

# Antosiyanınların Biyoteknolojik Yöntemlerle Üretimi

## Production of Anthocyanins by Biotechnological Methods

Emine Sema ÇETİN<sup>1</sup>, Hale SEÇİLMİŞ CANBAY<sup>2</sup>, Selda DALER<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Yozgat Bozok Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Yozgat, Türkiye

<sup>2</sup> Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Burdur, Türkiye

<sup>3</sup> Yozgat Bozok Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Yozgat, Türkiye

### ÖZ

**Amaç:** Bitkiler sağlık sektöründen gıda sektörüne, kozmetikten tekstil sektörüne kadar çok geniş bir yelpazede kullanılan bazı sekonder bileşikler üretmektedirler. Bu bileşiklerden bazılarının insanlarda antioksidan, antiinflamatuar, antialerjik, antiülser, antibiyotik ve antikanserojenik etkilere sahip olduklarının belirlenmesi ile birlikte bu bileşikler yoğun olarak üreten bitkilere ilgi artmıştır. Söz konusu bileşiklerin yüksek miktarlarda elde edilmesi önemli olup, geleneksel ekstraksiyon yöntemleri ile düşük miktar ve saflıklarda elde edilebildikleri bilinmektedir.

**Yöntem:** Bu bileşiklerin biyoteknolojik yöntemlerle daha yüksek miktar, kalite ve saflıkta elde edilebilmesi, çalışmaların bu alana odaklanmasını sağlamıştır. Bu çalışma ile de Alphonse Lavalley üzümlerine ait yapraklardan kallus kültürü ile antosiyanın bileşiklerinin üretilmesi ve HPLC ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Bulgular:** Altı farklı besin ortamının kullanıldığı bu araştırma sonucunda kalluslardan elde edilen antosiyanın miktarlarının 8.716 ile 94.501 µg/g arasında değiştiği belirlenmiştir.

**Sonuç:** İnsan sağlığı açısından son derece değerli, aynı zamanda katma değeri de yüksek olan bileşenlerin çevreyi tahrip etmeksizin yüksek miktarlarda ve sürdürülebilir üretimi için doku kültürü teknikleri ile farklı uygulamalarla eldesi önemlidir.

**Anahtar Kelimeler:** Üzüm, Kallus, HPLC, Antosiyanın.

### ABSTRACT

**Objective:** Plants produce some secondary compounds which are used in medicine, food, cosmetics and textile industries. Some of these compounds are effective in humans such as antioxidant, antiinflammatory, antiallergic, antiulcer, antibiotic and anticarcinogenic therefore the interest in plants that intensively produce these compounds has increased. It is important that to obtain these compounds on high levels, but it is known that they are obtained at lower levels by traditional extraction methods.

**Methods:** These compounds can be obtained with high-quality, quantity and purity by biotechnological methods. Therefore, studies have focused on these techniques. In this study, it was aimed that the production of anthocyanins by callus culture obtained from the leaves of the Alphonse Lavalley grape variety and it was also aimed the determination of these compounds with HPLC.

**Results:** As a result of this research, six media were used and the anthocyanin contents were changed between 8.716 and 94.501 µg/g.

**Conclusion:** It is important to obtain high-value and sustainable production of the components which are highly valuable for human health and which have high added value without damaging the environment with tissue culture techniques and different applications.

**Key words:** Grape, Callus, HPLC, Anthocyanin.

**Sorumlu Yazar:** Emine Sema ÇETİN

Yozgat Bozok Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Yozgat, Türkiye  
[esema.cetin@bozok.edu.tr](mailto:esema.cetin@bozok.edu.tr)

\*Bu makale 02-05 Mayıs 2018, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi'nde düzenlenen I. Uluslararası Sağlık ve Yaşam Bilimleri Kongresinde (IHSLC 2018) poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi: 15.10.2018 – Kabul Tarihi: 07.11.2019

## 1. GİRİŞ

Sekonder metabolitler, bitkilerden elde edilen, büyüme ve gelişme faaliyetlerinde direkt kullanılmayan ancak özellikle stres ortamında bitkinin kendisini korumak adına geliştirdiği bileşiklerdir. Bu bileşiklerin insan sağlığı ve beslenmesinde son derece önemli olduklarının belirlenmesi ile özellikle son yıllarda giderek artan bir ilgi göze çarpmaktadır (1-4). Asma bitkisi de bu bileşikler bakımından zengin olması nedeniyle, üzerinde en fazla durulan bitkilerden birisini oluşturmaktadır. Asmada sekonder metabolit elde etmeye yönelik çalışmalar yapan Decendit ve Merillon (5) ile Vitrac ve ark. (6) da antosiyanin, proantosiyanidin, kateşin ve stilbenler gibi fenolik bileşiklerin yüksek oranlarda sentezlendiğini tespit etmişlerdir. Yine asmada yapılmış olan farklı çalışmalarda elde edilen bileşiklerin üzüm ve kırmızı şarapta olduğu gibi antioksidan özellikler taşıyarak insan sağlığını koruyucu etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (7,8). Asmada doğal olarak üretilen antosiyaninler de çiçeklere, meyve ve sebzelere doğal rengini veren bileşikler olmasının yanında, sağlık ve gıda sektöründe kullanım potansiyeli son derece yüksek bileşiklerdir (9,10). Nitekim antosiyaninler; antioksidan, antiinflamatuvar, antialerjik, antiülser, antibiyotik ve antikanserojenik etkilere sahip son derece geniş biyolojik aktivite göstermeleri nedeni ile büyük öneme sahip bileşiklerdir (11,12). Aynı zamanda gıdalarda kullanılan yapay renklendiricilere (13) ve raf ömrünü uzatan katkı maddelerine (14) alternatif doğal bileşiklerdir.

Bitki bünyesinde doğal olarak üretilen bu bileşiklerin elde edilmesinde uzun yıllar geleneksel ekstraksiyon metodlarından yararlanıldığı bilinmektedir. Ancak belirli bir döneme bağlı olması, bitkinin belirli bir organında üretilen bileşiklerin sürekli sağlanamaması, fazla miktarlarda bitkisel materyale ihtiyaç duyulması ve ayrıca elde edilen ürünün de kalite ve saflığının düşük olması gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır. Ayrıca özellikle nadir bulunan bitkilerde neslin tükenmesi tehlikesi ile karşı karşıya kalınması da bir diğer dezavantajı oluşturmaktadır (15,16). Bu nedenlerle laboratuvar koşullarında bir örnek, yüksek saflıkta, yılın her dönemi üretilen ve az miktarda başlangıç materyalinin kullanıldığı biyoteknolojik metodlar daha avantajlı olarak görülmektedir. Bu alanda da en fazla kullanılan metodlar kallus ve hücre kültürü metodları olup, bu şekilde az miktarda başlangıç materyali ile çok kısa sürede bitkisel materyalin çoğaltılması sağlanarak daha fazla bileşik üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntemlerde farklı besin ortamı tip ve kombinasyonları ile farklı ön uygulamalar denenerek elde edilen bileşik miktarını artırmak da mümkün olabilmektedir. Bununla birlikte dünyada endüstriyel anlamda metabolit üretimi halen istenilen ölçüde gerçekleşmemektedir (17). Bu nedenle üzerinde yoğun çalışmalara ihtiyaç duyulan bir çalışma alanı konumundadır. Ayrıca bu bileşikler az miktarlarda üretilenleri nedeniyle oldukça yüksek fiyatlarda bulunduğu da göz önüne alındığında ekonomik olarak stratejik öneme sahip bileşiklerdir (18). Bu araştırma ile de asmada yaprak saplarından in vitro koşullarda kallus kültürleri ile antosiyanin bileşiklerinin üretilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Araştırmada bitkisel materyal olarak Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi (Tokat) koleksiyon parselinden 2017 yılı Haziran ayı içerisinde alınan Alphonse Lavallee üzüm çeşidine ait yaprak sapları kullanılmıştır. Alınan yapraklar laboratuvara getirilerek

yaprak sapsarı ayrılmış ve yaklaşık 1 er cm uzunluğunda olacak şekilde kesilerek içerikleri, Tablo 1’de sunulan 6 farklı besin ortamında kültüre alınmıştır.

**Tablo 1.** Öğrencilerin Kişisel Hijyen Malzemeleri Kullanım Puanları

Besin ortamı içeriği	Besin Ortamı Numarası					
	1	2	3	4	5	6
Besin ortamı tipi	B5	B5	MS	MS	MS	MS
2,4-D (mg/L)	-	-	0.05	-	-	0.1
Kinetin (mg/L)	-	0.2	0.2	0.2	-	-
Benzil amino purin (BAP) (mg/L)	0.5	-	-	-	0.5	1.0
Indol asetik asit (IAA) (mg/L)	0.5	-	-	-	0.5	-
Naftalen asetik asit (NAA) (mg/L)	-	0.1	-	0.1	-	-
Kazein hidrolizat (mg/L)	-	250	-	250	-	-
Sakkaroz (g/L)	30	30	30	20	30	10
Agar (g/L)	8	6	2	6	8	6

Eksplantlar Tablo 1’de belirtilen besin ortamlarına yerleştirilmelerinin ardından sıcaklığı 24°C sabit tutulan karanlık koşullardaki iklim odasında kültüre alınmışlardır. Bu ortamda yaklaşık beş hafta süre ile inkübe edilen eksplantlar ardından aynı içeriğe sahip taze hazırlanmış besin ortamlarına transfer edilmişler ve aydınlanmanın 16/8 saat olarak düzenlendiği aydınlık/karanlık periyotta kültüre alınmışlardır.

Bu şekilde eksplantların yeniden taze ortamlara transfer edilmeleri yani alt kültüre alınma işlemleri metabolit birikiminin yeterince elde edilmesine kadar sürdürülmüştür. Bu süreçte kalluslarda antosiyanin sentezinin yoğun olarak gerçekleştiği pembe renkli kalluslar ile (Şekil 1), bunun yanında yine fenolik bileşiklerin neden olduğu bir takım sarı ve kahverengi kallusların oluşumları da tespit edilmiştir. Bu şekilde ard arda yapılan alt kültürler sonrası antosiyaninlerin miktarlarının belirlenmesi amacıyla öncelikle kalluslar, üzerindeki besin ortamı kalıntılarından tamamen uzaklaştırılacak şekilde besin ortamından çıkarılmışlar, tartılmış ve analize hazır hale getirilmişlerdir. Antosiyanin analizlerine yönelik olarak 2 g kallus örneği alınmış ve üzerine %96’lık etanol ilave edilerek homojenize edilmiştir. Bu şekilde bir gece süresince ekstrakte edilen örnekler ardından önce vorteks ile karıştırılmış, sonrasında santrifüj yapılmış ve süpernatant kısmı alınmıştır. Alınan süpernatant kısım 45°C’de evapore edilmiş, kuru hale gelen evaporatör balonunun içerisine metil alkol ilave edilerek antosiyaninleri içeren kısmın çözünmesi sağlanmış ve 0.45 µM millipore filtreden geçirilerek HPLC sistemine verilmiştir (19).

Araştırmada HPLC analizlerinde kullanılan malvidin 3 klorür, metil alkol (HPLC saflıkta) ve formik asit (ACS saflıkta) Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) ile Merck (Steinheim, Almanya) firmalarından temin edilmiştir. Malvidin 3 klorür standardına ait stok çözelti, metil alkol içerisinde hazırlanmıştır.

Çalışmada kullanılan HPLC sistemi, Shimadzu Prominence marka olup, sistem, 20 A CBM, D SPD-M20A DAD dedektör, CTO-10ASVp kolon fırını, LC20 AT pompa ve SIL 20 ACHT oto örnekleyiciden oluşmaktadır. Bilgisayar programı olarak, LC Solution kullanılmıştır. Mobil faz olarak, %3 formik asit (A) ve metil alkol (B) tercih edilmiştir.

Gradient bir çalışma programı modifiye edilerek uygulanmış olup, çalışma programı, Tablo 2’de verilmiştir.



Şekil 1. Kalluslardan Antosiyanin Üretimi.

Tablo 2. Öğrencilerin Kişisel Hijyen Malzemeleri Kullanım Puanları

Final süresi (dakika)	% A	% B
0	100	0
3	95	5
15	80	20
17	80	20
27	60	40
37	50	50
50	60	40
65	0	100

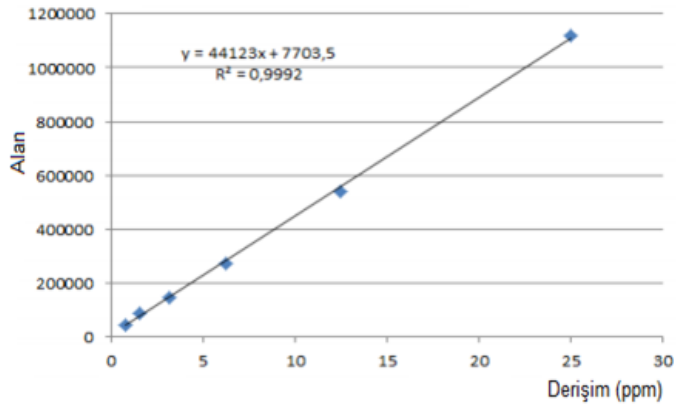
Akış hızı 0.8 mL/dakikadır. Kolon olarak Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (250 mm x 4,6, 5 µm) kullanılmıştır. Kolon fırın sıcaklığı 30 C’dir (20). Malvidin 3 klorürün kantitatif analizi için, dedeksiyon 530 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

### 3. BULGULAR

Araştırmada antosiyanin içeriği, malvidin 3 klorür cinsinden belirlenmiş olup, istenilen bileşiğe ait kalibrasyon grafiği, Şekil 2’de verilmiştir. Malvidin 3 klorür standardına ait alıkonma zamanı (RT), 41.9; dedeksiyon limiti değeri (LOD; mg/kg) 0.24 ve kantitasyon limiti değeri (LOQ; mg/kg) 0.792’dir. Korelasyon katsayısı (R2) ise, 0.999’dur. Malvidin 3 klorür standardına ait kromatogram, Şekil 2’de ve örneklere ait kromatogramlar toplu olarak, Şekil 3’de sunulmuştur.

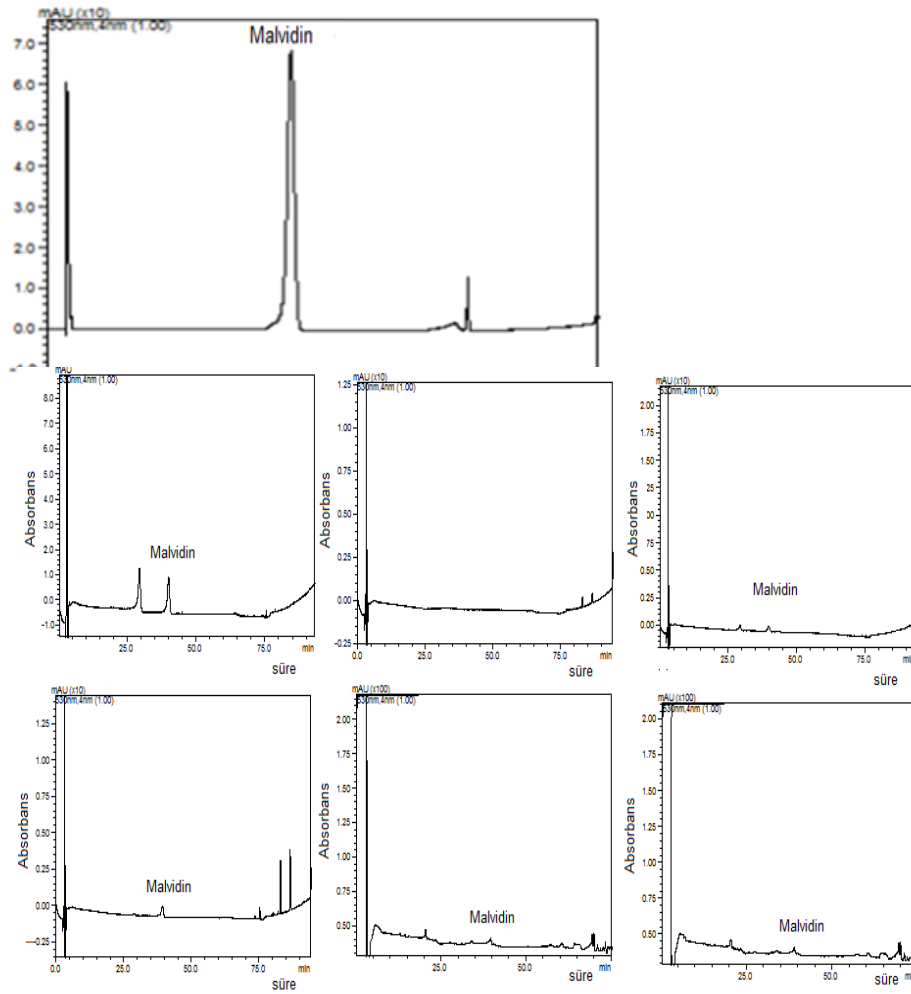
Araştırmada antosiyaninlerin belirlenmesine yönelik analizler HPLC ile gerçekleştirilmiştir. HPLC, özellikle yüksek sıcaklıklarda bozulan bileşikler için son derece uygun bir metot olması, aynı anda nicel ve nitel analizlerin yapılmasına olanak tanınması, yüksek çözünürlük sağlaması, basit, hızlı ve tekrarlanabilir olması, yüksek oranda geri

kazanımın sağlanması ve farklı dedektörler kullanılarak farklı kimyasal yapıdaki bileşiklerin tespit edilebilmesi gibi nedenlerle son derece avantajlı bir analiz metodu olarak değer taşımaktadır (21).



Şekil 2. Kalibrasyon Grafiği.

Araştırmada analizler üç tekerrürlü olarak yapılmış olup, yaprak sapı eksplantlarından elde edilen kallusların altı farklı besin ortamında üretmiş oldukları antosiyanin miktarlarına ilişkin sonuçlar, Tablo 3’de sunulmuştur.



Şekil 3. Standarda (üstte) ve Örneklerle (Alta) Ait Kromatogramlar.

**Tablo 3.** Kalluslardan Elde Edilen Antosiyanin Miktarları ( $\mu\text{g/g}$ ).

Besin ortamı	Antosiyanin miktarı ( $\mu\text{g/g}$ )
1	94.501 $\pm$ 3.205
2	<LOD
3	57.178 $\pm$ 2.215
4	8.716 $\pm$ 1.277
5	16.241 $\pm$ 2.478
6	19.329 $\pm$ 1.367

< LOD: Tespit limitinin altında

#### 4. TARTIŞMA

Besin ortamına göre antosiyanin miktarlarının değiştiğinin belirlendiği araştırmada 8.716  $\mu\text{g/g}$  dan 94.501  $\mu\text{g/g}$  a kadar değişen miktarlarda bileşik eldesi sağlanmıştır (Tablo 3). Burada 0.5 mg/L BAP ve 0.5 mg/L IAA katkılı B5 (22) ortamının kalluslardan antosiyanin sentezini teşvik etmesi bakımından daha başarılı sonuçlar verdiği görülmektedir. Bu ortam daha önce yapılmış olan araştırmalarda da yaprak sapı eksplantlarından kallus oluşumu üzerine olumlu etkileri olduğu belirlenmiş bir besin ortamıdır (23,24).

Alphonse Lavalley üzüm çeşidine ait yaprak sapı eksplantlarından elde edilen kalluslarda farklı besin ortamlarının antosiyanin üretimi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla planlanmış bu araştırmanın sonucunda besin ortamı içeriğine göre bileşik sentezinin değiştiği belirlenmiştir. Sekonder metabolit miktarlarının besin ortamı içeriğine, sıcaklık ve ışık gibi kültür koşullarına ve daha pek çok faktöre bağlı olarak değiştiği bilinmektedir (25,26). Bunun yanında kullanılan bitkisel materyalin ve kalluslara uygulanan biyotik ve abiyotik farklı stres uygulamalarının da sekonder metabolit üretimi üzerine etkili olduğu bu alanda yapılmış olan çalışmalarla tespit edilmiştir (27-31). Asmada kallus kültürleri ile antosiyanin üretimine yönelik araştırmalarda çoğunlukla spektrofotometrik yöntemlerin kullanıldığı belirlenmiştir. Nitekim yapmış oldukları bir araştırmalarında Mihai ve ark. (31) hormonal kombinasyonların değişimini incelemişlerdir. 37 gün ve 7 gün olarak alt kültürlerde iki aşamalı bir süreç belirleyen araştırmacılar besin ortamına ilave ettikleri salisilik asit, absisik asit, jasmonik asit ve mannitol konsantrasyonlarında değişiklikler yaptıkları araştırma sonucunda SA-ABA uygulamalarının uzun süreli Vitis vinifera kallus kültürlerinde antosiyanin üretimini artırmada etkili olduğunu ifade etmişlerdir. Araştırmalarının sonucunda spektrofotometrik olarak siyanidin 3- glikozit cinsinden belirledikleri antosiyanin içeriğinin farklı hormon kombinasyonlarına göre 20-90 mg/L arasında değiştiği belirlenmiştir. Asmada antosiyanin birikiminin belirlenmesine yönelik çalışmalarda genellikle farklı elisitörlerin kullanıldığı ve kökenini yine kallusların oluşturduğu hücre süspansiyon kültürlerinin kullanıldığı tespit edilmiştir (32-33). Bununla birlikte gerek kallus gerek hücre süspansiyon kültürleri ile yapılan metabolit üretmeye yönelik çalışmalarda halen istenilen düzeyde başarının elde edilemediği de bilinmektedir. Bu nedenle sekonder metabolit birikiminin incelenmesine yönelik yapılan araştırmalarda homojen ve yüksek miktarlarda ürün elde edilebilmesi bakımından yöntemin optimizasyonu büyük önem taşımaktadır.

Günümüzde modern ilaçların %25'inden fazlasının doğrudan ya da dolaylı olarak bitkilerden elde edildiği bilinmektedir. Bunun yanında ilaç endüstrisinin ilgilendiği sekonder metabolitlerin bulunduğu birçok bitki de doğal popülasyonlarının hızla tüketilmesi nedeniyle

nesli tükenmekte olan bitkiler içerisinde yer almaktadır. Bu nedenle insan sağlığı açısından son derece değerli, aynı zamanda katma değeri de yüksek olan bu bileşenlerin çevreyi tahrip etmeksizin yüksek miktarlarda ve sürdürülebilir üretimi için doku kültürü teknikleri ile farklı uygulamalar yapılması ve özellikle ziraat, kimya, tıp ve eczacılık bilimleri ile birlikte gerçekleştirilecek multidisipliner çalışmalarla potansiyellerinin ortaya konulması büyük önem taşımaktadır.

## 5. TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın gerçekleştirilmesinde ArGe İnovasyon projeleri kapsamında finansal destek sağlayan KOSGEB birimine ve deneysel aşamaların gerçekleştirildiği Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezine teşekkürlerimizi sunarız.

## KAYNAKLAR

1. Birudu, R.B. & Naik, M.J. (2014). Anticancer properties of secondary metabolites of medicinal plants in carcinoma. *British Biomedical Bulletin*, 2(4), 662-668.
2. Kennedy, D.O. (2014). Polyphenols and the human brain: Plant “secondary metabolite” ecologic roles and endogenous signaling functions drive benefits. *American Society for Nutrition Advances in Nutrition*, 5(5), 515-533.
3. Wink, M. (2015). Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines*, 2(3), 251-286.
4. Luciano, A.J., Irineo, T.P., Rosalía Virginia, O.V., Feregrino-Pérez, A.A., Hernández, A.C. & Ramón Gerardo, G.G. (2017). Integrating plant nutrients and elicitors for production of secondary metabolites, sustainable crop production and human health: A Review. *International Journal of Agriculture and Biology*, 19(3), 391-402.
5. Decendit, A. & Merillon, J.M. (1996). Condensed tannin and anthocyanin production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 15(10), 762-765.
6. Vitrac, X., Krisa, S., Decendit, A., Vercauteren, J., Nüehrich, A., Monti, J.P. et al. (2002). Carbon-14 biolabelling of wine polyphenols in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Journal of Biotechnology*, 95(1), 49-56.
7. Waterhouse, A.L. (1995). Wine and heart disease. *Chemical Industry*, 9, 338-341.
8. Merillon, J.M., Fauconneau, B., Waffo Teguog, P., Barrier, L., Vercauteren, J. & Huguet, F. (1997). Antioxidant activity of the stilbene astringin, newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures. *Clinical Chemistry*, 43(6), 1092-1093.
9. Jennings, A., Welch, A.A., Spector, T., Macgregor, A. & Cassidy, A. (2014). Intakes of anthocyanins and flavones are associated with biomarkers of insulin resistance and inflammation in women. *Journal of Nutrition*, 144(2), 202-208.
10. Khoo, H.E., Azlan, A., Tang, S.T. & Lim, S.M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Journal of Food and Nutrition Research*, 61(1), 1-21.
11. Juranić, Z. & Zizak, Z. (2005). Biological activities of berries: from antioxidant capacity to anti-cancer effects. *Biofactors*, 23(4), 207-211.
12. He, K, Li, X. & Chen, X. (2011). Evaluation of antidiabetic potential of selected traditional Chinese medicines in STZ-induced diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(3), 1135-1142.
13. Bridle, P. & Timberlake, C.F. (1997). Anthocyanins as natural food colours selected aspects. *Food Chemistry*, 58(1), 103-109.

14. McCann, D., Barrett, A. & Cooper, A. (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*, 370(9598), 1560-1567.
15. Vijaya, S.N., Udayasri, P.V., Aswani, K.Y., Ravi, B.B., Phani, K.Y. & Vijay, V.M. (2010). Advancements in the production of secondary metabolites. *Journal of Natural Products*, 3, 112-123.
16. Ginsburg, H. & Deharo, E. (2011). A call for using natural compounds in the development of new antimalarial treatments-An introduction. *Malaria Journal*, 10(1), 1-7.
17. Kim, B.J., Gibson, D.M. & Shuler, M.L. (2004). Effect of subculture and elicitation on instability of taxol production in *Taxus* sp. suspension cultures. *Biotechnology Progress*, 20(6), 1666-1673.
18. Sarfaraj, H., Sheeba, F., Saba, A., Akhlaguer, R., Iffet, Z.A. & Mohd, S. (2012). Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4(1), 10-20.
19. Kiselev, K.V., Dubrovina, A.S., Veselova, M.V., Bulgakov, V.P., Fedoreyev, S.A. & Zhuravlev, Y.N. (2007). The rol-B gene-induced over production of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. *Journal of Biotechnology*, 128(3), 681-692.
20. Caponio, F., Alloggio, V. & Gomes, T. (1999). Phenolic compounds of virgin olive oil: Influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*, 64(2), 203-209.
21. Yiğit, N., Bayhan Öktem, A. & Aksu, P. (2008). Gıdalarda pestisit kalıntı analizlerinde yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC)' nin kullanımı. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs, 2008, Erzurum, 1079-1082.
22. Gamborg, O.L., Miller, R.A. & Okajima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151-156.
23. Shure, K. & Acree, T. (1994). Production of  $\beta$ -damascenone precursors in cell cultures of *Vitis labrusca* cv. Concord grapes. *Plant Cell Reports*, 13(8), 477- 480.
24. Çetin, E.S. (2012). Gamay üzüm çeşidine ait kallus kültürlerinde fenolik bileşikler ile  $\alpha$ -tokoferol üretiminin artırılması: Potansiyel bir elisitör olarak UV-C. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 7(2), 112-122.
25. Yağcı, C., Toker, M.C. & Toker, G. (2008). Bitki doku kültürü yoluyla üretilen flavonoidler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 1(1), 47-58.
26. Topçu, Ş. & Çölgeçen, H. (2015). Bitki sekonder metabolitlerinin biyoreaktörlerde üretilmesi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8(2), 9-29.
27. Curtin, C., Zhang, W. & Franco, C. (2003). Manipulating anthocyanin composition in *Vitis vinifera* suspension cultures by elicitation with jasmonic acid and light irradiation. *Biotechnology Letters*, 25(14), 1131-1135.
28. Antognoni, F., Zheng, S., Pagnucco, C., Baraldi, R., Poli, F. & Biondi, S. (2007). Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. *Fitoterapia*, 78(5), 345-352.
29. Keskin, N. & Kunter, B. (2007). Erciş üzüm çeşidinin kallus kültürlerinde UV ışını etkisiyle resveratrol üretiminin uyarılması. *Ankara Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 13(4), 379-384.
30. Keskin, N. & Kunter, B. (2010). Production of trans-resveratrol in callus tissue of Öküzgözü (*Vitis vinifera* L.) in response to ultraviolet-C irradiation. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 20(3), 197-200.
31. Mihai, R., Mitoi, M., Brezeanu, A. & Cogalniceanu, G. (2010). Two-stage system, a possible strategy for the enhancement of anthocyanin biosynthesis in a long-term grape callus cultures. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(1), 5025-5033.



32. Aumont, V., Larronde, F., Richard, T., Budzinski, H., Decendit, A., Defieux, G. et al. (2004). Production of highly <sup>13</sup>C-labeled polyphenols in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. *Journal of Biotechnology*, 109(3), 287-294.
33. Belhadj, A., Telef, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S. et al. (2008). Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(4), 493-499.