

Bitki Doku Kültürü Yoluyla Üretilen Flavonoidler

Canan YAĞCI¹ Mehmet Cihat TOKER Gülnur TOKER²

¹Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara

²Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı, Ankara

Sorumlu yazar

e-posta: cyagci@science.ankara.edu.tr

Özet

Antioksidan, diüretik, antidiyabetik, antikanserojen gibi birçok etkiye sahip olan flavonoidlerin bitki doku kültürü teknikleriyle bitkilerden elde edilmesi günümüzde oldukça popüler bir konudur. Halen geliştirilmekte olan birçok yöntem ile tıbbi bitkilerden biyoaktif maddelerinin endüstriyel boyutlarda üretilmesi, ilaç sanayine katkı sağlanmaktadır. Bu derleme flavonoidlerin kullanım alanları, bitki doku kültürü yöntemleri, bu yöntemlerle flavonoidlerin nasıl elde edilebileceği ve verimin artırılması için geliştirilen yöntemleri anlatmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Flavonoid, bitki doku kültürü, kallus kültürü, süspansiyon kültürü.

Flavonoids Producing By Plant Tissue Culture

Abstract

Flavonoids, which have many effects such as antioxidative, diuretic, antidiabetic, anticancerogen, have been obtained from plants by plant tissue culture techniques is very popular issue lately. Production of bioactive components obtained from plants with industrial scale contribute to drug industry. This review mentions uses of flavonoids, plant tissue culture methods, how flavonoids obtained from these methods and new methods developed for increasing production.

Key Words: Flavonoid, plant tissue culture, callus culture, suspension culture.

GİRİŞ

Fenil alaninden türetilen fenolik bileşiklerden olan flavonoidler, bitkilerin meyve, tohum, çiçek, yaprak, gövdelerinde bulunan renkli maddelerdir. Bitkilerin yaşamlarında birçok mekanizmada iş gören flavonoidler aynı zamanda birçok ülkenin geleneksel halk tıbbında kullandığı preparatların içerisinde bulunmakta ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [1].

Geniş kapsamlı kullanım alanına sahip olan flavonoidlerin elde edilmesinde kaynak olarak bitkiler kullanılmaktadır. Bu da bitkilerin doğal yaşam alanlarından toplanması ile gerçekleştirilmekte ve aşırı toplanan bazı türler yok olma riskiyle karşı karşıya kalmaktadır. Bunun önüne geçmek için günümüzde bitki biyoteknolojisindeki gelişmelerden yararlanılmaktadır. Flavonoid içeren bitkiler, bitki doku kültürü ile üretilmekte, flavonoid üreten veya üretmeye programlanmış bitki hücre kültürleri ile çok miktarda ürün elde edilmektedir. Bu makale, flavonoidlerin genel özellikleri ve bitki doku kültürü hakkında bilgiler vermekte, flavonoidlerin bitki doku kültürü yöntemleriyle nasıl elde edilebileceğini anlatmaktadır.

Flavonoidler

Polifenolik bileşiklerden olan flavonoidler, özellikle Polygonaceae, Rutaceae, Fabaceae, Umbelliferae, Compositae gibi familyalarda yaygın olarak bulunan genellikle sarı, kırmızı/mavi renkli pigmentler olarak bilinirler. Genellikle yaprak, çiçek ve tomurcuklarında bulunan flavonoidlerin bitkide oksidasyon-redüksiyon olaylarına katıldığı ve büyümede rol oynadıkları bilinmektedir [2, 3].

Flavonoidlerin biyolojik aktiviteleri

Bitkilerdeki etkileri: Flavonoidler, bitkilerde özellikle çiçeklerdeki renklenmeyi sağlayan sekonder bileşiklerdir [2]. Çeşitli flavonoidlerin polar oksin taşınmasını negatif yönde etkilediği, ayrıca *Arabidopsis* polenlerinde yapılan çalışmalarda polen çimlenmesini artırıcı etkiye sahip oldukları kanıtlanmıştır. Bunlara ek olarak flavonoidlerin mikroorganizma ve böcek saldırılarına karşı koruyucu etkiye sahip olduğu da belirtilmiştir [3].

Antioksidatif etkileri: Sentetik antioksidanların kanserojenik etkileri olması nedeniyle doğal antioksidan özelliğe sahip flavonoidlere ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Flavonoidlerin, özellikle ker-

setinin, süperoksit ve hidroksil radikallerini ortadan kaldırdığı, lipid peroksit radikallerini indirgediği ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır [1]. Ayrıca DNA hasarı sonucu çıkan radikallerin antioksidanlar tarafından yakalanması ile flavonoidlerin antitümoral etki gösterdikleri de ileri sürülmektedir. *Eupatorium* türlerinde bulunan öpatin ve öpatortin ile *Centaurea* türlerinde bulunan sentaureidin ve 6 demetoksi sentaureidin, nazofrenksden alınan karsinomaya karşı orta derecede etkili olduğu bulunmuştur [2]. Antioksidan etkisi kanıtlanan flavonoidleri içeren besin maddelerinin başında yeşil çay, siyah çikolata, kırmızı şarap, çilek, ahududu, bögürtlen, brokoli gelmektedir.

P vitamini (biyoflavonoid) etkileri: Flavonoidler epinefrin metabolizması üzerine etki ederek ve C vitamininin etkisini uzatarak kapiller cidarının direncini artırır ve permeabilityyi azaltır. Bu alanda en çok bilinen flavonoidler, rutin ve hesperidindir. Rutin, *Sophora japonica* ve *Eucalyptus macroryncha*'da çok miktarda bulunurken, hesperidin ise *Pericarpium aurantii* ve *P. citri* gibi narenciye kabuklarında bulunur [2].

Diüretik etkileri: Bazı çalışmalarda flavonoidlerin diüretik etkilerinin permeabilityyi azaltmak suretiyle meydana geldiği ileri sürülmektedir [2]. Siyah ve yeşil çayın diüretik özelliğinde olduğu uzun yıllardır bilinmektedir [1].

Kardiyovasküler sistem üzerine etkileri: Flavonoidlerin damar genişletici etkileri de bulunmaktadır. Mirisetol, kersetol ve ramnetol kalp üzerine stimulan etki gösterirken hesperetol kalp depressanıdır. Biyoflavonoid taşıyan bitkiler olarak bilinen *Viburnum prunifolium*, *Juniperus communis*, *Ginkgo biloba*'de damar genişletici etki saptanmıştır [2].

Antidiyabetik ve hepatoprotektif etkileri: *Gentiana oliveri*'nin metanollü ekstresinin yüksek antidiyabetik aktivite gösterdiği ve aktiviteden sorumlu olan maddenin bir flavon C- heteroziti olan izoorientin olduğu belirlenmiştir [4, 5]. Deliorman Orhan ve ark. [6]'un yaptıkları çalışmada *G. oliveri*'nin antihepatotoksik özelliğinin olduğu kanıtlanmıştır.

Spazmolitik etkileri: Flavonoidlerin düz kaslar, gastrointestinal ve ürogenital sistem üzerinde spazmolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. *V. prunifolium*, *J. communis*, *G. biloba* biyoflavonoid taşıyan bitkiler olarak saptanmıştır [1].

Östrajenik etkileri: Genistein, daidzein ve biyokanin A, östrajenik aktiviteye sahip olan izoflavonlardır. *Medicago sativa*, *Trifolium repens*, *Lepidium capitatum* fitoöstrajen özellikli izoflavonları içermektedir [2].

Antimutajenik ve antimikrobiyal etkileri: Kersetol ile yapısı benzer olan 40 maddenin *Salmonella typhimurium*'a karşı mutajen etkileri araştırılmış ve kersetol, mirisetol, ramnetol gibi flavonoidlerin mutajen etkileri görülmüştür. Akne inflamasyonlarında önemli rol oynayan *Propionibacterium*lar üzerine yapılan bir çalışmada *S. japonica*'nın çiçek tomurcuklarından elde edilen ekstraktlarındaki etkili maddelerin flavonoid özelliğinde olduğu bulunmuştur [2]. Kersetin, morin, rutin apigenin hesperidin gibi birçok flavonoidin antiviral özelliği bulunmaktadır [1].

BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ

Bitki doku kültürü ile bitkilerin hücre, doku, organlarından kozmetik, farmasötik veya tarımsal açıdan önemli sekonder metabolitler üretilebilmektedir. Bu amaçla üretimin daha verimli, daha ucuz ve ürünün daha çok miktarda olması için gün geçtikçe yeni yöntemler keşfedilmektedir. Moleküler biyolojik araştırmalarla ürün verimini artırma, bir materyalden birden çok ürün alma veya genetik değiştirilmiş bitkilerden yeni ürünlerin kazanılması gibi metotlar geliştirilir. Bu metotlara göre güncellenen doku kültürü teknikleriyle üretilen doğal hammaddeler kullanılarak da yan etkisi olmayan "güvenli" ilaçlar elde edilebilir.

Bitki doku kültürü yöntemleri ile sekonder metabolit üretimi daha güvenilir, basit ve tahmin edilebilirdir. Normalde ana bitkide bulunmayan bileşiklerin de üretilebilmesine olanak sağlar. Politik, coğrafik ve mevsimsel engellerden bağımsız üretim yapılabilir. Karmaşık

bitki ekstraksiyonlarıyla karşılaştırıldığında fitokimyasalların izolasyonu daha çabuk ve etkili yapılabilir. Hücre kültürleriyle bitkinin kendisinden elde edilen fitokimyasalların miktarı karşılaştırıldığında hücre kültürlerinden çok daha fazla miktarda ürün elde edilebilir hatta üretim endüstriyel boyuta taşınabilir. Hücre kültüründe genetik uygulamalara yönelik işaretlemeler ve değişimler yapılabilir. Temel araştırmalara (örneğin metabolik ve biyokimyasal yolların anlaşılmasında) yol gösterici tayinler yapılabilir. Biyotransformasyon ile enzim sistemleri kullanılarak ucuz öncü moleküllerden yeni bileşikler elde edilebilir [7-9]. Tüm bu avantajların yanında sekonder metabolit üretiminde stabil olmayan hücre hatları, düşük verim, yavaş gelişme ve üretimi artırmada yaşanan sorunlar gibi çözülmesi gereken problemler de vardır [7].

Bitki hücre kültürleri sekonder metabolit üretimi için verimli bir yoldur. Fakat ürün verimini, kalitesini artırmak ve maliyeti düşürmek için bir takım yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu bölümde flavonoit üretimi açısından hücre kültürlerinde geliştirilen yöntemlerden en çok ilgi görenler anlatılacaktır.

Bitki Doku Kültürlerinde Sekonder Metabolit Üretimini Artırmak İçin Stratejiler

Üretici gücü yüksek hücre hatlarının taranması ve seçilmesi

Hücre hattı geliştirmek, istenen ürünün yüksek miktarda elde edilebildiği ana bitkinin seçimi, kallusu artırma ve kallustaki yüksek verimli hücrelerin gözlenmesi ile başlar. Sonra karışık populasyon arasından istenen ürünü en çok üreten hücre hatları taranır ve bu hücrelerle çalışmaya devam edilir.

Genetik yapıdan kaynaklanan çeşitlilik, yüksek verimli hücrelerin var olmasını sağlayabilir. Eğer istenen ürün pigment içeriyorsa seçim kolaylıkla yapılabilir. Örneğin *Lithospermum erythrorhizon* kültüründe şikonin üretiminde, taranan hücrelerden kırmızı renklilerin seçilmesiyle 13-20 kat fazla verim alınmıştır [10]. Klonal seçim ve görsel tarama ile antosiyanin üretiminin artırılması, *Euphorbia milli* ve

Daucus carota'da bildirilmiştir [11, 12]. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve radyo-immüno tayin (RIA) gibi diğer tekniklerle de yüksek verimli hücre hatları taranabilmektedir [13, 14]. Yüksek verimli hücre hatlarını gözlemek için geliştirilen mutasyon stratejisinde seçici ajanlar kullanılmıştır. Bu metot, fenilalanin analogu olan *p*-florofenilalanin (PFP) gibi bileşenler kullanılarak mutasyona uğratılmış hücrelerin stres şartları altında bile gelişebilmesi dolayısıyla dayanıklı hücrelerin seçilmesi esasına dayanır [15].

Ortam miktarlarının ve bileşenlerinin değiştirilmesi

Sükroz miktarı

Bitki hücre kültürleri genellikle heterotrofik olarak karbonu, basit şekerlerden (sükroz), inorganik maddeleri de diğer bileşenlerden karşılayarak gelişirler. Sükroz miktarı sekonder metabolit birikimi yapan kültürlerin üretkenliklerini etkilemektedir. *Aralia cordata* hücre süspaniyonunda %5 sükroz ile antosiyanin üretimi düşmüş, %3'te ise artmıştır [16].

Nitrat ve fosfat miktarı

Azot konsantrasyonunun hücre süspaniyon kültürlerinde, protein veya aminoasit ürünlerinin miktarında etkili olduğu bulunmuştur. Bitki doku kültürü ortamları olan Murashige ve Skoog (MS), Linsmaier ve Skoog (LS), Gamborg B5'te azot kaynağı olarak nitrat ve amonyum tuzları vardır. Bu tuzların miktarlarındaki değişiklikler, üretimi etkilemektedir. Örneğin, toplam azot miktarının artması *Vitis* türlerinde antosiyanin üretimini artırmıştır [17].

Fosfat konsantrasyonu bitki hücre kültürlerinde sekonder metabolit üretimi üzerinde etkili olmaktadır. Yüksek konsantrasyondaki fosfatın hücre gelişimini hızlandırdığı fakat fosfatça sınırlanmış ortamlarda sekonder ürünlerin birikiminin olumsuz etkilendiği bulunmuştur. Sasse ve ark. [18], azalan fosfat miktarının *Catharanthus roseus*'ta fenolik bileşiklerin üretiminin artmasına neden olduğunu bulmuşlardır.

Büyüme düzenleyiciler

Büyüme düzenleyiciler ve konsantrasyonları sekonder ürün birikiminde oldukça karmaşık role sahiptirler [19]. Oksin veya sitokininin çeşidi ve konsantrasyonu veya oksin/sitokinin oranı, kültüre alınmış bitki hücrelerinde gelişme ve ürün biçiminde dikkat çekici değişikliklere neden olur [20]. 2,4 Diklorofenoksi asetik asitin (2,4 D) birçok durumda sekonder metabolit üretimini inhibe ettiği görülmüştür. 2,4 D'nin ortamdan eliminasyonu veya Naftalen Asetik Asit (NAA) veya İndol Asetik Asit (IAA) ile değiştirilmesiyle *Populus* süspansiyonlarında antosiyanin üretiminin arttığı gözlenmiştir [21]. Buna karşılık *D. carota* süspansiyonlarında karotenoit biyosentezinde [22] ve *Oxalis linearis* kallus kültürlerinde antosiyanin üretiminde [23] 2,4 D'nin stimüle edici etkisi gözlenmiştir. Sitokininlerin etkisi metabolitin tipine ve incelenen türlere göre çeşitlilik gösterir. Kinetin, *Haplopappus gracilus*'ta antosiyanin üretimini artırırken *Populus* hücre kültürlerinde antosiyanin üretimini inhibe etmektedir [21, 22]. Gibberellik Asit (GA₃) ve Absisik Asitin (ABA) birçok hücre kültüründe antosiyanin üretimini engellediği bildirilmiştir [21].

Öncü molekül beslemesi

Bu yöntem, üretilmek istenen sekonder metabolitin biyosentez yolunun başlangıç veya ana ürünlerinden olan, yani ürünün öncüsü niteliğindeki bileşimin ortama eklenmesi mantığına dayanır. Bu sayede ürün miktarı artırılabilir. *Scutellaria baicalensis*'te yapılan bir çalışmada saçak kök kültürlerinde öncü molekül olarak L-fenilalanin kullanılmış ve flavonoid üretiminin artması sağlanmıştır [24]. Havuç kültürlerinde antosiyanin sentezi de ortama dihidrokersetin (naringen) eklenmesiyle artırılmıştır [25].

Kültür şartlarının optimizasyonu

Sıcaklık

Kültür hücrelerinin geliştirilmesi ve kallus dokularının artırılması için genellikle 17-25°C arasındaki sıcaklık değerleri uygulanır. Fakat her bitki türünün sıcaklık ihtiyacı farklı olabilir. Seo *et al.* [26], *S. baicalensis* hücre hatlarında, baikalin adlı flavonoidin üretiminin 30°C'de 2.9

g/l iken sıcaklık 25°C'ye düşürüldüğünde 72 saat sonra 4.2 g/l'ye yükseldiğini bulmuşlardır.

Aydınlatma

Yüksek şiddette aydınlatma sağlandığında antosiyanin ve türevlerinin üretiminin dikkate değer biçimde arttığı birçok çalışmada vurgulanmıştır. *Daucus carota* ve *Vitis* hibritlerinin hücre kültürlerinde ışığın antosiyanin üretimini artırdığı bulunmuştur [21]. Zhang *ve ark.* [27], yaptıkları çalışmada 8000-8300 lüks değerinde ışık şiddeti uyguladıkları *Vitis vinifera* süspansiyon kültürlerinde antosiyanin üretiminin kontrole göre 4.8 kat arttığını göstermişlerdir. Fedoreyev *ve ark.* [28], *Maackia amurensis*'in kallus kültürlerinde izoflavonoidlerin üretimini artırmak için inkübasyonu karanlıkta gerçekleştirmişlerdir. Aynı şekilde Kuzovkina *ve ark.* [24] wogonin, baikalin ve baikalin üretimin için *S. baicalensis* süspansiyon kültürlerinin inkübasyonunu karanlıkta gerçekleştirmişlerdir.

Çalkalama

Bu faktör genellikle süspansiyon kültürlerinde ve üretimi büyütülmekte olan kültürlerde önemlidir. Sıvı kültür içinde homojen dağılımı sağlamak amacıyla orbital çalkalama yapılır. Çalkalamada önemli olan nokta, hassas olan hücrelerin çalkalama direncine karşı koyabileceği bir değer bulunmasıdır. Bu değer genellikle 90-100 rpm arasında olmaktadır [24, 29, 30].

Uyarma (Elisidasyon)

Bitki hücre kültürlerinde sekonder metabolit üretimini artırmak, aynı zamanda yüksek konsantrasyonlarda üretimi kısa sürede sağlamak amacıyla biyotik ve abiyotik elisitörler kullanılır [31]. Fungal, bakteriyel ve maya kaynaklı biyotik elisitörler ile polisakaritler, glikoproteinler, inaktif enzimler, saflaştırılmış kurdan (bir tür polimer), ksantan ve kitosan, ağır metal tuzları gibi abiyotik elisitörler, çeşitli sekonder metabolitlerin üretiminde kullanılmıştır [32-34]. Elisitör olarak araşidonik asitin kullanıldığı bir çalışmada *Ononis arvensis* süspansiyon kültürlerinde 24 saat sonunda flavonoid miktarının %490 oranında arttığı gözlenmiştir [35]. Yine *O. arvensis*'te *Pseudomonas aeruginosa* bak-

terisinin ölü hücreleri elisitör olarak kullanılmış ve flavonoit üretiminde; kallus kültürlerinde 7 günlük elisitör uygulamasıyla %83; süspansiyon kültürlerinde 48 saat elisitör uygulamasıyla da %125 oranında artma tespit edilmiştir [36].

Permeabilizasyon

Genelde bitki hücre kültürlerinde üretilen metabolitler hücre içinde ve vakuollerde depolanırlar. Ürünün vakuolden bitki hücresinin dışına salınması için tonoplast, plazma membranından oluşan iki membran bariyerinin ve hücre çeperinin aşılması gereklidir. Hücre geçirgenliği bitki hücresinin membran sistemindeki çeşitli moleküllerin hücre içine giriş çıkışını sağlayan por oluşumlarına bağlıdır. İzopropanol, dimetil sülfoksit (DMSO) ve kitosan benzeri polisakkaritler permeabilize ajanlar olarak kullanılırlar [37]. Ultrasonikasyon, elektroporasyon ve iyonoforetik salınım gibi düşük akım kaynaklı araçlar, diğer permeabilize edici ajanlar olarak kullanılmıştır [38]. Ayrıca yüksek akımlı elektrik alanları ve çok yüksek basınç sekonder metabolit salınımı için kullanılmıştır [39]. Bourgaud *et al.* [29], *Psoralea* saçak kök kültüründe flavonoit üretimi için elisitör ve permeabilize edici ajan olarak kitosan kullanmışlardır.

FLAVONOİTLERİN BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ YOLUYLA ÜRETİLMESİ

Kallus Kültürü

Kallus kültüründen flavonoit üretimi diğer yollara göre daha sıklıkla yapılmaktadır. Yeni çalışmalarla kallus kültürlerindeki madde miktarları, büyüme düzenleyici, uyarıcı veya öncü maddelerin katılması ve besin düzenlemeleri ile normal bitkidekilere göre artırılabilir [40-42]. Madhavi *et al.* [40], *Vaccinium myrtillus* bitkisinin meyvelerinden ve hipokotil kaynaklı kallus kültürlerinden biyoaktif bileşikler izole etmişlerdir. Kallus kültürü B5 besin ortamı değiştirilerek yapılmış ve büyüme düzenleyici olarak da NAA, 2,4 D, kinetin ve polivinilpirolidon (PVP) kullanmıştır. Major bileşikler olarak siyanin ve proantosiyenin bileşiklerini elde etmişler ve meyvel-

erde antosiyenin miktarını 27.3 mg/g (kuru hücre ağırlığı) bulurken kalluslarda bu miktarı 0.08 mg/g olarak bulmuşlardır. Dias *et al.* [41] *Hypericum perforatum* var. *angustifolium* gövde parçalarını NAA ve Kinetin içeren MS ortamında ekmiş ve kallus elde etmişlerdir. Kalluslarda yeni bir doğal flavonoit olan 6-C-prenil luteolin ile diğer luteolin türevlerini izole etmişlerdir. Bitkiden elde edilen ekstraktlarda toplam flavonoit miktarı 14-70 mg/g iken kallus kültürlerinde 0.05-0.7 mg/g gibi çok düşük bir miktar bulunmuştur. Fedoreyev *et al.* [28], *M. amurensis*'in yaprak sapı, çiçek durumu, yaprak ve apikal meristemlerinden aldıkları eksplantlardan kallus geliştirmişler ve kallus ekstraksiyonu ile izoflavonoit analizi yapmışlardır. Kültürlerde izoflavonoitlerden daidzein, retuzin, genistein, formononetin ve pterokarpanlardan maakianin ve medikarpine rastlamışlardır. Kalluslardaki izoflavonoit ve pterokarpinlerin toplam miktarı 20.8 mg/g olarak tespit edilmiştir, bu da bitkidekinden 4 kat fazladır. Budzianowski *et al.* [42] ise *Drosophyllum lusitanicum* gövde eksplantlarını kinetin içeren MS ortamına ekmişler ve elde ettikleri sürgün ve kallus kültürlerinde flavonoitleri ve flavon C-heterozitlerden viteksin, izoviteksin, orientin, izoorientini analiz etmişlerdir. Sürgün kültürlerinde sonuçları 57 g yaş hücrede 0.8 mg viteksin, 1.8 mg izoviteksin, 0.4 mg orientin, 1.4 mg izoorientin olarak bulmuşlardır.

Süspansiyon Kültürü

Süspansiyon kültürüne geçmek için stabil ve optimize edilmiş kallus kültürleri kullanılır. Elde edilen kalluslar cam erlenler içindeki sıvı ortama aşılır ve orbital çalkalamalı inkübatörlerde geliştirilirler. Bir sonraki aşama ise, süspansiyonları spesifik biyoreaktörlere transfer etmektir (Tablo 1). Monache *et al.* [43] flavonoit elde etmek için *Maclura pomifera*'nın kallus ve hücre kültürlerini yapmışlardır. Bitkinin köklerinde %0.26, yapraklarında %0.32, meyvelerinde %0.08 olarak bulunan flavonoit miktarı hücre süspansiyon kültürlerinde %0.91'e kadar artırmışlardır. Zhang *et al.* [27] *V. vinifera* hücre hattından alınan hücreleri NAA ve Kinetin içeren sıvı B5 besin ortamına aktarmışlar ve süspansiyon kültürüyle antosi-

Çizelge 1. Farklı bitkilerde, çeşitli flavonoidlerin kallus ve süspansiyon kültürü yoluyla üretimi. (K- Kallus kültürü, SK- Süspansiyon kültürü) [8]

Kaynak bitki	Sekonder metabolit	Kültür çeşidi
<i>Dimorphothica auriculata</i>	(Siyanidin, Delfinidin)	K
<i>Phaseolus aureus</i>	Daidzein, 2',4',4'- trihidroksi kalkon	K, SK
	Daidzein	K, SK
<i>Glycine max</i>	Apigenin	SK
	Kemferol	K
<i>Agave wightii</i>	Kemferol, Kersetin	K
<i>Citrus sp.</i>	Sinensetin, Naringin, Limonin, Nobeletin	K

yanin üretmişlerdir. Kültür ortamına kattıkları jasmonik asit ve uyguladıkları fotoperiyodun hücre gelişimini azalttığını buna karşılık antosiyanin üretimini artırdığını bulmuşlardır. Shibasaki-Kitakawa *et al.* [30] çay bitkisinin tohumlarından elde ettikleri kallusları Kinetin ve 2,4 D içeren sıvı B5 besin ortamına aktararak süspansiyon kültürü yapmışlardır. Kültür sonucunda kateşin ve epikateşin türevlerinden oluşan flavonoid miktarını 150 mg/g olarak bulmuşlar bu değer de kontrol bitkisindeki göre yaklaşık 7 kat fazla olduğunu vurgulamışlardır.

Saçak Kök Kültürü

Agrobacterium rhizogenes'in kültürde, kalluslardan saçak kök oluşturma yeteneği sayesinde kök kaynaklı bileşiklerin üretimi daha kolay ve hızlı yapılabilmektedir [44]. Tepfer [45], 30 dikotil familyaya ait 116 bitkide bu bakteri ile saçak kök oluşumunu çalışmıştır. *A. rhizogenes* plazmidindeki T-DNA'nın konuk dokuya aktarılmasıyla, bakteriyel DNA'da bulunan oksin sentez genleri konukçu dokuda okunur ve bunun sonucunda da kallusta çok miktarda kök oluşumu ortaya çıkar [46]. Saçak köklerin tercih edilmesinin nedeni, dıştan herhangi bir oksin kaynağına ihtiyaç duyulmadan hızlı gelişimin sağlanmasıdır. İnkübasyon için çoğunlukla ışığa ihtiyaç duyulmaz. Genetik stabilitelere ilaveten metabolit verimi de oldukça stabildir. Tüm bu avantajlar nedeniyle hücre kültürü için uygun olmadığı düşünülen birçok kök kaynaklı bitki ürünü, saçak kök kültürü teknolojisiyle üretim için kullanılmıştır [7].

İstenen şekilde düzenlenmiş Ri plazmid (vektör) sayesinde, saçak kökün genomik DNA'sının değiştirilebilmesi yani gen aktarımı

yeni bileşiklerin üretiminde çok büyük bir kullanım alanı oluşturmuştur. Bu sistemi kullanarak, tek tip saçak kökten birden fazla ürün alınabilecektir. Bu tür yaklaşımlar saçak köklerin yeni bileşikleri üretmesini teşvik eder ve hızlandırır. En önemlisi de bu bileşiklerin *in vivo* koşullardaki bitkilerden elde edilenlere oranla *in vitro* gelişme döngüsüne sahip kültürlerde çok daha kısa sürede yapılabilmesidir [7]. Saçak kök ve organ kültürlerinde gelişen hücreleri süspansiyon kültürlerine ve biyoreaktörlere aktarmada sorunlar yaşanmasına rağmen yine de bu yönde yapılan çalışmalar bulunmaktadır [47]. Kuzovkina *et al.* [24], *S. baicalensis* saçak kök kültürlerinde besin ortamı olarak B5 sıvı besin ortamı, öncü molekül olarak L-fenilalanin, elisitör olarak da metil jasmonat kullanarak wogonin, baikalein ve baikalin üretimi 2.3 kat artırmışlardır. Bourgaud *et al.* [29] ise *Psoralea* saçak kök kültürlerini B5 sıvı besin ortamında geliştirmiş ve saçak köklerden daidzein ve benzeri flavonoidleri üretmişlerdir.

Bitki Hücrelerinin İmmobilizasyonu (Tutuklanması)

Hücre kültürlerinden sekonder metabolit üretimindeki gelişme, bitki hücrelerinin organizasyonu ve farklılaşmasıyla ilişkilidir. İmmobilizasyon, katalitik aktifliğe sahip hücre veya enzimlerin bir destek üzerinde tutuklanması ve bu sistemden sıvı fazın geçirilmesi üzerine kurulmuştur [48, 49]. İmmobilize bitki hücreleri, istenilen ürünlerin, öncü moleküllerden, tek veya birçok basamaklı biyodönüşümünde kullanılır. Brodelius *et al.* [50]'nin *Cataranthus roseus*, *Morinda citrifolia* ve *Digitalis lanata* bitkilerinin doku kültürü ile

üretilebilir canlı hücrelerini kalsiyum aljinat jelde tutuklaması dikkatleri bu teknığe çekmiştir.

İmmobilize bitki hücreleri, immobilize enzimlere göre daha avantajlıdır. İmmobilize enzimler için uygun pH, reaksiyon karışımının sıcaklığı ve kofaktör beslemesi gereklidir. İmmobilize enzimler genellikle tek basamakta ürün verirler ve organizmadan izole edilirken aktivitelerinde azalma olur. Bunlara karşın immobilize hücreler; çoklu enzim reaksiyonları gerçekleştirilebilirler. Yüksek biyosentetik aktiviteye sahip hücreler seçilirse katalitik aktivite hızlandırılabilir, hücreler üretebildikleri sürece, kofaktöre ihtiyaç duyulmaz. İmmobilize hücreler, immobilize enzimlere göre daha kolay elde edilirler.

Kullanılan genel teknik, hücrelerin, etraflarında polimerize olabilen jel veya jel kombinasyonları ile tutuklanmasıdır [51]. Kalsiyum aljinat en çok kullanılan matrikstir. Agar, agaroz, karregan ve poliakrilamid de matriks olarak kullanılan jellerdir [52]. Aljinat jelleri, toksik olmaması ve basitliği nedeniyle en geniş kullanıma sahip jellerdir. Diğer bir alternatif destek poliüretan köpük ve içi boş fibril membranlardır. Fenolik maddelerden olan flavonoidlerin, immobilize hücre kültürü tekniğiyle üretimiyle ilgili çalışmalar oldukça yenidir. *Glycine max* ve *Petunia hybrida*'da fenolik maddelerin üretimi için öncü molekül olarak sükröz, immobilizasyon yöntemi olarak da içi boş fibriller kullanılmıştır [7].

Sekonder Metabolit Üretimi İçin

Biyodönüşüm

Biyodönüşüm tıpkı mikroorganizmalarla gerçekleşen fermentasyon olayları gibi bitki hücre ve kısımlarını kullanarak substratların belli maddelere dönüştürülmesidir. Biyodönüşüm, istenilen sekonder metabolitin bitki hücre kültürlerinde elisitörlerle bile oluşturulmadığı ve kimyasal olarak sentezinin zor ve pahalı olduğu durumlarda uygulanılabilecek alternatif bir yoldur. Kültüre alınan bitki hücreleri, dışardan eklenen substratları, istenen ürüne veya yeni bir ürüne stereo ve regiospesifik (yer seçici) olarak dönüştürebilme yeteneğindedirler. Eklenen bu substratların doğal olmasına gerek yok-

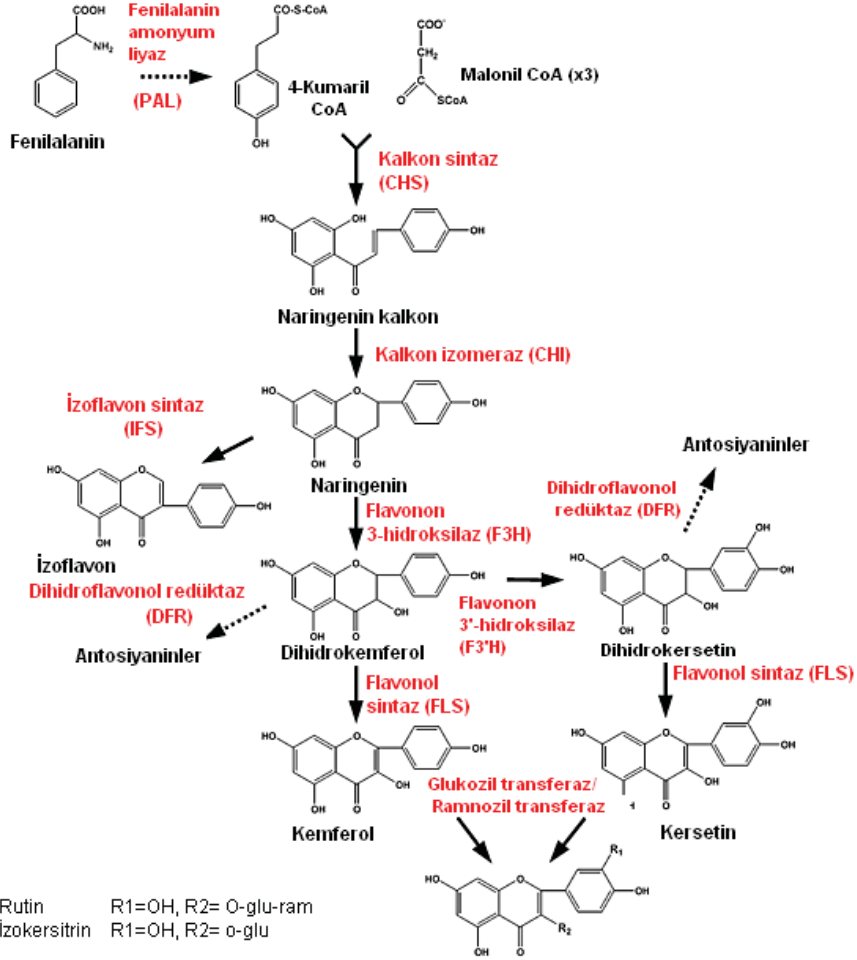
tur; sentetik orijinli de olabilirler. Yarı sentetik bir tatlandırıcı olan ve gıda, içecek, farmasötik, hayvan yemi teknolojilerinde kullanılan neohesperidin dihidrokalkonun (NHDC) şu andaki üretim şekli hesperetin adlı flavonoidi substrat olarak kullanan yöntemdir. Fakat hesperetin ancak yenilemeyen turunçgillerden elde edilebildiğinden üretimde sınırlayıcı bir etkiye neden olmaktadır. Kimyasal üretime alternatif olarak, portakal suyu fabrikalarından toplanan kabuklardan elde edilen hesperetin hidroliziyle neohesperidine dönüştürülmesi için genetik düzenlenmiş bitki hücreleri kullanılmıştır [53].

Biyoreaktörler

Flavonoid üretiminde büyük çapta üretim yapmak için biyoreaktör kullanımı yaygın değildir. Çünkü flavonoid üretimi için süspansiyon kültürlerinden biyoreaktörlere aktarılan hücreler oldukça hassaslaşmaktadır. Ayrıca farklı çeşitlerde biyoreaktör tasarımları yapılması gerektiği için de maliyet yüksek olmaktadır. Günümüzde flavonoid üretimi için yapılan tek ticari üretimde *Panax ginseng* kökleri ve biyoreaktör kullanılmış, 75 tona kadar ürün alınabilmiştir [7, 54].

Metabolik Mühendisliği

Flavonoid biyosentez yolundaki enzimlerin bilinmesi ve izolasyonlarının yapılması, istenen flavonoidin genetik işlemlerle üretilmesinde çok büyük avantaj sağlamaktadır. Florigene Ltd ve Suntory Ltd adlı şirketler doğal olarak oluşmayan delfinidin türevlerini üreten genleri aktararak eflatun çiçekli transgenik karanfil (*Dianthus*) geliştirmişlerdir. Bunu flavonoid sentez yolunda iş gören dihidroflavonol redüktaz (DFR) ve flavonon 3'-hidroksilaz (F3'H) genlerini bloklayarak başarmışlardır [55] (Şekil 1). Takashi ve ark. [56] *Gentiana scabra*'nın çiçek renginin kendiliğinden mutasyona uğrayarak pembeden eflatuna dönüştüğü moleküler araştırmalarla kanıtlamışlardır. Mutasyonun delfinidin adlı antosiyanin türevinin oluşumunu sağlayan flavonon 3',5'-hidroksilaz (F3'5'H) adlı enzimde olduğunu kanıtlamışlardır. Flavonon 3',5'-hidroksilaz (F3'5'H) enziminin genine yerleştirilen iki farklı transpozon el-



Şekil1. Flavonoid biyosentez yolu ve bu yolda iş gören enzimler [58]

ementiyle bu enzimin aktivasyonu bozulmuş ve bu yolun katalizlenmesi önlenmiştir. Sonuç olarak delfinidinün üretilmediği, buna karşılık pembe rengi veren siyanidinün üretilmediği gösterilmiştir (Şekil 1). *Petunia*'dan izole edilen kalkon izomeraz (CHS) geninin domatese aktarılmasıyla kemferol ve kersetol adlı flavonoidlerin domatesteki miktarları %70 oranında artırılmıştır. Böylece ve antioksidan özellikteki flavonoidlerin domatesteki miktarı ve besinsel değeri artmaktadır. Birçok bitkide beyaz renkli steril polenlerin oluşumunun flavonoid metabolizmasındaki genlerin mutasyonu sonucu olduğu belirlenmiştir. Sonuçta sterilitenin flavonoid takviyesiyle azaltılabileceği fikri ortaya çıkmıştır [57].

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Görüldüğü gibi sekonder metabolit üretimi konusunda bitki doku kültüründen doğrudan veya dolaylı olarak yararlanılan çok miktarda çalışma vardır. Çalışmaların bir kısmında deneysel aşama bitirilmiş, ticari üretime geçilmiştir [7, 9, 47]. Flavonoid üretiminde kallus, süspansiyon ve biyoreaktör yöntemi ile çok başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu tip çalışmaların çoğalması, tarım alanlarındaki kısıtlanma, aşırı toplanmayla yok olma ve mevsimlere bağlı kalma gibi pek çok dezavantajı ortadan kaldırmaktadır. Günümüzde dünya nüfusunun artışı ile yerleşimin artması sonucunda ekim alanlarının kısıtlanması ve besin

kıtlıklarının yaşanması, iklimsel değişiklikler nedeniyle çeşitli canlıların nesillerinin yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalması bilim insanlarının bu tür çalışmalara ağırlık vermesini gerektirmiştir. Son yüzyılda büyük ilerleme kaydeden, birçok bilim dalının ortaklaşa çalıştığı biyoteknoloji bilimi, hem besinsel kıtlığa hem de türlerin korunmasına çok parlak çözümler vaat etmektedir. Örneğin tarım alanlarının az olduğu bölgelerde, biyoteknoloji yolu ile besin ve vitamin değerleri diğer pirinçlere göre artırılmış olan “altın pirinç”i yetiştirmek oldukça cazip bir yöntemdir. Bitki biyoteknolojisi ile bitkiler çoğaltılabilir (klonlama), bitkilere yeni özellikler eklenebilir (transgenik bitkiler-Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar-GDO) veya ilaç hammaddesi sağlamak için bitki hücreleri ve metabolizması tıpkı bir fabrika gibi kullanılabilir. Bunlara ek olarak, çoğaltılan bitkiler, embriyolar veya tohumlar dondurarak saklama işlemleriyle gelecek nesillere aktarılabilir. Tüm bu avantajlara rağmen biyoteknolojide özellikle gen aktarma işlemlerinde henüz açıklığa kavuşmamış bazı noktalar bulunmaktadır. Bu nedenle gen aktarma işlemleri yapılmaksızın doğal yollarla biyoteknolojiyi birleştirerek çalışmak günümüzde yapılacak en doğru yol olarak görünmektedir. Örneğin gen aktarımını yapmadan öncü molekül beslemesi, besin ortamının içeriğinin değiştirilmesi, inkübasyon şartlarının optimize edilmesi gibi birçok yol denenerek ürün verimi artırılmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Bilaloğlu GV ve Harmandar M. 1999. Flavonoidler. Aktif Yayınevi, İstanbul.
- [2] Şener B ve Toker G. 1986. Flavonoidlerin Eczacılık Yönünden Önemi. Mar. Üniv. Ecz. Der., 2(2):169-183.
- [3] Taylor LP and Grotewold E. 2005. Flavonoids as developmental regulators. *Current Opinion in Plant Biology*, 8:317-323.
- [4] Aslan M. 2000. Şeker Hastalığına Karşı Halk İlacı Olarak Kullanılan Bitkiler Üzerinde Farmakognozok Araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara.
- [5] Sezik E, Aslan M, Yesilada E and Ito S. 2005. Hypoglycaemic Activity of *Gentiana olivieri* and Isolation of the Active Constituent through Bioassay-directed Fractionation Techniques. *Life Sciences*, 76:1223-1238.
- [6] Deliorman Orhan D, Aslan M, Aktay G, Ergun E, Yesilada E and Ergun F. 2003. Evaluation of Hepatoprotective Effect of *Gentiana olivieri* Herbs on Subacute Administration and Isolation of Active Principle. *Life Sciences*, 72:2273-2283.
- [7] Ramachandra Rao S and Ravishankar GA. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.*, 20:101-153.
- [8] Razdan MK. 2003. Introduction to Plant Tissue Culture. Science Publishers, India.
- [9] Lila MA. 2005. Valuable secondary products from in vitro culture. In: *Plant Development and Biotechnology* (ed. Trigiano RN and Gray D), pp. 285-289. CRC Press, Oxford, UK.
- [10] Fujita Y, Takahashi S and Yamada Y. 1984. Selection of cell lines with high productivity of shikonin derivatives through protoplasts of *Lithospermum erythrorhizon*. *Proc Euro Congr Biotechnol* (3rd), 1:161-166.
- [11] Dougall DK. 1980. Nutrition and metabolism. In: *Plant tissue culture as a source of biochemicals* (ed. Staba E), pp. 21-58. CRC Press, Boca Raton, FL.
- [12] Yamamoto T, Mizuguchi R and Yamada Y. 1982. Selection of a high stable pigment producing strain in cultured *Euphorbia milli* cells. *Theor Appl Genet*, 16:113-116.
- [13] Zenk MH. 1978. The impact of plant cell cultures on industry. In: *Frontiers of plant tissue culture* (ed. Thorpe EA), pp. 1-14.

- The International Association of Plant Tissue Culture, Calgary.
- [14] Matsumoto T, Ikeda T, Kano N, Kisaki T and Noguchi M. 1980. Selection of high ubiquinone 10-producing strain of tobacco cultures by cell cloning technique. *Agric Biol Chem*, 44:967–969.
- [15] Rhodes MJC, Hamil J, Parr AJ, Robins RJ and Walton NJ. 1988. Manipulating secondary metabolism in culture (ed. Robins RJ and Rhodes MJC), pp. 83–93. Cambridge Univ. Press, Oxford.
- [16] Sakamoto K, Iida K, Sawamura K, Hajiro K, Asada Y, Yoshikawa T and Furuya T. 1993. Effects of nutrients on anthocyanin production in cultured cells of *Aralia cordata*. *Phytochemicals*, 33:357–360.
- [17] Yamakawa T, Kato S, Ishida K, Kodama T and Minoda Y. 1983. Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension culture. *Agric Biol Chem*, 47:2185–2191.
- [18] Sasse F, Knobloch K and Berlin J. 1982. Induction of secondary metabolism in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum* and *Peganum harmala*. In: Proceedings of the 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture (ed. Fujiwara A), pp. 343–344. Abe Photo Printing, Tokyo.
- [19] DiCosmo F and Towers GHN. 1984. Stress and secondary metabolism in cultured plant cells. In: Recent advances in phytochemistry (ed. Timmerman BN, Steelink FA and Loewus FA), vol. 18, pp. 97–175. Plenum, New York.
- [20] Mantell SH and Smith H. 1984. Cultural factors that influence secondary metabolite accumulation in plant cell and tissue cultures. In: Plant Biotechnology (ed. Mantell SH and Smith H), pp. 75–108. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- [21] Seitz HU and Hinderer W. 1988. Anthocyanins. In: Cell culture and somatic cell genetics of plants (ed. Constabel F and Vasil I), vol. 5, pp. 49–76. Academic Press, San Diego.
- [22] Mok MC, Gabelman WH and Skoog F. 1976. Carotenoid synthesis in tissue cultures of *Daucus carota*. *J Am Soc Hortic Sci*, 101:442–449.
- [23] Meyer HJ and van Staden J. 1995. The in vitro production of an anthocyanin from callus cultures of *Oxalis linearis*. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 40:55–58.
- [24] Kuzovkina IN, Guseva AV, Alterman IE and Karnachuk RA. 2001. Flavonoid Production in Transformed *Scutellaria baicalensis* Roots and Ways of Its Regulation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48(4): 448–452.
- [25] Mulder-Krieger T, Verpoorte R, Svendse A and Scheffer J. 1988. Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures: A review. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 13:85–114.
- [26] Seo WT, Park YH and Choe TB. 1993. Identification and production of flavonoids in a cell suspension culture of *Scutellaria baicalensis* G. *Plant Cell Reports*, 12(7-8):414-417.
- [27] Zhang W, Curtin C, Kikuchi M and 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.
- [28] Fedoreyev SA, Pokushalova TV, Veselova MV, Glebko LI, Kulesh NI, Muzarok TI, Seletskaya LD, Bulgakov VP and Zhuravlev YuN. 2000. Isoflavonoid production by callus cultures of *Maackia amurensis*. *Fitoterapia*, 71(4):365-372.
- [29] Bourgaud F, Bouque V and Guckert A. 1999. Production of flavonoids by *Psoralea hairy* root cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 56:97–104.

- [30] Shibasaki-Kitakawa N, Takeishi J and Yonemoto T. 2003. Improvement of catechin productivity in suspension cultures of tea callus cells. *Biotechnol. Prog.*, 19:655–668.
- [31] Barz W, Daniel S, Hinderer W, Jaques U, Kessmann H, Koster J and Tiemann K. 1988. Elicitation and metabolism of phytoalexins in plant cell cultures. In: *Plant cell biotechnology* (ed. Pais M, Mavituna F and Novais J), pp. 211–230. NATO ASI Series, Springer-Verlag, Berlin.
- [32] Guo YG, Li HJ, Cai YX, Zhong Y and Peng ZY. 1992. Studies on the production of secondary metabolites in plant cell cultures. In: *Biochemical engineering for 2001* (ed. Furusaki S, Endo I and Matsuno R), pp. 242–245. Springer-Verlag, Tokyo.
- [33] Rajendran L, Suvarnalatha G, Ravishankar GA and Venkataraman LV. 1994. Enhancement of anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* L. under influence of fungal elicitors. *Appl Microbiol Biotechnol*, 42:227–231.
- [34] Ramachandra Rao S, Sarada R and Ravishankar GA. 1996b. Phycocyanin, a new elicitor of capsaicin and anthocyanin accumulation in plant cell cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*, 46:619–621.
- [35] Tumova L, Gallova K, Tuma J and Dolejsova J. 2002. Arachidonic acid as elicitor of flavonoid accumulation in *Ononis arvensis* L. culture *in vitro*. *Acta Pharm*, 52:299–304.
- [36] Tumova L. 1999. The effect of elicitors from *Pseudomonas aeruginosa* on the production of flavonoids in cultures of *Ononis arvensis* L. *Ceska Slov Farm*, 48(6):262-264.
- [37] Van Uden W, Pras N and Malingre THM. 1990. On the improvement of the podophyllotoxin production by phenylpropanoid precursor feeding to cell cultures of *Podophyllum hexandrum* Royle. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 23:217–224.
- [38] Brodelius P. 1988b. Permeabilization of plant cells for release of intracellularly stored products: viability studies. *Appl Microbiol Biotechnol*, 27:561–566.
- [39] Dornenburg H and Knorr D. 1993. Cellular permeabilization of cultured tissues by high electric field pulses or ultra high pressure for the recovery of secondary metabolites. *Food Biotechnol*, 7:35–48.
- [40] Madhavi DL, Bomser J, Smith MAL and Singletary K. 1998. Isolation of bioactive constituents from *Vaccinium myrtillus* (bilberry) fruits and cell cultures. *Plant Sci*, 131:95–103.
- [41] Dias ACP, Tomas-Barberan FA, Fernandes-Ferreira M and Ferreres F. 1998. Unusual Flavonoids Produced by Callus of *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry*, 48(7):1165-1168.
- [42] Budzianowski J, Budzianowska A and Kromer K. 2002. Naphthalene glucoside and other phenolics from the shoot and callus cultures of *Drosophyllum lusitanicum*. *Phytochemistry*, 61:421–425.
- [43] Monache GD, De Rosa MC, Scurria R, Vitali A, Cuteri A, Onacelli B, Pasqua G and Botta B. 1995. Comparison between metabolite productions in cell culture and in whole plant of *Maclura pomifera*. *Phytochemistry*, 39:575–580.
- [44] Flores HE, Vivanco JM and Loyola-Vargas M. 1999. Radicle biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends Plant Sci*, 4:220–226.
- [45] Tepfer D. 1990. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. *Physiol Plant*, 79:14–16.
- [46] Ambros PF, Matzke AJM and Matzyke MA. 1986. Localization of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in plant chromo-

- somes by in situ hybridization. *EMBO J*, 5:2073–2077.
- [47] Verpoorte R, Contin A and Memelink J. 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1:13–25.
- [48] Lindsey K and Yeoman MM. 1985. Immobilized plant cells. In: *Plant cell culture technology* (ed. Yeoman MM), pp. 229–267. Springer-Verlag, Berlin.
- [49] Yeoman MM, Holden MA, Corchet P, Holden PR, Goy JG and Hobbs MC. 1990. Exploitation of disorganized plant cultures for the production of secondary metabolites. In: *Secondary products from plant tissue culture* (ed. Charlwood BV and Rhodes MJC), pp. 139–166. Clarendon Press, Oxford.
- [50] Brodelius P, Deus B, Mosbach K and Zenk MH. 1979. Immobilized plant cells for the production of natural products. *FEBS Lett*, 103:93–97.
- [51] Novais J. 1988. Methods of immobilization of plant cells. In: *Plant cell biotechnology* (ed. Pais M, Mavituna F, Novais J), pp. 353–363. NATO ASI Series, Springer, New York.
- [52] Nilsson K, Birnbaum S, Flygare S, Linse L, Schroder U, Jeppsson U, Larsson P, Mosbach K and Brodelius P. 1983. A general method for the immobilization of cells with preserved viability. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 17:319–326.
- [53] Frydman A, Weisshaus O, Huhman DV, Sumner LW, Bar-Peled M, Lewinsohn E, Fluhr R, Gressel J and Eyal Y. 2005. Metabolic engineering of plant cells for biotransformation of hesperedin into neohesperidin, a substrate for production of the low-calorie sweetener and flavor enhancer NHDC. *J Agric Food Chem*, 53(25):9708-9712.
- [54] Jedinak A, Faragó J, Pšenáková I and Maliar T. 2004. Approaches to flavonoid production in plant tissue cultures. *Biologia Bratislava*, 59(6):697-710.
- [55] Florigene Pty Ltd. 2006. Web sitesi. <http://www.florigene.com/>. Erişim tarihi: 03.12.2006
- [56] Takashi N, Masahiro N, Keiichiro M, Hiroshi H and Saburo Y. 2005. Two different transposable elements inserted in flavonoid 3',5'-hydroxylase gene contribute to pink flower coloration in *Gentiana scabra*. *Molecular Genetics and Genomics*, 275:231–241.
- [57] Forkmann G and Martens S. 2001. Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology*, 12 (2):155-160.
- [58] Biology. 2006. Web sitesi. <http://www.chem.uwec.edu/Webpapers2005/obrae/Pages/Biology/page3.html>. Erişim tarihi: 05.12.2006.