S. KAYA, 2015

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NİĞDE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NİĞDE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TRİAKONTANOL'UN SERBEST VE TUTUKLANMIŞ *CAPSICUM ANNUUM* L. HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRÜNDE KAPSAİSİN ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

SONER KAYA

Temmuz 2015

T. C.
NİĞDE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TRİAKONTANOL'UN SERBEST VE TUTUKLANMIŞ *Capsicum annuum* L. HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRÜNDE KAPSAİSİN ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

SONER KAYA

Yüksek Lisans Tezi

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Cemil İŞLEK

Temmuz 2015

Soner KAYA tarafından **Yrd. Doç. Dr. Cemil İŞLEK** danışmanlığında hazırlanan **"TRİAKONTANOL' UN SERBEST VE TUTUKLANMIŞ** *CAPSICUM ANNUUM* **L. HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRÜNDE KAPSAİSİN ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ"** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Ergin Murat ALTUNER, Kastamonu Üniversitesi

Üye : Yrd. Doç. Dr. Bengü TÜRKYILMAZ ÜNAL, Niğde Üniversitesi

Üye : Yrd. Doç. Dr. Cemil İŞLEK, Niğde Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından …./…./20.... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun …./…./20.... tarih ve …..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

Doç. Dr. Murat BARUT

MÜDÜR

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Soner KAYA

ÖZET

TRİAKONTANOL'UN SERBEST VE TUTUKLANMIŞ *Capsicum annuum* L. HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRÜNDE KAPSAİSİN ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

KAYA, Soner
Niğde Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Cemil İŞLEK

Temmuz 2015, 63 sayfa

Bu çalışmada Kahramanmaraş Maraş-1 biber tohumlarına ait hücre süspansiyon kültüründe, kapsaisin üretimi üzerine tutuklama işleminin ve farklı konsantrasyonlarda triakontanol'un değişen zamanlardaki etkileri incelenmiştir *İn vitro* koşullarda çimlendirilmiş biber fidelerinin hipokotil eksplantlarından kallus elde edilmiştir ve kalluslardan hücre süspansiyonları oluşturulmuştur. Hücre süspansiyonlarından kalsiyum aljinat ile tutuklanmış hücre süspansiyon kültürleri ve tutuklama işlemi yapılmayan serbest hücre süspansiyon kültürleri elde edilmiştir. Hem serbest hem de tutuklanmış hücre süspansiyonlarına triakontanol (5, 10, 15 ve 30 µg/ml) uyarıcı olarak uygulanmış ve uyarıcı uygulanmayan kontrol grupları oluşturulmuştur. Etil asetat ile ekstraksiyon yapılarak serbest hücrelerdeki, tutuklanmış hücrelerdeki ve bunların süzüntülerindeki kapsaisin konsantrasyonları HPLC cihazında belirlenmiştir.

Tutuklama işleminin kapsaisin birikimi üzerine artırıcı etki yaptığı belirlenmiştir. Tutuklanmış hücrelerdeki kapsaisin miktarı, kontrol gruplarında ve uyarıcı uygulaması yapılan örneklerde, serbest hücrelere göre daha yüksek bulunmuştur. Tüm uyarıcı gün ve dozları karşılaştırıldığında en fazla toplam kapsaisin miktarı tutuklanmış hücre süspansiyonlarında 15 µg/ml triakontanol uygulamasında 12. günde 312,703 µg/g t.a. olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler*:* Kapsaisin, tutuklama, *Capsicum annuum* L., bitki doku kültürü, sekonder metabolit, triakontanol

SUMMARY

THE EFFECT OF TRIACONTANOL ON CAPSAICIN PRODUCTION IN FREELY SUSPENDED CELLS AND IMMOBILIZED CELL CULTURES OF *Capsicum annuum* L.

KAYA, Soner
Nigde University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Ass.Prof. Dr. Cemil İŞLEK

July 2015, 63 pages

In this study, the effect of immobilization and elicitation of triacontanol on the production of capsaicin in the cell suspension culture of Maraş-1 pepper seeds were studied.
Calluses were obtained by using *in vitro* germinated hypocotyl explants of pepper seedlings and cell suspensions were prepared from these calluses. Immobilized cell suspension cultures with calcium alginate and free cell suspension cultures were obtained by using these cell suspensions. Triacontanol (5, 10, 15 and 30 µg/ml) was applied both for the free and immobilized cell suspensions and control groups without elicitors were prepared. The concentration of capsaicin in freely suspended cells, immobilized cells and their filtrates were identified after extraction with ethyl acetate by HPLC.
It was identified that the immobilization process had an increasing effect on the capsaicin accumulation. The amount of capsaicin in the immobilized cells for both control groups and elicitor added samples was higher than the free cells. When all the triacontanol and the sampling days were compared, the highest capsaicin concentration for the immobilized cells was determined as 312,703 µg/g f.w. in the 12th day for 15 µg/ml triacontanol applied samples.

Key words : Capsaicin, immobilization, *Capsicum annuum* L., plant tissue culture, secondary metabolite, triacontanol

ÖNSÖZ

Çalışmanın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, maddi ve manevi olarak yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Cemil İŞLEK'e, Tecrübe ve bilgi paylaşımı ile laboratuvar desteğini esirgemeyen kıymetli hocam Doç. Dr. Teoman KANKILIÇ'a, istatistik hesaplamaları için kıymetli hocam Yrd. Doç. Dr. Bengü TÜRKYILMAZ ÜNAL'a

Öğrenim hayatım boyunca bana hep destek olan başta babam merhum İbrahim KAYA ve annem Ümmühan KAYA'ya, ağabeylerim Mehmet KAYA ve Bekir KAYA ile ablam Ümmü KAYA'ya

Çalışmalarımda desteğini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Cihan DÜŞGÜN, Serkan YANIK ve Mehmet TUNCER'e

Aynı evi paylaştığım değerli arkadaşım İbrahim Hakkı İŞLER'e ve her zaman yanımda olan Ş. Dilara GÜLDEREN, A. Can ERDİK ve Burcu AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma TÜBİTAK-TOVAG 113O518 nolu proje ile desteklenmiştir. Aynı zamanda tez süresince burs desteği sağlayan TÜBİTAK' a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET vi

SUMMARY vii

ÖNSÖZ viii

İÇİNDEKİLER ix

ÇİZELGELER DİZİNİ xii

ŞEKİLLER DİZİNİ xiii

FOTOĞRAF DİZİNİ xiv

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ xv

BÖLÜM I 1

GİRİŞ 1

BÖLÜM II 4

GENEL BİLGİLER 4

2.1 Bitki Doku Kültürü 4

2.1.1 Doku kültürü sürecinin aşamaları 5

2.2 Sekonder Metabolitler 6

2.2.1 Bitki doku kültürlerinde sekonder metobolit sentezi 9

2.3 Bitki Hücrelerinin İkincil Metabolit Sentezi İçin Tutuklanması (İmmobilizasyon) 11

2.4 Kapsaisin ve Kapsaisinoidler 15

2.4.1 Kapsaisin biyosentezi 19

2.4.2 Kapsasisinoidlerin fizyolojik etkileri 22

2.4.3 Kapsaisin Elde Edilmesi İle İlgili Bitki Doku Kültürü Çalışmaları 23

2.5 Kapsaisin sentezini uyarmak amacıyla kullanılacak olan Triakontanol 27

BÖLÜM III 29

MATERYAL VE METOD 29

3.1 Materyaller 29

3.1.1 Bitkisel materyal 29
3.1.2 Kapsaisin sentezini uyarmak için kullanılan uyarıcı 29
3.2 Yöntem 29
3.2.1 Tohumların yüzeysel sterilizasyonu 29
3.2.2 Tohum çimlendirme ortamı bilesimi ve hazırlanması 30
3.2.3 Kültür koşulları 31
3.2.4 Hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulması 34
3.2.5 Tutuklama işlemleri 34
3.3 Uyarıcı Uygulamaları ve Analiz İçin Örneklerin Hazırlanması 36
3.4 Ekstraksiyon İşlemleri 37
3.4.1 Serbest ve tutuklanmış hücrelerden kapsaisin ekstraksiyonu 37
3.4.2 Tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinden kapsaisin ekstraksiyonu 37
3.5 Kapsaisin Analizi 37
3.5.1 Kapsaisin standartının hazırlanması 38
3.5.2 Ekstraktlardan kapsaisin analizi 38
3.5.3 Kapsaisin tayininde HPLC koşulları 39
3.6 İstatistiksel Analizler 39
BÖLÜM IV 40
BULGULAR 40
4.1 Serbest Ve Tutuklanmış Hücrelerde Kapsaisin Birikimine Triakontanol Uygulamasının Etkisi 40
4.2 Serbest ve Tutuklanmış Hücrelerin Süzüntülerinde Kapsaisin Birikimine Triakontanol Uygulamasının Etkisi 44
4.3 Serbest Ve Tutuklanmış Hücrelerde Toplam Kapsaisin Birikimine Triakontanol Uygulamasının Etkisi 48
BÖLÜM V 53
TARTIŞMA VE SONUÇ 53
Kaynaklar 57

Özgeçmiş 63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Bitkiler tarafından üretilen bazı sekonder metabolitler ve kullanım alanları 8
Çizelge 2.2 Bazı ikincil (sekonder) metabolit için tutuklama çalışmaları 12
Çizelge 2.3 Doğal ve sentetik kapsaisinoidlerin kimyasal yapısı ve acılık dereceleri…...18
Çizelge 3.1 MS temel besin ortamı..... 31
Çizelge 4.1 Farklı konsantrasyonlarda triakontanol uygulamalarının, Capsicum annuum L.(Maraş-1)'un serbest hücrelerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)……...41
Çizelge4.2 Farklı konsantrasyonlarda triakontanol uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(Maraş-1)'un tutuklu hücrelerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3) …….…43
Çizelge 4.3 Farklı konsantrasyonlarda triakontanol uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(Maraş-1) serbest hücrelerinin süzüntülerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)..... 45
Çizelge 4.4 Farklı konsantrasyonlarda triakontanol uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(Maraş-1) tutuklanmış hücrelerinin süzüntülerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)……47
Çizelge 4.5 Farklı konsantrasyonlarda triakontanol uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(Maraş-1) toplam serbest ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)……....49
Çizelge 4.6 Triakontanol uygulamaları için etkin uyarım dozu, uyarım zamanı ve oluşturdukları toplam kapsaisin miktarları……...52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Bitki hücrelerinden sekonder metabolit üretimi 10
Şekil 2.2 Hücrelerin kalsiyum aljinatla tutuklanmasının şematik şekli..... 14
Şekil 2.3 Biber (*Capsicum annuum* L.) meyvesinin anatomisi 16
Şekil 2.4 Kapsaisinin molekül yapısı..... 17
Şekil 2.5 Kapsaisin biyosentez yolu 21
Şekil 2.6 Kapsaisin için reseptör model..... 22
Şekil 2.7 Triakontanol maddesinin açık kimyasal formülü 28
Şekil 3.2 Spektrofotometrede ölçüm için kapsaisin standartı ile çizilen grafik……38

FOTOĞRAF DİZİNİ

Fotoğraf 3.1 Steril besi ortamına ekilmiş biber tohumları 30
Fotoğraf 3.2 Biber tohumları (Maraş-1) nın ekimden 4 hafta sonraki gelişimi 32
Fotoğraf 3.3 Hipokotil (gövde bölgesi) eksplantından gelişen kallus dokusunun agarlı besiyerinde görünümü 33
Fotoğraf 3.4 Alt kültürde çoğalan kallus dokusu 33
Fotoğraf 3.5 Çalkalayıcı üzerindeki hücre süspansiyon kültürleri 34
Fotoğraf 3.6 Kalsiyum klorür içerisinde tutuklanmış hücrelerin oluşumu 35
Fotoğraf 3.7 MS besiyeri ortamında tutuklanmış hücreler 36

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	**Açıklama**
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
TRIA	Triakontanol
MS	Murashige ve Skoog
t.a.	Taze ağırlık
µg	Mikrogram

BÖLÜM I

GİRİŞ

Günümüzde bitki doku, organ ve hücre kültürleri giderek daha cazip hale gelmektedir. Özellikle aromalar, antioksidanlar, uçucu yağlar, kokular, renklendirici olarak kullanılan çeşitli maddeler, yüksek moleküler ağırlıklı moleküller gibi çeşitli maddelerin üretimi için avantaj sağlamaktadır. Son yıllarda çeşitli biyotokütle iyileştirmeleri içinde bitki doku kültürü teknikleri kullanılmaktadır. Ayrıca hücrelerinin büyük ölçüde geliştirilmesi ve bu hücrelerden fitokimyasalların üretimi için de kullanılmaktadır (Murthy vd., 2015).

İn vitro ortamlarda, çeşitli doğal ve sentetik bitki büyüme düzenleyiciler ile desteklenerek hücre ve organların büyümesi teşvik edilerek morfogenetik yapının değiştirilmesi ve çeşitli metabolitlerin birikimi sağlanmaktadır. Uyarıcı olarak çeşitli fiziksel ve kimyasal maddelerde biyoaktif üretimini artırmak için elisitörler olarak kullanılan bileşikler yer alır (Murthy vd., 2015).

Biberler eski zaman medeniyetlerinden birçok dünya mutfağında önemli yere sahip olmanın yanı sıra günümüzde sağlık alanlarında da alternatif tıp açısından önemli bir yere sahiptir. Kristof Kolomb yaptığı ilk keşif yolculuğunda (1492-1493) yerli halkın bu kırmızı renkli meyveyi aji veya axi olarak adlandırdıklarını ve tükettiklerini gözlemiştir. Kolomb biberleri İspanya'ya götürmüş ve bunları kırmızıbiber (red pepper) olarak adlandırmıştır(Govindarajan, 1986).

Biberle ilgili çalışmalar 1816 da Burcholz ile başlar. Biberdeki acılık verici maddeyi bileşenlerine ayırarak bu bileşenlerin tuz şeklinde olduğunu ortaya koymuştur. Bundan yaklaşık yirmi yıl sonra temel acılık verici maddenin kimyasal yapısı 8-methyl-6-nonenoylvanillylamide olarak belirlenmiştir. Yüz yıl sonra Kouge ve arkadaşları ince tabaka kromatografisinin geliştirilmesi ile acılık uyarıcı özelliği olan maddeyi buldular ve kapsaisinoid olarak isimlendirdiler (Poyrazoğlu vd., 2005).

Birçok alanda olduğu gibi sekonder bitki metabolitlerinin üretilmesi ve bunların sentezlenmesine ait temel bilgilere ulaşılması konularında da, bitki doku kültürleri araştırıcılara büyük olanaklar sunmaktadır. Nitekim değişik bitki türlerine ait dokularda in

vitro koşullarda bu maddelerin sentezini uyarabilecek çeşitli uyarıcılar ele alınmış ve etkin doz ile uygulama sonrası beklenmesi gereken süreler ortaya konulmuştur. Aynı zamanda, bitki hücre kültürleri, önemli farmasotiklerin ve yüksek öneme sahip metabolitlerin üretimi için yaygın olarak çalışılmaktadır. Hücre kültürlerinden elde edilen doğal yiyecek katkıları da sentetik karşıtlarına göre artan bir şekilde günümüzde tercih edilmektedir. Sekonder metabolit üretimi için hücre kültürlerinin potansiyeli çok geniş olmasına rağmen hedef maddelerin ürününün düşük olması ticari anlamda cesareti kırmaktadır. Ürünlerin getirisini arttırmak için biyotik ve abiyotik kaynaklı uyarıcıların kullanımı veya bitki hücre kültürlerinde tutuklama tekniği ile ürün miktarını arttırmayı hedefleyen çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır (Ramachandra vd., 1996).

Kapsaisin, *Capsicum spp*. (biber) bitkisinden elde edilen önemli bir yiyecek katkı maddesidir. Ayrıca kapsaisin preparatları bel ağrısı (lumbago), nevralji (sinir ağrısı) ve romatizmalı hastalıklara karşı kullanılmaktadır. Aynı zamanda, *Capsicum oleoresin* tanin ya da güle eklenip gargara yapıldığında faranjit ve boğaz yaralarını rahatlatır.

Kapsaisin, in vitro olarak serbest ve immobilize edilmiş (tutuklanmış) *Capsicum spp.* hücrelerinden sıvı besiyerinden elde edilebilmektedir. *Capsicum spp.*'nin tutuklanmış hücre kültürleri, serbest hücre süspansiyon kültürlerine göre birkaç kat daha fazla miktarda kapsaisin ürettiği bulunmuştur. Tutuklanmış bitki hücre kültürleriyle ilgili birçok çalışma vardır. Birçok deneme kapsaisin üretim seviyelerini artırmak için yapılmıştır. Bazı bitkisel sekonder metabolit bileşiklerin sentezi çeşitli biyotik ya da abiyotik uyarıcı maddelerin kültür ortamına eklenmesi ile arttırılabilir (Lindsey ve Yeoman, 1984).

Bitki hücrelerinin tutuklanması diğer biyolojik tutuklanma sistemleriyle benzerlik gösterir, sayısız avantajlar sergiler, özellikle hücre canlılığının sürekli düzen ve koruma şartlarında olmasını sağlar. Hücrelerin tutuklanması çeşitli metabolitlerin biyodönüşümü için ve ekstraselüler metabolitlerin sentezi için kullanılmıştır. Bitki hücrelerinin tutuklanması oldukça yeni bir teknolojidir ve çok sayıda ön deneysel evrelerden oluşan araştırmalara dayanır. Laboratuvar deneyleri ile ilgili çalışmalar büyük başarılı sonuçlar doğurmuştur İşlek, 2009).

Triakontanol, bitki büyümesini sağlayan doğal bir maddedir. Triakontanol biyoması, serbest aminoasit miktarını, indirgeyici şeker miktarını, fotosentetik aktiviteyi, çözülebilir protein miktarını ve büyümeyi arttırır (Ravindra vd., 2005).

Bu tez çalışmasında serbest ve tutuklanmış *Capsicum annuum* L. bitkisinin hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulması, oluşturulan kültürlere farklı gün ve konsantrasyonlarda (5, 10, 15 ve 30 µg/ml), (8. 10. 12. gün) triakontanolün uygulanması, uygulanan uyarıcının kapsaisin birikimi üzerine etkisi, etkili olduğu gün ve konsantrasyonunun belirlenmesi ayrıca serbest ve tutuklanmış hücrelerdeki kapsaisin birikiminin karşılaştırılıp etkili yöntemin tespit edilmesi öngörülmüştür.

BÖLÜM II
GENEL BİLGİLER

2.1 Bitki Doku Kültürü

Alman botanikçi Haberland 1902 yılında bitkilerdeki totipotensi kavramını ileri sürmüştür. Bu kavrama göre; tek bir bitki hücresinden uygun koşullarda anaç bitkinin aynı özelliklerini taşıyan yeni bir bitki meydana gelebilmektedir. Yani buna bitki hücresinin bütünü verme yeteneği de denilebilmektedir (Bhoite ve Palshikar, 2014). Bu bilgiyi takip ederek ortaya çıkan bitki doku kültürü de; aseptik şartlarda yapay bir besin ortamında (*in vitro*), bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (sekonder metabolitler gibi) üretilmesidir (Babaoğlu vd., 2001).

Doku kültürlerinin başlangıç noktası eksplant denen bitki dokularıdır. Doku kültürü bitkilerin kök, gövde, petiyol, yaprak veya çiçek parçalarından olabilmekte ve başarı oranı bitki türüne göre değişmektedir. Önemli olan eksplant olacak bitki parçası yüzeyinin tüm kontaminasyonlardan arındırılmasıdır. Bitki hücrelerinde bölünme bakteri ve mantarlara kıyasla daha yavaş olmaktadır (Collin ve Edwards, 1998).

Kültürü başlatmak ve kültürdeki bitki hücrelerini uzun süre korumak için veya kültüre edilmiş hücrelerden tam bitki meydana gelmesi için gereken koşullar her bitki türünde farklıdır. Bir türün her varyetesi için de bireysel olarak belirlenmiş kültürel gereksinimler farklı olacaktır. Günümüzde, bitki doku kültürü hakkında edinilen tüm bilgilere rağmen, her bir varyete için denemeler yapılarak, kültür koşullarının doğru olarak tanımlanması gerekmektedir (Collin ve Edwards, 1998). Doku kültürü bitkinin her yerinden başlatılabilir ancak sürgün ucu gibi meristematik dokulardan daha verimli kültürler oluşturulabilir. Ayrıca bitkilerin besin gereksinimlerindeki farklılıklar da göz önünde bulundurularak doğru besin içeriği hazırlanmalıdır (Bhoite ve Palshikar, 2014).

Doku kültüründe fizyolojik aşama, bitkinin doku kültürüne başlandığında cevap verecek yeteneğe sahip olmasıdır. Ana bitki sağlıklı olmalı ve açıkça görülebilecek çürüme veya hastalık belirtilerinden uzak olmalıdır. Eksplant denen bitki, doku kültürü çalışmaları

dolayısıyla dikkatle seçilmelidir. Daha genç olan dokular, daha aktif bölünürler ve kallus oluşturma yeteneği daha yüksektir. Hücreler aktif olarak bölünebilir olmalıdır ve dormansi periyoduna girme eğiliminde olmamalıdır (Collin ve Edwards, 1998).

2.1.1 Doku kültürü sürecinin aşamaları

a. Besi ortamının hazırlanması: makro element, mikro element, aminoasit, vitamin, demir, sakaroz, çeşitli hormonlar vb. içeriklerin eklenmesiyle hazırlanan ortama yarı katı hale gelebilmesi için oranlanmış agar veya çeşitli katılaştırıcılar eklendikten sonra besi ortamı otoklavda steril edilir.
b. Aseptik kültür oluşturulması: bu aşamada uygun bitki materyali belirlenir ve kültür başlatılarak bitki bölgesi tayini yapılır (meristem, anter, embriyo, gövde vb). Belirlenen bitki materyalinin distile su, alkol, sodyum hipoklorit gibi dezenfekte edici maddelerle siterilizasyonu sağlanır. Bu sterilizasyon işlemlerindeki kullanılan maddelerin uygulama süreleri ve uygulama yüzdeleri bitki materyaline ve bitkinin türüne göre farklılık göstermektedir.
c. Uygun ortama aktarım: gelişen eksplantın uygun besin ortamına alınıp uygun gelişim koşullarının sağlanması işlemidir.
d. Büyüme odasında bitkilerin gelişmesi: büyüme odasına alınan bitkiler uygun sıcaklık (25±2 ^{0}C vb.) ışık (1000-2000 lux florasan ışığı vb.) ve uygun nem (%50-60 vb.) değerleri altında gelişimin sağlandığı ve alt kültüre alındığı aşamadır.
e. Mikro bitkinin geliştirilmesi ve aktarılması: çok elverişli olan bu gelişim aşamalarından sonra bitkinin direncini oluşturabilmek için bitki kültür kabı içinde seralara alınır ve 4-6 hafta boyunca nem, sıcaklık, ışık gibi koşullara alıştırılır. Daha sonra da standart ortamına aktarılır (Bhoite ve Palshikar, 2014).

Bitki doku kültür teknolojisinin amacı yüksek miktarda, homojen, farklılaşmamış hücrelerin üretimine olanak sağlamaktır. Bitki doku kültürleri 30000'den fazla kimyasal bağ içeren çok değerli fitokimyasalları sentezleme potansiyeline sahiptir. Bitki doku kültürleri tarafından sentezlenen fitokimyasal miktarı mikroorganizmalar tarafından sentezlenen fitokimyasal miktarının yaklaşık 4 katıdır (Zhong, 2002, Vanisree ve Tsay, 2004).

2.2 Sekonder Metabolitler

Bitki kimyasalları primer ve sekonder olarak ikiye ayrılırlar. Primer metabolitler (karbonhidratlar, yağlar, proteinler vb.) doğada yoğun halde bulunabilirler (yüksek bitkilerin vejetatif dokularında ve tohumlarında). Sekonder metabolitler ise primer metabolitlerden biyosentetik yollarla üretilmiş olup genelde bitkilerde tozlaşma, savunma, adaptasyon ve predatörlere (avcılara) ve stres koşullarına karşı bitkiyi koruma gibi görevlerde bulunurlar (Oskay ve Oskay, 2009).

Sekonder metabolitlerin varlığı ilk olarak A. Kossel (1891) tarafından saptanmış ve bundan otuz yıl sonra F. Czapek (1921) birincil metabolitlerden modifiye olan bu metabolitlerin endproduct (son ürün)' terimi ile tanımını yapmıştır (Ramachandra Rao ve Ravishankar, 2002).

Genel olarak tartışmalı olsa da sekonder metabolitlerin bitkilerdeki görevleri;

a) Bitkiyi bakteri ve fungus gibi patojenik etki yaratabilecek zararlılara karşı korur ve aynı ortamdaki bitkilerle rekabetini güçlendirir.
b) Tozlaşmada etkili olan canlı gurubunu cezbetme etkisi göstererek onları çeker.
c) Bitkiyi stres faktörlerine karşı (sıcaklık değişmeleri, su miktarı değişimleri, ışık ve mineral madde içeriği değişimi vb.) korur.
d) Bitkide gen düzenleyici transkripsiyon mekanizması gibi çeşitli mekanizmalarda da görevlidir (Oskay ve Oskay, 2009).

Günümüzde endüstriyel alanda kullanılan sentetik ürünler insan sağlığını tehdit etmeye başlamıştır. Bunların yerine doğal olan sekonder metabolitler kullanılmaya başlanmıştır. Gıda sektöründe tatlandırıcı, kıvam arttırıcı, renk ve koku verici birçok madde; kozmetik endüstrisinde parfüm ve kozmetik ürün (krem, tonik, maske), tarım alanında insektisit gibi kimyasallar; tekstilde kumaş boyamada kullanılan doğal boyalar çeşitli bitkisel sekonder metabolitlerden elde edilmektedir. Ayrıca, temel ilaçlar kapsamında ilan edilen 252 ilacın %11'i bitkisel sekonder metabolitlerden üretilmektedir. Bunlardan en ünlüleri; *Salix* türlerinden izole edilen antipiretik ve analjezik özelliği olan saliksin (aspirin), *Taxus brevifolia*'dan elde edilen anti kanser etkisi olan taxol (paclitaxel) ve *Papaver sominiferum*'dan elde edilen güçlü analjezik, narkotik etkisi olan morfindir (Ilya Raskin vd., 2002).

Son yıllarda en fazla çalışılan bitki sekonder metabolitleri; alkaloidler, terpenoidler, fenolik bileşikler, resinler, antosiyaninler, taninler, saponinler ve uçucu yağlardır. Bu bileşikler, tıbbi uygulamalarda, endüstride (sabun, parfüm, bitkisel yağ, boya, yapışkan, doğal plastik) ve pestisit üretiminde kullanılmaktadır. Ticari olarak üretilen bitki sekonder metabolitlerinden düşük miktarlarda pestisitlerin bileşimine girenler; nikotin, pyretrinler ve rotenonlardır. Sekonder metabolitler insanlarda hastalık tedavisinde etkili olduğu için bazı ilaçların yapımında da kullanılmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde nüfusun %80'inin sağlık gereksinimlerini ilk etapta geleneksel tıbbi bitkilerden sağlamaktadır. Gelişmiş ülkelerde ise reçete ile satılan ilaçların yaklaşık %25 bitkisel kökenli kimyasallardır(Hassan Adeyemi, 2011).

Çizelge 2.1 Bitkiler tarafından üretilen bazı sekonder metabolitler ve kullanım alanları

Kullanım Alanı	Sekonder Metabolit	Kullanımı	Bulunduğu bitki
Sağlık	Ajmasilin	Antihipertansif	*Catharanthus roseus*
	Artemisin	Antimalarial	*Artemisia annua*
	Berberine	Bağırsak rahatsızlığı	*Coptis japonica*
	Kamptotesin	Antitümoral	*Camptotheca acuminata*
	Kapsaisin	Analjezik	*Capsicum frutescens*
	Kodein	Yatıştırıcı	*Papaver somniferum*
	Kolşisin	Antitümoral	*Colchicum autumnale*
	Digoksin	Kardiatonic	*Digitalis lanata*
	Digitoksin	Kardiovasküler	*Dioscorea deltoidea*
	Elliptisin	Antitümoral	*Ochrosia elliptica*
	Ginsenosides	Tonik	*Panax ginseng*
	Morfin	Yatıştırıcı	*Papaver somniferum*
	Podofillolotoksin	Antitümoral	*Podophyllum petalum*
	Kinin	Antimalarial	*Cinchona ledgeriana*
	Sanguinarin	Veba önleyici	*Sanguinaria canadensis*
	Şikonin	Antibakteriyel	*Lithospermum erythrorhizon*
	Taksol	Antikanser	*Taxus brevifolia*
	Vinkristin	Antilösemik	*Catharanthus roseus*
	Vinblastin	Antilösemik	*Catharanthus roseus*
Gıda	Antosiyanin	Renklendirici	*Vitis vinifera*
	Betalain	Renklendirici	*Beta vulgaris*
	Likopen	Renklendirici	*Lycopersicum esculentum*
	Kinin	Acılaştırıcı	*Cinchona ledgeriana*
	Naftokinonlar	Renklendirici	*Lithospermum erythrorhizon*
	Vanilin	Koku verici	*Vanilla plenifolia*
	Meyan	Tatlandırıcı	*Glycyrrhiza glabra*
	Mirakulin	Tatlandırıcı	*Synsepalum dulcificum*
	Taumatin	Tatlandırıcı	*Thaumatococcus danielli*
	Nane yağı	Esansiyel yağ	*Mentha piperata*
Kozmetik	Yasemin yağı	Esansiyel yağ	*Jasminum officinale*
	Gül yağı	Parfüm	*Rosa damascena*
	Lavanta yağı	Parfüm ve kozmetik	*Lavandula officinalis*
	Şikonin	Kozmetik	*Lithospermum erythrorhizon*
Ziraat	Piretrin, Sinerin	İnsektisit	*Chrysanthemum cinerariifolium*
	Yasmolin	İnsektisit	*Chrysanthemum cinerariifolium*
	Nikotin	İnsektisit	*Nicotiana tabacum*

(Ramachandra Rao ve Ravishankar, 2002)

2.2.1 Bitki doku kültürlerinde sekonder metobolit sentezi

Sekonder metabolitler birçok ekonomik öneme sahiptir. İlaç yapımında hammadde olarak, besin katkı maddesi olarak, kozmetikte ve zirai alanda zararlı mücadelesi gibi amaçlar için kullanılır. Sekonder metabolitlerin bu denli önemli olması da doğal yollarla elde edilmesinin yetersizliği sonucu doku kültürü yöntemleri ile üretimi sağlanmaya başlanmıştır. Bu yöntemle istenilen zamanda istenilen kadar sekonder metabolit üretilebilmesi, bitki türlerinin neslinin tükenmesinin engellenmesi, kaliteli bitkilerin elde edilmesi gibi birçok olumlu sonuç elde edilmiş olur. Metabolitlerin üretiminden verim alınabilmesi için bitki doku kültürü yöntemlerinde çeşitli besi ortamları kullanılır. Üretim yapılacak bitki kısmına ve üretilen sekonder bileşiğe göre çeşitli besi ortamları vardır. Ancak birkaç tanesi çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin; MS ortamı (Murashige ve Skoog (1962)) yüksek tuz içeren bir ortamdır. Bu besi ortamı genelde bitki köklendirilmelerinde ve içerisine eklenen uygun bitki büyüme düzenleyicileri ile kallus oluşumunda kullanılmaktadır. B5 (Gamborg ve ark. (1968)) ortamı ise ilk olarak soya kültürleri için geliştirilmiştir ve nitrat azotu yüksektir. Bunlar gibi bilinen ve sık kullanılan LS (Linsmaier ve Skoog (1965)), WH (White (1963)), NN (Nitsch ve Nitsch (1969)) besi ortamları da mevcuttur (Atar ve Çölgeçen, 2013).

2.2.1.1 Hücre süspansiyon kültürü

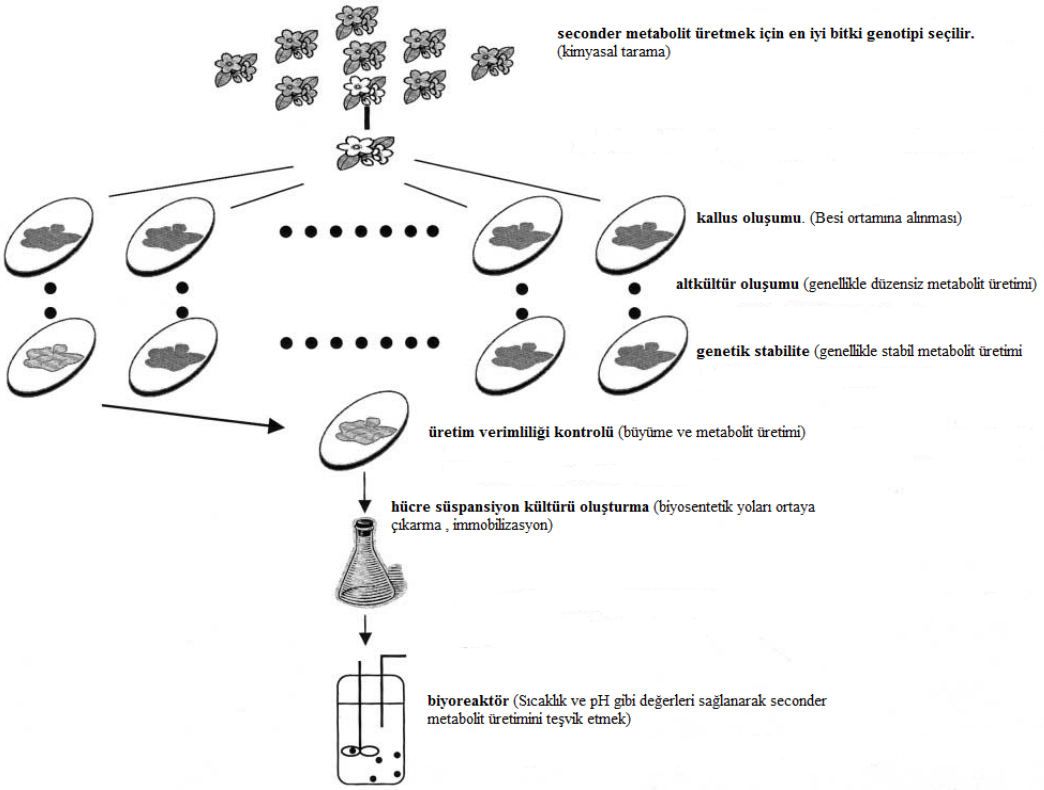
Sekonder metabolitlerin genelde stres koşullarında ortaya çıkıyor olması bitkiler açısından düşünüldüğünde olumsuzdur. Ama bilimsel açıdan metabolitlerin üretimini teşvik ettiği için avantajlı bir yöntemdir. Bitkisel sekonder metabolitlerin üretilmesi için kullanılan önemli bir doku kültürü yöntemi de, hücre süspansiyon kültürleridir. Bu kültür sisteminde sekonder metabolitlerin endüstriyel boyutta elde edilmesine olanak sağlanmış olur. Hücre süspansiyon kültürlerini elde etmek için farklılaşmış bitki materyalleri (hipokotil veya kotiledon) kullanılır. Farklılaşmış materyallerin seçimi yapılırken büyüme hızının yanı sıra hücre içi ve hücre dışı metabolit konsantrasyonlarına bakılır. Böylece en verimli hücre alınarak verim artırılmış olur (Bourgaud vd., 2001).

Hücre süspansiyon kültürleri ile üretilen sekonder metabolitler tıbbi ve ekonomik açıdan sürdürülebilirliği ve avantajı olan bir yöntemdir. Hücrelerin bu sitem içerisinde hızlı

bölünebilmesi ve kontrol altında tutulabilmesi de bu sitemlerin büyütülmesini desteklemektedir (Phillips vd., 2007).

Süspansiyon kültür ortamının kallus kültür ortamından farkı, kallus kültür ortamına katılaştırıcı ajan koyuluyorken, süspansiyon kültür ortamına koyulmamasıdır. Dolayısıyla, süspansiyon kültür ortamı sıvı bir ortamdır. Süspansiyon kültürlerinden iyi bir sonuç alabilmek için kallus kültürlerinden yararlanılır. Bu durum teknik açıdan daha avantajlıdır. Çünkü in vitro ortama uyum sağlamış kallus kültüründen alınan parçalar, ana bitkiden alınan parçalara göre sıvı ortama daha çabuk adapte olabilmektedir (Atar ve Çölgeçen, 2013).

Hücre süspansiyon kültürleri aşama olarak bitkiden alınan eksplant ile başlatılmış olur. Alt kültürdeki gelişimler takip edilerek genetik yeterliliğe ulaşıldığında hücre verimlerine bakılarak metabolit üretme miktarı hesaplanabilir ve daha verimli kallusun süspansiyona alınması sağlanabilir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Bitki hücrelerinden sekonder metabolit üretimi (Bourgaud vd., 2001)

2.3 Bitki Hücrelerinin İkincil Metabolit Sentezi İçin Tutuklanması (İmmobilizasyon)

Hücre kültürlerinden sekonder metabolit üretimindeki gelişme, bitki hücrelerinin organizasyonu ve farklılaşmasıyla bağlantılıdır. İmmobilizasyon, katalitik aktifliğe sahip hücre veya enzimlerin bir destek üzerinde tutuklanması ve bu sistemden sıvı fazın geçirilmesi üzerine kurulmuştur. İmmobilize bitki hücreleri, istenilen ürünlerin, öncü moleküllerden, tek veya birçok basamaklı biyodönüşümünde kullanılır (Lindsey ve Yeoman, 1985).

İmmobilize bitki hücreleri, immobilize enzimlere göre daha avantajlıdır. İmmobilize enzimler için uygun pH, reaksiyon karışımının sıcaklığı ve kofaktör beslemesi gereklidir. İmmobilize enzimler genellikle tek basamakta ürün verirler ve organizmadan izole edilirken aktivitelerinde azalma olur. Bunlara karşın immobilize hücreler; çoklu enzim reaksiyonları gerçekleştirilebilirler. Yüksek biyosentetik aktiviteye sahip hücreler seçilirse katalitik aktivite hızlandırılabilir, hücreler üretebildikleri sürece, kofaktöre ihtiyaç duyulmaz. İmmobilize hücreler, immobilize enzimlere göre daha kolay elde edilirler (Yağcı ve Toker, 2008).

Bitki hücrelerinin tutuklanması yeni yeni gelişen bir tekniktir. *Catbaranthus roseus* ve *Daucus corata* bitki hücrelerinin aljinat ile tutuklanması bu bağlamda rapor edilen ilk çalışmadır ve dikkat çekici olmuştur. Bu tekniğin temeli enzim ve mikroorganizmaların tutuklanmasına dayanmaktadır (Çizelge 2.2) (Babaoğlu vd., 2001).

Hücre immobilizasyonu için özellikle son 20 yıldan beri yapılan çalışmalarda değişik teknikler geliştirilmekle beraber teknikler temel anlamda taşıyıcıya bağlama ve tutuklanma olarak iki gurupta incelenir. Yöntemlerden polimer içerisinde tutuklanma ile immobilizasyon, hücre immobilizasyonunda kullanılan en kolay ve basit koşullar olduğu için güvenli yöntemdir. Ancak bu yöntem enzim immobilizasyon işleminde kullanılan maddenin gözenek çapının genişliği sebebiyle daha az tercih edilmektedir (Göksungur ve Güvenç, 2002).

Çizelge 2.2 Bazı ikincil (sekonder) metabolit için tutuklama çalışmaları

Bitki türü	**Subtrat/öncü**	**Ürün**	**Tutuklama metodu**	**Kaynak**
Biyodeğişimler				
Cantharanthus roseus	Kanthenamin	Ajmalisin	Agaroz	Felix vd. (1981)
Digitalis lanata	Dijitoksin	Digosin	Aljinat	BrodeIius vd. (l979)
Daucus carota	Dijitoksigenin	Periplogen	Aljinat	Jones- Veliky (1981)
Nicotiana labacum	Keto esterleri	Hidroksi esterleri	Aljinat	Naoshima - Akakabe (1981)
Papaver somniferum	Kodein	Kodein	Poliüretan köpük	Fruya vd. (1984) Frusaki vd. (1983)
Mucuna pruriens	L-tirozin	L-LOPA	Aljinat	Wicherse vd. (1983)
Capsicum spp.	Ferulik asit, vanililamin	Kapsaisin, vanilin	Aljinat	Johnson vd.(1996)
Öncüden sentezlenenler				
Cantharanthus roseus	Triptamin	Ajmalisin	Aljinat, agaroz	Brodelius vd. (1979)
Capsicum frutescens	İzokaprik asit, valin, vaniliamin, ferulik asit	Kapsaisin	Poliüretan köpük	Brodelîus-Nilsson (1983) Lindsey-Yeoman (1983b) (1984)
Coffea arabica	Theobromin	Kafein	Membran	Lange vd. (1990)
De novo sentez				
Capsicum frutescens		Kapsaisin	Poliüretan	Johnson (1993)
Cantharanthus roseus		Ajmalisin	Aljinat, agaroz	Brodelius-Nilsson (1980)
Glycine max		Fenolikler	Hollow fiber	Presonil-Pederson (1983)
Dioscorea dehoidea		Diosgenin	Poliüretan	İshida (1988)

(Ramachandra Rao ve Ravishankar, 2002)

Kullanılan genel teknik, hücrelerin, etraflarında polimerize olabilen jel veya jel kombinasyonları ile tutuklanmasıdır. Kalsiyum aljinat en çok kullanılan matrikstir. Agar, agaroz, karregan ve poliakrilamid de matriks olarak kullanılan jellerdir. Aljinat jelleri, toksik olmaması ve basitliği nedeniyle en geniş kullanıma sahip jellerdir. Diğer bir alternatif destek poliüretan köpük ve içi boş fibril membranlardır (Reyes-Escogido Mde vd., 2011). Aljinat ilk olarak 1881 yılında İngiliz kimyager E.E.C. Stanfort tarafından tanımlanmıştır. Doğada kahverengi deniz alginde bulunmaktadır. Bunun yanısıra *Azotabacter vinelandii* gibi toprak bakterilerinde ve bazı Pseudomonas türlerinde de aljinat benzeri polimerik maddeler bulunmaktadır. Kahverengi deniz alginin %40'ı

aljinattır ve hücre içerisinde sodyum, kalsiyum, magnezyum, stronsiyom ve baryum iyonları içeren jel halinde bulunur (Göksungur ve Güvenç, 2002).

Bitki hücrelerinin kültür ortamına tutuklanması oldukça avantaj sağlayan bir durumdur. Ortamda tutuklanan enzimlerin aktivitelerini kaybetmemeleri için uygun pH ve sıcaklık ayarları yapıldıktan sonra gerekli reaksiyon bileşikleri ve kofaktörlerin ortama eklenmesi gerekmektedir. Ortamda tutuklanan enzimler genellikle tek aşamalı reaksiyonların katalizlenmesinde görev alırlar. Daha karmaşık reaksiyonlar içeren çalışmalarda bu yöntemin kullanılması istenilen ürünlerin elde edilmesini engelleyebilir. Bir başka dezavantaj da enzimlerin canlılardan izolasyonları esnasında aktivitelerinin kaybolması ya da azalması ihtimalidir. Ortama tutuklanan hücrelerin sağlayabileceği en önemli avantaj ise aktivitelerini uzun süre koruyabilmeleridir (İşlek, 2009, Payne, 1991).

Bitkilerdeki tutuklama işlemi sekonder metobolitlerin üretimi için oldukça avantaj sağlar, bunlardan bazıları:

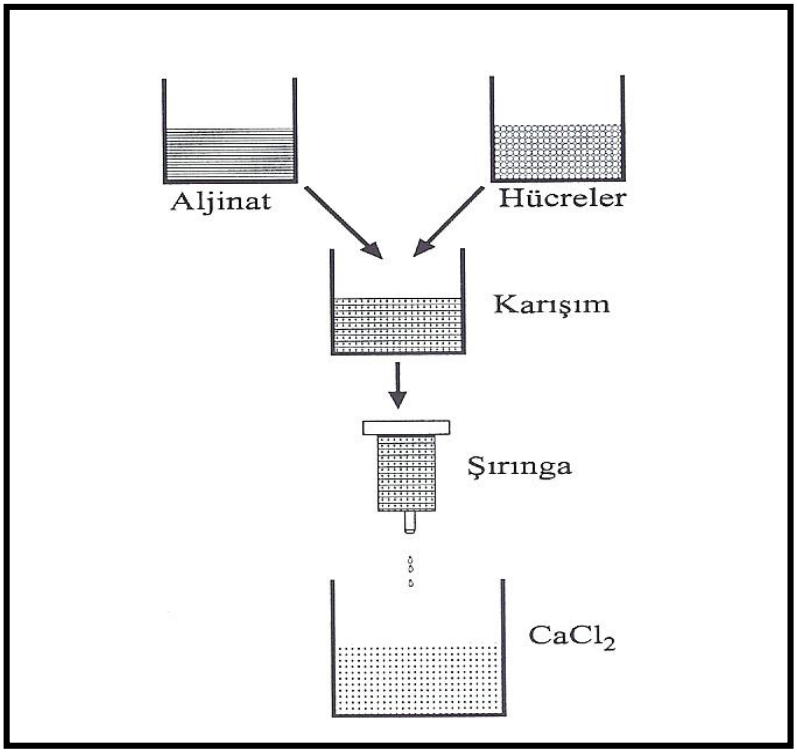
1. Tutuklanmış hücrelerdeki büyüme sıvı ortamdaki hücrelere göre daha yavaş olur. Böylelikle de yaşlanma gecikir ve daha fazla sekonder metobolit elde etme olanağı sağlanmış olur.
2. Tutuklanmış hücrelerin olduğu ortamlara müdahale etmek daha olanaklıdır. Ortama bitki büyüme düzenleyiciler ya da metabolit arttırıcı uyarıcıların eklenmesi sıvı ortama göre daha kolay ve sonuç alınabilirdir. Buna ek olarak ortama eklenen maddelerin etkisi kontrol edilip örneğin bitki büyümesi durdurulup veya yavaşlatılıp sekonder metabolit üretimi teşvik edilebilir.
3. Sistemden yaşlı hücrelerin uzaklaştırılması ile sistem sürekli genç ve verimli bir şekilde tutulabilir.
4. Sistemin sürekli kararlı olması bazı biyokimyasal değişiklikleri ve yan ürün etkilerini ortadan kaldırmış olur (Babaoğlu vd., 2001).

Bitki hücrelerinin tutuklanmasında; kovalent bağlanma, tutuklanma (adsorpsiyon) ve tuzaklama yöntemleri kullanılabilir;

Adsorpsiyon: Bitki hücrelerinin jelatin, agar, aljinat, polipropilen ve cam gibi desteklere tutundurulmasıdır. Bitki hücrelerinin destek üzerine tutunur halde durması beslenmesine de olanak sağlamış olur.

Kovalent bağlama: Glutar aldehit ve karbodiimidler gibi bağlayıcı maddeler ile mikroorganizmaların cam gibi desteklere bağlanması yöntemidir. Ancak bu kullanılan maddelerin bitki hücreleri için reaktif olması yöntemin kullanımını sınırlı hale getirmiş ve tercih edilmemesine sebep olmuştur.

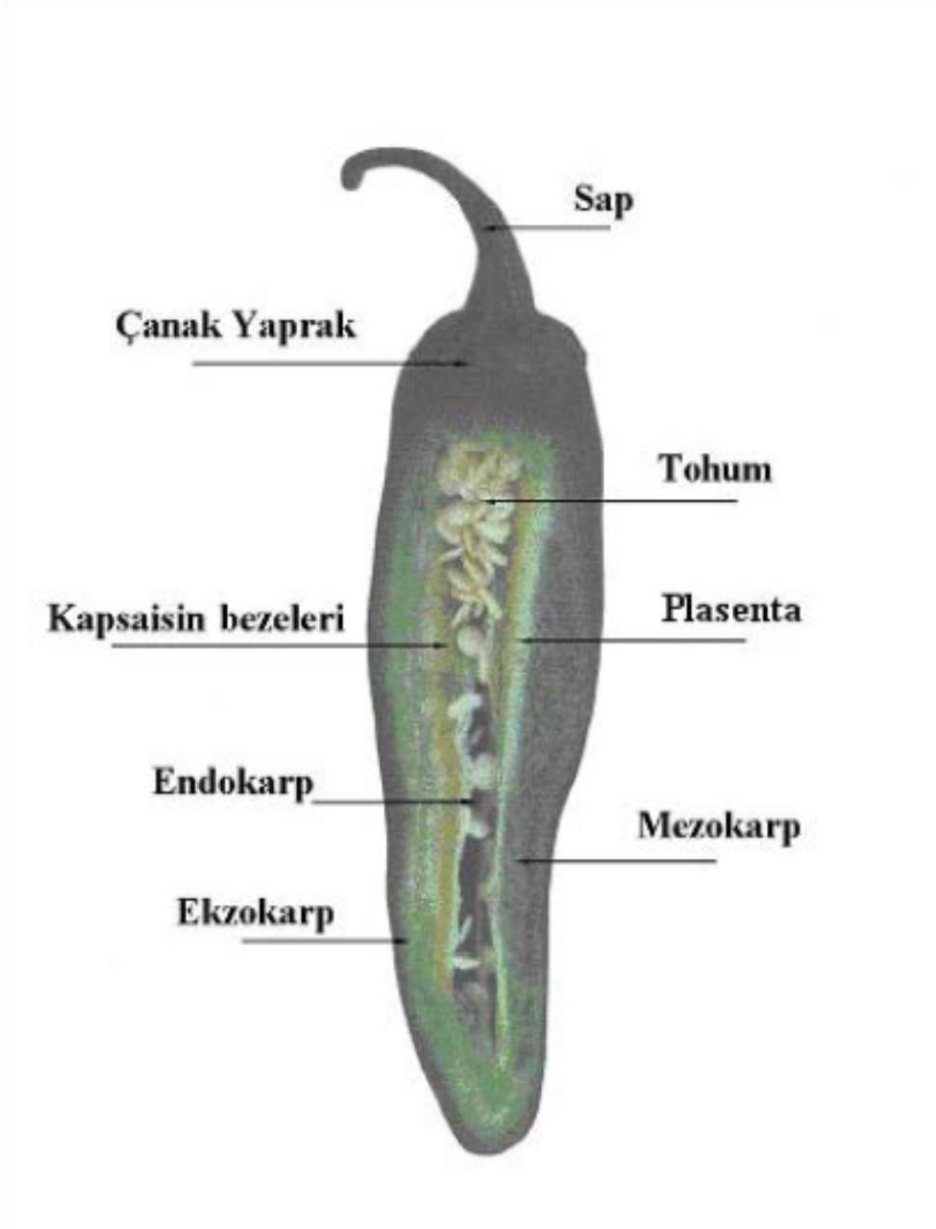
Tuzaklama: Hücrelerin tutuklanmasında en çok kullanılan yöntemdir. Çeşitli alt yöntemleri vardır. Polimer oluşturması, gözenekli yapıların kullanılarak kuşatma işlemi en çok kullanılan yöntemdir. Polimer oluşturmada aljinat, agar, karrajean doğal polimerler ve sentetik polimerler kullanılmaktadır. Polimerleşme koşullarının diğerlerine göre daha yumuşak olması nedeniyle en çok kullanılan polimer aljinattır (Şekil 2.2) (Sökmen ve Gürel, 2002).



Şekil 2.2 Hücrelerin kalsiyum aljinatla tutuklanmasının şematik şekli (Sökmen ve Gürel, 2002)

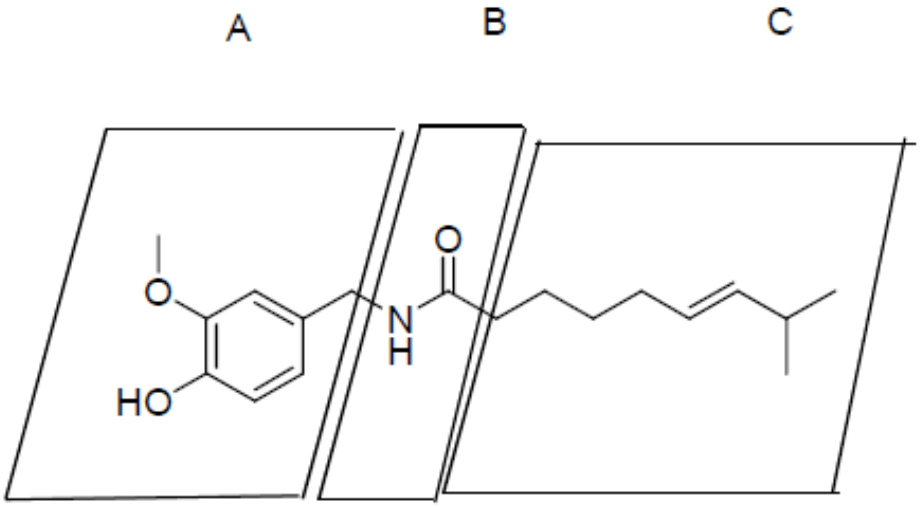
2.4 Kapsaisin ve Kapsaisinoidler

Capsicum annuum L. cinsi, *Dicotyledonae* sınıfının, *Tubiflorae (Solanales*) takımının, *Solaneceae* familyasında bulunur. Acı kırmızı biberin *(Capsicum annuum* L.*)* yapısında başlıca; acılık veren etken madde kapsaisin, bazı vitaminler, kırmızı karotenoidler, yağ, mineraller ve aromatik bileşikler bulunmaktadır. Meyvelerin tatlı tiplerinde kapsaisin yoktur. *Capsicum annuum* L.'de kapsaisin miktarı % 1.5-1.8'e kadar çıkmaktadır (Romero-Castillo vd., 2015) (Şekil 2.3). Anavatanı Güney Amerika olmakla birlikte Güney Asya ülkeleri, ülkemizin Güney Doğu Anadolu Bölgesi gibi dünyanın çeşitli bölgelerinde yaklaşık 7000 yıldır yetiştirilmekte olup keskin ve acı aroması nedeniyle yemeklerde baharat ve sos olarak kullanılmanın yanında içerisindeki etken maddelerde birçok alanda (sağlık, kozmetik, zirai vb.) kullanılmaktadır (Şekil 2.3) (Şener, 2010).



Şekil 2.3 Biber (*Capsicum annuum* L.) meyvesinin anatomisi (Yemiş vd., 2004)

Bibere acılığı veren madde yıllarca merak uyandırmış ve araştırılmıştır. Bu çalışmalara Burcholz kırmızıbiberlerdeki acılık verici bileşenlerin organik çözücülerle ortaya çıkarılabilen ve alkalilerde tuz şeklinde bulunan bileşenler olduğunu söyleyerek hız kazandırmıştır (Burcholz, 1846). Thresh ise bu bileşeni kapsaisin olarak adlandırmıştır. Sonraki yıllarda Micko kapsaisini saflaştırmış ve metoksil ve hidroksil gurupların varlığını kanıtlamıştır. Yirmi yıl sonra Nelson ve Dawson, kapsaisinin kimyasal yapısını '8-metil- 6-nonenilvanililamit' olarak belirlemişlerdir (Şekil 2.4). (Poyrazoğlu vd., 2005).



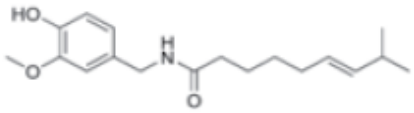
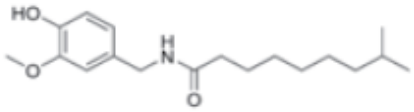
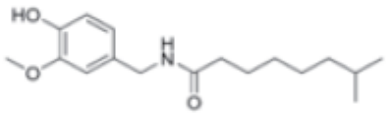
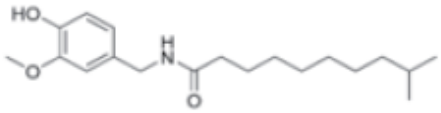
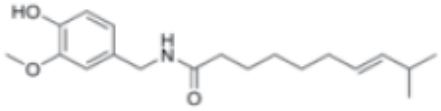
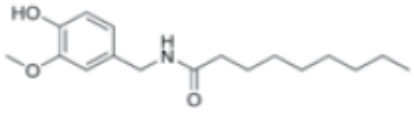
Şekil 2.4 Kapsaisinin molekül yapısı; **A**: aromatik halka **B**: amit bağı **C**: hidrofobik yan zincir (Arora vd., 2011)

Biberin acılık karakteri baskın kalıtım göstermektedir. Son zamanlarda yapılmış olan haritalama çalışmaları sonucu, 2. kromozom üzerinde olduğu belirlenen, C-lokusundaki baskın alelin bitki hücrelerinde kapsaisin sentezi ve birikiminden sorumlu olduğu belirlenmiştir. Ancak C-lokusunda bulunan alel sadece acılık karakterinin bitkide bulunup bulunmayacağını belirlemekte, bitkinin acılık düzeyi ise kantitatif kalıtım göstererek, bir çok genin ve çevresel faktörlerin etkisi sonucu belirlenmektedir. Bütün kapsaisinoidler C9-C11 dallanması gösteren yağ asitlerinin ve vanililamin bileşiklerinin asit amid türevleridir. Farklı kapsaisinoid bileşikleri arasındaki en önemli farklar; alifatik yan zincirlerinin uzunluklarının arasındaki farklılıklar, bileşiğin yapısında çift bağ olup olmaması ve molekülü oluşturan birimlerin dallanma noktalarıdır. Tüm bu yapısal farklılıklara bağlı olarak bitkinin acılık düzeyi de çeşitlilik gösterir (İşlek, 2009).

Acı biberin yapısında kapsaisin, nordihidrokapsaisin, homodihidrokapsaisin, dihidrokapsaisin ve homokapsaisin olarak adlandırılan kapsaisinoidler bulunur (Çizelge 2.3) . Bunlardan temel kapsaisinoidleri oluşturan kapsaisin ve dihidrokapsaisinin tat ve sinirler üzerine etkisi minör kapsaisinoidlere (nordihidrokapsaisin, homodihidrokapsaisin ve homokapsaisine) göre iki kat daha fazladır. Farklı biber türlerinin *(Capsicum frutescens, C. annuum* ve *C.chinese)* kapsaisinoid içeriğinin 0.22-20 mg/g olduğu belirtilmiştir Kapsaisinoidlerin bağıl oranları, kimyasal yapıları ve acı tatlarının derecesini ifade eden Scoville dereceleri Çizelge 2.3 de verilmiştir (Reyes-Escogido Mde vd., 2011).

Botanikte *Capsicum annuum* L. olarak bilinen kırmızı acı biberin etken maddesi kapsaisin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) dir. Buradaki [(4-hidroksi-3metoksifenil)-metil], vanilil kökünü ifade etmektedir. Acı biberin yapısındaki kapsaisin miktarı % 0.12-17 mg arasında değişmektedir. Yapısında başlıca; acılık veren etken madde kapsaisin ve bunun yanı sıra, bazı vitaminler, kırmızı karotenoidler, yağ, mineraller ve aromatik bileşikler bulunmaktadır. Kırmızı biberlere acılığı veren kapsaisinoit bileşiklerinden kapsaisin (% 46-77) en fazla bulunanıdır. Diğer kapsaisinoit bileşiklerden dihidrokapsaisin % 21-40, nordihidrokapsaisin % 2-12, diğerleri ise % 5'den az düzeyde bulunur. Kırmızıbiberlerde renk, başta kapsantin olmak üzere, karoten, kapsorubin, zeaksantin, kriptoksantin ve lutein gibi karotenoitlerden ileri gelir (Karadal vd., 2001).

Çizelge 2.3 Doğal ve sentetik kapsaisinoidlerin kimyasal yapısı ve acılık dereceleri (Şener, 2010)

Kapsaisinoid	Bağıl oran	Scoville acı derecesi	Kimyasal Yapı
Kapsaisin	69%	16,000,000	
Dihidrokapsaisin	22%	15,000,000	
Nordihidrokapsaisin	7%	9,100,000	
Homodihidrokapsaisin	1%	8,600,000	
Homokapsaisin	1%	8,600,000	
Nonivamid			

(E)-8-Metil-N-vanilil-6-nonenamid olarak adlandırılan kapsaisinin (Şekil 2.4) kapalı formülü $C_{18}H_{27}NO_3$ (Molekül Ağırlığı: 305.41 g) olup kokusuz ve renksiz bir tozdur. Erime derecesi 57-66 ^{o}C arasındadır. Alkolde, kloroformda ve benzende çözünür, karbon disülfitte az çözünür ve soğuk suda neredeyse hiç çözünmez. Bekletme, dondurma ve pişirme etkilerine karşı orijinal potansiyelini korur (Rollyson vd., 2014).

Kapsaisin mikrarının belirlenmesinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) metodu yaygın olarak kullanılır. Bununla beraber gaz kromatografisi ve LC/MS metodlarının kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur (Ha vd., 2008).

Kapsaisin bileşikleri bazı özgün özelliklerinden dolayı farmakolojik amaçlı uygulamaların yanı sıra besin katkı maddesi üretiminde ve böcek ilacı endüstrisinde kullanılmaktadır (Díaz vd., 2004, Schweiggert vd. 2006). Kapsaisin bileşiklerinin tıbbi amaçlı kullanımını sağlayan bir başka özelliği ise kanser fizyolojisinde oynadıkları roldür. Ancak bu rol değişkenlik göstermektedir. Çünkü bazı çalışmalardan elde edilen sonuçlar kapsaisin bileşiğinin kanserojen etkileri olduğu fikrini desteklemekte, bazı çalışmalar ise kapsaisin bileşiğinin tümör oluşumunu engelleyici özelliği olduğunu göstermektedir (Surh ve Lee, 1996). Kapsaisinin prostat kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği ve prostat kanseri için etki mekanizmalarının bilinmesi gerektiğini belirtmişlerdir (Cazenave vd., 2009). Ayrıca kapsaisin bileşiklerinin tarımda kullanımına yönelik de birçok çalışma yapılmıştır. Kapsaisin bileşikleri önemli ölçüde anti-mikrobik ve anti-fungal etkilere sahiptir (Masood vd., 1994, Molina-Torres J. vd., 1999).

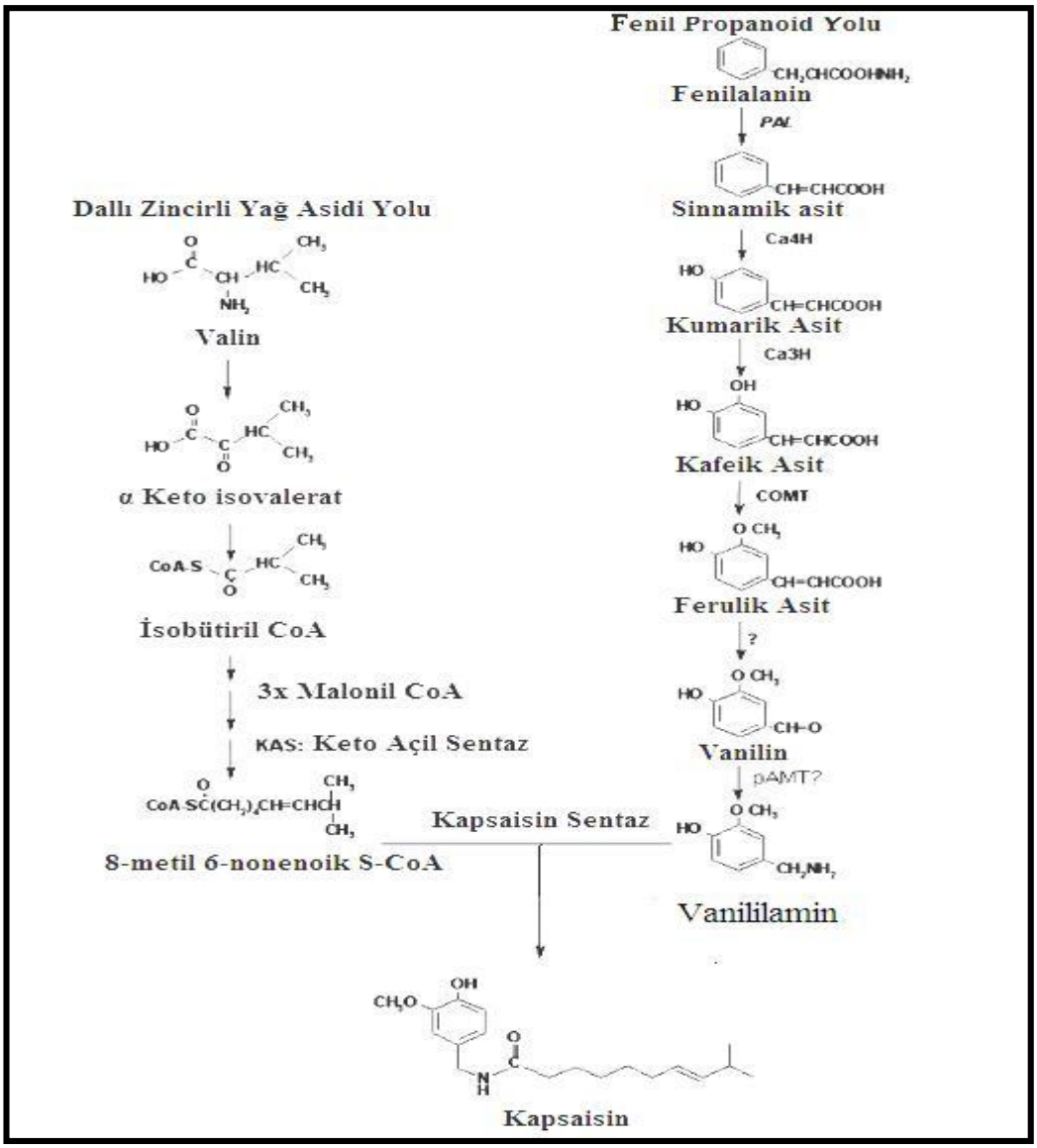
2.4.1 Kapsaisin biyosentezi

Kapsaisin, vanililamin ve 8-metil non-trans-6-enoik asit bileşiklerinin amid türevidir (Bennett ve Kirby, 1968). Kapsaisin biyosentez mekanizması büyük ölçüde belirlenmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Kapsaisinoidlerin yapısında bulunan vanililamin kısmı, şikimat arogenat metabolik yolundan elde edilen fenillalanin'den, yağ asiti kısmı ise valin' den sentezlenmektedir. Vanililamin kısmının fenilpropanoid metabolik yolu aracılığı ile sentezlendiği düşünülmektedir. Bu düşünce yapılan bir çalışmada *Vanilla planifola* yapısında bulunan vanilinin bu yolla sentezlendiğinin belirlenmesi sonucu ortaya çıkmış ve kabul edilmiştir. Bu çalışmaya göre fenilalanin, fenilpropanoid

metabolik yoluna girer ve kimyasal reaksiyonlar sonucu, PAL (fenil alanin amonyum liyaz) enzim aktivitesi ile sinnamik asite çevrilir. Daha sonra takip eden enzimatik aşamalar sonunda ferulik asit sentezlenir. Bir sonraki aşamada fruloil-CoA oluşur ve takip eden reaksiyon sonunda da bu bileşik vaniline indirgenir. Ancak bu mekanizmaya alternatif olarak vanilin biyosentezinin gerçekleştirildiği düşünülen farklı metabolik yollar da önerilmiştir (Walton vd., 2003). Ancak bunların hiçbiri bitkilerle yapılan araştırmalarla açıklığa kavuşturulamamıştır (Díaz vd., 2004).

Bitkilerde kapsaisin biyosentezi iki yolla tanımlanır. Bunlardan ilki fenilpropanoid, fenolik yapısını belirler. Bir diğeri de yağ asidi metabolizması, molekülün yağ asitlerini belirler. Meyve gelişim sırasında yavaş yavaş kapsaisin birikim miktarı da artış gösterir, bu artış 40-50 günde maksimum seviyeye ulaşır. Daha sonra sekonder metabolit seviyesinde de peroksidaz enzimine bağlı azalma meydana gelir. Sekonder metabolit seviyesini artırmak isteyen araştırmacılar su seviyesini düşürerek bitkiyi strese sokar ve fenilpropanoid mekanizmasına bağlı olarak kapsaisinoid seviyesini arttırırlar (Reyes-Escogido Mde vd., 2011).

Kapsaisinoid bileşiklerinin yapısındaki yağ asitlerinin valin moleküllerinden sentezlendiği Leete ve Louden (1968)'in işaretli kapsaisin metabolik öncüleri kullanarak yaptığı çalışmalar tarafından da desteklenmiştir (Díaz vd., 2004).

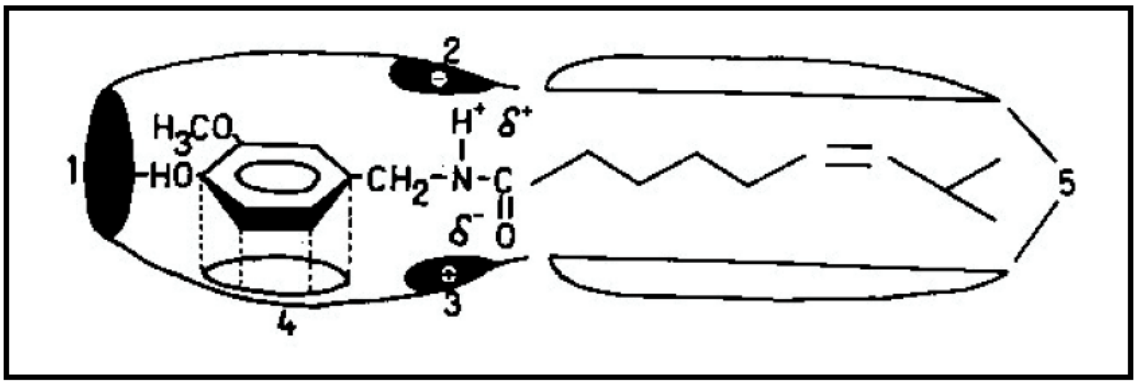


Şekil 2.5 Kapsaisin biyosentez yolu (Chayapathy vd., 2006)

Biber türlerinde plasenta dokusu hücrelerinin bazı genlerinin (Pal, Ca4h, Comt) protein sentezi için kullanımının hücrelerde biriken kapsaisinoid miktarı ile doğru orantılı olduğu belirlenmiştir (Curry vd., 1999). Bu sonuç aynı zamanda vanililamin bileşiğinin fenil propanoid metabolik yolu ile sentezlendiğini de desteklemektedir. Her durumda vanilinin, vanililamine dönüşümünün aminotransferaz enzimi tarafından katalizlendiği düşünülmektedir. Aminotransferaz enzimini kodlayan gen, yapılan araştırmalar sonucu klonlanmış ve bu genin proteine çevrilme düzeyi ile kapsaisinoid sentezi arasında oldukça güçlü bir pozitif korelasyon olduğu belirlenmiştir (Kim vd., 2001). Kapsaisin biyosentez yolu şekil 2.5' de gösterilmektedir.

2.4.2 Kapsasisinoidlerin fizyolojik etkileri

Kapsaisin ve buna bağlı bileşiklerinin, dil ve deri gibi duyusal bölgelere temas etmesi sonucunda, bölgesel ve iletime bağlı olarak ağrı, yanma gibi etkilere neden olmaktadır. Kapsaisinin ağrıya duyarlı sinirler üzerinde yaptığı etkiyi gösteren bir reseptör model geliştirilmiştir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Kapsaisin için reseptör model (Szolcsanyi, 2004).

Şekildeki gibi kapsaisin 1.reseptör bölgeye 4-OH^-üzerinden H^+ bağı ile 2. Elektronegatif bölgeye N'a bağlı H^+ ile, 3. Elektro pozitif bölgeye C'a bağlı O^{-2} ile, apolar olan 4. ve 5. bölgelere ise Wan del Waals kuvvetleri le bağlanmaktadır. Reseptörler üzerinde uyarıcıların konsantrasyonu, molekül özellikleri (boyut, şekil, fonksiyonel gruplar, sterokimyasallar) uyarıcıların bağlanma pozisyonlarının önemli olduğu tespit edilmiştir (Yemiş vd., 2004).

Kapsaisinle ilgili fazla sayıda *in vitro* çalışma bulunmamaktadır. Çalışmalar genelde *in vivo* olarak gerçekleştirilmiştir. Kapsaisin ve kapsaisinoidin üyeleri; gastrointestinal sistem, kardiyovasküler sistem ve solunum sistemi üzerinde etkileri olduğu deney hayvanlarında gözlenmiştir (Surh ve Lee, 1995).

Kapsaisinin antitümoral, antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuar, immünmodülatör analjezik, ülseri ve obeziteyi engelleyici etkileri olduğu bazı çalışmalarla gösterilmiştir (Maggi. vd., 1989).

2.4.3 Kapsaisin Elde Edilmesi İle İlgili Bitki Doku Kültürü Çalışmaları

Lindsey vd. (1983) yaptıkları çalışmada, besin içeriği yönünden iki farklı ortam kullanmışlardır. Bunlardan biri büyüme ortamı (bütün besin maddeleri + büyümeyi düzenleyen hormonlar) diğeri ise minimum ortam (sadece bazı besinler) dır. Minimum ortam içerisinde hücre bölünmesi ve hücre büyümesi için gerekli hormonlar ve diğer düzenleyici moleküller olmadığı için büyüme engellenmiştir. Bu iki farklı ortamdaki hücrelerin ürettiği kapsaisin beş günlük bir süreden sonra ortamdan alınarak HPLC ile ölçümler yapmışlardır. Büyüme ortamında kültürü yapılan hücrelerden elde edilen ortalama kapsaisin miktarı 1,397 ±0.136 mg k.a. ve minimum ortamda kültürü yapılan hücrelerden elde edilen kapsaisin miktarı ise 2,636 ± 0.298 mg k.a. olarak belirlemişlerdir. Bu sonuçlardan da anlaşılacağı gibi, hücre bölünmesi ve büyüme gibi birincil metabolik fonksiyonların, büyük ölçüde engellendiği minimum ortamda bitki hücreleri büyüme ortamındaki hücrelere göre yaklaşık 2 kat daha fazla kapsaisin sentezlemişlerdir. Bu sonuçlar daha önce elde edilen verileri destekleyici nitelikte olup, kültür büyüme hızı ile sekonder metabolit bileşiklerin sentezlenme hızı arasında, antagonistik bir bağıntı olduğunu bir kez daha göstermiştir.

Lindsey ve Yeoman (1984a), süspansiyon kültürü ve tutuklanmış hücre kültürü için 8 grup hazırlamışlardır. Hazırlanan kültür ortamları içerisinde kapsaisin molekülüne yakın benzerlikte ya da sentezde kullanılan bir metabolik öncü bileşik bulunmamaktadır. 5. ve 10. günlerin sonunda kültür gruplarının yarısı alınarak ortamda biriken kapsaisin moleküllerinin miktarlarının belirlenmesi için analiz yapmışlardır. Bu veriler göstermektedir ki; ortama konulan bitkilerin kuru ağırlığı baz alındığında, metabolik öncü moleküllerin yokluğunda, hem büyümenin yavaş olduğu son beş günde, hem de daha fazla büyüme hızının saptandığı ilk beş günde kültür ortamı içerisinde poliüretan ile tutuklanan hücrelerin, süspansiyon kültüründe büyüyen hücrelere oranla 3 kat daha fazla miktarda kapsaisin sentezlediğini göstermektedir. 5. ve 10. günler arasında biriken kapsaisin miktarındaki artış, tutuklanmış hücrelerin kapsaisin sentezleme hızının daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu durumun araştırılması ve artışın gerçek nedeninin belirlenmesi için tutuklanmış hücreler ve serbest süspansiyon kültürü içerisindeki hücreler L-[U- ^{14}C] fenil alanin ile işaretlenmiştir. Kültür ortamında biriken kapsaisin kloroform kullanılarak ortamdan çıkarılmış ve TLC plakaları üzerinde kromatografik

analiz yapmışlardır. Elde edilen ve kapsaisin molekülüne karşılık gelen noktalar bu plakalar üzerinde belirlemişlerdir. Radyoaktif işaretli molekülün hücreler tarafından alınma hızı yüksek olmasına rağmen bu hız tutuklanmış hücrelerde ve serbest süspansiyon kültürü içerisindeki hücrelerde yaklaşık olarak aynıdır. Ancak işaretli molekülün kapsaisin sentezinde kullanılma hızı tutuklanmış hücrelerde çok daha hızlı gerçekleşmiştir.

Lindsey ve Yeoman (1984b), fenilalanin ve isokaprik asit gibi metabolik öncü moleküllerin kapsaisin sentezinde kullanılmasının üretimi (11 mg kapsaisin/1g bitki) maksimum seviyelere taşıdığını belirlemişlerdir. Elde edilen bu miktar 1 g taze bitkinin hücrelerinin (hücreler içinde %90 oranında su olduğu varsayılarak) 1.1 mg kapsaisin sentezleyebildiği anlamına gelmektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar göstermektedir ki; 1 g bitkinin plasental doku hücreleri 2.04 mg kapsaisini metabolik öncü moleküller olmadan sentezleyebilme kapasitesine sahiptir. Başka bir çalışmada kültür ortamına 2.5mM ferulik asit eklenmesinin plasental doku hücreleri tarafından kapsaisin sentezini 3.22 mg/g seviyesine çıkardığı belirlenmiştir. Bu sonuç plasental doku hücrelerinin, metabolik öncü moleküllerin varlığında çok daha fazla miktarlarda kapsaisin sentezleyebildiklerini göstermektedir.

Holden vd. (1987), ikincil metabolik bileşiklerin (fenolik bileşikler ve kapsaisin), *Gliocladium deliquescens* tarafından arttırılmasının aynı zamanda fenilalanin amonyum liyaz aktivitesinde de artışa neden olduğunu belirlemiştir. Bu çalışmada kurdlan bileşiği kültür ortamına tutuklanmış hücrelerin ortamına eklendiğinde ikincil metabolik bileşiklerin sentezini uyarıcı etki göstermiş ve *A. niger* ve *R. oligosporus* hücrelerinden elde edilen bileşikler de kültür ortamına eklendiğinde ikincil metabolik bileşiklerin üretimini artırmışlardır. Bu sonuçlar mikroorganizmalardan ve mantarlardan elde edilen bileşiklerin, bitki hücresi kültür ortamında uyarıcı ve üretimi arttırıcı moleküller olarak kullanılabileceklerini göstermektedir.

Johnson vd. (1990) yaptıkları çalışmada kitosan, kurdlan ve ksantan'ın kapsaisin üretimi üzerine uyarma kapasitesi ve sodyum aljinatın etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre kapsaisin üretimi tutuklanmış hücrelerde kurdlan ve ksantan kullanımında kontrole göre sırasıyla 1,8 ile 2 kat daha fazla artmıştır. Kurdlan ve ksantan

kombinasyonu daha etkilidir ve kültürün 14. gününde kapsaisin üretimini 7,9 kat artırmıştır. Kitosan'la muamele edilmiş serbest hücrelerde ise maksimum kapsaisin üretimi 6. günde gerçekleşmiştir. % 0,05 sodyum aljinat uyarımı kültürün 10. gününde hücre süspansiyonundaki hücrelerde kapsaisinde 1,6 kat artış sağlamıştır.

Johnson vd. (1991), tutuklanmış hücreler ve plasental dokularda kapsaisin üretimi, fungal preparasyonların (*Aspergillus niger* ve *Rhizopus oligosporus* ekstraktları ve süzüntüsü) ve mikrobiyal polisakkaritlerin (kurdlan) kapsaisin üretimi üzerine etkileri ve kapsaisin üretimi üzerine öncü maddelerin etkisini çalışmışlardır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre kapsaisin üretimi tutuklanmış plasental dokularda tutuklanmış hücrelere göre daha yüksektir. Maksimum kapsaisin üretimi tutuklanmış plasentada başlangıç günündeki 700 µg dan 14. günde 1345 µg değerine ulaşmıştır. Kültürün besin ortamının yenilenmesi sonucu, 28 günlük kültür hücrelerinden 2400 µ*g* miktarında kapsaisin elde edilmiştir. Tutuklanmış hücrelerde kapsaisin üretimi 3 µg/g dan 28. günde 47 µg' a çıkmıştır. Tutuklanmış hücre sisteminde kapsaisin sentezinde kurdlan daha etkili bulunmuştur ve kontrol ile karşılaştırıldığında sentez yaklaşık iki kat artmıştır Tutuklanmış hücreler, plasental dokulara göre kurdlan etkisine daha etkili cevap vermişlerdir. Her iki fungal türün miselar ekstrakları tutuklanmış plasental dokularda yaklaşık % 25 civarında kapsasin artışına neden olmuştur.

Ramachandra Rao vd. (1996), *Capsicum frutescens* ve *Daucus carota* hücre süspansiyon kültürlerine *Spirulina platensis*' den elde ettikleri fikosiyanini farklı konsantrasyonlarda uygulamışlardır. *Capsicum frutescens* hücre süspansiyonunun bu şekilde uyarımı ile kapsaisin miktarı yaklaşık olarak iki kat artmıştır. Benzer şekilde *Daucus carota* hücre kültürlerinde de antosiyanin miktarında iki kat artış gözlenmiştir.

Ramachandra Rao ve Ravishankar (2000), *Capsicum frutescens*' in serbest süspansiyon hücreleri ve tutuklanmış hücre kültürlerini fenil propanoid öncü maddeleri protokatekuik aldehit ve kafeik asit ile muamele ederek biyodönüşüm özelliklerini araştırmışlardır. Dışardan bu metabolik öncüler ilavesi ile protokatekuik aldehit ve kafeik asitin vanilin ve kapsaisine biyodönüşümü belirlenmiştir. Burada önemli nokta ise metabolik öncü ile besleme sonucu protokatekuik aldehitin vaniline biyodönüşümünün kapsaisine

çevriminden çok daha fazla olmasıdır.Halbuki kafeik asit ile muamele edilen kültürlerde kapsaisin birikimi vanilin birikiminden daha fazladır.

Sudha ve Ravishankar (2002), *Capsicum frutescens* Mill. hücre süspansiyon kültüründe kapsaisin üretimi üzerine kalsiyum kanal aracılarının etkilerini araştırmışlardır. Kalsiyum iyonofor A23187' nin toplam kapsaisin miktarını 1.43 kat artırdığını belirlemişlerdir. Kalsiyum kanal modulatörleri verapamil ve kloropromazin uygulamalarında ise kapsaisin üretiminde ve büyümede azalma belirlemişlerdir.

Sudha ve Ravishankar (2003a), poliamin bileşiklerinin kapsaisin birikimine etkisini araştırmışlardır. *Capsicum frutescens* hücrelerinin süspansiyon kültür ortamına putressin uygulanması sonucu büyüme hızında ve kapsaisin sentezlenmesinde artış gözlemlenmiştir. Kapsaisin miktarındaki bu artışa, kapsaisin sentaz enziminin aktivitesinin artması sebep olmuştur.

Sudha ve Ravishankar (2003b), iki farklı bileşik; salisilik asit (SA) ve metil jasmonat'ı (MeJa) ayrı ayrı ve birlikte *Capsicum frutescens* hücrelerinin süspansiyon kültürlerine uygulanmışlar ve her iki bileşiğin de kültür hücrelerinde kapsaisin sentezini ve birikimini artturdığını belirlemişlerdir. Ancak bu bileşiklerden sadece biri; salisilik asit aynı zamanda kapsaisin sentaz enziminin aktivitesini de arttırmış, metil jasmonat bileşiğinin ise enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir etkisi gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlara göre metil jasmonat bileşiğinin kapsaisin miktarını arttırıcı etkisinin kapsaisin yıkımını ya da diğer moleküllere katılımını engelleyici aktivitesinden kaynaklandığı söylenebilir. Hücrelere SA uygulanması sonucu, etilen üretimi engellenmiş, MeJa uygulanması ise etilen üretiminin artmasına neden olmuştur. Hücrelerin poliamin üretimi de SA uygulanması ile artmış, MeJa uygulanması sonucu da düşmüştür (Sudha ve Ravishankar 2003b). Poliamin ve etilen biyosentezlerinin, ortak olarak kullanılan S-adenozil metiyonin (SAM) molekülleri için rekabet halinde oldukları düşünülürse elde edilen sonuçlar şaşırtıcı değildir.

Umamaheswari ve Lalitha (2007), *Capsicum annuum* kallus hücrelerinden kapsaisin üretiminin artırılması için yeni bir yöntem geliştirmeye çalışmışlardır. Farklı

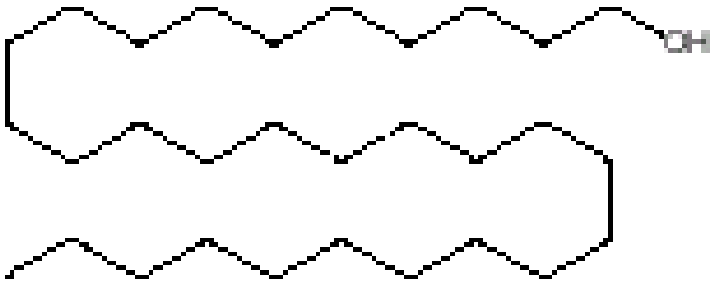
konsantrasyonlarda gibberellik asit, indol asetik asit, naftalen asetik asit, 2,4 D ve kinetin ilave edilmiş Murashige Skoog (MS) besiyerinde kültüre almışlardır. Kallus gelişimi ve plasental dokuların büyümesini en fazla 2 mg/l 2,4 D ve 0,5 mg/l kinetin içeren MS besiyerinde belirlemişlerdir

İşlek vd. (2014) Kahramanmaraş Hat-187 biber tohumlarına ait hücre süspansiyon kültüründe, kapsaisin üretimi üzerine tutuklama işleminin ve farklı konsantrasyonlarda selülaz uyarıcısının farklı zamanlardaki etkileri incelenmişlerdir. *İn vitro* koşullarda çimlendirilmiş biber fidelerinin hipokotil eksplantlarından kallus elde edilmiştir ve kalluslardan hücre süspansiyonları oluşturulmuştur. Hücre süspansiyonlarından kalsiyum aljinat ile tutuklanmış hücre süspansiyon kültürleri ve tutuklama işlemi yapılmayan serbest hücre süspansiyon kültürleri elde edilmiştir. Hem serbest hem de tutuklanmış hücre süspansiyonlarına selülaz (5-30 µg/ml) uyarıcısı uygulanmıştır ve uyarıcı uygulanmayan kontrol grupları oluşturulmuştur. Etil asetat ile ekstraksiyon yapılarak serbest hücrelerdeki, tutuklanmış hücrelerdeki ve bunların süzüntülerindeki kapsaisin konsantrasyonları HPLC cihazında belirlenmiştir. Tutuklama işleminin kapsaisin birikimi üzerine artırıcı etki yaptığı belirlenmiştir. Tutuklanmış hücrelerdeki kapsaisin miktarı, kontrol gruplarında ve uyarıcı uygulaması yapılan örneklerde, serbest hücrelere göre daha yüksek bulunmuştur. Genel olarak serbest hücrelerde tüm uyarıcılarda süzüntüye geçen kapsaisin miktarı tutuklanmış hücrelerdekinden daha fazladır.

2.5 Kapsaisin sentezini uyarmak amacıyla kullanılacak olan Triakontanol

Bitkilerin yapısında bulunan triakontanol düz zincirli yapıya sahiptir (Şekil 1). Formülü [CH3(CH2)28CH2OH] olan triakontanol ve onun ikincil mesajcı L(+)-adenozin bitkilerde büyümeyi uyarıcı bir aktivite sağlayan doğal 30 karbonlu primer alkoldür. Sinonim isimleri melisil alkol, mirakulan ve mirisil alkol olan bileşiğin moleküler yapısı CH3- (CH2)29-OH olup canlılarda bulunan ve bitki büyümesini sağlayan doğal bir maddedir. Triakontanol'ün bitki büyümesini arttırıcı etkisi ilk kez 1959 da görülmüştür. Triakontanol biyoması, serbest aminoasit miktarını, indirgeyici şeker miktarını, fotosentetik aktiviteyi, çözülebilir protein miktarını ve büyümeyi arttırdığı belirtilmiştir. Triakontanol'ün pirinç doku kültürü üzerindeki etkisi 1986 yılında Yun ve Kim tarafından, odunsu bitkiler üzerindeki etkisi de 2002 yılında Fraternole ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Knight ve Mitchell tarafından 1987 de triakontanol'ün salatalık

üzerinde uyarıcı etkisi rapor edilmiştir. Ma ve arkadaşları 1990 yılında triakontanol'ün *in vitro* şartlarda elma büyümesi üzerine etkisini bulmuştur (Ravindra. vd., 2005).



Şekil 2.7 Triakontanol maddesinin açık kimyasal formülü

Trifolium repens yapraklarındaki nötral yağların balmumu esterleri, serbest yağ asitleri, alkoller, serbest steroller, trigliseridler ve hidrokarbonlara ayrıldığı araştırmada balmumu esterlerinin temel olarak 18 karbonlu di ve tri doymamış yağ asitleri ve 30 karbonlu alifatik alkollerden oluştuğu bulunmuştur. Linoleik asidin baskın serbest yağ asidi, serbest alifatik alkollerden triakontanolün temelde 29,31 karbonlu hidrokarbon olduğu belirtilmiştir (Body, 1974).

Yoncanın bitki büyümesini arttıran sulu ekstraktı bazı ülkelerde çiftçiler tarafından bir asıra yakın süredir kullanılmaktadır, etkili kimyasalın birçok bitkinin üzerini mumsu bir şekilde kaplayan, arıların bal peteğinde de bulunan balmumunun ana bileşeni olan ve doğada çok yaygın olarak bulunabilen triakontanol olduğu belirlenmiştir (Hangarter vd., 1978, Hoagland, 1980). Hormonun doğrudan gen düzenleyici, genel metabolizmayı yönlendirici etkisi de tespit edilmiştir (Chen vd., 2002)

Sukroz ve salisilik asit gibi bazı doğal bitki büyüme düzenleyicileri triakontanol ile beraber kullandığında hormonun etkisini arttırdığı saptanmıştır (Rajasekaran ve Blake, 1999). Houtz ve arkadaşları (1985) tarafından hormonun Chlamydomonas üzerine etkisi ile ilgili yapılan çalışmada triakontanol hücre yoğunluğunu %35, toplam klorofil miktarını %31, CO_2 asimilasyonunu %100'e kadar artmıştır (Karacakaya vd, 2009).

BÖLÜM III
MATERYAL VE METOD

3.1 Materyaller

3.1.1 Bitkisel materyal

Çalışmada kullanılacak olan biber (*Capsicum annuum* L.) tohumu (Maraş-1) Doğu Akdeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma İstasyon Müdürlüğü'nden temin edilmiştir.

3.1.2 Kapsaisin sentezini uyarmak için kullanılan uyarıcı

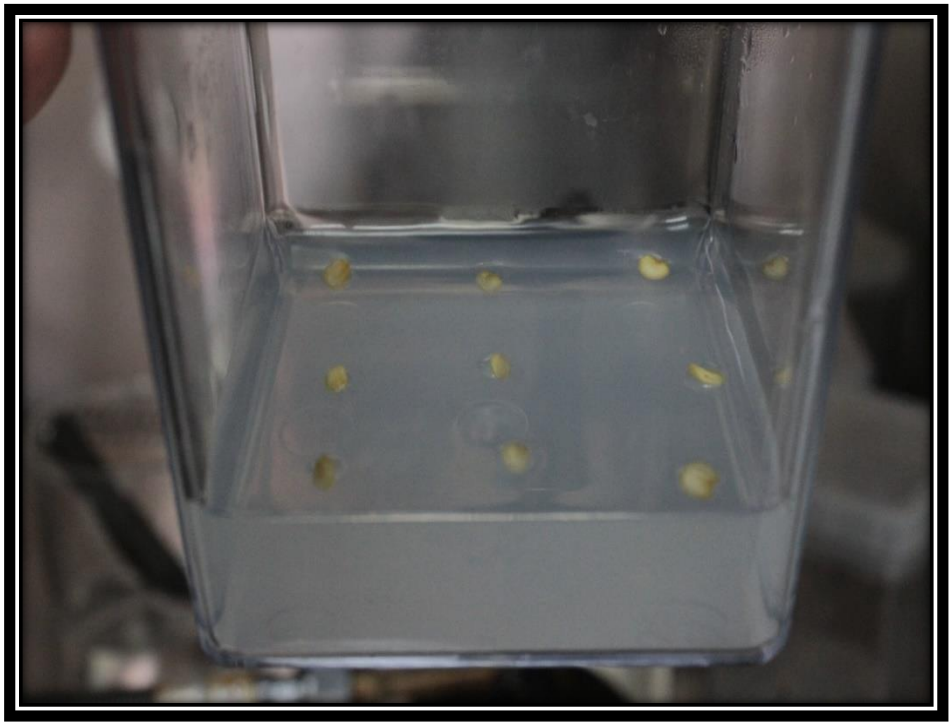
Kapsaisin sentezini uyarmak için kullanılan uyarıcı Triakontanol (TRIA) Sigma firmasından temin edilmiştir.

3.2 Yöntem

Tohumların ekimi, kallus kültürlerinin, hücre süspansiyonlarının ve uyarıcıların uygulanması ile ilgili tüm steril çalışmalar Heal Force marka laminar akımlı steril kabinde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan cam ve metal malzemeler Raypa marka etüvde 175 °C' de 2 saat, besiyeri ve sıvı ortamlar Wise Clave marka otoklavda 121 °C' de 15 dk steril edilerek kullanılmıştır.

3.2.1 Tohumların yüzeysel sterilizasyonu

Çalışmada kullanılacak olan biber tohumlarına ekim öncesinde yüzeysel sterilizasyon uygulanmıştır. Biber tohumları cam bir kaba (beher vb.) konularak üzerine % 70' lik etil alkol ilave edilmiş ve 3 dakika bekletilmiştir. Etil alkol steril kabinde süzülerek, % 40' lık ticari sodyum hipoklorit ilave edilmiş ve 30 dakika süreyle çalkalayıcı da çalkalanarak, hipoklorit kısım uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 3 kez 5'er dakika steril saf su ilave edilerek beklenmiş ve süzülmüştür. İçerisinde yaklaşık 50'şer ml steril agarlı besi ortamı konulan magenta kaplarına dış yüzeyi steril edilmiş biber tohumlarından 9 adet yerleştirilmiştir (Fotoğraf 3.1). Ekim yapılmış magentaların kapakları kapatılmış ve üzerlerine streç film sarılmıştır (Ellialtıoglu vd., 1998).



Fotoğraf 3.1 Steril besi ortamına ekilmiş biber tohumları

3.2.2 Tohum çimlendirme ortamı bilesimi ve hazırlanması

Biber tohumlarının çimlendirilmesi için hormonsuz Murashige ve Skoog (1962) (MS) temel besin ortamı kullanılmıştır. Bu besiyerinin bilesimi çizelge 3.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1 MS temel besin ortamı (Murashige ve ve Skoog, 1962).

Bileşenler	**MS Ortamı, mg/L**
Makro bileşenler	
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2.2H_2O$	440
KH_2PO_4	170
$MgSO_4.7H_2O$	370
NaFeEDTA	36,7
Mikro Bileşenler	
$MnSO_4.2H_2O$	16
$ZnSO_4.7H_2O$	8,6
H_3BO_3	6,2
KI	0,83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,25
$CuSO_4.5H_2O$	0,025
$CoCl_2.6H_2O$	0,025
Vitaminler	
Myo-Inositol	100
Glycin	2
Thiamine-HCl	0,1
Nikotinik Asit	0,5
Pridoksin-HCl	0,5

3.2.3 Kültür koşulları

İklim odasında 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak şekilde fotoperiyodik düzende magenta kaplarının içinde steril koşullarda çimlendirilen tohumlardan gelişen biber fideleri, dört haftalık inkübasyon süresini (Fotoğraf 3.2) tamamladıktan sonra eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Steril kabin içinde her bir fideden hipokotil eksplantı kesilmiştir. Öncelikle kök boğazından kesim yapılarak kökler uzaklaştırılmış, hipokotil

bölgesi yaklaşık 15 mm'lik parçalara ayrılarak hipokotil eksplantı hazırlanmıştır. Hipokotil eksplantından kallus eldesinde 1.0 mg/L 2,4–D ile 0,1 mg/L kinetin ve % 3 sakkaroz ile % 0,7 agar ilave edilmiş MS besin ortamı kullanılmıştır. Besiyerinin pH'ı 5.7' e ayarlanmıştır. Hipokotil eksplantları MS besiyerine yatay olarak yerleştirilmiştir (Ellialtıoğlu vd. 1998). Hipokotil eksplantından gelişen kallus dokuları 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmış fotoperiyodik düzende iki hafta süreyle iklim odasında geliştirilmiştir. Gelişen kallus dokuları, magenta kutuları içindeki 1.0 mg/L 2,4–D ile 0,1 mg/L kinetin ve % 3 sakkaroz ile % 0,7 agar ilave edilmiş MS besin ortamına transfer edilmiştir. Magenta kutularındaki kallus dokuları yine aynı fotoperiyodik düzende iklim odasında geliştirilmiştir (Fotoğraf 3.3-3.4).

Fotoğraf 3.2 Biber tohumları (Maraş-1) nın ekimden 4 hafta sonraki gelişimi

Fotoğraf 3.3 Hipokotil (gövde bölgesi) eksplantından gelişen kallus dokusunun agarlı besiyerinde görünümü

Fotoğraf 3.4 Alt kültürde çoğalan kallus dokusu

3.2.4 Hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulması

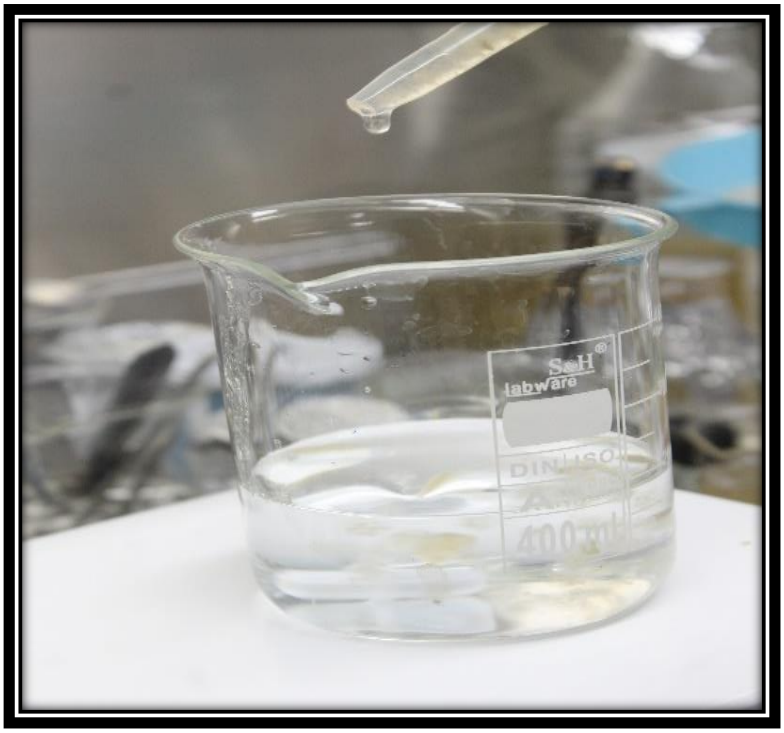
Kallus oluşumu için kullanılan 1.0 mg/L 2,4–D ile 0,1 mg/L kinetin ve % 3 sakkaroz ilave edilmiş MS besin ortamı süspansiyon kültüründe de kullanılmış, sadece ortama agar ilavesi yapılmamıştır. Kallus dokuları steril kabin içerisine yerleştirilen ve % 70'lik alkole batırılmış pamukla silinen hassas terazide steril kurutma kağıtları üzerinde tartılarak transfer edilmiştir. Magenta kutuları içerisinde geliştirilmiş olan kallus dokuları, içlerine 40'ar ml sıvı besin ortamı konulmuş 100 ml'lik erlenlere aseptik koşullarda her birine 2 gr olacak şekilde konulmuştur. Hücre süspansiyonlarını bulunduran erlenmayerler 25°C ±2 dereceye ayarlanmış çalkalayıcı üzerine yerleştirilmişlerdir (Fotoğraf 3.5). Çalkalayıcının hızı 110 devir/dakika olacak şekilde ayarlanmıştır (İşlek, 2009).

Fotoğraf 3.5 Çalkalayıcı üzerindeki hücre süspansiyon kültürleri

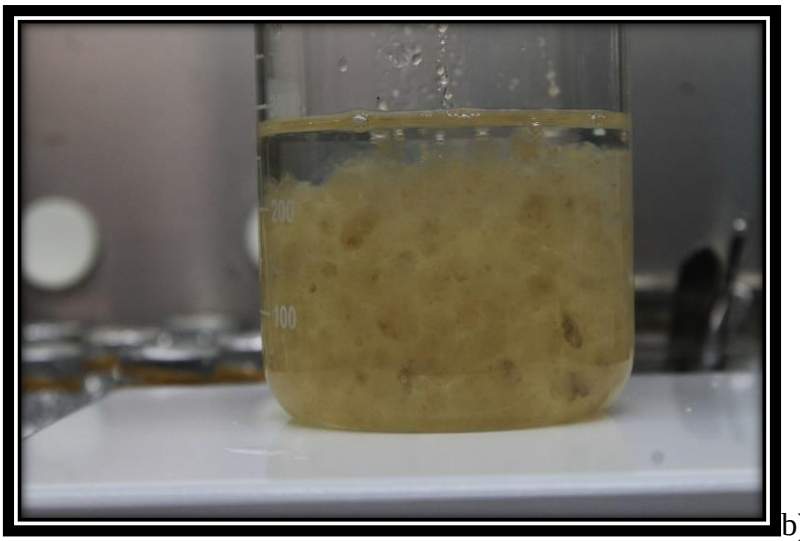
3.2.5 Tutuklama işlemleri

Tutuklama işlemi için 5 ml lik otomatik pipet ucu kullanılmıştır. Pipet uçları otoklavda 121 °C 15 dk süre ile steril edilmiştir (Fotoğraf 3.6). Hücre süspansiyon kültürleri bir ay süreyle 110 rpm'de geliştirilmiştir. Hücre süspansiyon kültürleri filtrasyonla besiyerinden ayrılmıştır. Tutuklama işleminde, hücre süspansiyon kültürlerinin yerine kallus hücre

süspansiyonlarının oluşması nedeniyle elde edilen hücreler bir baget yardımıyla uygun bir elekten geçirilerek tek tek hücreler elde edilmiştir. Tutuklama işleminde 1 gr hücre kullanılmıştır (Johnson vd., 1991)(modifiye edilmiştir). Tutuklama işlemi için % 2,5'lik 10'ar ml' lik sodyum aljinat çözeltisi hazırlanmıştır. Sodyum aljinat içerisine 1 gr hücre karıştırılmıştır. Hücreleri içeren sodyum aljinat çözeltisi pipet ile alınarak manyetik karıştırıcı üzerindeki beher içinde 20 ml'lik kalsiyum klorür içine damlatılarak hücreleri içeren 3,5-4 mm çapında boncuklar elde edilmiştir. (Fotoğraf 3.6-3.7). İşlemlerin tamamı steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir



a)


b)

Fotoğraf 3.6 Kalsiyum klorür içerisinde tutuklanmış hücrelerin oluşumu

Fotoğraf 3.7 MS besiyeri ortamında tutuklanmış hücreler

3.3 Uyarıcı Uygulamaları ve Analiz İçin Örneklerin Hazırlanması

Bir ay boyunca geliştirilen hücre süspansiyon kültürleri taze besiyeri ortamına alındıktan sonra uyarıcı uygulamaları yapılmıştır. Uyarıcı olarak triakontanol kullanılmıştır. Tüm deneyler üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

Steril kabin içinde, serbest ve tutuklanmış hücreler ile 40'ar ml süspansiyon kültürü içeren 100 ml' lik erlenmayerlere, steril stok çözeltilerinden seyreltilerek son konsantrasyonlarına, triakontanol (5, 10, 15 ve 30 µg/ml) steril uçlu otomatik pipet ile 1 ml olarak uygulanmıştır. Kontrol grupları için steril saf su kullanılmıştır.

Uyarıcı uygulamasının ardından yine çalkalayıcılar üzerine konulan serbest ve tutuklanmış süspansiyon kültürleri 8, 10, 12. gün sonra hücre ve süzüntüsünün birbirinden ayrılması için whatman no:2 filtre kağıdı üzerinde bunner hunisi vakum pompası yardımıyla vakum süzme işlemi uygulanmış, doku ve süzüntü birbirinden ayrılmıştır. Süzme işlemi sonrasında kalluslar ağzı kilitlenen küçük plastik poşetlerde, süzüntü kısmı ise 50 ml'lik plastik şişelerde analiz yapılncaya kadar -80 °C' deki derin dondurucuda saklanmıştır.

3.4 Ekstraksiyon İşlemleri

3.4.1 Serbest ve tutuklanmış hücrelerden kapsaisin ekstraksiyonu

Kapsaisin ekstraksiyonu için serbest hücrelerden 0,1 g ve tutuklanmış hücrelerden 0,2 g alınarak 3 kez 8 ml etil asetat ile havanda ezilmiştir. Daha sonra 3000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir ve üstteki süpernatanlar toplanmıştır(Johnson vd., 1990). Toplanan süpernatan bir döner buharlaştırıcı balonuna doldurularak 55°C sıcaklıkta, 180 devir/dakika hızda ve düşük basınç altında etil asetat kısım, kuruluğa yakın olacak şekilde buharlaştırılmıştır. Kalan tortu 1 ml etil asetat ile çözülmüş ve etiketlenmiş örnek şişelerine alınmıştır. Örnekler analiz edilinceye kadar -70°C'de derin dondurucuda bekletilmiştir.

3.4.2 Tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinden kapsaisin ekstraksiyonu

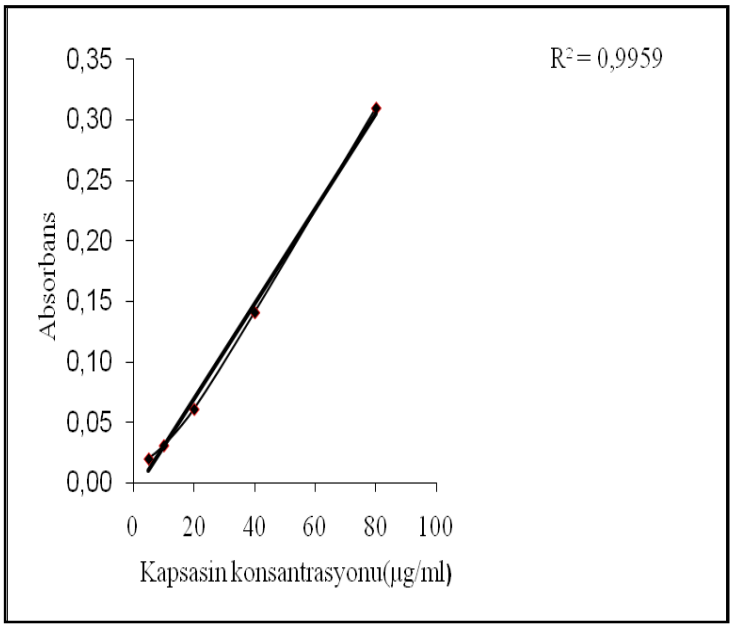
Serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinden kapsaisin ekstraksiyonu için 0,4 ml süzüntü alınarak 3 kez 8 ml etil asetat ilave edilerek 3000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve süpernatan alınarak bir döner buharlaştırıcı balonuna doldurulmuştur (Johnson vd., 1990). Döner buharlaştırıcıda 55°C sıcaklıkta, 180 devir/dakika hızda ve düşük basınç altında etil asetat kısım kuruluğa yakın olacak şekilde buharlaşıncaya kadar ekstrakte edilmiştir. Kalan tortu kısmı 1 ml etil asetat ile çözülmüş ve örnekler analiz edilinceye kadar -70 C'de derin dondurucuda bekletilmiştir.

3.5 Kapsaisin Analizi

HPLC cihazında ölçüm yapmadan önce örneklerde kapsaisin varlığının belirlenmesinde zaman kazanmak amacıyla ön çalışma olarak spektrofotometre de ölçüm ile kapsaisin tayini yapılmıştır (Ramos-Palacio, 1977).

3.5.1 Kapsaisin standartının hazırlanması

Kapsaisin standartı olan N-Vanillynonanamide, Sigma (V-9130)' dan temin edilmiştir. Spektrofotometrede ölçüm için, kapsaisinin 50 ml 100 µg/ml'lik stok standart çözeltisi etil asetat ile hazırlanmıştır. Daha sonra bu stok çözeltiden sırasıyla 5, 10, 20, 40, 80 ve 100 µg/ml'lik standart çözeltiler hazırlanmıştır. Bu standart çözeltilerden 0,2 ml alınarak üzerine 1 ml etil asetat ilave edilmiştir. Spektrofotometrede ölçüm yapmadan önce 0,1 ml % 1'lik Vanadyum oksi triklorit ($VOCl_3$) ilave edilmiştir. Renk kaybını engellemek için $VOCl_3$ ilave edildikten sonra ölçüm işlemi hızlı bir şekilde yapılmıştır. Kapsaisin standartlarının ölçüm işlemleri spektrofotometrede 720 nm'de 5 tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür. Ölçüm işlemi sonunda elde edilen standart grafik şekil 3.2' de görülmektedir.



Şekil 3.2 Spektrofotometrede ölçüm için kapsaisin standartı ile çizilen grafik

3.5.2 Ekstraktlardan kapsaisin analizi

Sıvı ekstraktlardan spektrofotometrede ölçüm yapabilmek için Ramos Palacio (1977 ve 1979)'un uyguladığı yöntem izlenmiştir. Buna göre her bir örnek 0,2 ml alınarak üzerine 1 ml etil asetat ilave edilmiş ve spektrofotometrede ölçüm yapmadan önce 0,1 ml % 5'lik $VOCl_3$ ilave edilmiştir. Renk kaybını engellemek için $VOCl_3$ ilave edildikten sonra ölçüm işlemi hızlı bir şekilde yapılmıştır.

3.5.3 Kapsaisin tayininde HPLC koşulları

HPLC analizlerinden önce sıvı ekstraktlar 0,45 µm' lik filtrelerden geçirilmiştir. Analiz işlemleri Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde Agilent 1260 model HPLC cihazında gerçekleştirilmiştir. Kromatografi koşulları aşağıdaki gibidir;

Dedektör : 1260 Infinity Diode Array Detector

Dalga boyu :280 nm

Kolon :ACE C18 (150 mm x 4,56 mm), 5 µm por çapı

Akış hızı : 1ml/dk

Hareketli faz : % 63 Methanol+ % 37 Distile su (% 1Asetik asit)

Enjeksiyon hacmi : 10 µl

3.6 İstatistiksel Analizler

Tez çalışmasında bütün deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Yapılan tüm ölçümler ve analizlerin verileri SPSS version 16.0 programında Varyans analizi (Multiple Range Testlerinden Tukey testi) ile $P<0.05$ önemlilik derecesine göre değerlendirilmiştir. Ortalamaların standart hata ve standart sapma değerleri de yine aynı programda hesaplanmıştır.

BÖLÜM IV
BULGULAR

Capsicum annuum L. (Maraş-1) fidelerinden alınan hipokotil eksplantlarından kallus kültürleri elde edildikten sonra, serbest ve kalsiyum aljinat ile tutuklanmış hücre süspansiyonlarında triakontanolun çeşitli (5, 10, 15 ve 30 µg/ml) konsantrasyonlarının, değişen zamanlarda (8, 10 ve 12. günler) hücre ve süzüntülerinde biriken kapsaisin miktarları incelenmiş ve hücre ve süzüntülerdeki kapsasin miktarlarının toplamları sonucu elde edilen toplam kapsaisin miktarları da belirlenmiştir.

4.1 Serbest Ve Tutuklanmış Hücrelerde Kapsaisin Birikimine Triakontanol Uygulamasının Etkisi

C. annuum L. (Maraş-1) serbest ve tutuklanmış hücre süspansiyon kültürlerine triakontanol uyarıcısı 5, 10, 15 ve 30 µg/ml olacak şekilde ilave edildikten sonra 8, 10 ve 12. günlerde alınan serbest ve tutuklanmış hücrelerde belirlenen kapsaisin miktarları çizelge 4.1 ve 4.2 ve Şekil 4.1 de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1 Farklı konsantrasyonlarda triakontanol uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(Maraş-1)'un serbest hücrelerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)

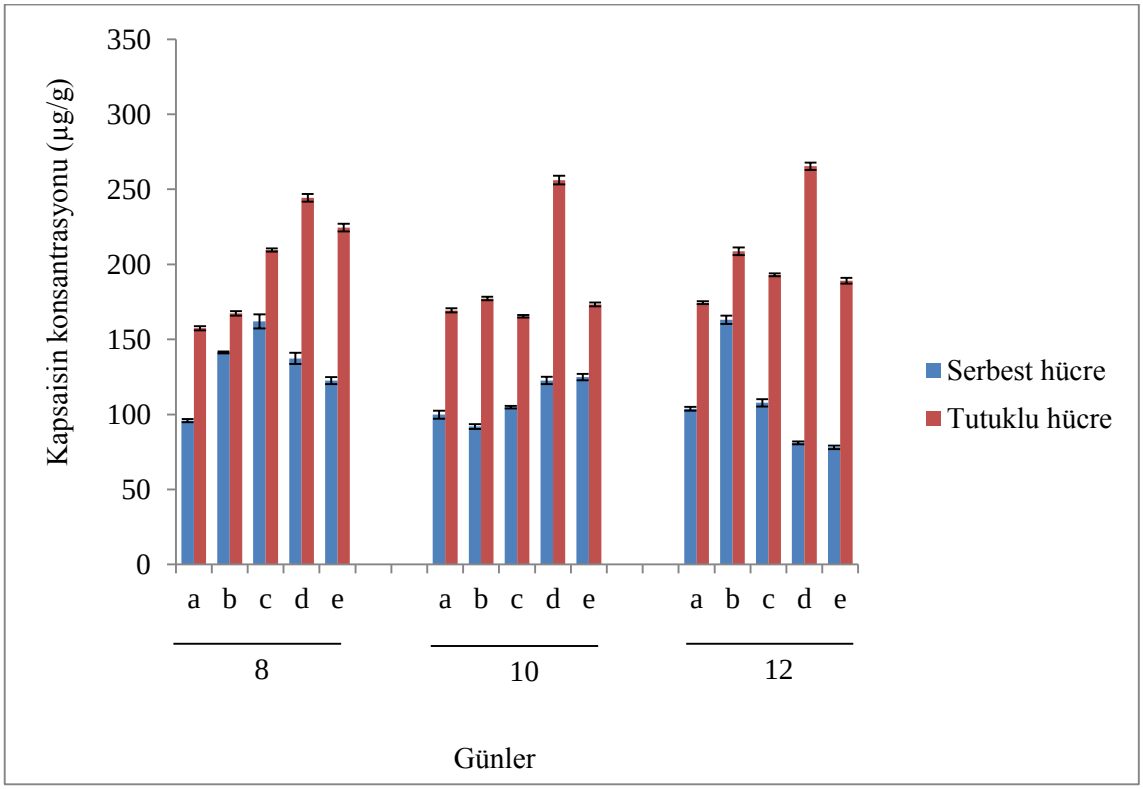
Zaman (gün)	Uygulama Dozu	Kapsaisin (µg/g)
		Serbest hücre
8	Kontrol	95,878 ± 1,112xa
	5 µg/ml triakontanol	141,273 ± 0,558yd
	10 µg/ml triakontanol	161,996 ± 4,667yg
	15 µg/ml triakontanol	137,325 ± 3,779yi
	30 µg/ml triakontanol	122,523 ± 2,338yl
10	Kontrol	99,825 ± 2,634xa
	5 µg/ml triakontanol	91,931 ± 1,643xe
	10 µg/ml triakontanol	104,759 ± 0,896xh
	15 µg/ml triakontanol	122,523 ± 2,462yi
	30 µg/ml triakontanol	124,825 ± 2,127yl
12	Kontrol	103,773 ± 1,228xa
	5 µg/ml triakontanol	162,983 ± 2,773yf
	10 µg/ml triakontanol	107,720 ± 2,412xh
	15 µg/ml triakontanol	81,075 ± 0,962yj
	30 µg/ml triakontanol	78,115 ± 1,187ym

x,y kontrol grubuna göre; a,b,c kontrol grubunun günlere göre; d,e,f 5 µg/ml triakontanol'un günlere göre; g,h,ı 10 µg/ml triakontanol'un günlere göre; i,j,k 15 µg/ml triakontanol'un günlere göre; l,m,n 30 µg/ml triakontanol'un günlere göre önemlilik derecesinde farklılığını göstermektedir.

Serbest hücrelerde uygulamanın 8. Gününde kapsaisin miktarında en fazla artış 10 µg/ml triakontanol uygulamasında belirlenmiştir. ($p<0,05$). Kapsaisin miktarındaki artış triakontanol konsantrasyon artışına paralel değildir. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında triakontanolün farklı konsantrasyonlarının kapsaisin miktarları üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$) bulunmuştur (Çizelge 4.1). Triakontanol uygulamasının 10. Gününde 5 µg/ml triakontanol uygulamasında kapsaisin miktarındaki azalma ve 10 µg/ml triakontanol uygulamasında belirlenen kapsaisin miktarındaki artış önemli değildir ($p<0,05$). 15 ve 30 µg/ml triakontanol uygulamasında belirlenen kapsaisin miktarı istatistiksel açıdan önemlidir. En yüksek kapsaisin miktarı

30 µg/ml triakontanol uygulamasında belirlenmiştir (Şekil 4.1). Serbest hücrelerde uyarımın 12. gününde en düşük uyarıcı konsantrasyonu olan 5 µg/ml triakontanol uygulamasında kapsaisin miktarı en fazla tespit edilmiştir ($p<0.05$). 15 µg/ml ve 30 µg/ml triakontanol uygulamalarında kontrole göre kapsaisin miktarında meydana gelen azalmalar istatistiksel açıdan ($p<0,05$) önemlidir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1'e genel olarak bakıldığında uyarıcının uygulama süresi kontrol gruplarındaki kapsaisin miktarları üzerine önemli derecede etki yapmıştır ($p<0,05$). Tüm uyarı günleri ve uyarıcı konsantrasyonlarına bakıldığında kapsaisin miktarında en fazla artış 5 µg/ml triakontanol uygulamasında belirlenmiştir.



Şekil 4.1 Farklı konsantrasyonlarda triakontanol uygulamalarının farklı zamanlarda serbest ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin miktarı üzerine etkisi

a: Kontrol, b: 5 µg/ml triakontanol, c: 10 µg/ml triakontanol, d: 15 µg/ml triakontanol, e: 30 µg/ml triakontanol

Çizelge 4.2 Farklı konsantrasyonlarda triakontanol uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(Maraş-1)'un tutuklu hücrelerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)

Zaman (gün)	Uygulama Dozu	Kapsaisin (µg/g)
		Tutuklu hücre
8	Kontrol	157,457 ± 1,401xa
	5 µg/ml triakontanol	167,325 ± 1,558xd
	10 µg/ml triakontanol	209,562 ± 1,091yg
	15 µg/ml triakontanol	244,299 ± 2,629yi
	30 µg/ml triakontanol	224,562 ± 2,588yl
10	Kontrol	169,299 ± 1,432xa
	5 µg/ml triakontanol	177,194 ± 1,220xd
	10 µg/ml triakontanol	165,352 ± 0,843xh
	15 µg/ml triakontanol	256,141 ± 2,833yi
	30 µg/ml triakontanol	173,246 ± 1,228xm
12	Kontrol	174,457 ± 1,012xa
	5 µg/ml triakontanol	208,773 ± 2,572ye
	10 µg/ml triakontanol	192,983 ± 0,922xg
	15 µg/ml triakontanol	265,352 ± 2,461yi
	30 µg/ml triakontanol	189,036 ± 1,865xm

x,y kontrol grubuna göre; a,b,c kontrol grubunun günlere göre; d,e,f 5 µg/ml triakontanol'un günlere göre; g,h,ı 10 µg/ml triakontanol'un günlere göre; i,j,k 15 µg/ml triakontanol'un günlere göre; l,m,n 30 µg/ml triakontanol'un günlere göre önemlilik derecesinde farklılığını göstermektedir.

Tutuklu hücrelerde 8. günde uygulanan tüm triakontanol konsantrasyonları kapsaisin miktarında artışa neden olmuştur (Çizelge 4.2). Kapsaisin miktarında en fazla artış 15 µg/ml triakontanol uygulamasında belirlenmiştir. Kapsaisin miktarındaki artış triakontanol konsantrasyon artışına paralel değildir. Triakontanol uygulamasını kontrol grupları ile karşılaştırıldığında triakontanolün farklı konsantrasyonlarının kapsaisin miktarı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.2). Triakontanol uygulamasının 10. gününde tutuklu hücrelerde kapsaisin miktarındaki en önemli değişim 15 µg/ml triakontanol uygulamasında belirlenmiştir. Tutuklu hücrelerde

10. günde kapsaisin miktarındaki değişimler konsantrasyonlar ile paralel değildir. 10. günde 10 µg/ml triakontanol uygulamasındaki kapsaisin miktarının azalması, 5 ve 30 µg/ml konsatrasyonlarda uygulanan triakontanolün kapsaisin miktarındaki artış etkisi istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur. Buna karşın 15 µg/ml konsantrasyondaki triakontanolün kapsaisin miktarına arttırıcı etkisi istatistiksel açıdan ($p>0,05$) önemli bulunmuştur(Şekil 4.1). Triakontanol uygulamasının 12. gününde tüm konsatrasyonlar kapsaisin miktarında artışa neden olmuştur. Tutuklu hücrelerde kapsaisin miktarında en fazla artış 15 µg/ml triakontanol uygulamasında belirlenmiştir ($p<0,05$). Kapsaisin miktarındaki artışlar triakontanol konsantrasyon artışına paralel değildir. 12. günde en önemli değişim 5 µg/ml triakontanol uygulamasında belirlenmiştir ($p<0,05$). 12. günde en düşük kapsaisin miktarı 30 µg/ml triakontanol uygulamasında meydana gelmiştir ve istatistiksel açıdan önemli değildir.

Çizelge 4.2 genel olarak değerlendirildiğinde uyarıcının uygulama süresi kontrol gruplarındaki kapsaisin miktarları üzerine önemli derecede etki yapmamıştır. Tüm konsantrasyonlara ve uyarım günlerine bakıldığında an fazla artış 15 ve 30 µg/ml triakontanol uygulamasında belirlenmiştir (Şekil 4.1).

4.2 Serbest ve Tutuklanmış Hücrelerin Süzüntülerinde Kapsaisin Birikimine Triakontanol Uygulamasının Etkisi

C. annuum L. (Maraş-1) serbest ve tutuklanmış hücre süspansiyon kültürlerine triakontanol uyarıcısı 5, 10, 15 ve 30 µg/ml olacak şekilde ilave edildikten sonra 8, 10 ve 12. günlerde alınan serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde belirlenen kapsaisin miktarları çizelge 4.3 ve çizelge 4.4 de gösterilmektedir.

Çizelge 4.3 Farklı konsantrasyonlarda triakontanol uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(Maraş-1) serbest hücrelerinin süzüntülerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)

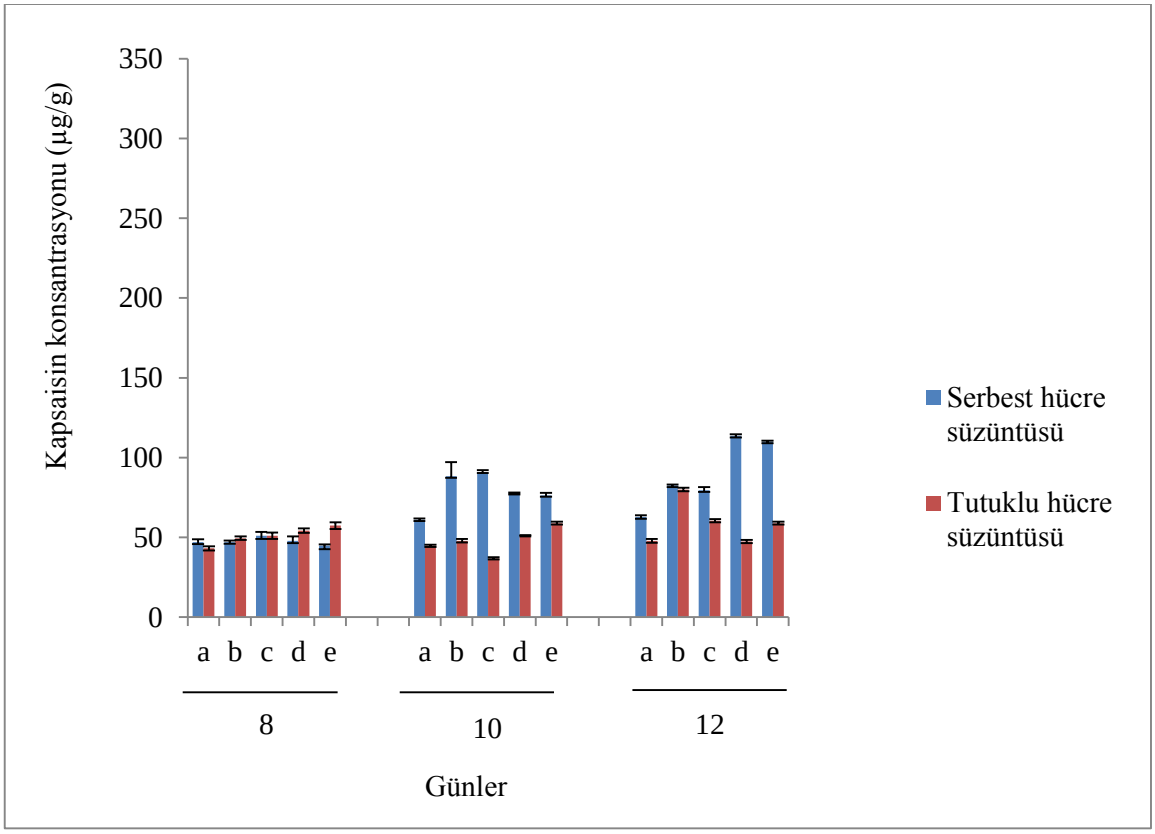
Zaman (gün)	Uygulama Dozu	Kapsaisin (µg/g)
		Serbest hücre süzüntüsü
8	Kontrol	47,088 ± 2,739xa
	5 µg/ml triakontanol	47,088 ± 3,687xd
	10 µg/ml triakontanol	51,036 ± 1,325xg
	15 µg/ml triakontanol	47,878 ± 1,993xi
	30 µg/ml triakontanol	44,720 ± 1,096xl
10	Kontrol	61,036 ± 2,111xb
	5 µg/ml triakontanol	88,404 ± 1,096ye
	10 µg/ml triakontanol	91,036 ± 4,869yh
	15 µg/ml triakontanol	77,352 ± 1,791yj
	30 µg/ml triakontanol	76,299 ± 3,959ym
12	Kontrol	62,878 ± 1,601xb
	5 µg/ml triakontanol	82,615 ± 2,958ye
	10 µg/ml triakontanol	79,457 ± 0,949yh
	15 µg/ml triakontanol	113,667 ± 2,993yk
	30 µg/ml triakontanol	109,983 ± 2,911yn

x,y kontrol grubuna göre; a,b,c kontrol grubunun günlere göre; d,e,f 5 µg/ml triakontanol'un günlere göre; g,h,ı 10 µg/ml triakontanol'un günlere göre; i,j,k 15 µg/ml triakontanol'un günlere göre; l,m,n 30 µg/ml triakontanol'un günlere göre önemlilik derecesinde farklılığını göstermektedir.

Serbest hücrelerin süzüntülerinde uygulamanın 8. gününde kapsaisin miktarında en fazla artış 10 µg/ml triakontanol uygulamasında belirlenmiştir, bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Kapsasin miktarındaki artış triakontanol miktarındaki artışa bağlı değildir. Kontrol grubuna göre 10 µg/ml triakontanol konsantrasyonundaki kapsaisin miktarı artışı, 15 ve 30 µg/ml triakontanol konsantrasyonu kapsaisin miktarı azalması ve istatistiksel açıdan önemsizdir. 5 µg/ml triakontanol uygulamasında süzüntüye geçen 10. gününde kapsaisin miktarında en fazla artış 10 µg/ml triakontanol konsantrasyonunda tespit edilmiştir ($p<0,05$). Kontrol grubuna göre bakıldığında 10. günde bütün

triakontanol konsantrasyonları kapsaisin miktarında değişime neden olmuştur ($p<0,05$). Uygulamanın 12. gününde kapsaisin miktarları kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında bütün triakontanol konsantrasyonlarında değişim belirlenmiştir ($p<0,05$). Serbest hücrelerin 12. gününde en fazla kapsaisin miktarı artışı 15 µg/ml triakontanol konsantrasyonunda tespit edilmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.2).

Çizelge 4.3'e genel olarak bakıldığında 10. ve 12. gününde kontrol gruplarındaki kapsaisin miktarındaki artışlar istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur.



Şekil 4.2 Farklı konsantrasyonlarda triakontanol uygulamalarının farklı zamanlarda serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde kapsaisin miktarı üzerine etkisi

a: Kontrol, b: 5 µg/ml triakontanol, c: 10 µg/ml triakontanol, d: 15 µg/ml triakontanol, e: 30 µg/ml triakontanol

Çizelge 4.4 Farklı konsantrasyonlarda triakontanol uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(Maraş-1) tutuklanmış hücrelerinin süzüntülerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)

Zaman (gün)	Uygulama Dozu	Kapsaisin (µg/g)
		Tutuklu hücre süzüntüsü
8	Kontrol	43,141 ± 2,010xa
	5 µg/ml triakontanol	49,457 ± 1,643xd
	10 µg/ml triakontanol	51,036 ± 1,726xg
	15 µg/ml triakontanol	54,194 ± 1,325xi
	30 µg/ml triakontanol	57,352 ± 3,823xl
10	Kontrol	44,72 ± 3,780xa
	5 µg/ml triakontanol	47,878 ± 2,556xd
	10 µg/ml triakontanol	36,825 ± 0,924xg
	15 µg/ml triakontanol	51,036 ± 1,842xi
	30 µg/ml triakontanol	58,931 ± 1,206xl
12	Kontrol	47,278 ± 2,143xa
	5 µg/ml triakontanol	79,983 ± 3,050ye
	10 µg/ml triakontanol	60,509 ± 2,764xg
	15 µg/ml triakontanol	47,352 ± 1,586xi
	30 µg/ml triakontanol	58,931 ± 0,263xl

x,y kontrol grubuna göre; a,b,c kontrol grubunun günlere göre; d,e,f 5 µg/ml triakontanol'un günlere göre; g,h,ı 10 µg/ml triakontanol'un günlere göre; i,j,k 15 µg/ml triakontanol'un günlere göre; l,m,n 30 µg/ml triakontanol'un günlere göre önemlilik derecesinde farklılığını göstermektedir.

Tutuklu hücrelerin süzüntülerinde 8. günde tüm triakontanol konsantrasyonları kapsaisin miktarında artışa neden olmuştur ve bu artışlar uygulanan triakontanol konsantrasyonuna paraleldir. Bu artışlar istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. 8. gününde kapsisin miktarında en fazla artış 30 µg/ml triakontanol konsantrasyonunda belirlenmiş ve istatistiksel olarak önemsizdir. 10. gününde kapsaisin miktarında en fazla artış 30 µg/ml triakontanol uygulamasında belirlenmiştir ve istatistiksel açıdan önemsizdir. 10 gününde kontraol grubu ile karşılaştırıldığında 10 µg/ml trikontanol konsatrasyonundaki kapsaisin

miktarının azalması istatistiksel açıdan önemsizdir. 12. gününde en düşük uyarıcı konsantrasyonu olan 5 µg/ml triakontanol uygulamasında kapsaisin miktarı en fazla tespit edilmiştir ($p<0,05$). 15 µg/ml triakontanol konsantrasyonu dışındaki konsantrasyonlarda kapsaisin miktarında artış belirleniştir (Şekil 4.2)

Çizelge 4.4'e genel olarak bakıldığında uyarıcının uygulama süresi tutklu hücrelerin süzüntülerinde kapsaisin miktarları üzerine önemli derecede etki yapmamıştır.

4.3 Serbest Ve Tutuklanmış Hücrelerde Toplam Kapsaisin Birikimine Triakontanol Uygulamasının Etkisi

C. annuum L. (Maraş-1) serbest ve tutuklanmış hücre süspansiyon kültürlerine triakontanol uyarıcısı 5, 10, 15 ve 30 µg/ml olacak şekilde ilave edildikten sonra 8, 10 ve 12. günlerde alınan hücre ve süzüntülerdeki kapsaisin miktarlarının toplamları sonucu elde edilen toplam kapsaisin miktarları çizelge 4.5 de gösterilmektedir.

Çizelge 4.5 Farklı konsantrasyonlarda triakontanol uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(Maraş-1) serbest ve tutuklanmış hücre süspansiyonlarında toplam kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)

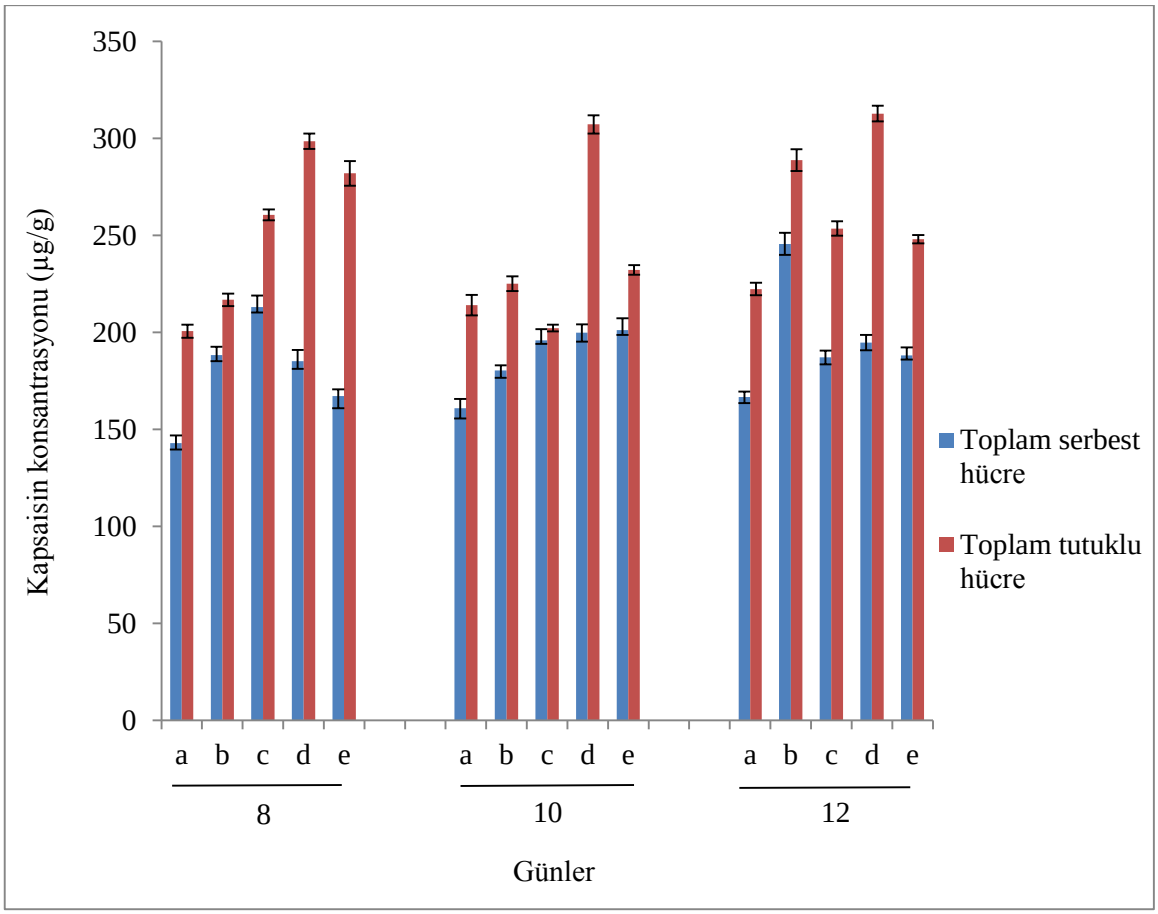
Zaman (gün)	Uygulama Dozu	Kapsaisin (µg/g)	
		Toplam serbest hücre	Toplam tutuklu hücre
8	Kontrol	142,966 ± 3,851xa	200,598 ± 3,411xa*
	5 µg/ml triakontanol	188,361 ± 4,246yd	216,782 ± 3,202xd
	10 µg/ml triakontanol	213,032 ± 5,991yg	260,598 ± 2,817yg*
	15 µg/ml triakontanol	185,203 ± 5,772yi	298,493 ± 3,953yi*
	30 µg/ml triakontanol	167,243 ± 3,433yl	281,914 ± 6,410yl*
10	Kontrol	160,861 ± 4,745xa	214,019 ± 5,212xa
	5 µg/ml triakontanol	180,335 ± 2,738xd	225,072 ± 3,776xd
	10 µg/ml triakontanol	195,795 ± 5,765yg	202,177 ± 1,767xh
	15 µg/ml triakontanol	199,874 ± 4,253yi	307,177 ± 4,675yi*
	30 µg/ml triakontanol	201,124 ± 6,086yl	232,177 ± 2,434xm
12	Kontrol	166,651 ± 2,828xa	222,335 ± 3,156xa*
	5 µg/ml triakontanol	245,598 ± 5,730yd	288,756 ± 5,622ye
	10 µg/ml triakontanol	187,177 ± 3,361xg	253,493 ± 3,686yg*
	15 µg/ml triakontanol	194,743 ± 3,955yi	312,703 ± 4,047yi*
	30 µg/ml triakontanol	188,098 ± 4,097yl	247,966 ± 2,128ym*

x,y kontrol grubuna göre; a,b,c kontrol grubunun günlere göre; d,e,f : 5 µg/ml triakontanol'un günlere göre; g,h,ı 10 µg/ml triakontanol'un günlere göre; i,j,k 15 µg/ml triakontanol'un günlere göre; l,m,n 30 µg/ml triakontanol'un günlere göre; * toplam serbest hücrenin toplam tutuklanmış hücreye göre önemlilik derecesinde farklılığını göstermektedir.

Serbest hücrelerde 8. günde kullanılan tüm uyarıcı konsantrasyonları toplam kapsaisin miktarı üzerine etkili bulunmuştur. Bu artışlar istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0,05$). En fazla kapsaisin miktarı 10 µg/ml triakontanol konsantrasyonunda belirlenmiştir ve istatistiksel açıdan önemlidir. Tutuklu hücrelerin 8. gününde bütün triakontanol konsantrasyonları kapsaisin miktarında etki yapmıştır. En fazla kapsaisin miktarı 15 µg/ml triakontanol konsantrasyonunda belirlenmiştir ($p<0,05$). 10, 15 ve 30 µg/ml triakontanol konsantrasyonunun kapsaisin miktarına artırıcı etkisi istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur.

Kapsaisin miktarındaki değişim toplam serbest hücrelerin 10. gününde tüm triakontanol konsantrasyonları kapsaisin miktarında arttırıcı etki yapmıştır. Artışların konsantrasyonlara paralel olduğu belirlenmiş ve istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. 10. gününde en fazla kapsaisin artışı 30 µg/ml triakontanol konsantrasyonunda belirlenmiş ve istatistiksel açıdan önemlidir. Toplam tutuklu hücrelerde uygulamanın 10. gününe bakıldığında en fazla kapsaisin miktarı 15 µg/ml triakontanol konsantrasyonunda belirlenmiştir ($p<0,05$). 10 µg/ml triakontanol konsantrasyonunda kapsaisin miktarı kontrol grubuna göre azalmış ve bu azalma istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır.

Toplam serbest hücrelerde uyarımın 12. gününde kapsaisin miktarında en fazla artış 5 µg/ml triakontanol konsantrasyonunda belirlenmiştir ($p<0,05$). Toplam kapsaisin miktarındaki artış triakontanol konsantrasyonuna bağlı değildir. 12. gününde toplam tutuklu hücrelerde kapsaisin miktarındaki en büyük artış 15 µg/ml triakontanol konsantrasyonunda belirlenmiştir ($p<0,05$). Uygulanan tüm konsantrasyonlar kontrole göre kapsaisin miktarında artışa neden olmuştur (Çizelge 4.5) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Farklı konsantrasyonlarda trikontanol uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin miktarı üzerine etkisi

a: Kontrol, b: 5 µg/ml triakontanol, c: 10 µg/ml triakontanol, d: 15 µg/ml triakontanol, e: 30 µg/ml triakontanol

Çizelge 4.5'e genel olarak bakıldığında tutuklama yönteminin kapsaisin birikimi üzerine etkili olduğu belirlenmiştir. Uyarıcı uygulaması yapılmayan tutuklanmış hücreler ve serbest hücrelerin kontrol örneklerinde tespit edilen kapsaisin miktarları karşılaştırıldığında tutuklanmış hücrelerdeki kapsasin birikimi serbest hücrelerden daha fazla bulunmuştur.

Sonuçlar topluca değerlendirildiğinde triakontanol uygulamaları için etkin olan uyarım dozu, etkin uyarım konsantrasyonu ve toplam kapsasin miktarları çizelge 4.6' de verilmiştir. En fazla kapsaisin miktarı 15 µg/ml triakontanol uygulamasında tutuklanmış hücre süspansiyonunda belirlenmiştir.

Çizelge 4.6 Triakontanol uygulamaları için etkin uyarım dozu, uyarım zamanı ve oluşturdukları toplam kapsaisin miktarları

Uyarıcı	Hücre süspansiyon tipi	Etkin uyarım zamanı	Etkin uyarım konsantrasyonu	Kapsaisin miktarı (µg/g t.a)
Triakontanol	Serbest hücre süspansiyonu	12. gün	5 µg/ml	245,598
	Tutuklanmış hücre süspansiyonu	12.gün	15 µg/ml	312,703

BÖLÜM V
TARTIŞMA VE SONUÇ

Tez çalışmasında serbest ve tutuklanmış hücre süspansiyon kültürlerine farklı konsantrasyonlarda triakontanol ilave edilmiştir ve belirli günlerde örnek alınarak bu uyarıcının kapsaisin üretimindeki potansiyelleri araştırılmıştır.

Triakontanol uyarıcısının kapsaisin sentezi üzerine etkisi konusunda yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. İlk kez bu çalışmada ele alınmıştır. Triakontanol doğal bir bitki büyüme düzenleyicisidir. Özellikle Asya'da, milyonlarca hektarlık alanlarda ekin üretimini artırmak için kullanılmaktadır. Triakontanol çeşitli bitki türlerine ekzojen olarak uygulandığında büyüme ve verimi artırmaktadır (Singh vd., 2011). Bu büyüme düzenleyici birincil ve ikincil metabolizma arasındaki karşılıklı ilişkiyi etkileyebilerek kuru madde üretiminde artışa aracılık etmektedir (Naeem vd., 2012).

Tez çalışmasında triakontanol, kültür ortamına 5, 10, 15 ve 30 µg/ml olacak şekilde uygulanmıştır. Serbest hücrelerde etkin uyarım konsantrasyonu ve zamanı sırasıyla 5 µg/ml triakontanol ve 12. gün olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1). Serbest hücrelerin süzüntüsünde 12. günde 15 µg/ml triakontanol uygulamasında süzüntüye geçen kapsaisin miktarı en fazla bulunmuştur (Çizelge 4.3). Bu uygulama konsantrasyonu ve sürelerinde serbest hücrelerdeki kapsaisin miktarının daha düşük çıkması kapsaisinin hücre içinde biriktiği yönünde düşündürebilir. Triakontanolün uygulama süresi arttıkça süzüntüye geçen kapsaisin miktarının arttığı belirlenmiştir. Uyarım süresinin artışı hücrelerden kapsaisinin sızmasına neden olmaktadır.

Tutuklanmış hücrelerde de uygulanan tüm triakontanol konsantrasyonları kapsaisin üretimi üzerine etkili olmuştur. En etkin uyarım konsantrasyonu ve uygulama zamanı 15 µg/ml triakontanol ve 12. gün olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2). Brooks vd. (1986), uyarıcının gereğinden fazla miktarda ve sürede kültüre uygulandığında kültürün zarar gördüğünü veya hiç etkilenmediğini belirtmişlerdir. Uyarıcı uygulamaları için optimum bir değerin bulunması gerektiği Brooks vd., (1986) tarafından bildirilmiştir. Kapsaisin içinde triakontanol konsantrasyonu ile uyarım süresi için optimum değerin bulunması gerekir. Nitekim tutuklanmış hücrelerde 15µg/ml triakontanol uygulamasında tüm

uyarım süresinde artış gözlenirken 30 µg/ml triakontanol uygulamasında ise azalış görülmektedir (Çizelge 4.2, Şekil 4.1).

10 ve 12. günlerde tutuklu hücrelerde süzüntüye geçen kapsaisin miktarı serbest hücrelerde süzüntüye geçen kapsaisin miktarına göre daha azdır. Tutuklu hücrelerde kalsiyum aljinat tabakadan dolayı kapsaisinin hücrelerde birikerek süzüntüye daha az geçmiş olması olarak açıklanabilir. Süzüntüye geçen en fazla kapsaisin miktarı 5 µg/ml triakontanol uygulaması 12. günde belirlenmiştir.

Hücre ve süzüntülerin toplamı olan toplam kapsaisin miktarları, etkin uygulama süresi ve zamanını gösteren çizelge 4.6 da verilmiştir. Serbest ve tutuklanmış hücre süspansiyonlarında etkin uyarım süresi 12. gün olarak belirlenmiştir. Serbest hücre süspansiyonlarında en fazla toplam kapsaisin birikimi 245,598 µg/g t.a olarak belirlenirken tutuklanmış hücre süspansiyonlarında ise 312,703 µg/g t.a olarak belirlenmiştir. Tutuklanmış hücre süspansiyonlarında tüm uyarım günlerinde 15 µg/ml triakontanol uygulaması toplam kapsaisin miktarında artışa neden olmuştur (Çizelge 4.6). Tutuklanmış hücre süspansiyonlarında 15 µg/ml triakontanol ile elde edilen sonuçlar bu konsantrasyonun kapsaisin birikimin artırma yönünde standart bir değer olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Zeleneva ve Khavkin (1980), yaptıkları çalışma sonucu süspansiyon kültüründe büyüyen *Zea mays* hücrelerinin bazı enzimlerinin aktivitelerinin anormal düzeyde olduğunu ve bazı enzimlerin oldukça düşük aktivite gösterdiklerini tespit etmişlerdir. Bu metabolik anormalliğin, hücrelerin bulundukları ortamın özelliklerinden kaynaklanabileceğini ve özellikle hücrelerin yapısal olarak biraraya gelmemelerinin, ayrıca ortamda bulunan besin, büyüme hormonları, düzenleyici moleküller, sıvı kültür ortamı içerisinde homojen bir şekilde dağılamayacağından, süspansiyon kültür ortamının heterojen yapısının, hücrelerin metabolik fonksiyonları üzerinde olumsuz etkileri olabileceğini belirlemiştir. Bu nedenlerden dolayı süspansiyon kültürü içerisindeki hücreler 'kapsaisin sentaz' enzimi aktivitesinin düşük olmasından ve heterojen ortam koşullarından dolayı daha az miktarda kapsaisin sentezleyebilmektedir.

Yapılan çalışmalarda (Lindsey vd., 1983, Lindsey ve Yeoman 1985, Johnson vd., 1991) *Capsicum spp.*'nin tutuklanmış hücre kültürlerinin, serbest hücre süspansiyon

kültürlerine göre birkaç kat daha fazla miktarda kapsaisin ürettiği bulunmuştur. Yaptığımız tez çalışmasında triakontanol ile elde ettiğimiz sonuçlar bu araştırıcıların çalışmaları ile uyumludur.

Hücre kültürlerinde alkoloid birikimi üzerine yapılan bir çalışmada (Lindsey ve Yeoman 1983) hücrelerin yapısal organizasyonunun ve büyüme hızının ikincil metabolik fonksiyonların aktivitesi ile yakından ilişkili olduğu ve gerçekleşen reaksiyonlar üzerinde belirleyici etkileri olduğu gösterilmiştir. Yapısal olarak birarada bulunan hücrelerin en yüksek miktarlarda alkoloid sentezlediği belirlenmiş ve kültür büyüme döngüsünün sonlarına doğru, birincil ve ikincil metabolik fonksiyonlarda ortak olarak kullanılan metabolik öncülerin, protein sentezinde kullanılmak yerine, yön değiştirerek fenolik bileşiklerin sentezi gibi ikincil metabolik reaksiyonlarda tepkimeye girdikleri belirlenmiştir.

Yapısal olarak birarada bulunan, kültür ortamına tutuklanmış hücreler, serbest süspansiyon kültür ortamındaki hücrelere göre daha yavaş büyüyen hücreler olduklarından, birincil metabolik aktiviteleri daha düşüktür ve bu nedenle de çok daha fazla miktarlarda ikincil metabolik bileşikleri sentezleyebilme kapasitesine sahiptirler.

Elde edilen sonuçlar topluca değerlendirildiğinde tutuklama yönteminin kapsaisin birikimi üzerine etkili olduğu belirlenmiştir. Uyarıcı uygulaması yapılmayan tutuklanmış hücreler ve serbest hücrelerin kontrol örneklerinde tespit edilen kapsaisin miktarları karşılaştırıldığında tutuklanmış hücrelerdeki kapsasin birikimi serbest hücrelerden yaklaşık % 28 daha fazla bulunmuştur. Burada tutuklama işleminin ve tutuklamada kullanılan kalsiyum iyonlarının da uyarıcı etkilerinin hücreleri uyararak kapsaisin birikimi üzerine olumlu etki yaptığı düşünülmektedir. Dışarıdan uyarıcıların uygulanması da kapsaisin birikimi üzerine etkili olmuştur. Özellikle tutuklama yöntemi ile birlikte uyarıcı uygulamasının yapılması kapsaisin miktarında önemli artışlara neden olmuştur. Tutuklama yöntemi ve uyarıcı uygulamaları ile elde edilen kapsaisin miktarları ticari olarak kapsaisin üretimi için yeterli olmamakla birlikte özellikle tutuklama yöntemi ile birlikte uyarıcı konsantrasyonlarının ve sürelerinin denenerek ve etkin yeni uyarıcıların, bunların kombinasyonlarının ve uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi amaçlanmalıdır.

Ülkemizde bitki hücre süspansiyon kültüründe tutuklama yönteminin kullanıldığı çalışmalar yok denecek kadar azdır. Bu yönüyle de bitki doku kültürü çalışmalarında sekonder metabolit üretimi amacıyla tutuklama yönteminin kullanımının yaygınlaştırılması açısından da önemli bir çalışmadır.

Triakontanolün hücre süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit uyarımı üzerine etki mekanizmalarının açıklığa kavuşabilmesi için daha ayrıntılı araştırmalara ihtiyaç vardır. Diğer büyüme düzenleyicilerle veya farklı uyarıcılarla birlikte olan etkileri araştırılmalıdır. Bu tez çalışmasının gelecek çalışmalara kaynak oluşturacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Arora, R. G., N. S. , Chauhan, G. and Rana, A. C., "An overview about versatile molecule capsaicin", ***International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*** 3(4), 280-286, 2011.

Atar, H. ve Çölgeçen, H., "Bitki doku kültüründe iridoit glikozitler", ***Marmara University Journal of Science*** 25(3), 115-115, 2013.

Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S., Bitki biyoteknolojisi, ***Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları*** Konya, 2001.

Bennett, D. J. and Kirby, G. W. C., "Constitution and biosynthesis of capsaicin.", ***Journal of Chemical Society, C,*** , 442-446, 1968.

Bhoite, H. and Palshikar, G., "Plant tissue culture: A Review", ***World Journal of Pharmaceutical Sciences*** 2(6), 565-572, 2014.

Body, D. R., "Neutral lipids in Trifolium repens petiols", ***Phytochemistry*** 13, 1527-1530, 1974.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E., "Production of plant secondary metabolites: a historical perspective", ***Plant Science*** 161(5), 839-851, 2001.

Bourgaud., F., A. Gravot, S. and Milesi, E. G., "Production of plant secondary metabolites: a historical perspective", ***Plant Science*** 161, 839–851, 2001.

Cazenave., M. S., Herrero, N. O., Vara, D. and Laviada, I. D., "Capsaicin, a component of red peppers, induces expression of androgen receptor via PI3K and MAPK pathways in prostate LNCaP cells.", ***FEBS letters*** 584, 141-147, 2009.

Chayapathy, B., Prasad, N., Gururaj, H. B., Kumar, V., Giridhar, P. and Ravishankar, G. A., "Valine pathway ismore crucial than phenyl propanoid pathway in regulating capsaicin biosynthesis in Capsicum frutescens Mill.", ***Journal of Agricultural and Food Chemistry,*** 54, 6660-6666, 2006.

Chen, X., Yuan, H., Chen, R., Zhu, L., Du, B., Weng, Q. and and He, G., "Isolation and characterization of triacontanol-regulated genes in rice (*Oryza Sativa* L.): possible role of triacontanol as a plant growth stimulator.", ***Plant Cell Physiology,*** 43, 869-876, 2002.

Collin, H. A. and Edwards, H. S., Plant cell culture (Introduction to Biotechniques), ***Bios Scientific Publishers Ltd***, Bios Scientific Publishers Ltd, 1998.

Curry, J., Aluru, M., Mendoza, M., Nevarez, J., Melendrez, M. and O'Connel, M. A., "Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent Capsicum spp", ***Plant Science*** 148, 47-57, 1999.

Díaz, J., Pomar, F., Bernal, A. and Merinos, F., "Peroxidases and the metabolism of capsaicin in Capsicum annuum L. ", ***Phytochemistry Reviews,*** 3, 141-157, 2004.

Ellialtıoglu, S., Üstün, A. S. ve Mehmetoglu, Ü., "Bazı biber çesitlerinden in vitro kallus oluşumu için en uygun besin ortamı bileşiminin belirlenmesi", ***II-Kızılırmak Uluslararası Fen Kongresi***, 1998.

Govindarajan, V. S., "Capsicum-production, technology, chemistry and quality. 3. chemistry of the color, aroma and pungency stimuli", ***Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*** 24(3), 1986.

Göksungur, Y. ve Güvenç, Y., "Kalsiyum aljinatta hücre immobilizasyonu ve biyoteknolojideki uygulamaları", ***GIDA*** 27(6), 511-518, 2002.

Ha, J., Han, K. J., Kim, K. J. and Jenong, S. W., "Gas chromatographic analysis of capsaicin in gochujang.", ***J AOAC Int*** 91, 387-391, 2008.

Hangarter, R., Ries, S. K. and Carlson, P., "Effect of triacontanol on plant cell Cultures in vitro", ***Plant Physiology*** 61, 855-857, 1978.

Hassan Adeyemi, M. M., "A Review of secondary metabolites from plant materials", ***Int. J. Pure Appl. Sci. Technol.*** 6(2), 94-102, 2011.

Hoagland, R., "Effects of triacontanol on seed germination and early growth. ", ***Bor Gaz.*** 141, 53-55, 1980.

Ilya Raskin., D. M. R., Slavko Komarnytsky, Nebojsa Ilic, Alexander Poulev,, Nikolai Borisjuk, A. B., Diego A. Moreno, Christophe Ripoll, Nir Yakoby, and Joseph M.O'Neal,

T. C., Ira Pastor and Bertold Fridlender, "Plants and human health in the twenty-first century", ***TRENDS in Biotechnology*** 20(12), 2002.

İşlek, C., Serbest ve tutuklanmış capsicum annuum L. hücre süspansiyon kültürlerinde kapsaisin üretimi üzerine bazı uyarıcıların etkisi, ***Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara***, 2009.

Johnson, T. S., Ravishankar, G. A. and Venkataraman, L. V., "In vitro capsaicin production by immobilized cells and placental tissues of Capsicum annuum L. grown in liquid medium. ", ***Plant Science,*** 70,, 223-229., 1990.

Johnson, T. S., Ravishankar, G. A. and Venkataraman, L. V., "Elicitation of capsaicin production in freely suspended cells and immobilized cell cultures of Capsicum frutescens Mill", ***Food Biotechnology,*** 5, 197-205, 1991.

Karacakaya, P., Kılıç, N. K., Duygu, E. ve Dönmez, G., "Stimulation of reactive dye removal by cyanobacteria in media containing triacontanol hormone", ***Journal of Hazardous Materials.*** 172, 1635-1639, 2009.

Karadal, Ç., Poyrazoğlu, E., Yemiş, O. ve Artık, N., "Kırmızı Biberlerde Acılık ve Renk Bileşenleri", ***Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*** 7(3), 359-366, 2001.

Kim, M., Kim, S., Kim, S. and Kim, B. D., "Isolation of DNA clones differentially accumulated in the placenta of pungent pepper by suppression substractive hybridization", ***Molecules and Cells*** 11, 213-219, 2001.

Lindsey, K. and Yeoman, M., Immobilized plant cells. , ***Springer-Verlag***, Berlin, 1985.

Lindsey, K. and Yeoman, M. M., "The viability and biosynthetic activity of cells of Capsicum frutescens Mill. cv. annuum immobilized in reticulate polyurethane. ", ***Journal of Experimental Botany,*** 35(160), 1684-1696, 1984.

Maggi., C., Barbanti, G., Santicioli, P., Beneforti, P., Misuri, D., Meli, A. and Turini, D., "Cystometric evidence that capsaicin-sensitive nerves modulate the afferent branch of micturition reflex in humans", ***J Urol*** 142(1), 150- 154, 1989.

Masood, A., Dogra, J. V. V. and J.H.A., A. K., "The influence of colouring and pungent agents of red chilli (Capsicum annuum) on growth and aflatoxin production by Aspergillus flavus.", ***Letters in Applied Microbiology*** 18(4), 184-186, 1994.

Molina-Torres J., A., G.-C. and Ramírez-Chávez E., "Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamérica: affinin and capsaicin," ***Journal of Ethnopharmacology*** 64, 241-248, 1999.

Murashige, T. and Skoog, F., "A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures," ***Physiologia Plantarum,*** 15,, 473-497., 1962.

Murthy., H. N., Georgiev, M. I., Park, S.-Y., Dandin, V. S. and Paek, K.-Y., "The safety assessment of food ingredients derived from plant cell, tissue and organ cultures: A review", ***Food Chemistry*** 176(0), 426-432, 2015.

Oskay, D. ve Oskay, M., "Bitki sekonder metabolitlerinin biyoteknolojik önemi", ***Ecological Life Sciences*** 4(2), 31-41, 2009.

Payne, G., Bringi, V., Prince, C. and Shuler, M.L. , "Plant cell and tissue culture in liquid systems.", ***Hanser publishers pp.***, 346, 1991.

Phillips, G. C., Hubstenberger, J. F. and Hansen, E. E., "Plant regeneration by organogenesis from callus and cell suspension cultures, Plant Cell, Tissue and Organ Culture", ***Springer*** (67-78), 2007.

Poyrazoğlu, E. S., Yemiş, O., Kadakal, Ç. ve Artık, N., "Determination of capsaicinoid profile of different chilli peppers grown in Turkey. ", ***Journal of the Science Food and Agriculture*** 85, 1435-1438, 2005.

Rajasekaran, L. R. and Blake, T. J., " New plant growth regulators protect photosynthesis and enhance growth under drought of jack pine seedlings", ***Journal of Plant Growth Regulation*** 18, 175-181, 1999.

Ramachandra Rao, S. and Ravishankar, G. A., "Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites", ***Biotechnology Advances*** 20(2), 101-153, 2002.

Ramachandra, R., S., Sarada, R. and Ravishankar, G. A., "Phycocyanin, a new elicitor for capsaicin and anthocyanin accumulation in plant cell cultures.", ***Applied Microbial Biotechnology*** 46(619-621), 1996.

Ramos-Palacio, J. J., "Spectrophotometric determination of capsaicin.", ***Journal-Association of Official Analytical Chemists,*** 60,, 970-972., 1977,.

Ravindra., B. M., Gangadhar, S. M. and K. Nataraja, "Effect of triacontanol on the micropropagation of costus speciosus sm. using rhizome thin sections.", ***In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*** 41, 129-132, 2005.

Reyes-Escogido Mde, L., Gonzalez-Mondragon, E. G. and Vazquez-Tzompantzi, E., "Chemical and pharmacological aspects of capsaicin", ***Molecules*** 16(2), 1253-1270, 2011.

Rollyson, W. D., Stover, C. A., Brown, K. C., Perry, H. E., Stevenson, C. D., McNees, C. A., Ball, J. G., Valentovic, M. A. and Dasgupta, P., "Bioavailability of capsaicin and its implications for drug delivery", ***J Control Release*** 196, 96-105, 2014.

Romero-Castillo, R. A., Roy Choudhury, S., Leon-Felix, J. and Pandey, S., "Characterization of the heterotrimeric G-protein family and its transmembrane regulator from capsicum (*Capsicum annuum* L.)", ***Plant Sci*** 234, 97-109, 2015.

Schweiggert, U., Carle, R. and Schieber, A., "Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chili pods (Capsicum frutescens L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry", ***Analytica Chimica Acta*** 557, 236-244, 2006.

Sökmen, A. ve Gürel, E., "Bitki biyoteknolojisi 1:Sekonder metabolit üretimi ", ***Selçuk üniversitesi Basımevi***, Konya, 2002.

Surh, Y. and Lee, S., "Capsaicin a double-edged sword: toxicity, metabolism, and chemopreventive potential", ***Life Sci*** 56(22), 1845-1855, 1995.

Surh., Y. J. and Lee, S. S., "Capsaicin in hot chili pepper: Carcinogen, Co-carcinogen or Anticarcinogen ?.", ***Food and Chemical Toxicology,*** 34(3), 313-316, 1996.

Szolcsanyi, J., "Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology", ***Neuropeptides*** 38(6), 377-384, 2004.

Şener, E. ve Şahin S., "Kapsaisin farmakokinetik, toksikolojik ve farmakolojik özellikleri", ***Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*** 29(2), 149-163, 2010.

Vanisree, M. and Tsay, H. S., "Plant Cell Cultures - An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites. International", ***Journal of Applied Science and Engineering*** 1(1), 29–48, 2004.

Walton, N. J., Mayer, M. J. and Narbad, A., "Vanillin", ***Phytochemistry,*** 63, 505-515, 2003.

Yağcı., C. ve Toker, T., "Bitki doku kültürü yoluyla üretilen flavonoitler ", ***Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*** 1(1), 47-58, 2008.

Yemiş, O., Bakkalbaşı, E. ve Artık, N., "Kapsaisinoit kaynağı olarak kırmızıbiberler", ***Gıda Mühendisliği Dergisi***, 2004.

Zhong, J.-J., "Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes", ***Journal of Bioscience and Bioengineering*** 94(6), 591-599, 2002.

ÖZGEÇMİŞ

Soner KAYA 1989 yılında Denizli'de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Denizli Buldan ilçesine bağlı Yenicekent Kasabası'nda tamamladı. 2009 yılında girdiği Niğde Üniversitesi Biyoloji Bölümünü 2013 yılında bitirdi. Aynı yıl Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. Yüksek lisans öğrenimi süresince TÜBİTAK-TOVAG 113O518 nolu proje de bursiyer yüksek lisans öğrencisi olarak görev aldı. Bu süreçte 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, II. KOP Bölgesel Kalkınma Sempozyumu ve Ekoloji Sempozyumu 2015'e katılım sağladı