

Bitkilerdeki Antosiyaninlerin Etkinliği, Stabilitesi ve *In Vitro* Üretimi

Elif ONAN^{1*}, Hatice ÇÖLGEÇEN², Havva KARAHAN³, Cengiz TEMİZ⁴

^{1,2,3}Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Zonguldak

⁴Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Elektronik ve Otomasyon Bölümü, Alaplı Meslek Yüksek Okulu, Zonguldak

¹<https://orcid.org/0000-0003-1413-2234>

²<https://orcid.org/0000-0001-8246-4279>

³<https://orcid.org/0000-0003-0518-6265>

⁴<https://orcid.org/0000-0002-9265-7485>

*Sorumlu yazar: elifonan@hotmail.com

Derleme

Makale Tarihçesi:

Geliş tarihi: 12.08.2023

Kabul tarihi: 07.01.2024

Online Yayınlanma: 25.06.2024

Anahtar Kelimeler:

Bitki biyoteknolojisi

Pigment üretimi

Sekonder metabolit

ÖZ

Bitki sekonder metabolitlerinin büyük bir grubunu oluşturan antosiyaninler, fenolik bileşikler sınıfının flavonoid grubuna ait pigmentlerdir. Antosiyaninler, angiosperm grubu meyve, sebze ve çiçeklere; somon rengi dahil olmak üzere pembeden kırmızıya ve menekşeden koyu maviye kadar değişen birçok rengi veren bileşiklerdir ve bitkilerde; oksinleri taşıma, abiyotik ve biyotik streslere karşı kendini koruma, mikroorganizmalar için sinyalizasyon sağlama, patojenlerden korunma, tozlaşmayı sağlama gibi görevler üstlenmişlerdir. Sentetik renklendirici maddelere ve raf ömrünü artıran katkı maddelerine alternatif doğal bileşikler olan antosiyaninler, uzun yıllardır geleneksel ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak elde edilmektedir. Bununla birlikte mevsime bağlı üretim dalgalanması olması, sürekliliğin sağlanmasının güç olması, üretimi için çok fazla bitkisel materyale gereksinim duyulması, elde edilen ürünün saflık derecesinin ve kalitesinin düşük olması antosiyaninlerin elde edilebilmesi açısından sınırlayıcı olmaktadır. Bu nedenle, antosiyaninlerin üretimi için laboratuvar koşullarında aynı özellikte, yüksek saflıkta, her daim üretilebilen ve başlangıç materyalinin az miktarda kullanıldığı biyoteknolojik yöntemler daha avantajlı olarak kabul edilmektedir. Biyoteknolojik metot olarak sıklıkla *in vitro* hücre, doku ve kallus kültürü yöntemleri ile antosiyaninlerin üretimi gerçekleştirilebilir. Bu derlemede antosiyaninlerin bitkilerdeki başlıca görevleri, *in vitro* üretimi ve stabilitesi incelenecektir.

The Activity, Stability and *In Vitro* Production of Anthocyanins in Plants

Reviews

Article History:

Received: 12.08.2023

Accepted: 07.01.2024

Published online: 25.06.2024

Keywords:

Plant biotechnology

Pigment production

Secondary metabolite

ABSTRACT

Anthocyanins, which form a large group of plant secondary metabolites, are pigments belonging to the flavonoid group of the phenolic compounds class. Anthocyanins in angiosperm group fruits, vegetables and flowers have many colors ranging from pink to red, violet to deep blue and salmon. Anthocyanins have tasks such as transporting auxins in plants, improving biotic and abiotic stresses, being a signal for microorganisms, protection against pathogens, and providing pollination. Anthocyanins, which are natural alternatives to artificial colorants and additives that extend

shelf life, have been obtained using traditional extraction methods for a long time. However, there are limiting factors: there is a seasonal production fluctuation, it is difficult to ensure continuity, the need for a lot of plant material for its production, and the low quality and purity of the obtained product. Therefore, biotechnological methods are used for the production of anthocyanins because of their advantageous: high purity, the same properties, always produced under laboratory conditions and using a small amount of starting material. Anthocyanins can be produced by using *in vitro* cell, tissue and callus culture methods. In this review, the activity, stability and *in vitro* production of anthocyanins in plants will be examined.

To Cite: Onan E., Çölgeçen H., Karahan H., Temiz C. Bitkilerdeki Antosiyaninlerin Etkinliği, Stabilitesi ve *In Vitro* Üretimi. Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2024; 7(3): 1413-1437.

1. Giriş

Antosiyaninler; bitkilerde bulunan en önemli pigment gruplarından biri olarak kabul edilmektedir (Kong ve ark., 2003). Bitkilerin yaprak, gövde, kök, tohum, çiçek ve meyve kısımlarının birbirinden farklı çok geniş bir renk yelpazesinde renk almasını sağlayan, suda çözünen önemli bir flavonoid pigment türüdür (Zhao ve ark., 2020). Antosiyaninler çoğunlukla endoplazmik retikulum içerisinde, flavonoid yolağı boyunca biyosentezlenir ve vakuollerde biriktirilir (Kaur ve ark., 2021). Ortamın asiditesi, ışık, sıcaklık, metal iyonları, oksijen, molekül içi veya moleküller arası ilişki ve diğer bazı bileşikler (kopigmentler, proteinler, şekerler, bozunma ürünleri gibi) çoğunlukla antosiyaninlerin rengini ve stabilitesini etkileyen başlıca faktörlerdir (Andersen ve Jordheim, 2008).

Antosiyaninler, bitkiler için önemli olmanın yanı sıra insan sağlığı, gıda sektörü, endüstri, enerji sektöründe de önemli bir yere sahiptir. Antioksidan özelliğinde olup DNA, protein gibi moleküllerin oksidasyonunu önlemektedir (Xu ve ark., 2017; Xie ve ark., 2021). Bununla birlikte, kronik hastalık riskini azaltmakta ve iltihabı hafifletmektedir (Jennings ve ark., 2014; Cassidy ve ark., 2015; Mohtashami ve ark., 2019; Liu ve ark., 2021). DNA molekülünde oluşan hasarları onardığı, tümör özellikte hücrelerin apoptozunu artırdığı, lipoproteinleri normal hale getirdiği, trombosit reaktivitesini azalttığı, vasküler endotelial fonksiyonunu ve nörotoksitenin iyileştirilmesine katkı sağladığı görülmüştür (Russo ve ark., 2005; Skupieñ ve ark., 2006; Soltani ve ark., 2014; Skrovankova ve ark., 2015; Satoh ve Ishihara, 2020). Antosiyaninler; boyar madde (saç boyası, kozmetik ürünleri, kumaş boyası vb.) olarak endüstride, alternatif enerji kaynağı olan boya duyarlı güneş pillerinde hassaslaştırıcı olarak kullanımıyla enerji sektöründe, gıda takviyesi, hastalık önleyici ve tedavi edici olarak tıp alanında, rengi artırma, raf ömrünü uzatma amaçlı olarak gıda sektöründe kullanılmaktadır (Onan ve Çölgeçen, 2023). Gıdalarda rengi ve bununla beraber radikallere karşı etkileri sayesinde gıdaların oksidatif stabilitesini de artırmaktadır (Espin ve ark., 2000).

Kontrollü laboratuvar koşullarında, istenen zamanda, standart özellikte ve saflık oranı yüksek olan, az miktarda hammadde kullanılarak fazla miktarda antosiyanin üretilen biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması pek çok sektörde antosiyanin kullanımını kolaylaştıracaktır.

1.1. Bitkilerde Antosiyaninlerin Başlıca Etkinlikleri

Antosiyaninler, bitkinin büyüme ve gelişmesini sağlamaktadır. Çiçek, meyve ve tohum gibi yapılara verdiği renkler, birçok hayvanı ve tozlayıcıyı kendine çekmektedir (Vermerris ve Nicholson, 2006; Buer ve ark., 2010; Shang ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2014). *Arabidopsis* L. polenleri ile yapılan çalışmalarda flavonoidlerin polen çimlenmesini artırıcı özellikte oldukları bildirilmiştir (Taylor ve Grotewold, 2005).

Enfeksiyonlar, düşen hava sıcaklığı, şiddetli ışık, bitki hücrelerinde oluşan oksidatif hasarlar gibi biyotik ve abiyotik stres koşulları, antosiyanin üretimini uyarmaktadır (Tohge ve Fernie, 2017). Bu durum, antosiyaninlerin bu sorunları önleme veya sorunla baş etmede etkili olduğunu düşündürmektedir. Antosiyaninler, patojenik organizmaların, böceklerin sayısını azaltabilmektedir. Domates, patlıcan, biber gibi sebzelere zarar veren bir böcek türü olan *Helicoverpa armigera* L. larvaları antosiyanince zengin tütün yapraklarını tercih etmemiş, tükettiklerinde ise larvaların ölüm oranı önemli ölçüde artmıştır (Malone ve ark., 2009). Biyoteknolojik çalışmalarla antosiyanin bakımından zenginleştirilmiş domates meyvelerinin gri küf duyarlılığı azaldığı görülmüştür (Zhang ve ark., 2013). Başka bir çalışmada antosiyanin üretimi artırılmış transgenik domates bitkileri elde edilmiş ve bu bitkilerin ısı stresine karşı hoşgörüsünün arttığı bildirilmiştir (Meng ve ark., 2015).

Mezofil hücrelerine ait vakuollerde bulunan antosiyaninlerin, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit anyonu (O_2^-) miktarını azalttığı görülmüştür (Kytridis ve Manetas, 2006). Antosiyaninler, UV radyasyonu ile bitkilerde oluşabilecek hasarlara karşı da korumaktadır (Braidot ve ark., 2008; Gomez ve ark., 2011). Mor biberin antosiyanin açısından zengin yapraklarında antosiyanin olmayan dokulara kıyasla daha yüksek bir foto-oksidasyon tolerans gözlenmiştir (Ou ve ark., 2013).

1.2. Antosiyanince Zengin Önemli Bitki Türleri ve Besin Kaynakları

Antosiyaninler, yüksek düzeyde antioksidan aktivitesi ile bilinen şifalı otlar ve baharatlarda, birçok meyve ve sebzede bulunmaktadır (Wang ve Stoner, 2008). *Vaccinium* L. türlerinde (kızılcık, yaban mersini), çilek, kiraz ve üzümde (Muscadines, Concord çeşidi) *Rubus* L. meyvelerinde (kırmızı ve siyah ahududu, böğürtlen) bolca antosiyanin bulunur (Wu ve ark., 2006; de Pascual-Teresa ve Sanchez-Ballesta, 2008). Diğer besin kaynakları arasında kırmızı şarap ve kırmızı lahana, mor renkli pancar, patates ve turp gibi bazı yapraklı ve köklü sebzelerde de bulunduğu bildirilmiştir (Zand ve ark., 2002). Bununla birlikte, antosiyaninler aynı türden bitkiler ve bu bitkilerden elde edilen meyve suları vb. ürünler arasında farklı içerik gösterir. Büyüdükleri ortamlardaki farklılıkların yanı sıra, genetik faktörler, hazırlanmaları ve ekstraksiyon işlemi süreçlerindeki yöntemsel farklılıklar, antosiyaninlerin miktar ve özelliklerinde değişkenliğine neden olur (de Pascual-Teresa ve Sanchez-Ballesta, 2008). Bu bölümde antosiyanince zengin bazı bitki türlerinin ve bitkilerden elde edilen saf meyve sularının içerdiği antosiyanin miktarları Tablo 1’de verilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Bazı bitki türleri ve bitkilerden elde edilen meyve sularında yaklaşık antosiyanin miktarı

Besin ögesi	Antosiyanin miktarı	Kaynaklar
Bleuberry/Yaban mersini (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.)	3-10,15 mg/g	Prior ve ark., 1998; Kähkönen ve ark., 2001, 2003; Franke ve ark., 2004
Black Raspberry/Kara ahududu (<i>Rubus occidentalis</i> L.)	3,25 mg/g	Wu ve ark., 2006
Cherry/ Kiraz (<i>Cerasus avium</i> L. <i>Moench</i>)	1,17 mg/g	Harnly ve ark., 2006
Cranberry/ Yaban mersini (<i>Vaccinium oxycoccus</i> L.)	0,2-3,6 mg/g	Kähkönen ve ark., 2001; Prior ve ark., 2001; Wu ve ark., 2006; Harnly ve ark., 2006
Blackberry/ Böğürtlen (<i>Rubus ideaeus</i> L.)	0,2-2,2 mg/g	Kähkönen ve ark., 2001; Wu ve ark., 2006
Strawberry/ Çilek (<i>Fragaria vesca</i> L.)	0,1-0,8 mg/g	Franke ve ark., 2004; Wu ve ark., 2006
Red Grape/ Kırmızı üzüm (<i>Vitis vinifera</i> L.)	0,45 mg/g	Franke ve ark., 2004; Wu ve ark., 2006
Rice berry/ Kahverengi pirinç (<i>Oryza sativa</i> L.)	0,37 mg/g DW	Jiamyangyuen ve ark., 2017
Red onion/ Kırmızı soğan (<i>Allium cepa</i> L.)	0,09-0,2 mg/g	Jackman ve ark., 1996
Red wine/ Kırmızı şarap	100-1000 mg/L	Glories ve ark., 1988
Black currant/ Siyah frenk üzümü (<i>Ribes nigrum</i> L.)	0,8-8,1 mg/g	Jackman ve ark., 1996; Kähkönen ve ark., 2001, 2003
Stawberry juice /Çilek suyu <i>Chockeberry/ Aronya suyu</i>	21-333 mg/L 3042 mg/L	Timberlake ve ark., 1988 Jakobek ve ark., 2007
<i>Elderberry/ Mürver suyu</i>	4188 mg/L	Jakobek ve ark., 2007
Sweet cerry/Tatlı kiraz suyu (<i>Cerasus avium</i> L.)	256 mg/L	Jakobek ve ark., 2007
Kırmızı yapraklı hanım tuzluğu/Japon kızamık (<i>Berberis thunbergii</i> L.)	11,73 mg/g	Schaefer ve ark., 2007
Şans/Kısmet ağacı (<i>Clerodendrum trichotomum</i> L.)	6 mg/g	Schaefer ve ark., 2007
Kızılcık (<i>Cornus mas</i> L.)	4 mg/g	Schaefer ve ark., 2007
Dağ muşmulası (<i>Cotoneaster melanocarpa</i> L.)	28 mg/g	Schaefer ve ark., 2007
Kara dut (<i>Morus nigra</i> L.)	37 mg/g	Schaefer ve ark., 2007
İncir (<i>Ficus carica</i> L.)	0,025 mg/g FW	Wallace ve Guisti, 2013
Mısır (<i>Zea mays</i> L.)	17,34 mg/g FW	Wallace ve Guisti, 2013
Tatlı patates (<i>Ipomoea batatas</i> L.)	14,07 mg/g FW	Wallace ve Guisti, 2013
Red potatoes/Kırmızı patates (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	5,5 mg/g FW	Wallace ve Guisti, 2013
Purple potatoes (<i>Solanum tuberosum</i> <i>var. violetta</i> L.)	13,83 mg/g FW	Wallace ve Guisti, 2013
Purple carrots /Mor havuç (<i>Daucus carota</i> L.)	0,04-17,99 mg/g DW	Wallace ve Guisti, 2013
Erik (<i>Prunus domestica</i> L.)	0,05-4,49 mg/g DW	Wallace ve Guisti, 2013
Elma (<i>Malus sylvestris</i> L.)	0,01-1,17 mg/g FW	Wallace ve Guisti, 2013
Apricot/Kayısı (<i>Prunus armeniaca</i> L.)	0,025 mg/g	Rababah ve ark., 2011
Blood orange/Kan portakalı (<i>Citrus × sinensis</i>)	0,028 mg/g	Rababah ve ark., 2011

Black currant, Siyah frenk üzümü (<i>Ribes nigrum</i> L.) 100% meyve suyu	176-1298 mg/L	Weidel ve ark., 2011
Bilberry juice /Yaban mersini (<i>Vaccinium myrtillus</i>) 100% meyve suyu	1610-5963 mg/L	Müller ve ark., 2012
Bleuberry (<i>Vaccinium corymbosum</i>) 100% meyve suyu	417 mg/L	Müller ve ark., 2012
Crowberry (<i>Empetrum nigrum</i> L.)	3-5,6 mg/g	Kähkönen ve ark., 2001

* (FW = taze ağırlık, DW = kuru ağırlık).

1.3. Antosiyaninlerin Stabilitesini Etkileyen Faktörler

Antosiyaninler geniş renk yelpazesi ve sağlığa sayısız yararları nedeniyle gıda sektöründe yaygın olarak kullanılan doğal pigmentlerdir. Ancak, antosiyaninlerin kararsız yapıda oluşu, gıdaların işlenmesi sırasında veya sonrasında kolay bozunmalarına, renk kayıplarına ve biyoaktivitelerinin azalmasına yol açmaktadır. Kararlı yapılar oluşturarak antosiyanin stabilitesini artırmak, kullanılmasını da kolaylaştıracaktır. Antosiyaninlerin *in vitro* üretimini sağlamak için yapılarının, biyosentez yolağının ve stabilitesini etkileyen faktörlerin iyi bilinmesi gerekir.

Derlememiz iki bölümden oluşmaktadır. Derlememizin ilk bölümü olan “Antosiyaninlerin Yapısı, Hücrede Biyosentezi, Etkinlikleri ve Kullanım Alanları” başlıklı makalede antosiyaninlerin yapısı ve hücrede biyosentezi ve sağlığa etkileri konusu detaylı olarak verilmiştir (Onan ve Çölgeçen, 2023). Derlememizin bu bölümünde ise *in vitro* üretimi sırasında antosiyaninlerin stabilitesini etkileyen temel bazı faktörlere değinilmiştir. Bu faktörlerin bilinmesi nitelik ve nicelik bakımından istenen özelliklere sahip antosiyanin eldesi için önemlidir.

1.3.1. Işık

Antosiyanin biyosentezi üzerinde elzem olan ışık faktörü, aynı zamanda degradasyonu da tetiklemektedir (Bechtold ve Mussak, 2009). Karanlıkta depolandıklarında renklerini koruyabilme özelliğine sahip antosiyaninlerin, ışıktaki depolandıkları takdirde 1 gün içerisinde renklerinde farklılıklar meydana geldiği görülmüştür (Rein, 2005). Bitki çeşitlerinin ışığa tepkileri farklıdır. Daha açık kırmızı çeşitler genellikle koyu kırmızı, mor ve siyah meyvelere kıyasla daha duyarlıdır (Kliewer, 1970; Steyn ve ark., 2004). Elma, armut, şeftali, nektarin ve kayısı gibi bazı ılıman *Rosa* L. meyvelerinin, kabukta antosiyanin sentezi için mutlak bir ışık gereksinimi olduğu, bununla birlikte, çilek, böğürtlen, üzüm, kiraz ve erik gibi diğer meyvelerin ışık yokluğunda daha az da olsa renk geliştirebildikleri kabul edilir (Allen, 1932). İncirleri olgunlaştırmak için mutlak bir ışık gereksinimi de belgelenmiştir (Puech ve ark., 1976). Kızılıcıktaki antosiyanin seviyelerinin ışığa maruz kalma ile doğru orantılı olarak arttığı bildirilmiştir (Zhou ve Singh, 2002).

1.3.2. Sıcaklık

Sıcaklık antosiyanin sentezini ışıktan sonra, etkileyen en önemli çevresel faktördür. Antosiyanin sentezi için hasattan önce ve/veya hasat sırasında düşük sıcaklıklarda depolama genellikle daha doğrudur (elma,

armut, üzüm, böğürtlen ve kızılıcıkta) (Kliwer, 1970; Naumann ve Wittenburg, 1980; Curry, 1997; Steyn ve ark., 2004). Sıcaklık, antosiyaninlerin degradasyonuna neden olan başlıca faktördür (Patras ve ark., 2010). Aritmetik sıcaklık artışları logaritmik antosiyanin kaybına neden olmaktadır (Dyrby ve ark., 2001; Rhim, 2002; Kırca ve Cemeroglu, 2003; Kırca ve ark., 2007; Castañeda -Ovando ve ark., 2009). Termal stres peroksidaz enzim aktivitesini ve hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarını yüksek düzeyde artırır, bu da antosiyaninin parçalanmasına neden olur (Takahama, 2004). Dondurma veya dondurarak depolamada antosiyanin kaybı olduğu görülmüştür. Bing kirazlarında (*Prunus avium* L.) taze meyvelerde toplam antosiyanin içeriğinin bozunma yüzdesi %12 iken, meyvelerin -23°C'de üç aylık depolanması sonunda toplam antosiyanin içeriğinde %66, altı ay sonunda ise %87; -70°C'de depolandığında üç ay sonunda %90, altı ay sonra %88 bozunma olduğu görülmüştür. Bunun nedeninin özellikle polifenol oksidaz gibi enzimlerin aktivitesinin artması olduğu düşünülmektedir (Chaovanalikit ve Wrolstad, 2004).

1.3.3. Oksijen

Antosiyaninler oksijenle oksitlenebilme özelliğindedir. Bununla birlikte, ortamdaki çeşitli maddeler de oksitleniyor ve bunun sonucunda antosiyaninler bu maddelerle reaksiyon oluşturarak renksiz ve kahverengi bileşikler oluşturuyor olabilir (Rein, 2005). Oksijen, askorbik asidin otooksidasyonuna ve bunun sonucu olarak hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşmasına neden olmaktadır. Bu durum, H₂O₂ tarafından antosiyaninlerde halka açılmasına, renksiz esterlerin ve kumarin türevleri üretilmesine neden olabilmektedir (Özkan, 2002).

1.3.4. Enzim

Polifenol oksidaz (PPO) ve peroksidazlar antosiyaninlerin yıkımına neden olan başlıca enzimlerdir (Kader ve ark., 1997). Bu bozulma peroksidaz nedeniyle gerçekleşen doğrudan bir oksidasyon şeklinde olabileceği gibi, aşamalı da olabilmektedir. Buna göre β-glukosidaz enzimi etkisiyle önce bir deglikosilasyon yaşanmakta, devamında da PPO veya peroksidaz etkisiyle oksidasyon ile bozulma meydana gelmektedir (Barbagallo ve ark., 2007; Oren-Shamir, 2009).

1.3.5. Metaller

Antosiyaninler alüminyum, bakır, kalay ve demirle metal kompleksi oluşturarak stabilitelerini yükseltebilirler (Markakis, 1974). Petunidinin, delfinidin ve siyanidin B halkası yapısında bulunan orto-dihidroksil düzenlenmesi özelliği, antosiyanidin metal-antosiyanin kompleksi ve glikozitleri oluşturmasını sağlarken, pelargonidin, peonidin ve malvidin bu yapıya sahip olmadıklarından metallerle kompleks oluşturamamaktadır (Boulton, 2001).

1.3.6. Kopigmentler

Kopigmentler antosiyaninlerle kompleks oluşturur, böylece daha yoğun ve stabil bileşikler elde edilebilir. Bu maddeler tek başına genelde renksizken, antosiyanin içeren çözeltilere girdiklerinde renk yoğunluğunu artırabilmektedirler (Kırca, 2004). Kopigment olma özelliği birçok bileşikte olmakla beraber, flavonoidler, organik asitler, aminoasitler, polifenoller ve alkaloidler en yaygın kopigmentlerdir (Marković ve ark., 2000; Cortez ve ark., 2017). Uygun tipte kopigment seçimi etkili kopigmentasyonu etkileyen kritik bir faktördür. Kopigmentasyon etkileri gösterdiği bildirilen biyopolimerler arasında peynir altı suyu proteini, pektin, arap zıncığı, dekstran sülfat ve guar sakızı (Jeong ve ark., 2012, 2016; de Almeida Paula ve ark., 2018; Selig ve ark., 2018; Qin ve ark., 2018; Fernandes ve ark., 2020) bulunmaktadır. Fe^{+2} , Fe^{+3} , Mg^{+2} ve Al^{+3} gibi metal iyonları, esas olarak antosiyaninlerin glikozitlerindeki katekol halkasını bağlayarak, antosiyaninin asidik ve alkali ortamlarda batokromik ve hiperkromik kaymasını artırmaktadır (Sigurdson ve ark., 2016). Termal bozunma, kopigmente edilmiş komplekslerin çoğunun stabilitesi için başka bir anahtar faktördür.

Yüksek sıcaklıklarda, kopigmentasyonun etkisi önemsiz olabilir veya hatta olumsuz bir sonuçla sonuçlanabilir. Örneğin, ferulik asit ile fenolik asitlerin 50-70°C'de istenen kopigmentasyonu sağladığı, 90°C'de ise bozulmanın hızlandığı görülmüştür (Fan ve ark., 2019). Sinapik asit ile kopigmentasyonda, 88°C'de 2 dakika ısı işlem gören çilek püresinde %60,6-68,7 antosiyanin kaybı meydana gelmiştir (Terefe ve ark., 2019). Başka bir çalışmada, gallik, ferulik ve kafeik asitlerin eklenmesi renk yoğunlaşmasını göstermekte ancak antosiyaninleri 95°C'de olumsuz şekilde kararsız hale getirmektedir (Qian ve ark., 2017).

Genel olarak, kopigmente antosiyaninlerin renk ve kimyasal stabilitesi, gıda işlemede de yer alan bir dizi farklı süreç ve çevre parametresinden önemli ölçüde etkilenir. Bu nedenle, kopigmente edilmiş kompleksler, gıda ürünleri ve ilgili işleme koşulları ile uyumlu olacak şekilde daha dikkatli tasarlanmalıdır. pH ve ısı işlem, gıda endüstrisinde kopigmentasyona ciddi sınırlamalar getirir. Kapsülleme, biyoaktif bileşiklerin fizikokimyasal özelliklerini koruyabilir ve sağlığı geliştirici özelliklerle bağlantılı kontrollü salımı sağlayabilir. Son zamanlarda, antosiyaninlerin nano/mikroenkapsülasyonu üzerine iki kapsamlı inceleme yapılmıştır (Sharif ve ark., 2020; Tarone ve ark., 2020). Antosiyaninler için ana kapsülleme teknikleri; sprey kurutma, dondurarak kurutma, emülsifikasyon, jelleştirme ve kompleksleştirme tekniklerinin kullanımına dayanmaktadır. Sprey kurutma, antosiyaninleri kapsüllemek için en yaygın yöntemlerden biridir. Bu teknikte, maltodekstrin, modifiye nişasta, zıncıklar, proteinler ve bunların karışımları, enkapsüle edici ajanlar olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Püskürterek kurutulmuş partiküllerin su aktiviteleri düşüktür ve ışık, ısı ve nem varlığında kapsüllenmiş antosiyaninlerin bozunmasını yavaşlatan duvar matrislerine sahiptir. Ancak püskürtme işlemi sırasında yüksek sıcaklık, antosiyaninlerin stabilitesini olumsuz yönde etkileyen önemli bir faktördür (Laokuldilok ve ark., 2015).

1.3.7. Konsantrasyon

Antosiyanin konsantrasyonunun artışı, kendiliğinden birleşme interaksyonu sağlamakta ve stabiliteyi pozitif yönde etkilemektedir (Giusti ve Wrolstad, 2003).

1.3.8. pH

Asidik çözeltilerde çözüldüklerinde, antosiyanin yapısı kimyasal olarak değişir ve bu değişimler geri dönüşümlüdür (Jing, 2006). Antosiyaninlerin stabilitesi asit ortamda daha fazla, alkali ortamda daha azdır. Asitle kırmızı, bazla daha mavi mor olurlar (Rein, 2005; Jordheim, 2007; Keleş, 2015). Oksijenin neden olduğu antosiyanin kararsızlığı da asiteden etkilenir; pH ne kadar yüksek olursa, oksijen varlığında antosiyanin parçalanması o kadar güçlü olur (Markakis, 1982). pH, kopigmente antosiyaninlerin bozunmasını etkileyen önemli bir faktördür. Örneğin, pH < 4'te üretilen kopigmente edilmiş kompleksler, pH 7,0'lık fosfat tamponuna dahil edildikten sonra hemen ayrışmaktadır (Buchweitz ve ark., 2012). Ayrışmış antosiyaninler daha sonra daha zayıf renk yoğunluğuna sahip su tarafından nükleofilik saldırı altında yok edilir. pH 4,5'te hazırlanan antosiyanin-polifenol kopigmente komplekslerinin ısıtmaya (80°C, 150 dakika), UV ışımaya (150 dakika) ve depolamaya (karanlıkta 3 ay) karşı pH 2,5'e göre daha az kararlı olduğu bildirilmiştir (Bąkowska ve ark., 2003).

1.3.9. Askorbik asit

Askorbik asidin antosiyanin üzerinde bozulma sürecini hızlandırdığı bilinmektedir. Pigment polimerleşmeyi artırır ve antosiyanin pigmentlerinde renk azalmasına neden olur. Buna karşın ortamda askorbik asitin olması antosiyaninleri enzimlerin neden olduğu bozulmalara karşı koruyabilir (He ve ark., 2010; Nikkhah ve ark., 2010). Meschter (1953) askorbik asidin parçalanması sonucu oluşan ürünlerden furfural, H₂O₂ ve dehidroaskorbik asitin antosiyaninleri parçaladığını bildirilmiştir.

1.3.10. Şeker

Bitkisel hücre kültürleri çoğunlukla heterotrofik olarak karbonu, sükröz, früktoz gibi karbohidratlardan, inorganik maddeleri ise diğer bileşiklerden alarak gelişir. Şeker miktarı sekonder metabolit üretimi yapan kültürlerin üretkenliklerini etkilemektedir (Yağcı ve ark., 2008). Genellikle fazla konsantrasyonda sükröz (%5), hem hücre büyüme hızında hem antosiyanin üretiminde önemli bir artışa neden olur. Muhtemelen, yüksek sükröz konsantrasyonunda hücre zarının geçirgenliğinin artması nedeniyle hücre hattının antosiyanin bırakma özelliği artmaktadır (Zhong ve ark., 1994). Bu özellik antosiyaninlerin büyük ölçekli üretiminde çok faydalı olabilir.

1.3.11. Nitrat ve fosfat

Azot yoğunluğu, hücre süspansiyon kültürlerinde, aminoasit, protein gibi ürünlerin üretim miktarında etkilidir. Bitki için doku kültürü ortamları olan Murashige ve Skoog (MS), Linsmaier ve Skoog (LS), ve Gamborg B5'te nitrat ve amonyum tuzları azot ihtiyacını karşılamaktadır. Burada yapılan tuz

miktarları değişiklikleri, üretim miktarını da etkilemektedir. *Vitis* sp. (Asma) türlerinde azot miktarında artış, antosiyanin üretimini de artırmıştır (Yamakawa, 1983). Bununla birlikte, fosfat konsantrasyonu da antosiyanin üretiminde etkilidir. Fosfatın yüksek konsantrasyonda olması hücre gelişimini hızlandırır, düşük yoğunlukta olması sekonder ürünlerin birikimini artırır (Sasse ve ark., 1982). Zheng ve ark.'a göre (2020) nitrojen eksikliği, fosfor eksikliği ve bu iki elementin birlikte eksikliği, *Vitis* kabuğunun kallusunda antosiyaninlerin sentezini etkiler. Sonuçlara göre nitrojen ve fosfor eksikliğinin yanı sıra nitrojen ve fosforun birlikte eksikliği antosiyaninlerin birikimini önemli ölçüde teşvik ederken kallus büyümesini engellemiştir (Zheng ve ark., 2020).

1.3.12. Permeabilize ajanlar

Bitki hücre kültürlerinde sentezlenen sekonder metabolitler çoğunlukla sitozolde ve vakuollerde depolanır. Metabolitin hücre dışına salgılanması için hem tonoplast hem plazma membranından oluşan iki ayrı membran bariyerinin, hem de hücre çeperinin aşılması gereklidir. Zar geçirgenliği, membran sistemindeki birbirinden farklı moleküllerin hücreye giriş ve çıkışını sağlayan por oluşumlarına bağlıdır. Dimetil sülfoksit (DMSO), kitosan benzeri polisakkaritler ve izopropanol (Van Uden ve ark., 1990) iyonoforetik, elektroporasyon ve ultrasonikasyon salınım gibi düşük akım kaynaklı araçlar (Brodelius ve ark., 1988) ve yüksek akımlı elektrik alanları, çok yüksek basınç da permeabilize edici ajanlar olarak kullanılmıştır (Dornenburg ve Knorr, 1993). Bourgaud ve ark. (1999) flavonoit üretimi için, *Psoralea* L. cinsine ait 7 ayrı türde yaptığı saçak kök kültürü çalışmalarında permeabilize edici ajan ve elisitör olarak kitosan tercih etmiştir.

1.4. Antosiyaninlerin İn Vitro Üretimi

Antosiyanin elde etmede, laboratuvar koşullarında, aynı özellikte olan, yüksek saflıkta, her daim üretilebilen ve başlangıç materyalinin az miktarda olduğu biyoteknolojik metotlar daha avantajlı olarak görülmektedir. Üretim için sıklıkla kullanılan yöntemler hücre, doku ve kallus kültürüdür, böylece az miktarda başlangıç materyali ile kısa zamanda bitkisel materyalin çoğaltılması sağlanarak daha fazla bileşik üretimi artışı sağlanabilmektedir. Farklı besin ortamları veya farklı kombinasyonlar denemek ürün miktarını artırabilir. Antosiyaninlerin *in vitro* üretimi daha çok araştırma ve deneme gerektiren bir alandır. Şimdilik istenen seviyede üretimi gerçekleştirilememiştir (Kim ve ark., 2004).

Sekonder metabolitlerin büyük ölçekli üretilebilmesi için *in vitro* koşulların metabolik yollarının anlaşılması oldukça önemlidir. Genel olarak, biyoteknolojik çalışmalarda, çeşitli faktörlerin antosiyaninler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Verimliliklerini artırmak için üretim ve birçok metodolojiye başvurulmuştur. Işık, antosiyanin biyosentezinde önemli bir kontrol etkeni olarak kabul edilse de bazı bitki türlerinde karanlıkta antosiyanin üreten hücreler elde edilmiştir (Konczak-Islam ve ark., 2000). Karanlık ortamda antosiyanin üreten hücre hatları ekonomik olarak daha kazançlıdır, ancak karanlık koşullar altında kurulan kültürler nekroz ve ölüme daha yatkındır (Cormier ve ark., 1996). Kallus kültürleri için protokoller geliştirilirken sıcaklık çoğu zaman dikkate alınmasa da bu

parametrenin *in vitro* antosiyanin üretimi için önemli bir çevresel faktör olduğu kanıtlanmıştır ve türe bağlı olduğu görülmektedir. *Cleome rosea* L.' nin kallus kültürlerinde en yüksek pigment üretim oranı 24 ± 2 °C'de elde edilirken, daha yüksek sıcaklıklar kallus kahverengileşmesine neden olmuştur (Simões, 2009). Bu, muhtemelen antosiyanin bozunması ve glukozidazlar tarafından glikosidik bağların hidrolizine bağlı olarak kahverengi yoğunlaşma ürünleri oluşumu nedeniyle gerçekleşmiştir. Yüksek antosiyanin üretimi 30°C'de elde edilmiştir (Narayan, 2005).

Fiziksel faktörlere ek olarak, bitki hücre kültürü ortamının besin bileşimindeki değişiklikler *in vitro* koşullar altında sekonder metabolit üretimini uyarmak için etkili bir stratejidir (Collin, 2001). Kültür ortamına eklenen şekerin yapısı ve konsantrasyonu pigment birikimini etkiler. Şekerler temelde karbon kaynağı olarak kullanılsa da aynı zamanda yüksek konsantrasyonlarda ozmotik ajandır. Ayrıca enerji kaynağıdır ve yapısal bileşenler ve çeşitli genlerin ifadesini düzenleyen fizyolojik sinyallerdir (Jang ve ark., 1997). Sükroz *in vitro* kültürlerde en sık kullanılan şekerdir ve antosiyanin üretimine etkisi literatürde bildirilmiştir (Pasqua ve ark., 2005; Simões ve ark., 2009). Bununla birlikte diğer şekerlerin etkisi de değerlendirilmiştir. Bazı çalışmalara göre diğer şekerlerle karşılaştırıldığında fruktoz içeren ortam, en etkili olan ortam olmuştur. *Aralia cordata* L. (Sakamoto, 1993), *Hibiscus sabdariffa* L. (Mizukami, 1991) ve *Fragaria vesca* L. (çilek) kallus kültürlerinde antosiyanin birikimine neden olmuştur (Mori ve Sakurai, 1994). Laktoz ise mutant bir havuç hücre hattında antosiyanin üretimini artırmıştır (Nagarajan, 1989), *Daucus carota* L.' nin kallus kültürlerinde sükroza manitol takviye edildiğinde antosiyanin miktarında önemli artış olmuştur (Rajendran ve ark., 1992). Beslenme kısıtlaması *in vitro* kültürlerde antosiyanin sentezini uyarmak için etkili bir stratejidir. Genel olarak, bazı besinlerin tükenmesi, sekonder metabolitlerin artmasına yol açmakta, ancak bitkinin büyümesini de sınırlamaktadır (Schiozer ve Barata, 2007).

Bitkilerde fosfor (P), kükürt (S) ve azot (N) başta olmak üzere birçok besin eksikliği, karbohidratların aşırı birikmesi ve dokulardaki fizyolojik bozuklukları antosiyanin artışına neden olmaktadır (Barker ve Pilbeam, 2007). Azot kaynağının yanı sıra, amonyumun (NH_4^+) nitrata (NO_3^-) oranı bitki hücre kültürlerinde antosiyaninlerin üretimini önemli ölçüde etkilemektedir. Murashige ve Skoog (MS) bazal kültür ortamına 70 mM toplam nitrojen molar konsantrasyonu eklendiğinde *Daucus carota*' nın kallus kültürlerinde maksimum antosiyanin birikimi sağlanmıştır (Narayan ve ark., 2005).

Vitis vinifera' da en iyi antosiyanin üretim 60 mM nitrojen (Yamakawa ve ark., 1983) ile sağlanmıştır. 30 mM nitrojen, *Euphorbia millii* L. (Yamamoto ve ark., 1989), *Aralia cordata* (Sakamoto ve ark. 1993) ve *Fragaria vesca* hücrelerinde en fazla antosiyanin üretimine neden olmuştur (Mori ve ark., 1994). *Aralia cordata* L. hücre kültürlerinde en yüksek düzeyde antosiyanin, standart 1:4 molar $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$ oranına sahip MS ortamı yerine, 1:2 modifiye ortamda elde edilmiştir (Sakamoto ve ark., 1993). *Fragaria vesca* (Sato ve ark., 1996), *Daucus carota* (Narayan, 2005) ve *Cleome rosea* L. (Simões ve ark., 2009) kallus kültürlerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Azotun yanı sıra, fosfat konsantrasyonunda değişiklikler de antosiyanin içeriğini artırmak için kullanılmıştır. *Daucus carota*' nın kallus kültürleri MS ortamında düşük seviyelerde tutulan fosfat katı

MS ortamı kültürlerine kıyasla antosiyanin içeriğinde %7,2'ye kadar bir artış göstermiştir (Rajendran, 1992). Fosfat yoksunluğu altında yüksek antosiyanin birikimi de *Vitis vinifera*'nın hücre süspansiyonlarında görülmüştür (Dedaldechamp ve ark., 1995; Dedaldechamp ve Uhel, 1999).

Bitki büyüme düzenleyicilerinin antosiyanin indüksiyonu üzerindeki etkileri değişkendir. Kallus kültürlerinde 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) veya Indol Asetik Asit (IAA) varlığında elde edilenlerle karşılaştırıldığında, 1-naftalenasetik asit (NAA) içeren ortamda gelişen *Glehnia littoralis* L.'de, antosiyanin miktarında neredeyse iki kat artış sağlanmıştır (Miura ve ark., 1998). Diğer yandan, NAA *Oxalis linearis* L.'in kallus kültürlerinde antosiyanin üretimi baskılanmıştır (Meyer ve Van Staden, 1995). *Camptotheca acuminata* hücre kültürlerinde antosiyanin içeriği benzilaminopurin (BAP) ile karşılaştırıldığında kinetin (KIN) varlığında önemli ölçüde daha yüksek olmuştur (Pasqua ve ark., 2005). *Daucus carota* kallusunda maksimum antosiyanin verimliliği ortamda NAA ve KIN olduğunda gözlenmiştir (Narayan ve ark., 2005). Bazı araştırmacılar 2,4-D'nin antosiyaninler dahil çok çeşitli sekonder metabolitlerin üretimini engellediğini öne sürmüş olsalar da (Ozeki ve Komamine, 1981; Schiozer ve Barata, 2007) bu büyüme düzenleyicileri ile kültür ortamı takviyesi kallusta yüksek antosiyanin üretiminin yanı sıra biyokütle artışı da desteklemek için gerekli olduğunu *Fragaria ananassa* L. (Nakamura, 1998), *Ipomoea batatas* L. (Konczak-Islam, 2000), *Daucus carota* (Ceoldo ve ark., 2005) ve *Cleome rosea* (Simões, 2009) ile yapılan çalışmalar kanıtlamıştır. Antosiyanin sentezinin 2,4-D ile düzenlenmesi havuç hücre süspansiyon kültürlerinde değerlendirilmiştir (Ozeki, 1996). Bu çalışma iki tane fenilalanin amonyak-lyaz (PAL) geninin olduğunu göstermiştir. Bu genlerden biri 2,4-D ile spesifik olarak uyarılırken, diğer geni kısa süreli, hızlı ve stres koşullarında aktiveleştirir *Cleome rosea*'nin kallus kültürlerinde yarı güçte optimize edilmiş bir besiyeri formülasyonu oluşturulmuştur. 1:4 oranında NH_4^+ / NO_3^- içeren $\frac{1}{2}$ MS ortamı için 70 g/L sakkaroz ve 0,90 μM 2,4-D içeren ortama aktarılan pigmentli kalluslar formülasyon yüksek bir biyokütle birikimini sürdürmüş ve kullanılan orijinal MS ortamıyla karşılaştırıldığında antosiyanin içeriğinde %150 artış sağlamıştır (Simões ve ark., 2009).

Vaccinium corymbosum L. türü 'Bluecrop' ve 'Duke' çeşitlerinin yapraklarından elde edilen kallus kültürü için 0,1-5,0 mg/L arasında değişen konsantrasyonlarda 2,4-D, BAP, Tidiazuron (TDZ), KIN ve NAA içeren MS veya Woody Plant Medium (WPM) ortamı kullanılan denemelerde 35 gün boyunca gözlenmiştir. Daha sonra seçilmiş kalluslar farklı konsantrasyonlarda ve farklı kombinasyonlarda bitki büyüme düzenleyicisi içeren WPM ortamına da aktarılıp 14 ay büyümesi beklenmiştir. En iyi kallus büyümesi, 0,2 mg/L 2,4-D içeren MS'de gözlenmiştir. Ayrıca MS 1,5 mg/L 2,4-D, 2,0 mg/L BAP, 1,0 mg/L NAA ve 0,1 mg/L TDZ içeren ortam ve 1,0 mg/L 2,4-D, 0,5 mg/L BAP, 2,0 mg/L NAA ve 1,0 mg/L KIN ve 0,5 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BAP içeren ortamlarda da iyi büyüme gözlenmiştir (Ramata-Stunda ve ark., 2020).

Vitis vinifera'nın *in vitro* kültürü kullanılarak antosiyanin üretimi yapılmakta ve elisitörler veya stres faktörleri kullanılarak verimi artırılmaktadır. Mısır (*Zea mays* L.), yüksek siyanidin-3- β -glukozit antosiyanin içeriği nedeniyle önemlidir. Yapılan çalışmada, mor ve beyaz mısır çeşitlerinin *in vivo* ve

in vitro kültürleri kullanılarak siyanidin-3- β -glukozit üretimi mekanizmaları ile değerlendirilmiştir. Beyaz mısır için en yüksek kallus indüksiyonu (%85), 2 mg/L 2,4-D eklenmiş MS ortamında elde edilirken, mor mısır için (%93) N6 ortamında 2 mg/L 2,4-D ile elde edilmiştir. Her iki çeşit için eksplant olarak çimlenmiş tohum kullanılmıştır. Elisitör olarak metil jasmonat eklendiğinde *in vitro*da siyanidin-3- β -glukozitin biriktiği veya üretildiği görülmemiştir. Buna karşılık, beyaz mısırın çimlenmiş tohumları ve kök dokusuna fosfor eksik çözelti uygulandığında en yüksek siyanidin-3- β -glukozit birikimi (0,06 mg/g) gözlenmiştir. Bu yöntem mor mısır için kullanıldığında antosiyaninlerin daha fazla üretildiği saptanmamıştır. Bu nedenle *in vivo* yöntemde beyaz mısırı tercih etmek gelecekteki uygulamalar için optimize edilebilecek kararlı bir antosiyanin üretiminde potansiyel bir yöntem olabileceği bildirilmiştir (Leon-Cisneros ve ark., 2019).

Yaban mersinin (*Vaccinium corymbosum* L. cv) den yaprak, kök ve gövde eksplantları alındıktan sonra farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri (1,0 mg/L BAP ve kombinasyon halinde 2,0 mg/L NAA) içeren Woody Plant Medium (WPM) besin ortamında maksimum kallus gelişimi kullanılan tüm eksplantlarda (yaprak için 1,03, kök için 1,0 ve gövde için 0,8 g/kavanoz) kaydedilmiştir. Aynı WPM ortamında dört alt kültürden sonra farklı ışık türlerinin kallus kültüründe antosiyaninlerin birikimi üzerindeki etkisi incelenmiştir. En yüksek antosiyanin içeriği seviyeleri kontrol olarak karanlıkta yetiştirilen kallus ile karşılaştırıldığında kırmızı ışık altında büyütülen kök (5,7 kat) ve yaprak (4,8 kat) kallusunda gözlenmiştir. Kırmızı ışık, yaprakta elde edilen kallustaki antosiyaninlerin nitel bileşimini kökten elde edilen kallusa göre büyük ölçüde artırmıştır (Abou El-Dis ve ark., 2021).

Tablo 2'de *in vitro* olarak kallus kültürü yöntemi ile antosiyanin üretimi yapılan çalışmalardan bazıları özetlenerek verilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. *In vitro* kallus kültürü yöntemi kullanılarak antosiyanin sentezi yapılan bazı çalışmalar.

Kullanılan takson	Eksplant	Bitki büyüme düzenleyicileri	Kültür ortamı, pH ve fotoperiyot	Kaynak
<i>Catharanthus roseus</i> L., <i>Celosia argentea</i> L., <i>Cordyline terminalis</i> L.	İnternod	2,4-D + BAP + NAA + KIN	MS ortam, pH: 5,8 16 saat / 8 saat (aydınlık / karanlık)	Taha ve ark., 2008
<i>Vaccinium corymbosum</i> L. var. bluecrop	Yaprak	2,4-D + KIN	SH ortam	Migas ve ark., 2005
<i>Cleome rosea</i> L.	Yaprak, gövde	NAA + PIC + 2,4-D + IAA	MS ortam, pH: 5,8 16 saat / 8 saat (aydınlık / karanlık)	Simões ve ark., 2009
<i>Crataegus sinaica</i> L.	Sürgün	KIN + 2,4-D + BAP + NAA	MS ortam, pH: 5,7 16 saat / 8 saat (aydınlık / karanlık)	Maharik ve ark., 2009
<i>Bridelia stipularis</i> L.	Yaprak, internod	NAA + 2,4-D + BAP + KIN	MS ortam, pH: 3-6 aralığında denemeler Aydınlık ortamda	Sreenivas ve ark., 2011
<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	Yaprak	NAA + BAP + AS	WPM ortam	Bolda, 2011

<i>Rosa hybrida</i> L.	Petal, yaprak	2,4-D	MS ve alt kültürde EM ortam, pH: 5,8 Karanlık ortam, alt kültürde 16 saat / 8 saat (aydınlık / karanlık)	Ram, 2011
<i>Hydrocotyle bonariensis</i> L.	Yaprak	2,4-D + KIN	DKW kültür ortamı, Aydınlık ortamda	Masoumian ve ark., 2011
<i>Citrullus colocynthis</i> L.	Yaprak, internod	BAP + NAA + KIN + 2,4-D	MS ortam	Tanveer ve ark., 2012
<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	Yaprak, gövde	NAA + BAP + AS	WPM, AND, MS ortamlar.	Botau ve Bolda, 2013
<i>Rosa gallica</i> L.	Yaprak, yaprak sapı, taç yaprak, anter, pistil	2,4-D + BAP + GA3	MS ortam, pH: 5,7-5,8 16 saat / 8 saat (aydınlık / karanlık)	Tarrahi ve Rezanejad, 2013
<i>Rosa hybrida</i> L.	Yaprak	IBA + KIN + AS	MS ve EM ortam pH: 5,8 Karanlık ortam ve 16 saat / 8 saat (aydınlık / karanlık)	Ram, 2013
<i>Anthocephalus indicus</i> L.	Yaprak	BAP	WPM ortam	Indu ve ark., 2013
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	Tohumdan elde edilen kotiledon parçaları, hipokotil segmentleri ve 7 günlük steril fideler	2,4-D + KIN + BAP	MS ortam pH: 5,8 Aydınlık ortamda	Abeda ve ark., 2014
<i>Malus pumila</i> L.	Yaprak	BAP + KIN + NAA + 2,4-D	MS ortam pH: 5,7 Aydınlık ortamda	Zahedzadeh ve ark., 2015
<i>Rumex vesicarius</i> L.	Kotiledon, hipokotil	IBA + NAA + 2,4-D	MS ortam	El-Shafey ve ark., 2016
<i>Sedum telephium</i> L.	Yaprak, yaprak sapı	BAP + IBA + NAA + KIN + 2,4-D	MS ortam, pH: 5,5 16 saat / 8 saat (aydınlık / karanlık)	Ardelean ve ark., 2017
<i>Angelica archangelica</i> L.	Tohum, yaprak, yaprak sapı, tomurcuk	2,4-D + NAA + BAP	MS ortam	Siatka, 2018
<i>Taraxacum officinale</i> L.	Yaprak	NAA + BAP	MS ortam pH: 5,8 16 saat / 8 saat (aydınlık / karanlık)	Martínez ve ark., 2018
<i>Lamprocapnos spectabilis</i> L.	Yaprak, yaprak sapı ve internod	BAP + IAA + NAA + 2,4-D + PIC	MS ortam	Kulus ve Tymozuk, 2020
<i>Vaccinium corymbosum</i> L.	Gövde, yaprak	N-morfolino etansülfonik asit (MES) + NAA + TDZ + BAP + KIN + 2,4-D	MS ve WPM ortam pH: 5,7 16 saat / 8 saat (aydınlık / karanlık)	Ramata-Stunda ve ark., 2020
<i>V. corymbosum</i> L. cv. Sunt Blue Giant	Yaprak, kök, gövde	NAA + BAP	WPM ortam Karanlık veya farklı renkte ışık	Abou El-Dis ve ark., 2021

*2,4 D: 2,4-diklorofenoksiasetik asit ; BAP: Benzilaminopurin; NAA: 1-naftalenasetik asit; KIN: kinetin; PIC: 4-amino-3,5,6-trikloropikolinik asit; IAA: indol asetik asit; AS: adenin sülfat; GA3: Gibberellik asit; IBA: indol-3-butirik asit.

2. Sonuç

Sekonder metabolitlerin bitkilerin ortama uyum sağlamasında, kendini korumasında ve çoğalmasında pek çok yararlılıkları vardır. İnsanlar için de başta sağlık olmak üzere pek çok kullanım alanı mevcuttur. Ancak sekonder metabolitlerin doğal kaynaklardan ticari olarak üretimi çok verimli değildir. Günümüzde pek çok yararlı maddenin biyoteknolojik yöntem kullanılarak daha ekonomik ve fazla miktarda üretimi mümkündür. Bu üretimin istenen seviyede ve kalitede olabilmesi için kültür ortam şartlarının çok iyi araştırılması ve çalışılması gerekmektedir.

Bundan hareketle, yaptığımız literatür çalışmalarının ışığında elde ettiğimiz verilerin, antosiyaninlerin *in vitro* üretimi ve stabilitesinin sağlanması ile ilgili bölüm bu derlemede siz değerli araştırmacılara kaynak olması amacı ile derlenmiş ve sunulmuştur.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye benzer oranda katkı sağlamış olduğunu beyan eder

Kaynakça

- Abeda HZ., Kouassi MK., Yapo KD., Koffi E., Sie RS., Kone M., Kouakou HT. Production and enhancement of anthocyanin in callus line of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *International Journal of Recent Biotechnology* 2014; 2(1): 45-56.
- Abou El-Dis GR., Zavdetovna KL., Nikolaevich AA., Abdelazeez WMA., Arnoldovna TO. Influence of light on the accumulation of anthocyanins in callus culture of *Vaccinium corymbosum* L. cv. Sunt Blue Giant. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 2021; 8: 100058.
- Allen F. Physical and chemical changes in the ripening of deciduous fruits. *Hilgardia* 1932; 6(13): 381-441.
- Andersen ØM., Jordheim M. The anthocyanins. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRC Press, Boca Raton 2008; 471-553.
- Andersen ØM., Jordheim M., Byamukama R., Mbabazi A., Ogweng G., Skaar I., Kiremire B. Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of *Synadenium grantii* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry* 2010; 71: 1558–1563.
- Ardelean M., Cachiță-Cosma D., Ardelean A., Lădașu FC., Lobiuc A., Zamfirache M., Rosenhech E. Cytological aspects and anthocyanin accumulation observed in *Sedum telephium* ssp. maximum L. callus. *Romanian Biotechnological Letters* 2017; 22(6): 13125-13134.
- Bąkowska A., Kucharska AZ., Oszmiański J. The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin–polyphenol copigment complex. *Food Chemistry* 2003; 81(3): 349-355.

- Barbagallo RN., Palmeri R., Fabiano S., Rapisarda P., Spagna G. Characteristic of b-glucosidase from Sicilian blood oranges in relation to anthocyanin degradation. *Enzyme and Microbial Technology* 2007, 41(5): 570–575.
- Barker AV., Pilbeam DJ. *Handbook of plant nutrition*. USA: CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2007.
- Bechtold T., Mussak R. *Handbook of natural colorants*. e-book ISBN: 978-0-470- 51199-2, John Wiley & Sons, 2009; 8: 412.
- Bolda VV. Studies on elemental composition and antioxidant capacity in callus cultures and native plants of *Vaccinium myrtillus* L. local populations. *Acta Biologica Szegediensis* 2011, 55(2): 255-259.
- Botau D., Bolda V. The selection of some tissue lines producers of anthocyanins in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) callus culture. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies* 2013; 17: 49-52.
- Boulton R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture* 2001; 52(2): 67-87.
- Bourgaud F., Bouque V., Guckert A. Production of flavonoids by *Psoralea* hairy root cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1999; 56(2): 96-103.
- Braidot E., Zancani M., Petrusa E., Peresson C., Bertolini A., Patui S., ... Vianello A. Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Signaling & Behavior* 2008; 3(9): 626-632.
- Brodellius P. Permeabilization of plant cells for release of intracellularly stored products: viability studies. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1988; 27: 561-566.
- Buchweitz M., Carle R., Kammerer DR. Bathochromic and stabilising effects of sugar beet pectin and an isolated pectic fraction on anthocyanins exhibiting pyrogallol and catechol moieties. *Food Chemistry* 2012; 135(4): 3010-3019.
- Buer CS., Imin N., Djordjevic MA. Flavonoids: new roles for old molecules. *Journal of integrative plant biology* 2010; 52(1): 98-111.
- Cassidy A., Rogers G., Peterson JJ., Dwyer JT., Lin H., Jacques PF. Higher dietary anthocyanin and flavonol intakes are associated with anti-inflammatory effects in a population of US adults. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2015; 102(1): 172-181.
- Castañeda-Ovando A., de Lourdes Pacheco-Hernández M., Páez-Hernández ME., Rodríguez JA., Galán-Vidal CA. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food chemistry* 2009; 113(4): 859-871.
- Ceoldo S., Levi M., Marconi AM., Baldan G., Giarola M., Guzzo F. Image analysis and *in vivo* imaging as tools for investigation of productivity dynamics in anthocyanin-producing cell cultures of *Daucus carota*. *New Phytologist* 2005; 166(1): 339-352.
- Chaovanalikit A., Wrolstad RE. Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *Journal of Food Science* 2004; 69(1): 67-72.

- Collin HA. Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 2001, 34: 119-134.
- Cormier F., Brion F., Do CB., Moresoli C. Development of process strategies for anthocyanin-based food colorant production using *Vitis vinifera* cell cultures. In: Di Cosmo F, Misawa M (eds.) *Plant cell cultures secondary metabolism: Toward industrial application*. New York: CRC Press, 1996.
- Cortez R., Luna-Vital DA., Margulis D., Gonzalez de Mejia E. Natural pigments: stabilization methods of anthocyanins for food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2017; 16(1): 180-198.
- Curry EA. Temperatures for optimum anthocyanin accumulation in apple tissue. *Journal of Horticultural Science* 1997; 72(5): 723-729.
- de Almeida Paula D., Ramos AM., de Oliveira EB., Martins EMF., de Barros FAR., Vidigal MCTR., da Rocha CT. Increased thermal stability of anthocyanins at pH 4,0 by guar gum in aqueous dispersions and in double emulsions W/O/W. *International Journal of Biological Macromolecules* 2018; 117: 665-672.
- de Pascual-Teresa S., Sanchez-Ballesta MT. Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry Reviews* 2008; 7: 281-299.
- Dedaldechamp F., Uhel C., Macheix J. Enhancement of anthocyanin synthesis and dihydroflavonol reductase (DFR) activity in response to phosphate deprivation in grape cell suspensions. *Phytochemistry* 1995; 40(5): 1357-1360.
- Dedaldechamp F., Uhel C. Induction of anthocyanin synthesis in nonpigmented grape cell suspensions by acting on DFR substrate availability or precursors level. *Enzyme and Microbial Technology* 1999; 25: 316–321.
- Dornenburg H., Knorr D. Cellular permeabilization of cultured tissues by high electric field pulses or ultra high pressure for the recovery of secondary metabolites. *Food Biotechnology* 1993; 7: 35–48.
- Dyrby M., Westergaard N., Stapelfeldt H. Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. *Food chemistry* 2001; 72(4): 431-437.
- El-Shafey NM., Ahmed ES., Sayed M., Hammouda O., Khodary SA. Effect of growth regulators, carbohydrates and antioxidant compounds on biomass, flavonoid accumulation and enzyme activity in callus cultures of *Rumex vesicarius* L. *Egyptian Journal of Botany* 2016; 56: 595-612.
- Espin JC., Soler-Rivas C., Wichers H., Garcia-Viguera C. Anthocyanin based natural colorants: A new Source of Foodstuff, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000; 48: 1588-1592.
- Fan L., Wang Y., Xie P., Zhang L., Li Y., Zhou J. Copigmentation effects of phenolics on color enhancement and stability of blackberry wine residue anthocyanins: Chromaticity, kinetics and structural simulation. *Food Chemistry* 2019; 275: 299-308.

- Fenger JA., Sigurdson GT., Robbine RJ., Collins TM., Giusti MM., Dangles O. Acylated anthocyanins from red cabbage and purple sweet potato can bind metal ions and produce stable blue colors. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 22(9): 4551.
- Fernandes A., Oliveira J., Fonseca F., Ferreira-da-Silva F., Mateus N., Vincken JP., de Freitas V. Molecular binding between anthocyanins and pectic polysaccharides—Unveiling the role of pectic polysaccharides structure. *Food Hydrocolloids* 2020; 102: 105625.
- Franke AA., Custer LJ., Arakaki C., Murphy, SP. Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis* 2004; 17(1): 1-35.
- Giusti MM., Wrolstad RE. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal* 2003; 14 (3): 217-225.
- Glories Y. Anthocyanins and tannins from wine: organoleptic properties. *Progress in Clinical and Biological Research* 1988; 280: 123-134.
- Gomez C., Conejero G., Torregrosa L., Cheynier V., Terrier N., Ageorges A. *In vivo* grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST. *The Plant Journal* 2011; 67(6): 960-970.
- Harnly JM., Doherty RF., Beecher GR., Holden JM., Haytowitz DB., Bhagwat S., Gebhardt S. Flavonoid content of US fruits, vegetables, and nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006; 54(26): 9966-9977.
- He F., Mu L., Yan GL., Liang NN., Pan QH., Wang J., ... Duan CQ. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules* 2010; 15(12): 9057-9091.
- Indu S., Vijaya L., Meeta B., Jossy V., Naresh C. Production of flavonoids in callus culture of *Anthocephalus indicus* A. Rich. *Asian Journal of Plant Sciences* 2013; 12(1): 40-45.
- Jackman RL, Smith JL. Anthocyanins and betalains. *Natural Food Colorants* 1996; 244-309.
- Jakobek L., Seruga M., Medvidovic-Kosanovic M., Novak I. Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices. *Deutsche Lebensmittelrundscha* 2007; 103(2): 58.
- Jang JC., Leon P., Zhou L., Sheen J. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *The Plant Cell* 1997; 9(1): 5-19.
- Jennings A., Welch AA., Spector T., Macgregor A., Cassidy A. Intakes of anthocyanins and flavones are associated with biomarkers of insulin resistance and inflammation in women. *The Journal of nutrition* 2014; 144(2): 202-208.
- Jeong D., Na K. Chondroitin sulfate based nanocomplex for enhancing the stability and activity of anthocyanin. *Carbohydrat Polymers* 2012; 90 (1): 507-515.
- Jeong D., Bae BC., Park SJ., Na K. Reactive oxygen species responsive drug releasing nanoparticle based on chondroitin sulfate-anthocyanin nanocomplex for efficient tumor therapy. *Journal of Controlled Release* 2016; 222: 78–85.
- Jiamyangyuen S., Nuengchamnong N., Ngamdee P. Bioactivity and chemical components of Thai rice in five stages of grain development. *Journal of Cereal Science* 2017; 74: 136-144.

- Jing P. Purple corn anthocyanins: chemical structure, chemoprotective activity and structure/function relationships. Doctoral dissertation, The Ohio State University, 263 p., USA, 2006.
- Jordheim M. Isolation, identification and properties of pyranoanthocyanins and anthocyanin forms. Journal of Controlled Release. University of Bergen Doctoral Thesis, 108 pp., Norway, 2007.
- Kader F., Rovel B., Girardin M., Metche M. Mechanism of browning in fresh highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.). Role of blueberry polyphenol oxidase, chlorogenic acid and anthocyanins. Journal of the Science of Food and Agriculture 1997; 74(1): 31-34.
- Kähkönen MP., Hopia AI., Heinonen M. Berry phenolics and their antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2001; 49: 4076-4082.
- Kähkönen MP., Heinämäki J., Ollilainen V., Heinonen M. Berry anthocyanins: Isolation, identification and antioxidant activities. Journal Science Food Agricultural 2003; 83: 1403-1411.
- Kaur S., Sharma N., Kapoor P., Chunduri V., Pandey AK., Garg M. Spotlight on the overlapping routes and partners for anthocyanin transport in plants. Physiologia Plantarum 2021, 171(4): 868-881.
- Keleş Y. Antosiyanin pigmentlerin biyokimyası ve analizi. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 2015; (1): 19-25.
- Kırca A., Cemeroglu B. Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. Food Chemistry 2003; 81(4): 583-587.
- Kırca A. Siyah havuç antosiyaninlerinin bazı meyve ürünlerinde ısıl stabilitesi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, sayfa no: 109, Ankara, Türkiye, 2004.
- Kırca A., Özkan M., Cemeroglu B. Thermal stability of black carrot anthocyanins in blond orange juice. Journal of Food Quality 2007; 26(5): 361-366.
- Kim BJ., Gibson DM., Shuler ML. Effect of subculture and elicitation on instability of taxol production in *Taxus* sp. suspension cultures. Biotechnology Progress 2004; 20(6): 1666-1673.
- Kliewer WM. Effect of day temperature and light intensity on coloration of *Vitis vinifera* L. Grapes1. Journal of the American Society for Horticultural Science 1970; 95(6): 693-697.
- Kong JM., Chia LS., Goh NK., Chia TF., Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry 2003; 64(5): 923-933.
- Konczak-Islam I., Yoshinaga M., Nakatani M., Terahara N., Yamakawa O. Establishment and characteristics of an anthocyanin-producing cell line from sweet potato storage root. Plant Cell Reports 2000; 19: 472-477.
- Kulus D., Tymoszuk A. Induction of callogenesis, organogenesis, and embryogenesis in non-meristematic explants of bleeding heart and evaluation of chemical diversity of key metabolites from callus. International Journal of Molecular Sciences 2020; 21(16): 5826.
- Kytridis VP., Manetas Y. Mesophyll versus epidermal anthocyanins as potential *in vivo* antioxidants: evidence linking the putative antioxidant role to the proximity of oxy-radical source. Journal of Experimental Botany 2006, 57(10): 2203-2210.

- Laokuldilok T., Kanha N. Effects of processing conditions on powder properties of black glutinous rice (*Oryza sativa* L.) bran anthocyanins produced by spray drying and freeze drying. *LWT-Food Science and Technology* 2015, 64(1): 405–411.
- Leon-Cisneros S., Quirola-Garcés A., Alvarez-Santana J., Barriga-Medina N., Ramirez- Villacís D., Caviedes M., Leon-Reyes A. Evaluation of anthocyanin production in white and purple maize (*Zea mays* L.) using methyl jasmonate, phosphorus deficiency and high concentration of sucrose. *Cereal Research Communications* 2019; 47(4): 604-614.
- Liu J., Hao W., He Z., Kwek E., Zhu H., Ma N., ... Chen ZY. Blueberry and cranberry anthocyanin extracts reduce bodyweight and modulate gut microbiota in C57BL/6 J mice fed with a high-fat diet. *European Journal of Nutrition* 2021; 60: 2735-2746.
- Maharik N., Elgengaihi S. Taha H. Anthocyanin production in callus cultures of *Crataegus sinaica* boiss. *International Journal of Academic Research* 2009; 1(1): 30-34.
- Malone LA., Barraclough EI., Lin-Wang K., Stevenson DE., Allan AC. Effects of red-leaved transgenic tobacco expressing aMYB transcription factor on two herbivorous insects, *Spodoptera litura* and *Helicoverpa armigera*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 2009, 133: 117–127.
- Markakis P. Anthocyanins and their stability in food. *CRC Critical Reviews in Food Technology* 1974; 4: 437–456.
- Markakis P. Stability of anthocyanins in foods. *Anthocyanins as Food Colors* 1982; 163: 180.
- Marković D., Petranović NA., Baranac JM. A spectrophotometric study of the copigmentation of malvin with caffeic and ferulic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000; 48(11): 5530-5536.
- Martínez ME., Poirrier P., Prüfer D., Gronover CS., Jorquera L., Ferrer P., ... Chamy R. Kinetics and modeling of cell growth for potential anthocyanin induction in cultures of *Taraxacum officinale* GH Weber ex Wiggers (Dandelion) *in vitro*. *Electronic Journal of Biotechnology* 2018; 36: 15-23.
- Masoumian M., Arbakariya A., Syahida A., Maziah M. Flavonoids production in *Hydrocotyle bonariensis* callus tissues. *Journal of Medicinal Plants Research* 2011; 5(9): 1564-1574.
- Meng X., Wang JR., Wang GD., Liang XQ., Li XD., Meng QW. An R2R3-MYB gene, LeAN2, positively regulated the thermo-tolerance in transgenic tomato. *Journal Plant Physiology* 2015, 175: 1–8.
- Meschter EE. Effects of carbohydrates and other factors on strawberry products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1953; 1: 574–579.
- Meyer HJ., Van Staden J. The *in vitro* production of an anthocyanin from callus cultures of *Oxalis linearis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1995; 40: 55-58.
- Migas P., Cisowski W. Dembińska-Migas W. Isoprene derivatives from the leaves and callus cultures of *Vaccinium corymbosum* var. bluecrop. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 2005; 62 (1): 45-51.

- Miura H., Kitamura Y., Ikenaga T., Mizobe K., Shimizu T., Nakamura M., ... Goda Y. Anthocyanin production of *Glehnia littoralis* callus cultures. *Phytochemistry* 1998; 48(2): 279-283.
- Mizukami H., Nakamura M., Tomita K., Higuchi K., Ohashi H. Effects of macronutrients on anthocyanin production in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) callus cultures. *Plant Tissue Culture Letters* 1991; 8(1): 14-20.
- Mohtashami R., Huseini HF., Nabati F., Hajiaghaee R., Kianbakht S. Effects of standardized hydro-alcoholic extract of *Vaccinium arctostaphylos* leaf on hypertension and biochemical parameters in hypertensive hyperlipidemic type 2 diabetic patients: a randomized, double-blind and placebo-controlled clinical trial. *Avicenna Journal of Phytomedicine* 2019; 9(1): 44.
- Mori T., Sakurai M. Production of anthocyanin from strawberry cell suspension cultures; effects of sugar and nitrogen. *Journal of Food Science* 1994; 59(3): 588-593.
- Müller D., Schantz M., Richling E. High performance liquid chromatography analysis of anthocyanins in bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.), blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), and corresponding juices. *Journal of Food Science* 2012; 77(4): C340-C345.
- Nagarajan RP., Keshavarz E., Gerson DF. Optimization of anthocyanin yield in a mutated carrot cell line (*Daucus carota*) and its implications in large scale production. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1989; 68(2): 102-106.
- Nakamura M., Seki M., Furusaki S. Enhanced anthocyanin methylation by growth limitation in strawberry suspension culture. *Enzyme and Microbial Technology* 1998; 22(5): 404-408.
- Narayan MS., Thimmaraju R., Bhagyalakshmi B. Interplay of growth regulators during solid-state and liquid-state batch cultivation of anthocyanin producing cell line of *Daucus carota*. *Process Biochemistry* 2005; 40: 351-358.
- Naumann WD., Wittenburg U. Anthocyanins, soluble solids, and titratable acidity in blackberries as influenced by preharvest temperatures. In *Symposium on Breeding and Machine Harvesting of Rubus*, 1980, July, page: 183-190.
- Nikkhah E., Khaiamy M., Heidary R., Azar AS. The effect of ascorbic acid and H₂O₂ treatment on the stability of anthocyanin pigments in berries. *Turkish Journal of Biology* 2010; 34(1): 47-53.
- Onan E. ve Çölgeçen H. Antosiyaninlerin yapısı, hücrede biyosentezi, etkinlikleri ve kullanım alanları. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2023; 6(1): 982-1005.
- Oren-Shamir M. Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants? *Plant Science* 2009, 177: 310–316.
- Ou LJ., Zhan, ZQ., Dai XZ., Zou XX. Photooxidation tolerance characters of a new purple pepper. *PLoS ONE* 2013, 8: 63593.
- Ozeki Y., Komamine A. Induction of anthocyanin synthesis in relation to embryogenesis in a carrot suspension culture: correlation of metabolic differentiation with morphological differentiation. *Physiologia Plantarum* 1981; 53(4): 570-577.

- Ozeki Y. Regulation of anthocyanin synthesis in carrot suspension cultured cells. *Journal of Plant Research* 1996; 109(3): 343-351.
- Özkan M. Degradation of anthocyanins in sour cherry and pomegranate juices by hydrogen peroxide in the presence of added ascorbic acid. *Food Chemistry* 2002; 78(4): 499-504.
- Pasqua G., Monacelli B., Mulinacci N., Rinaldi S., Giaccherini C., Innocenti M., Vinceri FF. The effect of growth regulators and sucrose on anthocyanin production in *Camptotheca acuminata* cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* 2005; 43(3): 293-298.
- Patras A., Brunton NP., O'Donnell C., Tiwari BK. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology* 2010; 21(1): 3-11.
- Prior RL., Cao G., Martin A., Sofic E., McEwen J., O'Brien C., Lischner N., Ehlenfeldt M., Kalt W., Krewer G., Mainland CM. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998; 46: 2686-2693.
- Prior RL., Lazarus SA., Cao G., Muccitelli H., Hammerstone JF. Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001; 49(3): 1270-1276.
- Puech AA., Rebeiz CA, Crane JC. Pigment changes associated with the application of Ethephon ((2-chloroethyl) phosphonic acid) to fig (*Ficus carica* L.) fruits. *Plant Physiology* 1976; 57: 504–509.
- Qian BJ., Liu JH., Zhao SJ., Cai JX. Jing P. The effects of gallic/ferulic/caffeic acids on colour intensification and anthocyanin stability. *Food Chemistry* 2017; 228: 526– 532.
- Qin X., Yuan D., Wang Q., Hu Z., Wu Y., Cai J., ... Liu G. Maillard-reacted whey protein isolates enhance thermal stability of anthocyanins over a wide pH range. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2018; 66(36): 9556-9564.
- Rababah TM., Al-Mahasneh MA., Kilani I., Yang W., Alhamad MN., Ereifej K., Al-u'datt M. Effect of jam processing and storage on total phenolics, antioxidant activity, and anthocyanins of different fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2011; 91(6): 1096-1102.
- Rajendran L., Ravishankar GA., Venkataraman LV., Prathiba KR. Anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* as influenced by nutrient stress and osmoticum. *Biotechnology Letters* 1992; 14: 707-712.
- Ram M., Prasad KV., Kaur C., Singh SK., Arora A., Kumar S. Induction of anthocyanin pigments in callus cultures of *Rosa hybrida* L. in response to sucrose and ammonical nitrogen levels. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 2011; 104: 171-179.
- Ram M., Prasad K., Singh S., Hada B. Kumar S. Influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitation on anthocyanin production in callus cultures of *Rosa hybrida* L. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 2013; 3: 459-467.

- Ramata-Stunda A., Valkovska V., Boroduškis M., Livkiša D., Kaktiņa E., Silamiķele B., Rostoks N. Development of metabolic engineering approaches to regulate the content of total phenolics, antiradical activity and organic acids in callus cultures of the highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Agronomy Research* 2020; 18(S3): 1860-1872.
- Rein MJ. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology Academic Dissertation, page: 87, Helsinki, Finland, 2005.
- Rhim JW. Kinetics of thermal degradation of anthocyanin pigment solutions driven from red flower cabbage. *Food Science and Biotechnology* 2002; 11(4): 361-364.
- Russo A., La Fauci L., Acquaviva R., Campisi A., Raciti G., Scifo C., ... Galvano F. Ochratoxin A-induced DNA damage in human fibroblast: protective effect of cyanidin 3-O-β-D-glucoside. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2005; 16(1): 31-37.
- Sakamoto K., Iida K., Sawamura K. Effects of nutrients on anthocyanin production in cultured cells of *Aralia cordata*. *Phytochemistry* 1993; 33(2): 357-360.
- Sasse F., Knobloch KH., Berlin J. Induction of secondary metabolism in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum* and *Peganum harmala*. In *Plant tissue culture 1982: proceedings, 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture held at Tokyo and Lake*, 11-16 July 1982, Yamanake, Japan, , Akio Fujiwara (Ed.). Tokyo.
- Sato K., Nakayama M., Shigeta JI. Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cell cultures of strawberry. *Plant Science* 1996; 113(1): 91-98.
- Satoh Y., Ishihara K. Investigation of the antimicrobial activity of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract against periodontopathic bacteria. *Journal of Oral Biosciences* 2020; 62(2): 169-174.
- Schaefer HM., McGraw K., Catoni C. *Journal compilation British Ecological Society, Functional Ecology* 2007; 22: 303-310.
- Schiozer AL., Barata LES. Stability of natural pigments and dyes. *Rev Fitos* 2007; 3(2): 6-23.
- Selig MJ., Celli GB., Tan C., La E., Mills E., Webley AD., ... Abbaspourrad A. High pressure processing of beet extract complexed with anionic polysaccharides enhances red color thermal stability at low pH. *Food Hydrocolloids* 2018; 80: 292-297.
- Shang Y., Venail J., Mackay S., Bailey PC, Schwinn KE., Jameson PE., Davies KM. The molecular basis for venation patterning of pigmentation and its effect on pollinator attraction in flowers of *Antirrhinum*. *New Phytologist* 2011, 189(2): 602-615.
- Sharif N., Khoshnoudi-Nia S., Jafari SM. Nano/microencapsulation of anthocyanins; a systematic review and meta-analysis. *Food Research International* 2020; 132: 109077.
- Siatka T. Production of anthocyanins in callus cultures of *Angelica archangelica*. *Natural Product Communications* 2018; 13(12): 1934578X1801301219.

- Sigurdson GT., Robbins RJ., Collins TM., Giusti MM. Evaluating the role of metal ions in the bathochromic and hyperchromic responses of cyanidin derivatives in acidic and alkaline pH. *Food Chemistry* 2016; 208: 26-34.
- Simões C., Bizarri CHB., da Silva Cordeiro L., de Castro TC., Coutada LCM., da Silva AJR., Albarello N. Mansur E. Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS. *Plant Physiology and Biochemistry* 2009; 47(10): 895-903.
- Skrovankova S., Sumczynski D., Mlcek J., Jurikova T., Sochor J. Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International Journal of Molecular Sciences* 2015; 16(10): 24673-24706.
- Skupień K., Oszmiański J., Kostrzewa-Nowak D., Tarasiuk J. *In vitro* antileukaemic activity of extracts from berry plant leaves against sensitive and multidrug resistant HL60 cells. *Cancer Letters* 2006; 236(2): 282-291.
- Soltani R., Hakimi M., Asgary S., Ghanadian M., Keshvari M., Sarrafzadegan N. Evaluation of the effects of *Vaccinium arctostaphylos* L. Fruit extract on serum lipids and hs-CRP levels and oxidative stress in adult patients with hyperlipidemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014; Article ID 217451.
- Sreenivas VK., Jisha VN., Martin KP., Madhusoodanan PV. *Bridelia stipularis*: a new source for anthocyanin production *in vitro*. *Acta Physiologiae Plantarum* 2011; 33: 2051-2056.
- Steyn WJ., Holcroft DM., Wand SJE., Jacobs G. Anthocyanin degradation in detached pome fruit with reference to preharvest red color loss and pigmentation patterns of blushed and fully red pears. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 2004; 129(1): 13-19.
- Taha HS., Abd El-Rahman RA., Fathalla A., Abd-El-Kareem M., Aly UE. Successful application for enhancement and production of anthocyanin pigment from calli cultures of some ornamental plants. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 2008; 2: 1148-1156.
- Takahama U. Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: physiological significance of the oxidation reactions. *Phytochemistry Reviews* 2004; 3: 207-219.
- Tanveer H., Safdar A., Asi MR. Appraisal of an important flavonoid, quercetin, in callus cultures of *Citrullus colocynthis*. *International Journal of Agriculture and Biology* 2012; 14(4).
- Tarone AG., Cazarin CBB., Marostica Junior MR. Anthocyanins: new techniques and challenges in microencapsulation. *Food Research International* 2020; 133: 109092.
- Tarrahi R., Rezanejad F. Callogenesis and production of anthocyanin and chlorophyll in callus cultures of vegetative and floral explants in *Rosa gallica* and *Rosa hybrida* (Rosaceae). *Turkish Journal of Botany* 2013; 37(6): 1145-1154.
- Taylor LP., Grotewold E. Flavonoids as developmental regulators. *Current Opinion in Plant Biology* 2005; 8: 317-323.

- Terefe NS., Netzel GA., Netzel ME. Copigmentation with sinapic acid improves the stability of anthocyanins in highpressure-processed strawberry purees. *Journal of Chemistry* 2019; 3138608.
- Timberlake CF., Henry BS. Anthocyanins as natural food colorants. *Progress in Clinical and Biological Research* 1988; 280: 107-121.
- Tohge T. and Fernie AR. Leveraging natural variance towards enhanced understanding of phytochemical sunscreens. *Trends in Plant Science* 2017, 22(4): 308-315.
- Xie Y., Wang H., He Z. Recent advances in polyphenols improving vascular endothelial dysfunction induced by endogenous toxicity. *Journal of Applied Toxicology* 2021; 41(5): 701-712.
- Xu Z., Mahmood K., Rothstein SJ. ROS induces anthocyanin production via late biosynthetic genes and anthocyanin deficiency confers the hypersensitivity to ROS-generating stresses in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 2017; 58(8): 1364-1377.
- Van Uden W., Pras N., Malingré TM. On the improvement of the podophyllotoxin production by phenylpropanoid precursor feeding to cell cultures of *Podophyllum hexandrum* Royle. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1990; 23: 217-224.
- Vermerris W., Nicholson R. Phenolic compound biochemistry, ISBN: 978-1-4020-5163-0, Netherlands, Springer 2006; 1-62.
- Wallace TC., Giusti MM. 1st Edition, Anthocyanins in health and disease. ISBN: 9780429067341, e-book, 2013; 368.
- Wang LS., Stoner GD. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters* 2008; 269(2): 281-290.
- Weidel E., Schantz M., Richling E. Anthocyanin contents in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) juices and fruit drinks. *Fruit processing: Journal for the Fruit Processing and Juice Producing European And Overseas Industry* 2011; 21(3): 102-107.
- Wu X., Beecher GR., Holden JM., Haytowitz DB., Gebhardt SE., Prior RL. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006; 54(11): 4069-4075.
- Yağcı C., Toker MC., Toker G. Bitki doku kültürü yoluyla üretilen flavonoidler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2008; (1): 47-58.
- Yamakawa T., Kato S., Ishida K., Kodama T., Minoda Y. Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension culture. *Agricultural and Biological Chemistry* 1983; 47(10): 2185-2191.
- Yamamoto Y., Kinoshita Y., Watanabe S., Yamada Y. Anthocyanin production in suspension cultures of high-producing cells of *Euphorbia millii*. *Agricultural and Biological Chemistry* 1989; 53(2): 417-423.
- Zahedzadeh F., Kakavand F., Mahna N. Effects of carbohydrate, light, nitrogen and magnesium on *in vitro* production of anthocyanin in apple. *International Journal of Biosciences* 2015; 6(5): 250-260.

- Zand RSR., Jenkins DJ., Diamandis EP. Flavonoids and steroid hormone-dependent cancers. *Journal of Chromatography B* 2002; 777(1-2): 219-232.
- Zhang Y., Butelli E., De Stefano R., Schoonbeek HJ., Magusin A., Pagliarani C., Martin C. Anthocyanins double the shelf life of tomatoes by delaying overripening and reducing susceptibility to gray mold. *Current Biology* 2013, 23: 1094-1100.
- Zhang Y., Butelli E., Martin C. Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2014; 19: 81-90.
- Zhao X., Zhang SS., Zhang XK., He F., Duan CQ. An effective method for the semi-preparative isolation of high-purity anthocyanin monomers from grape pomace. *Food chemistry* 2020; 310: 125830.
- Zheng HZ., Wei H., Guo SH., Yang X., Feng MX., Jin XQ., ... Meng JF. Nitrogen and phosphorus co-starvation inhibits anthocyanin synthesis in the callus of grape berry skin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 2020; 142: 313-325.
- Zhong JJ., Xu GR., Yoshida T. Effects of initial sucrose concentration on excretion of anthocyanin pigments in suspended cultures of *Perilla frutescens* cells. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 1994; 10: 590-592.
- Zhou Y., Singh BR. Red light stimulates flowering and anthocyanin biosynthesis in American cranberry. *Plant Growth Regulation* 2002; 38: 165-171.