



# Farklı Bitki Türlerinden Bitki Doku Kültürü Teknikleriyle Flavonoidlerin Üretimi

## *Production of Flavonoids by Plant Tissue Culture Techniques in From Different Plant Species*

Tayfun Aktaş<sup>\*</sup> , Hatice Çölgeçen

Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zonguldak, Türkiye

### Öz

Flavonoidler sağlık ve gıda alanlarında kullanılan fenolik bileşiklerdir. Bitkilerdeki flavonoidlerin üretimi bitki doku kültürü çalışmalarıyla arttırılmaktadır. Bu çalışmada, flavonoidlerin tanımı, önemi ve çeşitleri hakkında kısaca bilgi verilmiştir. Ayrıca bitki doku kültürü teknikleriyle flavonoidlerin üretimi örneklerle açıklanmıştır. Kallus kültürü, hücre süspansiyon kültürü, saçak kök kültürü ve biyoreaktörle flavonoidlerin üretimi çalışmalarından bahsedilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Bitki doku kültürü, Fabaceae, Flavonoid

### Abstract

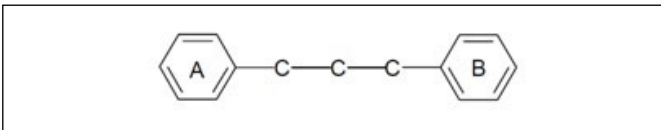
Flavonoids are phenolic compounds in healthcare and food areas. Production of flavonoids in plants are provided with plant tissue culture studies. In this study, brief information was given about the definition, importance and varieties of flavonoids. Furthermore production of flavonoids with plant tissue culture techniques were explained with examples. Studies on callus culture, cell suspension culture, hairy root culture and production of flavonoids with bioreactor were mentioned.

**Keywords:** Plant tissue culture, Fabaceae, Flavonoid

## 1. Giriş

### 1.1. Flavonoid Nedir?

Sarı renkli oldukları için latince sarı anlamına gelen flavus sözcüğünden türetilerek flavonoid adını almışlardır. 15 C atomlu 2-fenil benzopiron (difenil propan) yapısı (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) gösterirler ve polifenolik bileşikler olarak bilinirler (Kahraman vd. 2002). Flavonoidlere bitkinin çiçek, yaprak, kök, gövde, meyve ve tohum gibi bütün organlarında rastlanır (Işık 2005). Ayrıca flavonoidler 1930 yılına kadar vitaminlerin bir kolu (P vitaminleri) olarak düşünülürken şimdilerde vitamin olmadığı anlaşılmış ve yepyeni bir sınıf olarak çalışılmaktadır (Kumar ve Pandey 2013).



**Şekil 1.** Genel flavonoid iskeleti (Işık 2005).

### 1.2. Bitkilerde Flavonoidlerin Görevleri

Birçok çiçeğin ve meyvenin renginin oluşmasında, polinatör çekiminde (pelargonidinler, siyanidinler, delfinidinler), bitkiyi UV-A ve UV-B ışınımından korumada (kempferol), enzim inhibitörü, antioksidan vb. olaylarda rol alırlar. Yaralanma, kuraklık, metal ve açlık stresinde sentezlenirler. En bilinen flavonoidler olan fitoöstrojenler memelilerdeki 17 β-estradiol (E2)'e yapısal benzerlik gösterir (örneğin; genistein, kempferol, daidzein). Bitkilerde enerjinin dönüşümüne ve büyüme hormonlarına etki etmektedirler. Antioksidan kapasite derecesi ve UV dalga boylarını emme yeteneği flavonoidlerin farklı halka yapısına sahip olmalarına bağlıdır. Dihidroksi B halkasına sahip flavonoidler daha büyük bir antioksidan kapasitesine sahipken, monohidroksi B halkasına sahip flavonoidler UV dalgalarını daha iyi absorbe eder. Fabaceae (baklagiller) familyası fitoöstrojenler yönünden zengindir. Genelde flavonoidler vakuollerde bulunurlar ve hücre içerisindeki taşınımını endoplazmik retikulum sağlar. Flavonoidlerin DNA transkripsiyonunda rol alabileceği düşünülüyor. Flavonoidlerin oksin hareketini ve yıkımını düzenleyen moleküller olduğu düşünülmektedir. Hücreler arası oksin hareketine katılan flavonoidler plazma

\*Sorumlu yazarın e-posta adresi: tayfun-aktas@hotmail.com

Tayfun Aktaş [orcid.org/0000-0001-5253-1354](https://orcid.org/0000-0001-5253-1354)

Hatice Çölgeçen [orcid.org/0000-0001-8246-4279](https://orcid.org/0000-0001-8246-4279)

membranında oksin taşınmasındaki proteinlerin etkili inhibitörüdürler. (Işık 2005, Kumar ve Pandey 2013).

### 1.3. Flavonoidlerin Hayvanlarda ve İnsanlarda Etkileri

Flavonoidlerin uzun yıllardır çalışıldığı bilinmesine rağmen biyolojik aktivitelerindeki hücrel mekanizmalar hala çoğunlukla bilinmemektedir. Bunun yanında serbest radikal uzaklaştırıcı (antioksidan), kardiyovasküler, karaciğer koruyucu, antiviral ve son zamanlarda da antikanserojen aktiviteleri üzerinde çalışmalar devam etmektedir (Birman 2012).

#### 1.3.1 Antioksidan Etkileri

Sentetik antioksidanların kanserojen etkileri olduğu göz önünde bulundurulduğundan son yıllarda doğal antioksidan olan flavonoidlerin önemi artmıştır. Kalpte iskemi-reperfüzyon (kan yollarının tıkanmasının ilaçla veya cerrahi yollarla tedavisi) süresince reaktif oksijen türleri ortaya çıkmasını inhibe eder. Yapılan bir deneyde 3 haftalık süreyle proantosiyanidin ile beslenen sıçanlarda reperfüzyonun daha başlangıç dakikalarında serbest radikal üretiminin azaldığı gösterilmiştir. Antioksidan etkisi kanıtlanan flavonoidleri içeren besin maddelerinin başında yeşil çay, siyah çikolata, kırmızı şarap, çilek, ahududu, böğürtlen, brokoli gelmektedir. Fitoöstrojenlerin yüksek miktarda kullanımına bağlı olarak prostat kanseri riskine karşı koruma sağladığı da gösterilmiştir (Birman 2012, Kumar ve Pandey 2013).

#### 1.3.2 Kardiyovasküler Etkileri

Kardiyovasküler sistem üzerine olan aktiviteleri en çok üzerinde durulan etkileridir. Koruyucu etkilerinin ortaya

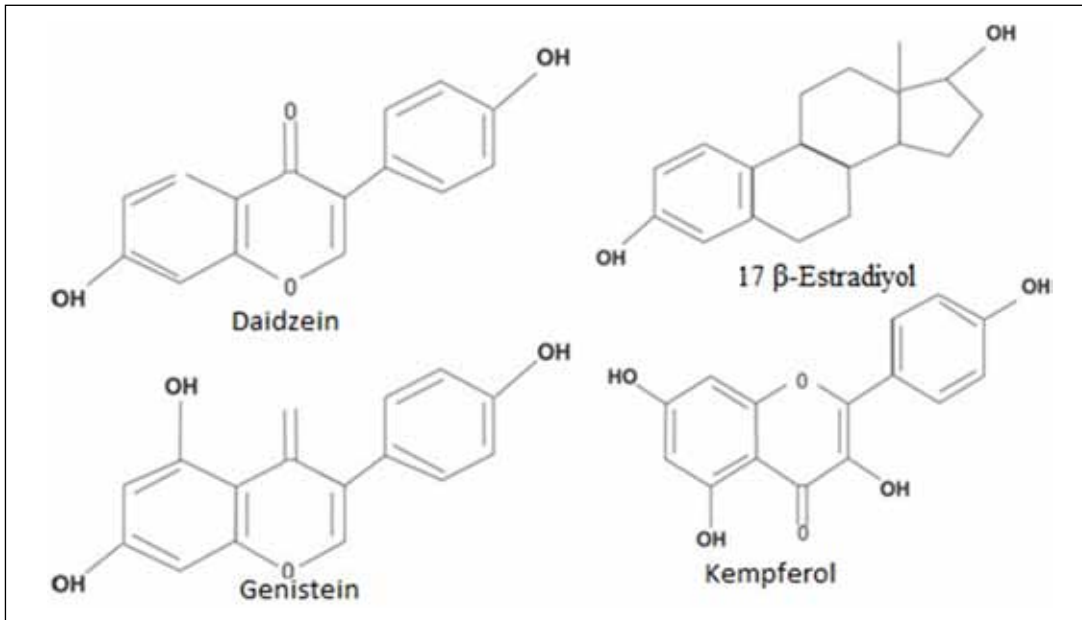
çıkmasında flavonoidlerin antioksidan özellikleri üzerinde durulmaktadır. Ayrıca flavonoidlerin damar genişletici etkileri bulunmaktadır. Flavonoidler doğal meyve, sebze, çay ve şarap gibi içeceklerde bulunurlar. Akdeniz'de yüksek oranda doymuş yağ kullanımına karşın kırmızı şarap tüketiminin fazlalığına bağlı olarak kardiyovasküler ölüm oranlarının az olduğu belirlenmiştir (Nijveldt vd. 2001, Işık 2005).

#### 1.3.3 Karaciğer Koruyucu Etkisi

Diyabet gibi farklı kronik hastalıklar karaciğerde rahatsızlığa neden olabilir. kateşin, apigenin, kuersetin, naringenin, rutin ve venoruton gibi flavonoidlerin karaciğer koruyucu etkisi olduğu rapor edilmiştir. Deve dikeninin yapısında bulunan üç flavonoid; silibinin, silidianin ve silikristin *Slybum marianum* bitkisinin meyve sütünde ve tohumunda üretilmektedir. Deve dikenini DNA biyosentez enzim aktivitesini stimüle eder ve hasarlı karaciğer hücrelerinin rejenerasyonuna olanak tanır (Kumar ve Pandey 2013).

#### 1.3.4 Antiviral Etki Mekanizması

1940'dan beri flavonoidlerin antiviral aktivitesi konusunda birçok rapor bulunmaktadır. Flavonoidlerin antiviral etkisi viral proteinlere bağlanma özelliğine bağlıdır. Örnek verecek olursak metil kuersetin'in poliovirüsünün replikasyonunu ve hücrel protein sentezini engellediği tespit edilmiştir. Flavonoidler ve enzim inhibe edici maddeler arasında yapı benzerliği bulunmaktadır. Antiviral bileşikler ile ilgili çalışmaların çoğu virüslerin yaşam döngüsü ve çeşitli enzimlerin inhibisyonu etrafında döner. Flavan-3-ol'un



Şekil 2. 17  $\beta$ -estradiol'ün flavonoidlerle yapısal benzerliği.

flavon ve flavonoidlere göre HIV virüsüne karşı daha etkili olduğu raporlanmıştır. Ancak HIV virüsü tedavisi için hala zamana ihtiyaç vardır (Kahraman 2002, Kumar ve Pandey 2013).

### 1.3.5 Antikarsinojen Etkisi

Önemli bir izoflavonoid ve fitoöstrojen kabul edilen genistein (4,5,7-trihidroksizoflavone) günümüzde kanser araştırmalarında sık kullanılmaktadır. Antikarsinojenik etkileri olduğu rapor edilmiştir. Soya temelli beslenmenin meme, prostat ve kolon kanserlerinin risklerini azaltabildiği belirlenmiştir (Hazer 2015).

### 1.3.6 Ticari Kullanımı

Flavonoidlerin, endüstrinin farklı alanlarında kullanılması ile ilgili araştırmaların sayısı artmaktadır. Bu bileşiklerin antioksidan özellikleri, tanenlerin bileşenine katılmalarından dolayı, besin, tekstil, deri, metalürji, tıp, ziraat gibi alanlarda kullanımı ve çeşitli ürün ve malzemeleri boyama yetenekleri gibi özellikleriyle kullanıldıkları alanlar artmaktadır. UV ışınlarından koruma özelliğine sahip olmaları nedeni ile bazı flavonoidler kozmetik ürünlerinde ve özellikle kremlerde kullanılmaktadır (Işık 2005).

## 2. Flavonoidlerin Yapısal Özelliklerine Göre Sınıflandırılması

İki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesi sonucu, flavonoidlerin karbon iskeleti oluşmaktadır. 15 karbon atomu içeren flavonoid iskeleti C6-C3-C6 konfigürasyonunda düzenlenmiştir. Üç karbonlu propan zincirinin üçüncü bir halka oluşturması, farklı şekiller alması veya fenil gruplarının farklı pozisyonlarda bağlanması sonucu flavonoidlerin farklı sınıfları oluşmaktadır (Kumar ve Pandey 2013).

### 2.1. Flavonoidlerin Biyosentez Ağı

Fenilalanin, fenilpropanoid metabolik sentez yolunda

önce 4-kumaril-CoA'ya dönüştürülür. Bu bileşik, ligninler, kumarinler ve stilbenlerin üretiminde kullanılabilir. 4-kumaril-CoA'nın bir dizi üretimi sonucu en yaygın kullanılan auronlar, flavonlar, flavonoller, izoflavonoidler, proantosiyanidinler ve antosiyaninler flavonoid bileşikleri oluşur (Boss vd. 1996).

## 3. Bitki Hücre ve Doku Kültürü ile Üretim

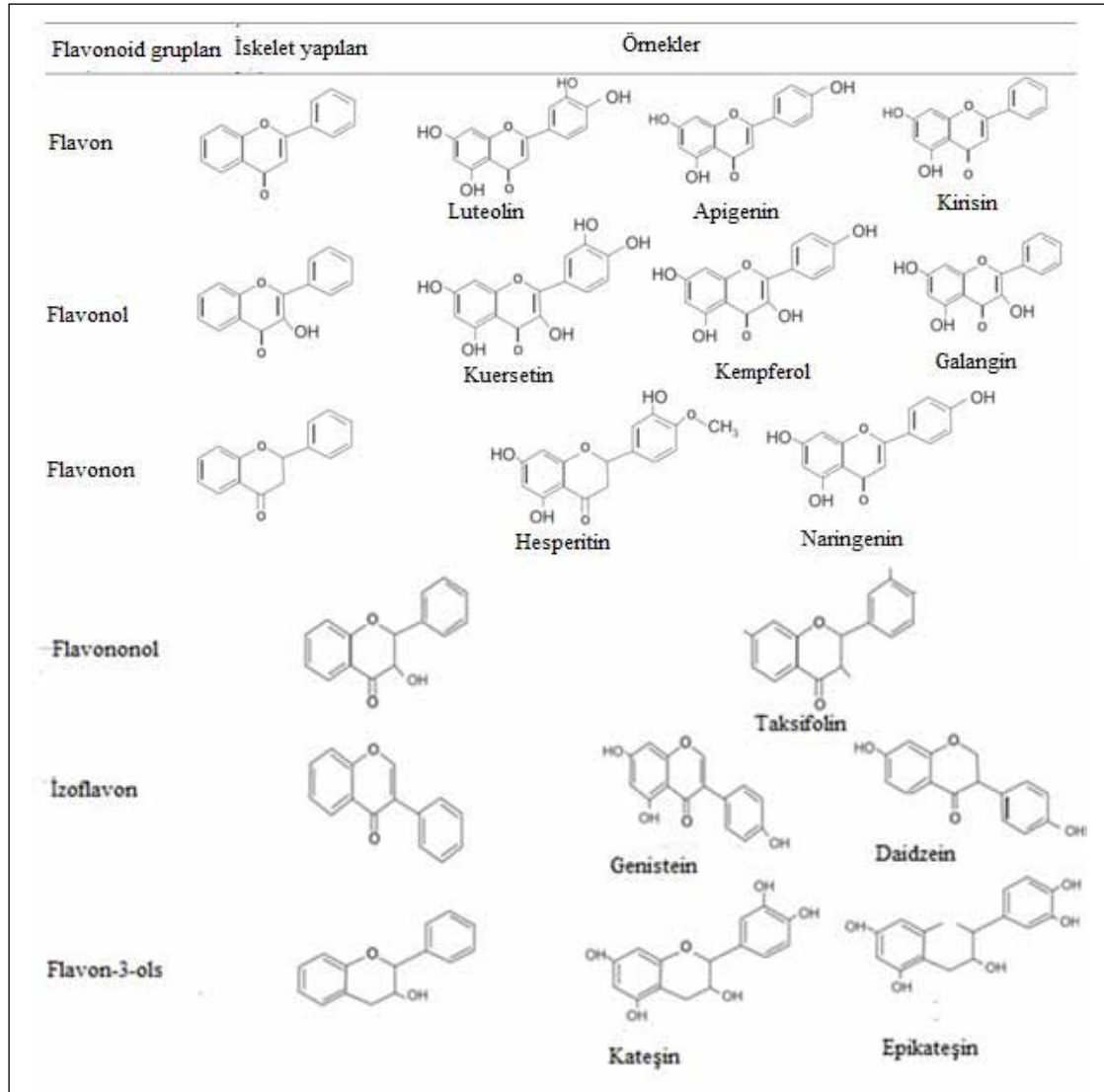
*In vitro* bitki kültürleri; aseptik şartlarda, niteliği belirli kimyasal ve fiziksel ortamlarda hücre, doku, organ ve bitkilerin kültüre alınması olarak tanımlanır. Bitki hücre ve doku kültürünün; kallus kültürü, hücre süspansiyon kültürü ve saçak kök kültürü gibi biyoreaktör çalışmalarına kadar uzanan alanları bulunmaktadır.

Fabaceae (Leguminosae- Baklagiller), Fabales takımından çoğunu otsu bitkilerin oluşturduğu çalı ve ağaç türlerini de içeren büyük bir familyadır. 400 cins ve 10.000 dolayında tür içerir. *Phaseolus vulgaris* (Fasulye), *Vicia faba* (bakla), *Cicer arietinum* (nohut), *Glycine max* (soya), *Lens culinaris* (mercimek), *Pisum sativum* (bezelye) gibi insan gıdası olarak kullanılan türler bu familyadandır. Hayvan gıdası ve farmakolojik açıdan insan sağlığı için de önemi bulunmaktadır.

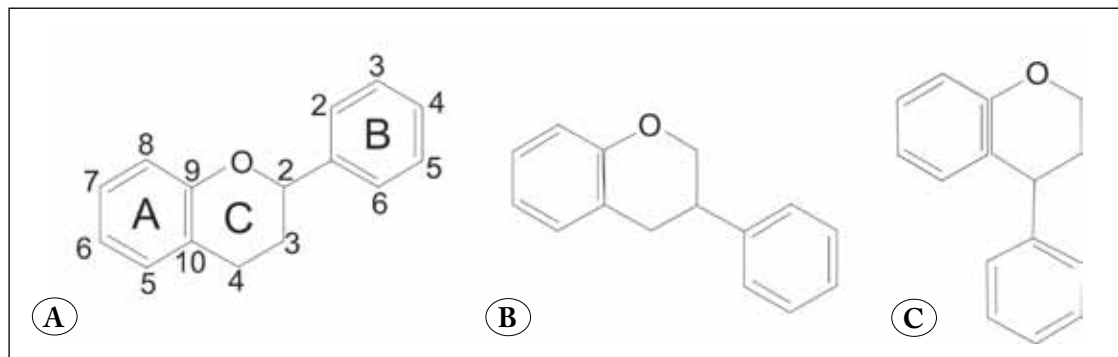
Baklagil bitkilerindeki flavonoidlerin varlığı değişik bitkilerden yapılan analizler sonucu ortaya çıkarılmıştır. Antioksidatif etkileri (Hrazdina vd. 1982, Begum vd. 2001, Lila 2004, Prakash vd. 2006, Han ve Baik 2008, Segev vd. 2010) ve floresan özellik gösteren Fabaceae bitkilerinin içerdiği flavonoidler hakkında (Vierstra 1981, Beninger vd. 2003) farklı çalışmalar bulunmaktadır. Aynı zamanda *Medicago sativa* moleküler tarım çalışmalarında son yıllarda en çok kullanılan bitkilerden biridir. Son yıllarda bu flavonoid içeriği bakımından zengin olan Fabaceae ailesinde yoğun bir şekilde *in vitro* üretim stratejileri uygulanmaktadır (Fritzscheier vd. 1983, Rolfs vd.1987, Luczkiewicz ve Daniel

**Çizelge 1.** Bazı flavonoidlerin buldukları besin kaynakları (Kumar ve Pandey 2013)

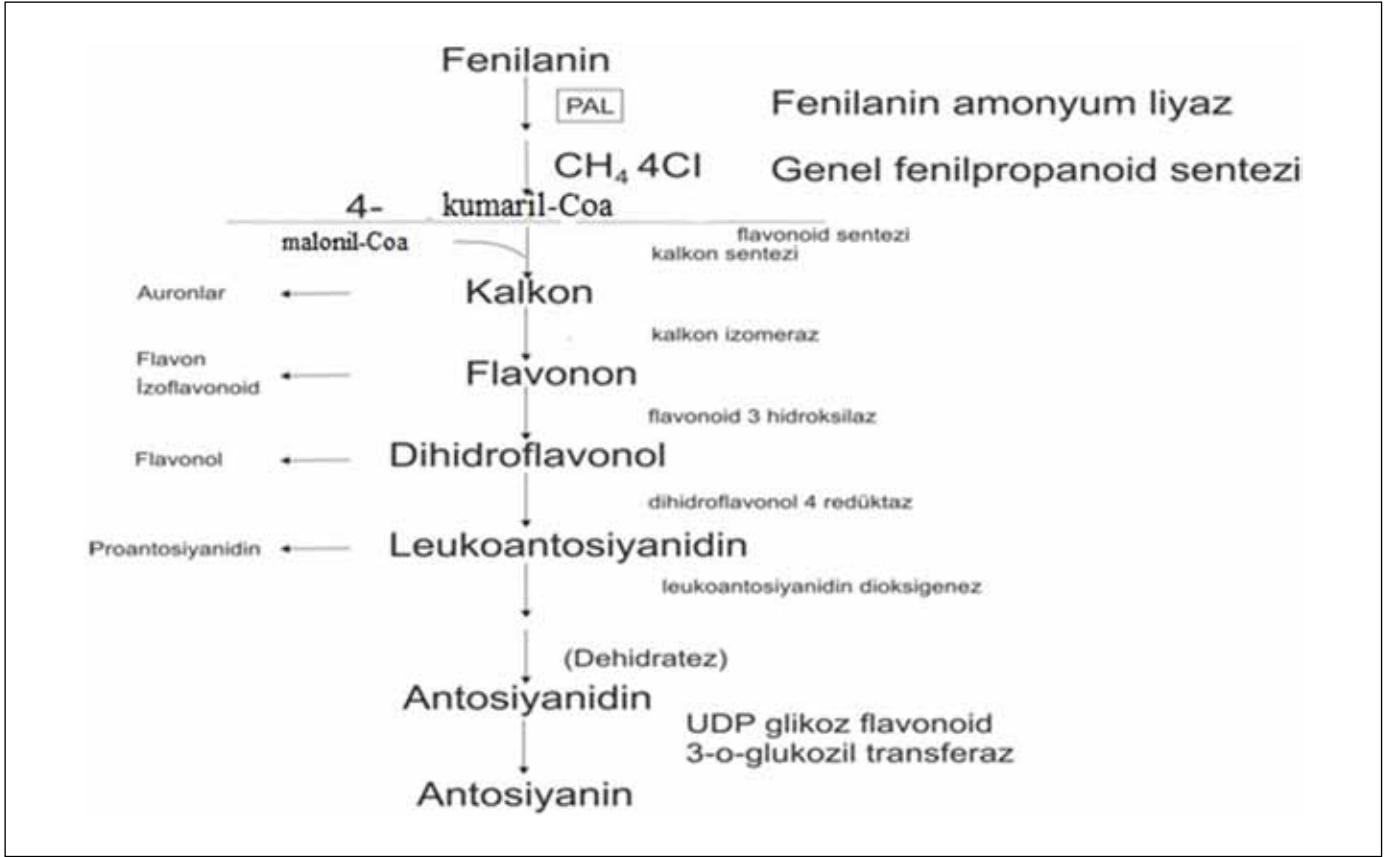
Sınıf	Flavonoid	Besinsel kaynağı
Flavanol	(+)-Kateşin, (-)-Epikateşin, Epigallokateşin	Çaylar
Flavone	Sirisin, apigenin, rutin, luteolin ve luteolin glukositleri	Meyve kabukları, kırmızı şarap, zeytinyağı, çilek ve greyluft
Flavonol	Kempferol, kuersetin, mirisetin ve tamariksetin	Soğan, kırmızı şarap, zeytinyağı, çilek ve greyluft
Flavanone	Naringin, naringenin, taksifolin ve hesperidin	Turunçgiller, greyluft, limon ve portakal
İzoflavone	Genistin, daidzin	Soya fasulyesi
Antosiyanidin	Apigenin, siyanidin	Kiraz, ahududu ve çilek



Şekil 3. Flavonoidlerin yapısı (Kumar ve Pandey 2013).



Şekil 4. Ana flavonoid sınıflandırması.  
A) Flavonoid  
B) İzoflavonoid  
C) Neoflavonoid (Vihakas 2014).



Şekil 5. Flavonoidlerin biyosentez ağı (Boss vd. 1996).

Glo'd 2003, El-Beltagi vd. 2011, Shipika Upman ve Renu Sarin 2011, Konate vd. 2012, Çölgeçen vd. 2013).

Baklagil türleri hem yapısal olarak hemde çevresel stres koşulları nedeniyle bünyelerinde bir dizi flavonoid ve izoflavonoid biriktirir. *Lotus corniculatus* bitkisinde flavonoidler ve izoflavonoidler örneğin böcek saldırılarına karşı dirence katılarak fitopatogen atak ve abiyotik stres başlatırlar (Colliver vd. 1997).

### 3.1. Kallus Kültürü

Temel olarak *in vitro* bitki hücre kültürü; bitkiden (yaprak, kök gövde vb.) bir parçanın (eksplant), daha önceden steril edilmiş, bir kap içindeki (petri, erlen vb.) besin ortamına yerleştirilmesidir. Farklı ortamlarda yapılan kültürler genellikle kallus kültürü ile başlar. Kallus farklılaşmamış bitki hücrelerinin çoğalmış kütesidir. Direkt ve indirekt organogenez, bitki rejenerasyonu, somatik embriyogenez ve hücre süspansiyon kültürlerinin başlangıç noktası esas itibarı ile kallus kültürüdür (Topçu ve Çölgeçen 2015).

Fabaceae üyeleri Çin'de bir numaralı ilaç ham maddesi olarak kullanılır. *Pueraria lobata*'dan kallus kültürüyle

üretimi yapılan flavonoid ve izoflavonoidler bu amaçla kullanılmaktadır. Yapılan çalışmada kallus kültürüyle puerarin, daidzein, genistein başta olmak üzere birçok flavonoid elde edilmiştir (Takeya ve Itokowa 1981).

Fitoaleksin, bitkiler tarafından mikrobik, fungal, fiziksel stres faktörlerine karşı üretilen antimikrobiyal ve antifungal etkili bileşiklerdir. İzoflavonoid olan medikarpin *Medicago* (yonca)'da bulunan en önemli fitoaleksindir. Paiva ve arkadaşları medicarpinin SH (Shenk ve Hildebrandt) ortamında kallus kültürüyle üretimini ve sentezlenmesini sağlamışlardır (Paiva vd. 1991, He vd. 1998). *Medicago sativa*'da yapılan çalışmada daidzein normal koşullarda bitki de belirlenebilecek miktarda bulunmazken kallus kültüründe üretilebildiği gösterilmiştir (Çölgeçen vd. 2013).

Çölgeçen ve arkadaşlarının *Trifolium pratense*'de yaptıkları çalışmalar gösteriyor ki çiçekli ve çiçeksiz bitkiden alınan örneklerle kıyasla *in vitro* koşullarda üretilen kalluslardaki izoflavonoid miktarlarında artış elde edilememiştir. Ayrıca çiçekli ve çiçeksiz bitki arasında da flavonoid bakımından farklar göze çarpmakta ve çiçeksiz bitkinin flavonoid bakımından daha zengin olduğu bildirilmektedir. Yapılan bu



çalışmada daidzein, genistein, formononetin ve biyokanın A analizi yapılmış miktarları belirlenmiştir (Çölgeçen vd. 2013).

Kallus kültürü tekniğiyle flavonoidlerin bitki tarafından üretilmesi artırılabilir. Araştırmalarda *Cytisus aeolicus*'un hipokotil ve kotiledon kısımlarının *in vitro* üretilmesiyle flavonoid olan genistin üretiliminin artırıldığı gözlenmiştir (Lucchesini vd. 2010).

*Genista*'da kallus kültürüyle üretilen materyallerde yapılan analiz sonucu genistein, puerarin, hidroksigenistein, daidzin, genistin gibi flavonoidlerin miktarında artış gözlenmiştir (Łuczkiwicz vd. 2004). Yine *Genista*'da yapılan çalışmalarda abiyotik bir elisitör (uyarıcı) olan UV radyasyon kullanılarak flavonoid üretimi gerçekleştirilmiştir. Farklı dalga boylarında uygulanan UV radyasyon sonucu genistin, genistein, daidzein ve biyokanın A gibi flavonoidlerin standart kallus kültürlerine göre yüksek seviyede artış görülmüştür (Tumova ve Tuma 2011).

*Indigofera cordifolia* ve *Indigofera linnaei*'de yapılan çalışmalar göstermiştir ki bitkinin *in vivo* analizine oranla *in vitro* çoğaltılan kalluslarda daha fazla flavonoid vardır. İki farklı bitkinin MS ortamında farklı bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak kalluslarda apegenin, kempferol, kuersetin miktarlarında artış sağlanmıştır (Upman ve Sarin 2011).

Flavonoidlerin çeşitli farmakolojik aktivitelere sahip olduğu rapor edilmiştir. Söz konusu etkileri araştıran Joby Jose *Mimosa pudica*'da *in vitro* çalışmalar yapmıştır. Yaptığı çalışmalar sonunda kuersetini başarıyla izole ettiğini ve flavonoidlerin antioksidan ve immunolojik etkilerini göstermiştir (Jose vd. 2014).

### 3.2. Hücre Süspansiyon Kültürü

Hücre süspansiyon kültürleri, çalkalanmakta olan sıvı besin ortamında dağılmış ve büyümekte olan hücreler ile hücre kümelerinden oluşur. Bu süre boyunca hücre materyali belli ölçüde artış gösterir ve maksimum bir noktaya ulaşır (Akçam-Oluk 2006).

Fabaceae'de yine Koichi ve Hıdeji kallus kültürüyle başladıkları *Pueraria lobata*'yı süspansiyon kültürüne alarak flavonoid (puerarin, daidzin, daidzein ve genistein) eldesini artırmışlardır (Takeya ve Itokowa 1981).

*M. sativa*'da Paiva ve arkadaşları medikarpinin SH ortamında hücre süspansiyon kültürü tekniğiyle üretimini ve sentezlenmesini sağlamışlardır (Paiva vd. 1991). Xian-Zhi He ve arkadaşları yine kallus kültüründe çoğalttığı *M. sativa*'ları hücre süspansiyon kültürüne alarak yapmış

oldukları analizler sonucu medikarpinin önemli ölçüde arttığını görmüşlerdir (He vd. 1998).

Baklagiller hem hayvanlar hemde insanlar açısından fazlaca tüketilen, tarımsal ve ticari açıdan önemli besin kaynaklarıdır. Bu besinler arasında *Medicago truncatula*'nın da önemi fazladır. Mohamed A. Farag ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada hücre süspansiyon kültüründe ürettikleri *M. truncatula*'dan farklı miktarlarda daidzein, formononetin, medikarpin, genistein, biyokanın A, 2-hidroksiformononetin, afrormosin, irilon, irisolidon, hispidol, 5,3-dimetoksiluteolin analizi gerçekleştirilmiştir (Farag vd. 2006). Çölgeçen ve arkadaşlarının daha önce de bahsettiğimiz çalışmasında *M. sativa* kallus kültürlerini hücre süspansiyon kültürüne alarak daidzein ve formononetin üretiliminin bitki tarafından gerçekleştirildiği görülmüştür. Araştırmaları sonucu doğal ortamında bulunan bitkiye ve kallus ortamına kıyasla hücre süspansiyon kültüründe daidzein ve formononetin daha yüksek seviyede olduğunu rapor etmişlerdir (Çölgeçen vd. 2013).

İzoflavonoidler ve flavonoidlerin geniş çapta biyolojik etkileri vardır. Flavonoidlerin de önemli ölçüde kaynağı baklagiller olmuştur. *Trifolium pratense* özellikle daidzein, formononetin, biyokanın A, ve genistein bileşiklerini içerir. Kasparova ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma sonucu kontrol ile kıyaslandığında %152 genistin, %151 daidzein ve %400 genisteinin arttığı tayin edilmiştir (Kasparova vd. 2011). Ayrıca yine bu alanda çalışması bulunan Çölgeçen ve arkadaşları doku kültüründe çoğalttıkları kallusları hücre süspansiyon kültürüne alarak üretime devam etmişlerdir. Ancak aynı bitkide kallus kültürüne kıyasla daidzein, genistein, formononetin ve biyokanın A'nın sentezinde artış olmadığını göstermişlerdir. Ayrıca çalışma da çiçeksiz bitkilerdeki flavonoid miktarının çiçekli bitkilere oranla daha fazla izoflavonoid içerdiğini göstermişlerdir (Çölgeçen vd. 2013).

### 3.3. Saçak Kök (Hairy Root) Kültürü

Meyan kökü geçmişten günümüze insanların kullandığı bitkisel ilaçlardan biridir. Farklı araştırmacılar farklı tıbbi özelliklerini çalışmışlardır. Bunlardan bazıları antiülser, antitümör, antimitojenik ve antimikrobiyal etkilerdir. Bundan yola çıkan Wei Li ve arkadaşları *Glycyrrhiza glabra*'da yaptıkları çalışmayla *Agrobacterium rhizogenes*'le saçak kök kültüründe flavonoid (likokalkon C, kanzonol Y, glinflanin B ve glisirdion A) üretmişlerdir (Li vd. 2000). Aynı yöntemi kullanan bir başka araştırmada bilinen 8 flavonoid (isobavakalkon 4-hidroksilonkokarpin, kanzonol

B, absinon II, glabrol, eukrenon a5 ve kambion) saçak kök kültürüyle üretilmiş ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada likoagrokalkon A ve likoagrokarpin adında iki yeni flavonoid isimlendirilmiştir (Asada vd. 1997). Ekonomik önemi bulunan meyan kökü flavonoidleri saçak köklerde yeterli miktarlarda bulunur. *Glycyrrhiza uralensis* 3000 yıldır bitkisel ilaç olarak kullanılıyor ve en eski bitkisel ilaç olduğu biliniyor. Hai-Chao Zhang ve arkadaşları yaptıkları saçak kök kültürüyle *Glycyrrhiza uralensis*'de flavonoid miktarlarını artırmışlardır (Zhang vd. 2009).

*A.rhizogenes*'in kültürde, kalluslardan saçak kök oluşturma yeteneği sayesinde kök kaynaklı bileşiklerin üretimi daha kolay ve hızlı yapılabilmektedir. Maria ve arkadaşları da *A. rhizogenes*'i kullanarak *Genista*'da flavonoidlerin üretimini artırmıştır. SH ortamında yaptıkları çalışma sonucunda genistein ve daidzein flavonoidlerini üretmişlerdir (Łuczkiwicz ve Kokotkiewicz 2005).

### 3.4. Biyoreaktör ile Üretim

Biyoreaktörler, içerisinde canlı organizma, hücre veya dokuların sıvı besiyeri içerisinde kültür ortamına zarar vermeden pH, sıcaklık, hava temini, karıştırma ve taze besiyeri ekleme işlemlerinin yapılabilirdiği elektronik kontrole imkan sağlayan metal, cam veya plastikten üretilmiş tanktır. Biyoreaktör içerisindeki besin ortamının şartlarını yakından takip etmeye olanak tanıdığı gibi fiziksel ve kimyasal müdahaleye de elverişli bir sistemdir (Topçu vd. 2015).

Ames ve Worden yaptıkları *Glycine max.* (soya fasulyesi) çalışmasında süspansiyon kültüründen (B5 Gamborg) manyetik alan biyoreaktörüne aktardıkları örneklerinden daidzein ve genistein'in sürekli üretimini gerçekleştirmişlerdir (Ames ve Worden 1997).

Yapılan bir çalışmada *Genista* türünü saçak kök kültürlerinden (*A. rhizogenes*) daldırmalı biyoreaktöre aktararak 34 günün sonunda yaklaşık 800 gr kallus üretilmiştir. *Genista*'da yapılan bu çalışmada flavonoidlerden genistein ve daidzein miktarları tayin edilmiştir (Łuczkiwicz ve Kokotkiewicz 2005).

Sharma ve arkadaşları öncelikle MS besi ortamında kurdukları hücre süspansiyon kültürüne karıştırmalı tank biyoreaktöründe devam ederek *Pueraria tuberosa* bitkisini çalışmışlardır. Farklı boyutlardaki biyoreaktörlerde yaptıkları çalışmada 76.6 mg/L flavonoid (puerarin, genistin, daidzein, genistein) verimi elde etmişlerdir (Sharma vd. 2009).

Çalışmalarına hücre süspansiyon kültürüyle (MS) başlayan Goyal ve arkadaşları hava püskürtmeli biyoreaktör ile devam etmişlerdir. *Pueraria tuberosa*'da elisitör olarak *Cuscuta reflexa* cinsi asalak bitki kullanmışlardır. Çalışmalarının sonunda flavonoid olan puerarin'in kontrol grubuyla kıyasladıklarında %580 arttığını rapor etmişlerdir. Ayrıca toplam flavonoid bazında %19 daha fazla üretim yapmışlardır (Goyal vd. 2011).

**Çizelge 2.** Farklı yöntemlerle flavonoid üretimi (Bharati ve Bansal 2014).

Bitki	Ortam	Flavonoid	Kültür yöntemi
<i>Clitoria ternatea</i>	MS + BAP + NAA	Flavonoid	Kallus kültürü
<i>Cyclopia subternata</i>	MS + (2,4,5-T) + 4 CPPU	İzoflavonoid	Süspansiyon kültürü
<i>Genista tinctoria</i>	MS + 2,4-D + KIN	İzoflavonoid	Kallus kültürü
<i>G. tinctoria</i>	MS + IBA	Izolikuiritigenin	Saçak kök
<i>Glycyrrhiza echinata</i>	MS + IAA + KN	Flavonoid	Kallus kültürü
<i>G. glabra</i>	MS+IAA	Flavonoid	Saçak kök
<i>G. uralensis</i>	MS + 2,4-D + NAA + BAP + MJ	Flavonoid	Kallus kültürü
<i>Indigofera cordifolia</i>	MS + 2,4-D + KIN	Apigenin, kempferol, kuersetin	Kallus kültürü
<i>Medicago truncatula</i>	Likid MS	Flavonoid, izoflavonoid	Süspansiyon kültürü
<i>Psoralea corylifolia</i>	MS + TDZ + BAP	izoflavon	Kallus kültürü
<i>Pueraria lobata</i>	MS+GA3+BAP; MS	İzoflavon	Kallus kültürü
<i>P. tuberosa</i>	MS + BAP	İzoflavonoid	Kallus kültürü
<i>P. candollei</i>	B5+kefotaksime +ampisilin	İzoflavonoid	Saçak kök
<i>Sutherlandia</i>	MS + NAA	Flavonoid	Kallus kültürü

#### 4. Kaynaklar

- Akçam-Oluk, E. 2006.** Bitki Hücre Süspansiyon Kültürleri ve Sekonder Metabolit Üretimi. *Anadolu Üni. Bil. ve Tek. Der.*, 7(2): 303-310.
- Ames, TT., Worden, RM. 1997.** Continuous Production of Daidzein and Genistein from Soybean in a Magnetofluidized Bed Bioreactor. *Biotechnol. Prog.*, 13: 336-339.
- Asada, Y., Li, W., Yoshikawa, T. 1997.** Isoprenylated Flavonoids From Hairy Root Cultures of *Glycyrrhiza glabra*. *Phytoche.*, 47(3): 389-392
- Begum, AA., Leibovitch, S., Migner, P., Zhang, F. 2001.** Specific flavonoids induced nod gene expression and pre-activated nod genes of rhizobium leguminosarum increased pea ( *Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. *Jour. of Exper. Bot.*, 52 (360): 1537-1543.
- Beninger, CW., Hosfield, GL. 2003.** Antioxidant Activity of Extracts, Condensed Tannin Fractions, and Pure Flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. Seed Coat Color Genotypes. *J. Agricultural Food Chem.*, 51: 7879-7883.
- Bharati, AJ., Bansal, YK. 2014.** In Vitro Production of Flavonoids: A Review. *World J. Pharmacy Pharmaceutical Sci.*, 3(6): 508-533.
- Birman H. 2012.** Bitkisel Flavonoid Bileşiklerinin Biyoaktiviteleri ve Muhtemel Etki Mekanizmaları. *İst. Tıp Fak. Derg.*, 75: 3.
- Boss, PK., Davies, C., Robinson, SP. 1996.** Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Mol. Bio.*, 32(3): 565-569.
- Colliver, SP., Morris, P., Robbins, MP. 1997.** Differential modification of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis with an antisense chalcone synthase construct in transgenic *Lotus corniculatus*. *Plant Mol. Bio.*, 35: 509-522.
- Çölgeçen, H., Koca, Çalışkan, U., Kartal, M., Büyükkartal, HN. 2013.** Comprehensive evaluation of phytoestrogen accumulation in plants and in vitro cultures of *Medicago sativa* L. 'Elçi' and natural tetraploid *Trifolium pratense* L. *Turkish J. Biol.*, 38: 619-627.
- El-Beltagi, HS., Ahmeda, OK., 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 Phy. Chem.*, 80: 968-976.
- Farag, MA., Huhman, DV., Lei, Z., Sumner, LW. 2007.** Metabolic profiling and systematic identification of flavonoids and isoflavonoids in roots and cell suspension cultures of *Medicago truncatula* using HPLC-UV-ESI-MS and GC-MS. *Phytochemistry*, 68: 342-354.
- Fritzemeier, KH., Rolfs, CH., Pfau, J., Kindt, H. 1987.** Action of ultraviolet-C on stilbene formation in callus of *Arachis hypogaea*. *Planta*, 172:238-244.
- Goyal, S., Sharma, V., Ramawat, KG. 2011.** Marked effect of *Cuscuta* on puerarin accumulation in cell cultures of *Pueraria tuberosa* grown in shake flasks and a bioreactor. *Plant Biotech. Rep.*, 5:121-126.
- Han, H., Baik, B. 2008.** Antioxidant activity and phenolic content of lentils (*Lens culinaris*), chickpeas (*Cicer arietinum* L.), peas (*Pisum sativum* L.) and soybeans (*Glycine max*), and their quantitative changes during processing. *International Jour. of Food Sci. and Techno.*, 43: 1971-1978.
- Han, H., Baik, BK. 2008.** Antioxidant activity and phenolic content of lentils (*Lens culinaris*), chickpeas (*Cicer arietinum*), peas (*Pisum sativum*) and soybeans (*Glycine max*), and their quantitative change during processing. *International Jour. of Food Sci. and Techno.*, 43: 1971-1978.
- Hazer, Y. 2015.** *Bryum Capillare* Hedw., *Sphagnum Palustre* L. ve *Thamnobryum Alopecurum* (Hedw.) Gangulee'nin Doku Kültürü Yöntemleriyle Çoğaltılması, Biyolojik Aktivite ve Fenolik İçeriklerinin Tesbiti. *Doktora tezi*. Bülent Ecevit Üniversitesi.
- He, XZ., Reddy, JT., Dixon, RA. 1998.** Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). XXII. cDNA cloning and characterization of an elicitor-inducible isoflavone 7-O-methyltransferase. *Plant Mol. Bio.*, 36: 43-54. <http://www.food-info.net/tr/e/e300-400.htm>
- Işık FE. 2005.** Edirne Bölgesinde Yetişen *Trifolium resupinatum* L. var. *Microcephalum* Bitkisinin Fitokimyasal İncelenmesi. *Doktora tezi*. Trakya Üniversitesi.
- Jose, J., Sudhakaran, S., Dhanya, AT., Kumar, STM., Jayaraman, S., Variyar, JE. 2014.** In Vitro Studies of Immunomodulatory and Free Radical Scavenging Activities of Flavonoid Isolated From *Mimosa pudica*. *International Jour. of Pharmaceutical Sci. and Res.*, 5(10): 4254-4261.
- Kahraman, A., Serteser, M., Köken T. 2002.** Flavonoidler. *Kocatepe Tıp Der.*, 3:01-08.
- Kasparova, M., Siatka, T., Klimesova, V., Dusek, J. 2012.** New Synthetic Pyridine Derivate as Potential Elicitor in Production of Isoflavonoids and Flavonoids in *Trifolium pratense* L. Suspension Culture. *The Scientific World Jour.*, 5 sayfa.
- Konate, AI., Koulibaly, A., Coulibaly, I., Berraho, EB. 1983.** Phosphate Solubilizing of Carob (*Ceratonia siliqua* L) Associative Bacteria Analyzed by Molecular Technique. *Planta*, 159:25-29.
- Kumar, S., Pandey, AK. 2013.** Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Bio. of Plants*, 6: 34.
- Li, W., Asada, Y., Yoshikawa, T. 2000.** Flavonoid constituents from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. *Phytochemistry*, 55: 447-456.
- Lila, MA. 2004.** Anthocyanins and Human Health: An In Vitro Investigative Approach. *J. Biomed. Biotechnol.*, 5: 306-313.



- Lucchesini, M., Bertoli, A., Mensuali-Sodi, A., Cappelli, Cecilia Noccioli, C., Luciardi, L., Pistelli, L. 2010.** *Cytisus aeolicus* Guss. ex Lindl. *in vitro* cultures and genistin production. *Central European J. Biol.*, 5(1): 111-120.
- Luczkiewicz, M., Głó'd, D. 2003.** Callus cultures of *Genista* plants *in vitro* material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity. *Plant Sci.*, 165: 1101-1108.
- Luczkiewicz, M., Głó'd, D., Baczek2, T., Bucin'ski, A. 2004.** LC-DAD UV and LC-MS for the Analysis of Isoflavones and Flavones from *In Vitro* and *In Vivo* Biomass of *Genista tinctoria* L. *Chromatographia*, 60: 179-185.
- Luczkiewicz, M., Kokotkiewicz, A. 2005.** *Genista tinctoria* Hairy Root Cultures for Selective Production of Isoliquiritigenin. *Verlag der Zeitschrift für Natur.*, 60: 867-875.
- Matti, Vihakas. 2014.** Flavonoids and Other Phenolic Compounds: Characterization and Interactions with Lepidopteran and Sawfly Larvae. *Turun Yliopiston Jul.*
- Nijveldt, RJ., Nood, EV., Hoorn, DECV., Boelens, PG., Norren, KV., Leeuwen, PAMV. 2001.** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.*, 74: 418-25.
- Paiva, NL., Edwards, R., Sun, Y., Hrazdina, G., Dixon, RA. 1991.** Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) 11. Molecular cloning and expression of alfalfa isoflavone reductase, a key enzyme of isoflavonoid phytoalexin biosynthesis. *Plant Mol. Biol.*, 17: 653-667.
- Prakash, D., Upadhyay, G., Singh, BN., Singh, HB. 2007.** Antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food Chem.*, 104: 783-790.
- Rolfs, CH., Schon, H., Steffens, M., Kindl, H. 1987.** Cell-suspension culture of *Arachis hypogaea* L.: model system of specific enzyme induction in secondary metabolism. *Planta*, 172:238-244.
- Segev, A., Badani, H., Kapulnik, Y., Shomer, I., Oren-Shamir, M., Galili, S. 2010.** Determination of Polyphenols, Flavonoids, and Antioxidant Capacity in Colored Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Food Sci.*, 75(2): 115-119.
- Sharma, V., Goyal, S., Ramawat, KG. 2009.** Scale up production of isoflavonoids in cell suspension cultures of *Pueraria tuberosa* grown in shake flasks and bioreactor. *Eng. Life Sci.*, 9(3): 267-271.
- Takeya, K., Itokawa, H. 1981.** Isoflavonoids and the Other Constituents in Callus Tissues of *Pueraria lobata*. *Tokyo College Phar.*, 30: 1496-1499.
- Tumova, L., Tuma, J. 2011.** The effect of UV light on isoflavonoid production in *Genista tinctoria* culture *in vitro*. *Acta Phys. Plant.*, 33: 635-640.
- Topçu, Ş., Çölgeçen, H. 2015.** Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoreaktörlerde Üretilmesi. *Türk Bilimsel Derl. Der.*, 8 (2): 09-29.
- Upman, S., Sarin, R. 2011.** Production of flavonoids from *Indigofera cordifolia* and *I. linnaei* *in vivo* and *in vitro* tissue cultures. *Int. J. Nat. Products Res.*, 1 (1): 4-8.
- Vierstra, RD., John, TR., Msu-doe, KLP. 1982.** Kaempferol 3-O-Galactoside, 7-O-Rhamnoside is the Major Green Fluorescing Compound in the Epidermis of *Vicia faba*. *Plant Phy.*, 69: 522-525.
- Zhang, HC., Liu, JM., Lu, HY., Gao, SL. 2009.** Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over-expression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment. *Plant Cell Rep.*, 28: 1205-1213.