlangıç kültürü

hazırlanmıştır. Başlangıç OD değeri 0,05 ve hacim 50 ml olacak şekilde başlangıç kültürden ne kadar kullanılması gerektiği hesaplanmıştır (Çizelge 4.5.). Her bir örneğe ilgili miktar eklenerek 30 °C 300 rpm’de çalkalayıcı inkübatörde 3 gün boyunca büyütme işlemine başlanmıştır. Suşların isimlerinin yanına çalkalayıcı inkübatörde kaç numaralı yerde bulundukları not edilmiştir.

Çizelge 4.5. Seçilen suşların sıvı besiyerinde üçüncü kez büyütülmesinde kullanılan başlangıç kültürlerin OD değerleri ve başlangıç kültürden alınan miktarlar

Suş Adı	OD Değeri	Kültürden Kullanılan Miktar (µl)
Kontrol	13,4	186,5
2 sn/3	9,28	269
2 sn/6	8,98	278
2 sn/13	10,78	232
3 sn/13	8,58	291
3 sn/14	12,5	200

3 gün boyunca OD ölçümü yapılmış ve Windows Excel programına aktarılmıştır (Çizelge 4.6.)

Çizelge 4.6. Seçilen suşların sıvı besiyerinde büyütülmesinin üçüncü uygulaması sırasında ölçülen 0, 24, 48, 72 saat OD değerleri

Suş Adı	0 Saat	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Kontrol 1-1	0,05	14,58	23,61	30,2
Kontrol 2-2	0,05	13,56	22,98	20,4
2 sn/3-3	0,05	12,3	22,71	28,3
2 sn/3-4	0,05	10,32	22,74	29,8
2 sn/6-5	0,05	8,68	19,05	27,9
2 sn/6-6	0,05	9,22	19,77	26,9
2 sn/13-7	0,05	12,7	22,98	29,2
2 sn/13-8	0,05	11,3	23,04	30,45
3 sn/13-9	0,05	7,98	12,36	25,75
3 sn/13-10	0,05	7,54	12,81	20,35
3 sn/14-11	0,05	13,86	22,77	25,75
3 sn/14-12	0,05	12,4	21,06	21,85

3 gün boyunca OD’si ölçülen suşların tamamının toplanarak saklanmasına karar verildi. Tüm suşlar içinde en koyu renge sahip suş 100 µj/3 sn 14’dür (Resim 4.8.).



Resim 4.8. Suşların sıvı besiyerinde üçüncü defa büyütülmesinin kültür ve peletleri a. kontrol (B₅), 100 µj/2 sn 3, 6, 13, 100 µj/3 sn 13, 14 suşlarının başlangıç kültürleri b. kontrol 1-1, kontrol 2-2, 100 µj/2 sn 3-3, 3-4, 6-5, 6-6 suşlarının kültürleri c. 100 µj/2 sn 13-7, 13-8, 100 µj/3 sn 13-9, 13-10, 14-11, 14-12 suşlarının kültürleri d. kontrol 1-1, kontrol 2-2, 100 µj/2 sn 3-3, 3-4, 6-5, 6-6, 13-7, 13-8, 100 µj/3 sn 13-9, 13-10, 14-11, 14-12 suşlarının kültürlerinin toplu görünümü e. kontrol 1-1, kontrol 2-2, 100 µj/2 sn 3-3, 3-4, 13-7, 13-8, 100 µj/3 sn 13-9, 13-10, 14-11, 14-12 suşlarının peletleri f. 100 µj/2 sn 6-5, 6-6 suşlarının peletleri

3. Büyütme ölçümlerinin grup içi karşılaştırmasının analiz edilmesi amacıyla Mann Whitney ve gruplar arası karşılaştırmasının analiz edilmesi amacıyla Friedman testi yapılmıştır.

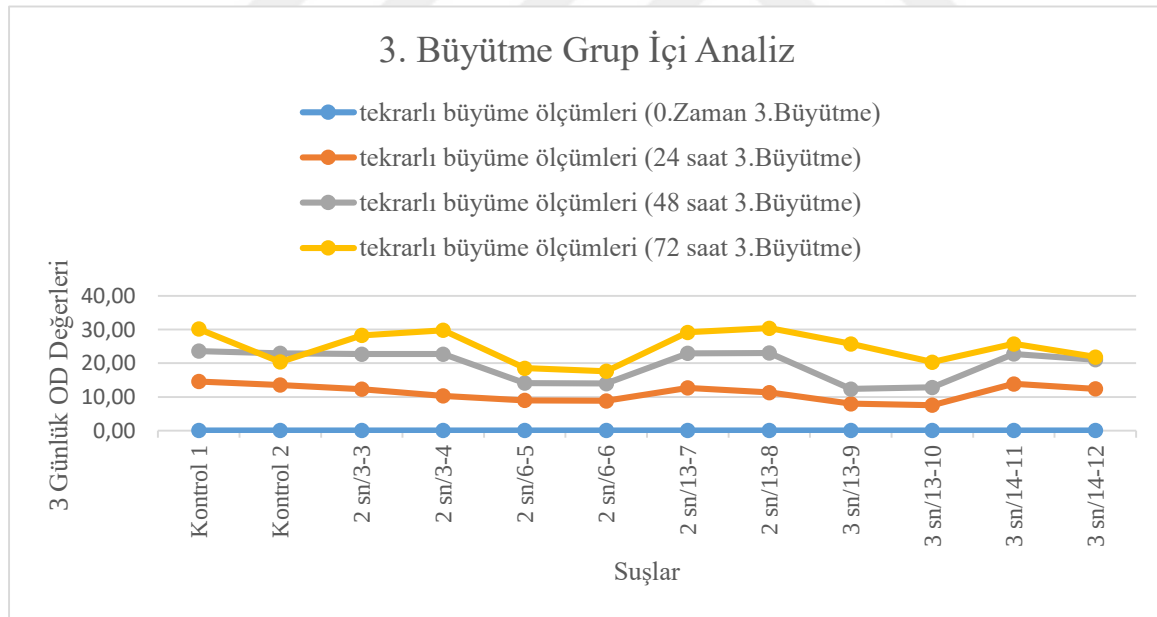
Gruplar arası karşılaştırma analizi sonuçlarına göre kontrol grubu ile deney grubu arasında 3. büyüme değerlerinin başlangıç, 24 saat, 48 saat ve 72 saat değerleri açısından anlamlı fark bulunmamaktadır.

Gruplar içi karşılaştırma analizi sonuçlarına göre deney grubunda Tekrarlı Büyüme (3. Büyütme) değerlerinin başlangıç, 24 saat, 48 saat ve 72 saat değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p > 0,05$) (Çizelge 4.7.).

Çizelge 4.7. Tekrarlı büyüme (3.büyütme) ölçümlerinin grup içi ve gruplar arası karşılaştırma analizi

	Kontrol		Deney		Gruplar Arası Karşılaştırma Testi	
	Ort.	ss	Ort.	ss	U	p
Tekrarlı büyüme ölçümleri (0.Zaman 3.Büyütme)	0,05	0,00	0,05	0,00	10,000	1,000
Tekrarlı büyüme ölçümleri (24 saat 3.Büyütme)	10,62	2,20	14,07	0,72	1,000	0,053
Tekrarlı büyüme ölçümleri (48 saat 3.Büyütme)	18,86	4,83	23,30	0,45	1,500	0,067
Tekrarlı büyüme ölçümleri (72 saat 3.Büyütme)	24,77	4,82	25,30	6,93	8,000	0,667
Grup İçi Karşılaştırma Testi (Ön Test-Son Test)	X^2	6,000	5,400			
	p	0,112	0,145			

İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arası analizde kontrol ve deney grubu arasında büyüme eğrileri açısından bir fark görülmemiştir. Yani deney grubunu oluşturan UV mutant suşlar da kontrol kadar sağlıklı suşlardır ve büyümeleri normal düzeyde seyretmektedir. 0, 24, 48, 72 saat OD değerleri arasında farklılık gözlenmesi beklenmektedir. 0,24, 48, 72 saat değerleri arasında bir artış saptanmıştır. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.2.).

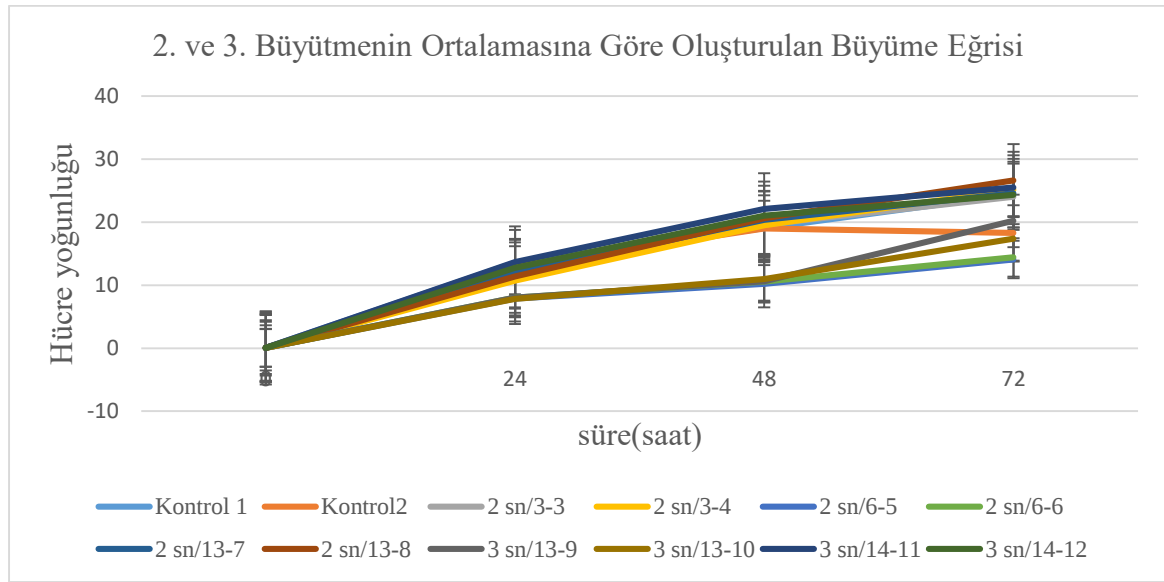


Şekil 4.2. Suşların sıvı besiyerinde 3. kez büyütülmesinde 0, 24, 48, 72 saat grup içi analizi

İstatistiksel analiz sonuçlarının dışında 2. ve 3. büyütme sonuçlarının ortalaması ve standart sapması alınarak suşların büyüme eğrileri oluşturulmuştur (Şekil 4.3.). 2. ve 3. büyütmeyle ait 24 saat değerlerinin, 48 saat değerlerinin, 72 saat değerlerinin ortalaması ve standart sapması alınmıştır (Çizelge 4.8.).

Çizelge 4.8. 2. ve 3. büyütme deneylerinde 0, 24, 48, 72 saat OD değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları

Suş Adı	0.Saat Ort	0.Saat S.Sapma	24.Saat Ort	24.Saat S.Sapma	48.Saat Ort	48.Saat S.Sapma	72.Saat Ort	72.Saat S.Sapma
Kontrol 1-1	0,05	0	13,54	1,04	19,05	4,56	24,35	5,85
Kontrol 2-2	0,05	0	12,95	0,61	18,99	3,99	18,3	2,1
2 sn/3-3	0,05	0	11,53	0,77	19,605	3,105	24	4,3
2 sn/3-4	0,05	0	10,69	0,37	19,5	3,24	25,125	4,675
2sn/6-5	0,05	0	7,86	1,1	10,215	3,885	14,075	4,475
2 sn/6-6	0,05	0	8,03	0,81	10,575	3,405	14,4	3,25
2 sn/13-7	0,05	0	11,88	0,82	20,37	2,61	24,6	4,6
2 sn/13-8	0,05	0	11,4	0,1	20,64	2,4	26,6	3,85
3 sn/13-9	0,05	0	8,01	0,03	10,605	1,755	20,2	5,55
3sn/13-10	0,05	0	7,82	0,28	10,95	1,86	17,35	3
3sn/14-11	0,05	0	13,65	0,21	22,065	0,705	25,5	0,25
3sn 14-12	0,05	0	12,76	0,36	21,015	0,045	24,325	2,475



Şekil 4.3. Suşların sıvı besiyerinde 2. ve 3. büyütülmelerinde alınan OD değerlerinin ortalamaları ile oluşturulan büyüme eğrisi

4.4. Sıvı Besiyerinde Büyütülen Suşlardan Karoten Ekstre Edilmesinin Sonuçları

Sıvı besiyerinde suşların büyütülmesinin ikinci ve üçüncü uygulamasında dondurulan örneklerden karoten ekstre edilmiştir.

Bu suşlar kontrol 1-1, kontrol 2-2, 100 µj/2 sn 3-3, 3-4, 6-5, 6-6, 13-7, 13-8, 100 µj/3 sn 13-9, 13-10, 14-11, 14-12 suşlarıdır. Ekstraksiyon öncesinde toplam ağırlıktan tüp ağırlığı çıkarılarak net maya ağırlıkları hesaplanmıştır (Çizelge 4.9.). Bu ağırlıklara göre hangi suşun kaç ml suyla dilüe edilerek ekstraksiyon için kullanılacağına karar verilmiştir. Her suşa ait iki örneğin arasında anlamlı bir fark olup olmadığı kontrol edilmiştir. 100 g maya ağırlığı ekstraksiyon için normal bir miktar olarak kabul edilmektedir. Bu miktarın altına düşen

örneklerde kullanılan su miktarı kısıtlı tutulmuş örneğin tamamı ekstraksiyon için kullanılmıştır. 100 g ve üstü maya ağırlıkları için 6 ml distile su kullanılmış ve örneğin 1 ml'si üzerinden karoten ekstre edilmiştir. 100 µj/2 sn 6-5 ve 6-6 örneklerinin maya ağırlıkları az bulunmuştur. 100 µj/2 sn 6-5 2 ml su ile, 100 µj/2 sn 6-6 ise 1 ml suyla çözülerek dilüe edilmiştir. Her ikisinden de 1 ml alınarak ekstraksiyonda kullanılmıştır. Diğer suşlar normal maya ağırlığına sahip olduğu için 6 ml distile suyla çözülerek 1 ml'si kullanılmıştır.

Çizelge 4.9. Karoten ekstraksiyonu deneyinin ilk uygulamasında kullanılan örneklerin toplam, tüp ve net maya ağırlıkları

Suş Adı	Toplam Ağırlık (g)	Tüp Ağırlığı (g)	Net Maya Ağırlığı (g)
Kontrol 1-1	7,0403	6,7979	242,4
Kontrol 2-2	6,8075	6,5737	233,8
2 sn/3-3	6,8286	6,5718	256,8
2 sn/3-4	6,8825	6,6588	223,7
2 sn/6-5	6,7855	6,6685	117
2 sn/6-6	6,8270	6,7779	49,1
2 sn/13-7	7,0508	6,7059	344,9
2 sn/13-8	7,2743	6,9669	307,4
3 sn/13-9	6,9446	6,6938	250,8
3 sn/13-10	6,9828	6,7194	263,4
3 sn/14-11	7,1135	6,6934	420,1
3 sn/14-12	6,9364	6,5822	354,2

Suşlar net maya ağırlıklarına göre dilüe edilip peletler çözülmüştür. Sonrasında karoten ekstraksiyonu deneyinin tüm işlemleri uygulanmıştır. Kontrol 1-1 heksanla 10 kat dilüe edilerek diğer örneklerse 20 kat dilüe edilerek OD okunmuştur. OD değerleri Windows Excel programına aktararak total karoten miktarları hesaplanmıştır (Çizelge 4.10.). Total karoten miktarları hesaplanırken net maya ağırlığı temel alınarak µg/g kuru hücre ağırlığı şeklinde hesap yapılmıştır. Yani 1 gram mayadaki total karoten miktarı µg cinsinden hesaplanmıştır.

Çizelge 4.10. Karoten ekstraksiyonu deneyinin ilk uygulaması sonucunda elde edilen OD değerleri ve total karoten miktarları

Suş Adı	OD Değeri	Total Karoten Miktarı (µg/g)
Kontrol 1-1	3,49	1
Kontrol 2-2	10,58	3
2 sn/3-3	4,9	1
2 sn/3-4	10,26	3
2 sn/6-5	19,78	12
2 sn/6-6	7,6	11
2 sn/13-7	6,14	1
2 sn/13-8	7,08	1
3 sn/13-9	5,18	1
3 sn/13-10	19,62	5
3 sn/14-11	16,96	2
3 sn/14-12	10,3	2

Aynı işlemler karoten ekstraksiyonunun ikinci uygulamasında da tekrar edildi. Net maya ağırlıkları hesaplandı (Çizelge 4.11.). Net maya ağırlığı diğer suşlara göre düşük olan 100 µj/2 sn 6-5, 6-6 örnekleri 3 ml distile suyla çözülmüş, diğer suşlar ise 6 ml suyla çözülmüştür. Tüm suşların 1 ml'si kullanılarak ekstraksiyon yapılmıştır.

Çizelge 4.11. Karoten ekstraksiyonu deneyinin ikinci uygulamasında kullanılan örneklerin toplam, tüp ve net maya ağırlıkları

Suş Adı	Toplam Ağırlık (g)	Tüp Ağırlığı (g)	Net Maya Ağırlığı (g)
Kontrol 1-1	7,1700	6,7487	421,3
Kontrol 2-2	6,9824	6,6509	331,5
2 sn/3-3	7,0500	6,7114	338,6
2 sn/3-4	7,1916	6,7867	404,9
2 sn/6-5	6,8219	6,6998	122,1
2 sn/6-6	6,8927	6,7662	126,5
2 sn/13-7	6,9800	6,7625	220,5
2 sn/13-8	7,2393	7,0264	212,9
3 sn/13-9	6,9628	6,7058	257
3 sn/13-10	6,8065	6,6340	172,5
3 sn/14-11	6,9130	6,5690	344
3 sn/14-12	6,9755	6,6316	343,9

Sonrasında karoten ekstraksiyonu deneyinin tüm işlemleri uygulanmıştır. Bu suşlar ertesi gün hemen HPLC aletinde ölçümde kullanılacağı için speedvacde kurutup tekrar HPLC için ölçme işleminin tekrar edilmesine gerek duyulmadı. Bu örnekler OD 449 nm'de OD okunarak ölçüm yapıldı. 100 µj/2 sn 3-3, 3-4, 100 µj/3 sn 14-11, 14-12 suşları 20 kat, diğerleri 15 kat dilüe edilerek OD okunmuştur. OD değerleri Windows Excel programına aktarılarak total karoten miktarları hesaplanmıştır (Çizelge 4.12.). Total karoten miktarları hesaplanırken net maya ağırlığı baz alınarak µg/g kuru hücre ağırlığı şeklinde hesap

yapılmıştır. Yani 1 gram mayadaki total karoten miktarı μg cinsinden hesaplanmıştır. Suşlar ertesı gün HPLC ölçümünde kullanılacağı için -20°C budolabında 1 gün muhafaza edilmiştir.

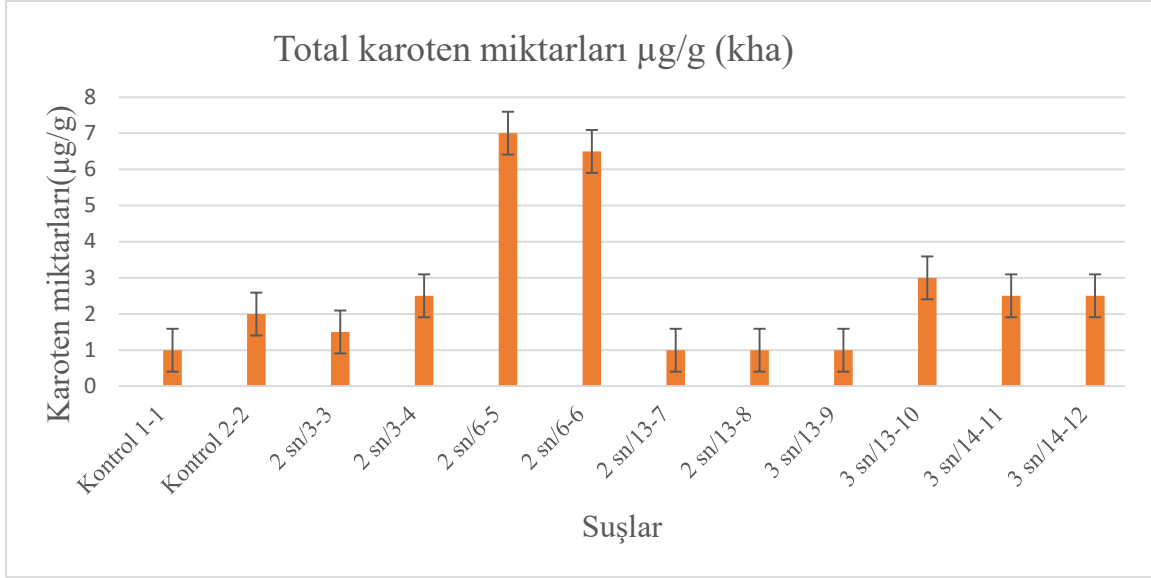
Çizelge 4.12. Karoten ekstraksiyonu deneyinin ikinci uygulaması sonucunda elde edilen OD değerleri ve total karoten miktarları

Suş Adı	OD Değeri	Total Karoten Miktarı($\mu\text{g/g}$)
Kontrol 1-1	8,265	1
Kontrol 2-2	7,29	1
2 sn/3-3	12,16	2
2 sn/3-4	12,8	2
2 sn/6-5	5,055	2
2 sn/6-6	5,235	2
2 sn/13-7	4,02	1
2 sn/13-8	4,29	1
3 sn/13-9	4,155	1
3 sn/13-10	3,975	1
3 sn/14-11	14,96	3
3 sn/14-12	14,3	3

Karoten ekstraksiyonu deneyinin iki uygulaması sonucunda ölçülen OD değerleri üzerinden total karoten miktarları hesaplanmıştır. Bu iki ölçümde elde edilen total karoten miktarlarının ortalaması ve standart sapması alınmıştır (Çizelge 4.13.). Bu şekilde bir total karoten miktarı grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.4.).

Çizelge 4.13. Karoten ekstraksiyonu deneyinin iki uygulaması sonucu elde edilen total karoten miktarlarının ortalamaları ve standart sapmaları

Suş Adı	1.Ekstraksiyon total karoten miktarı ($\mu\text{g/g}$)	2.Ekstraksiyon total karoten miktarı ($\mu\text{g/g}$)	Ortalama	Standart Sapma
Kontrol 1-1	1	1	1	0
Kontrol 2-2	3	1	2	1
2 sn/3-3	1	2	1,5	0,5
2 sn/3-4	3	2	2,5	0,5
2 sn/6-5	12	2	7	5
2 sn/6-6	11	2	6,5	4,5
2 sn/13-7	1	1	1	0
2 sn/13-8	1	1	1	0
3 sn/13-9	1	1	1	0
3 sn/13-10	5	1	3	2
3 sn/14-11	2	3	2,5	0,5
3 sn/14-12	2	3	2,5	0,5



Şekil 4.4. Karoten ekstraksiyonu sonucu elde edilen kuru hücre ağırlığı (kha) olarak total karoten miktarları

Total karoten ölçümlerinin grup içi karşılaştırmasının analiz edilmesi amacıyla Mann Whitney ve gruplar arası karşılaştırmasının analiz edilmesi amacıyla Wilcoxon testi yapılmıştır (Çizelge 4.14.).

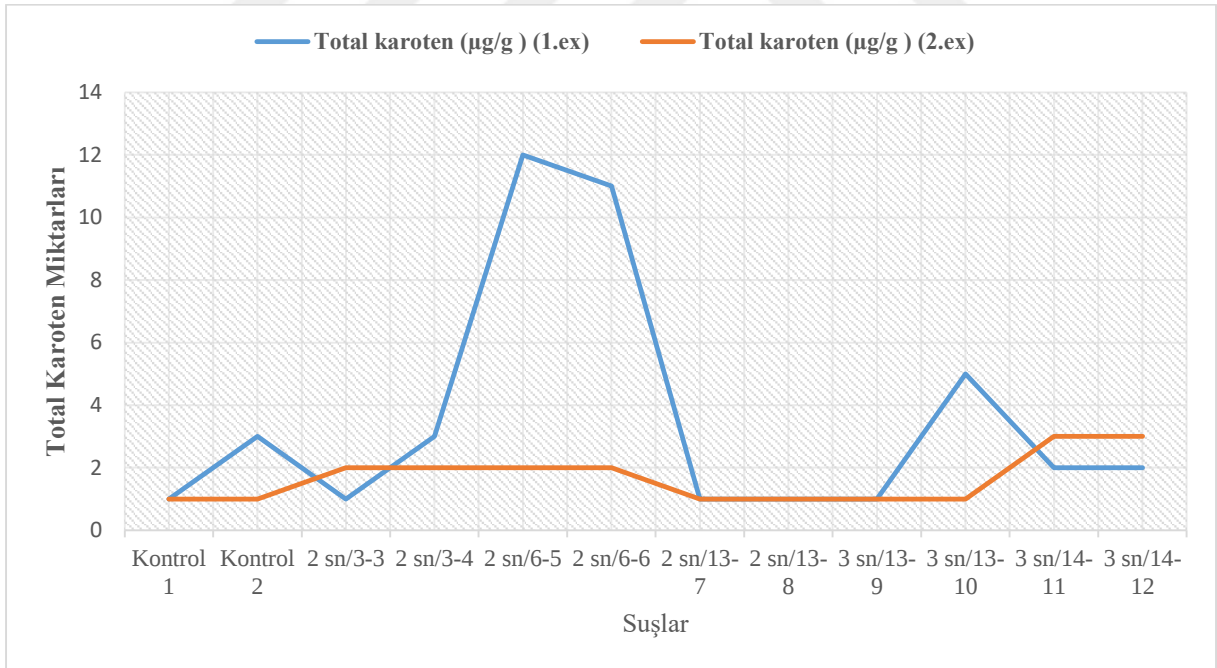
Gruplar arası karşılaştırma analizi sonuçlarına göre kontrol grubu ile deney grubu arasında total karoten (1.ölçüm) ve total karoten (2.ölçüm) değerleri açısından anlamlı fark bulunmamaktadır($p>0,05$).

Gruplar içi karşılaştırma analizi sonuçlarına göre deney grubunda total karoten (1.ölçüm) değeri ile total karoten (2.ölçüm) değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır($p>0,05$).

Çizelge 4.14.Total karoten ölçümlerinin grup içi ve gruplar arası karşılaştırma analizi

	Gruplar Arası Karşılaştırma Testi					
	Kontrol		Deney		U	p
	Ort.	ss	Ort.	ss		
Total Karoten (1.Ölçüm)	3,90	4,20	2,00	1,41	8,500	0,737
Total Karoten (2.Ölçüm)	1,80	0,79	1,00	0,00	4,000	0,159
Grup İçi Karşılaştırma Testi (Ön Test-Son Test)	Z	-1,119	-1,000			
	p	0,263	0,317			

Karoten ekstraksiyonu deneyinin iki uygulaması sonucunda elde edilen deney grubu total karoten miktarları arasında bir fark olmaması beklenen bir durumdur (Şekil 4.5.). Ancak kontrol ve deney gruplarının gruplar arası analizi sonucu anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bununla birlikte 100µj/2 sn 6-5 ve 6-6 suşlarında kontrole göre önemli bir artış mevcuttur.



Şekil 4.5. 1. ve 2. karoten ekstraksiyonunda elde edilen total karoten miktarlarının grup içi analizi

4.5. Suşların HPLC Analizlerinin Sonuçları

HPLC analiziyle tüm suşlar içerisinde bulunan spesifik karoten miktarları belirlenmiştir. Karoten ekstraksiyonu deneyinin iki uygulaması sonucu hücreden ekstre edilen total karoten

HPLC aletiyle analiz edilerek her sušta ne kadar β -karoten ve likopen bulunduğu hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar yapılırken beta karoten ve likopen için standartlar HPLC’de ölçülerek standart değerler bulunmuştur. Bu standart değerler üzerinden çizilen standart eğriler üzerindeki formül kullanılarak beta karoten ve likopen miktarı hesaplanmıştır. Standart ölçümler sayesinde beta karotenin ve likopenin kaçınıcı dakikada pik oluşturduğu bilinmektedir. Beta karoten 10. dakikada, likopen 15. dakikada pik oluşturmaktadır. Her suşun iki örneği için 10. ve 15. dakikada oluşan piklerin alan genişliği not edilmiştir. 1. ve 2. ekstraksiyonda elde edilen tüm suşlar analiz edilmiştir. Piklerin alan genişlikleri standart eğri üzerinde oluşan $y=ax+b$ şeklindeki denklemde x yerine yazılarak y değerleri hesaplanmıştır. Karoten ekstraksiyonu deneyinin iki uygulamasında elde edilen tüm örnekler aynı gün HPLC’de analiz edilmiştir. Karoten ekstraksiyonu deneyinin ilk uygulaması sonucu elde edilen suşlar speedvac’de kurutularak sadece karotenden ibaret halde bulundukları için çözünmeleri için çok miktarda heksan kullanılmıştır. HPLC ölçümleri tüm basamaklar takip edilerek yapılmıştır. Standart eğriler üzerinden beta karoten miktarları hesaplanmış y değerleri dilüsyon katsayıları ile çarpılarak gerçek değerler bulunmuştur (Çizelge 4.15.). Yine standart eğriler üzerinden likopen miktarları hesaplanmış ve dilüsyon katsayıları ile çarpılarak gerçek değerler bulunmuştur (Çizelge 4.16.). Gerçek değer $\mu\text{g/ml}$ cinsinden beta karoten ve likopen miktarını göstermektedir.

Çizelge 4.15. Karoten ekstraksiyonu deneyinin ilk uygulamasında elde edilen spesifik beta karoten miktarları

Suş Adı	Y Değeri	Dilüsyon Katsayısı	Gerçek Değer ($\mu\text{g/ml}$)
Kontrol 1-1	41203,84	16	659261,4
Kontrol 2-2	39671,11	16	634737,8
2 sn/3-3	17495,22	32	559847
2 sn/3-4	26355,11	32	843363,5
2 sn/6-5	18205,51	32	582576,3
2 sn/6-6	43020,68	32	1376662
2 sn/13-7	12792,38	32	409356,2
2 sn/13-8	17300,83	32	553626,6
3 sn/13-9	24859,77	32	795512,6
3 sn/13-10	34392,56	32	1100562
3 sn/14-11	9211,038	32	294753,2
3 sn/14-12	9128,794	32	292121,4

Çizelge 4.16. Karoten ekstraksiyonu deneyinin ilk uygulamasında elde edilen spesifik likopen miktarları

Suş Adı	Y Değeri	Dilüsyon Katsayıları	Gerçek Değer (µg/ml)
Kontrol 1-1	2072,081	16	33153,3
Kontrol 2-2	1886,252	16	30180,03
2 sn/3-3	2800,767	32	89624,54
2 sn/3-4	1864,644	32	59668,61
2 sn/6-5	2138,899	32	68444,77
2 sn/6-6	4179,687	32	133750
2 sn/13-7	1671,503	32	53488,1
2 sn/13-8	920,5433	32	29457,39
3 sn/13-9	1237,017	32	39584,54
3 sn/13-10	1594,711	32	51030,75
3 sn/14-11	1685,465	32	53934,88
3 sn/14-12	1684,467	32	53902,94

2. karoten ekstraksiyonu uygulamasının suşları ertesi gün HPLC’de ölçüm yapılmasına bağlı olarak heksanı buharlaştırılmadan -20 °C buzdolabında bekletilmiştir. HPLC ölçümleri tüm basamakları takip edilerek yapılmıştır. HPLC ölçümleri sonucu bilgisayar ekranında oluşan piklerin alan genişliği Windows Excel programına aktarılmıştır. Bilgisayar ekranında oluşan piklerin alan genişlikleri kullanılarak standart eğriler üzerinden y değerleri hesaplanmıştır. Bu işlem ilk olarak beta karoten için yapılmıştır (Çizelge 4.17.). Sonrasında likopen için de aynı işlem uygulanmıştır (Çizelge 4.18.). Bulunan y değerleri dilüsyon katsayıları ile çarpılarak gerçek değerler hesaplanmıştır. Gerçek değerler µg/ml cinsinden ifade edilmiştir.

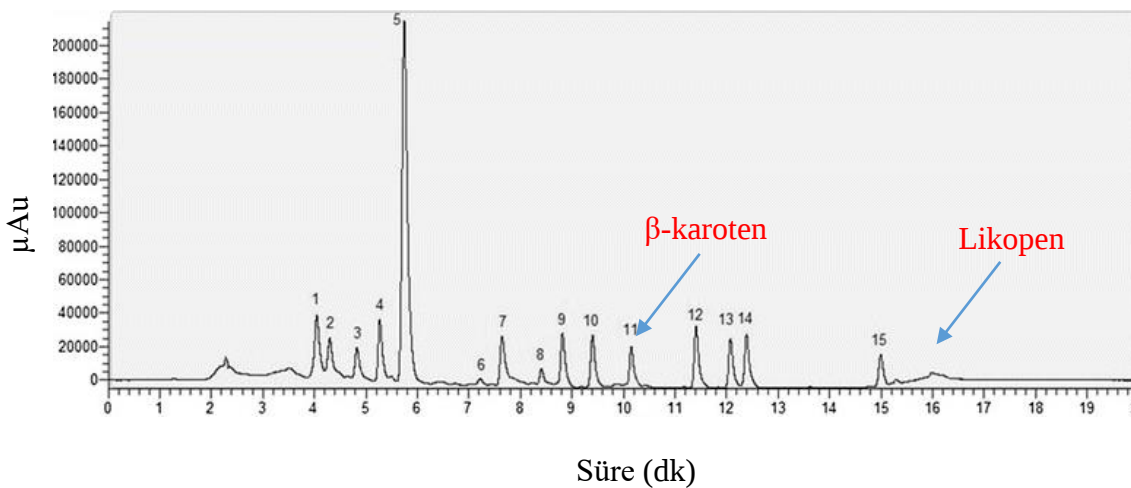
Çizelge 4.17. Karoten ekstraksiyonu deneyinin ikinci uygulamasında elde edilen spesifik beta karoten miktarları

Suş Adı	Y Değeri	Dilüsyon Katsayıları	Gerçek Değer (µg/ml)
Kontrol 1-1	14384,91	5	71924,55
Kontrol 2-2	14467,16	5	72335,8
2 sn/3-3	32321,52	2	64643,04
2 sn/3-4	28366,34	2	56732,68
2 sn/6-5	17084	5	85420
2 sn/6-6	14938,19	5	74690,95
2 sn/13-7	6594,193	5	32970,97
2 sn/13-8	6982,981	5	34914,91
3 sn/13-9	10287,68	5	51438,4
3 sn/13-10	10766,19	5	53830,95
3 sn/14-11	26205,58	2	52411,16
3 sn/14-12	24441,08	2	48882,16

Çizelge 4.18. Karoten ekstraksiyonu deneyinin ikinci uygulamasında elde edilen spesifik likopen miktarları

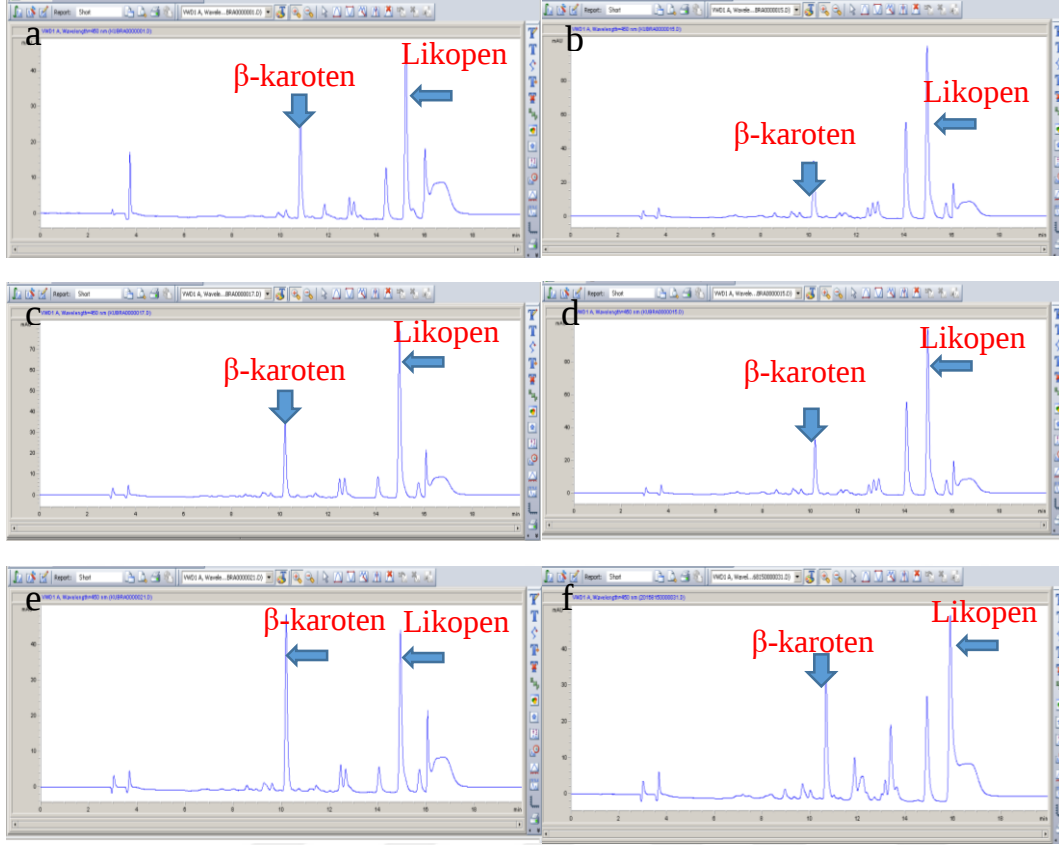
Suşı Adı	Y Değeri	Dilüsyon Katsayıları	Gerçek Değer (µg/ml)
Kontrol 1-1	1192,803	5	5964,015
Kontrol 2-2	1164,547	5	5822,735
2 sn/3-3	5722,162	2	11444,32
2 sn/3-4	5378,43	2	10756,86
2 sn/6-5	744,0229	5	3720,115
2 sn/6-6	750,6715	5	3753,358
2 sn/13-7	539,5785	5	2697,893
2 sn/13-8	556,2	5	2781
3 sn/13-9	506,6679	5	2533,34
3 sn/13-10	533,9272	5	2669,636
3 sn/14-11	6158,643	2	12317,29
3 sn/14-12	5343,192	2	10686,38

HPLC analizinde beta karoten ve likopen dışında karotenler de pik vermiştir. Şekil 4.6.'da görülen HPLC karoten profili kullanılarak bu piklerin hangi karotene ait olduğu belirlenmiştir. Bazı suşlarda 14. dakikada nero sporen karotenine ait pik oluşmuştur. Örneğin 100 µj/2 sn 3-3 ve 100 µj/2 sn 13-7 suşlarında nero sporen piki yüksek çıkmıştır. Ancak bu karotenler çalışmamızın kapsamında bulunmadığı için standartları bulunmamaktadır. Dolayısıyla standart eğrileri bulunmamakta, y değerleri ve gerçek değerleri hesaplanmamaktadır. Bazı suşlarda ise 15. dakikadan sonra pikler oluşmuştur. Ancak bu piklerin alan genişliği fazla bulunmamıştır.



Şekil 4.6. 250 -700 nm arasında kaydedilen karotenlerin HPLC profilleri. 1. violaksantin, 2. neoksantin, 3. antraksantin, 4. lutein, 5. zeaksantin, 6. fitoen, 7. β-kriptoksantin, 8. Fitofluen, 9. α-karoten, 10. β-karoten, 11. ζ-karoten, 12. δ-carotene, 13. γ-carotene, 14. nero sporen, 15. likopen [9]

Her suşa ait bilgisayar ekran görüntüsü incelenmiştir. Tüm suşlarda genel olarak beta karoten ve likopen piki görülmektedir (Resim 4.9.).



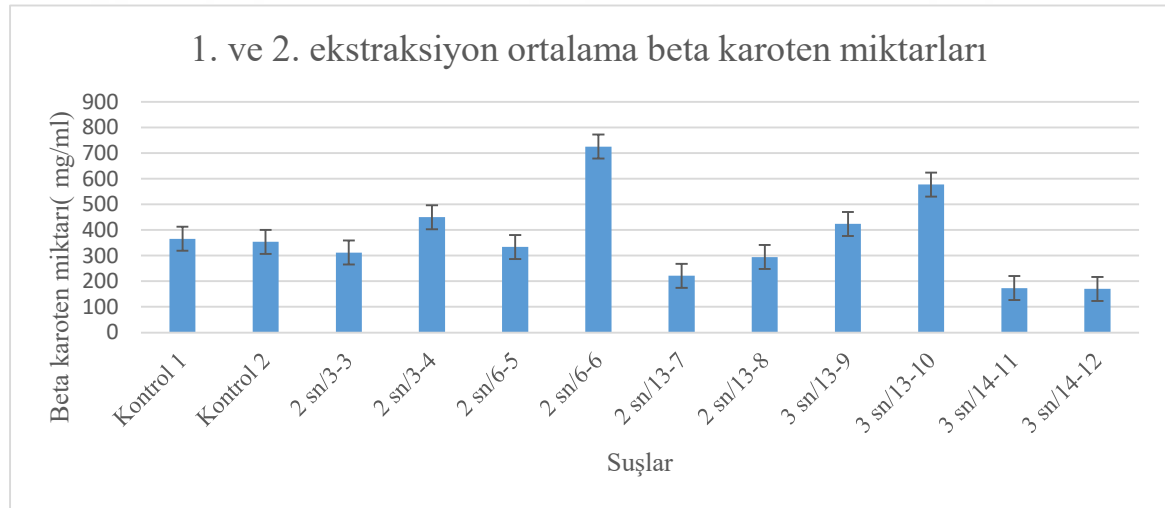
Şekil 4.7. Suşların HPLC analizi sonucu bilgisayar ekranında oluşan pikler a.kontrol suş b. 100 µj/2 sn 3 suşu c. 100 µj/2 sn 6 suşu d. 100 µj/2 sn 13 suşu e. 100 µj/3 sn 13 suşu f. 100 µj/3 sn 14 suşu

4.5.1. Suşların HPLC ölçümlerinin istatistiksel analizi ve ortalama β -karoten, likopen miktarları

1.ve 2. ekstraksiyonun HPLC ölçümüyle elde edilen spesifik beta karoten miktarlarının gerçek değerlerinin ortalaması ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.19.). Ortalamalar µg/ml cinsinden olduğunda değerler çok yüksek görüldüğü için bu değerler mg/ml olarak ifade edilmiştir. Ortalamalar kullanılarak bir grafik oluşturulmuştur (Şekil 4.7.).

Çizelge 4.19. HPLC analizi sonucu 1. ve 2. ekstraksiyonda elde edilen spesifik β -karoten miktarları, ortalamaları ve standart sapmaları

Suş Adı	1.Ekstraksiyon β -karoten ($\mu\text{g/g}$)	2.Ekstraksiyon β -karoten ($\mu\text{g/g}$)	Ortalama (mg/g)	Standart Sapma
Kontrol 1-1	659261,4	71924,55	365,593	293668,4
Kontrol 2-2	634737,8	72335,8	353,5368	281201
2 sn/3-3	559847	64643,04	312,245	247602
2 sn/3-4	843363,5	56732,68	450,0481	393315,4
2 sn/6-5	582576,3	85420	333,9982	248578,2
2 sn/6-6	1376662	74690,95	725,6764	650985,4
2 sn/13-7	409356,2	32970,97	221,1636	188192,6
2 sn/13-8	553626,6	34914,91	294,2707	259355,8
3 sn/13-9	795512,6	51438,4	423,4755	372037,1
3 sn/13-10	1100562	53830,95	577,1964	523365,5
3 sn/14-11	294753,2	52411,16	173,5822	121171
3 sn/14-12	292121,4	48882,16	170,5018	121619,6



Şekil 4.8. HPLC ölçümlerine göre spesifik β -karoten miktarları

HPLC β -karoten ölçümlerinin grup içi karşılaştırmasının analiz edilmesi amacıyla Mann Whitney ve gruplar arası karşılaştırmasının analiz edilmesi amacıyla Wilcoxon testi yapılmıştır (Çizelge 4.20.).

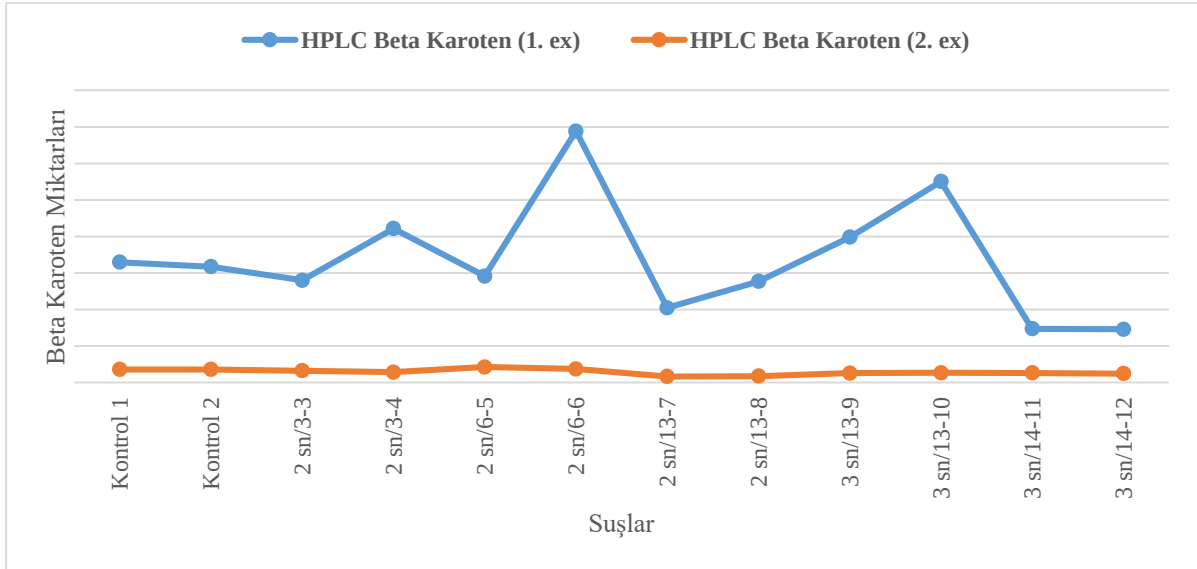
Gruplar arası karşılaştırma analizi sonuçlarına göre kontrol grubu ile deney grubu arasında HPLC β -karoten (1. Eks.) ve HPLC β -karoten (2. Eks.) değerleri açısından anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Gruplar içi karşılaştırma analizi sonuçlarına göre deney grubunda HPLC β -karoten (1.Eks.) değeri ile HPLC β -karoten (2.Eks.) değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Çizelge 4.20. HPLC β -karoten ölçümlerinin grup içi ve gruplar arası karşılaştırma analizi

		Kontrol		Deney		Gruplar Arası Karşılaştırma Testi	
		Ort.	ss	Ort.	ss	U	p
HPLC Beta Karoten (1. Eks.)		680.838,05	351.859,35	646.999,60	17.340,86	8,000	0,667
HPLC Beta Karoten (2. Eks.)		55.593,52	16.167,35	72.130,18	290,80	4,000	0,197
Grup İçi Karşılaştırma Testi (Ön Test-Son Test)	Z	-2,803		-1,342			
	p	0,005		0,180			

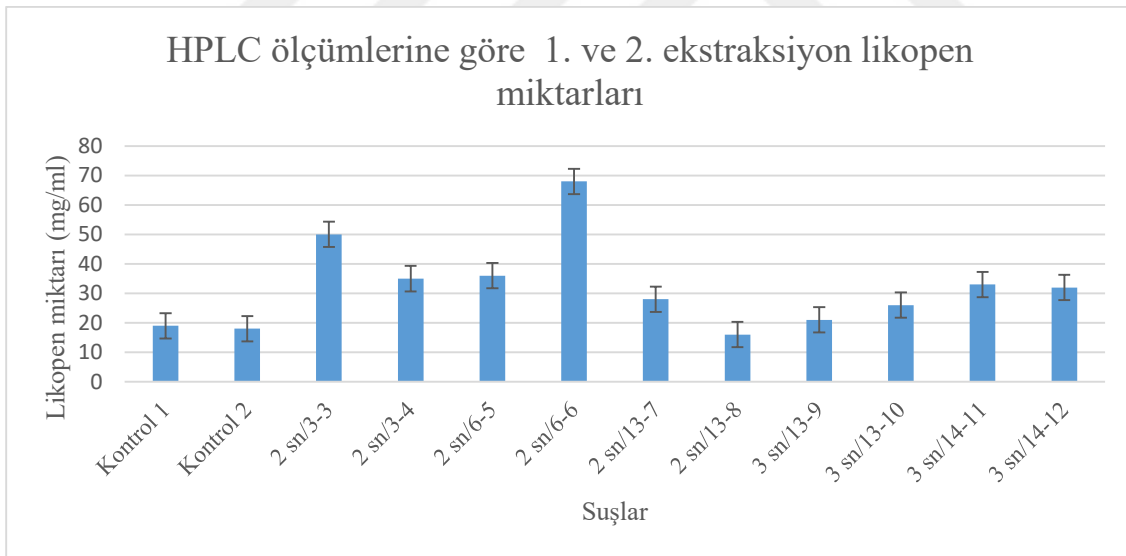
İstatistiksel analiz sonucu 1. ve 2. ekstraksiyon β -karoten ölçümleri arasında anlamlı bir fark bulunmaması beklenen bir durumdur (Şekil 4.8.). Yani grup içi analiz sonucunda p değerinin 0,05'den büyük çıkması normaldir. Ancak gruplar arası analizde kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir fark bulunmaması beklenen bir durum değildir. Bununla birlikte spesifik β -karoten miktarı açısından kontrole göre 100 $\mu\text{g}/2$ sn 6-6 ve 13-10 suşlarında önemli bir artış mevcuttur.

Şekil 4.9. 1. ve 2. karoten ekstraksiyonu HPLC ölçümlerine göre spesifik β -karoten miktarlarının grup içi analizi

1.ve 2. ekstraksiyonun HPLC ölçümüyle elde edilen spesifik likopen miktarlarının gerçek değerlerinin ortalaması ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.21.). Ortalamalar $\mu\text{g/ml}$ cinsinden olduğunda değerler çok yüksek görüldüğü için bu değerler mg/ml cinsine çevrilmiştir. Ortalamalar kullanılarak bir grafik oluşturulmuştur (Şekil 4.9.).

Çizelge 4.21. HPLC analizi sonucu 1. ve 2. ekstraksiyonda elde edilen spesifik likopen miktarları, ortalamaları ve standart sapmaları

Suş Adı	1.Ekstraksiyon Likopen ($\mu\text{g/g}$)	2.Ekstraksiyon Likopen ($\mu\text{g/g}$)	Ortalama (mg/g)	Standart Sapma
Kontrol 1-1	33153,3	5964,015	19	13594,64
Kontrol 2-2	30180,03	5822,735	18	12178,65
2 sn/3-3	89624,54	11444,32	50	39090,11
2 sn/3-4	59668,61	10756,86	35	24455,87
2 sn/6-5	68444,77	3720,115	36	32362,33
2 sn/6-6	133750	3753,358	68	64998,31
2 sn/13-7	53488,1	2697,893	28	25395,1
2 sn/13-8	29457,39	2781	16	13338,19
3 sn/13-9	39584,54	2533,34	21	18525,6
3 sn/13-10	51030,75	2669,636	26	24180,56
3 sn/14-11	53934,88	12317,29	33	20808,8
3 sn/14-12	53902,94	10686,38	32	21608,28



Şekil 4.10. HPLC ölçümlerine göre spesifik likopen miktarları

Likopen ölçümlerinin grup içi karşılaştırmasının analiz edilmesi amacıyla Mann Whitney ve gruplar arası karşılaştırmasının analiz edilmesi amacıyla Wilcoxon testi uygulanmıştır (Çizelge 4.22.).

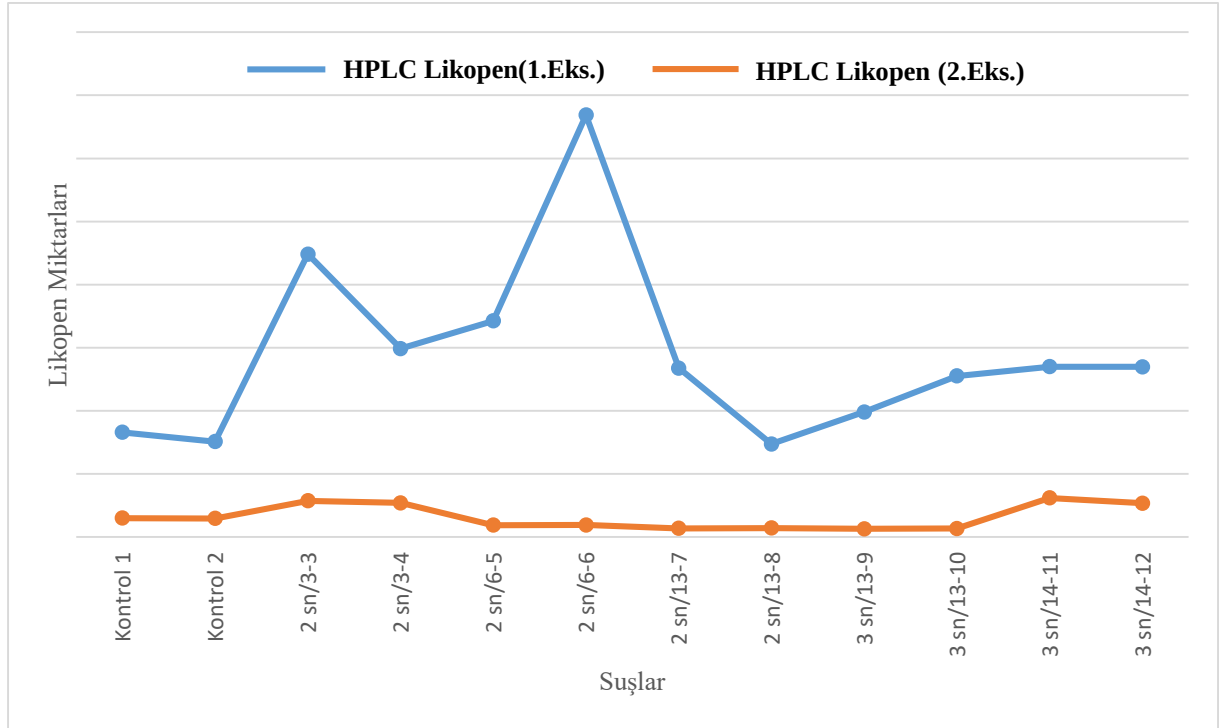
Gruplar arası karşılaştırma analizi sonuçlarına göre kontrol grubu ile deney grubu arasında likopen (1.ölçüm) ve likopen (2.ölçüm) değerleri açısından anlamlı fark bulunmamaktadır.

Gruplar içi karşılaştırma analizi sonuçlarına göre deney grubunda likopen (1.ölçüm) değeri ile likopen (2.ölçüm) değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Çizelge 4.22. Likopen ölçümlerinin grup içi ve gruplar arası karşılaştırma analizi

	Kontrol		Deney		Gruplar Arası Karşılaştırma Testi	
	Ort.	ss	Ort.	ss	U	p
Likopen (1.Ölçüm)	63.288,65	29.488,98	31.666,66	2.102,42	2,000	0,086
Likopen (2.Ölçüm)	6.336,02	4.315,73	5.893,38	99,90	8,000	0,667
Grup İçi Karşılaştırma Testi (Ön Test-Son Test)	Z	-2,803	-1,342			
	p	0,005	0,180			

İstatistiksel analiz sonucu 1. ve 2. ekstraksiyon likopen ölçümleri arasında anlamlı bir fark bulunmaması beklenen bir durumdur (Şekil 4.10.). Yani grup içi analiz sonucunda p değerinin 0,05'den büyük çıkması normaldir. Ancak gruplar arası analizde kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir fark bulunmaması beklenen bir durum değildir. Bununla birlikte spesifik likopen miktarı açısından kontrole göre 100 $\mu\text{g}/2$ sn 3-3ve 6-6 suşlarında önemli bir artış gözlenmiştir.



şekil 4.11. 1. ve 2. karoten ekstraksiyonu HPLC ölçümlerine göre spesifik likopen miktarlarının grup içi analizi

5. TARTIŞMA

Karotenoidler doğada farklı canlılarda, farklı formlarda bulunabilen ticari öneme sahip bileşiklerdir. Bitkilerde bu bileşikler fotosentezde rol oynamasının yanı sıra sitokinin, absisik asit gibi hormonların yapıtaşlarını oluşturmaktadır [130]. Hayvanlarda ve insanlarda ise β - karoten başta olmak üzere karotenoidler A vitamininin öncü formunu oluşturmaktadır. Dünya genelinde ilkökul çağındaki 250 milyon çocukta A vitamini eksikliği gözlenmektedir [131]. Bu durum ise kseroftalmia, körlük, keratomalazi, kemik gelişiminde bozukluklar ve bağışıklık sisteminin zayıflaması gibi sorunlara yol açmaktadır [101]. A vitamini eksikliği ülkelerin yarısından fazlasında önemli bir sorundur. Özellikle Afrika ve Güneydoğu Asya ülkeleri bu konuda ilk sıralarda yer almaktadır [131]. A vitamini öncülü olması dışında karotenoidlerin kanser, Alzheimer, kalp-damar hastalıkları gibi pek çok hastalıkta koruyucu etkiye sahip olduğu bilinmektedir [6].

İnsan sağlığı açısından yararlı maddeler olması karotenoidlerin üretimine olan rağbeti artırmıştır. Karotenoidler farklı şekillerde elde edilebilmektedir. Bununla birlikte karotenoidler eski zamanlardan beri doğal yollarla elde edilmeye çalışılmıştır. Karotenoidler ana organizmadan elde edilmesinin yanı sıra kimyasal yollarla sentezlenebilmektedir. Ancak kompleks yapılu bileşikler olan karotenoidlerin kimyasal sentezi masraflı ve zahmetlidir. Günümüzde ise metabolik mühendislik çalışmalarının gelişmesi, genetik ve moleküler tekniklerinin kullanımının yaygınlaşması sayesinde ana organizma dışında model organizmalardan elde edilebilmektedir [132]. Metabolik mühendislikte kullanılan model organizmalar bazı özellikleriyle ön plana çıkmaktadır. Bu özelliklerin başında genetik yapılarının çok iyi bilinmesi ve kolaylıkla manipüle edilebilir olmaları, kolay yetiştirilebilen, kısa zamanda çok döl verebilen, ekonomik, kolay ulaşılır ve insan sağlığı açısından güvenli olması yani GRAS statüde canlılar olması gelmektedir [95]. Bu koşulları sağlayan canlıların başında *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae* bulunmaktadır. Bu canlılar dışında bazı deniz algleri, yosunlar ve bazı maya türleri bu çalışmalarda kullanılmaktadır. Metabolik mühendislik yoluyla karotenoid üretiminde ilk kullanılan model organizmalardan biri olan *E.coli*'de bulunan 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat (MEP) yolağı karotenoid sentezinde kullanılmaktadır. Bu yolağa ilave olarak GGPP (geranil geraniyol piro fosfat) sentaz geni crt E, fitoen sentaz geni crt B, fitoen desatüras geni crt I ve likopen siklaz geni crt Y'in *E.coli* hücrelerine verilmesiyle MEP yolağındaki isopentenil difosfat farnesil difosfata dönüşerek beta karoten sentezini gerçekleştirmektedir [133]. Bu genlere ilave olarak *Erwinia* cinsi

bakterilerden alınan β -karoten hidroksilaz crt Z geninin *E.coli*'de ifade edilmesiyle 200-500 mg/g kuru hücre ağırlığı olarak zeaksantin üretilmiştir [134,135].

Bazı çalışmalarda beta karoten miktarını artırmak için MEP yolağının geliştirilmesi ve bu yolağa ilave olarak ökaryotlarda izoprenoid sentezinde kullanılan mevalonat yolağı *E.coli*'ye transfer edilerek karotenoid miktarının artırılması amaçlanmıştır [136,137]. *S.cerevisiae*'den aktarılan mevalonat yolağının *E.coli*'de aktifleştirilmesiyle likopen miktarı 102 mg/l'ye çıkarılmıştır [137]. *Pantoea ananitis* ve *Pantoea agglomerans* bakterilerinden *E.coli*'ye transfer edilen likopen siklaz geni crt Y sırasıyla 36 mg/l ve 35 mg/l beta karoten üretimini sağlamıştır [138]. Aynı çalışmada kullanılan *Pantoea agglomerans* crt E geninin *Pantoea ananitis* crt E genine göre daha etkin olduğu bulunmuştur [138]. Yine aynı çalışmada *E.coli* hücrelerinin 16,5 mM mevalonat ve %2,5 (w/v) gliserolle muamele edilmesi sonucu β - karoten miktarı 503 mg/l ulaşmıştır [138]. 2017 yılında yapılan bir çalışmada *E.coli*'de astaksantin üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada *Pantoea ananitis* bakterisinden izole edilen crt E, B, I, Y ve Z genlerini taşıyan rekombinant *E.coli* hücreleri kullanılmıştır. *Brevundimonas sp.*, *Sphingomonas sp.*, *Paracoccus sp.*, *Chlamydomonas reinhardtii* bakterilerinden alınan β - karoten ketolaz geni crt W ile crt E, B, I, Y ve Z genlerini taşıyan rekombinant *E.coli* hücreleri test edilmiştir. En iyi sonucun *Brevundimonas sp.*'e ait crt W ve *Pantoea ananitis*'e ait crt Z genleriyle elde edildiği bulunmuştur. Sonrasında p37 promotörünün kontrolü altında olan *P. Ananitis*'in crt Y geninden ekstra bir kopya taşıyan ASTA 1 gen kaseti tasarlanarak *E.coli* 'nin kromozomuna entegre edilmiş ve crt W, crt Z genlerinin aktivitesi düzenlenmiştir. Çalışma sonunda fermentör besiyerine hiçbir ek madde eklenmeden $7,4 \pm 0,3$ mg/g kuru hücre ağırlığı olarak astaksantin üretilmiştir [139]. Bizim çalışmamızda ise *S.cerevisiae*'de *X. dendrorhous*'dan alınan crt I, crt E, crt YB genleri ifade edilmiştir. Farklı canlılardan alınan karoten genlerinin aktiviteleri ölçülmemiştir.

E.coli dışında karotenoid üretiminde kullanılan bir diğer canlı bir deniz algı olan *Dunaliella salina*'dır. Bu alg türü doğal olarak β - karoten üretiminde kullanılmaktadır. 2015 yılında yapılan bir çalışmada doğal olarak astaksantin üretiminde kullanılan *Haematococcus pluvialis*'den alınan β - karoten ketolaz enzimini kodlayan bkt geni *Dunaliella*'ya ait Rubisko promotörünün kontrolü altında olacak şekilde ve transit peptid sekansı ile birlikte *Dunaliella salina*'ya verilmiştir. Yapılan HPLC ve MS analizleri sonucu kuru hücre ağırlığı olarak 3,5

$\mu\text{g/g}$ astaksantin ve $1,9 \mu\text{g/g}$ kantaksantin üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma ile *Dunaliella salina*'da ketokarotenoidlerin üretilebileceği gösterilmiştir [100].

E.coli ve bazı algler dışında *Saccharomyces cerevisiae* karotenoid üretiminde kullanılan temel model organizmalardandır. *S.cerevisiae* düşük pH toleransı sayesinde kolaylıkla kontamine olmayan ve yüksek homolog rekombinasyon yeteneği sayesinde genomuna verilen gen kasetlerini kolaylıkla yapısına alabilen bir maya türüdür [95]. Ayrıca *E.coli* ve *Blakeslea trispora* bakterilerinde likopen üretme çalışmalarında *E.coli*'nin endotoksin salgılaması ve *B. trispora*'nın ekstra siklaz inhibitörlerine ihtiyaç duymasına bağlı olarak bu organizmaların *S.cerevisiae*'ye göre daha az güvenli ve daha masraflı olduğu saptanmıştır [140, 141]. *S.cerevisiae* GRAS statüde olan genetik manipülasyonlara dayanıklı bir organizmadır. *S.cerevisiae*'de karotenoid üretiminde kullanılan yolak mevalonat yolağıdır. Mevalonat yolağı mayada dolikollerin, izoprenoidlerin, sterollerin ve ubikinonun sentezlendiği önemli bir yoldur [5]. Maya hücre duvarının yapısına katılan ergosterol de bu yolda sentezlenmektedir. Ergosterol hücre bütünlüğü ve zarın akışkanlığında etkili olan mayalar için önemli bir izoprenidir. Mevalonat yolağı 3 molekül asetil-CoA'nın hidroksil metil glutaryl CoA (HMGCoA)'ya dönüşmesi ile başlamaktadır ve bu aşamada yer alan HMG CoA redüktaz enzimi mevalonat miktarını azaltabilen bir enzimdir [142, 143]. Sonrasında gerçekleşen mevalonatın fosforilasyonu ve dekarboksilasyonu sayesinde izopentenil pirofosfat (IPP) ve onun izomeri olan dimetilalil piro fosfat (DMAPP) oluşmakta ve prenil tranferaz enzimleri sayesinde bu bileşikler geranil difosfat (GPP), farnesil difosfat (FPP) ve geranil geranil difosfata (GGPP) dönüşmektedir (Bkz. Ek 1) [7]. GPP monoterpenlerin, FPP sesquiterpenlerin ve GGPP diterpenlerin sentezinde kullanılmaktadır [144]. Bu yolağı ilave olarak *Xanthophyllomyces dendrorhous* gibi doğal olarak karotenoid üretiminde kullanılan canlılardan alınan crt E, B, I, Y genleri mayaya entegre edilerek β -karoten ve likopen üretimi sağlanabilmektedir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda *S.cerevisiae*'de karoten üretmek ve üretilen karoten miktarını artırmak amacıyla mevalonat yolağı üzerinde birtakım genetik modifikasyonlar yapılmıştır. 1994 yılında yapılan bir çalışmada *Erwinia uredovora*'dan alınan crt E, B, I, Y genleri *S.cerevisiae*'nin kendi genomuna ait promoter ve terminatör bölgeleriyle birleştirilerek bir mekik vektör oluşturulmuştur. Bu çalışmada kuru hücre ağırlığı olarak $113 \mu\text{g/g}$ likopen ve $103 \mu\text{g/g}$ β -karoten üretilenmiştir [145]. Bu çalışmayla hücrede bulunan mevalonat yolağında karoten senteziyle birlikte ergosterol miktarında azalma yaşandığı gösterilmiştir [145]. 2007 yılında yapılan bir çalışmada epizomal vektör yerine mayanın genomuna entegre edilen gen

kasetleri kullanılmıştır. Çünkü epizomal vektörler stabil olmayan suşları ortaya çıkarmakta ve verim düşmektedir. Bu çalışmada Verwaal ve arkadaşları *X. dendrorhous*'dan alınan crt I, Y, B genleriyle birlikte GGPP sentaz geni olan *S.cerevisiae*'de bulunan BTS1 geninin ilave kopyasını mayaya vermişler ve β -karoten ve likopen miktarında artış sağlamışlardır. crtI ve tHMG1 (truncated hidroksil metil glutaril CoA) geninden ekstra kopya verildiğinde kuru hücre ağırlığı olarak 5,9 mg/g β -karoten üretimi sağlanmıştır [6]. 2014 yılında yapılan başka bir çalışmada yine tHMGR (3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA redüktaz) geni ve GGPP sentaz enziminin fazla ifade edilmesi ile birlikte *Pantoea agglomerans* ve *X. dendrorhous*'dan alınan karoten genlerinin ifadesi gerçekleştirilmiştir. *X. dendrorhous*'dan alınan karoten genlerinin *P. agglomerans*'ın genlerinden daha etkili olduğu bulunmuş ve sonuçta kuru hücre ağırlığı olarak 1,56 mg/g β -karoten üretimi sağlanmıştır [146]. 2015 yılında yapılan bir çalışmada *X. dendrorhous*'dan alınan crt YB, E, I genleri ve *S.cerevisiae*'de tHMG1 geninin birlikte ifadesi sonucu kuru hücre ağırlığı olarak 4.47 mg/g likopen üretimi gerçekleştirilmiştir. crt E geninin aktivitesinin güçlendirilmesi ve farklı sayılarda crt gen kopyalarının ilavesi ile birlikte likopen miktarı 24,41 mg/g'a çıkarılmıştır [147]. Bu çalışmada likopen miktarı artarken ergosterol sentezinde kullanılan bir izoprenoid olan squalenin miktarında ise azalma olduğu saptanmıştır [147]. 2016 yılında yapılan bir başka çalışmada *S.cerevisiae*'de bazı gen delesyonlarını yapılmış ve farklı türlerden alınan karoten genlerinin aktivitesi test edilmiştir. Bu türlerden *Blakeslea trispora*'ya ait crt I geni en iyi aktiviteyi göstermiştir. crt I geninin aktivitesi artırılmış ve strese karşı cevap genlerinden INO2 geninin ifadesi artırılarak mevalonat yolağı aktive edilmiştir. Sonuç olarak kuru hücre ağırlığına göre 55,56 mg/g likopen üretilmiştir [148]. 2017 yılında yapılan bir çalışmada β -karoten üreten rekombinant *S.cerevisiae* suşlarında aminoasit, karbonhidrat sentezinde görev alan, glikoliz ve TCA döngüsünde rol oynayan yağ asitleri, asetik asit, süksinik asit, pirüvik asit, gliserol, ergosterol ve ATP gibi maddelerin yabancı suşlara göre daha düşük miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. β -karoten üretimini artırmak için hücrelere logaritmik fazda 10g/l şeklinde asetat uygulanmıştır. Sonuç olarak β -karoten konsantrasyonunda % 39,3 artış ve β -karoten üretiminde %14,2 gelişme gözlenmiştir. Bu bulgular karotenoid oluşumu sırasında hücre içi metabolitlerin çok fazla tüketildiğini ve bu metabolitlerin sınırlı olmasının karoten üretimini etkilediğini göstermektedir [149].

S.cerevisiae'de β -karoten ve likopen üretimine yönelik yapılan çalışmaların genelinde tHMG1 geni kullanılması, FPP sentaz geni olan Erg 20 geninin aktive edilmesi, Erg 9 genine ait orijinal promotörün değiştirilerek farklı bir promotör kullanılması, besiyerine

hidrojen peroksit, asetat, asetil CoA ilavesi gibi yöntemler kullanılmakta mevalonat yolu iyileştirilerek karotenoid üretiminin artırılması amaçlamaktadır. Çalışmalar genellikle karmaşık ve masraflı genetik modifikasyonlar temel alınarak yapılmaktadır. Bu tez kapsamında yapılan çalışmada kullanılan kontrol suş *X. dendrorhous*'dan alınan crt I, Y, B genlerini ve URA3 markerını taşıyan bir plazmit ve tHMG1-Phxt7-crt-I-LEU2 kasetini içermektedir. Yapısında 2 adet crt I geni ve bu genin aktivitesini artırmak için Phxt7 promoterını bulundurmaktadır. Bu tez kapsamında suş üzerinde herhangi bir genetik modifikasyon yapılmamış yalnızca farklı sürelerde UV'ye maruz bırakılmıştır. Yapılan çalışmaların çoğunda sadece β -karoten veya sadece likopen miktarı verilmekte, total karoten miktarları belirlenmemektedir. Bu tez kapsamında yapılan çalışmada β -karoten, likopen, total karoten miktarları her suş için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Yapılan HPLC analizleri sonucuna göre iki ölçümün ortalaması alınmış ve spesifik β -karoten ve likopen miktarları belirlenmiştir. Bu analiz sonuçlarına göre kontrole göre 100 μ j/ 2 sn 6-6 numaralı suшта önemli bir artış saptanmıştır. 100 μ j/ 2 sn 6-6 suшта 725,6764 mg/ml β -karoten ve 68 mg/ml likopen üretimi gözlenmiştir. Bu suş dışında 100 μ j/ 2 sn 3-3 suşunda 50 mg/ml likopen üretilmiş ve 100 μ j/ 3 sn 13-10 suşunda 577,1964 mg/ml β -karoten üretilmiştir. Tüm suşlar β -karoten ve likopen üretimi açısından kontrol ve deney grubu olarak istatistiksel analize tabi tutulmuş ancak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Total karoten miktarları da hesaplanmıştır. 100 μ j/ 2 sn 6-5 ve 100 μ j/ 2 sn 6-6 suşları total karoten açısından kontrole göre anlamlı bir artış göstermektedir. Total karoten miktarı kuru hücre ağırlığı olarak 100 μ j/ 2 sn 6-5 suşunda 7 μ g/g, 100 μ j/ 2 sn 6-6 suşunda 6,5 μ g/g olarak hesaplanmıştır. Tüm suşlar total karoten miktarları açısından kontrol ve deney grubu olarak istatistiksel analizden geçirilmiş ancak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

S.cerevisiae'de β -karoten ve likopen üretimi dışında astaksantin ve diğer ketokarotenoidlerin üretiminin gerçekleştirildiği çalışmalarda mevcuttur. Bu çalışmalarda kullanılan genetik modifikasyonlar β -karoten ve likopen üretimi için yapılan genetik modifikasyonların benzerleridir. 2009 yılında yapılan bir çalışmada β -karoten üretimi yapan maya hücrelerine *Paracoccus*'dan alınan crt W ve *Pantoea ananitis*'den alınan crt Z genleri aktararak 3 μ g/g kuru hücre ağırlığı olarak astaksantin üretimi gerçekleştirilmiştir [150]. Ayrıca *X.dendrorhous* gibi doğal astaksantin üretimi yapan canlılarda astaksantin üretimini artırmaya yönelik çalışmalar bulunmaktadır. 2015 yılında yapılan çalışmada Castelblanco ve arkadaşları yüksek ifadeye sahip crt E geni ve astaksantin sentaz geni crt S ile birlikte crt YB, I, R mutantlarında karotenoid sentez yolağının aktivitesinin arttığını belirtmiştir [151].

Bu tez kapsamında suşlar sıvı besiyerinde 3 kez büyütülmüş ilk büyütmeden sonra bazı suşlar elenmiş 0, 24, 48, 72 saat OD ölçümleri yapılmıştır ve iki büyütmenin ortalamasına göre büyüme eğrileri çizilmiştir. 72 saate doğru OD değerleri azalmıştır. 2016 yılında yapılan bir çalışmada da OD değerleri 48 saate kadar ölçülmüş ve benzer sonuçlar elde edilmiştir [148].

Yapılan çalışmalarda karotenoidlerin spesifik analizinde genellikle HPLC analizi kullanılmıştır. HPLC analizine ek olarak bazı çalışmalarda GC-MS testi, UV/VIS spektral analiz gibi yöntemler de tercih edilmiştir. Bu tez kapsamında yapılan analizler HPLC analizleridir. Spesifik karoten miktarlarının belirlenmesinde yüksek çözünürlüğe sahip HPLC analizi tercih edilmiştir [9]. C₃₀ kolon karotenoidlerin tüm yapısal izomerlerinin ayrıştırılmasında etkili bir sonuç vermektedir [9]. Yapılan çalışmalarda ise genellikle nükleosil C₁₈ kolonu kullanılmıştır.

S.cerevisiae'de üretilen β -karoten ve likopen miktarını artırmak amacıyla UV mutajenez yöntemiyle yapılan bu çalışma diğer yöntemlerle kıyaslandığında; β -karoten ve likopenin ana organizmadan doğal yollarla elde edilmesi ve kimyasal sentezi yöntemlerine göre daha ekonomik, daha az zahmetli bir yöntemdir ve daha fazla üretim sağlamaktadır. Metabolik mühendislik yoluyla model organizmalarda β -karoten ve likopen üretimi yöntemlerine göre daha güvenli, daha az maliyetli ve uygulaması kolay bir yöntemdir. Üretilen β -karoten ve likopen miktarları incelendiğinde diğer yöntemlere alternatif olabileceği görülmektedir. Birçok avantajına rağmen UV mutajenez yöntemi *S.cerevisiae*'de β -karoten ve likopen üretimi çalışmalarında kullanılmamıştır. Bu çalışmanın bu konuda yapılacak çalışmalara emsal teşkil edeceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında UV mutajenez yöntemiyle *Saccharomyces cerevisiae*'de β - karoten ve likopen üretiminin artırılması gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla *S.cerevisiae*'de bazı genetik modifikasyonlarla mevalonat yolağı güçlendirilmiş kontrol suş üzerinde farklı sürelerde UV uygulanmıştır. Bu suş üzerinde UV mutajenez dışında herhangi bir genetik manipülasyon yapılmamıştır.

Kontrol suş üzerinde ilk olarak 1 dk, 2 dk, 3 dk olmak üzere UV uygulanmıştır. Bu işlem sonucunda koloni oluşmamıştır. Bu sürelerin suş üzerinde letal etki yarattığı gözlenmiştir. Sonrasında uygulanan 5 sn, 15 sn, 30 sn UV sürelerinden 10 adet 5 sn kolonisi dışında diğer sürelerde koloni oluşmamıştır. 1 sn, 2 sn, 3 sn, 6 sn UV sürelerinde koloni gözlenmiştir. Ancak koyu renkli kolonilerin 2 sn ve 3 sn petrilinde fazla olmasına bağlı olarak 2 -3 sn'nin optimum UV süresi olduğuna karar verilmiştir. UV mutajenez deneyi dört kez uygulanmış toplamda 219 koloni petrilere koyu rengi, koloni büyüklüğünün kontrol suşla eşdeğer olması gibi kriterlere göre seçilerek tek koloni ekim yapılmıştır. Tek koloni ekim sırasında elde edilen tüm UV mutant koloniler kontrolle kıyaslanarak elenmiş veya seçilmiştir. 219 koloniden 15 adeti seçilerek büyütülmeye devam edilmiştir. Sonrasında bu suşların sıvı besiyerindeki büyümeleri ve renk durumları test edilmiştir. Bu suşlar yine kontrol suşla birlikte 3 gün boyunca 30 °C 300 rpm çalkalayıcı inkübatörde büyütülmüştür. 3 günün sonunda kontrolle kıyaslanarak bazı suşlar elenmiştir. Geriye kontrol, 100 μ j/2 sn 3, 6, 13, 100 μ j/3 sn 13, 14 suşları kalmıştır. Bu suşlar her birinden 2 örnek olacak şekilde 50 ml YPD sıvı besiyerinde 3 gün boyunca 30 °C 300 rpm çalkalayıcı inkübatörde büyütülmüştür. 3 gün boyunca OD değerleri ölçülmüştür. Yapılan Mann Whitney istatistiksel analizine göre 0, 24, 48, 72 saat değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur. Bu değerlere göre 72 saate kadar OD artışı gözlenmiştir. Bu durum suşların 3 gün boyunca bölünmeye devam ederek çoğaldıklarını göstermektedir. Kontrol ve deney gruplarının gruplar arası analizinde kullanılan Friedman analizine göre kontrol ve deney grubunun OD değerleri arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Bu durum UV mutant suşların da kontrol gibi bir büyüme gösterdiklerini ve yapılan mutasyonun suşların çoğalmasını etkilemediğini doğrular niteliktedir. Bu suşlar son kez 50 ml YPD içerisinde 3 gün boyunca 30 °C 300 rpm çalkalayıcı inkübatörde büyütülmüştür. 3 gün boyunca OD değerleri ölçülmüştür. Yapılan grup içi Mann Whitney analizine göre 0, 24, 48, 72 saat OD değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak bu sürelerdeki OD değerlerinde bir artış

mevcuttur. Grup içi analiz için kontrol ve deney grupları Friedman testiyle analiz edilmiştir. Bu test sonuçlarına göre kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. UV mutant suşlar da kontrol kadar iyi bir büyüme göstermektedir. Bu iki büyümenin ortalaması ve standart sapmaları alınarak bir büyüme eğrisi oluşturulmuştur. Sıvı besiyerinde suşların büyütülmesi deneyinin son iki uygulamasında elde edilen tüm suşlar toplanarak saklanmıştır. Liyofilizatörde içlerindeki su kurutularak kuru peletler elde edilmiştir. Sonrasında bu suşlardan karoten ekstraksiyonu yapılmıştır. Yapılan ekstraksiyonlar sonucu 2 ml heksanda çözülmüş karotenler üzerinden OD 449 nm’de OD okunarak total karoten miktarları belirlenmiştir. Total karoten miktarları kuru hücre ağırlığı üzerinden $\mu\text{g/g}$ şeklinde ifade edilmiştir. Karoten ekstraksiyonu deneyinin iki uygulaması sonucunda belirlenen total karoten miktarlarının ortalaması ve standart sapması alınarak bir total karoten grafiği oluşturulmuştur. Bu ortalama total karoten miktarlarına göre kontrol suşta $1 \mu\text{g/g}$ total karoten üretilirken, $100 \mu\text{j/2 sn}$ 6 suşuna ait iki örnek olan $100 \mu\text{j/2 sn}$ 6-5 ve $100 \mu\text{j/2 sn}$ 6-6’da sırasıyla 7 ve $6,5 \mu\text{g/g}$ total karoten üretilmiştir. Bununla birlikte kontrol ve deney grubunun gruplar arası karşılaştırılması için yapılan Wilcoxon testine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Karoten ekstraksiyonu deneyinin 1. ve 2. uygulamasında elde edilen total karoten miktarlarının karşılaştırılması adına yapılan Mann Whitney testine göre bu iki uygulama arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu durum 1. ve 2. karoten ekstraksiyonunun uygulamasında yapılan işlemlerin birbiriyle eşdeğer olduğunu göstermektedir.

Karoten ekstraksiyonu deneyinin sonucunda elde edilen total karoten içerisindeki β - karoten ve likopenin hangi suşta ne kadar bulunduğunu belirlemek amacıyla HPLC analizi uygulanmıştır. Yapılan analizler sonucu her suşa ait β - karoten ve likopen miktarları $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmış sonrasında bu değerler mg/ml olarak ifade edilmiştir. 1. ve 2. karoten ekstraksiyonu deneyi sonucu elde edilen tüm suşlarda β - karoten ve likopen miktarları saptanmış, ortalaması ve standart sapması alınarak grafikler oluşturulmuştur. Bu sonuçlara göre kontrol 1 suşunda $365,593 \text{ mg/ml}$ β - karoten üretilirken $100 \mu\text{j/2 sn}$ 6-6 suşunda $725,6764 \text{ mg/ml}$ β - karoten üretilmektedir. $100 \mu\text{j/3 sn}$ 13-10 suşunda $577,1964 \text{ mg/ml}$ β - karoten üretilmektedir. Ancak HPLC β - karoten ölçümlerinin kontrol ve deney olarak karşılaştırmasında kullanılan Wilcoxon testine göre anlamlı bir fark saptanmamıştır. Karoten ekstraksiyonu deneyinin 1. ve 2. uygulamasının β - karoten miktarlarının karşılaştırılması adına yapılan Mann Whitney testine göre bu iki uygulama arasında anlamlı bir fark

gözlenmemiştir. Bu durum karoten ekstraksiyonu deneyinin 1. ve 2. uygulamasının benzer sonuçlara sahip olduğunu göstermektedir.

Likopen üretiminde ise kontrol 1 suşunda 19 mg/ml likopen üretilirken 100 μ j/2 sn 6-6 suşunda 68 mg/ml likopen üretilmektedir. 100 μ j/2 sn 3-3 suşunda 50 mg/ml likopen gözlenmiştir. Bununla birlikte HPLC likopen ölçümlerinin kontrol ve deney olarak karşılaştırmasında kullanılan Wilcoxon testine göre anlamlı bir fark saptanmamıştır. Karoten ekstraksiyonu deneyinin 1. ve 2. uygulamasının sonucunda elde edilen likopen miktarlarının karşılaştırılması adına yapılan Mann Whitney testine göre bu iki uygulama arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. 1. ve 2. karoten ekstraksiyonu uygulamasında elde edilen sonuçlar özdeştir.

Bu sonuçlar UV mutant suşların bazılarında kontrole göre β - karoten ve likopen miktarının artış gösterdiğini ortaya koymaktadır. Elde edilen tüm mutant suşlar sıvı ve katı besiyerinde kontrol kadar veya özellikle 100 μ j/3 sn 14 suşu olmak üzere kontrolden daha iyi bir büyüme gösterebilmişlerdir. Literatürde *S.cerevisiae*'de UV mutajenez yöntemiyle β - karoten ve likopen üretmek adına bir çalışma olmaması bu tez kapsamında yapılan çalışmanın önemini ortaya koymaktadır. Bu çalışmada kullanılan UV mutajenez, mevalonat yolağını aktiveleştirmeye yönelik yapılan diğer genetik işlemlere göre uygulaması kolay ve ekonomik bir yöntemdir. Bu çalışmada kullanılan UV miktarı 100 μ j'dür. Bu miktar dışında farklı miktarlar ve farklı süreler çalışmanın devamında yapılacak alternatif yöntemler arasında sayılabilir. Karotenlerin hücreden ekstre edilme aşamasında kullanılan %99'luk heksan dışında bir çözücü kullanılarak özellikle HPLC analizinde zor pik veren likopenin daha iyi çözünmesi sağlanabilir. UV mutajenez uygulamasında elde edilen suşların genomunun sekanslatılması mutasyonun hangi gende gerçekleştiğini, fenotipte nasıl bir etkiye sebep olduğunu anlamak adına denenebilecek bir yöntemdir. UV mutajenez yöntemi sadece *S.cerevisiae*'de değil metabolik mühendislik alanında kullanılan diğer model organizmalarda da denebilecek bir yöntemdir. Bu yöntem metabolik mühendislik çalışmalarının temel amacı olan ekonomik, kolay yollardan çok miktarda istenilen ürün elde etme gayesine uygun bir yöntemdir. Mevalonat yolağını etkileyen bazı genlerin delesyonları, aktiveleştirilmesi ve sessizleştirilmesi gibi genetik işlemlerle birlikte kullanılması denenebilecek bir yöntemdir. Ancak yapılan her genetik modifikasyon ekstra maliyet getirmesine bağlı olarak UV mutajenez işlemi kadar ekonomik bir yöntem olmayacaktır.

Sonuç olarak ekonomik, kolay ve güvenli bir yöntem olan UV mutajenez yöntemiyle *S.cerevisiae*'de β -karoten ve likopen üretiminin artırılması dünyada A vitamini eksikliğine bağlı olarak gerçekleşen keratomalazi, kseroftalmia, kemik ve gelişim bozuklukları gibi hastalıkların görülme oranının azaltılmasında önemli bir adım niteliğindedir. Bu hastalıklar dışında Alzheimer, Parkinson, kanser, kalp damar ve immün sistem hastalıkları üzerinde koruyucu ve iyileştirici etkiye sahip β -karoten ve likopenin üretiminin artırılması bu hastalıklardan muzdarip hastalar adına önemli bir gelişme teşkil etmektedir. Bu konuda çalışma yapan araştırmacılar için alternatif bir yöntem olan UV mutajenez *S.cerevisiae*'de sadece β -karoten ve likopen üretiminde değil, aynı zamanda astaksantin gibi diğer karotenoidlerin, izoprenoidlerin, artemisinin, taxol gibi ilaçların üretiminde kullanılabilecek önemli bir genetik yöntemdir.

KAYNAKLAR

1. Forman, M. R., Lanza, E., Yong, L. C., Holden, J. M., Graubard, B. I., Beecher, G. R., Melitz, M., Brown, E. D., and Smith, J. C. (1993). The correlation between two dietary assessments of carotenoid intake and plasma carotenoid concentrations: Application of a carotenoid food-composition database. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 58(4), 519-524.
2. Wüstenberg, B., Stemmler R. T, Létinois, U., Bonrath, W., Hugentobler, M., and Netscher, T. (2011). Large-scale production of bioactive ingredients as supplements for healthy human and animal nutrition. *Chimia (Aarau)*, 65(6), 420-428.
3. Krivoruchko, A., and Nielsen, J. (2015). Production of natural products through metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Opinion in Biotechnology*, 35(12), 7-15.
4. Runguphan, W., and Keasling J. D. (2014). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid -derived bio fuels and chemicals. *Metabolic Engineering*, 21(6), 103-113.
5. Tippmann, S., Ferreira, R., Siewers V., Nielsen, J., and Chen Y. (2017, June). Effects of acetoacetyl-CoA synthase expression on production of farnesene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 911-922.
6. Verwaal, R., Wang, J., Meijnen, J., Visser, H., Sandmann, G., van den Berg, J. A., and van Ooyen A. J. J. (2007). High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(13), 4342-4350.
7. Özaydın, B., Burd, H., Lee, T. S., and Keasling J. D. (2013, July). Carotenoid - based phenotypic screen of the yeast deletion collection reveals new genes with roles in isoprenoid production. *Metabolic Engineering*, 174-183.
8. Sui, X., Kiser, P. D., von Lintig, J., and Palczewski K. (2013, November). Structural basis of carotenoid cleavage: from bacteria to mammals. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 203-213.
9. Gupta, P., Sreelakshmi, Y., and Sharma, R. (2015, February). A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography. *Plant Methods*, 1-12.
10. Yılmaz, İ. (2010). Karotenoidler. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 17 (3), 223-231
11. Raisig, A., and Sandmann G. (2001). Functional properties of diapophytoene and related desaturases of C30 and C40 carotenoid biosynthetic pathways. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1533(2), 164-170.
12. Koca N.(2006). *Havuçlarda (Daucus Carota L.) Karotenoidler ve Antioksidan Aktivite*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 3-4.

13. Britton, G. (1992). Carotenoids. In G. A. F. Hendry and J. D. Houghton (Eds), *Natural food colorants*. New York, Blackie and Sons Ltd., pp. 141–182,
14. von Elbe, J. H. and Schwartz, S. J. (1996). Colorants. In O. R. Fennema (Ed), *Food chemistry*. New York, Marcel Dekker Inc., pp: 651–722.
15. Hart, D.J., and Scott, K. J. (1995). Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chemistry*, 54(1), 101-111.
16. Britton , G., Liaaen-Jensen, S. and Pfander, H. (Editors). (1995). *Isolation and analysis*, Basel: Birkhauser Publishing, vol 1A.
17. Linaaen –Jensen, S. (2004). Basic carotenoid chemistry. In N. Krinsky, S. T. Mayne and H. Sies (Eds.), *Carotenoids in health and disease*. New york, Marcel Dekker, pp. 1-31.
18. Gerster, H. (1997). The potential role of lycopene in human health. *Journal of American College of Nutrition*, 16(2), 109-122.
19. Rao, A.V., and Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55(3), 207-216.
20. Rock, C. L. (1997). Carotenoids: biology and treatment. *Pharmacology & Therapeutics*, 75(3), 185-197.
21. Linaaen –Jensen, S. (Editor). (1962). *The constituion of some bacterial carotenoids and their bearing on biosynthetic problems*, Trondheim: Det Kgl, 8.
22. Johnson, J.D. (2009). Do carotenoids serve as transmembrane radical channels? *Free Radical Biology & Medicine*, 47(3), 321-323.
23. Omoni, A. O., and Aluko, E. (2005). The anticarcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 16(8), 344-350.
24. Zino, S., Skeaff, M., Williams, S., and Mann, J. (1997, June). Randomised controlled trial of effect of fruit and vegetable consumption on plasma concentrations of lipids and antioxidants. *British Medical Journal*, 1787-1791.
25. Khachik, F., Beecher, G. R., and Goli, M.B. (1991, September). Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. *Pure and Applied Chemistry*, 71-80.
26. İnternet: Doğal karotenoid kaynakları ve yumurta sarı rengi URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.organikpin.com%2Ftavuk%2520rasyonunda%2520do%C4%9Fal%2520renklendirici.pdf+%&date=2018-01-03> Son Erişim Tarihi: 03.01.2018.
27. Stahl, W., van den Berg, H., Arthur, J., Bast, A., Dainty, J., Faulks, R. M., Gärtner, C., Haenen, G., Hollman, P., Holst, B., Kelly, F.J., Polidori, M.C., Rice-Evans, C.,

- Southon, S., van Vliet, T., Viña-Ribes, J., Williamson, G., and Astley, S.B. (2002). Bioavailability and metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*, 23(1-3), 39-100.
28. Gruszecki, W. I. (1999). Carotenoids in membranes. In H. A. Frank, A. J. Young, G. Britton, and R. J. Cogdell (Eds.), *The photochemistry of carotenoids*. Dordrecht, Kluwer Academic, pp. 363-379.
 29. van de Ven, M., Kattenberg, M., van Ginkel, G., and Levine, Y. K. (1984, June). Study of orientational ordering of carotenoids in lipid bilayers by resonance-Raman spectroscopy. *Biophysical Journal*, 1203-1209.
 30. Johansson, L.B.-A., Lindblom, G., Wieslander, A., and Arvidson, G. (1981, June). Orientation of beta carotene and retinal in lipid bilayers. *FEBS Letters*, 97-99.
 31. Boileau, C. A. Erdman, J. W. Jr. (2004). Impact of food processing on content and bioavailability of carotenoids. In N. Krinsky, S.T. Mayne and H. Sies (Eds.), *Carotenoids in health and disease*. New York, Marcel Dekker, pp. 209-228.
 32. Chandler, L. A. and Schwartz, S. J. (1987). HPLC separation of cis-trans carotene isomers in fresh and processed fruits and vegetables. *Journal of Food Science*, 52(3), 669-672.
 33. Shi, J., and Le Maguer, M. (2000). Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 1-42.
 34. Nguyen, M. L., and Schwartz, S. J. (1998). Lycopene stability during food processing. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 218(2), 101-105.
 35. Clinton, S. K., Emenhiser, C., Schwartz, S.J., Bostwick, D.G., Williams, A.W., Moore B.J., and Erdman, J.W. Jr. (1996). Cis-trans lycopene isomers, carotenoids and retinole in the human prostate. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 5(10), 823-833.
 36. Khachik, F., Goli, M. B., Beecher, G.R., Holden, J., Lusby, W.R., Tenorio M.D., and Barrera, M.R. (1992). Effect of food preparation on qualitative and quantitative distribution of major carotenoid constituents of tomatoes and several green vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(2), 390-398.
 37. Clinton, S. K., and Giovannucci, E. (1998). Diet, nutrition and prostate cancer. *Annual Review of Nutrition*, 18(1), 412-440.
 38. Clinton, S.K. (1999). The dietary antioxidant network and prostate carcinoma. *Cancer*, 86(9), 1629-1631.
 39. Rao, A. V., and Agarwal, S. (2000). Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(5), 563-569.
 40. Mortensen, A., Skibstedt, L.H., and Truscott, T.G. (2001, January). The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 13-19.

41. Su, Q., Rowley, K.G., and Balazs, N. D. H. (2002, December). Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. *Journal of Chromatography B*, 393-418.
42. Moore, T. (1957). *Vitamin A* (Birinci baskı). Amsterdam: Elsevier, 39-42.
43. Barua, B.A. (2004). Bioconversion of provitamin A carotenoids. In N. Krinsky, S.T. Mayne and H. Sies (Eds.), *Carotenoids in health and disease*. New york, Marcel Dekker, pp. 295-312.
44. Bauernfeind, J.C., Adams, C.R., and Marusich W.L. (1981). Carotenes and other vitamin A precursors in animal feed. In J.C. Bauernfeind (Ed), *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors*. New York, Academic Press, pp. 563-743.
45. Cantrell, A., Truscott, G. T. (2004). Carotenoids and radicals; interactions with other nutrients. In N. Krinsky, S.T. Mayne and H. Sies (Eds.), *Carotenoids in health and disease*. New york, Marcel Dekker, pp. 31-52.
46. Ziegler, R. G., Mayne, S. T., and Swanson, C. A. (1996, January). Nutrition and lung cancer. *Cancer Causes Control*, 157-177.
47. Koca, N., ve Karadeniz, F. (2003). Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 16(1), 32-37.
48. Mortensen, A., and Skibsted, L. H. (1996). Kinetics of parallel electron transfer from β -carotene to phenoxyl radical and adduct formation between phenoxyl radical and β -carotene. *Free Radical Research*, 25(6), 515-523.
49. Edge, R., Land, E.J., McGarvey, D., Mulroy, L., and Truscott, T.G. (1998, February). Relative one - electron reduction of potential of carotenoids radical cations and the interactions of carotenoids with the vitamin E radical cation. *Journal of the American Chemical Society*, 4087-4090.
50. Edge, R., Truscott, T. G. (1999). Carotenoid radicals and the interaction of carotenoids with active oxygen species. In H. A. Frank, A. J. Young, G. Britton, R. J. Cogdell (Eds.), *The photochemistry of carotenoids*. Dordrecht, Kluwer Academic, pp. 223-234.
51. Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M. and Rice-Evans, C.A. (1996, April). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 240-242.
52. Burton, G.W., and Ingold K. U. (1984). β -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224(4649), 569-573.
53. Woods, J. A., Young, A. J., Gilmore, I. T., Morris, A., and Bilton, R. F. (1997, February). Measurement menadione-mediated DNA damage in human lymphocytes using the comet assay. *Free Radical Research*, 113-124.
54. Rock, C. L. (2004). Relationship of carotenoids to cancer. In N. I. Krinsky, S. T. Mayne and H. Sies (Eds.), *Carotenoids in health and disease*. New york, Marcel Dekker, pp. 373-407.

55. Sumantran, V. N., Zhang, R., Lee, D.S., Wicha, M.S. (2000, March). Differential regulation of apoptosis in normal versus transformed mammary epithelium by lutein and retinoic acid. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 257-263.
56. Prakash, P., Krinsky, N. I., and Russell, R.M. (2000, June). Retinoids, carotenoids and human breast cancer cell cultures: a review of differential effects. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 170-176.
57. Jemal, A., Thomas, A., Murray, T., and Thun, M. (2002, January- February). Cancer statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*. 23-47.
58. Cancer Facts and Figures. (1 Aralık 2002). *American Cancer Society*, 92-108.
59. Palozza, P., Serini, S., Magiano, N., Angelini, M., Boninsegna, A., Di Nicuolo F, Ranelletti, F.R., and Calviello, G. (2002). Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human colon adenocarcinoma cell lines by beta-carotene through down-regulation of cyclin A and Bcl-2 family proteins. *Carcinogenesis*, 23(1), 11-18.
60. Palozza, P., Calviello, G., Serini, S., Magiano, N., Lanza, P., Ranelletti F.O., and Bartoli, G. M. (2001). Beta-carotene at high concentrations induces apoptosis by enhancing oxy-radical production in human adenocarcinoma cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 30(9), 1000-1007.
61. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. (1997). *Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective*. Washington, DC: American Institute for Cancer Research, 312-314.
62. Engle, A., Muscat, J. E., and Harris, R. E. (1991, January). Nutritional risk factors and ovarian cancer. *Nutrition and Cancer*, 239-247.
63. Cramer, D.W., Kuper, H., Harlow, B.L., and Titus-Ernstoff L. (2001, October). Carotenoids, antioxidants and ovarian cancer risk in pre-and postmenopausal women. *International Journal of Cancer*, 128-134.
64. Heber, D., and Lu, Q., (2002). Overview of mechanism of action of lycopene. *Experimental Biology and Medicine*, 227(10), 920-923.
65. Albanes, D., Hartman T.J. (1999). Antioxidants and cancer: evidence from human observational studies and intervention trials. In A.M. Papas (Ed), *Diet, nutrition and health*. Boca Raton, CRC Press, pp. 497-544.
66. Mayne, S.T., Lippman, S.M. (2001). Cancer prevention: diet and chemopreventive agents: Retinoids, carotenoids and micronutrients. In V. T. De Vita, S. Hellman, S. A. Rosenberg (Eds.). *Principles and practice of oncology*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, pp. 575-590.
67. Zhou, S., Zhang, R., Bi T., Lu Y., and Jiang L. (2016, July). Inhibitory effect of lycopene against the growth of human gastric cancer cells. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines*, 184-190.
68. Sharoni, Y., Danilenko, M., Levy, J., Stahl, W. (2004). Anticancer activity of carotenoids: From human studies to cellular process and gene regulation. In N. I.

- Krinsky, S. T. Mayne and H. Sies (Eds.), *Carotenoids in health and disease*. New York, Marcel Dekker, pp. 165-196.
69. Amir, H., Karas, M., Giat, J., Danilenko, M., Levy, R., Yermiah, T., Levy, J., and Sharoni, Y. (1999). Lycopene and 1,25-dihydroxyvitamin-D₃ cooperate in the inhibition of cell cycle progression and induction of differentiation in HL-60 leukemic cells. *Nutrition and Cancer*, 33(1), 105-112.
 70. Livny, O., Kaplan, I., Reifen, R., Polak-Charcon, S., Madar, Z., and Schwartz, B. (2002). Lycopene inhibits proliferation and enhances gap-junction communication of KB-1 human oral tumor cells. *Journal of Nutrition*, 132(12), 3754-3759.
 71. Hughes, D.A. (2000). Dietary antioxidants and human immune function. *Nutrition Bulletin*, 25(2), 35-41.
 72. Basu, H. N., Del Vecchio, A. J., Flider, F. and Orthoefer, F. T. (2001, May). Nutritional and potential disease prevention properties of carotenoids. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, 665-675.
 73. Rauscher, R., Edenharder, R. and Platt, K. L. (1998, March). In vitro antimutagenic and in vivo anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids. *Mutation Research*, 129-142.
 74. Joshipura, K. J., Hu, F.B., Manson, J.E., Stampfer, M. J., Rimm, E.B., Speizer, F.E., Colditz, G., Ascherio, A., Rosner, B., Spiegelman, D., and Willett, W. C. (2001). The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Annals of Internal Medicine*, 134(12), 1106-1114.
 75. Sesso, H. D., Gaziano, J. M. (2004). Heart and vascular diseases. . In N. I. Krinsky, S. T. Mayne and H. Sies (Eds.), *Carotenoids in health and disease*. New York, Marcel Dekker, pp. 473-490.
 76. Bernstein, P.S., Gellermann, W. (2004). Noninvasive assessment of carotenoids in the human eye and skin. In N. I. Krinsky, S. T. Mayne and H. Sies (Eds.), *Carotenoids in health and disease*. New York, Marcel Dekker, pp.53-84.
 77. Mares, J.A. (2004). Carotenoids and eye disease: epidemiological evidence. In N. I. Krinsky, S. T. Mayne and H. Sies (Eds.), *Carotenoids in health and disease*. New York, Marcel Dekker, pp. 427-444.
 78. Ma, L., and Lin, X.M. (2010). Effects of lutein and zeaxanthin on aspects of eye health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(1), 2-12.
 79. Mathews-Roth M. M. (2004). Therapeutic uses of carotenoids in skin photosensitivity diseases. In N. I. Krinsky, S. T. Mayne and H. Sies (Eds.), *Carotenoids in health and disease*. New York, Marcel Dekker, pp. 519-529.
 80. Stahl W, Sies H. (2004). Carotenoids in systemic protection against sunburn. In N. I. Krinsky, S. T. Mayne and H. Sies (Eds.), *Carotenoids in health and disease*. New York, Marcel Dekker, pp. 491-502.

81. Hughes DA.(2004).Carotenoids and immune responses. In N. I. Krinsky, S. T. Mayne and H. Sies (Eds.), *Carotenoids in health and disease*. New york, Marcel Dekker, pp. 503-517.
82. Blum, A., Monir, M., Wirsansky, I., and Ben-Arzi, S. (2005, October). The beneficial effects of tomatoes. *European Journal of Internal Medicine*, 402-404.
83. Liu, M., Liu, H., Xie, J., Xu, Q., Pan, C., Wang, J., Wu, X., Sanabil, Zheng, M., and Liu, J. (2017). Anti-obesity effects of zeaxanthin on 3T3-L1 preadipocyte and high fat induced obese mice. *Food & Function*, 8(9), 3327-3338.
84. Al-Malki A.L., and Moselhy S.S. (2016). Free fatty acids profiling in response to carnitine synergize with lutein in diabetic rats. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines*, 13(6), 149-154.
85. Zeng, Z., He, W., Jia, Z., and Hao, S. (2017, October). Lycopene improves insulin sensitivity through inhibition of stat3/srebp-1c-mediated lipid accumulation and inflammation in mice fed a high-fat diet. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*, 610-617.
86. Astorg, P. (1997). Food carotenoids and cancer prevention: An overview of current research. *Trends in Food Science and Technology*, 8(12), 406-413.
87. Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB Journal*, 10(9), 940-954.
88. Chawla, A., Repa, J. J., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D. J. (2001, November). Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*, 1866-1870.
89. Deming, D. M. and Erdman, J. W. (1999). Mammalian carotenoid absorption and metabolism. *Pure and Applied Chemistry*, 71(9), 2213–2223.
90. Yeum, K.J., Booth, S. L., Sadowski, J. A., Liu, C., Tang, G., Krinsky, N.I., and Russell, R.M. (1996). Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables. *American Journal of Clinical Nutrition*, 64(4), 594-602.
91. Canfield, L. M., Giuliano, A.R., Neilson, E.M., Yap, H.H., Graver, E.J., Cui, H.A., and Blashill, B.M. (1997). Beta-carotene in breast milk and serum is increased after a single beta-carotene dose. *American Journal of Clinical Nutrition*, 66(1), 52-61.
92. Albanes, D., Wright M. E.(2004). Potential adverse effects of β -carotene supplementation in cigarette smokers and heavier drinkers. In N. I. Krinsky, S. T. Mayne and H. Sies (Eds.), *Carotenoids in health and disease*. New york, Marcel Dekker, pp. 531-551.
93. Bayraç, A.T., Baloğlu, M. C., Bayraç, C., Cansız, S. (2012). Rekombinant DNA teknolojisi. M. Karataş(Editörler). *Moleküler biyoloji*. Ankara, Nobel Yayın, s. 277-307.
94. İnternet: Rekombinat DNA oluşumu. URL:
<http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.emaze.com%2F%40AFILTOZW%23%21&date=2017-12-31> Son Erişim Tarihi:31.12.2017.

95. Julleson, D., David, F., Pflieger, B., and Nielsen, J. (2015, November). Impact of synthetic biology and metabolic engineering on industrial production of fine chemicals. *Biotechnology Advances*, 1395-1402.
96. Nielsen, J., Fussenegger, M., Keasling, J., Lee, S.Y., Liao, J.C., Prather, K., and Palsson, B. (2014). Engineering synergy in biotechnology. *Nature Chemical Biology*, 10(5), 319-322.
97. Tombuloğlu, A., Akman, A., Tekinay, A.B. (2012). Hücreler ve organizmalar. M.Karataş (Editörler). *Moleküler biyoloji* Ankara, Nobel Yayın, s. 3-21.
98. Wang, C. W., Oh, M. K., and Liao, J. C. (1999, January). Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 235-241.
99. Borodina, I., and Nielsen, J. (2014). Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of chemicals. *Biotechnology journal*, 9(5), 609-620.
100. Anila, N., Simon, D. P., Chandrashekar, A., Ravishankar, G. A., and Sarada R. (2015, March). Metabolic engineering of *Dunaliella salina* for production of ketocarotenoids. *Photosynthesis Research*, 321-333.
101. Wilson, S., and Roberts, S. (2014). Metabolic engineering approaches for production of biochemicals in food and medicinal plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 26(4), 174-182.
102. Krivoruchko, A., Zhang, Y., Siewers, V., Chen, Y., and Nielsen, J. (2015, March). Microbial acetyl-CoA metabolism and metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 28-42.
103. İkehata, H., and Ono, T. (2011). The Mechanisms of UV Mutagenesis. *Journal of Radiation Research*, 52(2), 115-125.
104. Griffiths, A. J. F., Miller, J.H., Suzuki, D. T., Lewontin, R.C., and Gelbart, W. M. (2000). *An Introduction to Genetic Analysis* (Yedinci Baskı). New York: W. H. Freeman, 40-44.
105. Kielbassa, C., Roza, L. and Epe, B. (1997, April). Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis*, 811-816.
106. Kvam, E., and Tyrell, R. (1997).) Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis*, 18(12), 2379-2384.
107. Kino, K., and Sugiyama, H. (2005). UVR-induced G-C to C-G transversions from oxidative DNA damage. *Mutation Research*, 571(1-2), 33-42.
108. Lemontt, J.F., Generoso, W.M. (1982). *Molecular and Cellular Mechanisms of Mutagenesis* (Birinci Baskı). New York: Plenum press, pp. 109-120.

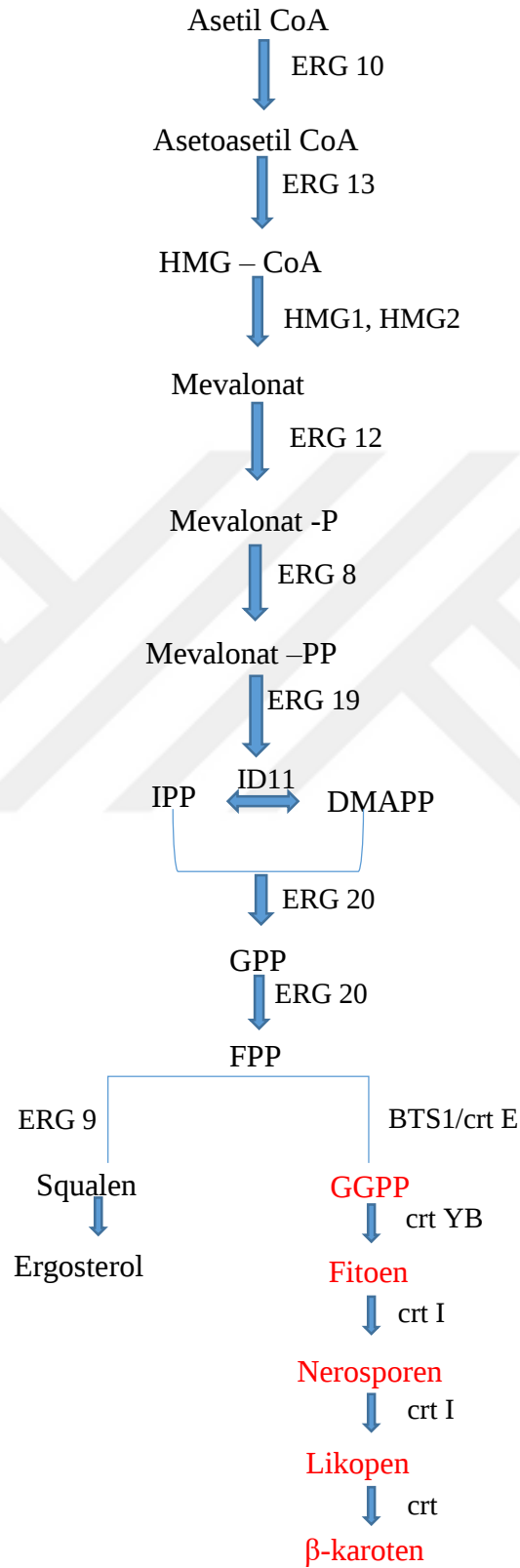
109. Pfeifer, G. P. (1997). Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Journal of the Photochemistry and Photobiology*, 65(2), 270-283.
110. Johnson, R.E., Prakash, S., and Prakash, L. (1999, February). Efficient bypass of a thymine -thymine dimer by yeast DNA polymerase. *Poleta Science*, 1001-1004.
111. Smith, C.A., Baeten, J., and Taylor, J.S. (1998, August). The ability of a variety of polymerases to synthesize past site-specific cis-syn, trans-syn II,(6-4) and Dewar photoproducts of thymidyl –(3'-5')-thymidine. *Journal of Biological Chemistry*, 21933-21940.
112. Pfeifer, G. P., You, Y., and Besaratinia, A. (2005, April). Mutations induced by ultraviolet light. *Mutations Research*, 9-31.
113. García-Nieto, P. E., Schwartz, E. K., King, D. A., Paulsen, J., Collas, P. Herrera, R. E., Morrison, A. J. (2017). Carcinogen susceptibility is regulated by genome architecture and predicts cancer mutagenesis. *The EMBO Journal*, 36(19), 2829-2843.
114. Hohhman, S. (2000). *Yeast genetics and molecular biology* (Birinci Baskı). Heidelberg: Springer, 1-85.
115. Schneiter, R. (2004). *Genetics, Molecular and Cell Biology of Yeast* (Birinci Baskı). Fribourg: Universite de fribourg suisse, 1-85.
116. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., and Clarck D. P. (2009). *Brock Biology of Microorganisms*. (Onikinci Baskı). San Francisco: Pearson Education Inc., 82-85.
117. Sariözlü, N., Demirel, R. (2011). Mikroorganizmalarda çeşitlilik – II. K.Güven (Editörler). *Genel mikrobiyoloji*, Eskişehir. Anadolu Üniversitesi Web-Ofset, s. 154-174.
118. Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), 546-567.
119. Wolters, J.F., Chiu, K., and Fiumera, H.L. (2015, June). Population structure of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genomics*, 12864-13015.
120. İnternet: Spektrofotometre URL:
<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fyasam.gazi.edu.tr%2Fposts%2Fview%2Ftitle%2Fspektrofotometre-72974&date=2017-12-31> Son Erişim Tarihi:31.12.2017.

121. İnternet: HPLC URL:
<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fyasam.gazi.edu.tr%2Fposts%2Fview%2Ftitle%2Fhplc-%2528yukse-basincli-sivi-kromatografisi%2529-72904&date=2017-12-31> Son Erişim Tarihi:31.12.2017.
122. İnternet: CEN PK2 suşu URL:
http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.euroscarf.de%2Fplasmid_details.php%3Faccno%3D30000A&date=2018-02-1 Son Erişim Tarihi: 01.02.2018
123. Sherman, J. M., Stone, E. M., Freeman-Cook, L. L., Brachmann, C. B., Boeke, J. D., and Pillus, L. (1999).The conserved core of a human SIR2 homologue functions in yeast silencing. *Molecular Biology of the Cell*, 10(9), 3045-3059.
124. İnternet: UV mutajenez protokolü. URL:
<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.biology.emory.edu%2Fresearch%2FCorbett%2FyeastUV.html++&date=2017-12-31> Son Erişim Tarihi:31.12.2017.
125. Winston, F. (2008). EMS and UV Mutagenesis in Yeast. *Current Protocols in Molecular Biology*, 13(3), 82.
126. İnternet: Liyofilizatör çalışma prensipleri URL:
<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fegematal.ege.edu.tr%2Ffiles%2Fpdf%2FLiyofilizator.pdf&date=2017-12-31> Son Erişim Tarihi: 19.12.2017.
127. İnternet: Heksanın kimyasal yapısı. URL:
<http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Ftr.esdifferent.com%2Fdifference-between-hexane-and-cyclohexane&date=2017-12-31> Son Erişim Tarihi: 31.12.2017.
128. İnternet: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) URL:
<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fgidaerge.akdeniz.edu.tr%2Fcihazlar.i32.yukse-performansli-sivi-kromatografisi-hplc-+&date=2017-12-31> Son Erişim Tarihi: 31.12.2017.
129. Aral, H. (2013). *Farklı Polaritelere Sahip Amid-Silika Kolon Dolgu Materyallerinin Sentezi ve HPLC İle Çeşitli Polar Bileşiklerin Ayrılmasında Kullanılması*, Doktora Tezi Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 15.
130. Matthewes, P.D., Luo, R., and Wurtzel, E.T. (2003, August). Maize phytoene desaturase and zeta carotene desaturase catalyze a poly - Z desaturation pathway;implication of genetic engineering of carotenoid content among cereal crops. *Journal of Experimental Botany*, 2215-2230.
131. İnternet: A vitamini eksikliği URL:
<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.who.int%2Fnutrition%2Ftopics%2Fvad%2Fen%2F&date=2017-12-31> Son Erişim Tarihi: 31.12.2017.
132. Vickers, C. E., Bongers, M., Liu Q., Delatte, T., and Bouwmeester, H. (2014, August). Metabolic engineering of volatile isoprenoids in plants and microbes. *Plant, Cell and Environment*, 1753-1775.

133. Misawa, N., Kajiwarra, S., Kondo, K., Yokoyama, A., Satomi, Y., Saito, T., Miki, W., and Ohtani, T. (1995). Canthaxanthin biosynthesis by the conversion of methylene to keto groups in a hydrocarbon β -carotene by a single gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 209(3), 867-876.
134. Kajiwarra, S., Fraser, P. D., Kondo, K., and Misawa, N., (1997, June). Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 421-426.
135. Ruther, A., Misawa, N., Bo"ger, P., and Sandmann, G.(1997, August). Production of zeaxanthin in *Escherichia coli* transformed with different carotenogenic plasmids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 162-167.
136. Martin, V. J., Pitera, D. J., Withers, S. T., Newman, J. D., and Keasling, J. D. (2003, July). Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nature Biotechnology*, 796-802.
137. Yoon, S. H., Lee, Y. M., Kim, J. E., Lee, S. H., Lee, J. H., Kim, J. Y., Jung, K. H., Shin, Y. C., Keasling, J. D., and Kim, S. W. (2006). Enhanced lycopene production in *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(6), 1025-1032.
138. Yoon S., Park, H., Kim, J., Lee, S., Choi, M., Kim J. Y., Oh, D., Keasling, J.D., and Kim, S. (2007). Increased β -carotene production in recombinant *Escherichia coli* harboring an engineered isoprenoid precursor pathway with mevalonate addition. *Biotechnology Progress*, 23(3), 599-605.
139. Lu, Q., Bu, Y., and Liu, J. (2017, September). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for producing astaxanthin as the predominant carotenoid. *Marine Drugs*, 296.
140. Ray, B.L., and Raetz, C.R. (1987). The biosynthesis of gram-negative endotoxin. A novel kinase in *Escherichia coli* membranes that incorporates the 4'-phosphate of lipid A. *Journal of Biological Chemistry*, 262(3), 1122-1128.
141. Mantzouridou, F., and Tsimidou, M.Z. (2008). Lycopene formation in *Blakeslea trispora*. Chemical aspects of a bioprocess. *Trends in Food Science & Technology*, 19(7), 363-371.
142. Basson, M. E., Thorsness, M., Finer-Moore J., Stroud, R. M.,and Rine, J. (1988, September). Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductases, the rate-limiting enzyme of sterol biosynthesis. *Molecular Biology of the Cell*, 3797-3808.
143. Polakowski, T., Stahl, U., and Lang, C. (1998, January). Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66-71.
144. Tholl, D. (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3), 297-304.

145. Yamano, S., Ishii, T., Nakagawa, M., Ikenaga, H., and Misawa, N. (1994, June). Metabolic engineering for production of beta-carotene and lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1112-1114.
146. Wang, B., Shi, M., Wang, D., Xu, J., Liu, Y., Yang, H., Dai, Z., and Zhang, X. (2014). Production of β -carotene by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Article in Chinese Abstracts*.
147. Xie, W., Lv, X., Ye, L., Zhou, P., and Yu, H. (2015). Construction of lycopene-overproducing *Saccharomyces cerevisiae* by combining directed evolution and metabolic engineering. *Metabolic Engineering Abstracts*.
148. Chen, Y., Xiao, W., Wang, Y., Liu, H., Li, X., and Yuan, Y. (2016). Lycopene overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* through combining pathway engineering with host engineering. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 113.
149. Bu, X., Sun, L., Shang, F., and Yan, G. (2017, November). Comparative metabolomics profiling of engineered *Saccharomyces cerevisiae* lead to a strategy that improving β -carotene production by acetate supplementation. *Plos One*, 385.
150. Ukibe, K., Hashida, K., Yoshida, N., and Takagi, H. (2009, November). Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for astaxanthin production and oxidative stress tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 7205-7211.
151. Castelblanco-Matiz, L. M., Barbachano-Torres, A., Ponce-Noyola, T., Ramos-Valdivia, A. C., Cerda García-Rojas, C. M., Flores-Ortiz, C. M., Barahona-Crisóstomo, S.K., Baeza-Cancino, M. E., Alcaíno-Gorman, J., and Cifuentes-Guzmán, V. H. (2015). Carotenoid production and gene expression in an astaxanthin-overproducing *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant strain. *Archives of Microbiology*, 197(10), 1129-1139.



Ek-1. *S. cerevisiae*'de izoprenoidlerin ve karotenlerin sentezlendiği mevalonat yolağı [7]

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Aslan, Kübra
Uyruğu : T. C.
Doğum tarihi ve yeri : 18.10.1992, Akyurt
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0545 244 96 47
e-mail : kubraslan.1992@ gmail.com



Eğitim

Derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.B.D.	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2014
Lise	Fatih Sultan Mehmet Lisesi	2010

Yabancı Dil

İngilizce



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

