



Antosiyaninlerin Kallus ve Hücre Süspansiyon Kültürüyle Üretimi

İlhami KARATAŞ^{a,1} (ilhami.karatas@gop.edu.tr)
Rahime KARATAŞ^b (memrem60@gmail.com)
Mahfuz ELMATAŞ^c (mahfuz.elmastas@gop.edu.tr)

^aGaziosmanpaşa Üniv. Almus Meslek Yüksekokulu, 60900 Tokat

^bGıda, Tarım ve Hay. Bak., Orta Karadeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araş. İstasyonu 60250 Tokat

^cGaziosmanpaşa Üniv. Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 60250 Tokat

Özet – Antosiyaninler bitki sekonder metabolitlerin yaygın bir grubu olan fenolik bileşiklerin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Bitki organlarına kırmızıdan maviye kadar birçok rengi veren bu bileşikler aynı zamanda çok sayıda biyolojik fonksiyonu da yerine getirmektedir. Antosiyaninlerin bitkilerdeki fonksiyonlarının yanında özellikle gıda sektöründe renklendirici olarak kullanım olanağı bulunmaktadır. Bu sektörün ihtiyacını karşılamak için alternatif üretim yolları araştırılmaktadır. Bu bağlamda bitki doku ve hücre kültürü teknikleri antosiyaninlerin üretimi için alternatif yöntemlerden bir tanesidir. Bu yöntemlerle üretim yapabilmek için çok sayıda strateji uygulanmıştır. Bu derlemede antosiyaninlerin genel özellikleri ve biyoteknolojik yöntemlerle üretim olanakları tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler –
Antosiyanin, kallus
kültürü, hücre
süspansiyon kültürü,
sekonder metabolitler

Gaziosmanpaşa Journal of Scientific Research 12 (2016) 80-91

Production of Anthocyanins by Callus and Cell Suspension Culture

Abstract – Anthocyanins constitute an important part of phenolic compounds, which are a common group of plant secondary metabolites. These compounds give in many colors ranging from blue and red to the plant organs at the same time has many biological functions. Besides the function of anthocyanins in plants it includes the use as colorants, especially in the food industry. Alternative production ways to meet the needs of the industry are being investigated. Plant tissue and cell culture techniques is one alternative method for the production of anthocyanins. A number of strategies are implemented to be able to produce by this method. In this review, general properties of anthocyanins and production facilities with biotechnological methods were discussed.

Keywords –
Anthocyanin, callus
culture, cell
suspension culture
Secondary
metabolites,

Received: 21.06.2016

Accepted: 21.07.2016

¹Sorumlu Yazar, Doktora tezinden hazırlanmıştır.

1. Giriş

Bitkiler primer ve sekonder metabolit olarak adlandırılan çok çeşitli organik bileşikler sentezlemektedirler. Primer metabolitler; fitosteroller, açıl lipitler, nükleotidler, proteinler, karbonhidratlar ve amino asitler olup büyüme, gelişme, fotosentez ve solunum gibi bir çok süreçte önemli rol oynamaktadırlar (Crozier ve ark., 2006; Ramawat, 2007). Sekonder metabolitler ise temel büyüme ve gelişme için gerekli olmayan fakat biyotik ve abiyotik streslere karşı çevresel uyumda görev alan düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir (Nascimento ve Fett-Neto, 2010). Bitki sekonder metabolitleri fenolikler, terpenler ve N ve S içeren bileşikler olmak üzere başlıca üç gruba ayrılmaktadır (Mazid ve ark., 2011). Fenolik bileşiklerin önemli bir bölümünü oluşturan flavonoidler ise antosiyanidinler, antosiyaninler kalkonlar, aurenler ve flavonellerden oluşmaktadır (Vermerris ve Nicholson, 2006). Bu bileşiklerin bitkilerdeki fonksiyonları uzun süre göz ardı edilse de herbivor ve mikroorganizmalara karşı korumada, tozlaşma ve tohumun yayılmasında hayvanları cezp etmede ve UV karşı korumada önemli bir role sahip olduğunun ortaya çıkmasıyla ilgi çekmeye başlamıştır. Ayrıca sekonder metabolitlerin boya, lif, yapıştırıcı, yağ, mum, tatlandırıcı, ilaç, parfüm, insektisit ve herbisit olarak kullanılabilmelerinden dolayı büyük önem arz etmektedir (Crozier ve ark., 2006).

Bitki doku kültürü; aseptik şartlar altında ve yapay bir besin ortamında bütün bir bitki, hücre, doku veya organ gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesi olarak tanımlanmaktadır (Babaoğlu ve ark., 2001). Başlıca doku kültürü yöntemleri arasında kök, sürgün, embriyo, kallus ve hücre süspansiyon kültürleri sayılabilmektedir. Kalluslar ana bitkiden kesip çıkarılan ve bölünme özelliğini kaybetmemiş organ veya doku parçalarının karbon kaynağı ve bitki büyüme düzenleyicilerini içeren yarı katı besi ortamında büyütülmesi sonucu oluşan morfolojik düzensizliğe sahip yapılardır. Hücre süspansiyon kültürleri ise tek hücrelerin veya küçük çapta hücre gruplarının sıvı büyüme ortamında dağılım gösterdiği bitki hücre kültürü tekniğidir. (Sökmen ve Gürel, 2001). Bu yöntemlerin birçok uygulama alanın bulunmasının yanında değerli sekonder metabolitlerin araştırılması ve üretilmesi için de elverişli biyoteknolojik bir yöntem olduğu bir çok araştırmacı tarafından ifade edilmektedir (Zhong, 2001; Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Vanisree ve ark., 2004).

Bu makalede; bitki biyoteknolojisinin sekonder metabolit üretiminde kullanımı, antosiyaninlerin genel özellikleri, antosiyaninlerin doku ve hücre kültürü teknikleriyle üretimi ve antosiyaninlerin üretiminin artırılması için yapılan uygulamalar anlatılmaktadır.

2. Biyoteknolojik Yöntemlerle Sekonder Metabolit Üretimi

Bitki hücre ve doku kültürü; kozmetik, farmositik veya tarımsal açıdan değerli sekonder metabolitlerin üretimi için geleneksel ekim yöntemleri ve kimyasal yöntemlere alternatif cezbedici bir yöntemdir (Kieran ve ark., 1997; Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Yağcı ve ark., 2008; Vijaya ve ark., 2010). Bitki hücre kültürü teknikleri 1960'ların sonlarından itibaren sekonder metabolitlerin hem üretilmesinde hem de bilimsel araştırmalarda bir araç olarak kullanılmaktadır. Söz konusu sistemlerde sekonder metabolit üretiminin geliştirilmesi amacıyla farklı stratejiler kullanarak yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Çalışmaların büyük çoğunluğu farklılaşmamış hücre kültürleri üzerine olsa da saçak kök kültürleri ve diğer organ kültürleri üzerine de yoğun bir ilgi gösterilmektedir (Bourgaud ve ark., 2001).

2.1. Bitki Biyoteknolojisiyle Metabolit Üretimin Avantajları

Sekonder metabolitlerin biyoteknolojik yöntemlerle üretiminin avantajlı olduğunu bildiren çok sayıda yayın bulunmaktadır (Chattopadhyay ve ark., 2002; Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Vanisree ve ark., 2004; Vijaya ve ark., 2010). Bu avantajlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- 1) Değerli bileşikler kontrollü şartlar altında iklim değişiklikleri ve toprak şartlarından bağımsız bir şekilde üretilebilmektedir.
- 2) Kültür ortamındaki hücreler mikrobiyolojik kontaminasyondan ve böcek saldırılarından uzak bir şekilde yetiştirilebilmektedir.
- 3) Tropikal veya yükseklerde yetişen herhangi bir bitkinin hücreleri kolaylıkla çoğaltılarak bu bitkiye has bileşikler üretilebilmektedir.
- 4) Hücre büyümesinin otomatik kontrolü ve metabolit süreçlerinin rasyonel düzenlenmesiyle üretkenlik artırılabilir ve iş gücü maliyeti azaltılabilir.
- 5) Organik bileşikler kallus kültüründen kolayca ekstrakte edilebilmektedir.
- 6) Bu sistem zararlı herbisit ve pestisidlerin kullanıma gereksinim duymamaktadır.
- 7) Üretildiği ana bitkide normal olarak bulunmayan yeni bileşiklerin üretilmesine imkan sağlamaktadır.
- 8) Daha sabit kalitede ve verimde sürekli üretim imkanı sağlanabilmektedir.

2.2. Bitki Doku ve Hücre Kültürlerinde Sekonder Metabolit Üretimini Artırmak için Geliştirilen Stratejiler

Bitki hücre kültür sisteminde ürün verimi ve kalitesini artırıp maliyeti azaltmak için stratejiler geliştirilmiştir (Yağcı ve ark., 2008). Bu sistemlerden yüksek miktarlarda ticari amaçlı ürün elde edilmesi kültür şartlarını optimize edilmesine, kültür ortamının hedef bileşiğe göre düzenlenmesine ve ilgili metabolik yolların iyi bilinmesine bağlıdır (Shilpa ve ark., 2010).

Bir çok kaynak tarafından ifade edilen bu stratejiler maddeler halinde aşağıda özetlenmiştir.

1) Üretim gücü yüksek hücre hatlarının taranması ve seçilmesi arzu edilen bileşiği en yüksek seviyede elde etme imkanı sağlayabilmektedir. Hücre hattının geliştirilmesi hedeflenen bileşiğin yüksek miktarda üretildiği ana bitkinin seçimiyle başlar ve bundan elde edilecek kallus kültüründen yüksek verimli hücre hatlarının seçimiyle devam ettirilir (Yağcı ve ark., 2008).

2) Kültürün oluşturulduğu besin ortamının standardizasyonu hem yüksek miktarda biyomas elde etme açısından hem de sekonder metabolit üretimi açısından önemli bir parametredir. Hücrelerdeki metabolit birikimi besin ortamının içeriği, dışarıdan uygulanan bitki hormonları ve kültür ortamının şartları tarafından düzenlenmektedir (Shilpa ve ark., 2010). Bitki doku ve hücre kültürlerinin gerçekleştirildiği besi ortamında bulunan her kimyasal büyüme ve sekonder metabolit üretimi için teşvik edici olabildiği gibi sınırlayıcı da olabilmektedir. Örneğin besi ortamında yer alan herhangi bir madde hücrelerin büyümesini teşvik ederken sekonder metabolit birikimini azaltabilmektedir. Kültür ortamında metabolit üretimini etkileyen başlıca kimyasal koşullar arasında karbon, azot ve fosfor kaynağı, bitki hormonlarının çeşidi ve derişimi, kültür ortamında bulunan makro ve mikro elementler, pH ve osmotik basınç sayılabilmektedir. Kültür ortamında metabolit üretimini etkileyen fiziksel koşullar ise ışık ve sıcaklıktır. Çalkalama ve havalandırma gibi

fiziksel etmenler de hücre süspansiyon kültürlerinde büyüme ve metabolit birikimini etkileyen diğer önemli faktörlerdir (Sökmen ve Gürel, 2001).

3) Öncül bileşiklerin besi ortamına ilave edilerek sekondor metabolit üretiminin artırılması yaygın şekilde başvurulmuş bir yaklaşımdır. Üretilmesi istenen metabolitin biyosentez mekanizmasının bilinmesi durumunda bu süreçte yer alan başlangıç veya ara ürünlerin kültür ortamına katılması metabolit üretimini artırabilmektedir (Ramachandra ve Ravishankar, 2002)

4) Elisitör olarak tanımlanan mikrobiyal, fiziksel veya kimyasal stres faktörlerinin sekonder metabolizmada artışa yol açması bu metabolitlerin üretiminde bir strateji olarak kullanılabilir (Mulabagal ve Tsay, 2004; Shilpa ve ark., 2010). Bitki sekonder metabolitleri çoğunlukla bitkileri çevresel stres faktörlerinden korumak için sentezlenmektedir. Bu nedenle bitki hücre kültürlerine ozmotik şok, ağır metal iyonlarının ilave edilmesi, inorganik tuzlar, mikrobiyal homojenat veya UV radyasyonu gibi stres faktörlerinin uygulanması bazı sekonder metabolitlerin birikimini artırmaktadır (Verpoorte ve ark., 2002).

5) Üretilmesi istenen hedef bileşiğin biyosentez yolundaki kilit gen veya genlerin aşırı ekspresyonu ile metabolit üretimi teşvik edilebilmektedir. Sekonder metabolitlerin biyosentez yolundaki genlerin klonlanmasında, transformasyonunda ve düzenlenmesinde oldukça ilerleme kaydedilmiştir. Bu tekniklerdeki ilerleme hedef bileşiğin biyosentezinin manipülasyonu için olanak ve bilgi imkanı sağlamaktadır (Gaosheng ve Jingmimg, 2012). Ayrıca, mikroRNA (miRNA)'lar olarak adlandırılan ve yaklaşık 21 nükleotit uzunluğundaki küçük endojen RNA'ların (sRNAs) bitki sekonder metabolitlerinin biyosentezinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı da ifade edilmiştir (Boke ve ark., 2015). Örneğin tıbbi bir bitki olan *Saussurea involucre*'ın içerdiği apigenin bileşiği tümörogenezi anlamlı şekilde inhibe ettiği bilinmektedir. Ancak bitkinin doğal yapısında düşük miktarda bulunan bu bileşiğin miktarını artırmak için flavonoid biyosentez yolunda transgenik yaklaşımla bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bitkinin saçak kök kültürüne aktarılan kalkon izomeraz geninin aşırı ekspresyonuyla kontrolden 12 kat daha fazla apigenin bileşiği elde edilmiştir (Li ve ark., 2006).

6) Sekonder metabolitin biyosentez yolundaki spesifik enzim inhibitörlerinin uygulanması hedef molekülün verimini artırılabilir. Birçok bileşiğin üretimi biyosentez basamağında birbiriyle rekabet halindedir. Bu metot hedef molekülün birikimini teşvik etmek için diğer bileşiklerin sentezlendiği biyosentez yollarının bloke edilmesine dayanmaktadır (Gaosheng ve Jingmimg, 2012).

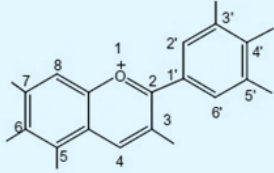
3. Antosiyaninler

3.1 Antosiyaninlerin yapısı

Antosiyaninler (Yunancada anthos: çiçek ve kyanos: mavi) klorofilden sonra gözle görülebilen en önemli pigment grubudur. Bunlar bitkilerin çiçek, meyve, yaprak ve depo organlarına kırmızıdan maviye kadar birçok rengi veren doğal bileşiklerdir. Başka bir ifadeyle antosiyaninler flavonoid grubuna ait C6-C3-C6 iskeletine sahip fenolik bileşiklerdir (Delgado-Vargas ve ark., 2000). Antosiyaninlerin temel kısmını antosiyanidin (aglikon) olarak adlandırılan flavilium katyonu oluşturmaktadır (Şekil 1) (Kong ve ark., 2003).

Bitkiler aleminde 2000 yılı itibarıyla 500 farklı antosiyanin çeşidinin bulunduğu belirlenmiştir (Galvano ve ark., 2004; Ghosh ve Konishi, 2007). Antosiyaninler arasındaki farklar, antosiyanidin moleküldeki hidroksil (OH) ve metoksil (OCH₃) gruplarının sayısı ve pozisyonu, moleküle bağlanmış şekerlerin türü, sayısı ve bağlanma şekli ve bu şekerlere

bağlanmış alifatik ve aromatik asitlerin yapı ve sayısı gibi faktörlerden kaynaklanmaktadır. Doğal olarak meydana gelen 17 antosiyanidin yapısı Şekil 1’de verilmiştir. Bunlardan pelargonidin, siyanidin, peonidin, delphinidin, petunidin ve malvidin bitkilerde en yaygın olarak bulunan altı antosiyanidindir. Bu altı antosiyanidin bitkilerin yenilebilir kısımlarındaki dağılımları incelendiğinde % 50 siyanidin, % 12 pelargonidin, % 12 peonidin, % 12 delphinidin, % 7 petunidin ve % 7 malvidinden oluştuğu belirlenmiştir. (Kong ve ark., 2003; Delgado-Vargas ve Paredes-López, 2003).



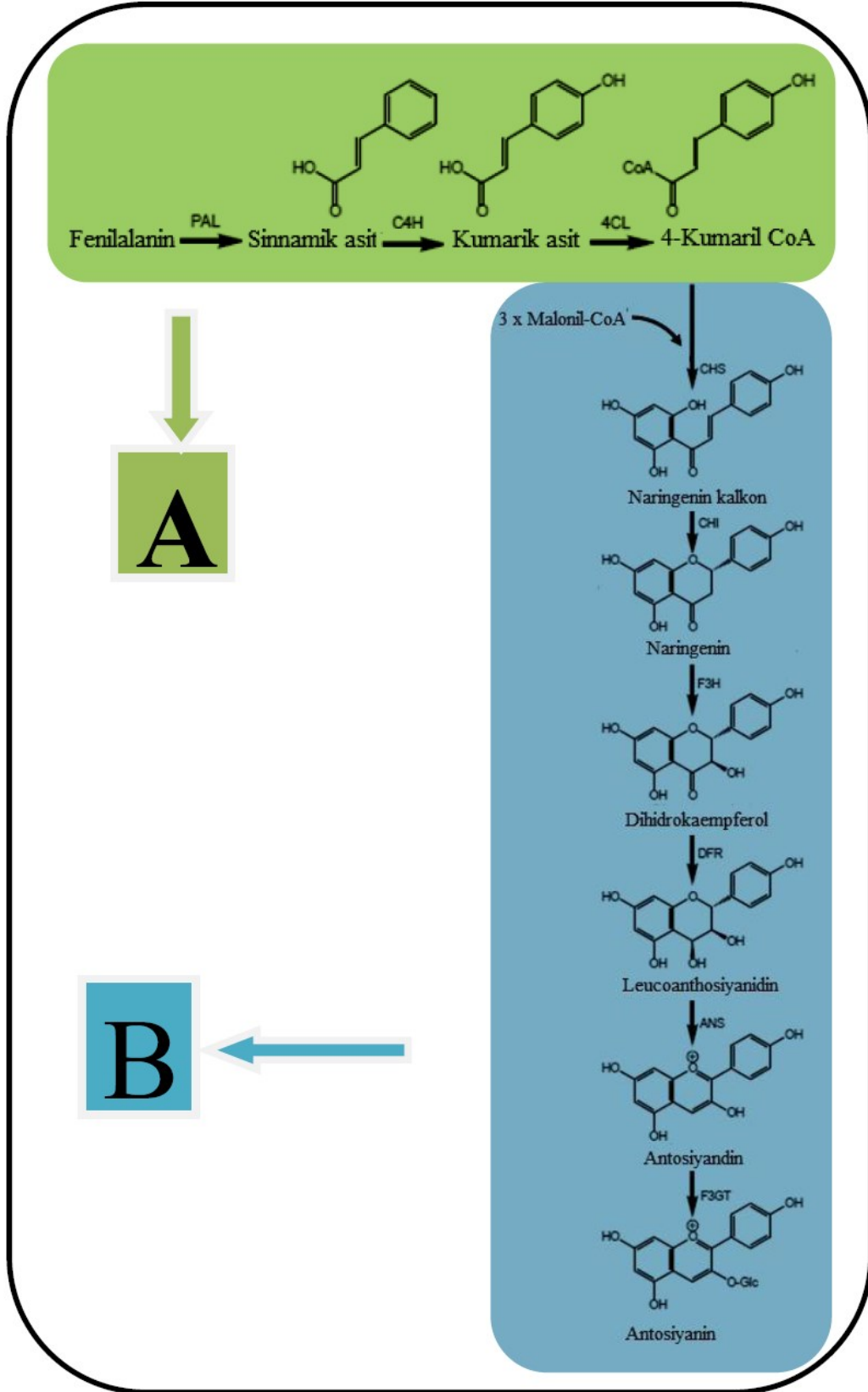
Adı	Kısaltma	3	5	6	7	3'	4'	5'	Renk
Apigeninidin	Ap	H	OH	H	OH	H	OH	H	Turuncu
Aurantininidin	Au	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	Turuncu
Capensinidin	Cp	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	Mavimsi-Kırmızı
Cyanidin	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Turuncu-Kırmızı
Delphinidin	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Mavimsi-Kırmızı
Eurupinidin	Eu	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	Mavimsi-Kırmızı
Hirsutidin	Hs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	Mavimsi-Kırmızı
6-Hydroxycyanidin	6OHCy	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	Kırmızı
Luteolinidin	Lt	H	OH	H	OH	OH	OH	H	Turuncu
Malvinidin	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	Mavimsi-Kırmızı
5-Methylcyanidin	5-MCy	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	Turuncu-Kırmızı
Pelargonidin	Pg	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Turuncu
Peonidin	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Turuncu-Kırmızı
Petunidin	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Mavimsi-Kırmızı
Pulchellidin	Pl	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Mavimsi-Kırmızı
Rosinidin	Rs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	Kırmızı
Tricetinidin	Tr	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Kırmızı

Not: OMe=OCH₃

Şekil 1. Antosiyaninlerin temel kısmını oluşturan antosiyanidin olarak adlandırılan flavilium katyonu ve antosiyanidinler (Kong ve ark., 2003).

3.2. Antosiyaninlerin Biyosentezi

Antosiyaninlerin öncül bileşikleri glikolitik yolla (fosfoenol pirüvat) ve pentoz fosfat yoluyla (eritroz-4-fosfat/ kalvin döngüsü) üretilir. Bu yollarla üretilen şikimik asit ile asetat antosiyaninleri de içeren pek çok fenolik bileşiğin temel aromatik yapıtaşını oluşturur. Antosiyaninlerin biyosentez yolu temel olarak iki ana bölüme ayrılabilir. Bu yolun birinci aşamasında (Şekil 2 A) fenilpropanoid metabolizmasının öncülleri sentezlenirken, ikinci aşamasında (Şekil 2 B) spesifik flavonoidlerin sentezi gerçekleşmektedir. Antosiyanin sentezinin ilk aşamasında fenilalanin p-kumaril-CoA'ya üç enzim tarafından dönüştürülür. Bu enzimler fenilalanin amonyum liyaz (PAL), sinamat-4-hidroksilaz (C4H) ve 4-kumaril-CoA ligaz (4CL) dir. p-Kumaril-CoA flavonoid, lignin ve diğer fenilpropanoidlerin başlıca öncül bileşimidir. Sentezin ikinci aşamasında flavonoid biyosentezinin anahtar enzimi olarak düşünülen kalkon sentaz (CHS) üç molekül malonil CoA ile 4-kumaril-CoA yı ara kalkon oluşturmak için katalizler. Kalkon, kalkon izomeraz (CHI) enzimi tarafından naringenine dönüştürülür. Naringenin bir dioksigenaz veya monooksigenaz tarafından dihidrokaempferol'e dönüştürülür. Bir sonraki basamakta dihidrokaempferol dihidroflavanol-4-redüktaz (DFR) enzimiyle leucoanthocyanidine dönüştürülür. Antosiyanidin sentaz (ANS) enzimi leucoanthocyanidinden renkli antosiyanidinleri meydana getirir. Antosiyaninlerin biyosentezi bir glikozillenme reaksiyonuyla antosiyanidinlerin antosiyaninlere dönüşümü gerçekleştirilir. Bu basamak için en iyi tanımlanan enzim flavonoid 3-O-glikozil transferaz (F3GT) enzimidir (Delgado-Vargas ve ark., 2000; Delgado-Vargas ve Paredes-López, 2003).



Şekil 2. Antosiyaninlerin biyosentez basamakları (Davies, 2009); PAL: fenilalanin amonyum liyaz, C4H: sinnamat-4-hidroksilaz, 4CL: 4-kumaril-CoA ligaz, CHS: kalkon sentaz, CHI: kalkon izomeraz, F3H: flavanone 3 β -hidroksilaz, DFR: dihidroflavanol-4-redüktaz, ANS: antosiyanidin sentaz, : F3GT: flavonoid 3-O-glikozil transferaz.

3.3. Antosiyaninlerin Kullanım Alanı ve Biyolojik Önemi

Antosiyaninlerin çekici kırmızı, turuncu ve mor renklerinin yanında suda çözünmeleri bu bileşiklerin doğal renklendirici olarak kullanım imkanı sağlamıştır (Bakowska-Barczak, 2005). Antosiyanin ekstraktlarının gıdalara yalnızca çekici renk özellikleri kazandırmadığı, aynı zamanda yüksek antiradikal kapasiteleri nedeniyle, eklendikleri gıdaların oksidatif stabilitelerini de arttırdığı ifade edilmiştir (Kırca, 2004). Bu bileşiklerin doğal gıda renklendiricisi olarak kullanılmasının yanında, yüksek antioksidan aktivitesi göstermesi nedeniyle de diyetle önemli bir yere sahiptir. Ayrıca kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği, koroner kalp rahatsızlıklarının oluşumunu engellediği, diyabet, nörolojik hastalıklar ve inflamasyonda etkili olduğu klinik olarak belirlenmiştir (Zhang ve Furusaki, 1999; Maharik ve ark., 2009).

3.4. Antosiyaninlerin bitki doku ve hücre kültürüyle üretimi

Antosiyaninlerin bitki hücre kültürüyle üretimi gerek akademik gerekse endüstriyel açıdan önemli ölçüde ilgi çeken bir teknolojidir. Bitki hücre kültürü yöntemleriyle antosiyanin üretiminin temel nedeni, ticari kullanıma uygun ekonomik olarak fayda sağlayacak geçerli bir sürecin oluşturulmasıdır. Bu amaçla yaklaşık 33 farklı bitki türünde çalışma yapıldığı ve en yaygın olarak çilek (*Fragaria ananassa*), üzüm (*Vitis vinifera*) ve havuç (*Daucus carota*) bitkilerinin kullanıldığı bildirilmektedir (Zhang ve ark., 2002; Derolles, 2009). Birçok kültür sisteminde antosiyanin biyosentezini artırarak ticari amaca elverişli bir teknoloji oluşturmak için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. En yaygın kullanılan stratejiler arasında yüksek üretken hücre hatlarının seçimi, öncül bileşiklerin ilave edilmesi, besin ortamının ve kültür şartlarının optimizasyonu, elitasyon ve iki aşamalı kültür sistemlerinin kurulması sayılabilmektedir (Zhang ve Furusaki, 1999). Bitki doku ve hücre kültürü yöntemleriyle antosiyanin üretiminin yapıldığı bitki türü, kültür tipi ve bu bileşiğin üretiminin artırılması için yapılan uygulamalar Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1: Antosiyaninlerin Bitki Doku ve Hücre Kültürü Yöntemleriyle Üretimi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Kültürü Yapılan Bitki	Kültür tipi	Yapılan uygulama	Referans
<i>Daucus carota</i>	Kallus	Fosfat ve nitrat eksikliğinden kaynaklanan stres antosiyanin içeriğini önemli ölçüde artırdığı belirtilmiştir.	Rajendran ve ark., 1992.
		0,05 mM putresin uygulanması antosiyanin miktarını kontrol grubuna göre 1,68 kat artırdığı ifade edilmiştir.	Sudha ve Ravishankar, 2003.
	Süspansiyon	Ultraviyole ışığın ve fungal elisitörün antosiyanin biyosentezini düzenleyen enzimlerin üzerine etkisini incelemiştir.	Gläßgen ve ark., 1998.
<i>Fragaria ananassa</i>	Süspansiyon	4 mg/L riboflavin ve % 10 sukroz içeren besin ortamında antosiyanin üretiminin arttığı ifade edilmiştir.	Mori ve Sakurai, 1995.
<i>Prunus cerasus</i>	Kallus	50 µM jasmonik asit antosiyanin sentezini uyardığı görülmüştür.	Blando ve ark., 2005.

<i>Catharanthus roseus</i> <i>Celosia argentea</i> <i>Cordyline terminalis</i>	Kallus	Antosiyanin üretiminde; L- fenilalanin ve Ca ⁺⁺ için optimum konsantrasyonun sırasıyla 3 µM ve 0.5 µM olduğu belirlenmiştir.	Taha ve ark., 2008.
<i>Crataegus sinaica</i>	Kallus	Gövde ve yaprak eksplantlarından elde edilen kallus kültüründe antosiyanin üretimi incelenmiştir.	Maharik ve ark., 2009.
<i>Cleome rosea</i>	Kallus	Sıcaklık (24 ± 2 °C ve 32 ± 2 °C) ve ışık (67 ve 80 µmol m ⁻² s ⁻¹) yoğunluğunun antosiyanin içeriği üzerine etkisi incelenmiştir. Antosiyanin üretimi sıcaklığın düşmesiyle ve ışık şiddetinin artmasıyla yükselmiştir.	Simões ve ark., 2009.
<i>Melastoma malabathricum</i>	Süspansiyon	Antosiyanin birikiminin orta dereceli ışık şiddetinde (301-600 lüks), sürekli ışıkta ve düşük sıcaklıkta (20 ± 2 °C) bekletilen kültürlerde daha fazla olduğu bildirilmiştir. Antosiyanin birikimi en yüksek pH 5,25 - 6,25 aralığında olduğu bildirmiştir.	Chan ve ark., 2010.
<i>Ocimum basilicum</i>	Süspansiyon	Çalkalama hızının 90 rpm'den 150 rpm'e yükseltilmesi antosiyanin içeriğini artırmıştır.	Strazzer ve ark., 2011.
<i>Malva neglecta</i>	Kallus	UV-B ve UV-C uygulamanın antosiyanin içeriğini artırdığı bildirilmiştir.	Khatami ve Ghanati, 2011.
<i>Vitis sp.</i>	Süspansiyon	Fosfat eksikliği hücrelerde antosiyanin birikimini belirgin şekilde teşvik etmiştir.	Yin ve ark., 2012.
<i>Vitis vinifera</i>	Süspansiyon	% 0,8'lik karboksi metil selüloz uygulanan kültürlerin antosiyanin içeriğinin kontrol grubuna göre 3 kat fazla olduğu belirlenmiştir.	Nagamori ve ark., 2001.
		20 µM jasmonik asit uygulanması antosiyanin miktarını kontrol grubuna göre 8,5 kat artırdığı; 8000-8300 lüks ışık altında kültüre alınan hücrelerin antosiyanin içeriği kontrole göre 4,8 kat arttığı belirlenmiştir.	Zhang ve ark., 2002.
		Aydınlık (10.000 lüks), kadmiyum sülfat (1,0 mM ve 1,5 mM), metil jasmonat (10 µM) ve sakkaroz (0,20 M ve 0,25 M) uygulanması antosiyanin birikimini teşvik ettiği ifade edilmiştir.	Çetin, 2010.
		Atımlı elektrik akımı (1,7 kat) ve ethephon (2,3 kat) uygulanması antosiyanin içeriğini kontrole göre artırdığı ifade edilmiştir.	Saw ve ark., 2012.
		10 µM Metil jasmonate ile birlikte kırmızı ışık uygulanması antosiyanin seviyesini önemli ölçüde artırmıştır.	Tassoni ve ark., 2012.
		Sentetik elisitör (İndanol-izolösin) uygulanması antosiyanin üretimini 2,6 kat artırdığı ifade edilmiştir.	Cai ve ark., 2012a.
		Chitosan (2,5 kat), pektin (2,5 kat) ve	Cai ve ark., 2012b

		alginate (2,6 kat) antosiyanin üretimini kontrole göre önemli ölçüde artırdığı belirtilmiştir.	
<i>Rosa hybrida</i>	Kallus	Salisilik asit ve metil jasmonat antosiyanin içeriğini artırdığı belirlenmiştir.	Ram ve ark., 2013.
<i>Malus sieversii f.niedzwetzkyana</i>	Kallus	Antosiyanin üretiminde oksin ve sitokinin kombinasyonları ile azot eksikliğinin etkisi incelenmiştir. Ayrıca bu hormonların antosiyanin sentezinin düzenleyici genleri üzerine etkiside araştırılmıştır.	Ji ve ark., 2015.
<i>Hypericum perforatum L.</i>	Süspansiyon	Fungal elisitör uygulanması antosiyanin üretimini artırdığı ifade edilmiştir.	Simic ve ark.,2015.

4. Sonuç

Bitki hücre ve doku kültü yöntemi birçok sekonder metabolitte olduğu gibi antosiyaninlerin üretimi içinde uygun bir tekniktir. Ayrıca bu yöntemle antosiyanin üretiminde birçok strateji uygulanarak verim artırılabilir. Ancak yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu laboratuvar ölçeklidir. Bu yöntemle antosiyanin üretiminin temel amacı ortam şartlarından bağımsız ve sürekli olarak sektörün ihtiyacını karşılayacak sistemin oluşturmasıdır. Bu bağlamda büyük ölçekte üretim sağlayacak biyoreaktör sistemlerinin oluşturulması ve üretim olanaklarının belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Kaynaklar

- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M.A., 2001. Doku kültürü: Temel laboratuvar teknikleri, Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. Konya, s.1-35.
- Bakowska-Barczak, A., 2005. Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants. Pol. J. Food Nutr. Sci., 14/55 (2) 107-116.
- Blando, F., Scardino, A.P., Bellis, L. D., Nicoletti, I., Giovinazzo, G., 2005. Characterization of in vitro anthocyanin –producing sour cherry (*Prunus cerasus* L.) callus cultures. Food Research International, (38) 937-942.
- Boke, H., Ozhuner, E., Turktas, M., Parmaksiz, I., Ozcan, S., Unver, T., 2015. Regulation of the alkaloid biosynthesis by miRNA in opium poppy. Plant Biotechnology Journal (13) 409–420.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science, (161) 839-851.
- Cai, Z., Knorr, D., Smetanska, I., 2012a. Enhanced anthocyanins and resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension culture by indanoyl-isoleucine, N-linolenoyl-L-glutamine and insect saliva. Enzyme and Microbial Technology, (50) 29-34.
- Cai, Z., Kastell, A., Mewis, I., Knorr, D., Smetanska, I., 2012b. Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. Plant Cell Tiss Organ Cult., (108) 401-409.

- Chan, L.K., Koay, S.S., Boey, P.L., Bhatt, A., 2010. Effects of abiotic stress on biomass and anthocyanin production in cell cultures of *Melastoma malabathricum*. *Biol Res.* (43)127-135.
- Chattopadhyay, S., Farkya, S., Srivastava, A. K., Bisaria, V.S., 2002. Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, (7) 138-149.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. N., 2006. Plant Secondary Metabolites : Occurrence, structure and role in the human diet. Phenol, polyphenols and tannins : an overview. Edited Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H., (1) 1-24.
- Çetin, E. S., 2010. Asmada hücre süspansiyon kültürleri ile sekonder metabolit üretimi üzerine araştırmalar.(Doktora tezi), Süleyman Demiral Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Davies, K.M., 2009. Anthocyanins, Biosynthesis, functions, and applications. Modifying anthocyanin production in flowers. Editors: Gould, K., Davies, K., Winefield, C. (3) 49-83.
- Delgado-Vargas, F., Paredes-López, O., 2003. Natural colorants for food and nutraceutical uses. Anthocyanins and betalains. 8.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A.R., Paredes-López, O., 2000. Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains- characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3)173-289.
- Deroles, S., 2009. Anthocyanins, Biosynthesis, functions, and applications. Anthocyanin biosynthesis in plant cell cultures: A potential source of natural colourants . Editors: Gould, K., Davies, K., Winefield, C. (5) 107-155.
- Gaosheng, H., Jingming, J., 2012. Production of useful secondary metabolites through regulation of biosynthetic pathway in cell and tissue suspension culture of medicinal plants, *Recent Advances In Plant In Vitro Culture*, Edited Leva, A., and Rinaldi, L. M. R. Chapter, 11.
- Galvano, F., Fauci, L.L., Lazzarino, G., Fogliano, V., Ritieni, A., Ciappellano, S., Battistini, N. C., Tavazzi, B., Galvano, G., 2004. Cyanidins: metabolism and biological properties. *Journal Nutritional Biochemistry*, (15) 2-11.
- Ghosh, D., Konishi, T., 2007. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pac J Clin Nutr*, 16(2) 200-208.
- Gläßgen, W. E., Rose, A., Madlung, J., Koch, W., Gleitz, J., Seitz, H. U., 1998. Regulation of enzymes involved in anthocyanin biosynthesis in carrot cell cultures in response to treatment with ultraviolet light and fungal elicitors. *Planta*, (204) 490-498.
- Ji, X-H., Wang, Y-T., Zhang, R., Wu, S-J., An, M-M., Li, M., Wang, C-Z., Chen X-L., Zhang, Y-M., Chen, X-S., 2015. Effect of auxin, cytokinin and nitrogen on anthocyanin biosynthesis in callus cultures of red-fleshed apple (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*). *Plant Cell Tiss Organ Cult* (120) 325–337.
- Khatami, F., Ghanati, F., 2011. Effect of UV irradiation on cell viability, anthocyanin, and flavonoid contents of callus-cultured *Malva neglecta* cells. *International Conference on life Science and Technology, IPCBEE 3*, Singapore.
- Kırca, A., 2004. Siyah havuç antosiyaninlerinin bazı meyve ürünlerinde ısıl stabilitesi (Doktora tezi) Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kieran, P. M., MacLoughlin, P.F., Malone, D.M., 1997. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*, (59) 39-52.
- Kong, J-M., Chia, L-S., Goh, N-K., Chia, T-F., Brouillard, R., 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, (64) 923-933.

- Li, F-X., Jin, Z-P., Zhao, D-X., Cheng, L-Q., Fu, C-X., Ma, F., 2006. Overexpression of the *Saussurea medusa* chalcone isomerase gene in *S. involucreta* hairy root cultures enhances their biosynthesis of apigenin. *Phytochemistry* (67) 553-560.
- Maharik, N., Elgengaihi, S., Taha, H., 2009. Anthocyanin production in callus cultures of *Crataegus sinaica* boiss. *International Journal of Academic Research*, 1-1.
- Mazid, M., Khan, T. A., Mohammad, F., 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*, 3(2) 232-249.
- Mori, T., Sakurai, M., 1995. Effects of riboflavin and increased sucrose on anthocyanin production in suspended strawberry cell cultures. *Plant Science*, (110)-147-153.
- Mulabagal, V., Tsay, H.S., 2004. Plant cell cultures-An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International journal of Applied Science and Engineering*, 2 (1) 29-48.
- Nagamori, E., Hiraoka, K., Honda, H., Kobayashi, T., 2001. Enhancement of anthocyanin production from grape (*Vitis vinifera*) callus in a viscous additive –supplemented medium. *Biochemical Engineering Journal* (9) 59-65.
- Nascimento, N. C., Fett-Neto, A. G., 2010. Plant Secondary Metabolism Engineering, Methods and Applications, Plant secondary metabolism and challenges in modifying its operation :An Overview. Edited: Fett-Neto, A. G., *Methods in Molecular Biology* 643, (1)1-13.
- Rajendran, L., Ravishankar, G.A., Venkataraman, L. V., Prathiba, K.R., 1992. Anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* as influenced by nutrient stress and osmoticum. *Biotechnology Letters*, (14) 707-712.
- Ram, M., Prasad, K. V., Singh, S. K., Hada, B. S., Kumar, S., 2013. Influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitation on anthocyanin production in callus cultures of *Rosa hybrida* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult* (113) 459–467.
- Ramachandra, R. S., Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, (20) 101-153.
- Ramawat, K. G., 2007. *Biotechnology :Secondary Metabolites, Secondary plant products in nature*. Edited: Ramawat, K. G., Merillon, L.M., (2) 21.
- Saw, N.M.M.T., Riedel, H., Cai, Z., Kütük, O., Smetanska, I., 2012. Stimulation of anthocyanin synthesis in grape (*Vitis vinifera*) cell cultures by pulsed electric field and ethephon. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, (108)47-54.
- Shilpa, K., Varun, K., Lakshmi, B.S., 2010. An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *Journal of Plant Sciences*, 5(3) 222-247.
- Simic, S.G., Tusevski, O., Maury, S., Hano, C., Delaunay, A., Chabbert, B., Lamblin, F., Laine, E., Joseph, C., Hage'ge, D., 2015. Fungal elicitor-mediated enhancement in phenylpropanoid and naphthodianthrone contents of *Hypericum perforatum* L. cell cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult* (122) :213–226.
- Simões, C., Bizarri, C. H. B., Cordeiro, L. S., Castro, T.C., Coutada, L. C. M., Silva, A.J.R., Albarello, N., Mansur, E., 2009. Anthocyanin production in callus culture *Cleome rosea* : Modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS. *Plant Physiology and Biochemistry*, (47) 895-903.
- Sökmen, A. ve Gürel, E., 2001. Sekonder metabolit üretimi, Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. Konya, s.211-261.
- Strazzer, P., Guzzo, F., Levi, M., 2011. Correlated accumulation of anthocyanins and rosmarinic acid in mechanically stressed red cell suspensions of basil (*Ocimum basilicum*). *Journal of Plant Physiology*, (168) 288-293.

- Sudha, G., Ravishankar, G. A., 2003. Influence of putrescine on anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* mediated through calcium ATPase. *Acta physiologiae plantarum*, (25) 69-75.
- Taha, H.S., Abd El-Rahman, R.A., Fathalla, M.K., Aly, U.E., 2008. Successful application for Enhancement and production of anthocyanin pigment from cali cultures of some ornamental plants. *Australian Journal of Basic Applied Sciences*, 2(4)1148-1156.
- Tassoni, A., Durante, L., Ferri, M., 2012. Combined elicitation of methyl-jasmonate and red light on stilbene and anthocyanin biosynthesis. *Journal of Plant Physiology*, (169) 775-781.
- Vanisree, M., Lee, C.Y., Lo, S.F., Nalawade, S. M., Lin, C.Y., Tsay, H.S., 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, (45) 1-22.
- Verpoorte, R., Contin, A., Memelink, J., 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews* (1) 13-25.
- Vermerris, W., Nicholson, R., 2006. *Phenolic Compound Biochemistry*. s. 1-32
- Vijaya S. N., Udayasri P., Aswani kumar V.V. Y., Ravi Babu B., Phanin kumar Y., Vijay V. M., 2010. Advancements in the production of secondary metabolites. (3) 112-123.
- Yağcı, C., Toker, M.C., Toker, G., 2008. Bitki doku kültürü yoluyla üretilen flavonoidler. *Türk Bilimsel Derlemler Dergisi*, 1 (1) 47-58.
- Yin, Y., Borges, G., Sakuta, M., Crozier, A., Ashihara, H., 2012. Effect of phosphate deficiency on the content and biosynthesis of anthocyanins and the expression of related genes in suspension-cultured grape (*Vitis sp.*) cells. *Plant Physiology Biochemistry*, (55)77-84.
- Zhang, W., Curtin, C., Kikuchi, M., Franco, C., 2002. Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Science*, (162) 459-468.
- Zhang, W., Furusaki, S., 1999. Production of Anthocyanins by plant cell cultures. *Biotechnol Bioprocess Eng.*, (4) 231-252.
- Zhong, J-J., 2001. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. Edited: Scheper, T., (72) 1-26.