

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**SERBEST VE TUTUKLANMIŞ *Capsicum annuum* L. HÜCRE SÜSPANSİYON
KÜLTÜRLERİNDE KAPSAİSİN ÜRETİMİ ÜZERİNE BAZI
UYARICILARIN ETKİSİ**

Cemil İŞLEK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2009**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Cemil İŞLEK tarafından hazırlanan “Serbest ve tutuklanmış *Capsicum annuum* L. hücre süspansiyon kültürlerinde kapsaisin üretimi üzerine bazı uyarıcıların etkisi” konulu tez çalışması 04/12/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. A. Sülün ÜSTÜN

Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri:

Başkan : Prof. Dr. Cihat TOKER

Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Işıl ÖNCEL

Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU

Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği ABD

Üye : Prof. Dr. Rukiye TIPIRDAMAZ

Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Orhan ATAKOL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

SERBEST VE TUTUKLANMIŞ *Capsicum annuum* L. HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNDE KAPSAİSİN ÜRETİMİ ÜZERİNE BAZI UYARICILARIN ETKİSİ

Cemil İŞLEK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. A. Sülün ÜSTÜN

Bu çalışmada Kahramanmaraş Hat-187 biber tohumlarına ait hücre süspansiyon kültüründe, kapsaisin üretimi üzerine tutuklama işleminin ve farklı konsantrasyonlarda çeşitli uyarıcıların farklı zamanlardaki etkileri incelenmiştir.

In 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), salisilik asit (100-300 µM/ml), metil jasmonat (0,04-0,1 µM/ml), ksantan (0,1-0,3 mg/ml) ve kurdlan (0,1-0,3 mg/ml) uyarıcıları uygulanmıştır ve uyarıcı uygulanmayan kontrol grupları oluşturulmuştur. Etil asetat ile ekstraksiyon yapılarak serbest hücrelerdeki, tutuklanmış hücrelerdeki ve bunların süzöntülerindeki 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. Selülaz ve kurdlan uyarıcılarının kapsaisin birikimi üzerine etkisi, diğer uyarıcılara göre daha etkili bulunmuştur. Genel olarak serbest hücrelerde tüm uyarıcılarda süzöntüye geçen kapsaisin miktarı tutuklanmış hücrelerdekinden daha fazladır. Süzöntüye geçen en fazla kapsaisin miktarı serbest hücrelerde 10. günde 30 µg/ml selülaz uygulamasında 91,27 µg/g t.a. olarak belirlenmiştir. Tüm uyarıcı gün ve dozları karşılaştırıldığında en fazla toplam kapsaisin miktarı tutuklanmış hücrelerde 0,2 mg/ml kurdlan uygulamasında 14. günde 426 µg/g t.a. olarak belirlenmiştir.

Aralık 2009, 138 sayfa

Anahtar Kelimeler : Kapsaisin, uyarıcı, tutuklama, *Capsicum annuum* L. , bitki doku kültürü, ikincil metabolit, Solanaceae

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

THE EFFECTS of SOME ELICITORS ON CAPSAICIN PRODUCTION in FREELY
SUSPENDED CELLS and IMMOBILIZED CELL CULTURES of
Capsicum annuum L.

Cemil İŞLEK

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. A. Sülün ÜSTÜN

In this study, the effect of immobilization and elicitation of some elicitors on the production of capsaicin in the cell suspension culture of Kahramanmaraş Hat-187 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. Elicitors such as cellulase (5-30 µg/ml), salicylic acid (100-300 µM/ml), methyl jasmonate (0,04-0,1 µM/ml), xanthan (0,1-0,3 mg/ml) and curdlan (0,1-0,3 mg/ml) were 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 capturing 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. The effect of cellulase and curdlan on the accumulation of capsaicin were found to be higher than the other elicitors. In general, capsaicin amount in the filtrate for free cells was higher than the immobilized cells. The highest amount of capsaicin in the filtrate for the free cells was identified as 91,27 µg/g f.w. in the 10th day for the 30 µg/ml cellulase applied samples. When all the elicitors and the sampling days were compared, the highest capsaicin amount for the immobilized cells was determined as 426 µg/g f.w. in the 14th day for the 0,2 mg/ml curdlan applied samples.

December 2009, 138 pages

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

TEŞEKKÜR

Bana araştırma olanağı sağlayan ve çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren danışman hocam, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. A. Sülün ÜSTÜN'e teşekkürlerimi sunarım. Doktora çalışmam süresince yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Işıl ÖNCEL'e, Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU ve Prof. Dr. Emine BAYRAKTAR'a, bitki doku kültürü aşamasında bana laboratuvarlarını kullanmamı sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU'na, tutuklama işlemleri için beni yönlendiren ve bilgilerini paylaşan The Pennsylvania State University' den Prof. Dr. Wayne R. CURTIS'e, tohum temini konusunda yardımcı olan Kahramanmaraş Tarımsal Araştırma Enstitüsü Bahçe Bitkileri Şube Başkanı Dr. Bekir Bülent ARPACI'ya, tez yazım ve çevirilerinde yardımlarını gördüğüm değerli arkadaşlarım Kastamonu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Yrd. Doç Dr Ergin M. ALTUNER ve Yrd. Doç Dr. Talip ÇETER'e, makale temininde yardım eden değerli arkadaşım biyolog Buket GÜLTEKİN'e teşekkür ederim.

Hayatımın her anında olduğu gibi, tez çalışmalarım sırasında da anlayışları, sevgileri ve sabırlarıyla beni destekleyen sevgili AİLEME çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, BİYEP 2005K120140 No'lu proje ile desteklenmiştir.

Cemil İŞLEK

Ankara, Aralık 2009

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1.GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 Bitki Hücre Kültürleri Tarafından İkincil Metabolit Bileşiklerin Üretimi	4
2.2 İkincil Metabolit Bileşik Sentezi İçin Bitki Hücrelerinin Tutuklanması	12
2.3 Kapsaisinoidler	16
2.3.1 Kapsaisinoid bileşiklerinin özellikleri ve kullanım alanları.....	19
2.3.2 Kapsaisinoid bileşiklerinin dokularda ve hücre içerisindeki Yerleşimi	22
2.3.3 Kapsaisinoid biyosentezi.....	23
2.3.4 Kapsaisinoid metabolizması.....	26
2.3.5 Kapsaisinoid bileşiklerinin birikiminin hormonlar tarafından düzenlenmesi	26
2.3.6 Kapsaisinoid birikimi ve çevresel faktörler	27
2.4 Kapsaisin Elde Edilmesi İle İlgili Doku Kültürü Çalışmaları	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	34
3.1 Materyal.....	34
3.1.1 Bitkisel Materyal	34
3.1.2 Kapsaisin sentezini uyarmak için kullanılan uyarıcılar	34
3.2 Yöntem	34
3.2.1 Tohumların yüzeysel sterilizasyonu	35
3.2.2 Tohum çimlendirme ortamı bileşimi ve hazırlanması	35
3.2.3 Kültür koşulları.....	36
3.2.4 Hücre Süspansiyon kültürlerinin oluşturulması	38
3.2.5 Tutuklama işlemleri	39
3.3 Uyarıcı uygulanması ve analiz için örneklerin hazırlanması.....	38
3.4 Ekstraksiyon İşlemleri	41
3.4.1 Serbest ve tutuklanmış hücrelerden kapsaisin ekstraksiyonu	41

3.4.2 Serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzöntüsünden kapsaisin ekstraksiyonu	42
3.5 Kapsaisin Analizi.....	42
3.5.1 Kapsaisin standartının hazırlanması	42
3.5.2 Ekstraktlardan kapsaisin analizi.....	44
3.5.3 Kapsaisin tayininde HPLC koşulları.....	44
3.6 İstatistiksel Analizler	44
4. BULGULAR.....	45
4.1 Serbest ve Tutuklanmış Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Kapsaisin Birikimine Selülaz Uygulamasının Etkisi	45
4.1.1 Serbest ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin birikimine selülaz uygulamasının etkisi	46
4.1.2 Serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzöntülerinde kapsaisin birikimine selülazın etkisi.....	49
4.1.3 Serbest ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin birikimine selülazın Etkisi.....	53
4.2 Serbest ve Tutuklanmış Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Kapsaisin Birikimine Salisilik Asit Uygulamasının Etkisi	56
4.2.1 Serbest ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin birikimine salisilik Asit uygulamasının etkisi	57
4.2.2 Serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzöntülerinde kapsaisin birikimine salisilik asit uygulamasının etkisi.....	60
4.2.3 Serbest ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin birikimine salisilik asitin etkisi	64
4.3 Serbest ve Tutuklanmış Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Kapsaisin Birikimine Metil Jasmonat Uygulamasının Etkisi.....	67
4.3.1 Serbest ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin birikimine metil jasmonat uygulamasının etkisi.....	68
4.3.2 Serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzöntülerinde kapsaisin birikimine metil jasmonat uygulamasının etkisi.....	71
4.3.3 Serbest ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin birikimine metil jasmonat uygulamasının etkisi.....	74
4.4 Serbest ve Tutuklanmış Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Kapsaisin Birikimine Ksantan Uygulamasının Etkisi.....	77
4.4.1 Serbest ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin birikimine ksantan uygulamasının etkisi	77
4.4.2 Serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzöntülerinde kapsaisin birikimine ksantan uygulamasının etkisi.....	80
4.4.3 Serbest ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin birikimine ksantan uygulamasının etkisi.....	83
4.5 Serbest ve Tutuklanmış Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Kapsaisin Birikimine Kurdlan Uygulaması.....	86

4.5.1 Serbest ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin birikimi üzerine kurdan uygulamasının etkisi.....	87
4.5.2 Serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde kapsaisin birikimine kurdan uygulamasının etkisi.....	91
4.5.3 Serbest ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin birikimine kurdan uygulamasının etkisi.....	93
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	98
KAYNAKLAR	112
EKLER.....	126
EK 1 5 µg/ml' lik kapsaisin standartının HPLC kromatogramı.....	127
EK 2 10 µg/ml' lik kapsaisin standartının HPLC kromatogramı.....	128
EK 3 20 µg/ml' lik kapsaisin standartının HPLC kromatogramı.....	129
EK 4 40 µg/ml' lik kapsaisin standartının HPLC kromatogramı.....	130
EK 5 80 µg/ml' lik kapsaisin standartının HPLC kromatogramı.....	131
EK 6 100 µg/ml' lik kapsaisin standartının HPLC kromatogramı.....	132
EK 7 Süzüntüye geçen kapsaisin miktarı ve toplam kapsaisin miktarının hesaplanması	133
EK 8 30 µg/ml selüloz uygulamasında 24. saatte tutuklanmış hücrelerdeki kapsaisin miktarına ait HPLC kromatogramı	134
EK 9 0,25 mg/ml kurdan uygulamasında 14. günde tutuklanmış hücrelerdeki kapsaisin miktarına ait HPLC kromatogramı	135
EK 10 Ksantan bileşiğinin moleküler yapısı.....	136
EK 11 Kurdan bileşiğinin moleküler yapısı.....	137
ÖZGEÇMİŞ.....	138

SİMGELER DİZİNİ

TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
GC	Gaz Kromatografisi
VRI	Vanilloid Reseptörü-I
PAL	Fenil Alanin Amonyum Liyaz
Ca4H	Sinnamik asit 4 hidroksilaz
Ca3H	Kumarik asit 3 hidroksilaz
CoMT	Kafeik asit O metil transferaz
pAMT	Amino transferaz
CS	Kapsaisin sentaz
KAS	Keto açıl sentaz
FAT	Thioestreaz
ACL	Açıl taşıyıcı protein
SA	Salisilik Asit
SAM	S-adenozil metiyonin
MS	Murashige ve Skoog
VOCl ₃	Vanadyum oksit triklorit
t.a.	Taze ağırlık
HMGR	3-hidroksi-3-metil-glutaril koenzim A redüktaz
k.a.	Kuru ağırlık

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Hücrelerin kalsiyum aljinatla tutuklanmasının şematik şekli (Sökmen ve Gürel 2002)	15
Şekil 2.2	Kapsaisinoid ve kapsinoidlerin yapısal dağılımları (Díaz vd. 2004)	17
Şekil 2.3	Kapsaisin biyosentez yolu (Chayapathy vd. 2006)	24
Şekil 3.1	Biber tohumlarının steril besi ortamına ekimi	35
Şekil 3.2	Kahramanmaraş-Hat 187 Biber tohumunun ekimden 4 hafta sonraki gelişimi	37
Şekil 3.3	Hipokotil eksplantından gelişen kallus dokusunun agarlı besiyerinde görünümü	37
Şekil 3.4	Alt kültürde çoğalan kallus dokusu	38
Şekil 3.5	Çalkalayıcı üzerindeki hücre süspansiyon kültürleri	39
Şekil 3.6	Kalsiyum klorür içerisinde tutuklanmış hücrelerin oluşumu	40
Şekil 3.7	MS besiyeri ortamında tutuklanmış hücreler	40
Şekil 3.8	Spektrofotometrede ölçüm için kapsaisin standartı ile çizilen grafik	43
Şekil 3.9.	HPLC yöntemi için kapsaisin standartı ile çizilen grafik	43
Şekil 4.1	Farklı konsantrasyonlarda selüloz uygulamalarının farklı zamanlarda serbest ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin miktarı üzerine etkisi	47
Şekil 4.2	Farklı konsantrasyonlarda selüloz uygulamalarının farklı zamanlarda serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde kapsaisin miktarı üzerine etkisi	51
Şekil 4.3	Farklı konsantrasyonlarda selüloz uygulamalarının farklı zamanlarda serbest ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin miktarı üzerine etkisi ...	54
Şekil 4.4	Farklı konsantrasyonlarda salisilik asit uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerdeki kapsaisin miktarı üzerine etkisi	59
Şekil 4.5	Farklı konsantrasyonlarda salisilik asit uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde kapsaisin miktarı üzerine etkisi	62

Şekil 4.6	Farklı konsantrasyonlarda salisilik asit uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin miktarı üzerine etkisi	66
Şekil 4.7	Farklı konsantrasyonlarda metil jasmonat uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin miktarı üzerine etkisi	69
Şekil 4.8	Farklı konsantrasyonlarda metil jasmonat uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde kapsaisin miktarı üzerine etkisi.....	73
Şekil 4.9	Farklı konsantrasyonlarda metil jasmonat uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin miktarı üzerine etkisi.....	76
Şekil 4.10	Farklı konsantrasyonlarda ksantan uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin miktarı üzerine etkisi	79
Şekil 4.11	Farklı konsantrasyonlarda ksantan uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde kapsaisin miktarı üzerine etkisi	82
Şekil 4.12	Farklı konsantrasyonlarda ksantan uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin miktarı üzerine etkisi	85
Şekil 4.13	Farklı konsantrasyonlarda kurdan uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin miktarı üzerine etkisi	89
Şekil 4.14	Farklı konsantrasyonlarda kurdan uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde kapsaisin miktarı üzerine etkisi	92
Şekil 4.15	Farklı konsantrasyonlarda kurdan uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin miktarı üzerine etkisi	95

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge.2.1	Bitkilerden elde edilen önemli farmasotikler (Ramachandra Rao and Ravishankar2002'den uyarlanmıştır).....	5
Çizelge 2.2	İkincil metabolitlerin yüksek ürünleri (Ramachandra Rao and Ravishankar 2002' den uyarlanmıştır).....	7
Çizelge 2.3	Yüksek bitkilerin doku ve süspansiyon kültürlerinden izole edilen doğal ürün grupları.....	11
Çizelge 2.4	Çeşitli ikincil metabolitler için tutuklama çalışmaları (Ramachandra Rao and Ravishankar 2002 uyarlanmıştır).....	13
Çizelge 3.1	MS temel besin ortamı (Murashige ve Skoog 1962)	36
Çizelge 4.1	Farklı konsantrasyonlarda selüloz uygulamalarının, <i>Capsicum annuum</i> L.(KM-187) serbest ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi.....	46
Çizelge 4.2.	Farklı konsantrasyonlarda selüloz uygulamalarının, <i>Capsicum annuum</i> L.(KM-187) serbest ve tutuklanmış hücrelerinin süzüntülerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi.	50
Çizelge 4.3.	Farklı konsantrasyonlarda selüloz uygulamalarının, <i>Capsicum annuum</i> L.(KM-187) toplam serbest ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi	53
Çizelge 4.4.	Farklı konsantrasyonlarda salisilik asit uygulamalarının, <i>Capsicum annuum</i> L.(KM-187) serbest hücre süspansiyon kültürlerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi	57
Çizelge 4.5.	Farklı konsantrasyonlarda salisilik asit uygulamalarının, <i>Capsicum annuum</i> L.(KM-187) serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi	61
Çizelge 4.6.	Farklı konsantrasyonlarda salisilik asit uygulamalarının, <i>Capsicum annuum</i> L.(KM-187) toplam serbest ve tutuklanmış hücrelerinin kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi	65
Çizelge 4.7.	Farklı konsantrasyonlarda metil jasmonat uygulamalarının, <i>Capsicum annuum</i> L.(KM-187) serbest ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi	68
Çizelge 4.8.	Farklı konsantrasyonlarda metil jasmonat uygulamalarının, <i>Capsicum annuum</i> L.(KM-187) serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi	72

Çizelge 4.9 Farklı konsantrasyonlarda metil jasmonat uygulamalarının, <i>Capsicum annuum</i> L.(KM-187) serbest ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi	75
Çizelge 4.10 Farklı konsantrasyonlarda ksantan uygulamalarının, <i>Capsicum annuum</i> L.(KM-187)serbest ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi.....	78
Çizelge 4.11 Farklı konsantrasyonlarda ksantan uygulamalarının, <i>Capsicum annuum</i> L.(KM-187) serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi	81
Çizelge 4.12 Farklı konsantrasyonlarda ksantan uygulamalarının, <i>Capsicum annuum</i> L.(KM-187) serbest ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi	84
Çizelge 4.13 Farklı konsantrasyonlarda kurdan uygulamalarının, <i>Capsicum annuum</i> L.(KM-187) serbest ve tutuklanmış hücrelerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi.....	87
Çizelge 4.14 Farklı konsantrasyonlarda kurdan uygulamalarının, <i>Capsicum annuum</i> L.(KM-187) serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi	91
Çizelge 4.15 Farklı konsantrasyonlarda kurdan uygulamalarının, <i>Capsicum annuum</i> L.(KM-187) serbest ve tutuklanmış hücrelerinde toplam kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi	94
Çizelge 4.16 Kullanılan uyarıcıların etkin uyarım dozu, uyarım zamanı ve oluşturdukları toplam kapsaisin miktarı	97

1.GİRİŞ

Birçok alanda olduğu gibi sekonder (ikincil) bitki metabolitlerin üretilmesi ve bunların sentezlenmesine ait temel bilgilere ulaşılması konularında da, bitki doku kültürleri araştırmacılara büyük olanaklar sunmaktadır. Nitekim değişik bitki türlerine ait dokularda *in vitro* koşullarda bu maddelerin sentezini uyatabilecek çeşitli uyarıcılar (elisitör) ele alınmış ve etkin konsantrasyon 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 (Johnson vd. 1991). Hücre kültürlerinden elde edilen doğal yiyecek katkıları da sentetik karışıtlarına göre artan bir şekilde günümüzde tercih edilmektedir. İkincil 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 immobilizasyon (tutuklama) tekniği ile ürün miktarını arttırmayı hedefleyen çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır (Ramachandra vd. 1996).

Kapsaisin biber bitkisinden elde edilen önemli bir yiyecek katkı maddesidir. Ayrıca kapsaisin preparatları bel ağrısı (lumbago), nevralji (sinir ağrısı) ve romatizmal hastalıklara karşı kullanılmaktadır. Aynı zamanda, *Capsicum* (Biber)'dan hazırlanmış preparatlarının tonik ve karmin şekli hazımsızlıkta kullanılmaktadır. Kapsaisinin, eklem ve romatizma ağrılarında, flaster, merhem ve tıbbi olarak çeşitli özellikte kullanımı olan bir madde olduğu da belirlenmiştir (Ramachandra Rao ve Ravishankar 2002, Barbero vd. 2008, Hayman ve Kam 2008).

İmmobilize (tutuklanmış) bitki hücre kültürleriyle ilgili birçok çalışma vardır (Lindsey vd. 1983, Lindsey ve Yeoman 1984a, Curtis vd. 1995, Johnson vd. 1996, Ramachandra Rao ve Ravishankar 1999, Premjet ve Tachibana 2004). Birçok deneme kapsaisin üretim seviyelerini artırmak için yapılmıştır. Kapsaisin, *in vitro* olarak serbest ve tutuklanmış *Capsicum spp.* hücrelerinden sıvı besiyerinden elde edilebilmektedir (Lindsey ve Yeoman 1984a, Ravishankar vd. 1988). *Capsicum spp.*'nin tutuklanmış

hücre kültürlerinin, serbest hücre süspansiyon kültürlerine göre birkaç kat daha fazla miktarda kapsaisin ürettiği bulunmuştur (Lindsey vd. 1983, Lindsey 1985).

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.

Bitki hücre kültürlerinde ikincil metabolitlerin uyarımı bitki türlerinin birçoğunda bildirilmiştir (Ramachandra Rao ve Ravishankar 2002). Çeşitli biyotik ve abiyotik uyarıcıların kültür hücrelerinde fitokimyasalların üretimini birkaç kat artırdığı bilinmektedir (Johnson vd. 1991).

Kapsaisin ticari şekli Oleoresin *Capsicum* ayrılmıştır ve ayrıştırma işlemi peş peşe birçok basamaktan geçirilerek olmaktadır. Kapsaisin, serbest ve tutuklanmış hücrelerden kolaylaştırılmış ayırım ve arındırma işlemleriyle ortamdan sızması sağlanarak üretilebilir (Ramachandra Rao ve Ravishankar 2002). Kapsaisin eldesi için kullanılacak *Capsicum* bitkisini normal koşullarda yetiştirmek 4-5 ayı almaktadır ve bu nedenle de kapsaisin sürekli bir üretim süreci uzun zamanda ve kısıtlı bir zaman periyodunda gerçekleştirilebilmektedir. Bu nedenle *Capsicum*' un serbest ve tutuklanmış hücre kültürlerinin *in vitro* şartlar altında sürekli yetiştirilebilmesi kapsaisin eldesi için sürekliliği sağlayabilecek bir yoldur.

Bu tez çalışmasında, serbest ve tutuklanmış *Capsicum spp.* hücre süspansiyon kültürleri hazırlamak ve bunlara farklı konsantrasyonlarda çeşitli uyarıcılar ilave ederek, değişen zamanlarda alınan örneklerde biriken kapsaisin miktarlarını belirlemek ve serbest ile tutuklanmış hücre süspansiyon kültürlerinde biriken kapsaisin miktarlarını karşılaştırarak avantajlı olan yöntemi belirlemeye çalışmak amaçlanmıştır. Aynı

zamanda kapsaisin birikimi üzerine etkili olan uyarıcı, konsantrasyon ve zaman belirlenmeye çalışılacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Bitki Hücre Kùltürleri Tarafından İkincil Metabolit Bileşiklerin Üretimi

İkincil metabolitler ya da ikincil ürünler birçok organizma tarafından sentezlenen ancak temel yaşamsal işlevlerde görev almayan, genellikle metabolizmada ikincil rolleri olan bileşiklerdir. Bu bileşiklerin, özellikle, canlıların diğer canlılarla ve çevreleri ile olan ekolojik ilişkilerini belirleyici fonksiyonları olduğu düşünülmektedir (Luckner 1984, Parr 1989).

Yüzyıllardır insanlık, bitkilere besin amaçlı; karbonhidrat, protein, yağ kaynağı ve barınak olarak bağımlı kalmıştır. Bununla beraber bitkiler geniş alanda, ikincil metabolitlerin kullanımı olan, eczacılıkta, zirai kimyasal, tatlandırıcı, güzel koku, renk, biyopestisit ve besin katkı maddesi eldesinde değerli kaynaklar olmuşturlar. Yaklaşık olarak bilinen 300 kadar doğal bitkisel kaynaklı ürün vardır (Balandrin ve Klocke 1988, Fowler ve Scragg 1988, Phillipson 1990, Ramachandra Rao ve Ravishankar 2002). Dünya çapında klinik alanda kullanılan ilaçların çoğu bitkilerden elde edilmektedir (Payne vd. 1991, Ramachandra Rao ve Ravishankar 2002). Bitkilerden önümüzdeki yüzyıllarda da yeni ilaçlar için farklı kimyasal ürünler sağlanacaktır. Çünkü bitki türlerinin çoğunun kimyası henüz tespit edilememiştir (Brevoort 1998, Glaser 1999, Cox ve Balick 1994, Ramachandra Rao ve Ravishankar 2002). Sentetik kimyadaki ilerlemelere karşın, hala sayısız ikincil metaboliti kapsayan farmasotiklerle ilgili olarak biyolojik kaynaklara bağılıyız. Karmaşık yapısal özellikleri ile sentezleri zordur. Bunların birçoğu bitkiler aleminde eşsizdir ve mikroorganizmalar ve hayvanlar tarafından üretilemez. Ancak transgenik araştırmalardaki bu ilerlemelerle bitkilerdeki orijinal sentezleri gibi olmasa da çeşitli bileşiklerin ve moleküllerin üretimi mümkün olmuştur (Ramachandra Rao ve Ravishankar 2002).

Bitkiler alemi oldukça çeşitli ikincil metabolit ürünlere sahiptir. Bu ürünler özellikle farmakolojik bileşiklerin sentezinde kullanılmalarından dolayı önemli ve değerlidir (Çizelge 2.1). Kırmızı renk veren pigmentler, şikonin ve antibiyotikler, günümüz

şartları altında endüstriyel çapta yoğun olarak üretilebilen bileşiklerdir (Ramachandra Rao ve Ravishankar 2002).

Çizelge 2.1 Bitkilerden elde edilen önemli farmasotikler (Ramachandra Rao ve Ravishankar 2002’den uyarlanmıştır)

Ürün	Kullanım	Bitki Türleri	(US \$ % kg)
Aymalisin	Tansiyon düşürücü	<i>Catharanthus roseus</i>	37
Artemisin	Sıtma tedavisi	<i>Artemisia annua</i>	400
Berberin	Bağırsak hastalıkları	<i>Coptis japonica</i>	3250
Eliptisin	Kanser tedavisi	<i>Orchrosia elliptica</i>	240,000
Podofilotoksin	Kanser tedavisi	<i>Podophyllum petalum</i>	n/a
Forskolin	Bronşiyal astım	<i>Coleus forskolii</i>	n/a
Ginsenosidler	Sakinleştirici	<i>Panax ginseng</i>	n/a
Kamfotesin	Kanser tedavisi	<i>Camptotheca acuminata</i>	432
Kapsaisin	Ağrı giderici	<i>Capsicum sp.</i>	700
Kinin	Öksürük kesici, aneljezik	<i>Cinchona ledgeriana</i>	500
Kodein	Öksürük kesici, aneljezik	<i>Papaver somniferum</i>	17
Kolşisin	Kalp uyarıcı	<i>Colchium autumnale</i>	35
Morfin	Kanser tedavisi	<i>Podophyllum petalum</i>	340,000
Şikonin	Antibakteriyel	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	4500
Taksol	Kanser tedavisi	<i>Taxus brevifolia</i>	600,000
Vinkristin	Kanser tedavisi	<i>Catharanthus roseus</i>	2,000,000
Vinblastin	Kanser tedavisi	<i>Catharanthus roseus</i>	1,000,000

(n/a : bilinmiyor)

Canlı bitkilerden elde edilen bileşiklere yakın özellikleri taşıyan ya da onlardan daha üstün özellikte ikincil metabolit bileşikler sentezleyebilen hücre kültürlerinin oluşturulması özellikle son yıllarda hız kazanmıştır. Biyolojik analiz teknikleri kullanılarak fizyolojik aktivite gösteren yeni bileşikler bulunmuştur. Yapılan çalışmalar kültür ortamının özelliklerinin düzenlenerek, hücrelerin biyosentetik aktivitelerinin artırılabilceğini göstermiştir. Yapay seçim ve metabolik aktiviteleri yüksek olan hücrelerin uyarımı ile hücrelerin ürettikleri bileşiklerin miktarları önemli düzeyde

arttırılabilmektedir. Canlı bitkilerde morfolojik ve fizyolojik olarak farklılaşmış belli organlar tarafından üretilen bileşikler, laboratuvar ortamında yapısal olarak organize olan hücrelerin uyarılması ile üretilmektedir (Vanisree vd. 2004).

Kültür sistemlerinin, canlı bitkileri kullanan geleneksel yöntemlerle kıyaslandığında sunduğu en önemli avantajlar:

- a) Yararlı bileşikler kontrol altında tutulan laboratuvar ortamında, iklim ve toprağın özelliklerindeki değişimlere bağlı olmadan üretilmektedir
- b) Kültür ortamında hücreler mikroorganizmaların ve böceklerin kontaminasyonuna uğramazlar.
- c) Herhangi bir bitkinin hücreleri (tropikal ya da daha yüksek yerlerde yetişen) kolaylıkla çoğaltılarak bitkiye özgü bileşiklerin üretilmesi için kullanılabilir.
- d) Hücre büyümesinin otomatik kontrol altında olduğu sistemler sayesinde metabolik fonksiyonlar kolayca düzenlenebilmekte ve bu sayede harcanan emek ve iş gücü de azaltılarak üretim arttırılabilmektedir.
- e) Organik bileşikler kallus kültüründen kolayca çıkarılabilir.

Ticari amaçlı uygulamalarda elde edilen ürün miktarının arttırılması için yapılan çalışmalarda, kültür içinde biyosentetik aktiviteleri yüksek olan hücrelerin seçilimi, kültür ortamı koşullarının optimizasyonu, ortama metabolit öncü bileşiklerin eklenmesi, transformasyon metotları ve hücrelerin ortama tutuklanması için geliştirilen teknikler üzerine yoğunlaşmıştır. Transgenik saçak kök kültürleri bitki hücresi kültür yöntemleriyle ikincil metabolit ürünlerin sentezlenmesinde devrim yaratmış ve bu sayede genetik ve biyosentetik özellikleri bakımından kararlı, hızlı büyüeyebilen ve uzun süre canlılığını koruyabilen hücreler elde edilmiştir. Bu yöntem kullanılarak çeşitli bileşiklerin üretilmesi mümkündür (Shanks ve Morgan 1999, Giri ve Narasu 2000, Vanisree vd. 2004).

Hücre kültürü tekniklerindeki ilerlemeler, genetik mühendisliği uygulamaları ile (özellikle transformasyon) birleştirilerek yüksek miktarda farmakolojik bileşikler ve besin katkı maddeleri gibi önemli bileşiklerin üretimi sağlanmıştır (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 İkincil metabolitlerin yüksek ürünleri (Ramachandra Rao ve Ravishankar 2002’ den uyarlanmıştır)

Ürün	Bitki Türleri	Ürün (% K.A.)	Referanslar
Rosmarinik asit	<i>Salvia officinalis</i>	36.0	Hippolyte vd. (1992)
Rosmarinik asit	<i>Coleus blumei</i>	21.4	Ulbrich vd. (1985)
Antrokinonlar	<i>Morinda citrifolia</i>	18.0	Zenk vd. (1975)
Şikonin	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	12.4	Fujita (1988)
Berberin	<i>Thalictrum minus</i>	10.6	Kobayashi vd. (1988)
Jatrorizin	<i>Berberis wilsonae</i>	10.0	Breuling vd. (1985)
Antosiyaninler	<i>Perilla frutescens</i>	8.9	Zhong vd. (1994)
Berberin	<i>Coptis japonica</i>	7.5	Matsubara vd. (1989)
Diosgenin	<i>Dioscorea deltoidea</i>	3.8	Sahai ve Knuth (1985)
Sanguinarin	<i>Papaver somniferum</i>	2.5	Park vd. (1992)
Serpentin	<i>Catharantus roseus</i>	2.2	Zenk vd. (1977)

Son zamanlarda moleküler biyoloji, enzimoloji ve fermantasyon teknolojisinde kaydedilen gelişmeler bitki kültürü uygulamalarının önemli moleküllerin sentezlenmesi için, devamlı bir kaynak olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Genetik yapısı değiştirilen virüslerin bitki hücrelerine aktarımı yoluyla da ürün miktarı arttırılabilmektedir. Bitki kültürü teknolojisinin geniş çaplı uygulamaları, geleneksel bitki yetiştirme yöntemlerine göre daha yüksek miktarlarda ve daha saf ürün elde edilmesini sağlamaktadır. Kieran vd. (1993) yaptıkları çalışmalarla, genetik mühendisliği yöntemlerinin, süspansiyon kültür ortamına ve bu ortamdaki hücrelere olan etkisini detaylı bir şekilde açıklamıştır. Son zamanlarda bitki kültürü teknolojisinde ortaya çıkan gelişmeler, transkripsiyon faktörlerinin üretilen bileşiklerin miktarının arttırılmasını sağlayabilecek en önemli moleküler araçlar olduğuna işaret etmektedir. Proteinlerin de hücre kültürü ortamında sentezlenebilmesi bağışıklık sistemi içerisinde önemli fonksiyonlarda görev alan terapik etkili proteinlerin de (monoklonal antikolar, interferon, albümin) kültür ortamında üretililebileceğini göstermiştir (Vanisree vd. 2004).

Son on yıl içerisinde birçok ülkede bitkiler üzerinde çalışan bilim adamları ve mikrobiyologlar , çok çeşitli hücre kültürlerinin biyosentetik kapasitelerini araştırarak bu konularla ilgili önemli sonuçlar elde etmişlerdir. Bu çalışmalar arasında bazı

araştırmacılar tıbbi aktivite yönünden önemli olan bileşiklerin üretilmesi konusunda yararlı gelişmeler sağlayabilecek sonuçlara ulaşmışlardır. Yakın zamanda bu bileşiklerin endüstriyel amaçlı üretimine geçilebileceği düşünülmektedir (Vanisree vd. 2004).

Bitki hücresi kültür uygulamalarında genellikle kullanılan 4 farklı yöntem vardır.

- 1) Kallus Kültürü
- 2) Süspansiyon Kültürü
- 3) Tutuklanmış Hücrelerin Kültürü
- 4) Farklılaşmış Hücrelerin Kültürü

Kısaca kallus kültürü, düzensiz hücre topluluklarının yarı katı bir ortam üzerinde gerekli besinler ve hormonlar sağlanarak çoğaltılmasını içerir. Ortamda bulunan besinler, oksijen ve diğer gerekli maddeler homojen bir şekilde dağılım göstermediğinden, hücrelerin büyüme hızı yavaştır. Büyümenin yavaş olması, hücrelerin topluluklar halinde bulunarak birbirleri ile temas halinde bulunması ve hücre farklılaşmasının kallus düzeyinde ilk aşamalarda olmasından dolayı bu yöntem ikincil metabolit bileşiklerin sentezlenmesini desteklemektedir (Lindsey ve Yeoman 1983).

Süspansiyon kültürleri, kallus yapısının sıvı büyüme ortamı içerisinde gerekli besinler ve büyüme faktörlerinin sağlanması ile oluşturulan ikinci bir kültür yöntemidir. Hücreler sıvı ortam içerisinde dağınık halde bulunurlar. Bu kültür yöntemi, hücrelerin daha hızlı (15 saat içerisinde hücre sayısı ikiye katlanabilir) çoğalmasını sağlar. Yöntemin basit olması bitki hücrelerinin ikincil metabolit ürünleri sentezleme konularında yapılan araştırmalarda sıklıkla kullanılmasını sağlamıştır (Lindsey ve Yeoman 1983, Teli ve Timko 2004, Oskay ve Oskay 2009). Hücrelerin süspansiyon kültürü içerisindeki yapısal organizasyonları genellikle farklılık göstermektedir. Bazı kültürlerde hücreler tamamen dağınıktır ve birbirinden ayrı olarak kültür ortamına yayılırlar, bazı kültürlerde ise hücreler bir araya gelerek milimetrelerle ölçülebilen çaplarda topluluklar oluşturabilirler. Genellikle bu tür hücre topluluklarının

oluşturduğu, büyüme hızı düşük olan kültürler daha fazla miktarlarda ikincil metabolit bileşikler sentezleyebilirler (Lindsey ve Yeoman 1983).

Hücrelerin kültür ortamına tutuklanması, aljinat, agaroz ya da benzer matrikslerin kullanılması ile sağlanır. Benzer şekilde, porlu bir yapı oluşturarak hücrelerin kültür ortamına tutuklanmasını sağlayan poliüretan köpükler de bu kültür yönteminde kullanılabilecek bir tekniktir (Lindsey vd. 1983, Payne vd. 1991). Özellikle bu maddenin kültür ortamında matriks oluşturmak için kullanılması sonucu, hücreler arasında temas ve kimyasal iletişim maksimum seviyede gerçekleşebilir. Yöntem basittir, kallus ve süspansiyon kültürü yöntemlerinde sağlanan avantajları tek bir işlemde birleştirme olanağı sunar (Parr 1989).

Diğer bir yöntem de, giderek kullanım alanı genişlemekte olan farklılaşmış hücre kültürleridir. Dış ortamdaki hormon miktarının ya da hücreler tarafından üretilen hormon miktarının çeşitli kimyasal uyarıcılarla değiştirilerek *Agrobacterium rhizogenes* (*A. rhizogenes*) bakterisi içine ya da mutant bir form olan *Agrobacterium tumefaciens* bakterisine aktarılması sonucu, fizyolojik olarak kendi kendine yetebilen organ kültürleri elde edilebilir. Bakteri hücrelerine transformasyon yapılmadan ya da *A. rhizogenes-t* ile transformasyon yapılarak elde edilen kök kültürleri ve gövde kültürleri oldukça dikkat çekmiş çalışmalardır (Parr 1989, Zayed ve Wink 2004, Kim vd. 2008). Bazı durumlarda, özellikle *A. rhizogenes* uygulaması ile elde edilen kök hücresi kültürleri, süspansiyon kültürü içerisindeki hücreler kadar hızlı büyüebilmekte ve yüksek büyüme hızına rağmen oldukça yüksek miktarlarda ikincil metabolit bileşikler sentezleyebilmektedirler (Parr 1989, Yeoman ve Yeoman 1996).

Kallus ve süspansiyon kültürü hücrelerinde dışarıdan uygulanan kimyasal uyarıcılar kaldırıldığında, hücreler tarafından sentezlenen ikincil metabolit bileşiklerin miktarı da düşmektedir. Bu nedenle ikincil metabolit bileşiklerin sentezlenmesini arttıracak yöntemler geliştirilmiştir. Genellikle kültür ortamına uygulanan hormonların çeşitliliği ve miktarı sentezlenen ürün miktarı üzerinde belirleyicidir. Oksin konsantrasyonunun arttırılması, hücrelerin ve dokuların büyümesini hızlandırır, ancak ikincil metabolit

ürünlerin sentezlenmesini önemli ölçüde engeller. Kültür ortamındaki diğer çevresel faktörler; besin seviyesi, ışık miktarı ve sıcaklık da bitki hücrelerinin ikincil metabolit ürünleri sentezleme düzeyi üzerinde etkili olan diğer faktörlerdir. Ortamdaki fosfat konsantrasyonunun azalmasının ürün birikimini uyarıcı etkisi olduğu tespit edilmiştir (Lindsey 1985). Ancak bu çevresel faktörlerin bitki hücreleri üzerindeki etkileri türler arası farklılıklar göstereceğinden, uygun koşulların belirlenmesi amacıyla yapılan optimizasyon çalışmalarının her kültür için ayrı ayrı denenerek uygulanması gerekmektedir (Parr 1989, Yeoman ve Yeoman 1996).

Bazı bitkisel ikincil metabolit bileşiklerin sentezi çeşitli biyotik (genellikle mantarlardan elde edilen) ya da abiyotik (ağır metal tuzları) uyarıcı moleküllerin kültür ortamına eklenmesi ile arttırılabilir (Di Cosmo ve Misowa 1985, Zhao vd. 2005, Savitha vd. 2006, Namdeo 2007). Sentezlenen ürün miktarını arttıran bu moleküller, genellikle hücre büyümesini ve canlılığını azalttığından, iki aşamalı kültür uygulamaları gündeme gelmiştir. Bu uygulama dahilinde hücreler, ilk aşamada optimum şartlar altında büyür ve daha sonraki aşamada da üretim ortamına (bir hücre döngüsü periyoduna eş zamanlı olarak) aktarılırlar. Üretim ortamındaki çevresel koşullar, ürün sentezini uyaracak ve arttıracak şekilde düzenlenmiştir. Bu uygulama sonunda verimli üretim sağlayan bir kültür elde edildikten sonra kültürün zaman içindeki kararlılığı test edilmelidir. Birçok kültürde bir süre sonra epigenetik (DNA metilasyonu) ve genetik (kromozom dublikasyonu, kromozom kaybı) ya da yapısal değişiklikler nedeniyle üretim verimi düşmektedir. Kültür ortamındaki değişikliklere bağlı olarak ortaya çıkan bu düşüşün pozitif bir yanı da olduğu düşünülebilir. Bir kültür içerisindeki hücrelerin hepsi aynı değildir, ürün sentezi en yüksek olan hücreler diğerlerinden ayırt edilebilir ve izolasyonla bu hücreler başka bir ortamda daha yüksek ürün elde etmek için kullanılabilir. Yüksek miktarlarda ürün sentezleyebilen hücreler, bazen değişerek daha az ürün sentezleseler de kültürlerin, üretilen bileşik miktarı bakımından takip edilmesi ve az ürün sentezleyen hücrelerin elenerek, daha verimli ürün elde edilen hücrelerin izolasyonu ile kültürlerden sağlanacak ürün miktarı da arttırılabilir (Parr 1989, Yeoman ve Yeoman 1996).

Yapısal organizasyonu düşük olan hücrelerin aksine farklılaşmış hücrelerden elde edilen kültürlerin fizyolojik gelişimleri önceden tahmin edilebilir. Bu tür kültürlerde üretilen ikincil metabolit bileşikler hem nicelik hem de nitelik bakımından canlı bitkilerin kendi doğal ortamlarında ürettikleri ürünlere benzerlik gösterirler. Ayrıca bu kültürlerin biyokimyasal ve genetik özellikleri kararlı yapıdadırlar. Böylece ekstra bir optimizasyon aşamasına ihtiyaç duyulmadan oldukça verimli üretim sistemleri olarak kullanılabilirler (Parr 1989).

Kültür ortamında üretilen biyolojik bileşiklerden hem ekonomik hem de biyolojik avantajlar sağlanması mümkündür. Bu nedenlerden dolayı, kültür ortamındaki hücreler tarafından sentezlenen her ürün dikkate alınmalıdır. Kültür hücrelerinden oldukça çeşitli ürünler elde edilmesi mümkündür. Bunların başlıcaları alkaloidler, terpenoidler ve bazı fenolik moleküllerdir (Çizelge 2.3). Sentezlenen ürün miktarı bitki türleri arasında ve hatta aynı tür içerisinde bireyler arasında bile farklılıklar gösterebilmektedir. Bitkisel kültürlerden en yüksek oranda faydalanılabilmesi için, hücre kültürlerinin optimizasyonu sadece alınan ürün miktarını arttırmaya yönelik değil, aynı zamanda sentezlenen bileşiklerin hücre dışına çıkışını da arttıracak şekilde olmalıdır (Parr 1989, Park ve Martinez 1992).

Çizelge 2. 3 Yüksek bitkilerin doku ve süspansiyon kültürlerinden izole edilen doğal ürün grupları

Antosiyaninler	Akridinler	Karotenler	Atrokinonlar	Steroidler
Kumarinler	Betalainler	Monoterpenler	Benzokinonlar	Pregnenolon türevleri
Flavonoidler	Kuinolizidinler	Seskuiterpenler	Naftokinonlar	Kardiak glikozitler
Hidroksi sinamol türevleri	Furonokinonlar	Diterpenler		
	Harringtoninler	Triterpenler		
İsoflavonoidler	İsokuinolinler			
Lignanlar	İndoller			
Fenoller	Pürinler			
Proantosiyanidler	Piridinler			
Stilbenler	Tropan alkaloitleri			
Taninler				

2.2 İkincil Metabolit Bileşik Sentezi İçin Bitki Hücrelerinin Tutuklanması

Bitki kültürü uygulamaları ile ikincil metabolit bileşiklerin üretilmesini geliştiren bir faktör de hücrelerin yapısal organizasyonu ve farklılaşma düzeyidir. Bu faktörün öneminin anlaşılması sonucu hücrelerin kültür ortamına tutuklanmasında kullanılabilecek teknikler gündeme gelmiştir. Bu teknikler uzun zamandan beri mikroorganizma ve enzim çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktaydı. Biyolojik olarak aktif enzimlerin ya da hücrelerin bir matriks tarafından tutularak sıvı ortama geçişinin engellenmesi tutuklanma olarak tanımlanabilir. Bu şekilde kültür ortamına sabitlenen hücrelerin, metabolik öncü molekülleri, bir ya da daha fazla aşamada biyodönüşüm reaksiyonları ile istenilen ürüne dönüştürmesi oldukça sık uygulanan bir yöntemdir. Brodelius vd. (1979), tarafından tanımlanan ve *Catharanthus roseus*, *Morinda citrifolia*, ve *Digitalis lanata* bitkilerinin canlı hücrelerinin, kalsiyum aljinat jel matriksi içinde tutuklanması oldukça ilgi toplayan bir çalışma olmuştur (Çizelge 2.4), (Ramachandra Rao ve Ravishankar 2002).

Bitki hücrelerinin kültür ortamına tutuklanması oldukça önemli avantajlar sağlamaktadır. Ortama tutuklanan enzimlerin aktivitelerini kaybetmemeleri için uygun pH ve sıcaklık ayarları yapıldıktan sonra gerekli reaksiyon bileşikleri ve kofaktörlerin ortama eklenmesi gerekmektedir. Ortama 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 (Payne vd. 1991, Ramachandra Rao ve Ravishankar 2002).

Kültür ortamına tutuklanan hücreler de pek çok yönden avantaj sağlayabilirler:

- a) Çok aşamalı reaksiyonların katalizlenmesinde tutuklanmış hücreler, tutuklanmış enzimlere oranla daha etkili olabilirler.

- b) Biyosentetik aktivitesi yüksek olan hücrelerin seçilimi, hücre içindeki enzimlerin aktivitelerinin yüksek olduğunun işaretidir ve bu hücreler çok daha hızlı bir şekilde ürün sentezleyebileceklerinden, verimi arttırabilirler.
- c) Bu teknikte kofaktörlerin kültür ortamına eklenmesine gerek yoktur çünkü hücreler bu molekülleri kendileri üretebilmektedirler.
- d) Kültür ortamına tutuklanan hücrelerle çalışmak, enzimlerle çalışmaktan çok daha kolaydır.

Çizelge 2.4 Çeşitli ikincil metabolitler için tutuklama çalışmaları (Ramachandra Rao ve Ravishankar 2002’ den uyarlanmıştır)

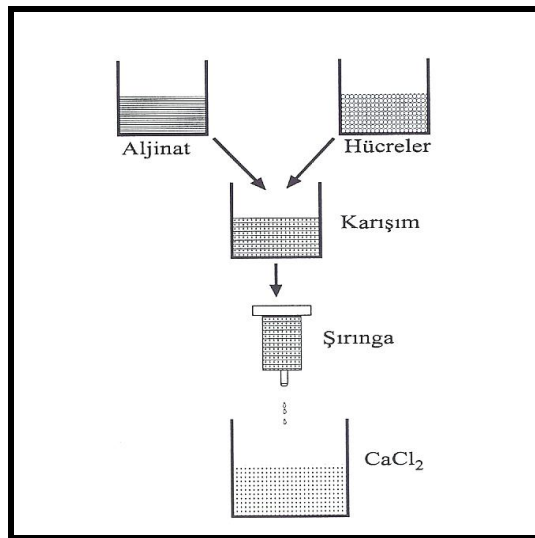
Bitki türü	Subtrat/öncü	Ürün	Tutuklama metodu	Kaynak
Biyodeğişimler				
<i>Cantharanthus roseus</i>	Kanthenamin	Ajmalisin	Agaroz	Felix vd. (1981)
<i>Digitalis lanata</i>	Dijitoksin	Digosin	Aljinat	Brodelius vd. (1979)
<i>Daucus carota</i>	Dijitoksigenin	Periplogenin	Aljinat	Jones- Veliky (1981)
<i>Nicotiana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

Tüm bu nedenlerden dolayı tutuklanmış hücrelerin biyokatalizör olarak kullanılması da giderek önem kazanmaktadır. Bu yöntemlerle üretilmesi planlanan bileşiklerin kesinlikle büyüme fonksiyonları ile ilişkili olması gerekmektedir. Hücrelerin kültür ortamında büyümeleri, belli kimyasallar kullanılarak engellenmelidir çünkü kültür ortamında hücrelerin uzun süreli olarak büyümeye devam etmesi, hücrelerin tutuklanmasını sağlayan matriksin yapısına zarar vererek bozabilir. Kültür ortamına tutuklanan hücreler, canlılıklarını ve biyosentetik kapasitelerini yüksek düzeylerde uzun süre koruyabilmelidirler. Bu sayede yüksek miktarda ikincil bileşik üretimi sağlanabilir. Ayrıca hücreler tarafından sentezlenen bileşiklerin, hücre içi ortamdaki hücre dışına geçişi de sağlanmalıdır. Bunun için uygulanan tekniklerden bir tanesi, hücrelerin tutuklanmasını sağlayan jel sisteminin hücreler etrafında polimerizasyonunun sağlanmasıdır. Bu amaçla en çok kullanılan kalsiyum aljinat jel matriksidir. Aljinat, glukoronik asit ve mannuronik asitten ibaret bir polisakkarittir. Kalsiyum iyonlarının glukoronik asit birimleri arasında oluşturduğu köprüler sayesinde jel oda sıcaklığında çabucak oluşmakta, fosfat iyonları eklendiğinde ise ayrışmaktadır. Ayrıca agar, agaroz, poliakrilamid ve jelatin de kullanılabilir. Alternatif olarak kullanılacak matrikslerden biri de poliüretan' dır (Ramachandra Rao ve Ravishankar 2002). Çeşitli matrikslerin kullanılarak, hücrelerin kültür ortamına tutuklanması, hücre fizyolojisi ve ikincil metabolit bileşik üretimi üzerinde önemli derecede etkili olmaktadır (Lindsey vd. 1983, Ramachandra Rao ve Ravishankar 2002).

Bitki hücrelerinin tutuklanması tekniği ile ikincil metabolit üretimi başlıca şu avantajları sağlamaktadır:

- 1) Tutuklanmış hücrelerde büyüme doğal olarak sıvı ortamdaki hücrelere göre daha yavaş gerçekleşir. Bu durum biyokütlenin daha uzun süre alıkonmasını sağlayacak, metabolit hücrelerden salındığı ve ortamdan kazanıldığı sürece sistem sürekli olarak çalışabilecektir. Halbuki sıvı hücre kültürlerinde bir süre sonra alt kültür (pasaj) yapma gereği duyulmaktadır. Burada sistemin verimli olması için yavaş büyüyen veya bölünmeyen hücrelerin ortamda alıkonması kilit rol oynamaktadır. Ayrıca yavaş büyüme, hızlı büyüme için gerekli olan 'birincil' metabolizmanın baskılanması veya hizmet dışına itilmesi anlamına da gelmektedir. Bu da ikincil metabolizmanın ön plana çıkması demektir (Lindsey ve Yeoman 1983).

- 2) Tutuklanmış hücrelerin bulunduğu ortamda çabuk ve etkin düzenlemelere gidilebilir. Örneğin, ortama öncül maddeler, büyüme düzenleyicileri ve besin maddeleri çabucak ve kolaylıkla eklenebilir.
- 3) Daha çok biyokütle verimi elde edilebilir. Ayrıca ortama 'genç' hücrelerin ekimi ve 'yaşlı' hücrelerin çıkarılması ile sistemin 'gençleştirilmesi' sağlanabilir.
- 4) Tutuklamada hücreler besin ortamından matriksle ayrıldığı için salınan ürün kolaylıkla kültürden 'hasat' edilmektedir.
- 5) Sistemin sürekli ve kararlı doğası, oluşabilecek bazı biyokimyasal değişiklikleri ve yan ürün tepkimelerini ortadan kaldırmaktadır.
- 6) Büyüme ve ürün oluşumu arasında kesin bir ayırım yapılabilmektedir. Böylelikle ürün optimizasyonu büyümeyi engellememektedir. Örneğin, ikincil metabolit üretimini destekleyen fakat büyümeyi baskılayan bir büyüme düzenleyicisi ortama verildiğinde, zaten tutuklanmış ve büyümesi yavaşlamış (hatta bazen tamamen durmuş) hücrelerde büyümede olumsuz etkide bulunmamakta, buna karşılık metabolit üretiminde artışa yol açmaktadır.
- 7) Agregat oluşumu ve mekanik hasarlara duyarlılık gibi büyümeye bağlı olarak ortaya çıkan, bazı sorunlar tutuklanmış hücreleri etkilememektedir (Sökmen ve Gürel 2002).



Şekil 2. 1 Hücrelerin kalsiyum aljinatla tutuklanmasının şematik şekli (Sökmen ve Gürel 2002)

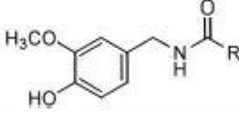
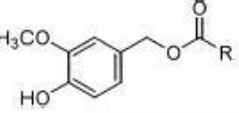
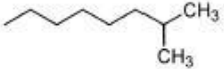
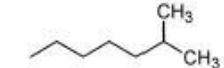
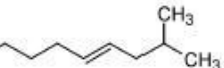
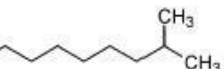
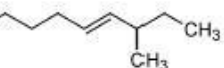
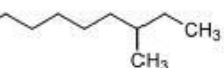
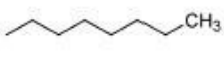
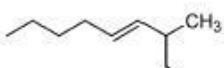
2.3 Kapsaisinoidler

Bibere acılığını veren maddenin ne olduğu her zaman merak konusu olmuştur. 1816 yılında Bucholtz, bibere acılık veren maddenin organik çözücüler aracılığı ile ayırt edilebileceğini söylemiştir. Tresh, 1876 yılında acı veren maddenin kristal yapısında olduğunu tespit ederek, adını "kapsaisin" koymuştur. Hogenes, 1878 yılında acı hissi veren bu maddeyi biberden ayırt etmeyi başarmış ve kapsaisinin ağız ve mide salgılarını artırdığını keşfetmiştir. 1930 yılında, Spath ve Darling, laboratuvarında kapsaisini sentezlemeyi başarmışlardır (Morrow 1999). Kosuge ve arkadaşları ince tabaka kromatografisinin (TLC) geliştirilmesi ile acılık uyarıcı özelliğe birbiriyle ilişkili iki komponent belirlemişler ve komponent karışımına “ kapsaisinoid” adını vermişlerdir (Kosuge vd. 1961, Poyrazoğlu vd. 2005).

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 (Díaz vd. 2004).

Birçok kapsaisinoid bileşiğinin karakteristik özelliği acı olmalarıdır; ancak α -hidroksikapsaisin gibi acı olmayan bileşikler de vardır. Bunlara ek olarak kapsinoidler olarak tanımlanan, kapsaisinoid benzeri maddeler de acı değildirler. Kapsinoidlerin alifatik yan zincirinin kimyasal yapısı kapsaisinoidlerin yapısındaki zincir ile aynıdır. Ancak moleküllerin yapısındaki aromatik kısım vanililamin yerine alkol türevi bir bileşiktir (Díaz vd. 2004).

İlk olarak bulunan kapsaisinoid bileşikleri, kapsaisin (8-metil-trans-enoik asitin vanililamid türevi), dihidrokapsaisin (8-metil-nonanoik asitin vanililamid türevi), nordihidro-kapsaisin I (9-metil-trans-7-enoik asitin vanililamide türevi ve homodihidro-kapsaisin (9-metil-dekanoik asitin vanililamid türevi) dir. Daha sonra birçok doğal kapsaisinoid bileşiği daha bulunmuştur : homodihidro-kapsaisin II, homokapsaisin II, oktanoik, nonanoik ve dekanoik asitlerin vanililamid türevleri, bishomokapsaisin, nordihidro-kapsaisin II, zukapsaisin (civamide), nonivamide ve ω -hidroksikapsaisin dir (Şekil 2.2).

Kapsaisinoidler		Kapsinoidler
		
R	Bileşik	Bileşik
	Kapsaisin	Kapsiat (*)
	Dihidro-kapsaisin	Dihidro-kapsiat (*)
	Nordihidro-kapsaisin	Nordihidro-kapsiat (*)
	Homokapsaisin	-----
	Homodihidro-kapsaisin	-----
	Homokapsaisin	-----
	Homodihidroksikapsaisin	-----
	Novinamid	-----
	ω Hidroksikapsaisin (*)	-----

* Acı olmayan bileşik

Şekil 2.2 Kapsaisinoid ve kapsinoidlerin yapısal dağılımları (Díaz vd. 2004)

Bu bileşikler arasında kapsaisin ve dihidrokapsaisin *Capsicum* türlerinde en çok rastlanan bileşiklerdir (Govindarajan vd. 1987, Perucka ve Materska 2001, Claver vd. 2006, 2007). Kapsaisinoid bileşiklerinin bitki dokularındaki toplam miktarı farklılıklar göstermekte ancak kapsaisin ve dihidrokapsaisin oranları, *C. annuum* türünde 77-90 % arasında, *C. frutescens* türünde ise 89-98 % arasında değişmektedir (Govindarajan vd. 1987).

Acı tat özelliği, kapsaisin bileşiği ve bu bileşiklerin analoglarının ağız ve nefes borusu hücrelerinde bulunan reseptörleri uyarması yoluyla algılanır. Besin endüstrisi yöntemleri arasında bu özelliğin belirlenmesi ve ölçümü için uzun zamandır kullanılmakta olan teknik, Scoville Organoleptik Testidir. Bu yöntem dahilinde beş bireyden oluşan bir grubun üyeleri, ölçüm yapılmak istenen biber örneklerini tadarak ve acı tat düzeyini kaydederek. Daha sonra örnekler acı tat özelliği kaybolana kadar seyreltilir. Anlaşılabileceği gibi yöntem kişilerin acı tadı algılama düzeyine bağlı olduğundan, göreceli sonuçlar vermesi gayet doğaldır. Analitik yöntemlerdeki hızlı gelişim sayesinde, birçok farklı yöntem tasarlanmış ve kapsaisinoid bileşiklerinin miktarlarının belirlenmesinde geleneksel yöntemlere göre daha objektif ve güvenilir sonuçlar veren teknikler geliştirilmiştir. Kapsaisinoid bileşiklerinin ayrıştırılması ve ölçümü için kullanılan Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Gaz Kromatografisi (GC) en çok tercih edilen yöntemlerdir (Díaz vd.1998).

Bitki hücrelerinde biriken kapsaisin moleküllerinin biyolojik önemi uzun süre tartışma konusu olmuştur. Yapılan bir çalışmada, Tewksbury ve Nabhan (2001), kapsaisin moleküllerinin ekolojik görevleri olduğu yönünde sonuçlar elde etmişlerdir. Güney Arizona'da yetişen acı biberlerin, özellikle bazı kuşlar için önemli besin kaynağı oluşturduğu yönünde veriler elde etmişlerdir. Laboratuvar şartları altında gerçekleştirilen deneyler sonucunda ise kaktüs farelerinin (*Peromyscus eremicus*), *Capsicum annuum* türüne ait acı biberleri yemeyi reddettiği ve onun yerine *Capsicum chacoense* türüne ait acı olmayan biberleri yemeyi tercih ettiği belirlenmiştir. Fareler ve kuşlar arasındaki bu beslenme farkı sindirim sistemi fizyolojisi farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Bu sonuçlarda dikkat edilmesi gereken bir başka nokta da, farelerin sindirim sisteminden geçen biber tohumlarının çimlenmediği, ancak

kuşlar tarafından sindirilen biberlerin tohumlarının çimlenme yeteneklerini kaybetmediğidir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre kuşlar yedikleri biberlerin tohumlarını sindirim sistemlerinde taşıyarak bu tohumların farklı ortamlara dağılımını sağlamakta ve bu şekilde taşınan tohumlar, çimlenme, büyüme ve gelişme fonksiyonlarını daha uygun ortamlarda sağlayabilme olanağı elde etmektedir. Bazı ortamlarda orada yetişen diğer bitkilerle daha sağlıklı büyüeyebilen biber tohumları, aynı zamanda böceklerin verdiği zararlardan da daha az etkilenmektedirler. Vanilloid reseptörlerindeki farklılıklardan dolayı bitki dokuları, hücrelerinde bulunan kapsaisinoid bileşiklerinden herhangi bir negatif etki görmemektedirler. Tüm bu etkenler biber tohumlarındaki kapsaisin bileşiğinin tohum dağılımına etkisini göstermekte ve bu dağılımı sağlamada memelilerin (fareler) önemli ölçüde bir etkisi olmadığını; ancak kuşların ise aktif olarak rol oynadığını göstermektedir (Díaz vd. 2004).

2.3.1 Kapsaisinoid bileşiklerinin özellikleri ve kullanım alanları

Kapsaisinoid 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). Kapsaisinoidlerin en belirgin özelliği acı olmalarıdır. Bu özellik, memelilerin kapsaisin ve vanilloidler olarak tanımlanan diğer bileşikleri algılama yeteneğinin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Kapsaisin reseptörü, Vanilloid Reseptörü-I (VRI) yapılan araştırmalar sonucu klonlanmıştır (Caterina vd. 1997). VRI reseptör proteini, hücrelerde seçiciliği olmayan katyon kanalı görevi yapmaktadır. Hücre zarı üzerinde bulunur, sıcaklık ve kapsaisinoid bileşikleri tarafından aktive edilerek sodyum ve kalsiyum iyonlarının hücre içine alımını artırır (Jordt vd. 2003). Acılığın memeliler tarafından bu şekilde algılanması bazı durumlarda nörojenik enfeksiyonlara ve inflamasyonlara neden olabilir. Ancak kapsaisinoid bileşiklerinin analjezik ve anti-inflamator etkileri olduğu da yapılan araştırmalar sonucu tespit edilmiştir (Díaz vd. 2004).

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 2002). Kapsaisin moleküllerinin anti-kanserojen aktivitesinin kontrollü hücre ölümünü (apoptosis) uyarıcı etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu aktivitenin, vanilloid reseptörleri aracılığı ile gerçekleştirilemeyeceği insan kan hücrelerinde yapılan çalışmalar sonucu tespit edilmiştir. Son zamanlarda yapılan araştırmalardan elde edilen veriler, kapsaisin moleküllerinin hücre ölümünü uyarıcı etkisinin, genellikle kapsaisin moleküllerinin mitokondriyel elektron taşıma sistemine etkisi sonucu, oksijene duyarlı moleküller aracılığı ile gerçekleştiğini belirlemiştir (Daz vd. 2004). Kapsaisinin prostat kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği ve prostat kanseri için etki mekanizmalarının bilinmesi gerektiğini belirtmişlerdir (Cazenave vd. 2009).

Kapsaisinoid bileşiklerinin antioksidan etkilerinin olduğu da belirlenmiştir. Büyük olasılıkla bu etkinin kapsaisinoid bileşiklerinin acılığı ile ilişkisi yoktur. Çünkü yapılan çalışmalarda acı ve acı olmayan biberlerin aynı antioksidan etkiyi gösterebildikleri belirlenmiştir (Rosa vd. 2002, Ochi vd. 2003). Kapsaisin molekülleri hem hücre zarı üzerinde hem de hücre içinde bulunan serbest radikalleri parçalayabilir (Kogure vd. 2002).

Ayrıca kapsaisinoid bileşiklerinin tarımda kullanımına yönelik de birçok çalışma yapılmıştır. Kapsaisinoid bileşikleri önemli ölçüde anti-mikrobik ve anti-fungal etkilere sahiptir (Govindarajan vd. 1987, Masood vd. 1994, Molina-Torres vd. 1999).

Ayrıca kapsaisinoid bileşiklerinin bitkilerde bulunan kitinaz gibi bazı enzimlerin aktivitelerini ve miktarını arttırarak bazı mantar zararlılarına karşı direnç geliştirilmesini sağladığı yönünde önemli veriler elde edilmiştir. Bitkilerin direnç kazanmasında kapsaisinoidlerin oynadığı rol, hastalıklara karşı geliştirilen direncin kapsaisinoid miktarı ve içeriği ile ilgili olmasına bağlanabilir (Suzuki ve Iwai 1984). Yapılan çalışmalarda kapsaisinoid bileşiklerinin böceklerin zararlı etkilerine karşı bir etkisi

gözlemlenmemiştir (Crombie 1999) ancak bazı alelo-kimyasal etkilerinin olduğu belirlenmiştir (Kato-Noguchi ve Tanaka 2003).

Biberin acılığından esas olarak sorumlu olan bileşik kapsaisin, bilinen en acı maddelerden biridir. On yedi milyonda birlik çözeltisi bile, insanda acı hissi uyandırır. Kimyevi açıdan çok güçlü bir alkaloid olan kapsaisin, soğuğa ve ısıya karşı dayanıklıdır, biberin pişirilmesi veya dondurulması sırasında aktivitesini kaybetmez. Kapsaisin aşırı miktarda alındığında zehirlenme özelliği olan bir maddedir. Ancak öldürücü tesirinin ortaya çıkması, çok yüksek miktarda alınmasına bağlıdır. Bir kişinin tüketebileceği biber miktarı, toksik tesirin çok altındadır. Kapsaisinin tahriş edici özelliğinden yararlanılarak hazırlanan bazı spreyler, çeşitli ülkelerde sokak ve park hayvanlarını insanlardan uzaklaştırmakta kullanılmaktadır (Morrow 1999).

Kapsaisin'in ağrı duyusuyla doğrudan ilişkisi olduğunu açıklığa kavuşturan çalışmalar (Tominaga ve Julius 2000, Catarina ve Julius 2001, Erdost 2004) yapılmıştır. Kapsaisin primer sensorik nöronlar aracılığı ile etkili olan ağrı kesici maddeler grubunda yer almaktadır. Bu nöronların duyarlılığı ortadan kaldırılarak posthepatik nöropati, diyabetik ve diğer nöropatik ağrılarda kullanılabilirliğinin sağlandığı bildirilmiştir (Blackwell 1990, Fusco ve Giocovazzo 1997, Yoshimura vd. 2000, Erdost 2004).

Ayrıca kapsaisinin sindirim sisteminde anti-mikrobia ve anti-kanserojen etkileri bildirilmektedir (Surh ve Lee 1996, Takahata vd. 1999, Erdost 2004). *Salmonella enteritis* ile enfekte kanatlılarda diyet ile verilen kapsaisinin iyileştirici etkisi olduğu gösterilmiştir (Tellez vd. 1993). Safra taşları oluşumunun önlenmesindeki olası etkisinin incelenmesi amacıyla hamster ve fare için hazırlanan diyetlere değişik konsantrasyonlarda kapsaisin ilavesi yapılmıştır. Araştırmada safra/kolesterol konsantrasyonu ile kolesterol/fosfolipid oranı belli dönemlerde değerlendirilerek, bu oranlarda belirgin şekilde azalma olduğu saptanmıştır. Bu durumda kapsaisin safra taşı oluşumunu önleyebilecek potansiyel bir ajan olarak bildirilmiştir (Hussain ve Chandrasekhara 1993).

2.3.2 Kapsaisinoid bileşiklerinin dokularda ve hücre içerisindeki yerleşimi

Kapsaisinoidlerin birikimi, bitkilerin tek bir organının belirli bir gelişim seviyesinde bulunması ile alakalıdır. Bu organ da meyvedir. Otha (1962), yaptığı histolojik ve histokimyasal analizler sonucu, kapsaisinoid sentezleyen organların biber türlerinde plasentada ve meyvelerin bazı bölümlerinde bulunduğunu belirlemiştir (Díaz vd. 2004). İşaretli fenil alanin moleküllerinin, kapsaisinoid bileşiklerinin yapısına katılma hızı, *C. annuum* türünün farklı organlarında yapılan analizlerle belirlenmiş ve karşılaştırmalar yapılmıştır. Sonuç olarak kapsaisinoid moleküllerinde, radyoaktivitenin en yüksek olduğu organın plasental doku olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, kapsaisinoid bileşiklerinin biyosentezinin plasenta içerisinde gerçekleştiğine işaret etmektedir. Daha sonra yapılan bir çalışmada Suzuki vd. (1980), plasenta dokusunun hücresel yapısını ışık mikroskobu kullanarak incelemiş ve gelişim sırasında plasenta yapısının epidermal dokusunda morfolojik değişimler olduğunu gözlemlemiştir. Ayrıca elektron mikroskobu kullanılarak, plasenta yapısının epidermal dokusunda bulunan keseciklerde yoğun granüller olduğu gözlemlenmiş ve bu granüllerin daha sonra kapsaisinoid sentezinde kullanıldığı belirlenmiştir (Díaz vd. 2004).

Kapsaisinoid biyosentezi için gerekli olan enzimlerin yerleşimi konusunda yapılan çalışmalarda plasenta yapısının kapsaisinoid sentezinin gerçekleştirildiği yer olduğuna işaret etmektedir. İmmüno-lokalizasyon tekniği kullanılarak yağ asiti sentezleyen enzim kompleksinin (FAS) bir bileşeni olan α -ketoaçıl sentaz (KAS), enziminin plasental yapının epidermal hücrelerinde bulunduğu belirlenmiştir (Aluru vd. 2003).

Kapsaisinoidlerin hücre içindeki yerleşiminin belirlenmesi için, Fujiwake vd. 1982, acı biber hücrelerinin plasental yapılarındaki protoplast hücrelerini izole ederek, Percoll yoğunluk farkı santrifügasyonu ve elektron mikroskobu analizi ile, kapsaisinoid bileşiklerinin bitki hücreleri içinde vakuollerde bulunduğunu tespit etmiştir. Bu bilimadamları daha sonraki çalışmalarında kapsaisin ve diğer kapsaisinoid bileşiklerinin biyosentezinde kullanılan enzimlerin ve ara metabolit moleküllerin hücre içinde dağılımını araştırmışlardır (Fujiwake vd. 1982).

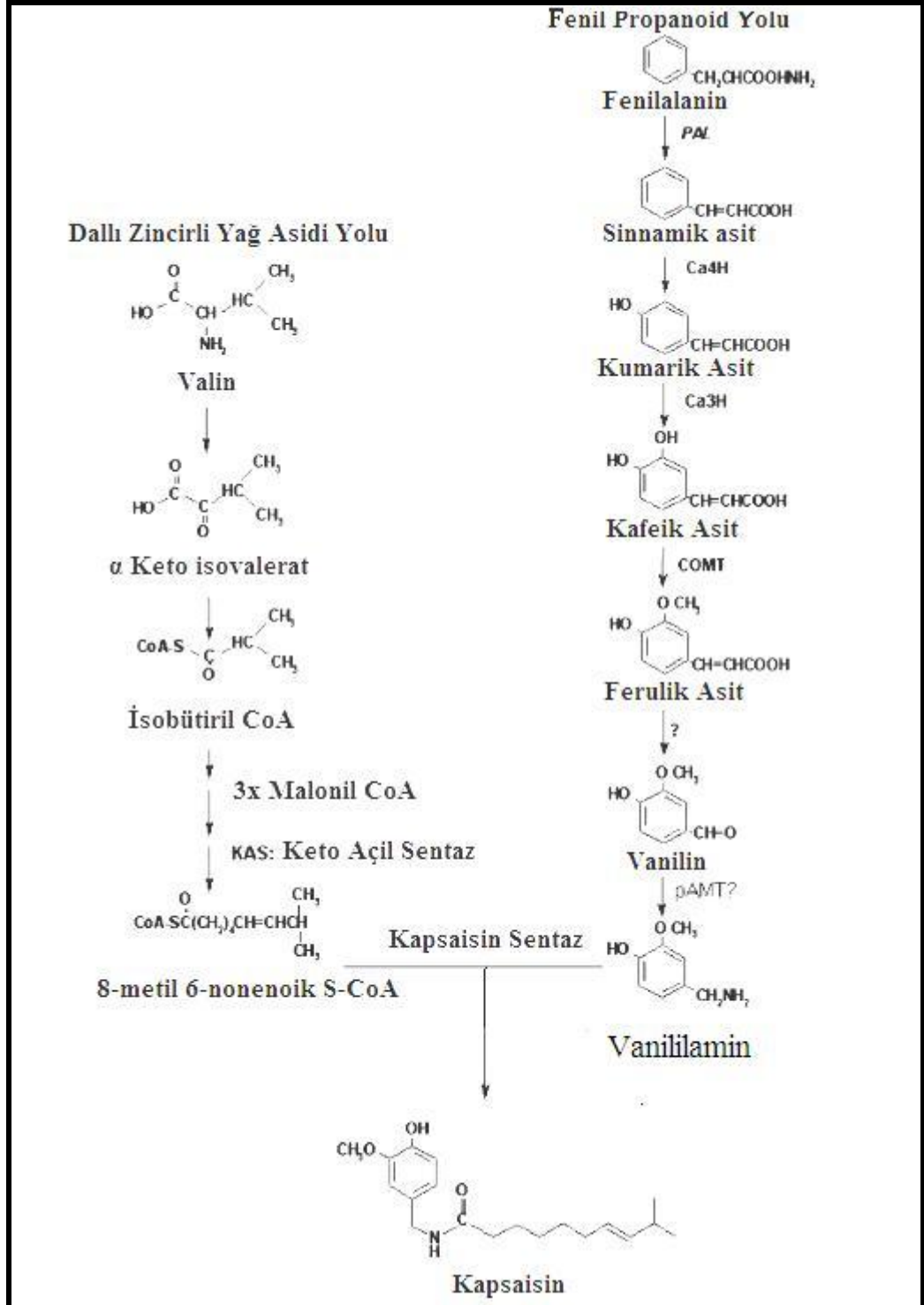
Zamski vd. (1987), kapsaisinoid sentezleyen hücrelerde, kapsaisinoid bileşiklerinin biyosentezini ve translokasyonunu araştırarak, kapsaisinoidlerin hücre içinde endoplasmik retikulum organeli içerisinde sentezlendiğini ve kesecikler aracılığı ile sitoplazmaya taşındığını belirlemiştir.

2.3.3 Kapsaisinoid biyosentezi

Kapsaisin, vanililamin ve 8-metil non-trans-6-enoik asit bileşiklerinin amid türevidir (Bennett ve Kirby 1968). Kapsaisin biyosentez mekanizması önemli ölçüde belirlenmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Kapsaisinoidlerin yapısında bulunan vanililamin kısmı, şikimat arogenat metabolik yolundan elde edilen fenilalanin'den, yağ asiti kısmı ise valin' den sentezlenmektedir. Vanililamin kısmının fenilpropanoid metabolik yolu aracılığı ile sentezlendiği düşünülmektedir. Bu düşünce yapılan bir çalışmada *Vanilla planifolia* 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).

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 (Curry vd. 1999, Kim vd. 2001). Kapsaisin biyosentez yolu şekil 2.3' de gösterilmektedir.



Şekil 2.3 Kapsaisin biyosentez yolu (Chayapathy vd. 2006)

Kapsaisinoid bileşiklerinin yapısındaki yağ asitlerinin valin moleküllerinden sentezlendiği Leete ve Louden (1968)'in işaretli kapsaisin metabolik öncüleri kullanarak yaptığı çalışmalar tarafından da desteklenmiştir (Diaz vd. 2004). Bu çalışmada valin- U^{14} -C bileşiğinin biber hücrelerine aktarılması ile radyoaktif kapsaisin ve dihidrokapsaisin moleküllerinin sentezlendiği gözlemlenmiştir. Elde edilen bu sonuç, aynı zamanda kapsaisin yapısında bulunan 10 karbonlu asit yapının izobütil koenzim-A ve 3 asetat biriminden sentezlendiği hipotezini de desteklemektedir. Açıl zincirinin uzaması 2 karbonlu yapıların birbirine eklenmesi ile sağlanmaktadır ve bu reaksiyon FAS kompleksi tarafından katalizlenmektedir. Bu kompleksi oluşturan enzimleri kodladığı düşünülen 3 gen yapılan araştırmalarla klonlanmıştır (Curry vd. 1999, Kim vd. 2001, Aluru vd. 2003). Bu üç genin β -ketoaçıl sentaz (KAS), Açıl taşıyıcı protein (ACL), ve thioesteraz (FAT) enzimlerini kodladığı belirlenmiştir. Bu genlerin ekspresyonu sadece plasenta yapısı içerisinde gerçekleşmektedir ve bu genlere karşılık gelen RNA'ların miktarları, bitki hücreleri içerisinde biriken kapsaisinoid miktarı ve bitkinin acılık düzeyi ile pozitif bir ilişki göstermektedir (Aluru vd. 2003).

Bu güne kadar yapılan çalışmalarda, belirlenmesi en zor olan konu kapsaisin sentaz enziminin yer aldığı metabolik yol dahilindeki reaksiyonların araştırılması olmuştur. Bu reaksiyonlar zincirinde kapsaisin sentaz enzimi, vanililamin ve yağ asiti moleküllerinin birleştirilmesini katalize eder. Kapsaisinoid sentezleyen enzimlerin aktivitelerinin ve substrat özgünlüğünün belirlenebilmesi için bir yöntem geliştirilmiş (Fujiwake vd. 1980) ve gelişen meyve hücrelerinde ve kallus kültürü hücrelerinde enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Ancak enzim saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmemiştir (Ochoa-Alejo ve Gomez-Peralta 1993). Yapılan bir çalışmada, biber hücrelerinin açıl transferaz enzimi (SB2-66)'nin cDNA klonu elde edilmiş ve bu genin kapsaisin sentaz enzimine karşılık geldiği önerilmiştir (Kim vd. 2001). SB2-66 geninin ekspresyonu acı biberlerde kapsaisinoid bileşiği birikiminin en yüksek düzeye ulaştığı zamanlarda gerçekleşmektedir ve tatlı biber hücrelerinde bu gen aktif değildir. Ayrıca bu gen acı biber hücrelerinde C-lokusuna bağlıdır (Yoo vd. 2003). Tüm bu nedenlerden dolayı bu genin kapsaisin sentaz enzimini kodlayan gen olduğu düşünülmektedir.

2.3.4 Kapsaisinoid metabolizması

Kapsaisinoidler, sentezlendikleri metabolik yolun son ürünleridirler ve sentezlendikten sonra herhangi bir metabolik dönüşüme uğramazlar (Holden vd. 1987). Ancak kapsaisinoid bileşikleri, özellikle meyve gelişimi ve olgunlaşması sırasında bir takım dönüşüm ve yıkım reaksiyonlarına uğramaları sonucu zarar görebilirler. Son zamanlarda kapsaisinoid metabolizmasının nasıl gerçekleştiğine yönelik yeni bilgiler elde edilmiştir. Meyve gelişiminin son aşamalarında, kapsaisinoid bileşiklerinin şeker ve diğer moleküllere katılması sonucu, elde edilen kapsaisin miktarının düştüğü belirlenmiştir. Konjugasyon reaksiyonları sayesinde bitkiler fenolik bileşikleri metabolizma tarafından ihtiyaç duyuluncaya kadar depolayıp saklayabilirler. Ancak *Capsicum annuum* L. türünün meyvelerinin analizi sonucunda az miktarda fenolik ve flavonoid bileşiğin şekerlerin yapısına katıldığı ve şeker yapımında kullanıldığı belirlenmiştir (Winter ve Herrmann 1986, Lorizzi vd. 2001, Materska vd. 2003). Ayrıca hücrelerdeki bütün vanililamin ve kapsaisinoid bileşiklerinin serbest formda olduğu belirlenmiştir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar arasında, kapsaisin moleküllerinin şeker yapımında kullanıldığını gösteren tek çalışma, Calva-Calva vd. (1995) tarafından yapılan çalışmadır ve burada tam olarak karakterizasyonu yapılamamış olsa da, kapsaisin moleküllerinin şeker sentezinde kullanılabildiği gösterilmiştir. Diğer taraftan kapsaisin moleküllerinin *Coffea arabica* hücrelerinin kültür ortamına eklendiğinde şeker sentezinde kullanıldığı gözlemlenmiş ancak aynı durum *Capsicum annuum* türünde olumsuz sonuç vermiştir (Kometani vd. 1993). Bu nedenle, kapsaisin glikolizasyonunun biber hücrelerinin fizyolojisine uygun olmadığı düşünülmektedir (Kirchbaum-Titze vd. 2002). Büyük olasılıkla biber hücrelerinde kapsaisinoidlerin oksidasyonunu sağlayan enzim ya da enzimler bulunmaktadır. Çalışmalardan elde edilen sonuçlar bu enzimin peroksidaz (EC.1.11.1.7) olduğuna işaret etmektedir (Díaz vd. 2004).

2.3.5 Kapsaisinoid bileşiklerinin birikiminin hormonlar tarafından düzenlenmesi

Bitkilerdeki gelişme ve büyüme olaylarının hormonlar tarafından düzenlendiği oldukça iyi bilinmektedir. Meyve olgunlaşmasında rol oynayan en önemli bitki hormonu

etilendir. Etilenin etkilerinin araştırılması için yapılan çalışmalarda ethephon (2-kloroetilfosforik asit) genellikle meyvelerin dış yüzeyine uygulanmaktadır. Ethephon, etilen açığa çıkaran ve tarımsal uygulamalarda meyvelerin olgunlaşmasının eş zamanlı gerçekleştirilmesini sağlamak amaçlı kullanılan bir bileşiktir. Meyvelerine düşük konsantrasyonlu ethephon uygulanan biber bitkilerinde, kırmızı renk seviyesinin ve acı özelliğinin arttığı belirlenmiştir (Krajayklang vd. 1999). Ancak, Perucka (1996), yaptığı çalışmada ethephon uygulanan biber bitkilerinin kontrol grubundaki bitkilere göre çok daha az seviyede kapsaisinoid sentezlediğini gözlemlemiştir. Kapsaisinoid sentezinde oluşan bu değişikliklerin, PAL enzimi aktivitesindeki değişimlere paralel olduğu da belirlenmiştir. Ethephon bileşiğinin PAL enziminin aktivitesini engelleyerek, kapsaisinoid sentezini de engellediği düşünülmektedir. Çalışmalardan elde edilen sonuçların birbirini tutmaması, etilenin kapsaisinoid sentezine etkilerinin doğru olarak anlaşılabilmesi için bu konu ile ilgili daha çok çalışma yapılması gerektiğine işaret etmektedir.

Kapsaisin sentezinin ve birikiminin hormonlar tarafından düzenlenmesi oldukça karmaşık reaksiyon zincirleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu konu ile ilgili olarak özellikle canlı bitkilerde ve onların meyvelerinde çalışmalar yapılması, hormonların kapsaisinoid sentezine ve birikimine etkilerinin belirlenmesi için katkılar sağlayacaktır.

2.3.6 Kapsaisinoid birikimi ve çevresel faktörler

Herhangi bir biber türünün kapsaisinoid sentezleyebilme ve biriktirme yeteneği baskın bir karakter olup C lokusu tarafından kontrol edilmektedir. Ancak çevresel etkenlere bağlı olarak da değişkenlik göstermektedir (Harvell ve Bosland 1997, Zewdie ve Bosland 2000). Meyvelerin bitki üzerindeki pozisyonu ve mevsimsel değişiklikler kapsaisinoid birikimini etkileyen önemli çevresel faktörlerdir (Estrada vd. 1999, Estrada vd. 2002). Çeşitli çevresel faktörler arasında sıcaklık ve ışığa maruz kalma zamanı en önemli etkenler olarak belirlenmiştir. Ancak su ve nem gibi bazı çevresel faktörler de kapsaisinoid miktarını önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Bunun nedeni de kapsaisinoid ve diğer fenilpropanoid biyosentez reaksiyonları arasında rekabet olmasıdır. Ayrıca

topraktaki minerallerin de kapsaisinoid sentezini arttırıcı etkileri olduğu belirlenmiştir (Estrada vd. 1988). Bu etkinin aşağıda sayılan nedenlerden dolayı olduğu düşünülmektedir:

1. Kapsaisin bileşiğinin oksidasyonu peroksidaz enzimi aktivitesi ile sağlanmaktadır.
2. Bu enzimatik aktivitenin gerçekleştirilmesi için peroksidaz enziminin hücre içinde doğru bölümde bulunması gerekmektedir.
3. Peroksidaz oksidasyonu sonucu oluşan ürünler meyve hücrelerinde birikmektedir.

Ancak peroksidaz enzimi tarafından katalizlenen oksidasyon reaksiyonlarının yanı sıra, bitki hücrelerinde diğer katabolik reaksiyon mekanizmalarının da olduğu bilinmektedir. Kapsaisin oksidasyonu polifenol oksidaz enzimleri tarafından da gerçekleştirilebilir. Ayrıca bitkiler dışında diğer canlılarda da; hayvanlarda ve mikroorganizmalarda kapsaisin metabolizması oksidasyon reaksiyonları dışında lipaz enzimleri tarafından parçalanma gibi metabolik reaksiyonları da içerir. Bu mekanizmaların biber türlerinde de olup olmadığı henüz tespit edilmemiştir. Bu güne kadar yapılan araştırmalar kapsaisin miktarını düzenleyen; biyosentez, konjugasyon ve katabolizma metabolik yollarından sadece biri üzerinde odaklanmıştır. Bu nedenle her üçünün birlikte çalışıldığı bir araştırma yapılmamıştır. Yöntemlerin ve analitik tekniklerin gelişmesi, gelişen meyvelerin hücrelerinde kapsaisinoid sentezi ve yıkımını sağlayan enzimlerin bir arada çalışılabilmesini kolaylaştırmış ve bu enzimlerin aktivitelerinin hücrelerde bulunan serbest ve konjuge kapsaisinoid miktarı ile ilişkilendirilmesini mümkün kılmıştır.

2.4 Kapsaisin Elde Edilmesi İle İlgili 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 yapılmıştır. Büyüme ortamında kültürü yapılan hücrelerden elde edilen ortalama kapsaisin miktarı $1,397 \pm 0.136$ mg k.a. ve minimum ortamda kültürü yapılan hücrelerden elde edilen kapsaisin miktarı ise $2,636 \pm 0.298$ 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 ikincil metabolik 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

molekölün 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 kurdan 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 arttırmışlardır. 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, kurdan ve ksantan'ın kapsaisin üretimi üzerine uyarma kapasitesi ve sodyum aljinatın etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre kapsaisin üretimi tutuklanmış hücrelerde kurdan ve ksantan kullanımında kontrole göre sırasıyla 1,8 ile 2 kat daha fazla artmıştır. Kurdan 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 (kurdan) 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 µg miktarında kapsaisin elde edilmiştir. Tutuklanmış hücrelerde kapsaisin üretimi 3 µg/g dan 28. günde 47 µg' a çıkmıştır. Tutuklanmış hücre sisteminde kapsaisin sentezinde kurdan daha etkili bulunmuştur ve kontrol ile karşılaştırıldığında sentez yaklaşık iki kat artmıştır Tutuklanmış hücreler, plasental dokulara göre kurdan etkisine daha etkili cevap vermişlerdir. Her iki fungal türün miselar ekstraktları 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 fikosiyaniini 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 modulatorleri 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 (MeJa) ayrı ayrı ve birlikte *Capsicum frutescens* hücrelerinin süspansiyon kültürlerine uygulanmışlar ve her iki bileşiğin de kültür hücrelerinde kapsaisin sentezini ve birikimini arttırdığı belirlenmiştir. 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.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

Araştırma 2005-2009 yılları arasında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Fizyolojisi Laboratuvarı ve Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1 Materyal

3.1.1 Bitkisel materyal

Tez çalışmasında kullanılacak olan biber (*Capsicum annuum* L.) (Kahramanmaraş-Hat 187) tohumları Kahramanmaraş Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir.

3.1.2 Kapsaisin sentezini uyarmak için kullanılan uyarıcılar

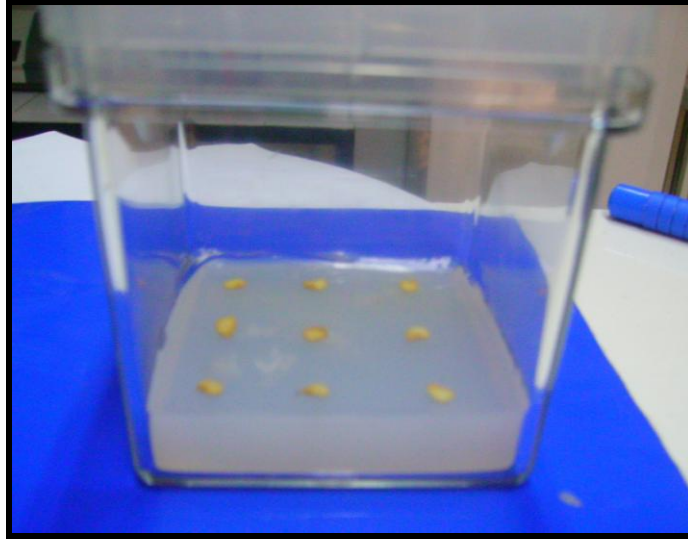
Kapsaisin sentezini uyarmak için kullanılan uyarıcılar, selüloz (C9422), salisilik asit (S7401), metil jasmonat (392707), ksantan (G1253) ve kurdan (C7821), Sigma (Aldrich) firmasından temin edilmiştir.

3.2 Yöntem

Tohumların ekimi, kallus kültürlerinin, hücre süspansiyonlarının ve uyarıcıların uygulanması ile ilgili tüm steril çalışmalar Nuair marka class II steril kabinde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan cam ve metal malzemeler Nüve marka etüvde 175 °C' de 2 saat, besiyeri ve sıvı ortamlar otoklavda 121 °C' de 20 dk steril edilerek kullanılmıştır.

3.2.1 Tohumların yüzeysel sterilizasyonu

Çalışmada kullanılacak olan biber tohumları ekim öncesinde yüzeysel sterilizasyona tabi tutulmuştur. Biber tohumları kapaklı cam bir kavanoza konularak üzerine % 70' lik etil alkol ilave edilmiş ve 3 dk bekletilmiştir. Etil alkol steril kabinde süzülerek, % 5,25' lik 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 süzölmüştür. İçerisinde yaklaşık 50'şer ml steril agarlı besi ortamı konulan magenta kaplarının her birinin içine dış yüzeyi steril edilmiş biber tohumlarından 9 adet yerleştirilmiştir (Şekil 3.1). Ekim yapılmış magentaların kapakları kapatılmış ve üzerlerine streç film sarılmıştır (Ellialtıoğlu vd. 1998).



Şekil 3.1 Biber tohumlarının steril besi ortamına ekimi

3.2.2 Tohum çimlendirme ortamı bileşimi ve hazırlanması

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

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

Bileşenler	MS Ortamı, mg/L
Makro bileşenler	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
NaFeEDTA	36,7
Mikro Bileşenler	
MnSO ₄ .2H ₂ O	16
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	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 (Şekil 3.2) tamamladıktan sonra eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Steril kabin içinde her bir fideden hipokotil eksplantı kesilmiştir. Öncelikle kökboğazından 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 Digitech marka 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

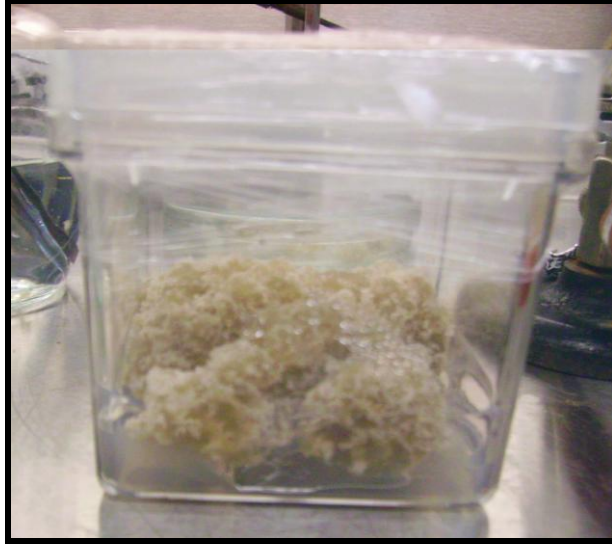
edilmiş MS besin ortamına transfer edilmiştir. Magenta kutularındaki kallus dokuları yine aynı fotoperiyodik düzende iklim odasında geliştirilmiştir (Şekil 3.3-3.4).



Şekil 3.2 Kahramanmaraş-Hat 187 Biber tohumunun ekimden 4 hafta sonraki gelişimi



Şekil 3.3 Hipokotil eksplantından gelişen kallus dokusunun agarlı besiyerinde görünümü



Şekil 3.4 Alt kültürde çoğalan kallus dokusu

3.2.4 Hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulması

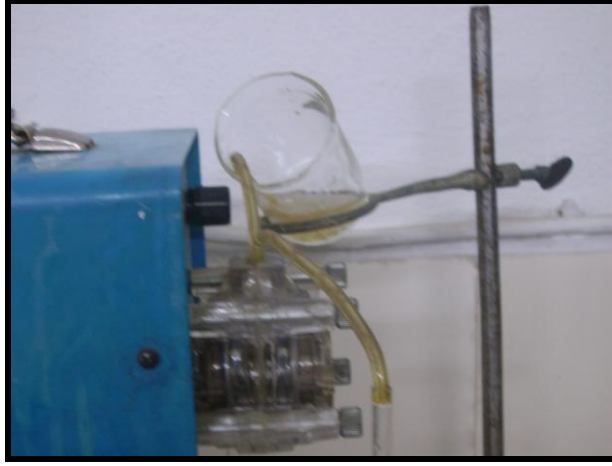
Kallus oluşumu için kullanılan 1.0 mg/L 2,4-D ile 0,1 mg/L kinetin ve % 3 sakkaroz ilave edilmiş MS besin ortamı süspansiyon kültüründe de kullanılmış, sadece ortama agar ilavesi yapılmamıştır. Kallus dokuları steril kabin içerisine yerleştirilen ve % 70'lik alkole batırılmış pamukla silinen hassas terazide 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 $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ dereceye ayarlanmış çalkalayıcı üzerine yerleştirilmişlerdir (Şekil 3.5). Çalkalayıcının hızı 110 devir/dakika olacak şekilde ayarlanmıştır (Ellialtıoğlu vd. 1998).



Şekil 3.5 Çalkalayıcı üzerindeki hücre süspansiyon kültürleri

3.2.5 Tutuklama işlemleri

Tutuklama işlemi için pH' sı 2 olan % 70'lik etil alkol ile steril edilen ve peristaltik pompa ucuna yerleştirilen steril bir pipet kullanıldı (Şekil 3.6). Hücre süspansiyon kültürleri bir ay süreyle 110 rpm'de geliştirildi. Hücre süspansiyon kültürleri filtrasyonla besiyerinden ayrıldı. 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 edildi. Tutuklama işleminde 1 gr hücre kullanıldı (Johnson vd. 1991). 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 peristaltik bir pompa ucuna takılan steril bir pipet yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerindeki beher içinde 20 ml'lik kalsiyum klorür içerisine damlatılarak hücreleri içeren 3,5-4 mm çapında boncuklar elde edilmiştir (Şekil 3.6-3.7). Tüm bu işlemler steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.6 Kalsiyum klorür içerisinde tutuklanmış hücrelerin oluşumu



Şekil 3.7 MS besiyeri ortamında tutuklanmış hücreler

3.3 Uyarıcı uygulamaları ve analiz için örneklerin hazırlanması

Bir ay boyunca geliştirilen hücre süspansiyon kültürleri taze besiyeri ortamına alındıktan sonra uyarıcı uygulamaları yapılmıştır. Uyarıcı olarak selüloz, salisilik asit, metil jasmonat, ksantan ve kurdan 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 konsantrasyonları şeklinde, selüloz (5, 10, 15 ve 30 µg/ml), salisilik asit (100, 200, 250 ve 300 µM/ml), metil jasmonat (0.04, 0.06, 0.08 ve 0.1 µM/ml), ksantan (0.1, 0.2, 0.25 ve 0.3 mg/ml) ve kurdan (0.1, 0.2, 0.25 ve 0.3 mg/ml) uyarıcıları steril mikropipet yardımıyla 1 ml olarak ilave edilmiştir. Kontrol örnekleri için steril saf su kullanılmıştır.

Uyarıcı uygulamalarının ardından yine çalkalayıcılar üzerine yerleştirilen serbest ve tutuklanmış süspansiyon kültürleri selüloz için 24, 48 ve 72. saatte, diğer uyarıcılar için 10, 12 ve 14. gün sonra hücre ve süzöntüsünün birbirinden ayrılması için whatman no :2 filtre kağıdı üzerinde buhner hunisi vakum pompası yardımıyla vakumla süzme işlemine tabi tutulmuş, doku ve süzöntü kısımları birbirinden ayrılmıştır. Süzme işleminin sonunda kallus yaş ağırlığı (g) ölçülmüş, süzöntü kısmı 100 ml'lik plastik şişelerde, kallus dokusu ise ağzı kilitlenen küçük plastik poşetlere konularak analiz yapılncaya dek -70°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 süpernatantlar toplanmıştır (Johnson vd. 1990).

Toplanan süpernatant bir döner buharlaştırıcı balonuna doldurularak 55°C sıcaklıkta, 180 devir/dakika hızda ve düşük basınç altında etil asetat kısmı, 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 süpernatant alınarak bir döner buharlaştırıcı balonuna doldurulmuştur (Johnson vd. 1990). Döner buharlaştırıcıda 55°C sıcaklıkta, 180 devir/dakika hızda ve düşük basınç altında etil asetat kısmı kuruluğa yakın olacak şekilde buharlaşmaya kadar ekstrakte edilmiştir. Kalan tortu kısmı 1 ml etil asetat ile çözülmüş ve örnekler analiz edilinceye kadar -70 C’de derin dondurucuda bekletilmiştir.

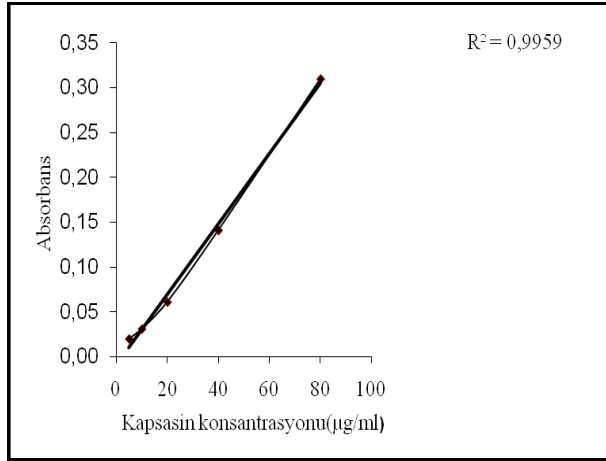
3.5 Kapsaisin Analizi

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, 1979).

3.5.1 Kapsaisin standartının hazırlanması

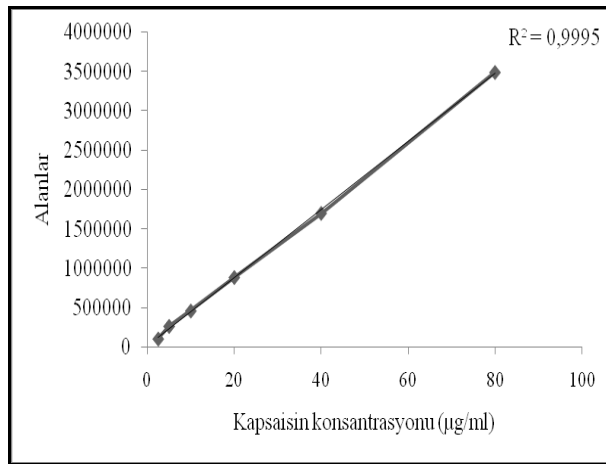
Kapsaisin standartı olan N-Vanillynonanamide, Sigma (V-9130)’ dan temin edilmiştir. Spektrofotometrede ölçüm için, kapsaisinin 50 ml 100 µg/ml’lik stok standart çözeltisi etil asetat ile hazırlanmıştır. Daha sonra bu stok çözeltiden sırasıyla 5, 10, 20, 40, 80 ve 100 µg/ml’lik standart çözeltiler hazırlanmıştır. Bu standart çözeltilerden 0,2 ml alınarak üzerine 1 ml etil asetat ilave edilmiştir. Spektrofotometrede ölçüm yapmadan önce 0,1 ml % 1’lik Vanadyum oksit triklorit (VOCl₃) ilave edilmiştir. Renk kaybını engellemek için VOCl₃ ilave edildikten sonra ölçüm işlemi hızlı bir şekilde yapılmıştır.

Kapsaisin standartlarının ölçüm işlemleri spektrofotometrede 720 nm’de (Cecil 5000) 5 tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür. Ölçüm işlemi sonunda elde edilen standart grafik şekil 3.8’ de görülmektedir.



Şekil 3 8 Spektrofotometrede ölçüm için kapsaisin standartı ile çizilen grafik

HPLC cihazında ölçüm için, kapsaisinin 50 ml 100 µg/ml’lik stok standart çözeltisi metanol ile hazırlanmıştır. Daha sonra bu stok çözeltiden sırasıyla 5, 10, 20, 40, 80 ve 100 µg/ml’ lik standart çözelti hazırlanmıştır. HPLC analizlerinden önce standart çözelti 0,45 µm’ lik filtrelerden geçirilmiştir. Ölçüm işlemi sonunda elde edilen standart grafik şekil 3.9’da görülmektedir (EK 1-EK 6)



Şekil 3.9 HPLC yöntemi 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 $0,45\ \mu\text{m}$ ' lik filtrelerden geçirilmiştir. Analiz işlemleri Spectrasystem HPLC cihazında gerçekleştirilmiştir. Kromatografi koşulları aşağıdaki gibidir;

Dedektör : UV6000 LP UV

Dalga boyu :280 nm

Kolon : Luna C18 (150 mm x 4,56 mm), $5\ \mu\text{m}$ por çapı

Akış hızı : 1ml/dk

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

Enjeksiyon hacmi : $10\ \mu\text{l}$

3.6 İstatistiksel Analizler

Tez çalışmasında bütün deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Üzerinde durulan özellikler bakımından elde edilen sonuçlar, SPSS 15.0 paket programı kullanılarak faktöriyel düzende tekrarlanan ölçümlü varyans analizi tekniği ile değerlendirilmiştir. Burada yöntem faktörünün serbest ve tutuklanmış olmak üzere iki seviyesi, konsantrasyon faktörünün kontrol ve diğer dört uyarıcı konsantrasyonu olmak üzere beş seviyesi, zaman faktörünün selülazda 24, 48 ve 72. saat olarak üç seviyesi, diğer özelliklerde 10, 12 ve 14. gün olmak üzere 3 seviyesi mevcuttur. Tekrarlanan ölçümler zaman faktörünün seviyelerini göstermiştir. Farklı grupların saptanması Mstat paket programında Duncan çoklu karşılaştırma yöntemi kullanılarak belirlenmiştir

4. BULGULAR

Capsicum annuum L. (Kahramanmaraş-Hat 187) (*C. annuum* KM-187) fidelerinden alınan hipokotil eksplantlarından kallus kültürleri elde edildikten sonra, serbest ve kalsiyum aljinat ile tutuklanmış hücre süspansiyonlarında farklı uyarıcıların (selülaz, salisilik asit, metil jasmonat, ksantan, kurdan) değişik konsantrasyonlarının, değişen zamanlarda (selülaz için 24, 48 ve 72. saatte, diğer uyarıcılar için 10, 12 ve 14. günler) hücre ve süzüntülerinde biriken kapsaisin miktarları incelenmiş ve hücre ve süzüntülerdeki kapsaisin miktarlarının toplamaları sonucu elde edilen toplam kapsaisin miktarı (Ochoa-Alejo 2005) (Ek 7) verileri istatistiksel olarak faktöriyel analiz tekniği yöntemine göre karşılaştırılmıştır. Selülaz için kısa zaman periyotlarının seçilmesi bu enzimin daha uzun zaman periyotlarında hücre çeperlerini parçalayıp hücrelere zarar verebilmesi nedeniyledir.

4.1 Serbest ve Tutuklanmış Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Kapsaisin Birikimine Selülaz Uygulamasının Etkisi

C. annuum L. (KM-187) serbest ve tutuklanmış hücre süspansiyon kültürlerine selülaz uyarıcısı 5, 10, 15 ve 30 µg/ml olacak şekilde ilave edildikten sonra 24, 48 ve 72. saatlerde alınan serbest ve tutuklanmış hücre süspansiyon örneklerinde belirlenen kapsaisin miktarları çizelge 4.1-4.3'de gösterilmektedir. Varyans analizi tekniğine ilişkin hesaplamalardan sonra zaman x konsantrasyon x yöntem interaksyonu istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,01$). Farklı konsantrasyonlarda selülaz uygulanmış serbest ve tutuklanmış hücrelerdeki, serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerindeki ve serbest ve tutuklanmış hücrelerdeki toplam kapsaisin miktarlarının Duncan testi sonuçları ilgili ortalamalarının yanında harfli gösterim yaklaşımıyla belirtilmiştir (Çizelge 4.1-4.3).

4.1.1 Serbest ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin birikimine selüla uygulamasının etkisi

Serbest hücrelerde 24. saatte kapsaisin miktarlarının değışimi 41,66-154,03 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1). Kapsaisin miktarında en fazla değışim 30 µg/ml selüla uygulamasında belirlenmiştir (p<0,01). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında selüla konsantrasyonu arttıkça kapsaisin miktarı da artmaktadır. Ancak 10 µg/ml ve 15 µg/ml selüla uyarıcı konsantrasyonları arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.1 Farklı konsantrasyonlarda selüla uygulamalarının, *Capsicum annum* L.(KM-187)'un serbest ve tutuklanmış hücrelerinde kapsaisin miktarına değışen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3).

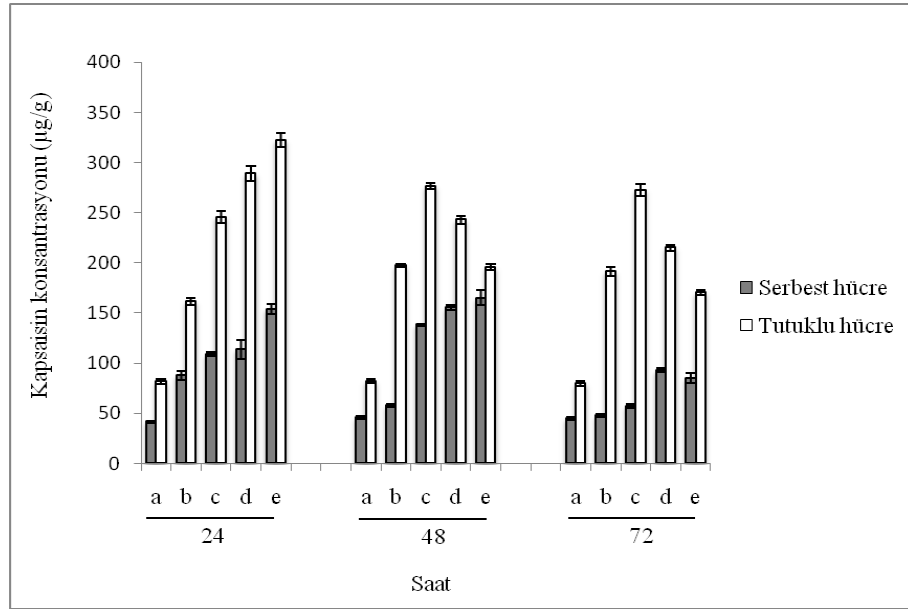
Zaman (saat)	Uygulama konsantrasyonu	Kapsaisin (µg/g) t.a.			
		Serbest hücre		Tutuklanmış hücre	
24	Kontrol	41,66 ± 0,61	Ad2	81,59 ± 1,20	Ae1
	5 µg/ml selüla	87,54 ± 2,72	Ac2	161,66 ± 1,97	Bd1
	10 µg/ml selüla	108,80 ± 1,09	Bb2	245,93 ± 3,30	Bc1
	15 µg/ml selüla	113,64 ± 5,28	Bb2	288,84 ± 4,37	Ab1
	30 µg/ml selüla	154,03 ± 2,63	Aa2	322,52 ± 4,05	Aa1
48	Kontrol	45,77 ± 0,64	Ac2	82,02 ± 1,28	Ae1
	5 µg/ml selüla	57,82 ± 0,84	Bc2	197,31 ± 1,10	Ac1
	10 µg/ml selüla	138,42 ± 0,53	Ab2	276,64 ± 1,79	Aa1
	15 µg/ml selüla	155,58 ± 1,61	Aab2	242,97 ± 2,33	Bb1
	30 µg/ml selüla	165,14 ± 4,30	Aa2	175,50 ± 1,69	Bd1
72	Kontrol	44,84 ± 0,67	Ab2	79,53 ± 1,48	Be1
	5 µg/ml selüla	47,55 ± 0,80	Bb2	191,43 ± 2,49	Ac1
	10 µg/ml selüla	57,35 ± 1,03	Cb2	272,84 ± 3,38	Aa1
	15 µg/ml selüla	92,77 ± 1,18	Ca2	215,06 ± 1,84	Cb1
	30 µg/ml selüla	85,13 ± 2,69	Ba2	170,24 ± 1,30	Bd1

Büyük harfler : Dikey sütunda aynı uyarıcı konsantrasyonlarının farklı zamanlarda Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Küçük harfler : Dikey sütunda aynı uyarım zamanında uyarıcı konsantrasyonlarının Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Rakamlar : Yatay sütunda yöntemlerin Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Tutuklanmış hücrelerde 24. saatte kapsaisin miktarının değişimi 81,59-322,52 µg/g t.a. olarak bulunmuştur. Kapsaisin miktarında en fazla artış 30 µg/ml selülaaz uygulamasında belirlenmiştir ($p<0,01$). Selülaaz konsantrasyonu arttıkça kapsaisin miktarı da artmaktadır. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında selülaazın farklı konsantrasyonlarının kapsaisin miktarları üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli ($p<0,01$) bulunmuştur.



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

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

Selülaaz uygulaması sonucu 24. saatte tutuklanmış hücrelerdeki kapsaisin miktarı ile serbest hücrelerdeki kapsaisin miktarları karşılaştırıldığında, tutuklanmış hücrelerdeki kapsaisin miktarı, serbest hücrelerdeki kapsaisin miktarının yaklaşık iki katı olarak belirlenmiştir. Aradaki bu fark istatistiksel olarak da önemli ($p<0,01$) bulunmuştur.

Serbest hücrelerde 48. saatte kapsaisin miktarının değişimi 45,77- 165,14 µg/g t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). En fazla kapsaisin birikimi 30 µg/ml selülaaz uygulamasında bulunmuştur. Ancak bu değer 15 µg/ml selülaaz uygulamasında belirlenen kapsaisin miktarından istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. 5 µg/ml selülaaz uygulaması

haricinde diğ er uygulama konsantrasyonlarında kontrol örneklerine göre daha fazla kapsaisin birikiminin olduğu tespit edilmiştir. Bu farklar istatiksel anlamda $p<0,01$ oranında önemli bulunmuştur.

Tutuklanmış hücrelerdeki 48. saatte kapsaisin miktarının değişimi 82,02-276,64 $\mu\text{g/g}$ t.a. olarak bulunmuştur ( izelge 4.1). En fazla kapsaisin miktarı 10 $\mu\text{g/ml}$ sel l z uygulamasında belirlenmiştir ( izelge 4.1, şekil 4.1). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında uygulama konsantrasyonları arasındaki farklar istatiksel olarak önemlidir ($p<0,01$). Uyarıcı konsantrasyon artışı ile kapsaisin miktarındaki artış arasında bir paralellik yoktur.

Serbest hücrelerde 72. saatte kapsaisin miktarının değişimi 44,84-92,77 $\mu\text{g/g}$ t.a. olarak belirlenmiştir ( izelge 4.1). En yüksek kapsaisin miktarı 15 $\mu\text{g/ml}$ sel l z uygulamasında belirlenmiştir ($p<0,01$). Kontrol ile 5 ve 10 $\mu\text{g/ml}$ sel l z konsantrasyonları arasındaki farklar önemli değilken, 15 ve 30 $\mu\text{g/ml}$ sel l z konsantrasyonunda ise kapsaisin miktarında artma bulunmuştur ($p<0,01$).

Tutuklanmış hücrelerde 72. saatte kapsaisin miktarının değişimi 79,53-272,84 $\mu\text{g/g}$ t.a. olarak bulunmuştur ( izelge 4.1). Tutuklanmış hücrelerde en yüksek kapsaisin miktarı 10 $\mu\text{g/ml}$ sel l z uygulamasında belirlenmiştir ($p<0,01$). Uyarıcı konsantrasyonları arasındaki farklar istatiksel anlamda $p<0,01$ oranında önemlidir ( izelge 4.1).

Serbest hücrelerde kontrol gruplarında değişen zamanlarda meydana gelen kapsaisin miktarları karşılaştırıldığında ortalamalar arası farklar istatiksel olarak önemli değildir. Sel l zın 10 ve 15 $\mu\text{g/ml}$ uygulama konsantrasyonunda zamanla değişen kapsaisin miktarları arasındaki farklar $p<0,01$ oranında önemlidir. Sel l zın 30 $\mu\text{g/ml}$ uygulama konsantrasyonunda 24. ve 48. saatte kontrole göre kapsaisin miktarları yaklaşık 3 kat fazla belirlenmiştir. 72. saatte kapsaisin miktarında kontrole göre yarı yarıya azalma belirlenmiştir. Bu azalma istatiksel olarak ($p<0,01$)  nemli bulunmuştur. Sel l zın 5 $\mu\text{g/ml}$ uygulama konsantrasyonunda 48 ve 72. saatte belirlenen kapsaisin miktarları arasındaki fark önemli bulunmamıştır ( izelge 4.1, şekil 4.1).

Tutuklanmış hücrelerde kontrol gruplarında değişen zamanlarda meydana gelen kapsaisin miktarları Duncan testine göre karşılaştırıldığında 72. saatte kapsaisin miktarındaki azalma önemli bulunmuştur ($p<0,01$). Tutuklanmış hücrelerde selülağın 15 µg/ml uygulama konsantrasyonunda zamanla değişen kapsaisin miktarları arasındaki farklar istatistiksel anlamda $p<0,01$ oranında önemlidir. Selülağın 5-10 µg/ml uygulama konsantrasyonunda 48 ve 72. saatte kapsaisin miktarı, 24. saate göre artmıştır. Bu artış istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,01$). Selülağın 30 µg/ml uygulama konsantrasyonunda 48 ve 72. saatte kapsaisin miktarı 24. saate göre azalmıştır. Bu azalma istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,01$).

4.1.2 Serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde kapsaisin birikimine selülağın etkisi

Serbest hücrelerin süzüntüsünde 24. saatte kapsaisin miktarının değişimi 32,21-89,27 µg/g t.a. olarak bulunmuştur. Selülağ uygulamasının serbest hücrelerin süzüntüsüne etkisi 24. saatte incelendiğinde, uyarıcı konsantrasyonunun artışı ile süzüntüye geçen kapsaisin miktarının da arttığı belirlenmiştir. Bu artış istatistiksel anlamda $p<0,01$ oranında önemlidir. En yüksek kapsaisin miktarı en yüksek uyarıcı konsantrasyonu olan 30 µg/ml selülağ uygulamasında bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Tutuklanmış hücrelerin süzüntüsünde 24. saatte kapsaisin miktarının değişimi 37,29-41,19 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2). Kontrol ile karşılaştırıldığında tutuklanmış hücrelerde 24. saatte selülağ uygulaması sonucu süzüntüye geçen kapsaisin miktarında artış bulunmuştur. Bu artış istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,01$). Uygulanan selülağ konsantrasyonlarının kapsaisin birikimine etkisi istatistiksel anlamda önemli değildir.

Selülağ uygulaması sonucu 24. saatte serbest hücrelerin süzüntüsündeki kapsaisin miktarı ile tutuklanmış hücrelerin süzüntüsündeki kapsaisin miktarları karşılaştırıldığında, serbest hücrelerin süzüntüsündeki kapsaisin miktarı daha fazla bulunmuştur ($p<0,01$). 30 µg/ml selülağ uygulandığında serbest hücrelerin süzüntüsünde aradaki bu fark yaklaşık iki kat daha fazladır (Çizelge 4.2, Şekil 4.2).

Çizelge 4.2 Farklı konsantrasyonlarda selüloz uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(KM-187) serbest ve tutuklanmış hücrelerinin süzüntülerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)

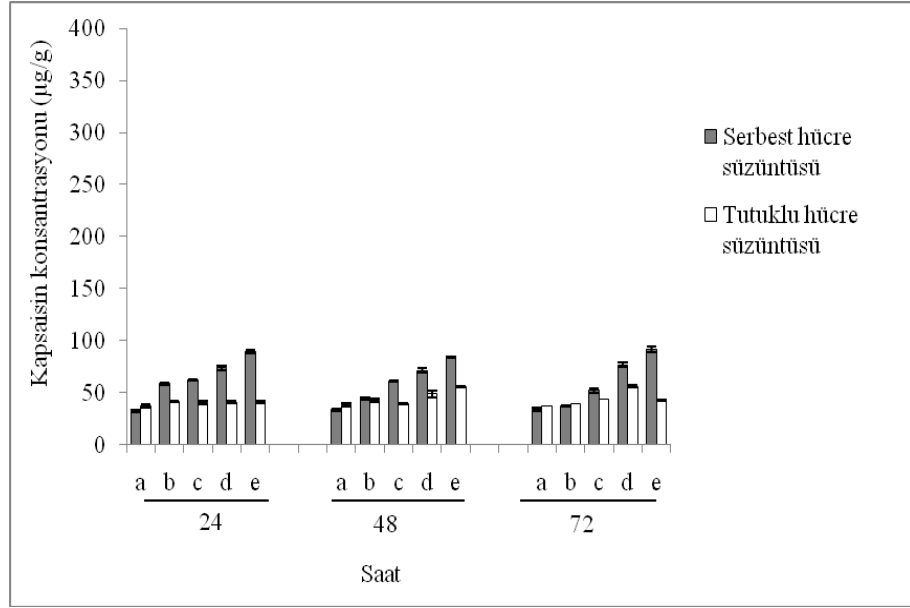
Zaman (saat)	Uygulama konsantrasyonu	Kapsaisin (µg/g) t.a.			
		Serbest hücre süzüntüsü			Tutuklanmış hücre süzüntüsü
24	Kontrol	32,21	± 0,82	Ae2	37,29 ± 0,85 Ab1
	5 µg/ml selüloz	58,50	± 0,62	Ad1	41,19 ± 0,20 Ba2
	10 µg/ml selüloz	61,94	± 0,39	Ac1	40,26 ± 0,82 Ba2
	15 µg/ml selüloz	73,53	± 1,51	Bb1	40,55 ± 0,47 Ca2
	30 µg/ml selüloz	89,27	± 0,67	Aa1	40,39 ± 0,71 Ba2
48	Kontrol	33,40	± 0,51	Ae2	37,69 ± 1,04 Ad1
	5 µg/ml selüloz	44,32	± 0,51	Bd1	42,51 ± 0,79 Ac1
	10 µg/ml selüloz	61,16	± 0,46	Ab1	39,00 ± 0,46 Bd2
	15 µg/ml selüloz	71,19	± 1,20	Bc1	48,54 ± 2,00 Bb2
	30 µg/ml selüloz	84,00	± 0,41	Ba1	55,17 ± 0,28 Aa2
72	Kontrol	33,69	± 0,71	Ae2	36,66 ± 0,17 Ad1
	5 µg/ml selüloz	37,22	± 0,47	Cd1	39,22 ± 0,01 Bc1
	10 µg/ml selüloz	52,09	± 1,25	Bc1	43,92 ± 0,17 Ab2
	15 µg/ml selüloz	76,35	± 1,23	Ab1	55,99 ± 0,45 Aa2
	30 µg/ml selüloz	91,27	± 1,53	Aa1	42,42 ± 0,36 Bb2

Büyük harfler : Dikey sütunda aynı uyarıcı konsantrasyonlarının farklı zamanlarda Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Küçük harfler : Dikey sütunda aynı uyarım zamanında uyarıcı konsantrasyonlarının Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Rakamlar : Yatay sütunda yöntemlerin Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Serbest hücrelerin süzüntülerinde 48. saatte kapsaisin miktarının değişimi 33,40-84,00 µg/g t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Selüloz uygulaması sonucu süzüntüye geçen en yüksek kapsaisin miktarı 30 µg/ml uyarım konsantrasyonunda belirlenmiştir. Serbest hücrelerin 48. saatteki süzüntülerindeki kapsaisin miktarları konsantrasyon artışına paralel olarak artmıştır (Çizelge 4.2, Şekil 4.2). Bu artış istatistiksel olarak önemlidir (p<0,01).



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

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

Tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde 48. saatte kapsaisin miktarının değişimi 37,69-55,17 µg/g t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Selüloz uygulaması sonucu süzüntüye geçen en yüksek kapsaisin miktarı 30 µg/ml uyarım konsantrasyonunda belirlenmiştir. Bu artış istatistiksel olarak $p < 0,01$ oranında önemlidir. Kontrol uygulamasında belirlenen kapsaisin miktarı ile 10 µg/ml selüloz konsantrasyonunda belirlenen kapsaisin miktarı arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir.

Kontrol örneklerindeki kapsaisin miktarları karşılaştırıldığında 48. saatte tutuklanmış hücrelerin süzüntüsündeki kapsaisin miktarı serbest hücrelerin süzüntüsünden daha fazla bulunmuştur (Çizelge 4.2, Şekil 4.2). Selüloz uygulaması sonucu 48. saatte serbest hücrelerin süzüntüsündeki kapsaisin miktarı ile tutuklanmış hücrelerin süzüntüsündeki kapsaisin miktarları karşılaştırıldığında, serbest hücrelerin süzüntüsündeki kapsaisin miktarı daha fazla bulunmuştur ($p < 0,01$).

Serbest hücrelerin süzüntülerindeki 72. saatte kapsaisin miktarlarının değişimi, 33,69-91,27 µg/g t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Bu zaman periyodunda en fazla

kapsaisin 30 µg/ml sel l z uygulamasında, en az ise kontrol grubunda bulunmuştur. 72. saatte uyarıcı konsantrasyonlarının kapsaisin miktarı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli ($p<0,01$) bulunmuştur.

Tutuklanmış hücrelerin s z nt s nde 72. saatte kapsaisin miktarının değişimi 33,66-55,99 µg/g t.a. olarak bulunmuştur. Tutuklanmış hücrelerin s z nt s nde en fazla kapsaisin miktarı 15 µg/ml sel l z uygulamasında bulunmuştur. Bu artış istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,01$). Tutuklanmış hücrelerin s z nt s nde uygulanan tüm sel l z konsantrasyonlarında kapsaisin miktarı kontrole göre daha fazladır. Sel l zın 10 ve 30 µg/ml'lık uygulama konsantrasyonları arasındaki farklar istatistiki olarak önemli değildir.

Serbest hücrelerin s z nt lerinde kontrol gruplarında değişen zamanlarda meydana gelen kapsaisin miktarları karşılaştırıldığında ortalamalar arası farklar istatistiksel olarak önemli değildir. Serbest hücrelerin s z nt s nde 5 µg/ml sel l z uygulamasında zamanla değişen kapsaisin miktarları arasındaki farklar istatistiksel anlamda $p<0,01$ oranında önemlidir. Sel l zın 10 µg/ml uyarıcı konsantrasyonunda 72. saatte serbest hücrelerde s z nt ye geçen kapsaisin miktarı 24 ve 48. saate göre azalmıştır ( izelge 4.2, şekil 4.2). Bu azalma istatistiksel anlamda $p<0,01$ oranında önemlidir. Sel l zın 15 µg/ml uyarıcı konsantrasyonunda 72. saatte serbest hücrelerde s z nt ye geçen kapsaisin miktarı 24 ve 48. saate göre artmıştır ($p<0,01$). Uyarımın 48. saatinde 30 µg/ml uyarıcı konsantrasyonunda kapsaisin miktarı, 24 ve 72. saatte belirlenen miktara göre daha az bulunmuştur ( izelge 4.2, şekil 4.2).

Serbest hücrelerin s z nt lerindeki kapsaisin miktarı tutuklanmış hücrelerin s z nt lerindeki kapsaisin miktarından daha yüksek bulunmuştur (şekil 4.2). Bu farklılık istatistiksel a ıdanda önemli ($p<0,01$) bulunmuştur. Serbest hücrelerin ve tutuklanmış hücrelerin s z nt lerinin kontrol örneklerindeki kapsaisin miktarları karşılaştırıldığında tutuklanmış hücrelerin s z nt lerindeki kapsaisin miktarları daha yüksek bulunmuştur ( izelge 4.2, şekil 4.2).

4.1.3 Serbest ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin birikimine selülazın etkisi

Serbest hücrelerde 24. saatte selülaz uygulamalarında toplam kapsaisin miktarının değişimi 73,87-243,30 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3). Kontrol uygulaması ile kullanılan selülaz uyarıcı konsantrasyonları arasındaki farklar istatistiksel olarak $p < 0,01$ oranında önemlidir. serbest hücrelerde 24. saatte 10 µg/ml ve 15 µg/ml selülaz uygulama konsantrasyonlarında belirlenen toplam kapsaisin miktarları arasındaki farklar önemli bulunmamıştır ($p < 0,01$).

Çizelge 4.3 Farklı konsantrasyonlarda selülaz uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(KM-187) serbest ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)

Zaman (saat)	Uygulama konsantrasyonu	Toplam kapsaisin (µg/g) t.a.					
		Serbest hücre			Tutuklanmış hücre		
24	Kontrol	73,87	± 0,21	Ad2	118,88	± 0,37	Ae1
	5 µg/ml selülaz	146,04	± 2,11	Ac2	202,84	± 2,12	Bd1
	10 µg/ml selülaz	170,74	± 0,71	Bb2	286,18	± 3,22	Bc1
	15 µg/ml selülaz	187,18	± 5,16	Bb2	329,39	± 4,07	Ab1
	30 µg/ml selülaz	243,30	± 3,19	Aa2	362,91	± 4,54	Aa1
48	Kontrol	79,17	± 1,16	Ae2	119,71	± 1,85	Ad1
	5 µg/ml selülaz	102,14	± 0,77	Bd2	239,81	± 1,83	Ac1
	10 µg/ml selülaz	199,58	± 0,60	Ac2	315,64	± 2,25	Aa1
	15 µg/ml selülaz	226,77	± 1,78	Ab2	291,51	± 0,51	Bb1
	30 µg/ml selülaz	249,14	± 3,94	Aa1	250,67	± 1,70	Bc1
72	Kontrol	78,53	± 1,22	Ac2	116,19	± 1,63	Ae1
	5 µg/ml selülaz	84,77	± 0,87	Bc2	230,66	± 2,50	Ac1
	10 µg/ml selülaz	109,44	± 2,08	Cb2	316,76	± 3,31	Aa1
	15 µg/ml selülaz	169,12	± 1,54	Ba2	271,05	± 2,15	Cb1
	30 µg/ml selülaz	176,40	± 4,21	Ba2	212,66	± 1,00	Bd1

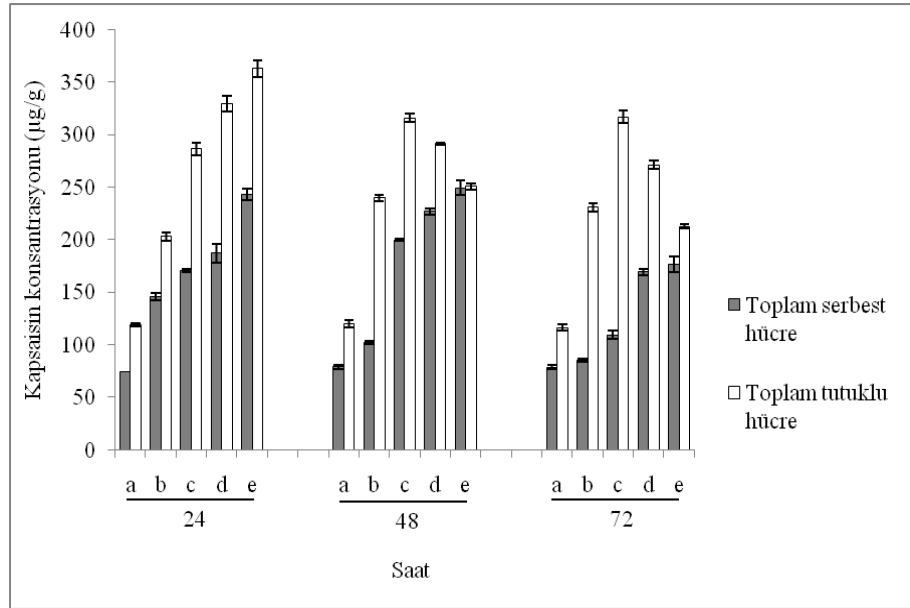
Büyük harfler : Dikey sütunda aynı uyarıcı konsantrasyonlarının farklı zamanlarda Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Küçük harfler : Dikey sütunda aynı uyarım zamanında uyarıcı konsantrasyonlarının Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Rakamlar : Yatay sütunda yöntemlerin Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Tutuklanmış hücrelerde 24. saatte toplam kapsaisin miktarındaki değişim 118,88-362,91 $\mu\text{g/g}$ t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3). Toplam tutuklanmış hücrelerde 24. saatte selüla z uyarıcı konsantrasyonları arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,01$). En fala kapsaisin miktarı 30 $\mu\text{g/ml}$ selüla z uygulamasında belirlenmiştir (EK 8). Tutuklanmış hücrelerdeki toplam kapsaisin miktarı serbest hücrelerdeki kapsaisin miktarından fazladır. Özellikle 15 $\mu\text{g/ml}$ selüla z uygulamasında kapsaisin miktarı serbest hücrelerde 187,18 $\mu\text{g/g}$ t.a. iken tutuklanmış hücrelerde 329,39 $\mu\text{g/g}$ t.a. olarak bulunmuştur.

Serbest hücrelerde uyarımın 48. saatinde toplam kapsaisin miktarının değişimi 79,17-249,14 $\mu\text{g/g}$ t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3). Selüla z uyarıcı konsantrasyonları arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,01$). Uyarıcı konsantrasyon artışına paralel olarak kapsaisin miktarı da artmaktadır.



Şekil 4. 3 Farklı konsantrasyonlarda selüla z uygulamalarının farklı zamanlarda serbest ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin miktarı üzerine etkisi

a: Kontrol, b: 5 $\mu\text{g/ml}$ selüla z , c: 10 $\mu\text{g/ml}$ selüla z , d: 15 $\mu\text{g/ml}$ selüla z, e: 30 $\mu\text{g/ml}$ selüla z

Tutuklanmış hücrelerde 48. saatte toplam kapsaisin miktarının değişimi 119,71-315,64 $\mu\text{g/g}$ t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3). Tutuklanmış hücrelerde uyarımın 48.

saatinde en fazla toplam kapsaisin birikimi 10 µg/ml selüla  uygulamasında belirlenmiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.3). Bu artış istatistiksel anlamda $p<0,01$ oranında önemlidir. 5 µg/ml ile 30 µg/ml selüla  uygulama konsantrasyonlarının kapsaisin birikimi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli değildir.

Serbest hücrelerde selüla  uygulanan 72. saatteki örneklerde toplam kapsaisin miktarının değişimi 78,53-176,40 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3). Bu hücrelerde kontrol uygulaması ile 5 µg/ml selüla  uygulama konsantrasyonu arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli değildir. Kapsaisin miktarında en fazla artış 30 µg/ml selüla  konsantrasyonunda belirlenmiştir. Elde edilen bu miktar ile 15 µg/ml selüla  konsantrasyonunda elde edilen miktar arasında istatistiksel olarak fark yoktur ($p<0,01$).

Tutuklanmış hücrelerde 72. saatte toplam kapsaisin miktarındaki değişim 116,19-316,76 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3). Kapsaisin miktarında en fazla artış 10 µg/ml selüla  konsantrasyonunda belirlenmiştir. Toplam tutuklanmış hücrelerde 72. saatte kontrol uygulaması ile uyarıcı konsantrasyonlarının kapsaisin miktarı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,01$).

Serbest hücrelerde kontrol gruplarında değişen zamanlarda meydana gelen toplam kapsaisin miktarı Duncan testine göre karşılaştırıldığında ortalamalar arası farklar istatistiksel olarak önemli değildir. Selüla ın 5 µg/ml uygulama konsantrasyonunda 24. saatte belirlenen kapsaisin miktarı 48. ve 72. saatte azalmaktadır (Çizelge 4.3, Şekil 4.3). serbest hücrelerde 10 µg/ml selüla  konsantrasyonunda zamanla değişen toplam kapsaisin miktarları arasındaki farklar istatistiksel anlamda $p<0,01$ oranında önemlidir. Selüla ın 15 µg/ml uyarıcı konsantrasyonunda 24. ve 72. saatte belirlenen kapsaisin miktarları arasındaki fark önemsizken 48. saatteki kapsaisin miktarındaki artış bu iki zaman süresine göre istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,01$). Selüla ın 30 µg/ml uygulama konsantrasyonunda 24. ve 48. saatte belirlenen kapsaisin miktarı 72. saatte azalmaktadır ($p<0,01$).

Tutuklanmış hücrelerde kontrol gruplarında değişen zamanlarda meydana gelen toplam kapsaisin miktarı istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ortalamalar arası farklar istatistiksel olarak önemli değildir. Tutuklanmış hücrelerde 24. saatte 5 µg/ml ve 10 µg/ml selüloz uygulamalarında toplam kapsaisin birikimi artmaktadır. Bu uygulama konsantrasyonları 24. saate göre karşılaştırıldığında 48. ve 72. saatte daha fazla kapsaisin birikimine neden olmuştur ($p<0,01$). Selülazın 15 µg/ml uygulama konsantrasyonunda zamanla değişen kapsaisin miktarları $p<0,01$ oranında istatistiksel olarak önemlidir. Uyarım süresi arttıkça kapsaisin miktarı da azalmaktadır. Selülazın 30 µg/ml konsantrasyonunda uyarım zamanının artmasıyla kapsaisin miktarı azalmaktadır. Bu azalma $p<0,01$ oranında istatistiksel olarak önemlidir (Çizelge 4.3, Şekil 4.3).

Toplam kapsaisin miktarları açısından selüloz uygulaması tutuklanmış hücrelerde 24. saatte daha etkili olmuştur. Tutuklanmış hücrelerde en fazla kapsaisin miktarı 30 µg/ml selüloz uygulamasında 24. saatte belirlenmiştir (Şekil 4.3, Çizelge 4.3).

4.2 Serbest ve Tutuklanmış Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Kapsaisin Birikimine Salisilik Asit Uygulamasının Etkisi

C. annuum L. (KM-187) serbest ve tutuklanmış hücre süspansiyon kültürlerine salisilik asit, 100, 200, 250 ve 300 µM/ml olacak şekilde ilave edildikten sonra 10., 12. ve 14. günlerde alınan serbest ve tutuklanmış hücre süspansiyon örneklerinde belirlenen kapsaisin miktarları çizelge 4.4-4.6'da gösterilmektedir. Varyans analizi tekniğine ilişkin hesaplamalardan sonra zaman x konsantrasyon x yöntem interaksyonu istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,01$). Farklı konsantrasyonlarda salisilik asit uygulanmış serbest ve tutuklanmış hücrelerdeki, serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerindeki ve serbest ve tutuklanmış hücrelerdeki toplam kapsaisin miktarlarının Duncan testi sonuçları ilgili ortalamalarının yanında harfli gösterim yaklaşımıyla belirtilmiştir (Çizelge 4.4-4.7).

4.2.1 Serbest ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin birikimine salisilik asit uygulamasının etkisi

Serbest hücrelerde 10. günde kapsaisin miktarındaki değişim 34,96-51,98 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4). Salisilik asidin 100, 200 ve 250 µM/ml uyarıcı konsantrasyonlarında belirlenen kapsaisin miktarları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir ($p<0,01$). 300 µM/ml salisilik uygulamasında belirlenen kapsaisin miktarı ile kontrol örneklerindeki kapsaisin miktarı arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.4 Farklı konsantrasyonlarda salisilik asit uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(KM-187)' un serbest ve tutuklanmış hücrelerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)

Zaman (gün)	Uygulama Konsantrasyonu	Kapsaisin (µg/g) t.a. t.a.	
		Serbest hücre	Tutuklanmış hücre
10	Kontrol	34,96 ± 1,11 Ab2	67,49 ± 0,42 Ab1
	100 µM/ml salisilik asit	49,54 ± 2,91 Aa2	89,14 ± 1,93 Ba1
	200 µM/ml salisilik asit	51,98 ± 0,40 Ca2	65,02 ± 3,08 Cb1
	250 µM/ml salisilik asit	48,32 ± 1,05 Ca2	62,11 ± 3,38 Cb1
	300 µM/ml salisilik asit	40,45 ± 0,77 Bb2	52,28 ± 1,20 Cc1
12	Kontrol	37,15 ± 1,05 Ad2	68,50 ± 1,72 Ad1
	100 µM/ml salisilik asit	49,40 ± 1,63 Ac2	59,80 ± 1,19 Ce1
	200 µM/ml salisilik asit	76,98 ± 2,13 Aa1	82,02 ± 2,33 Bc1
	250 µM/ml salisilik asit	57,69 ± 2,65 Bb2	126,73 ± 5,73 Aa1
	300 µM/ml salisilik asit	39,47 ± 2,09 Bd2	92,30 ± 2,85 Ab1
14	Kontrol	38,38 ± 1,53 Ad2	71,10 ± 0,52 Ab1
	100 µM/ml salisilik asit	36,50 ± 1,56 Bd2	95,50 ± 1,28 Aa1
	200 µM/ml salisilik asit	67,50 ± 1,73 Bb2	97,75 ± 1,46 Aa1
	250 µM/ml salisilik asit	84,18 ± 1,84 Aa2	96,04 ± 1,46 Ba1
	300 µM/ml salisilik asit	57,21 ± 3,51 Ac2	74,02 ± 2,77 Bb1

Büyük harfler : Dikey sütunda aynı uyarıcı konsantrasyonlarının farklı zamanlarda Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Küçük harfler : Dikey sütunda aynı uyarım zamanında uyarıcı konsantrasyonlarının Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

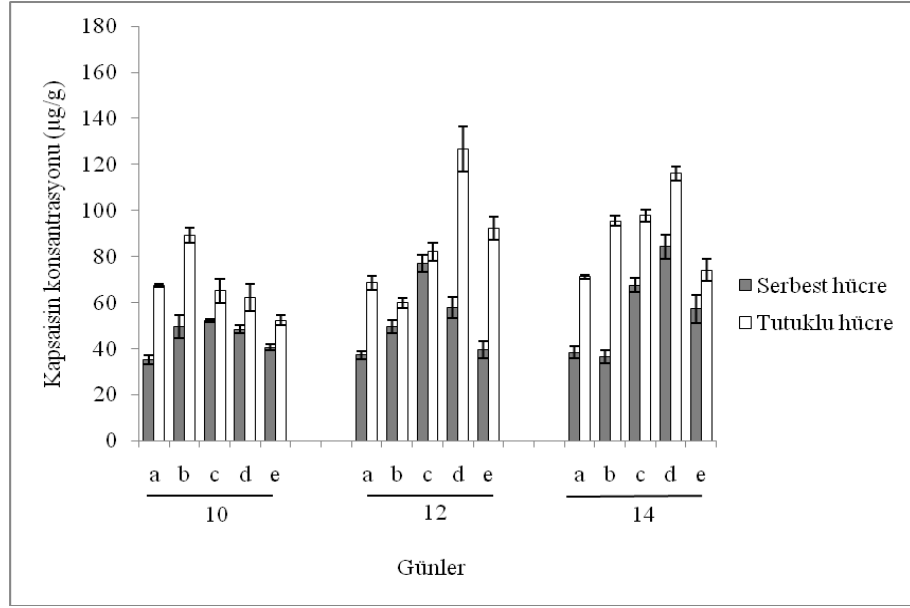
Rakamlar : Yatay sütunda yöntemlerin (serbest, tutuklanmış) Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Tutuklanmış hücrelerde 10. günde kapsaisin miktarındaki değişim 52,28-89,14 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4). Tutuklanmış hücrelerde uyarımın 10. günündeki kapsaisin miktarları 100 µM/ml salisilik asit uygulamasında kontrole göre artmıştır. Salisilik asidin 300 µM/ml uygulama konsantrasyonunda kontrole göre kapsaisin miktarında en fazla azalma olmuştur. Bu azalma istatistiksel anlamda $p<0,01$ oranında önemlidir. Uygulanan diğer uyarıcı konsantrasyonlarında (200 ve 250µM/ml) kapsaisin miktarlarında kontrole göre azalmalar önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.4, Şekil 4.4).

Uyarımın 10. gününde tutuklanmış hücrelerdeki kapsaisin miktarı serbest hücrelerdeki kapsaisin miktarından daha fazla bulunmuştur. Yöntemler arasındaki bu fark istatistiksel olarak $p<0,01$ oranında önemlidir.

Serbest hücrelerde 12. günde kapsaisin miktarındaki değişim 37,15-76,98 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4.). Serbest hücrelerde 12. günde en fazla kapsaisin miktarı, 200 µM/ml salisilik asit uygulamasında bulunmuştur. Bu artış $p<0,01$ oranında önemlidir. Uyarımın 12. gününde 200 µM/ml salisilik asit uygulamasına kadar kapsaisin miktarındaki artış uyarıcı konsantrasyonu ile paralel artmaktadır. Serbest hücrelerde salisilik asidin 300 µM/ml'lik uyarım konsantrasyonunda kapsaisin miktarında kontrole göre çok az bir artma söz konusudur. Bu artış istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.4, Şekil 4.4).

Tutuklanmış hücrelerde 12. günde kapsaisin miktarının değişimi 68,50-126,73 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4). Kapsaisin miktarındaki en fazla artış 250 µM/ml salisilik asit uygulamasında bulunmuştur. 100 µM/ml salisilik asit uygulamasında kapsaisin miktarı kontrole göre azalmıştır. Uygulanan diğer salisilik asit konsantrasyonları kontrole göre daha fazla kapsaisin birikimine neden olmuştur. Kontrol ile karşılaştırıldığında uyarıcı konsantrasyonlarının kapsaisin birikimi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,01$).



Şekil 4.4 Farklı konsantrasyonlarda salisilik asit uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerdeki kapsaisin miktarı üzerine etkisi

a:Kontrol, b: 100 µM/ml salisilik asit, c: 200 µM/ml salisilik asit, d: 250 µM/ml salisilik asit, e: 300 µM/ml salisilik asit

Salisilik asit uygulamasının 12. gününde tutuklanmış hücrelerdeki kapsaisin miktarı serbest hücrelerdeki kapsaisin miktarından daha fazla bulunmuştur. Yöntemler arasındaki bu fark istatistiksel olarak $p < 0,01$ oranında önemlidir. Ancak tutuklanmış hücrelerde 200 µM/ml salisilik asit uygulamasında belirlenen kapsaisin miktarı ile serbest hücrelerde belirlenen kapsaisin miktarı arasında istatistiksel olarak fark önemli bulunmamıştır.

Salisilik asit uygulamasında serbest hücrelerde 14. günde kapsaisin miktarının değişimi 38,38-84,18 µg/g t.a. olarak değişmektedir (Çizelge 4.4). Salisilik asit uygulamasında 14. günde serbest hücrelerde kapsaisin miktarında en fazla değişim 250 µM/ml salisilik asit uygulamasında belirlenmiştir. Bu değişim istatistiksel olarak önemli ($p < 0,01$) bulunmuştur. 14. günde 250 µM/ml salisilik asit uygulamasına kadar olan konsantrasyon artışı serbest hücrelerde kapsaisin miktarını artırmıştır. Bu konsantrasyondan sonra 300 µM/ml salisilik asit uygulamasında kapsaisin miktarı azalmaktadır, fakat bu konsantrasyonda kontrole göre bir artış belirlenmiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.4).

Tutuklanmış hücrelerde 14. günde kapsaisin miktarının değişimi 71,10-97,75 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4.). Kontrol uygulaması ile karşılaştırıldığında 100, 200 ve 250 µM/ml uygulama konsantrasyonlarında belirlenen kapsaisin miktarları arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli ($p<0,01$) bulunmuşken, 300 µM/ml uygulama konsantrasyonunda ise önemli bulunmamıştır.

Serbest hücrelerde kontrol gruplarında zamanla değişen kapsaisin miktarları arasındaki farklar istatistiki olarak önemli değildir. Salisilik asitin 100 µM/ml uygulama konsantrasyonunda zamanla kapsaisin miktarı azalmıştır. Bu azalma 14. günde istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,01$). Salisilik asitin 250 µM/ml uygulama konsantrasyonunda zamanla kapsaisin miktarı artmıştır ($p<0,01$). Salisilik asidin 200 µM/ml uygulama konsantrasyonunda 48. saatte artan kapsaisin miktarı 72. saatte azalmıştır. Zamanla değişen kapsaisin miktarları arasındaki farklar $p<0,01$ oranında önemlidir. 300 µM/ml uygulama konsantrasyonunda 10. ve 12. günde kapsaisin birikimi benzerken 14. günde kapsaisin miktarı artmıştır (Çizelge 4.4, Şekil 4.4).

Tutuklanmış hücrelerde kontrol gruplarında zamanla değişen kapsaisin miktarları arasındaki farklar önemli bulunmamıştır. 100 µM/ml salisilik asit konsantrasyonunda 12. günde azalan kapsaisin miktarı 14. günde tekrar artmaktadır. Salisilik asitin 200 µM/ml konsantrasyonunda uyarım süresinin artışına paralel olarak kapsaisin miktarı da artmaktadır ($p<0,01$). Tutuklanmış hücrelerde 250 ve 300 µM/ml salisilik asit konsantrasyonunda 12. günde artan kapsaisin birikimi 14. günde azalmaktadır (Çizelge 4.4, Şekil 4.4).

4.2.2 Serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde kapsaisin birikimine salisilik asit uygulamasının etkisi

Serbest hücrelerin süzüntülerinde uyarımın 10. gününde kapsaisin miktarının değişimi 14,97-37,85 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5). Serbest hücrelerin süzüntüsünde 10. günde en fazla kapsaisin miktarı 100 µM/ml salisilik asit uygulamasında belirlenmiştir. Uygulanan tüm salisilik asit konsantrasyonlarında süzüntüye geçen kapsaisin miktarı kontrole göre daha fazla bulunmuştur. Salisilik asitin 100 µM/ml

uygulama konsantrasyonunda kapsaisin miktarında ani bir artış belirlenirken uyarıcı konsantrasyonunun artışı ile 200 ve 250 $\mu\text{M}/\text{ml}$ uygulama konsantrasyonlarında kapsaisin miktarı azalmış fakat 300 $\mu\text{M}/\text{ml}$ uygulama konsantrasyonunda tekrar kapsaisin miktarında artış belirlenmiştir.

Çizelge 4.5 Farklı konsantrasyonlarda salisilik asit uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(KM-187)'un serbest ve tutuklanmış hücrelerinin süzöntülerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)

Zaman (gün)	Uygulama Konsantrasyonu	Kapsaisin ($\mu\text{g}/\text{g}$) t.a.	
		Serbest hücre süzöntü	Tutuklanmış hücre süzöntü
10	Kontrol	14,97 $\pm$ 0,33 Bd1	11,83 $\pm$ 0,25 Cd2
	100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ salisilik asit	37,85 $\pm$ 1,53 Aa1	20,68 $\pm$ 0,51 Ab2
	200 $\mu\text{M}/\text{ml}$ salisilik asit	20,07 $\pm$ 0,45 Bc2	29,89 $\pm$ 0,44 Aa1
	250 $\mu\text{M}/\text{ml}$ salisilik asit	19,32 $\pm$ 0,40 Ac1	17,85 $\pm$ 0,35 Cc1
	300 $\mu\text{M}/\text{ml}$ salisilik asit	27,08 $\pm$ 0,32 Ab1	16,75 $\pm$ 0,45 Cc2
12	Kontrol	15,80 $\pm$ 0,64 Bd1	13,66 $\pm$ 0,31 Bc2
	100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ salisilik asit	32,70 $\pm$ 0,68 Ba1	13,96 $\pm$ 0,05 Cc2
	200 $\mu\text{M}/\text{ml}$ salisilik asit	20,04 $\pm$ 0,98 Bb1	19,04 $\pm$ 0,57 Bb1
	250 $\mu\text{M}/\text{ml}$ salisilik asit	19,40 $\pm$ 0,86 Abc2	26,81 $\pm$ 0,18 Aa1
	300 $\mu\text{M}/\text{ml}$ salisilik asit	17,83 $\pm$ 0,24 Cc2	28,03 $\pm$ 0,27 Ba1
14	Kontrol	18,68 $\pm$ 0,88 Ad1	18,51 $\pm$ 0,33 Ab1
	100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ salisilik asit	27,70 $\pm$ 0,56 Ca1	16,80 $\pm$ 0,44 Bc2
	200 $\mu\text{M}/\text{ml}$ salisilik asit	25,52 $\pm$ 0,76 Ab1	19,28 $\pm$ 0,43 Bb2
	250 $\mu\text{M}/\text{ml}$ salisilik asit	20,59 $\pm$ 0,28 Ac2	21,35 $\pm$ 0,37 Ba1
	300 $\mu\text{M}/\text{ml}$ salisilik asit	21,52 $\pm$ 0,48 Bc2	19,17 $\pm$ 0,24 Ab1

Büyük harfler : Dikey sütunda aynı uyarıcı konsantrasyonlarının farklı zamanlarda Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

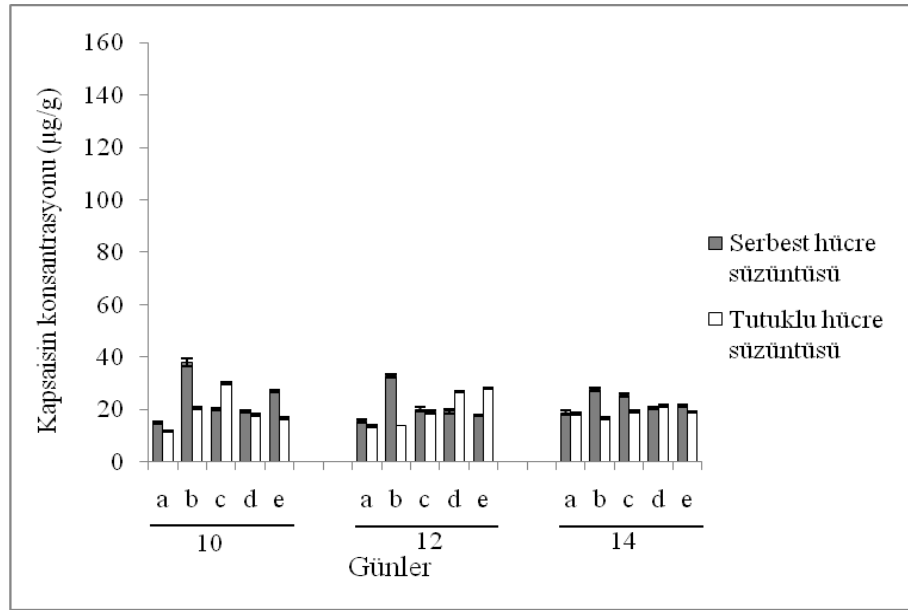
Küçük harfler : Dikey sütunda aynı uyarım zamanında uyarıcı konsantrasyonlarının Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Rakamlar : Yatay sütunda yöntemlerin Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Tutuklanmış hücrelerin süzöntülerinde 10. günde kapsaisin miktarının değişimi 11,83-29,89 $\mu\text{g}/\text{g}$ t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Tutuklanmış hücrelerin süzöntüsünde en fazla kapsaisin miktarı 200 $\mu\text{M}/\text{ml}$ salisilik asit uygulamasında belirlenmiştir ($p<0,01$). Serbest hücrelerin kontrollerinde süzöntüye geçen kapsaisin miktarı tutuklanmış hücrelerdekinden daha fazla bulunmuştur. Tutuklama işlemi uyarımın 10. gündeki örneklerin süzöntülerinde sadece 200 $\mu\text{M}/\text{ml}$ salisilik asit uygulamasında

serbest hücelere göre kapsaisin miktarının artmasında etkili olmuştur (Çizelge 4.5, Şekil 4.5).

Salisilik asit ile uyarımın 10 gününde serbest hücelerin süzüntülerindeki kontrol örneklerinde kapsaisin miktarı, tutuklanmış hücelerin süzüntülerindeki kapsaisin miktarından daha fazla bulunmuştur. Serbest hücelerin süzüntülerinde salisilik asidin 100 ve 300 $\mu\text{M}/\text{ml}$ uygulama konsantrasyonunda belirlenen kapsaisin birikimi aynı konsantrasyondaki tutuklanmış hücelerin süzüntülerinde belirlenen kapsaisin birikiminden daha fazla bulunmuştur. 200 $\mu\text{M}/\text{ml}$ salisilik asit uygulama konsantrasyonunda tutuklama işlemi serbest hücelere göre kapsaisin birikimi üzerine daha etkili olmuştur ($p<0,01$).



Şekil 4.5 Farklı konsantrasyonlarda salisilik asit uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücelerin süzüntülerinde kapsaisin miktarı üzerine etkisi

a :Kontrol, b: 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ salisilik asit, c: 200 $\mu\text{M}/\text{ml}$ salisilik asit, d: 250 $\mu\text{M}/\text{ml}$ salisilik asit, e: 300 $\mu\text{M}/\text{ml}$ salisilik asit

Tutuklanmış hücelerin süzüntülerinde 12. günde kapsaisin miktarının değişimi 13,66-26,81 $\mu\text{g}/\text{g}$ t.a. arasındadır (Çizelge 4.5). Tutuklanmış hücelerin süzüntülerinde 12. günde en fazla kapsaisin miktarı en yüksek uyarıcı konsantrasyonu olan 300 $\mu\text{M}/\text{ml}$

salisilik asit uygulamasında belirlenmiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.5). Kapsaisin miktarındaki bu artış 250 µM/ml salisilik asit uygulamasında belirlenen kapsaisin miktarından istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Tutuklanmış hücrelerin süzöntülerinde salisilik asitin 100 µM/ml konsantrasyonunda belirlenen kapsaisin miktarı kontrol ile karşılaştırıldığında önemli bulunmamıştır ($p<0,01$).

Salisilik asit ile uyarımın 12 gününde serbest hücrelerin süzöntülerindeki kontrol örneklerinde kapsaisin miktarı, tutuklanmış hücrelerin süzöntülerindeki kapsaisin miktarından daha fazla bulunmuştur. Serbest hücrelerin süzöntülerinde salisilik asidin 100 ve 200 µM/ml uygulama konsantrasyonunda belirlenen kapsaisin birikimi aynı konsantrasyondaki tutuklanmış hücrelerin süzöntülerinde belirlenen kapsaisin birikiminden daha fazla bulunmuştur . 250 ve 300 µM/ml salisilik asit uygulama konsantrasyonunda, tutuklama işlemi serbest hücrelere göre kapsaisin birikimi üzerine daha etkili olmuştur ($p<0,01$).

Salisilik asit ile uyarımın 14. gününde kapsaisin miktarının değişimi 18,68-27,70 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5). Serbest hücrelerin süzöntülerinde en fazla kapsaisin miktarı 100 µM/ml salisilik asit uyarıcı konsantrasyonunda bulunmuştur. Kontrol ile karşılaştırıldığında uyarıcı konsantrasyonları arasındaki farklar istatistiksel anlamda $p<0,01$ oranında önemlidir.

Tutuklanmış hücrelerin süzöntülerinde 14. günde kapsaisin miktarındaki değişim 16,80-21,35 µg/g t.a. arasındadır. Tutuklanmış hücrelerin süzöntülerinde 14. günde ise en fazla kapsaisin miktarı yine en yüksek uyarıcı konsantrasyonu olan 250 µM/ml salisilik asit uygulamasında belirlenmiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.5). Kontrol ile karşılaştırıldığında 200 µM/ml ve 300 µM/ml salisilik asit uyarıcı konsantrasyonları arasındaki farklar önemli değildir. Salisilik asidin 100 µM/ml uygulamasında kapsaisin miktarı kontrole göre azalırken 250 µM/ml salisilik asit uygulamasında ise artmıştır. Bu azalma ve artışlar istatistiksel olarak $p<0,01$ oranında önemlidir.

Salisilik asit uygulamasında serbest hücrelerde 10. ve 12. günde kontrollerde belirlenen kapsaisin miktarları istatistiksel olarak önemli değildir. Salisilik asidin 100 µM/ml uygulama konsantrasyonunda zamanla değişen kapsaisin miktarları arasındaki farklar $p<0,01$ oranında önemlidir. Serbest hücrelerde 250 µM/ml salisilik asit uygulamasında zamanla kapsaisin miktarının değişimi önemli değildir (Çizelge 4.5, Şekil 4.5).

Tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinin kontrollerinde zamanla değişen kapsaisin miktarları arasındaki farklar önemlidir ($p<0,01$).

4.2.3 Serbest ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin birikimine salisilik asitin etkisi

Serbest hücrelerde uyarımın 10. gününde toplam kapsaisin miktarının değişimi 49,93-87,39 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.6). Kapsaisin miktarındaki en fazla değişim 100 µM/ml salisilik asit uygulamasında bulunmuştur ($p<0,01$). Serbest hücrelerde 10. günde kontrol ile karşılaştırıldığında uyarıcı konsantrasyonlarının kapsaisin birikimi üzerine etkisi istatistiksel anlamda $p<0,01$ oranında önemlidir. 200, 250 ve 300 µM/ml salisilik asit uygulamalarında belirlenen kapsaisin miktarları birbirine yakındır. Aralarındaki bu fark istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır.

Tutuklanmış hücrelerde 10. günde toplam kapsaisin miktarının değişimi 69,03-109,82 µg/g t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Kapsaisin miktarında en fazla değişim 100 µM/ml salisilik asit uygulamasında belirlenmiştir. Salisilik asit konsantrasyonu 100 µM/ml’ dan daha fazla artırıldığında kapsaisin miktarı azalmaktadır. Kontrol ile 250 µM/ml salisilik asit konsantrasyonunda belirlenen kapsaisin miktarı arasındaki fark önemli bulunmamıştır. 300 µM/ml salisilik asit konsantrasyonunda kontrole göre kapsaisin miktarı azalmıştır ($p<0,01$).

Serbest hücrelerde uyarımın 12. gününde toplam kapsaisin miktarının değişimi 52,95-97,02 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.6). Kapsaisin miktarındaki en fazla değişim 200 µM/ml salisilik asit uygulamasında bulunmuştur ($p<0,01$). Kontrol grupları

ile karşılaştırıldığında 100, 250 ve 300 µM/ml salisilik asit uygulamasında uyarıcı konsantrasyonlarının kapsaisin birikimi üzerine etkisi önemli değilken, 200 µM/ml salisilik asit uyarıcı konsantrasyonunda istatistiksel olarak ($p<0,01$) önemlidir.

Çizelge 4.6 Farklı konsantrasyonlarda salisilik asit uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(KM-187)'un serbest ve tutuklanmış hücrelerinin toplam kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)

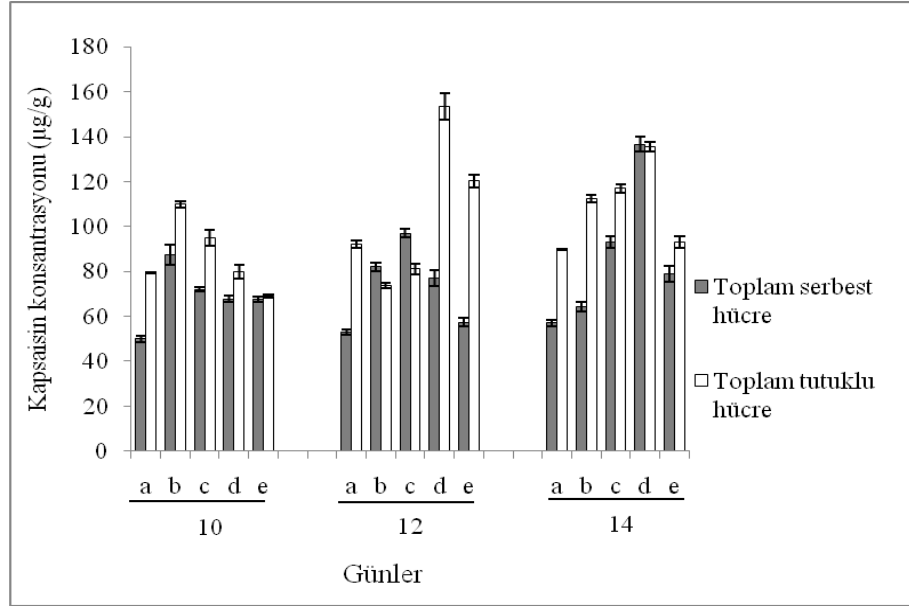
Zaman (gün)	Uygulama Konsantrasyonu	Toplam kapsaisin (µg/g) t.a. t.a.	
		Serbest hücre	Tutuklanmış hücre
10	Kontrol	49,93 ± 1,26 Bc2	79,32 ± 0,41 Bc1
	100 µM/ml salisilik asit	87,39 ± 4,44 Aa2	109,82 ± 1,42 Aa1
	200 µM/ml salisilik asit	72,05 ± 0,84 Bb2	94,91 ± 3,51 Bb1
	250 µM/ml salisilik asit	67,64 ± 1,45 Cb2	79,95 ± 3,10 Cc1
	300 µM/ml salisilik asit	67,53 ± 1,10 Bb1	69,03 ± 0,88 Cd1
12	Kontrol	52,95 ± 1,39 Abc2	92,15 ± 1,85 Ac1
	100 µM/ml salisilik asit	82,10 ± 1,97 Ab1	73,76 ± 1,24 Be2
	200 µM/ml salisilik asit	97,02 ± 1,74 Aa1	81,06 ± 2,27 Cd2
	250 µM/ml salisilik asit	77,09 ± 3,46 Bb2	153,54 ± 5,79 Aa1
	300 µM/ml salisilik asit	57,30 ± 1,84 Cc2	120,33 ± 2,84 Ab1
14	Kontrol	57,06 ± 1,34 Ae2	89,61 ± 0,27 Ac1
	100 µM/ml salisilik asit	64,20 ± 2,04 Bd2	112,30 ± 1,71 Ab1
	200 µM/ml salisilik asit	93,01 ± 2,50 Ab2	117,03 ± 1,88 Ab1
	250 µM/ml salisilik asit	136,63 ± 3,31 Aa1	135,53 ± 2,20 Ba2
	300 µM/ml salisilik asit	78,74 ± 3,53 Ac2	93,19 ± 2,70 Bc1

Büyük harfler : Dikey sütunda aynı uyarıcı konsantrasyonlarının farklı zamanlarda Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Küçük harfler : Dikey sütunda aynı uyarım zamanında uyarıcı konsantrasyonlarının Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Rakamlar : Yatay sütunda yöntemlerin Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Tutuklanmış hücrelerde 12. günde toplam kapsaisin miktarının değişimi 73,76-153,54 µg/g t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Kapsaisin miktarında en fazla artış 250 µM/ml salisilik asit uygulamasında belirlenmiştir (Çizelge 4.6, Şekil 4.6). Salisilik asidin 100 ve 200 µM/ml konsantrasyonunda kontrole göre kapsaisin miktarı azalmıştır. Tutuklanmış hücrelerde 12. günde kontrol ile karşılaştırıldığında uyarıcı konsantrasyonlarının toplam kapsaisin birikimine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,01$).



Şekil 4.6 Farklı konsantrasyonlarda salisilik asit uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin miktarı üzerine etkisi

a: Kontrol, b: 100 µM/ml salisilik asit, c: 200 µM/ml salisilik asit, d: 250 µM/ml salisilik asit, e: 300 µM/ml salisilik asit

Serbest hücrelerde uyarımın 14. gününde toplam kapsaisin miktarının değişimi 57,06-136,63 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.6). Kapsaisin miktarındaki en fazla artış 250 µM/ml salisilik asit uygulamasında bulunmuştur ($p < 0,01$). Kontrolleri ile karşılaştırıldığında uyarıcı konsantrasyon artışına paralel olarak kapsaisin miktarı da 300 µM/ml salisilik asit uygulama konsantrasyonuna kadar artmaktadır.

Tutuklanmış hücrelerde 14. günde toplam kapsaisin miktarının değişimi 89,61-135,53 µg/g t.a. olarak belirlenmiştir. Kapsaisin miktarında en fazla artış 250 µM/ml salisilik asit uygulamasında belirlenmiştir (Çizelge 4.6, Şekil 4.6). Bu artış 100 ve 200 µM/ml salisilik asit uygulama dozunda belirlenen kapsaisin miktarından istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Kontrol ile karşılaştırıldığında 300 µM/ml salisilik asit konsantrasyonunun kapsaisin birikimine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Zamanla kapsaisin birikimi incelendiğinde, toplam serbest hücrelerde salisilik asit uygulamasında kontrolleri ile karşılaştırıldığında 12. ve 14. günde kapsaisin miktarında

artış vardır. Serbest hücrelerde 250 µM/ml ve 300 µM/ml salisilik asit uyarıcı konsantrasyonlarında zamanla değişen kapsaisin miktarları arasındaki farklar istatistiksel anlamda $p<0,01$ oranında önemli bulunmuştur.

Toplam tutuklanmış hücrelerde kontrollerde zamanla değişen kapsaisin miktarları karşılaştırıldığında 12. ve 14. gündeki kapsaisin miktarları arasındaki fark önemsizken, 10. gündeki kapsaisin miktarına göre önemli bulunmuştur ($p<0,01$). 100 µM/ml salisilik asit uygulamasında 12. günde azalan kapsaisin miktarı 14. günde tekrar artmıştır. Salisilik asidin 200 µM/ml uygulama dozunda 10. ve 12. günde kapsaisin birikimi benzer bulunmuştur, 14. günde ise kapsaisin birikimini artırıcı etki yapmıştır. Uygulamanın 10. gününde 250 ve 300 µM/ml uygulama konsantrasyonlarında kapsaisin birikimi 12. günde artarken 14. günde tekrar azalmıştır. Ancak 14. günde belirlenen kapsaisin miktarı 10. günde belirlenenden daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.6, Şekil 4.6).

4.3 Serbest ve Tutuklanmış Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Kapsaisin Birikimine Metil Jasmonat Uygulamasının Etkisi

C. annuum L. (KM-187) serbest ve tutuklanmış hücre süspansiyon kültürlerine metil jasmonat uyarıcısı 0.04, 0.06, 0.08 ve 0.1 µM/ml olacak şekilde ilave edildikten sonra 10, 12 ve 14. günlerde alınan serbest ve tutuklanmış hücre süspansiyon örneklerinde belirlenen kapsaisin miktarları çizelge 4,7-4.9' de gösterilmektedir. Varyans analizi tekniğine ilişkin hesaplamalardan sonra zaman x konsantrasyon x yöntem interaksyonu istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p<0,01$). Farklı konsantrasyonlarda metil jasmonat uygulanmış serbest ve tutuklanmış hücrelerdeki, serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerindeki ve serbest ve tutuklanmış hücrelerdeki toplam kapsaisin miktarlarının Duncan testi sonuçları ilgili ortalamalarının yanında harfli gösterim yaklaşımıyla belirtilmiştir (Çizelge 4.7-4.9).

4.3.1 Serbest ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin birikimine metil jasmonat uygulamasının etkisi

Serbest hücrelerde uyarımın 10. gününde kapsaisin miktarının değişimi 32,71-46,68 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.7). Serbest hücrelerde 10. günde kapsaisin miktarındaki en fazla artış 0,08 µM/ml metil jasmonat uygulamasında belirlenmiştir. Bu değer 0,1 µM/ml uyarıcı konsantrasyonunda bulunan kapsaisin miktarından istatistiksel olarak önemli değildir. Kontrolleri ile karşılaştırıldığında serbest hücrelerde 10. günde 0,08 ve 0,1 µM/ml konsantrasyonlarında kapsaisin miktarında artışlar belirlenmiştir. Metil jasmonatın 0,04 ve 0,06 µM/ml uyarıcı konsantrasyonunda kapsaisin birikiminde azalış ve artış kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.7 Farklı konsantrasyonlarda metil jasmonat uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(KM-187)'un serbest ve tutuklanmış hücrelerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)

Zaman (gün)	Uygulama Konsantrasyonu	Kapsaisin (µg/g) t.a.	
		Serbest hücre	Tutuklanmış hücre
10	Kontrol	32,71 ± 1,04 Ab2	64,15 ± 1,06 Bb1
	0,04 µM/ml Metil jasmonat	31,97 ± 1,35 Bb2	65,73 ± 1,74 Ab1
	0,06 µM/ml Metil jasmonat	34,41 ± 2,82 Bb2	91,58 ± 1,49 Aa2
	0,08 µM/ml Metil jasmonat	46,68 ± 2,06 Aa2	55,55 ± 2,31 Bc1
	0,1 µM/ml Metil jasmonat	46,15 ± 0,74 Aa2	53,19 ± 1,65 Bc1
12	Kontrol	34,25 ± 1,19 Aa2	67,51 ± 1,25 Bbc1
	0,04 µM/ml Metil jasmonat	34,44 ± 2,41 Ba2	70,65 ± 3,09 Aab1
	0,06 µM/ml Metil jasmonat	35,63 ± 1,93 Ba2	63,50 ± 0,04 Bc1
	0,08 µM/ml Metil jasmonat	34,73 ± 2,74 Ba2	67,91 ± 2,95 Abc1
	0,1 µM/ml Metil jasmonat	34,22 ± 1,67 Ba2	74,90 ± 1,02 Ba1
14	Kontrol	31,75 ± 1,13 Ac2	75,86 ± 3,64 Ab1
	0,04 µM/ml Metil jasmonat	50,59 ± 1,66 Ab2	63,90 ± 1,95 Ac2
	0,06 µM/ml Metil jasmonat	84,66 ± 0,47 Aa1	104,00 ± 3,51 Aa1
	0,08 µM/ml Metil jasmonat	25,64 ± 1,05 Cd2	60,83 ± 1,94 Bc1
	0,1 µM/ml Metil jasmonat	21,75 ± 0,42 Cd2	58,05 ± 4,19 Cc1

Büyük harfler : Dikey sütunda aynı uyarıcı konsantrasyonlarının farklı zamanlarda Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

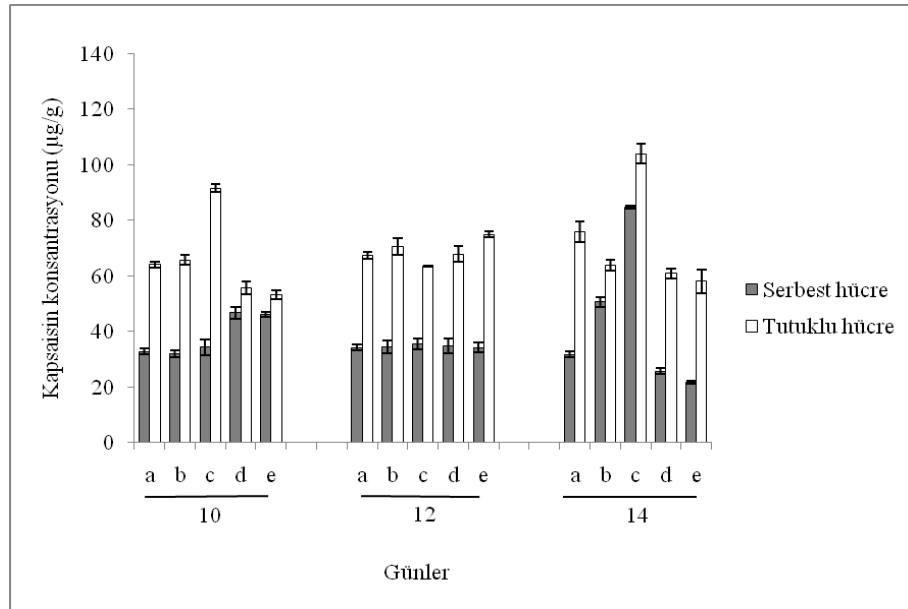
Küçük harfler : Dikey sütunda aynı uyarım zamanında uyarıcı konsantrasyonlarının Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Rakamlar : Yatay sütunda yöntemlerin Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Tutuklanmış hücrelerde 10. günde kapsaisin miktarının değişimi 64,15-91,58 $\mu\text{g/g}$ t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7). Tutuklanmış hücrelerde 10. günde kontrolleri ile karşılaştırıldığında kapsaisin miktarı en fazla 0,06 $\mu\text{M/ml}$ metil jasmonat konsantrasyonunda belirlenmiştir. Metil jasmonatın 0,08 $\mu\text{M/ml}$ ve 0,1 $\mu\text{M/ml}$ uyarım konsantrasyonunda kapsaisin miktarı kontrole göre azalmıştır (Şekil 4.7).

Tutuklama işlemi 10. günde serbest hücelere göre metil jasmonat ile uyarım sonucunda sadece 0,06 $\mu\text{M/ml}$ uyarıcı konsantrasyonunda kapsaisin birikimi üzerine daha etkili bulunmuştur. Kontrol örnekleri ve diğer metil jasmonat konsantrasyonlarında serbest hücrelerdeki kapsaisin miktarı tutuklanmış hücrelerden daha az bulunmuştur ($p<0,01$) (Çizelge 4.7, Şekil 4.7).

Serbest hücrelerde 12. günde kapsaisin miktarının değişimi 34,22-34,73 $\mu\text{g/g}$ t.a. arasındadır (Çizelge 4.7). Kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında 12. gündeki serbest hücrelerde dışarıdan selüloz uygulaması kapsaisin miktarı üzerine etkili olmamıştır.



Şekil 4.7 Farklı konsantrasyonlarda metil jasmonat uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin miktarı üzerine etkisi

a: Kontrol, b: 0,04 $\mu\text{M/ml}$ metil jasmonat, c: 0,06 $\mu\text{M/ml}$ metil jasmonat, d: 0,08 $\mu\text{M/ml}$ metil jasmonat, e: 0,1 $\mu\text{M/ml}$ metil jasmonat

Tutuklanmış hücrelerde 12. gündeki örneklerde kapsaisin miktarının değişimi 67,51-74,90 µg/g t.a. arasında bulunmuştur (Çizelge 4.7). Kapsaisin miktarındaki en fazla artış 0,1 µM/ml metil jasmonat uygulamasında belirlenmiştir (Çizelge 4.7, Şekil 4.7). Bu artış kontrol örneklerine göre istatistiksel olarak önemli ($p < 0,01$) bulunmuştur. Kontrol ile karşılaştırıldığında metil jasmonatın 0,06 ve 0,08 µM/ml uygulama konsantrasyonlarında belirlenen kapsaisin birikimi istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır.

Serbest hücrelerde metil jasmonat ile uyarımın 14. gününde kapsaisin miktarının değişimi 21,75-84,66 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.7). Serbest hücrelerde 14. günde en yüksek kapsaisin miktarı 0,06 µM/ml metil jasmonat uygulamasında belirlenmiştir. Serbest hücrelerde kontrolleri ile karşılaştırıldığında uyarıcı konsantrasyonları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli ($p < 0,01$) bulunmuştur. Metil jasmonatın 0,08 ve 0,1 µM/ml' lik uyarım konsantrasyonlarında kontrole göre kapsaisin miktarında azalmalar bulunmuştur. Bu azalma kontrole karşılaştırıldığında $p < 0,01$ oranında önemlidir. Her iki uyarım konsantrasyonu kendi aralarında karşılaştırıldığında kapsaisin miktarı üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli değildir.

Tutuklanmış hücrelerde metil jasmonat ile uyarımın 14. günde kapsaisin miktarının değişimi 58,05-104,00 µg/g t.a. arasındadır (Çizelge 4.7). Tutuklanmış hücrelerde en yüksek kapsaisin miktarı 0,06 µM/ml metil jasmonat uygulamasında belirlenmiştir (Çizelge 4.7, Şekil 4.7).

Tüm uyarım günleri dikkate alındığında, çizelge 4.7' de görüldüğü gibi en yüksek kapsaisin miktarı tutuklanmış hücrelere 0,06 µg/ml metil jasmonat uygulandığında 14.günde belirlenmiştir.

4.3.2 Serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde kapsaisin birikimine metil jasmonat uygulamasının etkisi

Dışarıdan metil jasmonat uygulaması sonucu 10. günde serbest hücrelerin süzüntüsündeki kapsaisin miktarındaki değişim 13,71-21,10 $\mu\text{g/g}$ t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8). Serbest hücrelerin süzüntüsünde kontrol örneklerine göre kapsaisin miktarındaki artış sadece 0,08 $\mu\text{M/ml}$ metil jasmonat uygulamasında 21,10 $\mu\text{g/g}$ t.a. olarak belirlenmiştir. Ancak bu artış kontrolleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır. Metil jasmonatın 0,04 $\mu\text{M/ml}$ uygulama konsantrasyonunda kontrole göre kapsaisin miktarındaki azalma belirlenmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında serbest hücrelerin süzüntüsünde metil jasmonatın 0,06 ve 0,1 $\mu\text{M/ml}$ uygulama konsantrasyonlarında azalan kapsaisin miktarı istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır.

Tutuklanmış hücrelerin süzüntüsündeki uyarımın 10. gününde kapsaisin miktarındaki değişim 13,24-20,71 $\mu\text{g/g}$ t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8). Tutuklanmış hücrelerin süzüntüsünde 0,04 $\mu\text{M/ml}$ metil jasmonat uygulaması haricinde diğer konsantrasyonlar kapsaisin miktarında artışa neden olmuştur (Çizelge 4.8, Şekil 4.8). Metil jasmonatın 0,04 $\mu\text{M/ml}$ uygulama konsantrasyonunda azalan kapsaisin miktarı kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır.

Metil jasmonat ile uyarımın 12. gününde serbest hücrelerin süzüntüsünde kapsaisin miktarındaki değişim 13,70-22,58 $\mu\text{g/g}$ t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8). En fazla kapsaisin miktarı 0,08 $\mu\text{M/ml}$ metil jasmonat uygulamasında belirlenmiştir. Serbest hücrelerin süzüntülerinde en düşük uyarıcı konsantrasyonu olan 0,04 $\mu\text{M/ml}$ metil jasmonat uygulamasında kontrol grubuna göre kapsaisin miktarında azalma bulunmuştur.

Çizelge 4.8 Farklı konsantrasyonlarda metil jasmonat uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(KM-187) serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)

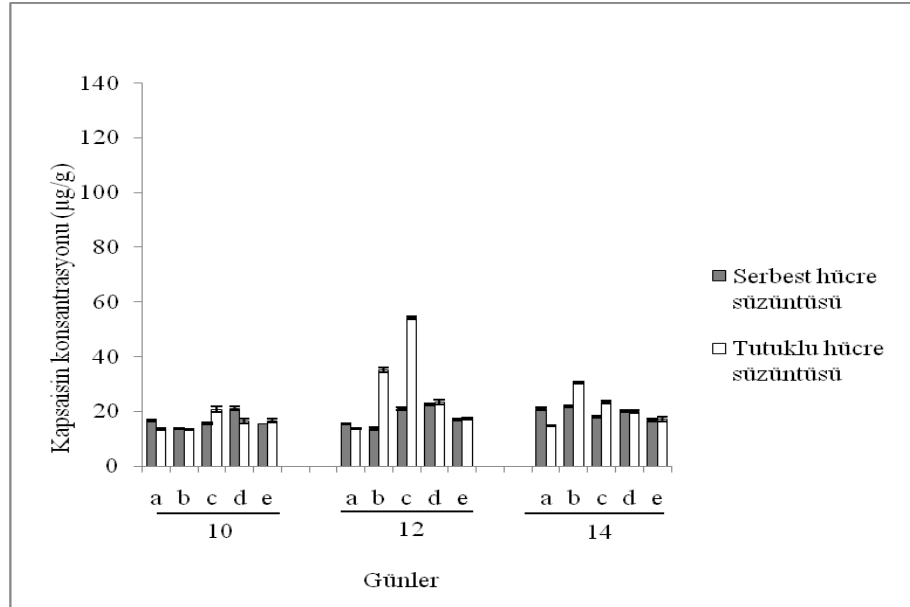
Zaman (gün)	Uygulama Dozu	Kapsaisin (µg/g) t.a.		
		Serbest hücre süzüntüsü	Tutuklanmış hücre süzüntüsü	
10	Kontrol	16,54 ± 0,42 Bb1	13,51 ± 0,34	Ac2
	0,04 µM/ml Metil jasmonat	13,71 ± 0,24 Bc1	13,24 ± 0,21	Cc1
	0,06 µM/ml Metil jasmonat	15,58 ± 0,21 Bb2	20,71 ± 1,06	Aa1
	0,08 µM/ml Metil jasmonat	21,10 ± 0,81 Aba1	16,53 ± 0,81	Cb2
	0,1 µM/ml Metil jasmonat	15,25 ± 0,15 Bb1	16,53 ± 0,68	Cb1
12	Kontrol	15,54 ± 0,20 Bc1	13,78 ± 0,15	Ae2
	0,04 µM/ml Metil jasmonat	13,70 ± 0,42 Bd2	35,24 ± 0,88	Ab1
	0,06 µM/ml Metil jasmonat	20,97 ± 0,67 Ab2	54,08 ± 0,43	Aa1
	0,08 µM/ml Metil jasmonat	22,58 ± 0,31 Aa1	23,36 ± 0,86	Ac1
	0,1 µM/ml Metil jasmonat	17,01 ± 0,32 Ac1	17,28 ± 0,42	Ad1
14	Kontrol	20,99 ± 0,40 Aab1	14,61 ± 0,16	Ae2
	0,04 µM/ml Metil jasmonat	21,85 ± 0,29 Aa1	30,49 ± 0,36	Ba1
	0,06 µM/ml Metil jasmonat	17,91 ± 0,34 Ac2	23,29 ± 0,60	Bb1
	0,08 µM/ml Metil jasmonat	20,15 ± 0,34 Bb1	19,96 ± 0,54	Bc1
	0,1 µM/ml Metil jasmonat	16,74 ± 0,45 Abc1	17,31 ± 0,87	Ad1

Büyük harfler : Dikey sütunda aynı uyarıcı konsantrasyonlarının farklı zamanlarda Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Küçük harfler : Dikey sütunda aynı uyarım zamanında uyarıcı konsantrasyonlarının Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Rakamlar : Yatay sütunda yöntemlerin Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde 12. günde kapsaisin miktarındaki değişim 13,78-54,08 µg/g t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8). Tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde kapsaisin miktarındaki en fazla artış 0,04 µM/ml metil jasmonat uygulamasında belirlenmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.8). En yüksek uyarıcı konsantrasyonu olan 0,1 µM/ml metil jasmonat uygulamasında kontrole göre kapsaisin miktarında en az değişim belirlenmiştir. Yine de bu artış istatistiksel olarak ($p<0,01$) önemlidir.



Şekil 4. 8 Farklı konsantrasyonlarda metil jasmonat uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerin süzöntülerinde kapsaisin miktarı üzerine etkisi

a: Kontrol, b: 0,04µM/ml metil jasmonat, c: 0,06 µM/ml metil jasmonat, d: 0,08µM/ml metil jasmonat e: 0,1 µM/ml metil jasmonat

Tutuklanmış hücrelerin süzöntülerinin kontrollerinde 10. günde kapsaisin miktarı serbest hücrelerin süzöntülerine göre daha düşük bulunmuştur (Çizelge 4.8, Şekil 4.8). Yöntemler arası bu fark istatistiksel anlamda $p < 0,01$ oranında önemlidir. Ancak uyarıcı ilavesi ile kapsaisin miktarındaki artış serbest hücrelerdekinden daha yüksektir.

Metil jasmonat ile uyarımın 14. gününde serbest hücrelerin süzöntüsünde kapsaisin miktarındaki değişim 16,74-21,85 µg/g t.a. arasında değişmektedir (Çizelge 4.8, Şekil 4.8). Serbest hücrelerin süzöntüsünde kontrol grubuna göre artış sadece 0,06 µM/ml metil jasmonat uygulamasında bulunmuştur. Bu artış istatistiksel olarak önemli değildir. 0,08 µM/ml metil jasmonat uygulamasında belirlenen kapsaisin miktarı ile kontrol grubunda belirlenen kapsaisin miktarı arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir.

Tutuklanmış hücrelerin süzöntüsünde 14. günde kapsaisin miktarındaki değişim 14,61-30,49 µg/g t.a. arasında belirlenmiştir. Kapsaisin miktarındaki en fazla artış 0,04 µM/ml metil jasmonat uygulamasında 30,49 µg/g t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.8).

Uygulanan tüm uyarıcı konsantrasyonlarının tutuklanmış hücrelerin süzöntülerinde kapsaisin miktarı üzerine artırıcı etkisi bulunmuştur. Uyarıcı konsantrasyonları arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,01$).

4.3.3 Serbest ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin birikimine metil jasmonat uygulamasının etkisi

Serbest hücrelerde 10. günde toplam kapsaisin miktarındaki değişim 45,68- 67,79 $\mu\text{g/g}$ t.a. arasında belirlenmiştir (Çizelge 4.9). Toplam serbest hücrelerde 0,04 $\mu\text{M/ml}$ metil jasmonat ile uyarım sonucunda kontrole göre kapsaisin miktarında önemli olmayan bir azalma bulunmuştur. Metil jasmonatın 0,06 $\mu\text{M/ml}$ ' lik uygulama konsantrasyonundan daha yüksek konsantrasyonlardaki dozları kapsaisin miktarı üzerine etkili olmuştur. 0,08 $\mu\text{M/ml}$ metil jasmonat konsantrasyonunda kapsaisin miktarı en fazla bulunmuştur.

Tutuklanmış hücrelerde 10. günde toplam kapsaisin miktarındaki değişim 77,66-112,30 $\mu\text{g/g}$ t.a. arasında belirlenmiştir. Tutuklanmış hücrelerde 0,06 $\mu\text{M/ml}$ metil jasmonat uygulama konsantrasyonuna kadar olan uyarıcı konsantrasyon artışı kontrol örneklerine göre toplam kapsaisin miktarında artışa neden olmuştur (Çizelge 4.9, Şekil 4.9). 0,1 $\mu\text{M/ml}$ metil jasmonat uygulamasında kapsaisin miktarı kontrole göre azalmıştır.

Metil jasmonat ile uyarımın 12. gününde serbest hücrelerde oluşan toplam kapsaisin miktarının değişimi 48,14-57,31 $\mu\text{g/g}$ t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.9). Kontrol örneklerine göre metil jasmonatın 0,04 $\mu\text{M/ml}$ ' lik uygulama konsantrasyonu kapsaisin miktarında azalmaya neden olmuştur. Ancak bu azalma istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır.

Tutuklanmış hücrelerde metil jasmonat ile uyarımın 12. gününde toplam kapsaisin miktarının değişimi 81,28-117,58 $\mu\text{g/g}$ t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.9). Tutuklanmış hücreler kontrolleri ile karşılaştırıldığında tüm uyarıcı konsantrasyonları toplam kapsaisin miktarı üzerine etkili olmuştur. En fazla kapsaisin miktarı 0,06 $\mu\text{M/ml}$ metil jasmonat konsantrasyonunda bulunmuştur.

Çizelge 4.9 Farklı konsantrasyonlarda metil jasmonat uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(KM-187)'un serbest ve tutuklanmış hücrelerinde toplam kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)

Zaman (gün)	Uygulama Konsantrasyonu	Toplam Kapsaisin (µg/g) t.a.							
		Serbest hücre				Tutuklanmış hücre			
10	Kontrol	49,25	±	1,46	Ab2	77,66	±	1,24	Bbc1
	0,04 µM/ml Metil jasmonat	45,68	±	1,58	Bb2	78,96	±	1,55	Cb1
	0,06 µM/ml Metil jasmonat	49,99	±	2,64	Cb2	112,30	±	1,35	Ca1
	0,08 µM/ml Metil jasmonat	67,79	±	1,28	Aa1	72,08	±	2,90	Cc1
	0,1 µM/ml Metil jasmonat	61,40	±	1,61	Aa2	69,71	±	1,13	Cd1
12	Kontrol	49,78	±	1,07	Ac2	81,28	±	1,37	Bd1
	0,04 µM/ml Metil jasmonat	48,14	±	2,56	Bc2	105,88	±	2,87	Ab1
	0,06 µM/ml Metil jasmonat	56,60	±	1,79	Bab2	117,58	±	0,42	Ba1
	0,08 µM/ml Metil jasmonat	57,31	±	2,46	Ba2	91,26	±	2,30	Ac1
	0,1 µM/ml Metil jasmonat	51,23	±	1,80	Bbc2	92,18	±	0,94	Ac1
14	Kontrol	52,74	±	0,76	Ac2	90,47	±	3,49	Ab1
	0,04 µM/ml Metil jasmonat	72,44	±	1,70	Ab2	94,39	±	2,20	Bb1
	0,06 µM/ml Metil jasmonat	102,57	±	0,15	Aa2	127,29	±	3,16	Aa1
	0,08 µM/ml Metil jasmonat	45,79	±	1,32	Cd2	80,79	±	1,93	Bc1
	0,1 µM/ml Metil jasmonat	38,49	±	0,67	Ce2	75,36	±	3,79	Bc1

Büyük harfler : Dikey sütunda aynı uyarıcı konsantrasyonlarının farklı zamanlarda Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

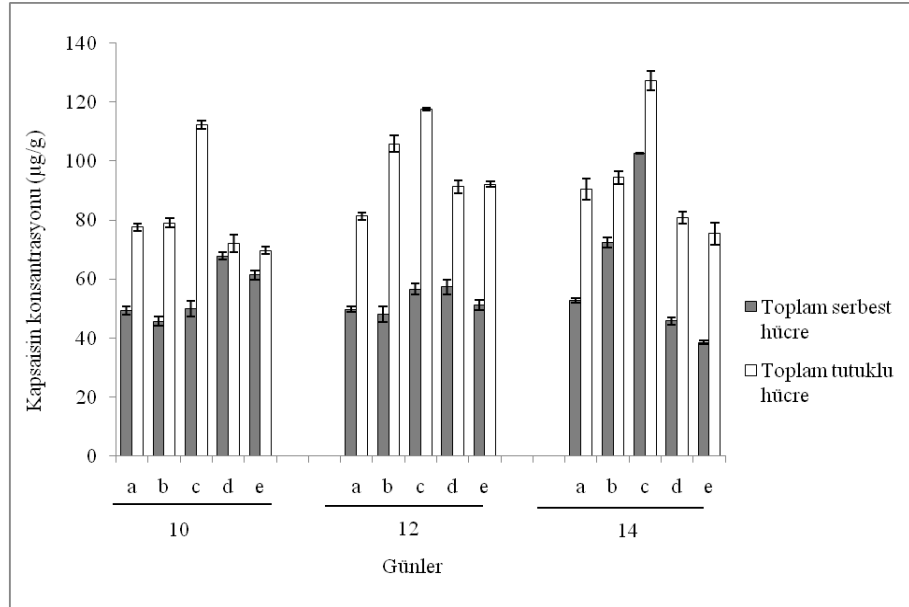
Küçük harfler : Dikey sütunda aynı uyarım zamanında uyarıcı konsantrasyonlarının Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Rakamlar : Yatay sütunda yöntemlerin Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Serbest hücrelerde metil jasmonat ile uyarımın 14. gününde toplam kapsaisin miktarındaki değişim 38,49-102,57 µg/g t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.9, Şekil 4.9). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serbest hücrelerde kapsaisin miktarında en fazla değişim 0,06 µM/ml metil jasmonat uygulamasında bulunmuştur. Serbest hücrelerde 0,08 µM/ml ve 0,1 µM/ml metil jasmonat uygulamasında kontrol örneklerine göre kapsaisin miktarında azalmalar belirlenmiştir.

Tutuklanmış hücrelerde metil jasmonat ile uyarımın 14. gününde toplam kapsaisin miktarındaki değişim 75,36-127,29 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.9). Tutuklanmış hücrelerde kontrolleri ile karşılaştırıldığında en yüksek toplam kapsaisin miktarı 0,06 µM/ml metil jasmonat uygulamasında belirlenmiştir. 0,08 µM/ml ve 0,1

$\mu\text{M/ml}$ metil jasmonat uygulamasında kontrol örneklerine göre kapsaisin miktarında azalmalar belirlenmiştir (Çizelge 4.9, Şekil 4.9). 0,08 $\mu\text{M/ml}$ ve 0,1 $\mu\text{M/ml}$ metil jasmonat uygulamalarında elde edilen kapsaisin miktarları arasındaki fark önemsizdir.



Şekil 4.9 Farklı konsantrasyonlarda metil jasmonat uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin miktarı üzerine etkisi

a: Kontrol, b: 0,04 $\mu\text{M/ml}$ metil jasmonat, c: 0,06 $\mu\text{M/ml}$ metil jasmonat, d: 0,08 $\mu\text{M/ml}$ metil jasmonat, e: 0,1 $\mu\text{M/ml}$ metil jasmonat

Serbest hücrelerde kontrol gruplarında zamanla değişen kapsaisin miktarları istatistiksel olarak önemli değildir. Metil jasmonatın 0,08 ve 0,1 $\mu\text{M/ml}$ uygulama konsantrasyonlarında uyarım zamanının artışı ile homojen olarak kapsaisin miktarı da azalmaktadır. Bu azalma Duncan testine göre $p < 0,01$ oranında önemlidir. Metil jasmonatın 0,06 $\mu\text{M/ml}$ uygulama konsantrasyonunda uyarım zamanı 10. günden 12. ve 14. güne çıkarıldığında kapsaisin miktarı artmaktadır (Çizelge 4.9, Şekil 4.9).

Tutuklanmış hücrelerde kontrol gruplarında zamanla toplam kapsaisin miktarındaki değişim karşılaştırıldığında 10 ve 12. günlerdeki fark istatistiksel olarak önemli değildir. Kontrol grubunda uyarımın 14. gününde artan kapsaisin miktarı istatistiksel olarak önemli ($p < 0,01$) bulunmuştur. Metil jasmonatın 0,06 ve 0,1 $\mu\text{M/ml}$ uygulama

konsantrasyonlarında zamanla kapsaisin miktarı azalmaktadır. Metil jasmonatın 0,06 μ M/ml uygulama konsantrasyonunda zamanla kapsaisin miktarındaki değişim istatistiksel olarak önemli ($p<0,01$) bulunmuştur (Çizelge 4.9, Şekil 4.9).

Metil jasmonat uygulamasında tutuklama işlemi kapsaisin üretimi üzerine serbest hücrelere göre daha etkili bulunmuştur. Özellikle 0,06 μ M/ml metil jasmonat uygulamasında 10. günde ve 12. günde tutuklanmış hücrelerde belirlenen kapsaisin miktarı serbest hücrelerdekinden yaklaşık iki kat daha fazladır (Çizelge 4.9, Şekil 4.9).

4.4 Serbest ve Tutuklanmış Hücre Süspansiyon Kùltürlerinde Kapsaisin Birikimine Ksantan Uygulamasının Etkisi

C. annuum L. (KM-187) serbest ve tutuklanmış hücre süspansiyon kùltürlerine ksantan uyarıcısı 0.1, 0.2, 0.25 ve 0.3 mg/ml olacak şekilde ilave edildikten sonra 10, 12 ve 14. günlerde alınan serbest ve tutuklanmış hücre süspansiyon örneklerinde belirlenen kapsaisin miktarları çizelge 4.10-4.12' de gösterilmektedir. Varyans analizi tekniğine ilişkin hesaplamalardan sonra zaman x konsantrasyon x yöntem interaksyonu istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p<0,01$). Farklı konsantrasyonlarda ksantan uygulanmış serbest ve tutuklanmış hücrelerdeki, serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzùntülerindeki ve serbest ve tutuklanmış hücrelerdeki toplam kapsaisin miktarlarının Duncan testi sonuçları ilgili ortalamalarının yanında harfli gösterim yaklaşımıyla belirtilmiştir (Çizelge 4.10-4.12).

4.4.1 Serbest ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin birikimine ksantan uygulamasının etkisi

Serbest hücrelerde 10. günde kapsaisin miktarındaki değişim 46,69 -76,36 μ g/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.10). Ksantan uygulaması sonucu serbest hücrelerde uyarımın 10. gününde kapsaisin miktarında en fazla artış 0,2 mg/ml ksantan uygulamasında belirlenmiştir. Serbest hücrelerde uygulanan tüm ksantan uyarıcı konsantrasyonları kontrole göre kapsaisin miktarında artışa neden olmuştur.

Çizelge 4.10 Farklı konsantrasyonlarda ksantan uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(KM-187) serbest ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)

Zaman (gün)	Uygulama Konsantrasyonu	Kapsaisin (µg/g) t.a.					
		Serbest hücre			Tutuklanmış hücre		
10	Kontrol	46,69	± 1,17	Ad2	69,22	± 1,09	Ae1
	0,1 mg/ml ksantan	65,24	± 0,87	Ab2	104,32	± 2,79	Bc1
	0,2 mg/ml ksantan	76,36	± 2,69	Aa2	134,61	± 1,89	Ab1
	0,25 mg/ml ksantan	66,03	± 1,95	Ab2	166,80	± 0,32	Aa1
	0,3mg/ml ksantan	53,37	± 1,56	Bc2	93,87	± 2,63	Ad1
12	Kontrol	45,32	± 1,46	Ab2	71,40	± 1,78	Ac1
	0,1 mg/ml ksantan	47,88	± 0,87	Bb2	88,44	± 1,14	Cb1
	0,2 mg/ml ksantan	58,25	± 2,08	Ba2	88,13	± 1,82	Bb1
	0,25 mg/ml ksantan	46,18	± 2,17	Bb2	135,44	± 2,68	Ba1
	0,3mg/ml ksantan	44,46	± 1,75	Cb2	73,19	± 1,79	Bc1
14	Kontrol	46,03	± 0,93	Ab2	71,60	± 2,79	Ac1
	0,1 mg/ml ksantan	46,74	± 1,48	Bb2	111,32	± 2,75	Aa1
	0,2 mg/ml ksantan	51,14	± 0,89	Cb2	74,40	± 2,16	Cc1
	0,25 mg/ml ksantan	68,52	± 1,19	Aa1	72,16	± 3,19	Cc1
	0,3mg/ml ksantan	72,16	± 3,19	Aa2	94,95	± 1,82	Ab1

Büyük harfler : Dikey sütunda aynı uyarıcı konsantrasyonlarının farklı zamanlarda Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Küçük harfler : Dikey sütunda aynı uyarım zamanında uyarıcı konsantrasyonlarının Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Rakamlar : Yatay sütunda yöntemlerin (serbest, tutuklanmış) Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

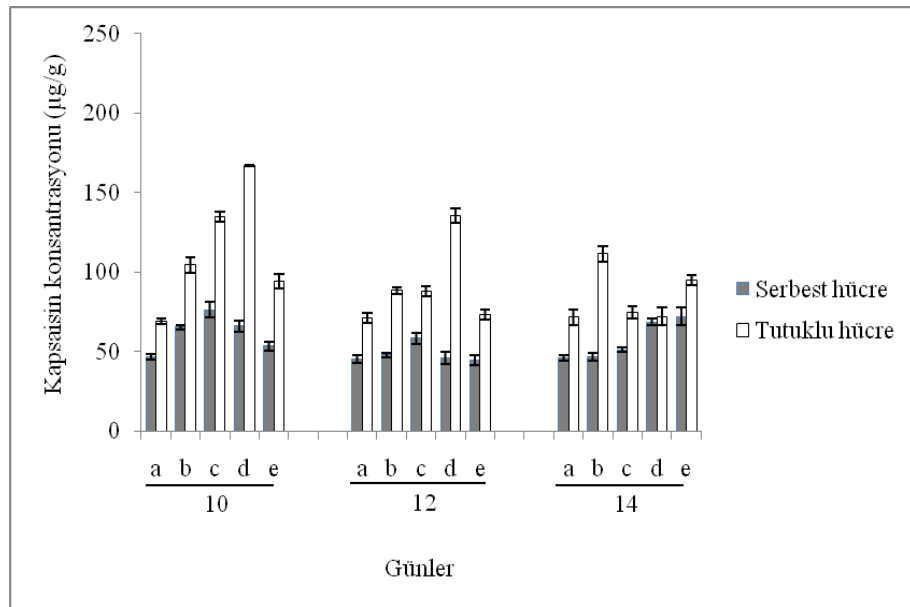
Tutuklanmış hücrelerde 10. günde kapsaisin miktarının değişimi 69,22-166,80 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.10). Tutuklanmış hücrelerde kapsaisin miktarında en fazla artış 0,25 mg/ml ksantan uygulanmasında belirlenmiştir. 0,3 mg/ml ksantan uygulamasına kadar olan her üç konsantrasyonda konsantrasyon artışına paralel olarak kapsaisin miktarı da artmaktadır. 0,3 mg/ml ksantan uygulamasında kapsaisin miktarında azalma görülse de elde edilen miktar kontrol örneklerinden daha fazladır (Çizelge 4.10). Kontrol ile karşılaştırıldığında uygulanan uyarıcı konsantrasyonları arasındaki farklar $p<0,01$ oranında önemlidir.

Tutuklanmış hücrelerin kontrollerindeki kapsaisin miktarı serbest hücrelerde belirlenenden daha fazla bulunmuştur. Uygulanan tüm ksantan konsantrasyonlarında da

tutuklama işlemi serbest hücrelere göre kapsaisin birikimi yönünden etkili bulunmuştur. Yöntemler arası bu fark istatistiksel anlamda $p<0,01$ oranında önemlidir (Çizelge 4.10, Şekil 4.10).

Ksantan ile uyarımın 12. gününde serbest hücrelerde kapsaisin miktarındaki değişim 44,46- 58,25 $\mu\text{g/g}$ t.a. arasında belirlenmiştir. (Çizelge 4.10). Serbest hücrelerde en yüksek kapsaisin miktarı 0,2 mg/ml ksantan uygulamasında belirlenmiştir (Çizelge 4.10, Şekil 4.10). Serbest hücrelerde 0,3 mg/ml ksantan uygulaması kontrol örneklerine göre kapsaisin miktarında azalmaya neden olmuştur. Bu azalma istatistiksel olarak önemli değildir ($p<0,01$).

Tutuklanmış hücrelerde kapsaisin miktarındaki değişim 12. günde 71,40-135,44 $\mu\text{g/g}$ t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.10). Tutuklanmış hücrelerde en yüksek kapsaisin miktarı 0,25 mg/ml ksantan uygulamasında belirlenmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında tutuklanmış hücrelerde 0,3 mg/ml ksantan uygulaması kapsaisin miktarında önemli bir artışa neden olmamıştır (Çizelge 4.10, Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Farklı konsantrasyonlarda ksantan uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin miktarı üzerine etkisi

a: Kontrol, b: 0,1mg/ml ksantan, c: 0,2 mg/ml ksantan, d: 0,25mg/ml ksantan, e: 0,3mg/ml ksantan

Ksantan ile uyarımın 14. gününde serbest hücrelerde kapsaisin miktarında değişim 46,03-72,16 µg/g t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.10). Serbest hücrelerde kapsaisin miktarındaki en fazla artış en yüksek uyarıcı konsantrasyonu olan 0,3 mg/ml ksantan konsantrasyonunda belirlenmiştir (Çizelge 4.10, Şekil 4.10). Uyarıcı konsantrasyonunun artışına paralel olarak serbest hücrelerde kontrole göre kapsaisin miktarı da artmaktadır. Ancak kontrol ile karşılaştırıldığında 0,25 ve 0,3 mg/ml uyarıcı konsantrasyonlarındaki artış istatistiksel olarak önemli ($p<0,01$) bulunmuşken, 0,1 ve 0,2 mg/ml uyarıcı konsantrasyonlarındaki artış önemli bulunmamıştır.

Tutuklanmış hücrelerde uyarımın 14. gününde kapsaisin miktarındaki değişim 71,60-111,32 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.10). Kontrole göre kapsaisin miktarında en fazla artış 0,1 mg/ml ksantan uygulamasında belirlenmiştir. Tutuklanmış hücrelerde kontrol ile karşılaştırıldığında 0,1 mg/ml ve 0,3 mg/ml uyarıcı konsantrasyonlarında kapsaisin miktarındaki artış istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,01$).

Tüm uyarım günleri ve konsantrasyonları dikkate alındığında serbest hücrelere göre tutuklanmış hücrelerdeki kapsaisin miktarının daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ksantan konsantrasyonları hem serbest hem tutuklanmış hücrelerde kontrol örneklerine göre kapsaisin miktarında etkili bulunmuştur (Çizelge 4.10, Şekil 4.10).

4.4.2 Serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde kapsaisin birikimine ksantan uygulamasının etkisi

Serbest hücrelerin süzüntüsünde 10. günde kapsaisin miktarındaki değişim 21,21-44,56 µg/g t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Süzüntüye geçen kapsaisin miktarında en fazla artış 0,2 mg/ml ksantan uygulamasında belirlenmiştir. Serbest hücrelerin süzüntüsünde 10. günde kontrolleri ile karşılaştırıldığında uyarıcı konsantrasyonlarının kapsaisin birikimi üzerine etkisi istatistiksel anlamda $p<0,01$ oranında önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.11 Farklı konsantrasyonlarda ksantan uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(KM-187) serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzöntülerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)

Zaman (gün)	Uygulama Konsantrasyonu	Kapsaisin (µg/g) t.a.			
		Serbest hücre süzöntüsü		Toplam hücre süzöntüsü	
10	Kontrol	25,12 ± 0,56	Ad1	17,58 ± 0,53	Bc2
	0,1 mg/ml ksantan	21,21 ± 0,67	Be1	19,25 ± 0,90	Cc1
	0,2 mg/ml ksantan	44,56 ± 1,10	Aa1	22,93 ± 1,17	Cb2
	0,25 mg/ml ksantan	39,81 ± 0,36	Ab2	44,54 ± 1,31	Aa1
	0,3mg/ml ksantan	35,59 ± 0,64	Ac2	44,59 ± 2,03	Aa1
12	Kontrol	18,02 ± 1,07	Bb2	25,68 ± 0,69	Ad1
	0,1 mg/ml ksantan	16,48 ± 0,76	Cb2	47,69 ± 1,55	Aa1
	0,2 mg/ml ksantan	18,27 ± 0,46	Cb2	42,44 ± 0,83	Ab1
	0,25 mg/ml ksantan	22,67 ± 0,39	Ba2	41,89 ± 0,96	Bb1
	0,3mg/ml ksantan	16,89 ± 0,35	Cb2	37,48 ± 0,86	Bc1
14	Kontrol	19,16 ± 0,67	Bb2	24,67 ± 0,38	Ad1
	0,1 mg/ml ksantan	24,54 ± 0,39	Aa2	33,90 ± 0,8	Bc1
	0,2 mg/ml ksantan	25,50 ± 0,50	Ba2	36,03 ± 0,64	Bbc1
	0,25 mg/ml ksantan	23,90 ± 0,71	Ba2	38,19 ± 0,64	Cb1
	0,3mg/ml ksantan	24,01 ± 0,39	Ba2	45,53 ± 0,62	Aa1

Büyük harfler : Dikey sütunda aynı uyarıcı konsantrasyonlarının farklı zamanlarda Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Küçük harfler : Dikey sütunda aynı uyarım zamanında uyarıcı konsantrasyonlarının Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Rakamlar : Yatay sütunda yöntemlerin Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir

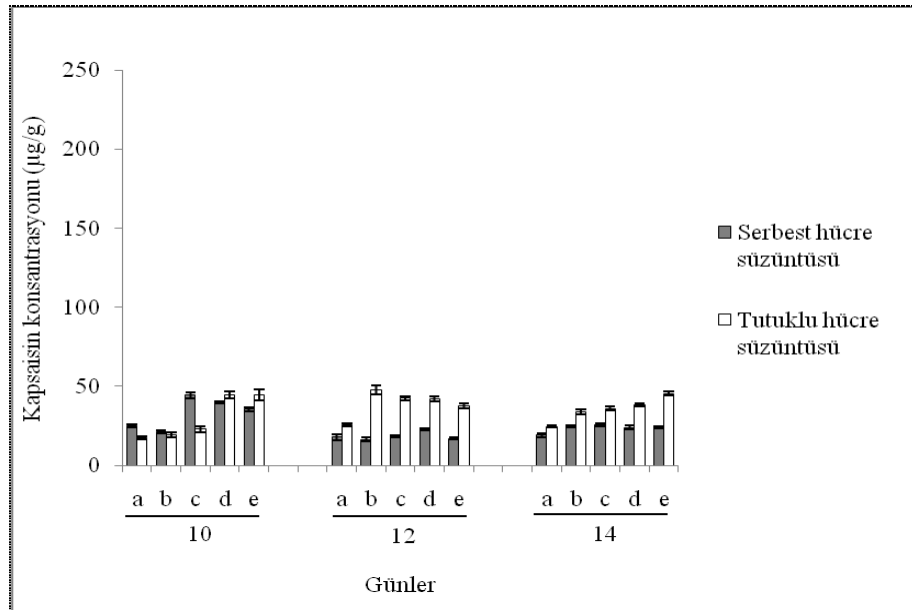
Tutuklanmış hücrelerin süzöntüsünde 10. günde kapsaisin miktarındaki değişim 17,58-44,59 µg/g t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Tutuklanmış hücrelerin süzöntülerinde konsantrasyon artışına paralel olarak kapsaisin miktarıda artmaktadır. Kontrolleri ile karşılaştırıldığında 0,1 mg/ml ksantan uygulamasındaki fark önemli değildir ($p<0.01$). Kapsaisin miktarında en fazla artış en yüksek uyarım konsantrasyonu olan 0,3 mg/ml ksantan uygulamasında 44,59 µg/g t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11).

Ksantan ile uyarımın 12. gününde serbest hücrelerin süzöntüsünde kapsaisin miktarının değişimi 16,48-22,67 µg/g t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Serbest hücrelerin süzöntüsünde kapsaisin miktarındaki en fazla artış 0,25 mg/ml ksantan uygulamasında

bulunmuştur($p<0,01$). Kontrol ile karşılaştırıldığında diğer ksantan konsantrasyonlarının kapsaisin birikimi üzerine etkisi istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır.

Ksantan ile uyarımın 12. gününde tutuklanmış hücrelerin süzöntüsünde kapsaisin miktarının değişimi 25,68-47,69 $\mu\text{g/g}$ t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Tutuklanmış hücrelerin süzöntüsünde kapsaisin miktarındaki en fazla artış 0,1 mg/ml ksantan uygulamasında belirlenmiştir.

Tutuklanmış hücrelerin süzöntülerinde belirlenen kapsaisin miktarı 12. günde serbest hücrelerin süzöntülerinde belirlenen kapsaisin miktarından daha fazladır. Ksantanın 0,1 mg/ml konsantrasyonunda tutuklanmış hücrelerin süzöntüsünde tayin edilen kapsaisin miktarı serbest hücrelerin süzöntüsünde tayin edilen kapsaisin miktarından yaklaşık 3 kat fazladır.



Şekil 4.11 Farklı konsantrasyonlarda ksantan uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerin süzöntülerinde kapsaisin miktarı üzerine etkisi

a: Kontrol, b: 0,1mg/ml ksantan, c: 0,2 mg/ml ksantan, d: 0,25mg/ml ksantan, e: 0,3mg/ml ksantan

Ksantan ile uyarımın 14. gününde serbest hücrelerin süzöntülerinde belirlenen kapsaisin miktarları 19,16-25,50 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.11). Ksantan konsantrasyonları kontrol ile karşılaştırıldığında kapsaisin miktarını artırıcı etki yapmışlardır. Serbest hücrelerin süzöntüsünde en fazla kapsaisin 0,2 mg/ml ksantan uygulamasında bulunmuştur (Şekil 4.11). Uyarıcı konsantrasyonları kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir.

Tutuklanmış hücrelerin süzöntülerinde 14. günde belirlenen kapsaisin miktarları 24,67-45,53 µg/g t.a. olarak değişim göstermiştir (Çizelge 4.11). Tutuklanmış hücrelerin süzöntüsünde en fazla kapsaisin, en yüksek uyarıcı konsantrasyonu olan 0,3 mg/ml ksantan uygulamasında belirlenmiştir. Tutuklanmış hücrelerin süzöntülerinde uyarıcı konsantrasyonunun artışına paralel olarak kapsaisin miktarı da artmaktadır.

Tüm uyarım süreleri dikkate alındığında serbest hücrelerin süzöntüsünde en fazla kapsaisin 10. günde 0,2 mg/ml ksantan uygulamasında, tutuklanmış hücrelerin süzöntüsünde ise 12. günde 0,1 mg/ml ksantan uygulamasında belirlenmiştir.

4.4.3 Serbest ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin birikimine ksantan uygulamasının etkisi

Serbest hücrelerde 10. günde toplam kapsaisin miktarları 71,81-120,92 µg/g t.a. arasında değişmektedir (Çizelge 4.12). Kapsaisin miktarında en fazla artış 0,2 mg/ml ksantan uygulamasında belirlenmiştir. Serbest hücrelerde ksantan konsantrasyonlarının toplam kapsaisin miktarı bakımından sıralanışları 0,1 mg/ml < 0,3 mg/ml < 0,25 mg/ml < 0,2 mg/ml şeklindedir (Çizelge 4.12). Serbest hücrelerde 10. günde kontrol örnekleri ile uygulama konsantrasyonlarının toplam kapsaisin birikimi üzerine etkisi arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,01$). Ksantanın 0,1 mg/ml ve 0,3 mg/ml konsantrasyonlarının kapsaisin birikimi üzerine etkisi arasındaki farklar önemli değildir.

Tutuklanmış hücrelerde 10. günde toplam kapsaisin miktarları 86,79-211,34 µg/g t.a. arasında değişmektedir (Çizelge 4.12). En fazla kapsaisin miktarı 0,25 mg/ml ksantan

uygulamasında belirlenmiştir. Ksantan konsantrasyonlarının tayin edilen kapsaisin miktarlarına göre sıralanışları 0,1 mg/ml < 0,2 mg/ml < 0,3 mg/ml < 0,25 mg/ml şeklindedir (Çizelge 4.12).

Çizelge 4. 12 Farklı konsantrasyonlarda ksantan uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(KM-187) toplam serbest ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)

Zaman (gün)	Uygulama Konsantrasyonu	Kapsaisin (µg/g) t.a.					
		Toplam serbest hücre			Toplam tutuklanmış hücre		
10	Kontrol	71,81	± 1,52	Ad2	86,79	± 1,62	Be1
	0,1 mg/ml ksantan	86,44	± 0,77	Ac2	123,57	± 2,72	Cd1
	0,2 mg/ml ksantan	120,92	± 3,50	Aa2	157,54	± 2,98	Ab1
	0,25 mg/ml ksantan	105,84	± 2,30	Ab2	211,34	± 1,63	Aa1
	0,3mg/ml ksantan	88,97	± 2,04	Bc2	138,45	± 4,58	Ac1
12	Kontrol	63,34	± 2,42	Bbc2	97,09	± 1,09	Ad1
	0,1 mg/ml ksantan	64,36	± 0,54	Bbc2	136,12	± 1,94	Bb1
	0,2 mg/ml ksantan	76,52	± 2,20	Ba2	130,57	± 2,24	Bb1
	0,25 mg/ml ksantan	68,85	± 2,36	Cb2	177,34	± 3,64	Ba1
	0,3mg/ml ksantan	61,35	± 1,55	Cc2	110,67	± 2,41	Bc1
14	Kontrol	65,18	± 1,59	Bbc2	96,27	± 2,44	Ac1
	0,1 mg/ml ksantan	71,28	± 1,85	Bbc2	145,22	± 2,14	Aa1
	0,2 mg/ml ksantan	76,64	± 0,44	Bb2	110,43	± 1,91	Cb1
	0,25 mg/ml ksantan	92,42	± 1,46	Ba2	110,35	± 3,33	Cb1
	0,3mg/ml ksantan	96,17	± 2,89	Aa2	140,48	± 1,68	Aa1

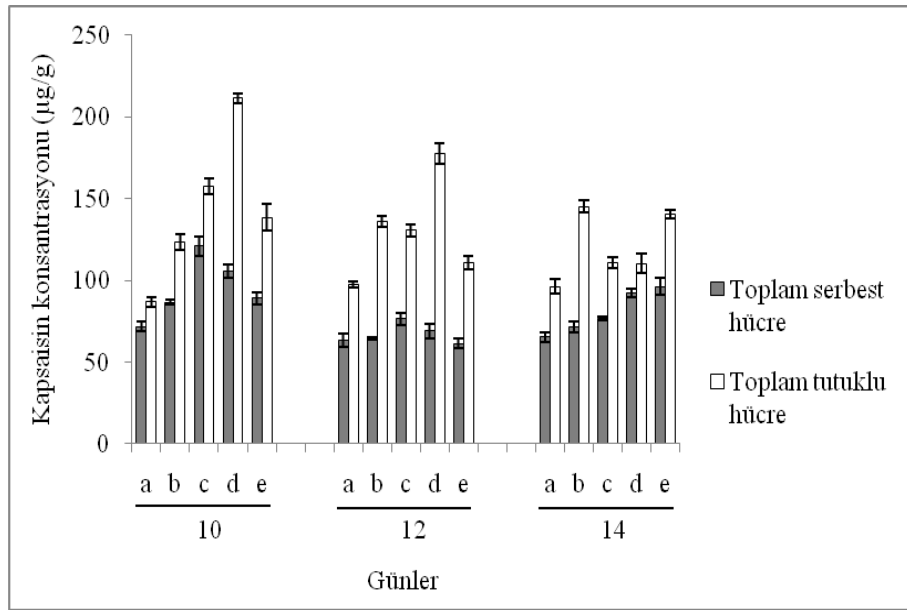
Büyük harfler : Dikey sütunda aynı uyarıcı konsantrasyonlarının farklı zamanlarda Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Küçük harfler : Dikey sütunda aynı uyarım zamanında uyarıcı konsantrasyonlarının Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Rakamlar : Yatay sütunda yöntemlerin Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Tutuklanmış hücrelerde kontrol ile uygulama konsantrasyonlarının kapsaisin miktarı üzerine etkisi arasındaki farklar istatistiksel anlamda $p<0,01$ oranında önemlidir. Tutuklanmış hücrelerde 10. günde kapsaisin miktarları serbest hücrelerden daha fazla bulunmuştur (Çizelge 4.12, Şekil 4.12). Özellikle 0,25 mg/ml ksantan uygulamasında tutuklama işlemi ile belirlenen kapsaisin miktarları serbest hücrelerdekinin yaklaşık iki katıdır. Yöntemler arası bu fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,01$).

Serbest hücrelerde 12. günde kapsaisin toplam miktarının değişimi 61,35-76,52 $\mu\text{g/g}$ t.a. arasındadır (Çizelge 4.12). Kapsaisin miktarında en fazla artış 0,2 mg/ml ksantan konsantrasyonunda bulunmuştur ($p<0,01$). Kontrol ile karşılaştırıldığında diğer konsantrasyonların kapsaisin birikimi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.



Şekil 4.12 Farklı konsantrasyonlarda ksantan uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin miktarı üzerine etkisi

a: Kontrol, b: 0,1mg/ml ksantan, c: 0,2 mg/ml ksantan, d: 0,25mg/ml ksantan, e: 0,3mg/ml ksantan

Tutuklanmış hücrelerde 12. günde toplam kapsaisin miktarının değişimi 97,09-177,34 $\mu\text{g/g}$ t.a. arasındadır (Çizelge 4.12). Kapsaisin miktarında en fazla artış 0,25 mg/ml uyarıcı konsantrasyonunda gerçekleşmiştir ($p<0,01$). Kontrol ile karşılaştırıldığında uyarıcı konsantrasyonları arasındaki fark $p<0,01$ oranında önemlidir.

Serbest hücrelerde 14. günde toplam kapsaisin miktarının değişimi 65,18-96,17 $\mu\text{g/g}$ t.a. arasındadır (Çizelge 4.12). En fazla kapsaisin birikimi 0,3 mg/ml ksantan uygulamasında belirlenmiştir. Ksantan konsantrasyonunun artışına paralel olarak toplam serbest hücrelerde kapsaisin miktarı artmaktadır.

Tutuklanmış hücrelerde 14. günde toplam kapsaisin miktarının değişimi 96,27-145,22 µg/g t.a. arasındadır (Çizelge 4.12). En fazla kapsaisin miktarı 0,1 mg/ml ksantan konsantrasyonunda bulunmuştur. Ksantan konsantrasyonları tutuklanmış hücrelerdeki toplam kapsaisin miktarları açısından karşılaştırıldığında 0,25 mg/ml<0,2 mg/ml<0,3 mg/ml<0,1mg/ml şeklinde bir dizi takip etmektedir (Çizelge 4.12, Şekil 4.12).

Serbest hücrelerde kontrol gruplarında toplam kapsaisin miktarının zamanla değişimi 12. ve 14. günde birbirine benzerdir. Kontrol gruplarında 10. günde belirlenen kapsaisin miktarı istatistiksel olarak $p<0,01$ oranında diğer uygulama günlerinden farklıdır (Çizelge 4.12, Şekil 4.12).

Tüm günler ve uyarıcı konsantrasyonları dikkate alındığında serbest hücrelerde en fazla kapsaisin miktarı 10. günde 0,2 mg/ml ksantan konsantrasyonunda 120,92 µg/g t.a. olarak, tutuklanmış hücrelerde ise 10. günde 0,25 mg/ml ksantan konsantrasyonunda 211,34 µg/g t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.12, Şekil 4.12).

4.5 Serbest ve Tutuklanmış Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Kapsaisin Birikimine Kurdan Uygulamasının Etkisi

C. annuum L. (KM-187) serbest ve tutuklanmış hücre süspansiyon kültürlerine kurdan uyarıcısı 0.1, 0.2, 0.25 ve 0.3 mg/ml olacak şekilde ilave edildikten sonra 10, 12 ve 14. günlerde alınan serbest ve tutuklanmış hücre süspansiyon örneklerinde belirlenen kapsaisin miktarları çizelge 4,13-4.15’ de gösterilmektedir. Varyans analizi tekniğine ilişkin hesaplamalardan sonra zaman x konsantrasyon x yöntem interaksyonu istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p<0,01$). Farklı konsantrasyonlarda kurdan uygulanmış serbest ve tutuklanmış hücrelerdeki, serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerindeki ve serbest ve tutuklanmış hücrelerdeki toplam kapsaisin miktarlarının Duncan testi sonuçları ilgili ortalamalarının yanında harfli gösterim yaklaşımıyla belirtilmiştir (Çizelge 4.13-4.15).

4.5.1 Serbest ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin birikimi üzerine kurdan uygulamasının etkisi

Farklı konsantrasyonlarda kurdan uygulaması ile 10. günde serbest hücrelerde kapsaisin miktarının değişimi 30,33-78,69 µg/g t.a. arasındadır (Çizelge 4.13). Serbest hücrelerde 10. günde kurdan konsantrasyonu artışına paralel olarak kapsaisin konsantrasyonu da artmaktadır. Serbest hücrelerde en yüksek kapsaisin miktarı 0,3 mg/ml kurdan uygulamasında belirlenmiştir. Serbest hücrelerde 10. günde kontrol ile uyarıcı konsantrasyonları karşılaştırıldığında sadece 0,3 mg/ml kurdan uygulamasında istatistiksel anlamda $p < 0,01$ oranında fark bulunmuştur.

Çizelge 4.13 Farklı konsantrasyonlarda kurdan uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(KM-187) serbest ve tutuklanmış hücrelerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)

Zaman (gün)	Uygulama Konsantrasyonu	Kapsaisin (µg/g) t.a.					
		Serbest hücre			Tutuklanmış hücre		
10	Kontrol	30,33	± 0,18	Ab2	73,43	± 1,90	Ad1
	0,1 mg/ml kurdan	37,01	± 1,53	Ab2	139,05	± 2,61	Bc1
	0,2 mg/ml kurdan	38,02	± 0,52	Ab2	338,67	± 3,90	Bb1
	0,25 mg/ml kurdan	38,74	± 0,16	Ab2	390,94	± 5,63	Aa1
	0,3mg/ml kurdan	78,69	± 0,50	Aa2	135,63	± 3,20	Ac1
12	Kontrol	35,92	± 1,54	Aa2	77,44	± 3,02	Ae1
	0,1 mg/ml kurdan	36,31	± 4,23	Aa2	136,05	± 4,68	Bc1
	0,2 mg/ml kurdan	37,36	± 1,37	Aa2	338,88	± 3,52	Ba1
	0,25 mg/ml kurdan	35,93	± 3,48	Aa2	156,28	± 3,75	Bb1
	0,3mg/ml kurdan	36,31	± 1,07	Ba2	96,78	± 0,15	Bd1
14	Kontrol	32,59	± 0,90	Aa2	75,70	± 1,84	Ad1
	0,1 mg/ml kurdan	35,59	± 1,03	Aa2	179,33	± 0,85	Ab1
	0,2 mg/ml kurdan	34,21	± 1,92	Aa2	389,76	± 1,59	Aa1
	0,25 mg/ml kurdan	34,79	± 1,59	Aa2	140,05	± 2,53	Cc1
	0,3mg/ml kurdan	32,42	± 0,79	Ba2	79,22	± 2,35	Cd1

Büyük harfler : Dikey sütunda aynı uyarıcı konsantrasyonlarının farklı zamanlarda Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Küçük harfler : Dikey sütunda aynı uyarım zamanında uyarıcı konsantrasyonlarının Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Rakamlar : Yatay sütunda yöntemlerin Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

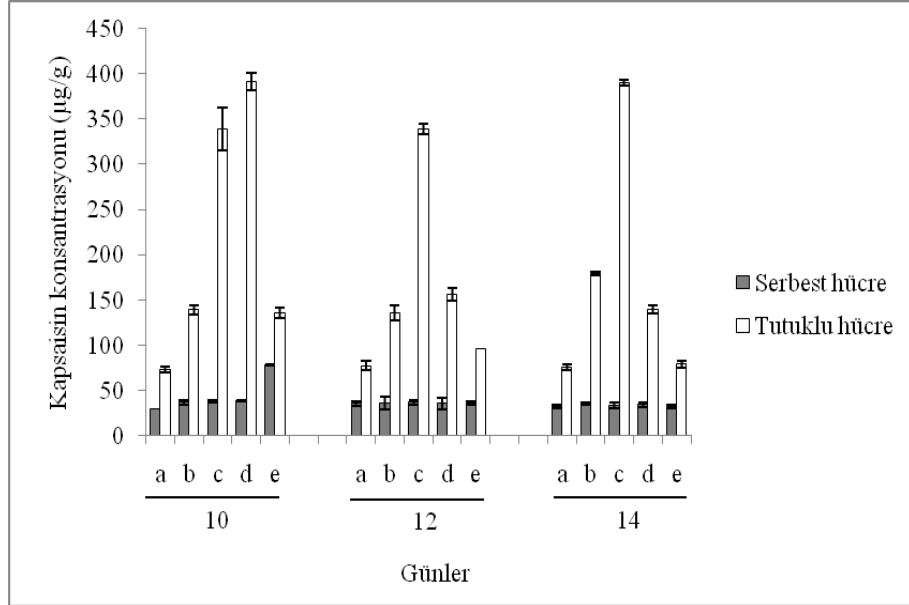
Tutuklanmış hücrelerde 10. günde kapsaisin miktarının değişimi 73,43-390,94 µg/g t.a. şeklindedir (Çizelge 4.13). Tutuklanmış hücrelerde 10. günde en fazla kapsaisin miktarı 0,25 mg/ml kurdan uygulamasında belirlenmiştir (EK 9). Belirlenen bu 390,94 µg/g t.a. kapsaisin miktarı aynı konsantrasyonda serbest hücrelerde tayin edilen 38,741 µg/g t.a. değerinin yaklaşık on katıdır. Tutuklanmış hücrelerdeki kapsaisin miktarları kurdan konsantrasyonları açısından karşılaştırıldığında sıralama 0,3 mg/ml<0,1 mg/ml<0,2 mg/ml<0,25 mg/ml şeklindedir (Çizelge 4.13). Tutuklanmış hücrelerde 10. günde kontrol ile uyarıcı konsantrasyonlarının kapsaisin birikimi üzerine etkisi bakımından aralarındaki fark istatistiksel olarak $p<0,01$ oranında önemlidir. Kurdanların 0,1 mg/ml ve 0,3 mg/ml uygulama konsantrasyonları arasında kapsaisin birikimi üzerine benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Tutuklanmış hücreler ve serbest hücrelerin kontrolleri 10. günde karşılaştırıldığında tutuklama işleminin kapsaisin birikimi üzerine etkili olduğu belirlenmiştir. Tutuklanmış hücrelerin kontrollerinde kapsaisin miktarının birikimi serbest hücrelerden yaklaşık iki kat daha fazla bulunmuştur. Serbest hücrelerde kurdan konsantrasyonlarından sadece 0,3 mg/ml uygulama konsantrasyonu kapsaisin birikimi üzerine etkili bulunmuştur. Tutuklanmış hücrelerde ise uygulanan tüm kurdan konsantrasyonları kapsaisin birikimi üzerine etkili olmuştur. Tutuklanmış hücrelerde 0,25 mg/ml kurdan konsantrasyonunda serbest hücrelerden on kat daha fazla kapsaisin birikimi bulunmuştur (Çizelge 4.13, Şekil 4.13).

Serbest hücrelerde kurdan uygulaması sonucu 12. günde kapsaisin miktarının değişimi 35,92-37,36 µg/g t.a. arasında bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kurdan konsantrasyonları serbest hücrelerde kapsaisin miktarında önemli bir değişime neden olmamıştır (Çizelge 4.13, Şekil 4.13).

Tutuklanmış hücrelerde kurdan uygulaması sonucu 12. günde kapsaisin miktarının değişimi 77,44-338,88 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.13). Kapsaisin miktarındaki en fazla artış 0,2 mg/ml kurdan uygulamasında belirlenmiştir. Uygulanan 0,2 mg/ml kurdan konsantrasyonu ile tutuklanmış hücrelerde 338,88 µg/g t.a. kapsaisin

miktarı, serbest hücrelerde tayin edilen 37,36 $\mu\text{g/g}$ t.a. kapsaisin miktarından yaklaşık on kat fazladır (Çizelge 4.13,Şekil 4.13). Tutuklanmış hücrelerde 12. günde 0,2 mg/ml kurdan uygulamasında aniden artan kapsaisin birikimi 0,25 mg/ml kurdan uygulamasında yaklaşık olarak yarı yarıya azalmıştır.



Şekil 4.13 Farklı konsantrasyonlarda kurdan uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerde kapsaisin miktarı üzerine etkisi

a: Kontrol, b: 0,1mg/ml kurdan c: 0,2 mg/ml kurdan, d: 0,25mg/ml kurdan, e: 0,3mg/ml kurdan

Kurdan uygulaması sonucu 14. günde serbest hücrelerde belirlenen kapsaisin miktarı 32,42-35,59 $\mu\text{g/g}$ t.a. aralığında bulunmuştur. Kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında kurdan uygulama konsantrasyonları kapsaisin miktarı üzerine etkili değildir. 0,3 mg/ml kurdan uygulamasında kapsaisin miktarında kontrole göre azalmalar bulunmuştur (Çizelge 4.13, Şekil 4.13). Bu azalma istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Tutuklanmış hücrelerde 14. günde kapsaisin miktarındaki değişim 75,30-389,76 $\mu\text{g/g}$ t.a. olarak belirlenmiştir. Kapsaisin miktarındaki en fazla artış 0,2 mg/ml kurdan uygulamasında belirlenmiştir (Çizelge 4,13, Şekil 4.13). Tutuklanmış hücrelerde 14. günde 0,1 mg/ml kurdan konsantrasyonunda kontrole göre kapsaisin birikimi

artmaktadır. 0,2 mg/ml kurdan konsantrasyonunda birden artan kapsaisin birikimi 0,25 mg/ml kurdan konsantrasyonunda üçte bir oranında azalmıştır. Kontrol örneklerindeki kapsaisin miktarı ile 0,3 mg/ml kurdan konsantrasyonlarında biriken kapsaisin miktarı arasındaki fark istatistiksel anlamda önemsiz bulunmuştur.

Serbest hücrelerde kontrol gruplarında kapsaisin miktarının zamanla değişimi karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Uygulanan kurdan uyarıcı konsantrasyonlarında kapsaisin miktarının zamanla değişimi karşılaştırıldığında 0,1, 0,2 ve 0,25 mg/ml uygulama konsantrasyonlarında belirlenen kapsaisin miktarları arasında fark bulunamamıştır. Kurdanın 0,3 mg/ml uygulama konsantrasyonunda 10. günde belirlenen kapsaisin miktarı 12. ve 14. günde benzer olan kapsaisin miktarından istatistiksel anlamda $p<0,01$ oranında önemlidir.

Tutuklanmış hücrelerde ve serbest hücrelerde kontrol gruplarında kapsaisin miktarının zamanla değişimi karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Kurdanın 0,1 ve 0,2 mg/ml uygulama konsantrasyonunda 10 ve 12. günde kapsaisin miktarında istatistiksel olarak bir artış görülmezken, 14. gündeki artış bu zaman periyotlarına göre istatistiksel olarak ($p<0,01$) önemlidir (Çizelge 4.13, Şekil 4.13).

Tüm kurdan uyarıcı konsantrasyonları ve günleri dikkate alındığında serbest hücrelerde en yüksek kapsaisin miktarı 10. günde 0,3 mg/ml kurdan uygulamasında 78,69 $\mu\text{g/g}$ t.a. olarak, tutuklanmış hücrelerde ise 10. günde 0,25 mg/ml kurdan uygulamasında 390,94 $\mu\text{g/g}$ t.a. olarak belirlenmiştir. 0,2 mg/ml uygulama konsantrasyonunda her üç uyarım gününde de serbest hücrelerden on kat daha fazla kapsaisin miktarı bulunmuştur (Çizelge 4.13, Şekil 4.13).

4.5.2 Serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde kapsaisin birikimine kurdan uygulamasının etkisi

Serbest hücrelerin süzüntülerinde 10. günde belirlenen kapsaisin miktarları 23,66-69,68 µg/g t.a. arasında değişmektedir (Çizelge 4.14). Kapsaisin miktarındaki en fazla artış 0,3 mg/ml kurdan uygulamasında belirlenmiştir. Serbest hücrelerin süzüntüsünde 10. günde tayin edilen kapsaisin miktarı açısından kurdan konsantrasyonlarının sıralanışı 0,1 mg/ml<0,25 mg/ml< 0,2mg/ml<0,3 mg/ml şeklindedir (Çizelge 4.14). Kontrolleri ile karşılaştırıldığında uygulama konsantrasyonları arasındaki fark önemli bulunmuştur (p<0,01). Kurdanın 0,2 ve 0,3 mg/ml uygulama konsantrasyonlarında kapsaisin birikimi artmıştır.

Çizelge 4.14 Farklı konsantrasyonlarda kurdan uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(KM-187)'un serbest ve tutuklanmış hücrelerinin süzüntülerinde kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)

Zaman (gün)	Uygulama Konsantrasyonu	Kapsaisin (µg/g) t.a.			
		Serbest hücre süzüntüsü		Tutuklanmış hücre süzüntüsü	
10	Kontrol	23,66	± 1,03 Bd1	18,29	± 0,77 Ad2
	0,1 mg/ml kurdan	28,85	± 0,56 Bc1	31,25	± 0,65 Bb1
	0,2 mg/ml kurdan	66,42	± 1,42 Ca1	36,26	± 1,13 Aa2
	0,25 mg/ml kurdan	57,31	± 1,57 Ab1	24,95	± 0,81 Bc2
	0,3mg/ml kurdan	69,68	± 0,51 Aa1	20,46	± 1,23 Ad2
12	Kontrol	21,36	± 0,50 Be1	19,09	± 0,4 Ad1
	0,1 mg/ml kurdan	47,53	± 5,02 Ad1	35,92	± 0,61 Aa2
	0,2 mg/ml kurdan	80,18	± 0,68 Aa1	27,73	± 0,4 Bb2
	0,25 mg/ml kurdan	52,40	± 0,39 Bc1	23,97	± 0,26 Bc2
	0,3mg/ml kurdan	70,45	± 0,96 Ab1	17,58	± 0,48 Ad2
14	Kontrol	28,28	± 0,57 Ae1	20,74	± 0,71 Ac2
	0,1 mg/ml kurdan	50,65	± 0,34 Ac1	21,38	± 0,66 Cc2
	0,2 mg/ml kurdan	71,33	± 1,18 Ba1	36,93	± 0,58 Aa2
	0,25 mg/ml kurdan	60,79	± 0,58 Ab1	28,88	± 0,55 Ab2
	0,3mg/ml kurdan	33,31	± 0,32 Bd1	19,63	± 0,53 Ac2

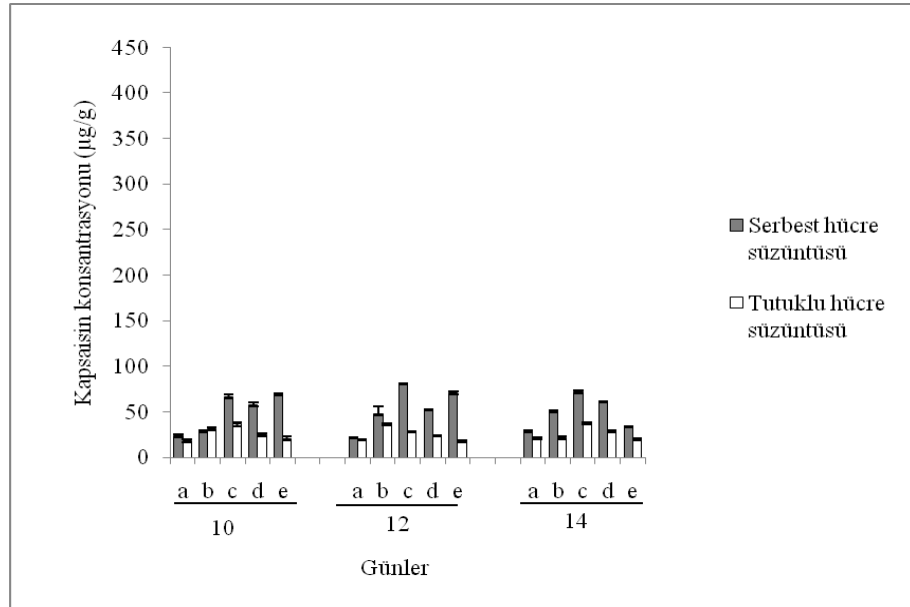
Büyük harfler : Dikey sütunda aynı uyarıcı konsantrasyonlarının farklı zamanlarda Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Küçük harfler : Dikey sütunda aynı uyarım zamanında uyarıcı konsantrasyonlarının Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Rakamlar : Yatay sütunda yöntemlerin Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Tutuklanmış hücrelerin süzöntüsünde 10. günde belirlenen kapsaisin miktarları 18,29-36,26 µg/g t.a. arasında değişmektedir (Çizelge 4.14). Kapsaisin miktarındaki en fazla artış 0,2 mg/ml kurdan uygulamasında belirlenmiştir. Tutuklanmış hücrelerin süzöntülerinde tayin edilen kapsaisin miktarı açısından kurdan konsantrasyonlarının sıralanışı 0,3 mg/ml<0,25 mg/ml<0,1 mg/ml<0,2 mg/ml şeklindedir (Çizelge 4.14).

Serbest hücrelerin süzöntülerinde belirlenen kapsaisin miktarları 0,1 mg/ml kurdan uygulaması haricinde tutuklanmış hücre süzöntülerinden daha yüksektir (Çizelge 4.14, Şekil 4.14).



Şekil 4.14 Farklı konsantrasyonlarda kurdan uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerin süzöntülerinde kapsaisin miktarı üzerine etkisi

a: Kontrol, b: 0,1mg/ml kurdan c: 0,2 mg/ml kurdan, d: 0,25mg/ml kurdan, e: 0,3mg/ml kurdan

Serbest hücrelerin süzöntüsünde 12. günde kapsaisin miktarındaki değişim 21,36-80,18 µg/g t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.14). En fazla kapsaisin miktarı 0,2 mg/ml kurdan uygulamasında bulunmuştur. Belirlenen kapsaisin miktarlarına göre kurdan konsantrasyonlarının sıralanışı 0,1mg/ml<0,25mg/ml<0,3mg/ml<0,2mg/ml şeklindedir (Çizelge 4.14, Şekil 4.14).

Tutuklanmış hücrelerin süzöntüsünde 12. günde kapsaisin miktarındaki değişim 17,58-35,92 µg/g t.a. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.14). En fazla kapsaisin miktarı 0,1 mg/ml kurdan uygulamasında bulunmuştur. Belirlenen kapsaisin miktarlarına göre kurdan konsantrasyonlarının sıralanışı 0,3 mg/ml<0,25 mg/ml<0,2 mg/ml<0,1 mg/ml şeklindedir (Çizelge 4.14, Şekil 4.14). Kurdan konsantrasyonu arttıkça süzöntüye geçen kapsaisin miktarı azalmaktadır.

Serbest hücrelerin süzöntüsünde 14. günde kapsaisin miktarının değişimi 28,28-71,33 µg/g t.a. arasındadır (Çizelge 4.14). Kontrol uygulaması ile uyarıcı konsantrasyonları arasındaki fark $p<0,01$ oranında önemli bulunmuştur. En fazla kapsaisin miktarı 0,2 mg/ml kurdan uygulamasında belirlenmiştir ($p<0,01$).

Tutuklanmış hücrelerin süzöntüsünde 14. günde kapsaisin miktarının değişimi 19,63-36,93 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.14). Kapsaisin miktarında en fazla artış 0,2 mg/ml kurdan uygulamasında belirlenmiştir ($p<0,01$). Kontrol ile karşılaştırıldığında 0,1 ve 0,3 mg/ml uygulama konsantrasyonları arasındaki fark önemsizdir.

Serbest ve tutuklanmış hücre süzöntüleri 14. günde karşılaştırıldığında serbest hücrelerde süzöntüye geçen kapsaisin miktarı daha yüksek bulunmuştur. Tüm kurdan konsantrasyonlarında serbest hücrelerde süzöntüye geçen miktar tutuklanmış hücrelerden yaklaşık iki kat daha fazla belirlenmiştir (Çizelge 4.14, Şekil 4.14).

4.5.3 Serbest ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin birikimine kurdan uygulamasının etkisi

Toplam serbest hücrelerde 10. günde kapsaisin miktarındaki değişim 53,98-148,37 µg/g t.a. şeklindedir (Çizelge 4.15). En fazla kapsaisin miktarı 0,3 mg/ml kurdan uygulamasında belirlenmiştir ($p<0,01$). Uygulanan tüm kurdan konsantrasyonlarında kontrole göre kapsaisin miktarında artış belirlenmiştir. 0,2 ve 0,25 mg/ml kurdan

konsantrasyonlarında belirlenen kapsaisin miktarları birbirine yakın bulunmuştur ve aralarındaki fark istatistiksel anlamda önemsizdir. Kurdlanın 0,1 mg/ml uyarıcı konsantrasyonunda kapsaisin miktarında kontrole göre artış vardır, fakat uygulanan diğer konsantrasyonlara göre bu kapsaisin miktarı daha düşüktür ($p<0,01$)

Çizelge 4.15 Farklı konsantrasyonlarda kurdan uygulamalarının, *Capsicum annuum* L.(KM-187) serbest ve tutuklanmış hücrelerinde toplam kapsaisin miktarına değişen zamanlarda etkilerinin incelenmesi (n=3)

Zaman (gün)	Uygulama Konsantrasyonu	Toplam kapsaisin ($\mu\text{g/g}$) t.a.					
		Serbest hücre			Tutuklanmış hücre		
10	Kontrol	53,98	$\pm 1,17$	Ad2	91,71	$\pm 2,08$	Ae1
	0,1 mg/ml kurdan	65,85	$\pm 1,29$	Bc2	170,30	$\pm 3,18$	Bc1
	0,2 mg/ml kurdan	104,44	$\pm 0,91$	Bb2	374,93	$\pm 3,80$	Bb1
	0,25 mg/ml kurdan	96,05	$\pm 1,70$	Ab2	415,90	$\pm 6,42$	Aa1
	0,3mg/ml kurdan	148,37	$\pm 0,21$	Aa1	156,09	$\pm 2,22$	Ad1
12	Kontrol	57,28	$\pm 1,79$	Ac2	96,52	$\pm 3,36$	Ad1
	0,1 mg/ml kurdan	83,84	$\pm 7,04$	Ab2	171,97	$\pm 5,25$	Bb1
	0,2 mg/ml kurdan	117,54	$\pm 1,84$	Aa2	366,60	$\pm 3,91$	Ba1
	0,25 mg/ml kurdan	88,33	$\pm 3,57$	Ab2	180,24	$\pm 3,51$	Bb1
	0,3mg/ml kurdan	106,75	$\pm 0,28$	Ba1	114,36	$\pm 0,56$	Bc1
14	Kontrol	60,87	$\pm 1,45$	Ac2	96,44	$\pm 2,43$	Ad1
	0,1 mg/ml kurdan	86,24	$\pm 1,30$	Ab2	200,72	$\pm 0,80$	Ab1
	0,2 mg/ml kurdan	105,54	$\pm 3,08$	Ba2	426,69	$\pm 2,17$	Aa1
	0,25 mg/ml kurdan	95,58	$\pm 1,32$	Aab2	168,92	$\pm 2,81$	Cc1
	0,3mg/ml kurdan	65,73	$\pm 1,07$	Cc2	98,85	$\pm 2,85$	Cd1

Büyük harfler : Dikey sütunda aynı uyarıcı konsantrasyonlarının farklı zamanlarda Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Küçük harfler : Dikey sütunda aynı uyarım zamanında uyarıcı konsantrasyonlarının Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

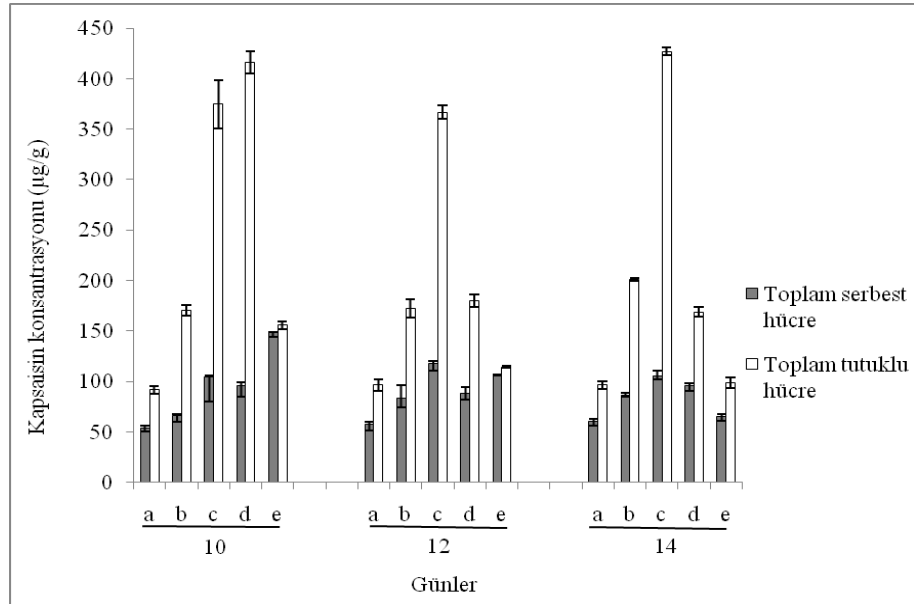
Rakamlar : Yatay sütunda yöntemlerin Duncan testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

Tutuklanmış hücrelerde 10. günde toplam kapsaisin miktarındaki değişim 91,71-415,90 $\mu\text{g/g}$ t.a. şeklindedir (Çizelge 4.15). Toplam tutuklanmış hücrelerde 10. günde en fazla kapsaisin miktarı 0,25 mg/ml kurdan uygulamasında bulunmuştur. Kontrol ile karşılaştırıldığında uygulanan tüm kurdan konsantrasyonları kapsaisin miktarında artışa neden olmuştur.

Tutuklanmış hücrelerde belirlenen toplam kapsaisin miktarı 10. günde serbest hücrelerde belirlenen toplam kapsaisin miktarından daha yüksektir. Tutuklanmış hücrelerde 0,25 mg/ml kurdan uygulamasında belirlenen toplam kapsaisin miktarı, serbest hücrelerde belirlenen kapsaisin miktarından yaklaşık 4 kat daha fazladır.

Serbest hücrelerde 12. günde toplam kapsaisin miktarındaki değişim 57,28-117,54 µg/g t.a. şeklindedir (Çizelge 4.15). Uygulanan tüm kurdan konsantrasyonlarında kontrole göre artışlar belirlenmiştir. En fazla kapsaisin miktarı 0,2 mg/ml kurdan uygulamasında belirlenmiştir. Kurdanların 0,2 ve 0,3 mg/ml'lik konsantrasyonlarında belirlenen kapsaisin birikimi birbirine yakındır ($p<0,01$).

Tutuklanmış hücrelerde 12. günde toplam kapsaisin miktarındaki değişim 96,52-366,60 µg/g t.a. olarak bulunmuştur (Çizelge 4.15). Uygulanan tüm kurdan konsantrasyonlarında kontrollerine göre artışlar belirlenmiştir. Kapsaisin miktarında en fazla artış 0,2 mg/ml kurdan uygulamasında belirlenmiştir.



Şekil 4.15 Farklı konsantrasyonlarda kurdan uygulamalarının farklı zamanlarda serbest hücre ve tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin miktarı üzerine etkisi

a : Kontrol, b: 0,1mg/ml kurdan c: 0,2 mg/ml kurdan, d: 0,25mg/ml kurdan, e: 0,3mg/ml kurdan

Serbest hücrelerde 14. günde toplam kapsaisin miktarındaki değişim 60,87-105,54 µg/g t.a. şeklindedir (Çizelge 4.15). En fazla kapsaisin miktarı 0,2 mg/ml kurdan uygulamasında belirlenmiştir. Uygulanan tüm kurdan konsantrasyonlarında kontrole göre kapsaisin miktarında artış belirlenmiştir.

Tutuklanmış hücrelerde 14. günde toplam kapsaisin miktarındaki değişim 96,44-426,69 µg/g t.a. şeklindedir (Çizelge 4.15). Tutuklanmış hücrelerde 14. günde en fazla toplam kapsaisin miktarı 0,2 mg/ml kurdan uygulamasında bulunmuştur Uygulanan tüm kurdan konsantrasyonları kapsaisin miktarında kontole göre artışa neden olmuştur.

Tutuklanmış hücrelerde 14. günde belirlenen kapsaisin miktarı serbest hücrelerde belirlenen kapsaisin miktarından daha yüksektir. Tutuklanmış hücrelerde 0,2 mg/ml kurdan uygulamasında belirlenen toplam kapsaisin miktarı, serbest hücrelerde belirlenen kapsaisin miktarından yaklaşık 4 kat daha fazladır.

Serbest hücrelerde kontrollerdeki toplam kapsaisin miktarının zamanla değişimi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p<0,01$). 0,1 mg/ml kurdan uygulamasında uyarım zamanının artışı ile kapsaisin miktarı da artmaktadır. 0,2 mg/ml kurdan uygulamasında 12. günde artan kapsaisin miktarı 14. günde azalmıştır. 0,25 mg/ml kurdan uygulamasında kapsaisin miktarının zamanla değişimi istatistiksel anlamda önemsiz bulunmuştur ($p<0,01$). 0,3 mg/ml kurdan uygulamasında ise uyarım süresinin artması ile kapsaisin miktarı azalmaktadır (Çizelge 4.15, Şekil 4.15).

Sonuçlar topluca değerlendirildiğinde selüloz, salisilik asit, metil jasmonat, ksantan ve kurdan uygulamaları için etkin olan uyarım dozu, etkin uyarım konsantrasyonu ve toplam kapsaisin miktarları çizelge 4.16' da verilmiştir. En fazla kapsaisin miktarı kurdan uygulamasında tutuklanmış hücre süspansiyonunda belirlenmiştir. Ksantan uygulaması haricinde diğer uyarıcılarda serbest hücrelerde etkili olan uyarım konsantrasyonu tutuklanmış hücre süspansiyonlarında da etkili olmuştur. Selüloz uyarıcısı uygulandığında serbest hücre süspansiyonlarında etkili olan uyarım zamanı

tutuklanmış hücre süspansiyonlarında da etkili olmuştur. Metil jasmonat ve ksantan uyarıcı uygulamalarında da serbest hücre süspansiyonlarında etkili olan uyarım zamanı tutuklanmış hücre süspansiyonlarında etkilidir (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16. Kullanılan uyarıcıların 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)
Selülaz	Serbest hücre süspansiyonu	24-48 saat	30 µg/ml	243,30- 249,14
	Tutuklanmış hücre süspansiyonu	24 saat	30 µg/ml	362,91
Salisilik asit	Serbest hücre süspansiyonu	14. gün	250 µM/ ml	136,63
	Tutuklanmış hücre süspansiyonu	12. gün	250 µM/ ml	153,54
Metil jasmonat	Serbest hücre süspansiyonu	14. gün	0,06 µM/ml	102,57
	Tutuklanmış hücre süspansiyonu	14. gün	0,06 µM/ml	127,29
Ksantan	Serbest hücre süspansiyonu	10. gün	0,2 mg/ml	120,92
	Tutuklanmış hücre süspansiyonu	10. gün	0,25 mg/ml	211,34
Kurdlan	Serbest hücre süspansiyonu	12. gün	0,2 mg/ml	117,54
	Tutuklanmış hücre süspansiyonu	14. gün	0,2 mg/ml	426,69

5. TARTIşMA VE SONUÇ

Tez çalışmasında yapılan literatür araştırmalarının ışığı altında serbest ve tutuklanmış hücre süspansiyon kültürlerine farklı konsantrasyonlarda çeşitli uyarıcılar (kurdlan, ksantan, salisilik asit, metil jasmonat ve selölaz) ilave edilmiştir ve bu uyarıcıların kapsaisin üretimindeki potansiyelleri araştırılmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan uyarıcılar ve hücrelerin tutuklanması ile kapsaisinin kısa sürede ve daha fazla miktarda elde edilmesi hedeflenmiştir. Bu alışma sayesinde kapsaisin, ölkemiz koşullarında ilk kez laboratuvar koşullarında hücre süspansiyonu kullanılarak elde edilmiştir. Yine ölkemizde bitki doku kültüründe tutuklama yönteminin kullanıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu yönüyle de ölkemiz koşullarında bitki doku kültürü çalışmalarında tutuklama yönteminin ilk defa denendiği söylenebilir.

Selölaz uyarıcısının kapsaisin sentezi üzerine etkisi konusunda yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. İlk kez bu çalışmada ele alınmıştır. Selölaz uyarıcısı birçok bitki türünde olduğu gibi biberde de fitoaleksini oluşumunu uyardığı bildirilmiştir (Brooks vd. 1986). Ellialtıoğlu vd. (1998), selölazın *Capsicum annuum* kallus süspansiyon kültüründe biber fitoaleksini olan kapsidiol oluşumunu artırıcı etki yaptığını tespit etmiştir.

Tez çalışmasında selölaz, kültür ortamına 5, 10, 15 ve 30 µg/ml olacak şekilde uygulanmıştır. Serbest hücrelerde etkin uyarım konsantrasyonu ve zamanı sırasıyla 30 µg/ml ve 24-48 saat olarak bulunmuştur. Ellialtıoğlu vd. (1998), yaptıkları çalışmada 11B 14 biber çeşidinde en yüksek kapsidiol birikimini 30 µg/ml etkin uyarım konsantrasyonunda 24 saat süre sonunda bulmuşlardır. Etkin konsantrasyon ve zaman açısından kapsaisin için bulduğumuz sonuç bu araştırıcıların sonuçları ile benzerdir.

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 tutuklama işlemi tüm selüloz konsantrasyonları ve uyarım sürelerinde serbest hücrelere göre kapsaisin miktarı üzerine etkili bulunmuştur (Çizelge 4.1-4.3, Şekil 4.1-4.3). Bu anlamda elde edilen sonuçlar yapılan tutuklama çalışmaları ile paralellik göstermektedir.

Hücre kültürlerinde alkaloid 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 alkaloid 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 bileşikler sentezleyebilme kapasitesine sahiptirler.

Chappel vd. (1987)'nin yaptığı bir çalışmada, yine biber gibi bir Solanaceae bitkisi olan KY-14 tütün çeşidine ait hücre süspansiyon kültürüne selüloz ilave edilmiş, selüloz için etkin konsantrasyonun $(0,2-0,4) \times 10^{-3}$ mg/ l olduğu ve maksimum kapsidiolünde 18-24 saatleri arasında oluştuğu belirlenmiştir. Selüloz uyarıcısı hücre çeperlerini etkilediğinden oluşan kapsidiolün büyük bir kısmının hücre dışına çıktığını ve dokuda çok az miktarda kapsidiol bulunduğunu gözlemlemişlerdir. Tez çalışmamızda ise hücrelerdeki kapsaisin miktarının süzüntülerden fazla olduğu bulunmuştur. Ancak diğer uyarıcıların süzüntüleri ile karşılaştırıldığında selüloz uyarıcısının kapsaisinin süzüntüye

geçmesinde daha etkili olduğu bulunmuştur. Serbest hücrelerin süzüntülerinde elde edilen kapsaisin miktarı selüla2 uygulanan kontrol grupları haricinde tutuklanmış hücrelerden daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.2, Şekil 4.2). Bu durum bize selüla2 uyarıcısının serbest hücrelerle direk temas ederek hücre çeperlerini etkileyip kapsaisinin süzüntüye geçmesini sağladığını düşündürmektedir. Tutuklanmış hücrelerde kalsiyum aljinat tabakanın selüla2ın süzüntüye geçmesini serbest hücrelere göre nispeten azalttığı düşünülmektedir.

Threlfall ve Whitehead (1988), tütün hücre süspansiyon kültürüne selüla2 uygulamış ve oluşan olayları üç fazda incelemiştir. Birinci fazda kapsidiolü sentezleyen seskiterpen siklaz, germakrene siklaz enzimlerinin aktif hale geldiğini, 24 saate kadar da kapsidiol miktarında artış olduğunu gözlemlemiştir. Chappel vd. (1991) yine tütün hücre süspansiyon kültürüne selüla2 uygulamışlardır. Kapsidiol biyosentez yol izinde anahtar enzimler olan HMGR ve seskiterpen siklaz aktivitesini artırdığını ve kapsidiolün oluştuğunu gözlemlemiştir. Moreau ve Preisig (1993), aynı tütün çeşidinde selüla2 uyarıcısını kullanmış ve hücre zarlarındaki lipitleri incelemiştir. Uyarıcı uygulanmasından 8 saat sonra kapsidiol ölçülebilir seviyeye ulaşmış ve 24 saate kadar da kapsidiol artışı devam etmiştir. Choong (2008), *C. annuum* L. süspansiyon kültüründe maksimum kapsidiol oluşumunu 3 µg/ml selüla2 uygulama konsantrasyonunda, 24 saat süre sonunda bulmuştur.

Tutuklanmış hücrelerde de uygulanan tüm selüla2 konsantrasyonları kapsaisin üretimi üzerine etkili olmuştur. En etkin uyarım konsantrasyonu ve uygulama zamanı 30 µg/ml selüla2 ve 24 saat olarak bulunmuştur. Selüla2ın 30 µg/ml uygulama konsantrasyonunda zaman 48 ve 72. saate çıkarıldığında kapsaisin miktarları bu konsantrasyonda 24. saate göre düşmektedir (Çizelge 4.3, Şekil 4.3). Brooks vd. (1986), uyarıcının gereğinden fazla miktarda ve sürede kültüre uygulandığında kültürün zarar gördüğünü veya hiç etkilenmediğini belirtmişlerdir. Selüla2 konsantrasyonu ile uyarı süresi için maksimum kapsidiol konsantrasyonunun oluştuğu optimum bir değerin bulunması gerektiği Brooks vd. (1986) tarafından bildirilmiştir. Kapsaisin içinde selüla2 konsantrasyonu ile uyarım süresi için optimum değerin bulunması gerekir. Nitekim tutuklanmış hücrelerde 5 ve 10 µg/ml selüla2 uygulamasında tüm uyarı süresinde artış

gözlenirken 15 ve 30 µg/ml selüloz uygulamasında azalış görülmektedir (Çizelge 4.3, Şekil 4.3).

Tez çalışmasında kullanılan diğer bir uyarıcı da salisilik asittir. Salisilik asitin dışarıdan ortama ilave edilen önemli bir düzenleyici olduğu, özellikle de patojene karşı bitkinin savunması boyunca asetil salisilik asit türevleri ile birlikte PR proteinlerinin oluşumuna etki ettiği belirtilmiştir. Ward vd. (1991), Enyedi vd. (1992) ve Uknes vd. (1992), PR proteinlerinin de fungus ya da virüs ile uyarılan bölgelerin direncini artırdığını bildirmişlerdir. Sonuçta uyarma, salisilik asit ve metil jasmonat ile düzenlenmektedir.

Tez çalışmasında salisilik asit, kültür ortamına 100, 200, 250 ve 300 µM/ ml olacak şekilde uygulanmıştır. Yaptığımız tez çalışmasında tutuklama işlemi tüm salisilik asit konsantrasyonları ve uyarım sürelerinde serbest hücrelere göre kapsaisin miktarı üzerine etkili bulunmuştur (Çizelge 4.4-4.6, Şekil 4.4-4.6). Bu anlamda elde edilen sonuçlar literatür çalışmaları ile paralellik göstermektedir.

Serbest hücrelerde en etkili uyarım konsantrasyon ve günü sırasıyla 250 µM/ml salisilik asit uygulaması ve 14. gündür. Serbest hücrelerde uyarım süresinin artması ile kapsaisin miktarının artması arasında homojenlik görülmemektedir. Serbest hücrelerde 300 µM/ml salisilik asit uygulamasında uyarım süresi 12. ve 14. güne çıkarılması kapsaisin miktarında azalmaya neden olmuştur. Bu konsantrasyon 10. günde kontrole göre kapsaisin miktarında artışa neden olmasına rağmen diğer konsantrasyonlarda belirlenen kapsaisin miktarına göre bir azalma bulunmuştur.

Sudha ve Ravishankar (2003b), *Capsicum frutescens* hücre süspansiyon kültürüne 200 µM salisilik asit uygulamasında en yüksek toplam kapsaisin miktarı elde etmişlerdir (46,64±2,3 µg/kültür). Elde edilen bu değer kontrole (29,25±1,4 µg/kültür) göre 1,5 kat daha fazladır. Kapsaisin sentaz aktivitesi de en yüksek bulunmuştur (6,9±0,34 ünite). İçsel poliamin düzeyleri salisilik asit uygulamasında 6. günde en yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda uyarımın 12. gününde kapsaisin miktarında en fazla artış 200 µM/ml salisilik asit uygulama konsantrasyonunda bulunmuştur. Tez çalışmasında elde ettiğimiz etkin uyarım dozu bu araştırmacıların çalışmaları ile benzerlik göstermektedir.

Sudha ve Ravishankar (2003b), kapsaisin miktarındaki artışın salisilik asitin kapsaisin sentezinde anahtar enzim olan kapsaisin sentaz aktivitesini uyarmasının neden olduğunu kapsaisin sentaz aktivitesi ölçümleri ile göstermişlerdir.

Literatür incelemelerinde *Capsicum annuum* L. tutuklanmış hücrelerinde salisilik asit uyarımı ile kapsaisin üretimi üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tutuklanmış hücrelerde kapsaisin üretimi üzerine etkin uyarım konsantrasyonu ve süresi sırasıyla 250 µM/ml salisilik asit ve 12. gün olarak bulunmuştur (Çizelge 4.6). Salisilik asit uygulamasının 10. gününde 200-300 µM/ml uygulama konsantrasyonunda kültür etkilenmemiş ve kapsaisin üretilmemiştir. 100-250 µM/ml salisilik asit uygulamasında 14. günde kapsaisin miktarında az miktarda artış vardır.

Chen ve Chen (1999), transforme *Salvia miltiorrhiza* hücre süspansiyon kültürlerine salisilik asit ve metil jasmonatın tek başlarına uygulandıklarında “cryptotanshinone” fitoaleksininin uyarımını teşvik etmediğini bildirmişlerdir. Salisilik asit maya uyarıcısı ile birlikte kullanıldığında 50-500 µM konsantrasyonu etkili olmuştur. Özellikle 200 µM salisilik asit konsantrasyonunda kontrole göre bu fitoaleksinin miktarında % 37’lik bir artış bulmuşlardır.

Chen vd. (1993), salisilik asitin bitkilerin doğal savunma mekanizmasını harekete geçiren bir madde olduğunu ileri sürmüşlerdir. Salisilik asit katalaz inhibitörü gibi hareket ederek ortamdaki H₂O₂ miktarının artmasına neden oluyor şeklinde ifade etmişlerdir. Salisilik asit *Hyoscyamus muticus* hücre süspansiyon kültürüne uygulandığında lubimin konsantrasyonu % 40 oranında artış göstermiştir (Mehmetoğlu ve Curtis 1997).

Sudha ve Ravishankar (2003b), salisilik asit ve metil jasmonatı ayrı ayrı ve birlikte *Capsicum frutescens* hücrelerinin süspansiyon kültürlerine uygulamış ve her iki bileşiğin de kültür hücrelerinde kapsaisin sentezini ve birikimini arttırdığı belirlemiştir.

Kang vd. (2004), salisilik asitin *Scopolia parviflora* da ilgili biyosentetik genlerin ekspresyonunu uyardığını belirlemişlerdir.

Kapsaisinoidlerin yapısında bulunan vanililamin kısmı, şikimat arojenat metabolik yolundan elde edilen fenillalanin'den, yağ asiti kısmı ise valin' den sentezlenmektedir. Vanililamin kısmının fenilpropanoid metabolik yolu aracılığı ile sentezlendiği düşünülmektedir. Chayapathy vd. (2006), kapsaisin biyosentezinin düzenlenmesinde valin biyosentez yolunun fenil propanoid biyosentez yoluna göre daha önemli olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmacılar yaptıkları çalışmada, 2,5 μ M salisilik asit uygulamasında 29,0 μ g/mg kapsaisin, 5 μ M salisilik asit uygulamasında 27,3 μ g/mg kapsaisin elde etmişlerdir. Elde ettikleri bu değer kontrole (12,7 μ g/mg) göre yaklaşık 2 kat daha fazladır. Bu durumu kapsaisin sentezinde ara bileşiklerden biri olan 8 metil nonanoik asit oluşumunun artması ile açıklamışlardır.

Yu vd. (2006), *Saussurea medusa* hücre kültüründe salisilik asit ilavesi ile “jaceosidin” ve “syringin” üretimini incelemişlerdir. PAL'in fenol propanoid biyosentezini katalizleyen ilk enzim olduğunu ifade ederek hiç uyarıcı ilave edilmeyen kontrol uygulamalarında bu enzimin aktivitesinin yok ya da çok az olduğunu belirlemişlerdir. Uyarıcı olarak salisilik asit uygulandığında enzim aktivitesinin 12. saatte artmaya başladığını 24. saatte ise maksimum olduğunu belirtmişlerdir. Salisilik asidin 20 μ M uygulama konsantrasyonunda 6. günde kontrole göre 2,5 kat “jaceosidin” ve 2,7 kat “syringin” üretimi sağlamışlardır. Salisilik asidin bu ikincil metabolitlerin üretiminde fenil propanoid biyosentetik enzimlerini teşvik ettiğini ifade etmişlerdir. Salisilik asit abiyotik uyarıcı olarak bitki hücre kültürlerinde ikincil metabolitlerin biyosentezini teşvik etmektedir (Taguchi vd. 2001). Zhao vd. (2001), salisilik asidin *Catharanthus roseus* indol alkaloidlerin üretimini teşvik ettiğini bildirmişlerdir. Salisilik asit sinyal iletiminde önemli bir role sahiptir. Fenilpropanoid biyosentezini teşvik etmektedir ve bitkilerde savunma genlerinin ekspresyonunu düzenlemektedir (Yu vd. 2006).

Jasmonik asit ve metil esterleri, çeşitli ikincil metabolitlerin oluşumuna neden olan uyarma aşamalarında önemli bir anahtar bileşen olarak ortaya çıkmaktadır (Gundlach

vd. 1992). Yine Gundlach vd. (1992), protein inhibitörü proteazlara etki eden jasmonik asit ve metil esterlerinin ikincil metabolizmaya ait genlerin aktivasyonunda doğrudan ya da dolaylı etkisinin bulunduğunun ve uyarıcı reseptör kompleksleri arasındaki yolda sinyal görevi üstlendiğini bildirmişlerdir. Bu maddenin bazı bitkilerde tek başına uyarıcı olarak etki ettiği halde, bazı bitkilerde diğer uyarıcı ile kombinasyonlarının daha fazla fitoaleksinin sentezini uyardığı belirlenmiştir.

Jasmonik asit yolu genellikle alkaloidler, terpenoidler, flavonoidler, fenolik bileşikler ve fitoaleksinin gibi bitki ikincil metabolitlerinin çoğunda sinyal veya sinyal artırıcı olarak uyarıma neden olmaktadır (Gundlach vd. 1992, Mueller vd. 1993, Mirjalili ve Linden 1996, Brader vd. 2001). Jasmonik asit biyosentezi ve ikincil metabolit birikiminin uyarıcılar tarafından teşvik edildiği çeşitli bitkilerde gösterilmiştir (Gundlach vd. 1992, Mueller vd. 1993, Menke vd. 1999). Jasmonik asit ve uyarıcı sinyali birbirine paralel olarak iş görmektedir veya birbirleri ile çakışarak veya daha kompleks metabolik yollarla bitkilerde çeşitli ikincil metabolitlerin uyarımını sağlamaktadır (Zhao vd. 2004).

Tez çalışmasında metil jasmonat, kültür ortamına 0.04, 0.06, 0.08 ve 0,1 $\mu\text{M}/\text{ml}$ olacak şekilde ilave edilmiştir. Serbest hücrelerde etkin uyarım konsantrasyonu ve zamanı sırasıyla 0,06 $\mu\text{M}/\text{ml}$ metil jasmonat ve 14. gün olarak bulunmuştur. Serbest hücrelerde 0,08-0,1 $\mu\text{M}/\text{ml}$ metil jasmonat uygulama konsantrasyonunda 10. günde üretilen kapsaisinin 12. ve 14. günde fenilpropanoid yol izindeki başka bir metabolite dönüşmeye başladığı düşünülmüştür. Sudha ve Ravishankar (2003b), metil jasmonat bileşiğinin kapsaisin miktarını artırıcı etkisinin kapsaisin yıkımını ya da diğer moleküllerle konjugasyonunu engellemesi ile açıklamışlardır. Bu durumu dışarıdan metil jasmonat uygulamasında kapsaisin sentezinde anahtar enzimlerden biri olan kapsaisin sentaz aktivitesini etkilememesi ile açıklamışlardır. Serbest hücrelerde uygulanan metil jasmonat konsantrasyonları 12. günde etkili olmazken (Çizelge 4.7, Şekil 4.7), 0,06-0,08 $\mu\text{M}/\text{ml}$ uygulama konsantrasyonlarında süzüntüye geçen kapsaisin miktarının fazla olması (Çizelge 4.8, Şekil 4.8) toplam serbest hücreler üzerine metil jasmonatın etkisi üzerine belirleyici olmuştur (Çizelge 4.9, Şekil 4.9).

Tutuklanmış hücrelerde ise etkin uyarım konsantrasyonu ve zamanı sırasıyla 0,06 $\mu\text{M}/\text{ml}$ metil jasmonat ve 14. gündür. Bu uygulama konsantrasyonu tüm uyarım günlerinde kapsaisin miktarında en fazla artışa neden olmuştur (Çizelge 4.9, Şekil 4.9). Tutuklanmış hücrelerde 0,06 $\mu\text{M}/\text{ml}$ ' den daha az veya daha fazla uygulama konsantrasyonları 10. ve 14. günde kapsaisin miktarını etkilememiştir veya kapsaisinin azalmasına neden olmuştur. Bu konsantrasyonların yol izini başka bir yol izine kaydırdığı düşünülebilir. Metil jasmonatın tutuklanmış hücre süspansiyon kültürlerinde kapsaisin üretimi üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tez çalışmasında en fazla kapsaisin miktarı hem serbest hücrelerde hem de tutuklanmış hücrelerde 14. günde 0,06 $\mu\text{M}/\text{ml}$ metil jasmonat uygulama konsantrasyonunda belirlenmiştir. Tez çalışmamızda serbest hücrelerde belirlenen kapsaisin miktarı kontrole göre 1,9 kat daha fazladır. Tutuklanmış hücrelerde belirlenen kapsaisin miktarı kontrole göre 1,4 kat daha fazladır. Sudha ve Ravishankar vd. (2003), *Capsicum frutescens* serbest hücre süspansiyonlarına 0,05 $\mu\text{M}/\text{ml}$ metil jasmonat uygulamasında 12. günde elde edilen kapsaisin miktarını $40,19 \pm 2 \mu\text{g}/\text{kültür}$ olarak bulmuşlardır. Elde edilen bu değer kontrole ($29,25 \pm 1,4 \mu\text{g}/\text{kültür}$) göre 1,4 kat daha fazladır. Genotip farkı, besiyeri ortam bileşenleri farkı ve çalışılan laboratuvar koşulları arasındaki fark nedeniyle önceki çalışmalarda ile tamamen aynı sonuçları beklemek söz konusu değildir. Elde ettiğimiz sonuçların bu anlamda bu araştırmacıların çalışmaları ile benzerlik gösterdiği düşünülmektedir.

Ravishankar vd. (2003), salisilik asit ve metil jasmonatın birlikte uygulanması sonucu besiyerine maksimum kapsaisin salınımını 15. günde $24,16 \pm 1,2 \mu\text{g}/\text{kültür}$ olarak bulmuşlardır. Salisilik asit ve metil jasmonatın birlikte etkileri kontrole göre kapsaisin miktarında azalmaya neden olmuştur.

Suresh ve Ravishankar (2005), *Capsicum frutescens* kök kültürlerinde dışarıdan metil jasmonat ve kafeik asit gibi öncül maddelerle vanilin gibi çeşitli fenil propanoidlerin oluşumunu araştırmışlardır. 10 $\mu\text{M}/\text{ml}$ metil jasmonat uygulamasında kontrolleri ile karşılaştırıldığında 1,93 kat daha fazla vanilin ürettiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada Kafeik asit o-metil transferaz aktivitesinde de artış gözlemlenmiştir.

Sharan vd. (1998), metil jasmonatın fungal uyarıcı ile birlikte PAL aktivitesini uyardığı ve tütün hücre kültürlerinde “scopoletin” ve “scopolin” üretimini artırdığını belirtmişlerdir.

Rodriguez vd. (2003) ve Tabata (2004), metil jasmonatın çoğu hücre süspansiyon kültüründe ve saçak kök kültüründe farklı metabolik reaksiyonları uyaran enzim aktivitelerini teşvik eden kimyasal bir uyarıcı olduğunu ifade etmişlerdir.

Wu ve Lin (2003), *Taxus chinensis* hücre süspansiyon kültüründe metil jasmonat uyarımı ile taksol birikimini PAL aktivitesindeki artışla ilişkilendirmişlerdir.

Metil jasmonat ve jasmonik asitin, domates, *Arabidopsis* ve tütün gibi bitkilerde etilen üretimini uyardığı ve savunma mekanizmalarında etkili olduğunu belirtilmiştir (Xu vd. 1994, O’ Donnell vd. 1996).

Hayashi vd. (2003), maya uyarıcısı ve metil jasmonatın *Glycyrrhiza glabra* hücre kültürlerinde 5-deoxyflavonoid üretimini teşvik ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca metil jasmonat “soyasaponin” birikimini de teşvik etmiştir.

Mandujano-Chavez vd. (2000), metil jasmonat ve selüloz tütün hücre kültüründe kapsidiol birikimini, gen ekspresyonunu ve seskiterpen siklaz genlerinin ekspresyonunu uyardığını bildirmişlerdir.

Zhao vd. (2001), metil jasmonat uygulamasında *Mexican cypress* (*Cupressus lusitanica*)’ nın β -thujaplicin’ i yüksek düzeyde sentezlendiğini belirtmişlerdir.

Jasmonatlar bitkilere dışarıdan uygulandığında morfolojik ve fizyolojik değişimlerde inhibe edici veya destekleyici etkiler yapmaktadırlar (Sembdner ve Parthier 1993). Jasmonatlar protein sentezinde gen ekspresyonunu da uyarmaktadırlar. Jasmonatlar savunma cevabında çeşitli ikincil metabolitlerin *Taxus condensis*, *Taxus cuspidate*’ den

“paclitaxel” (Ketchum vd. 1999), *Tulipa gesneriana*’dan “antosiyenin” üretiminde (Saniewski vd. 1998) ve *Rubus idocus*’ dan “benzelaseton” (Pedapudi vd. 2000) üretiminde çalışılmıştır. Jasmonatlar bitki hücre kültürlerinde kimyasal sinyal bileşikleri olarak *de novo* gen transkripsiyonunu ve sonuçta doğal ürünlerin sentezini uyarmaktadırlar (Stockigt vd. 1995).

Bulgakov vd. 2002, *Rubia cordifolia* kültürlerinde metil jasmonat ve salisilik asitin atrakinon fitoaleksininin üretimini uyardığını belirtmişlerdir. Pitta-Alvarez vd. 2002, *Bragmansia candia* saçak kök kültürlerinde tropan alkaloidler “scopolamine” ve “hyoscyamine” üretimini salisilik asitin önemli bir şekilde uyardığını belirtmişlerdir.

Kapsaisin biyosentezi fenil propanoid yolu ve valin metabolik yolu olarak iki metabolik yoldan sentezlenir. Aromatik biyosentez yolunun ilk kısmı tüm bitkilerde fenil propanoid metabolizma ile ortak paylaşılmaktadır. Bu durum dışarıdan uyarıcı uygulamasının metabolik yolu bu yönde ilerletebileceğini düşündürmektedir. Ferulik asit yoluyla vanilin ve vanilinaminden kapsaisine dönüşüm sadece biberin hücre kültürlerinde ve meyvelerinde bulunmuştur (Sukrasno ve Yeoman 1993).

Mikroorganizmalardan elde edilen polisakkaritler ve diğer çeşitli bileşikler ikincil metabolik bileşiklerin sentezini uyarıcı etkilere sahiptir. Bir tür fitoaleksinin olan kapsidiol bileşiği bitki hücrelerinde, mikroorganizmaların enfeksiyonu sonucu sentezlenmektedir. Mantarlar tarafından üretilen glukanlar bitki hücrelerinin ikincil metabolik bileşik sentezini etkilemektedirler (*Ruta graveoens* tarafından sentezlenen acridine peroksit, *Petroselinum hortense* tarafından sentezlenen kumarin bileşikler, *Glycine max* tarafından sentezlenen glyceollin ve *Phaseolus vulgaris* tarafından sentezlenen phaseolin vb.).

Ksantan (Xanthan), *Xanthomonas campestris*’ den elde edilen mikrobiyal bir polisakkarittir. Ksantanın moleküler yapısı EK 10’ da verilmiştir. Tez çalışmasında ksantan, kültür ortamına 0,1, 0,2, 0,25 ve 0,3 mg/ml olacak şekilde uygulanmıştır. Ksantan uygulaması sonucu serbest hücrelerde etkin uyarım konsantrasyonu ve süresi

sırasıyla 0,2 mg/ml ve 10. gün olarak bulunmuştur. Uyarıma süresi 10. günden 12.ve 14. güne çıkarıldığında serbest hücrelerde oluşan kapsaisin miktarı azalmıştır. Bu sonuçlardan 12. günde fenilpropanoid yol izindeki başka bir metabolite dönüşmeye başladığı veya 10. günde PAL enziminin daha aktif olduğu düşünülebilir. Uyarımın 10. ve 12. gününde uyarıcı konsantrasyonunun artışı ile kapsaisin üretimi arasında tam bir homojenlik görülmemiştir.

Johnson vd. (1991) yaptıkları çalışmada *Capsicum frutescens* serbest ve tutuklanmış hücre süspansiyon kültürlerinde kitosan, kurdan ve ksantan'ın kapsaisin üretimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre kapsaisin üretimi tutuklanmış hücrelerde ksantan kullanımında 14. günde kontrole göre 2 kat daha fazla artmıştır. Tez çalışmasında serbest hücrelerde 0,2 mg/ml ksantan uyarımında 10. günde kontrole göre kapsaisin miktarında 1,4 kat, tutuklanmış hücrelerde ise 0,25 mg/ml ve uyarımın 10. gününde 2 kat artış belirlenmiştir. Johnson vd. (1991) yaptıkları çalışma ile uyguladığımız konsantrasyonun başarısı serbest hücrelerle paralel bulunmuştur. Ancak bizim elde ettiğimiz kapsaisin değerleri daha düşüktür ve uygulamanın 10. gününde maksimum artış belirlenmiştir. Bunun nedeni çalıştığımız biber türünün farklı olması, direk uyarıcı *Xanthomonas campestris*' den elde edilen saf ksantanı kullanmaları ve laboratuvar şartlarının farklılığı olabilir.

C. frutescens hücre kültürlerine, *Gliocladium deliquescens* hücrelerinden elde edilen bileşiklerin uygulanması sonucu, fenil alanin amonyum liyaz aktivitesinde artış gözlemlenmiştir (Holden vd. 1987). Bitkilerden elde edilen ikincil metabolik bileşiklerin birçoğunun sentezi, kültür ortamına mikroorganizma ve mantarlardan elde edilen bileşiklerin eklenmesi sonucu artış göstermektedir.

Kurdan (Curdan), *Alcaligenes faecalis*' den elde edilen mikrobiyal bir polisakkarittir. Kurdan bileşiğinin moleküler yapısı EK 11' de verilmiştir. Tez çalışmasında kurdan, kültür ortamına 0,1, 0,2, 0,25 ve 0,3 mg/ml olacak şekilde uygulanmıştır. Yaptığımız tez çalışmasında tutuklama işlemi tüm kurdan konsantrasyonları ve uyarım sürelerinde serbest hücrelere göre kapsaisin miktarı üzerine etkili bulunmuştur (Çizelge 4.13-4.15,

Şekil 4.13-4.15). Bu anlamda elde edilen sonuçlar literatür çalışmaları ile paralellik göstermektedir. Çalışmamızda 0,2 mg/ml ve 0,25 mg/ml kurdan ile uyarım sonucunda uyarımın 10. ve 14. gününde serbest hücrelerde elde edilen kapsaisinin yaklaşık 4 kat daha fazla kapsaisin elde edilmiştir.

Ortak metabolik öncü moleküllerin birden fazla metabolik yolda görev alıyor olması bu moleküller için reaksiyonlar arasında rekabet olduğuna işaret etmektedir. Bu nedenle ikincil metabolik bileşiklerin kültür ortamına tutuklanan hücreler tarafından daha fazla miktarda sentezlenmesinin, daha kompleks reaksiyonların gerçekleştiği zamanlarda daha belirgin olacağı düşünülmektedir (Brodelius ve Nilsson 1980).

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 sentezlemektedirler.

Lindsey ve Yeoman (1983), yaptıkları çalışmalar sonucu, kültür ortamına tutuklanan hücrelerin serbest süspansiyon kültürü hücrelerine göre yaklaşık olarak 1000 kat daha fazla kapsaisin sentezleyebildiklerini belirlemişlerdir. Bu sonucun kültür ortamına tutuklanan hücrelerin, metabolik öncü molekülleri birincil metabolik reaksiyonlar yerine, kapsaisin sentezinde kullanmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Süspansiyon kültürü hücrelerinin oldukça az miktarlarda kapsaisin sentezleyebildiği, hücrelerin kültür ortamına tutuklanması sonucu üretilen kapsaisin miktarının 28 günlük kültürlerde 10 katına kadar arttığı belirlenmiştir. Kültür ortamına tutuklanan hücrelerle karşılaştırıldığında, 14 günlük plasental doku hücreleri 40 kat daha fazla kapsaisin

sentezleyebilmektedir. Plasental doku hücreleri, kapsaisin sentezinin gerçekleştiği yer olarak, sahip olduğu fizyolojik kapasite sayesinde diğer kültür hücrelerine göre çok daha fazla miktarlarda kapsaisin sentezleme potansiyeline sahiptir.

Johnson vd. (1990), 14 gün boyunca inkübe edilmiş tutuklanmış hücreler ve plasentada kapsaisin üretimi üzerine *Aspergillus niger* ve *Rhizopus oligosporus* ekstraktları ve süzüntüsü ile kurdan'ın etkisini incelemişlerdir. Tutuklanmış hücre sisteminde kapsaisin sentezinde kurdan daha etkili bulunmuştur ve kontrol ile karşılaştırıldığında sentez yaklaşık iki kat artmıştır.

Johnson vd. (1991), yaptıkları çalışmada *Capsicum frutescens* serbest ve tutuklanmış hücre süspansiyon kültürlerinde kitosan, kurdan ve ksantan'ın kapsaisin üretimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre kapsaisin üretimi tutuklanmış hücrelerde kurdan kullanımında 14. günde kontrole göre 2 kat daha fazla artmıştır.

Suvarnalatha vd. (1993), 3mg/L ve 2,4 D içeren MS ortamında % 0,2- % 0,08- % 0,12 ve % 0,16 kurdan uygulamışlar ve tutuklanmış hücrelerde % 0,2 kurdan uygulamasında 3. günde en yüksek kapsaisinoid miktarını 220 µg/g bulmuşlardır. Tez çalışmasında kapsaisin miktarı üzerine kurdan uyarıcısının etkin uyarım dozu 0,2 mg/ml olarak bulunmuştur (Çizelge 4.13-4.15, Şekil 4.13-4.15).

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 kapsaisin birikimi serbest hücrelerden yaklaşık iki kat daha fazla bulunmuştur. Burada tutuklama işleminin ve tutuklamada kullanılan kalsiyum iyonlarının da uyarıcı etkilerinin hücreleri uyarak 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. Kurdan ve selülaz uyarıcılarının etkisi diğer uyarıcılara göre kapsaisin

miktarı üzerinde daha etkili bulunmuştur. 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. Selüloz uyarıcısı uygulandığında diğer kullanılan uyarıcılara göre oldukça kısa bir uyarım zamanında (24 saat) yüksek kapsaisin miktarı elde edilmiştir. Kullanılan selüloz konsantrasyonunu da dikkate alırsak selüloz uyarıcısı ile uygun konsantrasyonların denenerek kapsaisin miktarını arttıracak çalışmalar yapılması düşünülmelidir. Yine selülozun etkili olan kurdan uyarıcı ile birlikte etkileri de incelenmelidir.

Bu sonuçlar mikroorganizmalardan elde edilen bileşiklerin, bitki hücresi kültür ortamında uyarıcı ve üretimi arttırıcı moleküller olarak kullanılabileceklerini göstermektedir. Ancak bu uygulamaların endüstriyel amaçlı kullanımına geçilmeden önce mikroorganizmalardan elde edilen çeşitli bileşiklerinin etkilerinin önceden yapılacak çalışmalarla belirlenmesi gerekmektedir.

İkincil metabolit bileşiklerin üretilmesinde kullanılan hücre kültürü tekniklerinin biyoteknolojik uygulama alanları oldukça ilgi çekmektedir. Tezin giriş bölümünde de belirtildiği gibi bir çok bileşiğin kültür ortamında sentezlenebildiği gözlemlenmiştir. Uygulanan yöntemlerin ekonomik olduğunun söylenebilmesi için, daha önce geleneksel yöntemlerle elde edilen sonuçlardan çok daha verimli sonuçlar alınması gerekmektedir. Özellikle bitkilerden elde edilen bileşiklerin geleneksel yöntemlerle üretilmesi daha ucuza mal olmakta ancak yine de bu yöntemlerle tam optimizasyon sağlandığında bile elde edilen ürün genellikle çok düşük olmamakla birlikte yine de yetersizdir. Bu nedenlerden dolayı hücre kültürü teknolojisinde günlük verimi arttırmaya yönelik yeni sistemler geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun da anlamı, yüksek miktarda ürün veren hücrelerin elde edilmesi ve bu hücrelerden devamlı ürün alınmasını sağlayacak sistemlerin oluşturulması gerektiğidir. Bugünün şartları altında oldukça az bitkisel ikincil metabolit bileşik kültür teknolojisi yöntemleri ile ekonomik olarak elde edilebilmektedir.

Biyokimya, ikincil ürün sentezi ve birikimi konularında bilimsel altyapı arttıkça, bu bilgiler uygulanan yöntemlerin yeniden düzenlenmesine kullanılacak ve gerekli değişiklikler yapılacaktır.

Sonuç olarak, hücrelerin bulundukları ortamın kimyasal içeriğinin değiştirilmesi ve hücrelerin kültür ortamına tutuklanmasına uygulanan teknikler bitki hücrelerinin ikincil metabolit bileşikleri sentezlemelerini düzenleyen metabolik olayların anlaşılmasını kolaylaştırabilecek olanaklar sağlamaktadır. Yapılan değişiklikler sonucu hücrelerin metabolik fonksiyonlarının nasıl etkilendiğinin gözlemlenmesi, istenilen ürünün üretim miktarının artırılması için gerekli koşulların belirlenmesine de katkıda bulunacaktır. Bu teknikler sundukları avantajlar sayesinde, bitki hücrelerinin ikincil metabolit bileşiklerinin endüstriyel üretimlerine de önemli katkılar sağlayabilirler.

KAYNAKLAR

- Aluru, M.R., Mazourek, M., Landry, L.G., Curry, J., John, M. and O'Connell, M.A. 2003. Differential expression of fatty acid synthase genes, *Acl*, *Fat* and *Kas*, in *Capsicum* fruit. *Journal of Experimental Botany*, 54, 1655-1664.
- Balandrin, M.J. and Klocke, J.A. 1988. Medicinal, aromatic and industrial materials from plants. In: Bajaj YPJ, editor. *Biotechnology in agriculture and forestry. Medicinal and aromatic plant*, vol. 4. Springer-Verlag, pp.1-36, Berlin.
- Barbero, G.F., Liazid, A., Palma, M. and Barroso, C.G. 2008. Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta*, 75, 1332-1337.
- Bennett, D.J. and Kirby, G.W. 1968. Constitution and biosynthesis of capsaicin. *Journal of Chemical Society, C*, 442-446.
- Blackwell, H.W. 1990. *Poisonous and Medicinal Plants*. Prentice Hall Inc., 171, USA.
- Brader, G., Tas, E. and Palva, E.T. 2001. Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in *Arabidopsis* by culture filtrates of the nonspecific pathogen *Erwinia carotovora*. *Plant Physiology*, 126, 849-860.
- Brevoort, P. 1998. The blooming U.S. botanical market: a new overview. *Herbalgram*, 44, 33-46.
- Brodelius, P., Deus, B., Mosbach, K. and Zenk, M.H. 1979. Immobilized plant cells for the production and transformation of natural products. *FEBS Letters*, 103, 93-97.
- Brodelius, P. and Nilsson, K. 1980. Entrapment of plant cells in different matrices. *FEBS Letters*, 122, 312-316.
- Brooks, C.J.W., Watson, D.G. and Freer, I.M. 1986. Elicitation of capsidiol accumulation in suspended callus cultures of *Capsicum annum*. *Phytochemistry*, 27(5), 1089-1092.
- Bucholz, C.F. 1816. "Chemische Untersuchung der trockenen reifen spanischen Pfeffers" [Chemical investigation of dry, ripe Spanish peppers], *Almanach oder Taschenbuch für Scheidekünstler und Apotheker* (Weimar) [Almanac or Pocket-book for Analysts (Chemists) and Apothecaries], 37, 1-30. In : Morrow, W. 1999. *The chile pepper encyclopedia* by Dave De Witt . William Morrow Company & Company Inc. New York.
- Bulgakov, V.P., Tchernoded, G.K., Mischenko, N.P., Khodakovskaya, M.V., Glazunov, V.P., Zvereva, E.V., Fedoreyev, S.A. and Zhuravlev, Y.N. 2002. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes. *Journal of Biotechnology*, 97, 213-221.

- Calva-Calva, G., Narvard, A., Eagles, J., Parr, A.J., Rhodes, M.J.C., Walton, N.J., Amiot, M.J. and Robins, R.J. 1995. Phenolic transformations by *Capsicum* spp. In: García-Viguera, C, Castañer, M, Gil, M.I., Ferreres, F. & Tomás-Barberán, F.A. (ed) Current Trends in Fruit and Vegetables Phytochemistry, 205–209,. CSIC, Madrid.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A. Levine, J.D. and Julius, D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389, 816-824.
- Catarina, M. J. and Julius, D. 2001. The vanilloid receptor : A molecular gateway to the pain pathway. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 487-517.
- Cazenave, M.S. Herrero, N.O., Vara, D. and Laviada, I.D. 2009. Capsaicin, a component of red peppers, induces expression of androgen receptor via PI3K and MAPK pathways in prostate LNCaP cells. *FEBS letters*, 583,141-147.
- Chayapathy, B. and Prasad, N., Gururaj, H.B., Kumar, V., Giridhar, P. and Ravishankar, G.A. 2006. Valine pathway is more crucial than phenyl propanoid pathway in regulating capsaicin biosynthesis in *Capsicum frutescens* Mill. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6660-6666.
- Chappel, J., Nable, R., Fleming, P., Andersen, R.A. and Burton, H.R. 1987. Accumulation of capsidiol in tobacco cell cultures treated with fungal elicitor. *Phytochemistry*, 26, 2259-2260.
- Chappel, J., Vonlanken, C. and Vogeli, U. 1991. Elicitor-inducible 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity is required for sesquiterpene accumulation in tobacco cell suspension cultures. *Plant Physiology*, 97(2),693-698.
- Chen, Z., Silva, H. and Klessig, D.F. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 262-264..
- Chen, H. and Chen, F. 1999. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on cell growth and cryptotanshinone formation in Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cell suspension cultures. *Biotechnology Letters*, 21, 803-807.
- Choong, J. M. 2008. Cellulase elicitor induced accumulation of capsidiol in *Capsicum annuum* L. suspension cultures. *Biotechnology Letters*, 30, 961-965.
- Claver, A. G., Arnedo-Andres, M., S. Abadia, J., Ortega, R.G. and Fernandez, A.A. 2006. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruits by liquid chromatography-electrospray/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54, 9303-9311.

- Claver, A.G., Ortega, R.G., Fernandez, A.A. and Arnedo-Andres M.S. 2007. Inheritance of capsaicin and dihydrocapsaicin determined by HPLC-ESI/MS, in an Intraspecific Cross of *Capsicum annuum* L..Agricultural and Food Chemistry,55(17), 6951-6957.
- Cox, P.A. and Balick, M.J. 1994. The ethnobotanical approach to drug discovery. Scientific American, 82-87.
- Crombie, L. 1999. Natural product chemistry and its part in the defence against insects and fungi in agriculture. Pesticid Science, 55, 761-774.
- Curry, J., Aluru, M., Mendoza, M., Nevarez, J., Melendrez, M. and O'Connel, M.A. 1999. Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent *Capsicum spp.* Plant Science, 148, 47-57.
- Curtis, W.R., Wang, P., Humprey, A. 1995. Role of calcium and differentiation in enhanced sesquiterpene elicitation from calcium alginate-immobilized plant tissue. Enzyme and Microbial Technology, 17, 554-557.
- Díaz, J. Bernal, A. Merino, F. and Ros Barceló, A. 1998. Phenolic metabolism in *Capsicum annuum* L. Recent Research Development of Phytochemistry, 2, 155-169.
- Díaz, J., Pomar, F., Bernal, A. and Merinos, F. 2004. Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum* L. Phytochemistry Reviews, 3, 141-157.
- Di Cosmo, F. and Misawa, M. 1985. Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures. Trends in Biotechnology, 3, 318-322.
- Ellialtıoğlu, Ş. Üstün, A.S. ve Mehmetoğlu, Ü. 1998. Bazı biber çeşitlerinde *İn vitro* Kallus oluşumu için en uygun besin ortamı bileşiminin belirlenmesi. II-Kızılırmak Uluslararası Fen Kongresi, 20-22 Mayıs,-Kırıkkale, 51-58.
- Enyedi, A., Yalpani, N., Silverman, P. and Raskin, I. 1992. Localization, conjugation and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic viruse. Proceedings of the National Academy of Sciences,USA, 89, 2480-2484.
- Erdost, H. 2004. Capsaicin, Uludag University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, 23(1-3), 149-155.
- Estrada, B., Pomar, F., Díaz, J., Merino, F. and Bernal, M.A. 1988. Effects of mineral fertilizer supplementation on fruit development and pungency in "Padrón" peppers. Journal of Horticultural Science Biotechnology, 73, 493-497.

- Estrada, B., Díaz, J., Merino, F., Bernal, M.A. 1999, The effect of seasonal changes on the pungency level of Padrón pepper fruits. *Capsicum Eggplant Newsletter*, 18, 28-31.
- Estrada, B., Bernal, M.A., Díaz, J., Pomar, F. and Merino, F. 2002. Presence of capsinoids in vegetative organs of *Capsicum annum* L. In relation to fruiting. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 1188-1191.
- Fowler, M.W., Scragg, A.H. 1988. Natural products from higher plants and plant cell culture. In: Pais M.S.S., Mavituna F, Novais JM, (eds), *Plant cell biotechnology*. NATO ASI Series, vol. 18. Springer-Verlag, pp. 165-177, Berlin.
- Fujiwake, H., Suzuki, T. and Iwai, K. 1980. Intracellular localization of capsaicin and its analogues in *Capsicum* fruit II. The vacuoles as the intracellular accumulation site of capsaicinoid in the protoplast of *Capsicum* fruit. *Plant and Cell Physiology*, 21, 1023-1030.
- Fujiwake, H., Suzuki, T. and Iwai, K. 1982. Capsaicinoid formation in the protoplast from the placenta of *Capsicum* fruits. *Agricultural Biology and Chemistry*, 46, 2591-2592.
- Fusco, B.M. and Giacobazzo, M. 1997. Peppers and pain: the promise of capsaicin. *Drugs*, 53, 909-914.
- Giri, A. and Narasu, M.L. 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances*, 18, 1-22.
- Glaser, V. 1999. Billion-dollar market blossoms as botanicals take root. *Nature Biotechnology*, 17, 17-18.
- Govindarajan, V.S. Rajalakshmi, D. and Chand, N. 1987. *Capsicum*—production, technology, chemistry, and quality. Part IV. Evaluation of quality. *Crit. Rev. Food. Science Nutr.* 25, 185-282.
- Gundlach, H., Müller, M.J., Kutchan, T.M. and Zenk, M.H. 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 89, 2389-2393.
- Harvell, K.P. and Bosland, P.W. 1997. The environment produces a significant effect on pungency of chiles. *HortScience*, 32, 1292.
- Hayashi, H., Huang, P. and Inoue, K. 2003. Up-regulation of soyasaponin biosynthesis by methyl jasmonate in cultured cells of *Glycyrrhiza glabra*. *Plant Cell and Physiology*, 44, 401-411.
- Hayman, M. and Kam, P.C.A. 2008. Capsaicin : A review of its pharmacology and clinical applications. *Current Anaesthesia&Critical Care*, 19, 338-343.

- Holden, R.R. Holden, M.A. and Yeoman, M.M. 1987. The effects of fungal elicitation on secondary metabolism in cell cultures of *Capsicum frutescens*. In R.J. Robins and M.J.C Rhodes, Manipulating Secondary metabolism in culture. Cambridge University Press, 67-72.
- Hussain, M. and Chandrasekhara, N. 1993. Influence of curcumin and capsaicin on cholesterol gallstone induction in hamsters and mice. Nutrition Research, 13, 349-357.
- Johnson, T.S. Ravishankar, G.A. and Venkataraman, L.V. 1990. In vitro capsaicin production by immobilized cells and placental tissues of *Capsicum annum* L. grown in liquid medium. Plant Science, 70, 223-229.
- Johnson, T.S. Ravishankar, G.A. and Venkataraman, L.V. 1991. Elicitation of capsaicin production in freely suspended cells and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens* Mill. Food Biotechnology, 5, 197-205.
- Johnson, T.S. Ravishankar, G.A. and Venkataraman, L.V. 1996. Biotransformation of ferulic acid and vanillylamine to capsaicin and vanillin in immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 44, 117-121.
- Jordt, S.E., McKemy, D.D. and Julius, D. 2003. Lessons from pepper and peppermint: the molecular logic of thermosensation. Current Opinion in Neurobiology, 13, 487-492.
- Kang, Y.M., Min, J.Y., Moon, H.S., Karigar, C.S., Prasad, D.T., Lee, C.H. and Choi, M.S. 2004. Rapid *in vitro* adventitious shoot propagation of *Scopolia parviflora* through rhizome cultures for enhanced production of tropane alkaloids. Plant Cell Reports, 23(3), 128-133.
- Kato-Noguchi, H. and Tanaka, Y. 2003. Effects of capsaicin on plant growth. Biology of Plants, 47, 157-159.
- Ketchum, R.E., Tandon, M., Gibson, D.M., Begley, T. and Shuler, M.L. 1999. Isolation of labeled 9-dihydroxybaccatin III and related taxoids from cell cultures of *Taxus canadensis* elicited with methyl jasmonate. Journal of Natural Product, 62, 1395-1398.
- Kieran, P.M., Malone, D.M., MacLoughlin, P.F. 1993. Variation of aggregate size in plant suspension batch and semicontinuous cultures. Transactions Institute of Chemical Engineers, 71, 40-46.
- Kim, M., Kim, S., Kim, S. and Kim, B.D. 2001. Isolation of cDNA clones differentially accumulated in the placenta of pungent pepper by suppression subtractive hybridization. Molecules and Cells, 11, 213-219.

- Kim, J. S. Lee, S.Y. and Park, S. U. 2008. Resveratrol production in hairy root culture of peanut, *Arachis hypogaea* L. transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains. *African Journal of Biotechnology*, 7(20), 3788-3790.
- Krischbaum-Titze, P., Mueller-Seitz, E. and Petz, M. 2002. Pungency in paprika (*Capsicum annuum*. 1. Decrease in capsaicinoids content following cellular disruption. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 1260-1263.
- Kogure, K., Goto, S., Nishimura, M., Yasumoto, M., Abe, K., Ohiwa, C. Sassa, H. Kusumi, T. and Terada, H. 2002. Mechanism of potent antiperoxidative effect of capsaicin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1573, 84-92.
- Kometani, T., Tanimoto, H., Nishimura, T., Kanbara, I. and Okada, S. 1993. Glucosylation of capsaicin by cell suspension cultures of *Coffea arabica*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 57, 2192-2193.
- Kosuge, S., Inagaki, Y. and Okumura, H. 1961. Studies on the pungent principles of red pepper. Part VIII. On the chemical constitutions of the pungent principles. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi (Journal of Agricultural Chemistry Society)*, 35, 923-927.
- Krajayklang, M., Klieber, A., Wills, R.B.H. and Dry, P.R. 1999. Effects of ethephon on fruit yield, colour and pungency of cayenne and paprika peppers. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 39, 81-86.
- Lindsey, K., Yeoman, M.M., Black, G.M. and Mavituna, F. 1983. A novel method for the immobilization and culture of plant cells. *FEBS Letter*, 155, 143-149.
- Lindsey, K. and Yeoman, M.M. 1983. Novel experimental systems for studying the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. *Plant biotechnology*, In: Mantell SH, Smith H, editors, Cambridge University Press, pp. 39-66, London.
- Lindsey, K. and Yeoman, M. M. 1984a. 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.
- Lindsey, K. and Yeoman, M.M., 1984b. The synthetic potential immobilized cells of *Capsicum frutescens* Mill. cv. *annuum*. *Planta*, 162, 495-501.
- Lindsey, K. 1985. Manipulation by nutrient limitation of the biosynthetic activity of immobilized cells of *Capsicum frutescens* Mill. cv. *annuum*. *Planta*, 165, 126-133.
- Lorizzi, M., Lanzotti, V., De Marino, S., Zollo, F., Blanco-Molina, M., Macho, A. and Muñoz, E. 2001. New glycoside from *Capsicum annuum* L. var. *acuminatum*. Isolation, structure determination and biological activity. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 2022-2029.

- Luckner, M. 1984. Secondary metabolism in microorganisms. Plants and Animals, (2nd ed.), Springer-Verlag, Berlin.
- Mandujana-Chavez, A., Schoenbeck, M.A., Ralston, L.F., Lozoya-Gloria, E. and Chappell, J. 2000. Differential induction of sesquiterpene metabolism in tobacco cell suspension cultures by methyl jasmonate and fungal elicitor. Archives of Biochemistry and Biophysics, 12, 381, 285-294.
- Masood, A., Dogra, J.V.V. and Jha, A.K. 1994. 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.
- Materska, M., Piacente, S., Stochmal, A., Pizza, C., Oleszek, W. and Perucka, I. 2003. Isolation and structure elucidation of flavonoid and phenolic acid glycosides from pericarp of hot peeper fruit *Capsicum annuum* L. Phytochemistry, 63, 893-898.
- Mehmetoğlu, Ü. and Curtis, W.R. 1997. Effects of abiotic inducers on sesquiterpene synthesis in hairy root and cell suspension cultures of *Hyoscyamus muticus*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 67, 71-77.
- Menke, F.L., Parchmann, S. Mueller, M.J. Kijne, J.W. and Memelink, J. 1999. Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. Plant Physiology, 119, 1289-1296.
- Mirjalili, N. and Linden, J.C. 1996. Methyl jasmonate induced in suspension cultures of taxol in suspension cultures of *Taxus cuspidata* : ethylene interaction and induction models. Biotechnology Progress, 12, 110-118.
- Molina-Torres, J., García-Chávez, A. and Ramírez-Chávez, E. 1999. Antimicrobial properties of alkaloids present in flavouring plants traditionally used in Mesoamérica:affinin and capsaicin. Journal of Ethnopharmacology, 64, 241-248.
- Moreau, R.A. and Preisig, C.L. 1993. Lipid changes in tobacco cell suspensions following treatment with cellulase elicitor. Physiologia Plantarum, 87, 7-13.
- Morrow, W. 1999. The chile pepper encyclopedia by Dave De Witt . William Morrow Company& Company Inc. New York.
- Mueller, M.J., Brodschelm, W., Spannagl, E. and Zenk, M.H. 1993. Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA., 90, 7490-7494.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15, 473-497.

- Namdeo, A. G. 2007. Plant cell elicitation for Production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews*,1(1), 69-79.
- Ochi, T., Takaishi, Y., Kogure, K. and Yamauti, I. 2003. Antioxidant activity of a new capsaicin derivative from *Capsicum annuum*. *Journal of Naturel Product*, 66, 1094-1096.
- Ochoa-Alejo, N. and Gómez-Peralta J.E. 1993. Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Plant Physiology*, 141, 147-152.
- Ochoa-Alejo, N. 2005. Capsaicin accumulation in *Capsicum* spp. suspension cultures. *Methods in Molecular Biology*, 327-334.
- O'Donnell, P.J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H.M.O. and Bowles, D.J. 1996. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science*, 274, 1914-1917.
- Oskay, D. and Oskay, M. 2009. Bitki sekonder metabolitlerinin biyoteknolojik önemi. *E-Journal of New World Sciences Academy*, 4(2), 31-41.
- Park, C.H. and Martinez, B.C. 1992. Enhanced release of rosmarinic acid from *Coleus blumei* permeabilized by dimethyl sulfoxide (DMSO) while preserving cell viability and growth. *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 459-464.
- Parr, A.J. 1989. The production of secondary metabolites by plant cell cultures. *Journal of Biotechnology*, 10, 1-26.
- Payne, G., Bringi, V., Prince, C. and Shuler, M.L. 1991. Plant cell and tissue culture in liquid systems. Hanser publishers, pp.346, Newyork.
- Pedapudi, S., Chin, C.K. and Pedersen, H. 2000. Production and elicitation of benzalacetone and the raspberry ketone in cell suspension cultures of *Rubus idaeus*. *Biotechnology Progress*, 16, 346–349
- Perucka, I. 1996. Effect of 2-chloroethylphosphonic acid on phenylalanine ammonia-lyase activity and formation of capsaicinoids in placenta of hot pepper fruits. *Acta Physiology Plant*, 18, 7-12.
- Perucka, I. and Materska, M. 2001. Phenylalanine ammonia lyase and antioxidant activities of lipophilic fraction of fresh pepper fruits *Capsicum annuum* L. *Innovative Food Science&Emerging Technologies*, 2, 189-192.
- Phillipson, J.D.1990. Plants as source of valuable products. Secondary products from plant tissue culture, In: Charlwood BV, Rhodes MJC.(eds), Oxford Clarendon Press, pp.1-21.

- Pitta-Alvarez, S.T., Spollansky, T.C. and Giulietti, A.M. 2000. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme Microbial Technology*, 26, 252-258.
- Poyrazoğlu, E.S., Yemiş, O. Kadakal, Ç. and Artık, N. 2005. Determination of capsaicinoid profile of different chilli peppers grown in Turkey. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 85, 1435-1438.
- Premjet, D. and Tachibana, S. 2004. Production of podophyllotoxin by immobilized cell cultures of *Juniperus chinensis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(7), 1130-1134.
- Ramachandra Rao, S., Sarada, R. and Ravishankar, G.A. 1996. Phycocyanin, a new elicitor for capsaicin and anthocyanin accumulation in plant cell cultures. *Applied Microbial Biotechnology*, 46, 619-621.
- Ramachandra Rao, S. and Ravishankar, G.A. 1999. Biotransformation of isoeugenol to vanilla flavour metabolites and capsaicin in suspended and immobilised cell cultures of *Capsicum frutescens* study of the influence of β -cyclodextrin and fungal elicitor, 35, 341-348.
- Ramachandra Rao, S. and Ravishankar, G.A. 2000. Biotransformation of protocathechuic aldehyde and caffeic acid to vanillin and capsaicin in freely suspended and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*, *Journal of Biotechnology*, 76, 137-146.
- Ramachandra Rao, S. and Ravishankar, G.A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20, 101-153.
- Ramos-Palacio, J.J. 1977. Spectrophotometric determination of capsaicin. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 60, 970-972.
- Ramos-Palacio, J.J. 1979. Further study of the spectrophotometric determination of capsaicin. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 62, 1168-1170.
- Ravishankar, G.A., Sarma, K.S. Venkataraman, L.V. and Kadyan, A.K. 1988. Effect of nutritional stress on capsaicin production in immobilized cell cultures of *Capsicum annum*. *Current Science*, 57, 381-383.
- Rodriguez, S., Compagnon, V., Crouch, N.P., St-Pierre, B. and De Luca, V. 2003. Jasmonate-induced epoxidation of tabersonine by a cytochrome P-450 in hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*, 64, 401-409.
- Rosa, A., Deiana, M., Casu, V., Paccagnini, S., Appendino, G., Ballero, M., Dessi, M.A. 2002. Antioxidant activity of capsinoids. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 7396-7401.

- Saniewski, M., Miszczak, A., Kawa-Miszczak, L., Wegrzynowicz-Lesiak, E., Miyamoto, K. and Ueda, J. 1998. Effects of methyl jasmonate on anthocyanin accumulation, ethylene production, and CO₂ evolution in uncooled and cooled tulip bulbs. *Journal of Plant Growth Regulation*, 17, 33-37.
- Savitha, B.C., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N. and Ravishankar, G.A. 2006. Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. *Process Biochemistry*, 41, 50-60.
- Schweiggert, U., Carle, R. and Schieber, A. 2006. 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.
- Sembdner, G. and Parthier, B. 1993. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 44, 569-589.
- Shanks, J.V. and Morgan, J. 1999. Plant 'hairy root' culture. *Current Opinion Biotechnology*, 10, 151-155.
- Sharan, M., Taguchi, G., Gonda, K., Jouke, T., Shimosaka, M., Hayashida, N. And Okazaki, M. 1998. Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. *Plant Sciences*, 132, 13-19.
- Sökmen, A. ve Gürel, E. 2002. Bitki Biyoteknolojisi 1 Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, 211-261, Konya.
- Stockigt J, Oblitz, P., Falkenhagen, H., Lutterbach, R. and Ende, B.S. 1995. Natural products and enzymes from plant cell cultures. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 43, 97-109.
- Sudha, G. and Ravishankar, G.A. 2002. Influence of calcium channel modulators in capsaicin production by cell suspension cultures of *Capsicum frutescens* Mill. *Current Science*, 83(4), 8, 480-484.
- Sudha, G. and Ravishankar, G.A. 2003a. Putrescine facilitated enhancement of capsaicin production in cell suspension cultures of *Capsicum frutescens*. *Journal of Plant Physiology*, 160, 339-346.
- Sudha, G. and Ravishankar, G.A. 2003b. Influence of methyl jasmonate and salicylic acid in the enhancement of capsaicin production in cell suspension cultures of *Capsicum frutescens* Mill. *Current Science*, 85, 1212-1217.

- Sukrasno, N. and Yeoman, M.M. 1993. Phenyl propanoid pathway metabolism during growth and development of *Capsicum frutescens* fruits. *Phytochemistry*, 32, 839-844.
- Suresh, B. and Ravishankar, G.A. 2005. Methyl jasmonate modulated biotransformation of phenylpropanoids to vanillin related metabolites using *Capsicum frutescens* root cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 125-131.
- Surh, Y.J. and Lee, S.S. 1996. Capsaicin in hot chili pepper: Carcinogen, Co-carcinogen or Anticarcinogen?. *Food and Chemical Toxicology*, 34(3), 313-316.
- Surh, Y.J. 2002. More than spice: Capsaicin in hot chili peppers makes tumor cells commit suicide. *Journal of National Cancer Institute*, 94, 1263-1265.
- Suvarnalatha, G., Chand, N., Ravishankar, G.A. and Venkataraman, L. V. 1993. Computer-aided modeling and optimization for capsaicinoid production by immobilized *Capsicum frutescens* cells. *Enzyme Microbial Biotechnology*, 15(8), 710-715.
- Suzuki, T. and Iwai, K. 1984. Constituents of red pepper species: Chemistry, biochemistry, pharmacology and food science of the pungent principle of *Capsicum* species. In Brossi A. (ed) *The Alkaloids*. Vol. 23, Academic Press Inc. pp. 227-299, Orlando, Florida.
- Tabata, H. 2004. Paclitaxel production by plant-cell-culture technology. *Advanced in Biochemical Engineering Biotechnology*, 87, 1-23.
- Taguchi, G., Yazawa, T., Hayashida, N. and Okazaki M. 2001. Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyltransferases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin. *European Journal of Biochemistry*, 268, 4086-4094.
- Takahata, K, Chen, X., Monobe, K. and Tada, M. 1999. Growth inhibition of capsaicin on hela cells is not mediated by intracellular calcium mobilization. *Life Science*, 64, 167-171.
- Teli, N. P. and Timko, M.P. 2004. Recent developments in the use of Transgenic plants for the production of human therapeutics and biopharmaceuticals. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 79, 125-145.
- Tellez, G., Jaeger, L., Dean, C.E., Corrier, D.E., Deloach, J.R., Williams, J.D. and Hargis, B.M. 1993. Effect of prolonged administration of dietary capsaicin on *Salmonella enteritidis* infection in Leghorn Chicks. *Avian Diseases*, 37, 143-148.
- Tewksbury, J.J. and Nabhan, G.P. 2001. Directed deterrence by capsaicin in chillies. *Nature*, 412, 403-404.

- Threlfall, D.R. and Whitehead, I.M. 1988. Co-ordinated inhibition of squalene synthetase and induction of enzymes of sesquiterpenoid phytoalexin biosynthesis in cultures of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*, 27, 2567–2580.
- Tominaga, M. and Julius, D. 2000. Capsaicin receptor in the pain pathway. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 83, 20-24.
- Thresh, J.C. 1876. Isolation of capsaicin. *The Pharmaceutical Journal and Transactions*, 3rd series, 6, 941-947.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E.R. and Ryals, J.A. 1992. Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 4, 645-656.
- Umamaheswari, A. and Lalitha, V. 2007. *In vitro* effect of various growth hormones in *Capsicum annuum* L. on the callus induction and production of capsaicin. *Journal of Plant Sciences*, 2(5), 545-551.
- Vanisree, M., Lee, C.Y., Lo, S.F., Nalawade, S.M., Lin, C.Y. and Tsay, H.S. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 45,1-22.
- Walton, N.J., Mayer, M.J. and Narbad, A. 2003. Vanillin. *Phytochemistry*, 63, 505-515.
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C. Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahi-Goy, P., Metraux, J.P. and Ryals, J.A. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 3, 1085-1094.
- Winter, M. and Herrmann, K. 1986. Esters and glucosides of hydroxycinnamic acids in vegetables. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 34, 616–620.
- Wu, J. and Lin, L. 2003. Enhancement of taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound, methyl jasmonate and *in situ* solvent extraction, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, 151-155.
- Xu, Y., Chang, P.F., Liu, D., Narasimhan, M.L., Raghothama, K.G., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. 1994. Plant defence genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *The Plant Cell*, 6, 1077-1085.
- Yeoman, M.M. and Yeoman, C.L. 1996. Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. *New Phytologist*, 134, 553-569.
- Yoo, E.Y., Kim, S., Kim, Y.H., Lee, C.J. and Kim, B.D. 2003. Construction of a deep coverage BAC library from *Capsicum annuum*, ‘CM334’. *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 540-543.

- Yoshimura, M., Yonehara, N., Ito, T., Kawai, Y. and Tamura, T. 2000. Effects of topically applied capsaicin cream on neurogenic inflammation and thermal sensitivity in rats. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 82, 116-121.
- Yu, Z.Z., Fu, C.X., Han, Y.S. Li, Y.X. and Zhao, D.X. 2006. Salicylic acid enhances jaceosidin and syringin production in cell cultures of *Saussurea medusa*. *Biotechnology Letters*, 28, 1027-1031.
- Zamski, E., Shoham, O., Palevitch, D. and Levy, A. 1987. Ultrastructure of capsaicinoid-secreting cells in pungent and nonpungent red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Botanical Gazette*, 148, 1-6.
- Zayed, R. and Wink, M. 2004. Induction of tropane alkaloid formation in transformed root cultures of *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae). *Zeitschrift für Naturforschung*, 59c, 863-867.
- Zeleneva, I.V. and Khavkin, E. E. 1980. Rearrangement of enzyme patterns in maize callus and suspension cultures :is it relevant to changes in the growing cells of the intact plant?. *Planta*, 148, 108-115.
- Zewdie, Y. and Bosland, P.W. 2000. Evaluation of genotype, environment, and genotype-by-environment interaction for capsaicinoids in *Capsicum annuum* L. *Euphytica*, 111, 185-190.
- Zhao, J., Hu, Q., Guo, Y.Q. and Zhu, W.H. 2001. Elicitor-induced indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cell cultures is related to Ca^{2+} influx and the oxidative burst. *Plant Science*, 161, 423-431.
- Zhao, J., Guo, Y.Q., Kosaihira, A. and Sakai, K. 2004. Rapid accumulation and metabolism of polyphosphoinositol and its possible role in β -thujaplicin biosynthesis in yeast elicitor-treated *Cupressus lusitanica* cell cultures. *Planta*, 219, 121-131.
- Zhao, J. Davis, L.C. and Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal production leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23, 283-333.
- Zhen, Z.Y., Chung, X. F. Ying, S. H., Yong, X.L. and De, X.Z. 2006. Salicylic acid enhances jaceosidin and syringin production in cell cultures of *Saussurea medusa*. *Biotechnology Letters*, 28, 1027-1031.

EKLER

- EK 1** 5 µg/ml' lik Kapsaisin standartının HPLC kromatogramı
- EK 2** 10 µg/ml' lik Kapsaisin standartının HPLC kromatogramı
- EK 3** 20 µg/ml' lik Kapsaisin standartının HPLC kromatogramı
- EK 4** 40 µg/ml' lik Kapsaisin standartının HPLC kromatogramı
- EK 5** 80 µg/ml' lik Kapsaisin standartının HPLC kromatogramı
- EK 6** 100 µg/ml' lik Kapsaisin standartının HPLC kromatogramı
- EK 7** Süzüntüye geçen kapsaisin miktarı ve toplam kapsaisin miktarının hesaplanması
- EK 8** 30 µg/ml selülaz uygulamasında 24. saatte tutuklanmış hücrelerdeki kapsaisin miktarına ait HPLC kromatogramı
- EK 9** 0,25 mg/ml kurdan uygulamasında 10. günde tutuklanmış hücrelerdeki kapsaisin miktarına ait HPLC kromatogramı
- EK 10** Ksantan bileşiğinin moleküler yapısı
- EK 11** Kurdan bileşiğinin moleküler yapısı

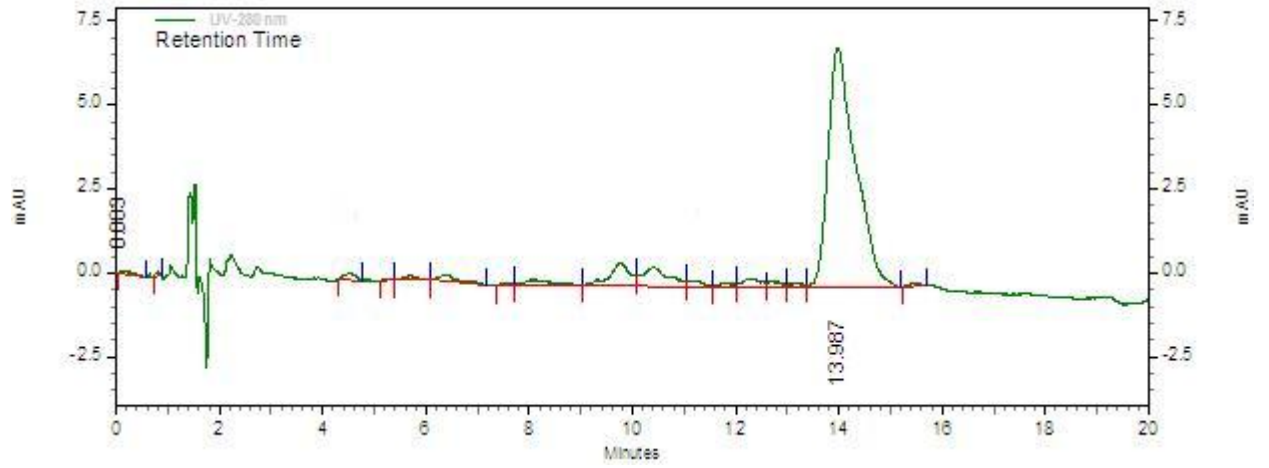
EK 1 5 µg/ml' lik Kapsaisin standartının HPLC kromatogramı

Analyst: System

Sample ID: 5 µg/ml

Vial: A01

Injection Volume: 10 µl



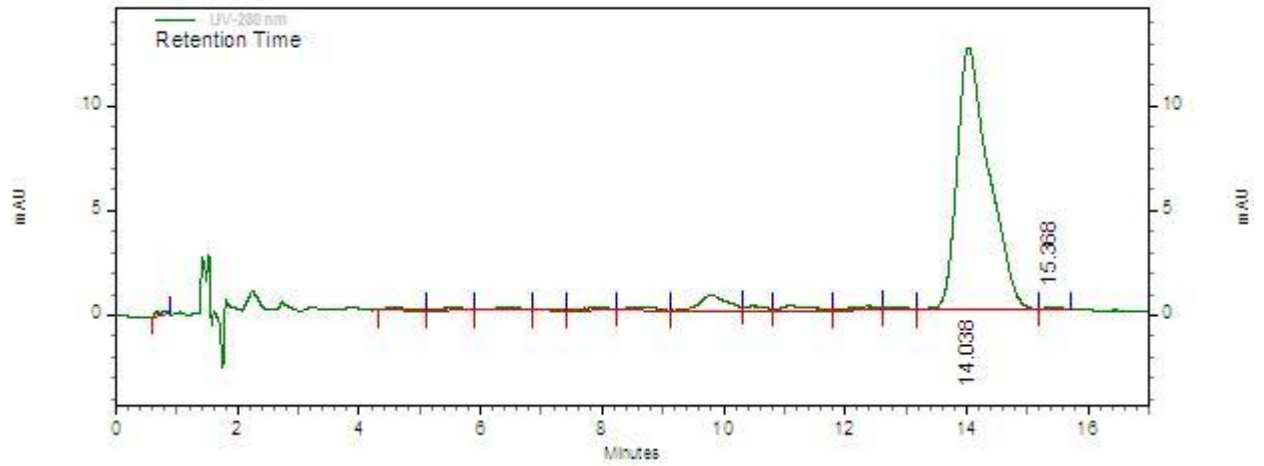
EK 2 10 µg/ml' lik Kapsaisin standartının HPLC kromatogramı

Analyst: System

Sample ID: 10 µg/ml

Vial: A01

Injection Volume: 10 µl



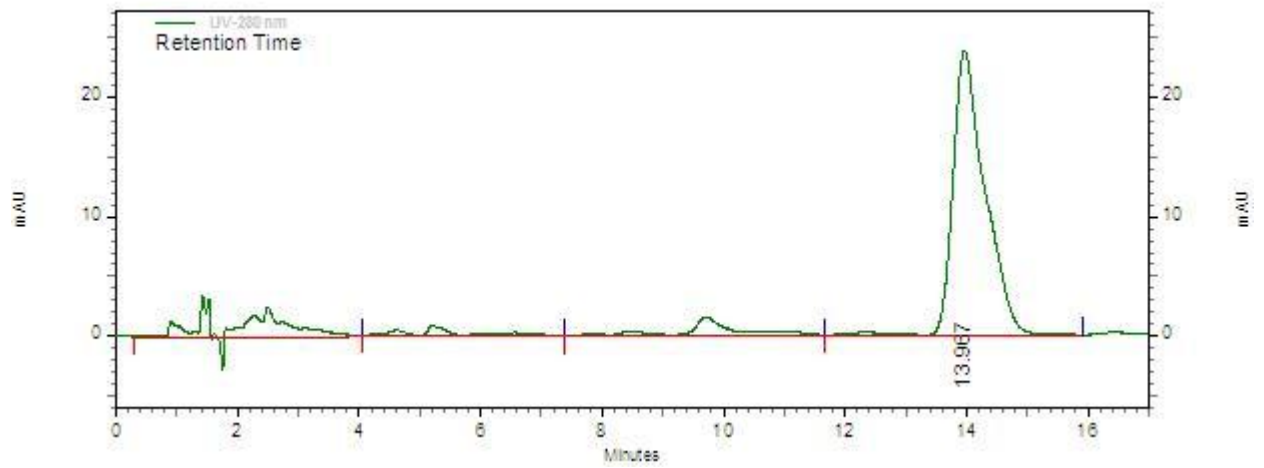
EK 3 20 µg/ml' lik kapsaisin standartının HPLC kromatogramı

Analyst: System

Sample ID: 20 µg/ml

Vial: A01

Injection Volume: 10 µl



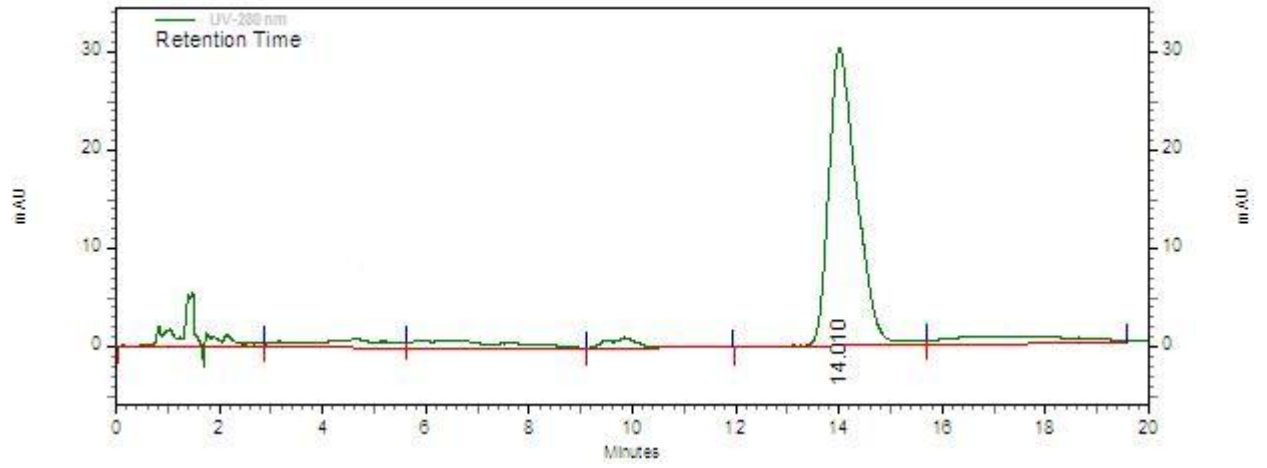
EK 4 40 µg/ml' lik Kapsaisin standartının HPLC kromatogramı

Analyst: System

Sample ID: 40 µg/ml

Vial: A01

Injection Volume: 10 µl



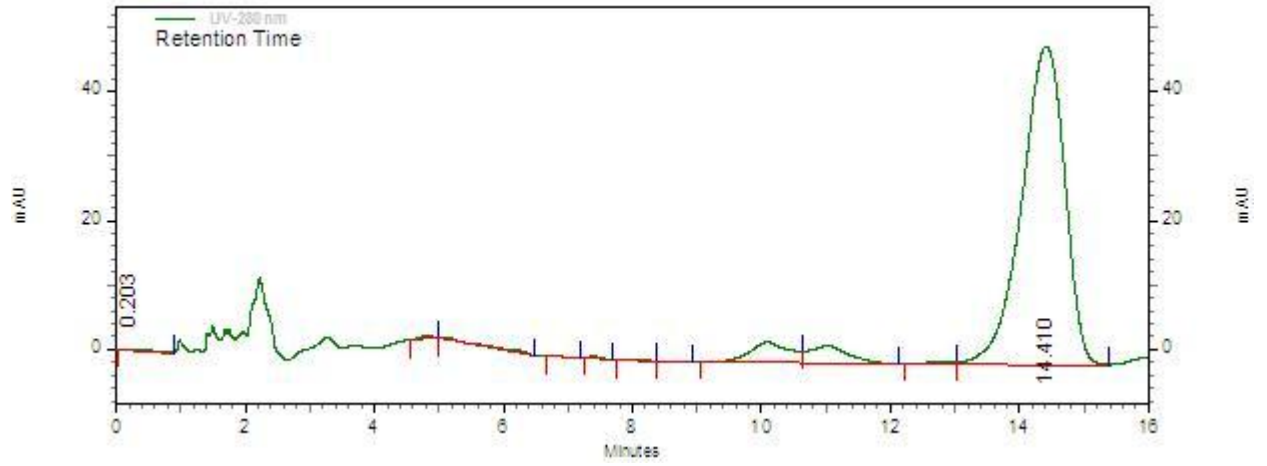
EK 5 80 µg/ml' lik Kapsaisin standartının HPLC kromatogramı

Analyst: System

Sample ID: 80 µg/ml

Injection Volume: 10 µl

Vial: A01



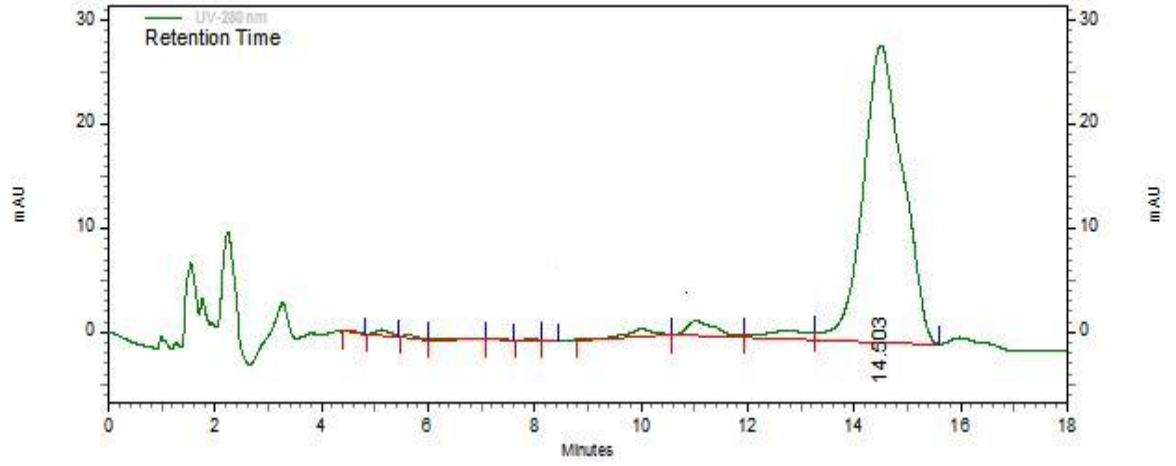
EK 6 100 µg/ml' lik Kapsaisin standartının HPLC kromatogramı

Analyst: System

Sample ID: 100 µg/ml

Injection Volume: 10 µl

Vial: A01



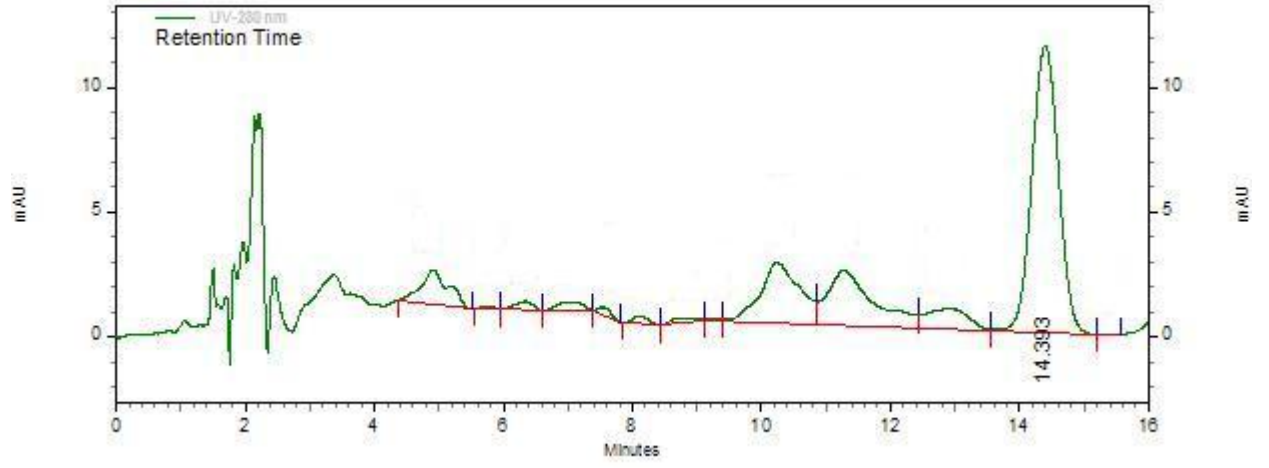
EK 7 Süzüntüye geçen kapsaisin miktarı ve toplam kapsaisin miktarının hesaplanması

Süzüntüye geçen kapsaisin miktarı ($\mu\text{g/g}$) = 40 ml besiyerindeki kapsaisin miktarı/
besiyerindeki hücrelerin yaş ağırlığı

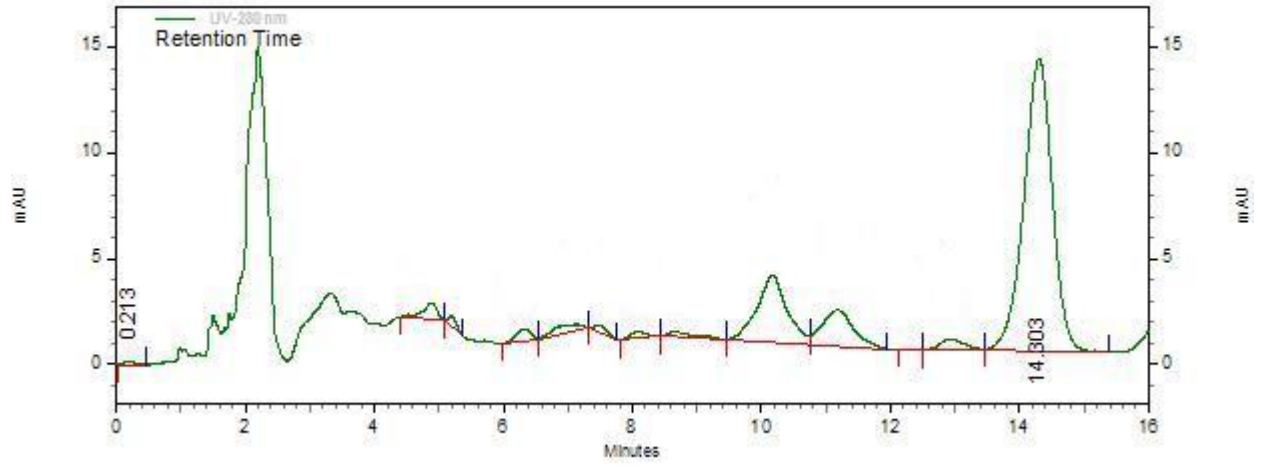
Serbest hücrelerde toplam kapsaisin miktarı ($\mu\text{g/g}$) = Serbest hücrelerdeki kapsaisin
miktarı + serbest hücrelerde süzüntüye geçen kapsaisin miktarı

Tutuklanmış hücrelerde toplam kapsaisin miktarı ($\mu\text{g/g}$) = Tutuklanmış
hücrelerdeki kapsaisin miktarı + tutuklanmış hücrelerde süzüntüye geçen kapsaisin
miktarı

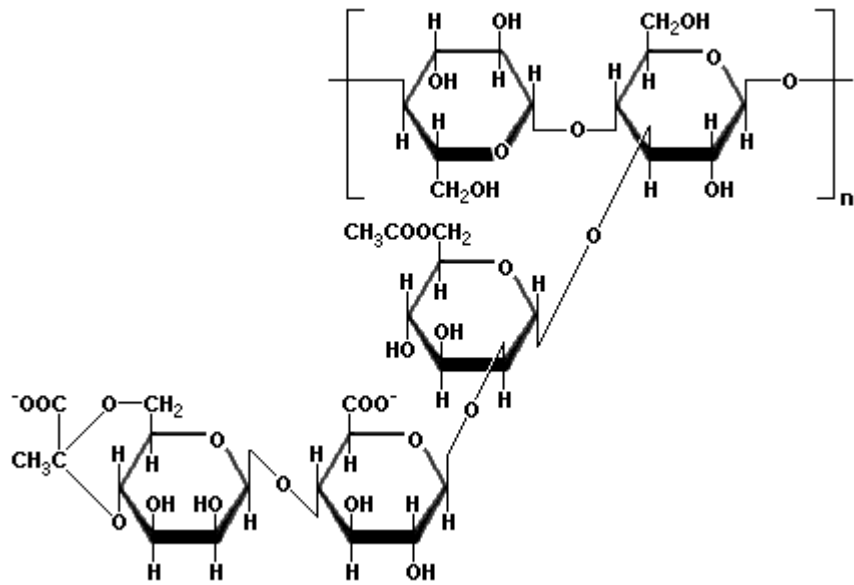
EK 8 30 µg/ml selülaz uygulamasında 24. saatte tutuklanmış hücrelerdeki kapsaisin miktarına ait HPLC kromatogramı



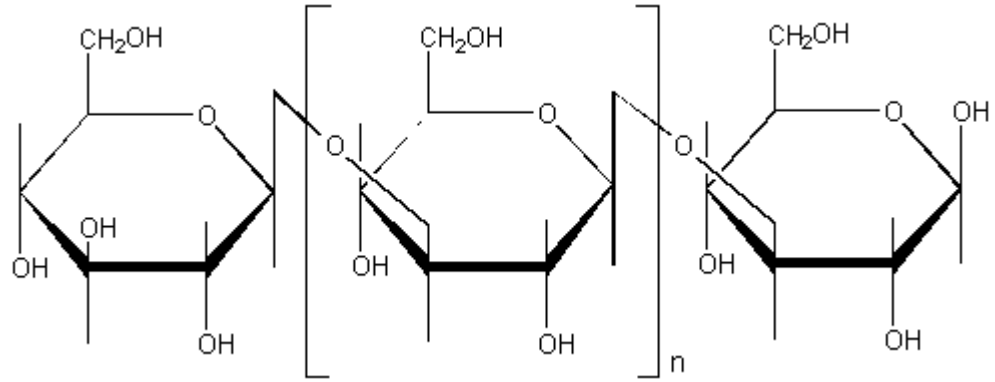
EK 9 0,25 mg/ml kurdlan uygulamasında 10. günde tutuklanmış hücrelerdeki kapsaisin miktarına ait HPLC kromatogramı



EK 10 Ksantan bileşiğinin moleküler yapısı



EK 11 Kurdlan bileşiğinin moleküler yapısı



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Cemil İŞLEK

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 19-04-1978

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Ankara Kurtuluş Lisesi,1992

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü,2000

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü,2003

Çalıştığı Kurumlar

Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Arş Grv., 2001-2003.

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Arş Grv., 2003-2009.