

BİTKİ DOKU KÜLTÜRLERİNDE SEKONDER METABOLİT SENTEZİ

Alper Güven*, Işıl Gürsul

Tunceli Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tunceli

Geliş tarihi / Received: 27.08.2013

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 26.03.2014

Kabul tarihi / Accepted: 01.04.2014

Özet

Bitki doku kültürlerinden elde edilen ikincil metabolitler, insan sağlığı açısından önemlidirler. Bu nedenle, son on yılda ikincil metabolitlerin sentezlenmesi ve fermentörlerde üretimi üzerindeki çalışmalar hız kazanmıştır. İkincil metabolitler biyoaktif özellikleri olan bileşenlerdir. Özellikle tıp ve eczacılık alanlarında kullanılırlar. Gıda endüstrisinde ise katkı maddesi, fonksiyonel gıda bileşeni veya besin takviyesi açısından önemlidirler. İkincil metabolitlerin bitkiler tarafından üretilmesi meteorolojik koşullara, coğrafi konuma ve yetiştirme koşullarına bağlıdır ve pek çok bitki ancak belirli mevsimlerde yetişip olgunlaşabilir. Bitki yerine bitki hücrelerinin uygun koşullarda biyoreaktörlerde üretilmesi bitkisel unsurların doğanın sunduğu parametrelerden bağımsız üretimini sağlar. Dolayısıyla, ikincil metabolitlerin tam bitkiden bağımsız üretimi piyasaya arzda süreklilik sağlar, üretim verimini artırır ve ikincil metabolitler belirli spesifikasyonlara sahip endüstriyel ürünler niteliğine kavuşur. Bitkilerin totipotensi özelliği, bir bitki hücresinden organizmanın üretilmesine olanak sağlar. Bitki doku kültürleri hayvan dokularıyla karşılaştırıldığında totipotensi özelliğinden dolayı hedef alınan metabolitler daha çok ve daha hızlı üretilirler. Ancak, bitki doku kültürlerinin ikincil metabolit sentezlediği mekanizmalar tamamen bilinmemektedir. İkincil metabolit üretimi ile ilgili bilimsel çalışmaların çoğu laboratuvar ölçeği ile sınırlı kalmıştır. Biyoreaktörlerde bitki doku kültürlerinden ikincil metabolit üretimi tarıma dayalı endüstrinin katma değer açısından çok önemli bir unsuru olmaya adaydır. Burada, bu konuda bilimsel çalışma yapmayı hedefleyenler için bitki doku kültürlerinin gelişim ve ikincil metabolizmalarını etkileyen unsurlarla bitki doku hücrelerinde ikincil metabolizmayı etkileyen stres mekanizmaları ve stres sonucu bitki doku kültürünün uğradığı değişimler özetlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Bitki doku kültürü, sekonder metabolit, stres.

SECONDARY METABOLITE SYNTHESIS IN PLANT TISSUE CULTURES

Abstract

Synthesis and manufacture of secondary metabolites have gained popularity due to their importance to human health. Secondary metabolites are known to have bioactive properties, and they are widely used in medical treatments, and thus are important in the pharmaceutical industry. Secondary metabolites are also used as food ingredients, functional food components and food additives. Plant tissue cultures allow manufacture of continuous, standardized production of secondary metabolites independent of seasonal variations, geographic position, atmospheric and soil growth conditions. Secondary metabolite production from plant tissues is faster and with higher yields compared to the animal tissues due to totipotency of plants which allows the plant cell to produce the organism itself. However, secondary metabolite syntheses mechanisms in plant tissue cultures are not well-understood, and in most cases, research on plant tissue cultures is limited to laboratory-scale in vitro studies. The present work is a review of the growth conditions, secondary metabolite biosynthesis, the stress mechanisms that induce secondary metabolite biosynthesis in plant tissue cultures, and the changes that occur in these cultures upon application of stress.

Keywords: Plant tissue culture, secondary metabolite, stress.

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ agueven@gmx.de,

☎ (+90) 428 2131752 / 1216,

☎ (+90) 428 226 1225

GİRİŞ

Bitki doku kültürleri, steril koşullar altında, yapay bir besi ortamında, tam bitkiden veya bitkinin çeşitli kısımlarından elde edilen kültürlerdir. Bitkisel ürünlerin biyoreaktör ortamında üretimi için tam bitki kullanılabileceği gibi bitkinin hücreleri (meristematik veya kallus hücreleri), dokuları (çeşitli bitki kısımları) veya organları (apikal meristem, kök vb.) kullanılabilir (1). Bitkilerin söz konusu bitkiye ait herhangi bir parçadan eşeysiz çoğalabilme özelliklerine "totipotensi" denir. Bitki doku kültürleri bitkilerin totipotensi özelliği sayesinde üretilebilir. Totipotensi özelliği, gelişimleri sırasında bitkileri hayvanlardan ayıran en önemli özelliktir (2, 3). Bu özellik sayesinde tek hücreden organizma üretilebilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri hayvansal dokulardan daha çok ve daha hızlı üretilebilirler (1).

Bitki doku kültür teknolojisinin amacı yüksek miktarda, homojen, farklılaşmamış hücrelerin üretimine olanak sağlamaktır. Bitki doku kültürleri 30000'den fazla kimyasal bağ içeren çok değerli fitokimyasalları sentezleme potansiyeline sahiptir. Bitki doku kültürleri tarafından sentezlenen fitokimyasal miktarı mikroorganizmalar tarafından sentezlenen fitokimyasal miktarının yaklaşık 4 katıdır (4). Fitokimyasallar doğal olarak tarımsal yöntemlerle de elde edilebilirler. Ancak, tarımsal üretim, pek çok bitki için mevsimsel olduğu gibi, coğrafi konuma, iklim ve büyüme koşullarına da bağlıdır (5).

Bitki Kallus ve Süspansiyon Hücre Kültürleri

Hücre süspansiyon kültürleri çalkalamalı düzeneklerde sıvı halindeki besiyeri içinde geliştirilir. Gelişen hücre süspansiyonu büyüyen bireysel ve kümeleşmiş hücrelerden oluşur. Kültüre edilmiş bitki hücreleri iki biçimde saklanabilir: İlki aseptik koşullarda agar gibi uygun katı besiyerlerinde kallus şeklinde, ikincisi ise aseptik koşullarda sıvı besiyerlerinde süspansiyon kültürü adı verilen küçük hücre kümeleri şeklindedir. Kallus, düzensiz bitki hücrelerinin kümeleşerek, kısmen farklılaşmış, hızlı üreyebilen halidir (6). Tam bitki dokuları kallus indüksiyonundan sorumludur. Başarılı kallus oluşumu genotipe ve dışarıdan elde edilen büyüme düzenleyicilerinin etkisine bağlıdır. Büyüme düzenleyici tipi ve besiyerindeki derişimi ağırlıklı olarak eksplantın türüne ve potansiyel endojen hormon içeriğine bağlıdır (7). Bitkilerde kallus hücreleri, bitki

yaralandığında veya *Agrobacterium tumefaciens* gibi bazı fitopatojenik organizmaların neden olduğu bir tümör sonrası iyileştirici mekanizma olarak açığa çıkar (3, 6). Kallus, benzer karakterler gösteren parankima hücrelerinden oluşmakla birlikte bileşim açısından heterojen bir dokudur. Kallus kültürü farklılaşmış ve farklılaşmamış iki sınıf dokudan oluşur (7). Kallus dokusunun en önemli özelliklerinden biri "ufalanabilirlik"tir. Ufalanabilirlik hücre süspansiyon kültürleri için istenen bir özelliktir (7). Süspansiyon kültürleri fidelerden, embriyolardan veya yapraklardan mekanik yöntemlerle elde edilir (6).

Bitki Hücre Kültürlerinde Gelişme ve Sekonder Metabolitlerin Sentezi

Bitki hücrelerinde büyüme, hücre sayısında artış ve hücre hacminde artış olarak iki ana aşamada gerçekleşir. Bitki hücre kültürlerinde büyüme-süre grafiği, mikroorganizmalarda olduğu gibi sigmoidal bir eğridir. Kültür büyümesi esas alındığında hücre gelişiminin sigmoidal davranışı beş tane karakteristik büyüme fazından oluşur:

- 1- Lag Faz: Bitki hücrelerinin bölünmeye başlamadan önceki hazırlık aşaması
- 2- Log veya üstel Faz: Hızlı hücre bölünmesinden ötürü hücre sayısında üstel artış
- 3- Lineer Faz: Kültürlerin yaş ve kuru ağırlıklarının arttığı hücre nüfusunda doğrusal artış
- 4- Yavaşlama Fazı: Besin unsurlarının azalması ve hücre kalıntı birikiminden dolayı hücre bölünme hızında aşamalı yavaşlama
- 5- Duraklama Fazı: Hücre bölünmesinin durması (6, 8).

Log fazında alt kültürü yapılan hücrelerde lag fazı gözlenmez. Bununla birlikte ekim miktarı da bitki hücre süspansiyon kültürlerinin büyümesinde etkili bir faktördür. Az sayıda hücre ile ekim yapılırsa alt kültür ortamında lag fazı uzar ve logaritmik fazın eğimi azalır. Buna karşılık, yüksek hücre yoğunluğuna sahip alt kültürlerde duraklama fazına geçmeden önce sınırlı sayıda hücre bölünmesi gerçekleşir. İdeal ekim hacmi hücre kültürü elde edilen türe ve kültür koşullarına göre farklılıklar gösterir.

Hücre kültürlerinde ikincil metabolit birikimi ile büyüme arasındaki ilişki, "antosiyanın tip" ve "betasiyanin tip" olmak üzere iki ana model aracılığıyla değerlendirilir. Pek çok hücre kültüründe antosiyanın tip ilişki geçerlidir.

Antosiyanin tip ilişkide ikincil metabolit (diosgenin, fenolik bileşikler, berberin, vb.) birikimi ile büyüme arasında zıt ilişki vardır. Birikim doğrusal artış fazının sonlarına doğru artar ve durgun fazda maksimum düzeye ulaşır (8). "Betasiyanin tip" birikimde metabolit düzeyi hücre bölünmesi ile doğru orantılıdır. Bu tip birikimde metabolit seviyesindeki artış hücre bölünmesinin en yoğun olduğu log safhasında maksimuma ulaşır, sonraki safhalarda ise azalır (8).

İkincil metabolitler, bitkilerde çok önemli fonksiyonları olan karmaşık kimyasal bileşenlerdir. İkincil metabolitler, bitki yaşamı için elzem olmamakla birlikte bitki herhangi bir stres faktörü (UV ışın, herbisit, vb.) saldırısı ile karşı karşıya kaldığında savunma mekanizması olarak sentezlenmeye başlarlar. Ayrıca, ikincil metabolitler bitkiyi büyüme koşullarındaki varyasyonlardan koruyarak bitki gelişimine yardım eden metabolik aktiviteleri etkilerler (5).

Bitki doku kültürlerinin metabolizmaları tam bitkinin metabolizmasından daha yüksektir. Hücre gelişiminin kültürde başlatılması hücre kütleindeki bölünmeyi hızlandırır. Bu nedenle

ikincil metabolit üretimi yaklaşık 2-4 hafta içinde gerçekleşir. Ayrıca, hücre kültürleri çevresel faktörlerden bağımsız geliştikleri için üretim koşulları denetim altına alınabilir. Denetimle optimum büyüme koşullarının sağlanması hücre bölünmesini hızlandırır. Biyoreaktör ortamında morfolojik varyasyonlar görsel seleksiyonla ayırt edilebilir. Bunun yanı sıra bazı bitki enzimleri kültür ortamında etkin biçimde salgılanabilir. Bitki doku kültürlerinde kullanılan besiyeri bileşimleri standart mikrobiyel veya maya-küf besiyeri ortamlarına göre daha sadedir.

- Spesifik biyoaktif bileşenlerin ticari üretimi için in vitro geliştirilen kültürler kullanılabilir. Geniş hücre büyüklüğüne bağlı olarak ve sıklıkla bir araya toplanarak geliştikleri için hücre kültürleri, havalandırmadaki kayma gerilimine ve taşınım süreçlerine duyarlıdır (9). Bitki doku kültürlerinin büyüme hızı mikroorganizmalardan düşük, metabolitlerin kültür ortamından kazanımı ise tam bitkiye göre daha azdır. Yüksek üretim eğrilerinin sağlanması için hücre gruplarının homojen olması önemlidir. Bu tür hücre gruplarında farklılaşmış hücrelerin varlığı kültürün üretim potansiyelini önemli oranda etkiler.

Çizelge 1. Bitki doku kültürlerinden sentezlenen bazı değerli sekonder metabolitler ve sağlık üzerine etkileri

Bitki Doku Kültürü	Sekonder Metabolit	Özellik	Referans
<i>Coleus blumei</i>	Rosmarinik asit, kafeik asit	Antioksidan, hepatoprotektif aktivite, antimitojen, antidepresif,	10
<i>Cichorium intybus</i>	Neolignan glukosid kafeik asit	Antioksidan, aneljezik, sedatif, anti-inflamatuvar	11
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Desulfo-Gl, dolikol, poliprenol, β -sitosterol, stigmasterol, kampesterol	Antikanserojen, anti-patojen, ROS'a karşı koruyucu etki, kemoterapötik	12
<i>Podophyllum hexandrum</i>	Gümüş nanopartikülleri (AgNPs)	Antimikrobiyel, antitümör etki	13
<i>Panax ginseng</i>	Gingsenosid	Antioksidan, anti-diyabetik ajan, anti-kanser	14
<i>Ceropegia bulbosa Roxb.</i>	Cerpegin	Hepatoprotektif, antipiretik, anti-ulser, analjezik, sakinleştirici,	15
<i>Glycyrrhiza</i>	Triterpenler	Anti-oksidatif, anti-inflamatuvar, anti-kanserojen, antiviral	16
<i>Saussurea involucreta</i>	Sirinjin, klorojenik asit	Anti-inflamatuvar, antinosiseptif, hipoglisemik etki, antidepresan	17
<i>Lavandula officinalis</i>	Rosmarinik asit, kafeik asit, artemisinin	Terapötik, antimikrobiyel, antioksidan, antikolinesteraz	18
<i>Vitis vinifera</i>	İzoflavonoidler, Resveratrol, genistein, daidzein, genistin,	Antioksidan, anti-karsinojen, antimikrobiyel, anti-inflamatuvar, anti-trombotik	19
<i>Phyllanthus amarus</i> <i>Helianthus tuberosus</i>	Filantin, hipofilantus İnülin	Hepatoprotektif Antimikrobiyel, antifungal, diüretik, spermatojenik, stomik	20
<i>Cistus creticus subsp. creticus L.</i>	Etanol	Sitotoksik	21
<i>Spilanthes acmella Murr.</i> <i>Bupleurum falcatum L.</i>	Alkilamid, spilantol Saikosaponin	Antiseptik Antialerjik, aneljezik, anti-inflamatuvar, immüno-regülatör	22 23

• Bitki Doku Kültürlerinde Birincil ve İkincil Metabolizma

Birincil metabolizma, hücrenin canlılığını sürdürebilmesi için gereken tüm metabolik yolları içerir. ADP, ATP ve diğer nükleotid trifosfatlar ile enerji transferi; proton ve elektron alıcıları; glikoliz ve sitrik asit döngüleri; solunum zinciri; karbonhidrat döngüsü; enzim tepkimeleri; lipit, nükleotid ve porfirin biyosentezi birincil metabolizmanın ana unsurlarıdır. Birincil metabolizmadaki tüm temel metabolik süreçler, hücre bileşenlerinin enerji üretimi ve büyüme sırasındaki dönüşümleriyle ilgilidir. Birincil metabolizmanın temel prensipleri, kimyasal tepkimeleri ve ürünleri tüm canlılarda büyük ölçüde benzerdir.

İkincil metabolizmada ise bitki savunmasından sorumlu bileşenler üretilir. Bu ürünler farklılaşmış özel hücrelerde oluşur. İkincil metabolitler alkaloidler, izoprenoidler/ terpenler, kauçuk benzeri polimerler/ poliizoprenler, fenolik bileşikler, ender aminoasitler, bitki aminleri ve glikosidler olarak sınıflandırılabilir (9). Flavonoller gibi bazı ikincil metabolitler antibiyotik özelliklere sahiptir. Stres sonucu bitki doku kültürlerinde sentezlenen bazı önemli ikincil metabolitler ve hangi bitki doku kültüründe sentezlendikleri Çizelge 1'de görülmektedir.

Biyoteknolojik çalışmalar sonucunda hücre doku kültürlerini kullanarak ikincil metabolitlerin üretilmesi ve gıda sanayinde kullanılması yönünde çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır (24). Çizelge 2'de bitki-bitki doku kültürlerinden elde edilen çeşitli bileşenler ve bunların gıda katkı maddesi olarak kullanıldığı alanlar görülmektedir.

İkincil metabolitler bitki savunma mekanizması ile ilgili olduğu için sentezlenmeleri soğuk ve kuraklık, UV, vurgulu elektrik alan gibi abiyotik stres faktörleri ve mikrobiyel enfeksiyon gibi biyotik stres faktörleri ile tetiklenebilir.

Bitki Doku Kültürlerinde Stres Faktörleri

Bitki metabolizması değişkendir ve çevresel faktörlere bağlı olarak tepki verir. Bir faktörün bitkinin optimumundan her sapması stresle sonuçlanmaz. Fakat dokuların yaralanması, hastalık veya anormal fizyolojiye neden olan beklenmedik aşırı değişimler bitkinin kendi optimum durumunu kaybetmesine neden olur (9). Işık, sıcaklık ve ozmotik basınçta aşırı değişimler,

Çizelge 2. Bitki-Bitki doku kültürlerinden elde edilen çeşitli bileşenler ve bunların gıda katkı maddesi olarak kullanım potansiyelleri

Ürün Tipi	Bitki Türü	Ref.
Renklendiriciler		
Antosiyantinler	<i>V. vinifera</i>	25
Betalainler	<i>D. carota</i>	26
Krokin	<i>Pe. frutescens</i>	27
Karotenoidler	<i>Cheno. rubrum</i>	28
Antrakononlar	<i>Gard. jasminoides</i>	29
	<i>Lycop. esculentum</i>	30
	<i>Cinchon. ledgeriana</i>	31
Naphthoquinonlar	<i>M. citrifolia</i>	32
	<i>L. erythrorhizon</i>	33
Esansiyel Yağlar		
Nane yağı	<i>Mentha piperata</i>	45
Biberiye yağı	<i>Rosm. officinalis</i>	46
Yasemin yağı	<i>Jasm. officinale</i>	47
Anason yağı	<i>Pim. anisum</i>	48
Keskin Gıda Katkı Mad.		
Kapsaisin	<i>Ca. frutescens</i>	40
	<i>Ca. annuum</i>	41
Tatlandırıcılar		
Steviosid	<i>Ste. rebaudiana</i>	42
Gliserin	<i>Glyc. glabra</i>	43
Thaumatokocin	<i>Thau. danielli</i>	44
Lezzet Vericiler		
Vanilin	<i>Va. planifolia</i>	34
Sarımsak	<i>All. sativum</i>	35
Soğan	<i>All. cepa</i>	36
Hint pirinci	<i>Oryza sativa</i>	37
Turunçgil	<i>Citrus spp</i>	38
Kakao	<i>Theo. cacao</i>	39

patojen enfeksiyonu, herbivör saldırıları ve besin yetersizliği de bitkide stres yaratan faktörlerdir.

Biyolojik Stres Kavramı

Stres, abiyotik veya biyotik orijinli herhangi bir içsel veya dışsal faktörün yol açtığı normal yaşamdan sapmalara neden olan farklılıktır. Stres yoğunluğuna göre östres olarak bilinen pozitif veya distres olarak bilinen negatif etkilere neden olan güçlü veya düşük stres olarak ayrılabilir (9).

Bitkiler, strese uğramadan önce, büyüme ve gelişimleri ışık ve mineral destekli koşullara göre ayarlanmış standart koşullarda optimum fizyolojide olurlar (49). Stres faktörleri ve karmaşık stres uygulamaları üç ayrı tepki fazına ve zarar çok şiddetli değilse stres faktörleri ortadan kalktığında yenilenme fazına yol açarlar. Ardışık dört fazda gerçekleşen olaylar ise aşağıda özetlenmiştir:

- Başlangıç Fazı (Stresin başlaması): Alarm tepkimeleri; fonksiyonel normdan ayrılma, canlılığın azalması, katabolizmadan anabolizmaya geçiş.
- Onarım Fazı (Stresin sürdürülmesi): Direnç

aşaması; adaptasyon ve onarım süreçleri, sertleşme (reaktivasyon).

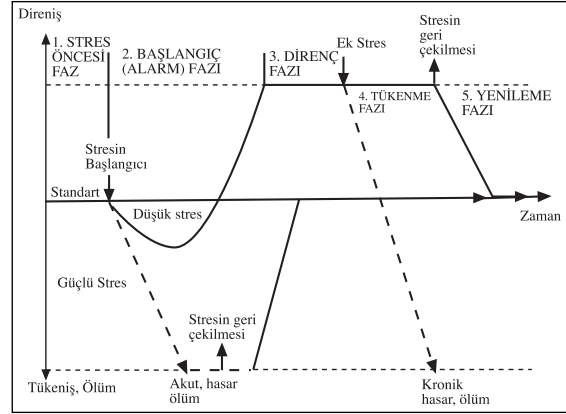
- Bitiş Fazı (Uzun dönemli stres): Tükenme aşaması; yüksek stres yoğunluğu, adaptasyon kapasitesinin aşırı yüklenmesi, kronik hastalık veya ölüm.

- Yenilenme Fazı: Fizyolojik fonksiyonların kısmen veya tamamen yenilenmesi (stres faktörleri ortadan kalktığında hasar çok yüksek değilse).

Bitkiler, başlangıç fazında güçlü veya düşük strese göre farklı tepkiler verirler (Şekil 1). Stres toleransı çok düşük olan bitkilere güçlü stres uygulandığında hızla akut hasar oluşur. Fakat yoğun biçimde verilen ani stres hemen ortadan kaldırıldığında, hücreler, onarım mekanizmalarını kullanarak normal seviyelerine dönerler. Düşük yoğunlukta stres uygulamasıyla karşılaşan hücreler yalnızca alarm fazı boyunca stresten etkilenirler. Bitkiler, stresin başlangıcında fotosentez, metabolitlerin taşınması ve birikimi, iyonların yer değiştirmesi ve/veya alım performansı gibi birincil metabolizma fonksiyonlarında düşüş yaşarlar. Metabolik aktivitelerindeki düşüşe bağlı olarak fizyolojik standartlarından saparlar ve canlılıkları azalır. Fakat alarm fazının bitiminde çoğu bitki strese başa çıkma mekanizmalarını etkinleştirerek onarım süreçlerini devreye sokarak uzun dönem metabolik ve morfolojik adaptasyon sağlarlar. Bitki onarım süreçleri ve adaptasyon ile fizyolojik fonksiyonlarını tamir etmeye çalıştığı bu evrede maksimum direnç gösterir. Değişen çevresel koşullar altında optimum fizyolojiye sahiptir. Bitki düşük dozda uzun süreli strese karşılaştığında tükenme fazına sürüklenir ve canlılığı kısmen kaybolur. Geri dönüşümsüz hasarlar ve hücre ölümü gerçekleşebilir. Bitki hücrelerine uygulanan stres faktörleri hücrede baskın hale gelmeden önce ortadan kaldırılırsa bitki hücreleri yenilenirler ve yeni fizyolojik standartlara adapte olabilirler. Bitkinin yeni fizyolojik standartlarda ne kadar süre ile kalacağı ise dış ve iç faktörlere bağlıdır. Hücreler bu yeni fizyolojik standartlarda strese karşı direnç kazanmıştır ve hücre savunması aktiftir. Bu duruma ulaşan bitki hücresi aşağıdaki yollardan birini izler:

- Hücreler ek stres altında kalırlarsa kronik hasar oluşur ve tükenme fazına yol açan fonksiyonlar hızlanır (Şekil 1).

- Direnç fazından sonra orijinal düşük stres ortadan kalkar, sertleşme tersine döner, pozitif stres etkilerinin ortadan kalktığı için hücreler normal yaşam koşullarına döner (Şekil 1).



Şekil 1. Bitkilerde biyolojik stres konsepti (9, 49, 50)

Özetle, bitkinin tolerans limitlerini aşmayan kısa süreli stres fizyolojik süreçlerde geçici değişimlere neden olur. Uzun süreli strese karşılaşılan bitkide ise kalıcı hasarlar oluşur (5).

Biyotik ve Abiyotik Stres Faktörleri ve Oksidatif Stres

Bitkiler çevresel strese karşılaştıklarında serbest radikallerin ve diğer oksidatif moleküllerin miktarında artış gözlenir (9).

Abiyotik faktörler; hava kirliliği, paraquat diklorid gibi oksitleyici oluşturan herbisitler, ağır metaller, yaralanma, UV ışınları gibi radikallerin ve diğer oksidatif moleküller türlerin oluşumunu tetikler. Biyotik faktörler ise viral, bakteriyel veya fungal patojenlerdir (13). En çok bilinen serbest radikaller; süperoksit (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri ve nitrik oksit (NO) gibi reaktif azot türleridir. Reaktif oksijen türleri (ROS) mutlak redoks tepkimeleri, tamamlanmamış oksijen indirgenmesi ve mitokondriyal veya kloroplast elektron transfer zincirleri tarafından suyun yükseltgenmesi ile oluşur (9). Stoplazmik ve plazma membran komponentlerinden oluşan süperoksit NADPH oksidaz kompleksi ve peroksidaz tarafından sentezlenen Hidrojen peroksitte (H_2O_2) Reaktif oksijen türleri (ROS) nin oluşumuna neden olur.

Hücrelerin bu zararlı moleküller yapılarına karşı hayatta kalma becerisi, detoksifikasyon mekanizmalarını çalıştırabilmelerine bağlıdır. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve Reaktif azot türleri (RNS) bu mekanizmalar tarafından etkinleştirilirler. Sonuçta fenolik ikincil metabolizmaya ilişkili enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların üretimi sağlanır (9).

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bitki doku kültürleri 30000'den fazla biyoaktif kimyasalın üretimine olanak verecek tarıma dayalı endüstri açısından katma değeri çok yüksek ürünlerin eldesine yönelik bir ileri teknoloji uygulamasıdır. Biyoaktif kimyasalların metabolik ürünler olması nedeniyle in vitro laboratuvar ortamında ya da yapay koşullarda üretimleriyle ilgili yanıtlanması gereken pek çok soru vardır. Bitki doku kültürlerinden biyoaktif kimyasalların endüstriyel ölçekli fermentörlerde üretiminde karşılaşılan en önemli sorunlardan biri hücrelerin mekanik dayanıklılığıdır. Genetik uyarlamalarla mekanik dayanıklılığı artırılmış hücre kültürlerinin elde edilmesi üretim maliyetlerinin düşmesini sağlayacak unsurlardan biridir. Bu alanda üretime yönelik gelişme sağlayacak alanlardan biri oksijen transferi ile mekanik karıştırma ve havalandırmaya mikroorganizma kültürlerinden daha hassas olan bitki doku kültürlerinin hassasiyetlerini göz önüne alacak fermentör tasarımı çalışmalarıdır. Laboratuvar ölçeğinde elde edilen sonuçları endüstriyel ölçeğe taşıyacak yöntemlerin geliştirilmesi önemli bir bilimsel çalışma alanı olarak ortaya çıkmaktadır. Çoğunluğu hücre içinde üretilen biyoaktif kimyasalların kültürün üretim potansiyelini etkilemeden salgılanmasını sağlayacak yöntemlerin ve genetik olarak buna uygun kültürlerin geliştirilmesi endüstriyel üretime önemli katkı sağlayacaktır. Son olarak, yurdumuzda bitki doku kültürlerinden biyoaktif kimyasalların üretilmesiyle ilgili endüstriyel uygulamalara yönelik yapılacak bilimsel araştırmalar, tarıma yönelik endüstrinin gelişmesini sağlayacak ve bu alanda elde edilecek sonuçlar teknoloji transferi olanağı da beraberinde getirecektir.

KAYNAKLAR

1. Gözükırmızı N. 2010. Bitki Biyoteknolojisi. *Gıda Biyoteknolojisi*. Aran N (Baş editör), Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, Türkiye, s. 393-414.
2. Aran N (ed). 2010. *Gıda Biyoteknolojisi*. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, Türkiye, 485 p.
3. Taiz LE. 2006. *Plant Physiology*. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin Heidelberg.
4. Zhong JJ. 2001. Biochemical Engineering of the Production of Plant-Specific Secondary Metabolites by Cell Suspension Cultures. In: Plant Cells. (Chief ed), Vol. 72, Springer -Berlin / Heidelberg, pp. 1-26.
5. Gueven A, Knorr D. 2011. Isoflavonoid production by soy plant callus suspension culture. *J Food Eng*, 103: 237-243.
6. Nunez-Palenius HG, Cantliffe DJ, Klee HH, Ochoa-Alejo N, Ram rez-Malagón R, and E. Pérez-Molphe. 2005. Methods in Plant Tissue Culture. In: *Food Biotechnol*, Shetty K (Chief ed), CRC Press, pp. 553-601.
7. Chwala H.S. 2002. *Introduction to plant biotechnology*. Second Edition. Enfield, NH : Science Publishers, UK, 538 pp.
8. Sökmen A. 2001. Sekonder Metabolit Üretimi. *Bitki Biyoteknolojisi*. Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S (Editörler), Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, Türkiye, s. 221-224.
9. Hermann M. 2010. Influence of pulsed electric fields on polyphenol production, peroxidase and polyphenol oxidase activity of grape cell culture (*Vitis vinifera*). Technical University of Berlin, Diplomarbeit, Berlin, Germany, 73p.
10. Vukovic R, Bauer N, Curkovic-Perica M. 2013. Genetic elicitation by inducible expression of cryptogein stimulates secretion of phenolics from *Coleus blumei* hairy roots. *Plant Sci*, 199-200; 18-28.
11. Malarz J, Stojakowska A, Szneler E, Kisiel W. 2013. A new neolignan glucoside from hairy roots of *Cichorium intybus*. *Phytochemistry Lett* 6: 59-61.
12. Luczak S, Forlani F, Papenbrock J. 2013. Desulfo-glucosinolate sulfotransferases isolated from several *Arabidopsis thaliana* ecotypes differ in their sequence and enzyme kinetics. *Plant Physiol and Biochem* 63: 15-23.
13. Imbert, F., 1998. Discovery of podophyllotoxins. *Biochimie* 80, 207-222.
14. Wang j, Man S, Gao W, Zhang L, Huang L. 2013. Cluster analysis of ginseng tissue cultures, dynamic change of growth, total saponins, specific oxygen uptake rate in bioreactor and immunoregulative effect of ginseng adventitious root. *Industrial Crops Prod*, 41: 57-63.

15. Phulwaria M, Shekhawat NS, Rathore JS, Singh RP. 2013. An efficient in vitro regeneration and ex vitro rooting of *Ceropegia bulbosa* Roxb-A threatened and pharmaceutical important plant of Indian Thar Desert. *Industrial Crops Prod*, 42: 25-29.
16. Man S, Wang J, Gao W, Guo S, Li Y, Zhang L, Xiao P. 2013. Chemical analysis and anti-inflammatory comparison of the cell culture of *Glycyrrhiza* with its field cultivated variety. *Food Chem*, 136: 513-517.
17. Chen R, Liu X, Zou J, Yang L, Dai J. 2013. Qualitative and quantitative analysis of phenylpropanoids in cell culture, regenerated plantlets and herbs of *Saussurea involucrata*. *J Pharm Biomed Anal*, 74: 39-46.
18. Gonçalves S, Romano A. 2012. In vitro culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. *Biotechnol Adv* (Article in Press).
19. Yue X, Zhang W, Deng M. 2011. Hyperproduction of ¹³C-labeled trans-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cell culture by elicitation and in situ adsorption. *Biochem Eng J* 53: 292-296.
20. Taha HS, Abd El-Kawy AM, Abd El-Kareem Fathalla M. 2012. A new approach for achievement of inulin accumulation in suspension cultures of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) using biotic elicitor. *J Genet Eng Biotechn*, 10: 33-38.
21. Skoric M, Todorovic S, Gligorijevic N, Jankovic R, Zivkovic S, Ristic M, Radulovic S. 2012. Cytotoxic activity of ethanol extracts of in vitro grown *Cistus creticus subsp. creticus* L. on human cancer cell lines. *Industrial Crops Prod* 38: 153-159.
22. Singh M, Chaturvedi R. 2012. Screening and quantification of an antiseptic alkylamide, spilanthol from in vitro cell and tissue cultures of *Spilanthus acmella* Murr. *Industrial Crops Prod* 36: 321-328.
23. Kusakari K, Yokoyama M, Inomata S, Gozu Y, Katagiri C, Sugimoto Y. 2012. Large-scale production of saikosaponins through root culturing of *Bupleurum falcatum* L. using modified airlift reactors. *J Biosci Bioeng* 113: 99-105.
24. Rao RS ve Ravishankar GA. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 20: 101-153.
25. Arnous A, Meyer SA. 2008. Comparison of methods for compositional characterization of grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins. *Food Bioprocess Process* 86: 79-86.
26. Obon JM, Diaz-Garcia MC, Castellar MR. 2011. Red fruit juice quality and authenticity control by HPLC. *J Food Compos Anal* 24: 760-771.
27. Zhong J-J, Yu J-T, Yoshida T. 1995. Recent advances in plant cell cultures in bioreactors. *World J Microbiol Biotechnol* 11: 461-467.
28. Chaidee A, Wongchai C, Pfeiffer W. 2008. Extracellular alkaline phosphatase is a sensitive marker for cellular stimulation and exocytosis in heterotroph cell cultures of *Chenopodium rubrum*. *J Plant Physiol*, 165: 1655-1666.
29. Yang L, Peng K, Zhao S, Chen L, Qiu F. 2013. Monoterpenoids from the fruit of *Gardenia jasminoides* Ellis (Rubiaceae). *Biochem Syst Ecol* 50: 435-437.
30. Taveira M, Ferreres F, Gil-Izquierdo A, Oliveira L, Valentão P, Andrade PB. 2012. Fast determination of bioactive compounds from *Lycopersicon esculentum* Mill. leaves. *Food Chem* 135: 748-755.
31. Cheng GG, Zhang Y, Cai XH, Bao MF, Gua J, Li Y, Liu N, Liu YP, Luo XD. 2013. Cincholenines A and B, two unprecedented quinoline alkaloids from *Cinchona ledgeriana*. *Tetrahedron Letters* 54: 4547-4550.
32. Krishnaiah D, Bono A, Sarbatly R, Anisuzzaman SM. 2013. Antioxidant activity and total phenolic content of an isolated *Morinda citrifolia* L. methanolic extract from Poly ethersulphone (PES) membrane separator. *Journal of King Saud University - Engineering Sciences* (Article in Press).
33. Han J, Weng X, Bi K. 2008. Antioxidants from a Chinese medicinal herb - *Lithospermum erythrorhizon*. *Food Chem*, 106: 2-10.
34. Domingues de Oliveiraa SO, Saydb RM, Balzonc TA, Scherwinski-Pereira JE. 2013. A new procedure for in vitro propagation of vanilla (*Vanilla planifolia*) using a double-phase culture system. *Scientia Horti*, 161: 204-206.
35. Santhosha SG, Jamuna P, Prabhavathi SN. 2013. Bioactive components of garlic and their physiological role in health maintenance: A review. *Food Biosci*, 3: 59-74.

36. Russo M, di Sanzo R, Cefaly V, Carabetta S, Serra D, Fuda S. 2013. Non-destructive flavour evaluation of red onion (*Allium cepa* L.) Ecotypes: An electronic-nose-based approach. *Food Chem* 141: 896-899.
37. Si-bin G, Yu W, Xiao-qiong L, Kai-qiang L, Feng-kuan H, Cai-hong C, Guo-qing G. 2013. Development and Identification of Introgression Lines from Cross of *Oryza sativa* and *Oryza minuta*. *Rice Sci*, 20: 95-102.
38. Ballester AR, Lafuente MT, de Vos RCH, Bovy AG, Gonzalez-Candelas L. 2013. Citrus phenylpropanoids and defence against pathogens. Part I: Metabolic profiling in elicited fruits. *Food Chem*, 136: 178-185.
39. Arlorio M, Locatelli M, Travaglia F, Coisson JD, Del Grosso E, Minassi A, Appendino G, Martelli A. 2008. Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Food Chem* 106: 967-975.
40. Romano D, Gondolfi R, Guglielmetti S and Molinari F. 2011. Enzymatic hydrolysis of capsaicins for the production of vanillylamine using ECB deacylase from *Actinoplanes utahensis*. *Food Chem* 124: 1096–1098.
41. Johnson TS, Ravishankar GA, Venkataraman LV. 1990. In vivo capsaicin production by immobilized cells and placental tissues of *Capsicum annuum* L. grown in liquid medium. *Plant Sci*; 70:223 -229.
42. Dey A, Kundu S, Bandyopadhyay A and Bhattacharjee A. 2013. Efficient micropropagation and chlorocholine chloride induced stevioside production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Comptes Rendus Biologies* 336: 17-28.
43. Liao WC, Lin YH, Chang TM and Huang WY. 2012. Identification of two licorice species, *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra*, based on separation and identification of their bioactive components. *Food Chem* 132: 2188-2193
44. Picone D, Temussi PA. 2012. Dissimilar sweet proteins from plants: Oddities or normal components? *Plant Sci*; 195: 135-142.
45. Negi PS. 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *Int J Food Microbiol* 156: 7-17.
46. El-Beltagi HS, Osama K.A, El-Desouky W. 2011. Effect of low doses gamma-irradiation on oxidative stress and secondary metabolites production of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) callus culture. *Radiation Physics and Chem*; 80: 968-976.
47. Teerarak M, Laosinwattana C, Charoenying P. 2010. Evaluation of allelopathic, decomposition and cytogenetic activities of *Jasminum officinale* L. f. var. grandiflorum (L.) Kob. on bioassay plants. *Bioresource Technol* 101: 5677-5684.
48. Ernst D. Pimpinella anisum L. (Anise). 1989. Cell culture somatic embryogenesis and the production of anise oil. In: *Biotechnology in agriculture and forestry*, Bajaj YPS, (Editor). Vol. 1. Berlin: Springer, pp. 381.
49. Lichtenthaler HK. 1996. Vegetation Stress: an Introduction to the Stress Concept in Plants. *J Plant Physiol*, 148: 4-14.
50. Beck E, Lüttge U. 1990. Streß bei Pflanzen. *Biologie in unserer Zeit*, 20: 237-244.