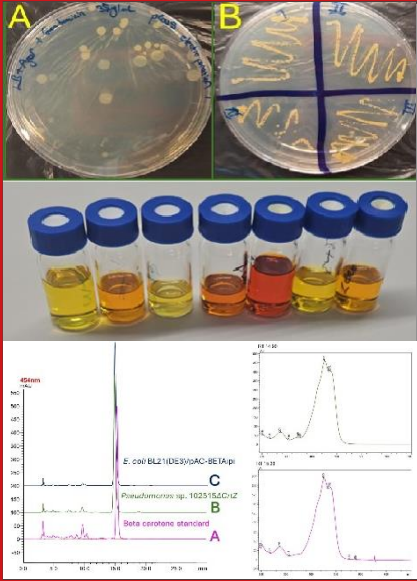


Nuriye
Arslansoy



arslansoynuriye@gmail.com

0009-0008-5514-8711



Thesis Advisor

Dr. Özkan Fidan

ozkan.fidan@agu.edu.tr

Approval date of the thesis

BIOSYNTHESIS OF HIGH VALUE-ADDED
CAROTENOIDS BY ENGINEERED

abstract Carotenoids are pigment molecules that play an important role in coloring plants, algae, and other organisms. These molecules exhibit various biological activities such as anticancer, antiviral and antioxidant activities. They have a huge market size and are mainly used in the food, feed, and cosmetic industries. The current supply chain for carotenoids is mostly relied on the extraction from plants and/or chemical synthesis for certain carotenoids. However, these strategies have various bottlenecks and disadvantages such as being affected by climate change, more difficult and costly extraction processes, and environmental issues. These can be overcome with microbial biosynthesis, which not only addresses the previous problems but also provides advantages of producing in a short time and scale-up for industrial production. In this research, we aimed to biosynthesize the high value-added carotenoids by engineered microorganisms. The genome of a native producer of zeaxanthin diglucoside, identified as endophytic *Pseudomonas* sp. 102515, was first edited by CRISPR-Cas9 to knock out zeaxanthin glucosyltransferase (CrtX), lycopene β -cyclase (CrtY) and beta-carotene hydroxylase (CrtZ). This led to $\Delta crtX$, $\Delta crtY$ and $\Delta crtZ$ mutant strains of *Pseudomonas* sp. 102515. On the other hand, overexpression plasmids carrying *crtW*, *CaZEP* and *CaZEP-CaCCS_{m40}* genes were constructed and transformed to $\Delta crtX$ mutant to synthesize astaxanthin, violaxanthin and capsanthin/capsorubin. HPLC analysis of extracts from mutant strains and overexpression strains revealed that all the engineered strains produced the corresponding carotenoids such as zeaxanthin, β -carotene, and lycopene. Thus, this study paved the way for the biosynthesis of valuable carotenoids in the engineered endophytic bacteria.

keywords Carotenoids, Biosynthesis, *Pseudomonas*, Genetic Engineering, CRISPR-Cas9

özet Karotenoidler, bitkiler, algler ve diğer organizmaları renklendirmede önemli rol oynayan pigment molekülleridir. Bu moleküller, antikanser, antiviral ve antioksidan aktiviteler gibi çeşitli biyolojik aktiviteler sergiler. Büyük bir market büyüklüğüne sahiptirler ve ağırlıklı olarak gıda, yem ve kozmetik endüstrilerinde kullanılırlar. Karotenoidlerin mevcut tedarik zinciri, çoğunlukla bitkilerden ekstraksiyon ve/veya belirli karotenoidler için kimyasal senteze dayanır. Ancak, bu stratejiler iklim değişikliğinden etkilenme, daha zor ve maliyetli ekstraksiyon süreçleri ve çevresel sorunlar gibi çeşitli kısıtlamalar ve dezavantajlara sahiptir. Mikrobiyal biyosentez bu sorunları aşmak ve aynı zamanda kısa sürede, endüstriyel ölçekte üretim için avantajlar sağlayan etkili bir yöntemdir. Bu çalışmada, genetik olarak tasarlanmış mikroorganizmalar kullanarak yüksek katma değerli karotenoidleri biyosentezle üretmeyi amaçladık. Doğal bir zeaxanthin diglukozit üreticisi olarak keşfedilmiş endofitik *Pseudomonas* sp. 102515'in genomu, CRISPR-Cas9 ile düzenlenerek zeaxanthin glukoziltransferaz (CrtX), likopen β -siklaz (CrtY) ve β -karoten hidroksilaz (CrtZ) genleri nakavt edildi. *Pseudomonas* sp. 102515'in $\Delta crtX$, $\Delta crtY$ ve $\Delta crtZ$ mutant suşları elde edildi. Diğer yandan, *crtW*, *CaZEP* ve *CaZEP-CaCCS_{m40}* genlerini taşıyan aşırı ekspresyon plazmidleri oluşturuldu ve $\Delta crtX$ mutantına astaxanthin, violaxanthin ve kapsanthin/kapsorubin sentezlemek üzere transforme edildi. Mutant suşlardan ve aşırı ekspresyon suşlarından elde edilen ekstraktların HPLC analizi, genetik olarak tasarlanmış suşların zeaxanthin, β -karoten ve likopen gibi ilgili karotenoidi ürettiğini ortaya koydu. Böylece, bu çalışma, genetik mühendislik ile endofitik bakterilerde değerli karotenoidlerin biyosentezi için bir yol açtı.

anahtar kelimeler Karotenoidler, Biyosentez, *Pseudomonas*, Genetik Mühendisliği, CRISPR-Cas9