



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

BİBER KALLUSLARINDA BAZI FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL
PARAMETRELER ÜZERİNE YÜKSEK HİDROSTATİK BASINCIN ETKİSİ

ERSAN KARTOPU

Temmuz 2019

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

BİBER KALLUSLARINDA BAZI FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL
PARAMETRELER ÜZERİNE YÜKSEK HİDROSTATİK BASINCIN ETKİSİ

ERSAN KARTOPU

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Doç. Dr. Cemil İŞLEK

Temmuz 2019

Ersan KARTOPU tarafından **Doç. Dr. Cemil İŞLEK** danışmanlığında hazırlanan **“BİBER KALLUSLARINDA BAZI FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL PARAMETRELER ÜZERİNE YÜKSEK HİDROSTATİK BASINCIN ETKİSİ”** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :

Üye :

Üye :

ONAY:

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

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

Doç. Dr. Murat BARUT
MÜDÜR

TEZ BİLDİRİMİ

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

Ersan KARTOPU

ÖZET

BİBER KALLUSLARINDA BAZI FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL PARAMETRELER ÜZERİNE YÜKSEK HİDROSTATİK BASINCIN ETKİSİ

KARTOPU, Ersan

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Cemil İŞLEK

Temmuz 2019, 40 sayfa

Bu tez çalışmasında fiziksel bir uyarıcı olan basınç uygulamasının biber kalluslarında bazı fizyolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş biber fidelerinin hipokotil eksplantlarından kallus elde edilmiştir ve kalluslardan hücre süspansiyonları oluşturulmuştur. Hücre süspansiyonlarına 50, 100, 200 ve 300 MPa yüksek hidrostatik basınç (YHB) dozları uygulanmıştır. Uyarıcı uygulamasından sonra 12. günde örnek alınarak analiz işlemleri yapılmıştır. Farklı basınç dozlarının Malon aldehit (MDA), toplam fenolik bileşik miktarı, toplam protein miktarı değişimleri ile antioksidant enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktiviteleri üzerine olan etkileri incelenmiştir. Toplam protein ve toplam fenolik bileşik miktarındaki en fazla artış 50 Mpa basınç uygulamasında belirlenmiştir. 300 Mpa basınç uygulama dozunda SOD ve CAT enzim miktarındaki artış en fazladır. Elde edilen sonuçlar dışarıdan YHB gibi uyarıcıların ilavesi ile metabolik yolların tetiklendiğini göstermiştir. Abiyotik elisitör olarak YHB kullanımını bitki hücrelerinde stres sinyal iletim yollarının nasıl etkilediğinin araştırılarak öğrenilmesi ve ikincil metabolit üretimi ile ilgili yapılan çalışmalara kaynak oluşturması açısından önemlidir.

Anahtar Sözcükler: Yüksek hidrostatik basınç, bitki doku kültürü, antioksidant enzimler, toplam fenolik bileşik

SUMMARY

THE EFFECTS OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE ON SOME PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN PEPPER CALLUS

KARTOPU, Ersan

Nigde Ömer Halisdemir University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Cemil İŞLEK

July 2019, 40 pages

In this thesis, the effect of pressure, which is a physical elicitor, on some physiological and biochemical parameters in pepper calluses was investigated. For this purpose, callus was obtained from hypocotyl explants of germinated pepper seedlings under in vitro conditions and cell suspensions were formed from callus. 50, 100, 200 and 300 MPa high hydrostatic pressure (HHP) doses were applied to the cell suspensions. On the 12th day after the stimulant application, samples were taken and analyzed. The effects of different pressure doses on malon aldehyde (MDA), total phenolic compound, total protein amount changes and superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzyme activities were investigated. The maximum increase in total protein and total phenolic compound was determined at 50 Mpa pressure application. The increase in SOD and CAT enzymes is the highest at 300 Mpa pressure application dose. The results showed that the metabolic pathways are triggered by the addition of external stimulants such as HHP. The use of HHP's as an abiotic elicitor is important in terms of investigating how stress signal transduction pathways affect plant cells and providing resources for studies on secondary metabolite production.

Keywords: High hydrostatic pressure, plant tissue culture, antioxidant enzymes, total phenolic compound

ÖN SÖZ

Yüksek lisans tez çalışmamın yürütülmesi esnasında, yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren bana her türlü desteği sağlayan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Cemil İŞLEK'e yine kıymetli tecrübelerinden faydalandığım Doç. Dr. Bengü TÜRKYILMAZ ÜNAL'a ve laboratuvar çalışmaları esnasında yardımlarını gördüğüm, uzman biyolog Hüseyin TÜRKER'e ve Zeynep DÜZELTEN BALLI'ya, tez düzenlenmesinde yardımlarını gördüğüm arkadaşım Cihan DÜŞGÜN'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen canım aileme de çok teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ÖN SÖZ	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR	xi
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II GENEL BİLGİLER	3
2.1 Bitki Doku Kültürü	3
2.1.1 Kallus kültürü	3
2.1.2 Süspansiyon kültürü	4
2.1.3 Organ kültürü	4
2.2 Oksidatif Stresin Kontrolünde Antioksidan Sistemler	4
2.3 Malondialdehit	6
2.4 Fenolik Bileşikler	6
2.5 Yüksek Hidrostatik Basınç	7
2.5.1 Yüksek hidrostatik basıncın mikroorganizmalar üzerine etkisi	8
2.5.2 Yüksek hidrostatik basıncın hücre zarı üzerine etkisi	9
2.5.3 Yüksek hidrostatik basıncın proteinler üzerine etkisi	10
BÖLÜM III MATERYAL VE METOT	12
3.1 Bitkisel Materyal	12
3.2 Tohumların Yüzeysel Sterilizasyonu	12
3.3 Tohum Çimlendirme Ortamı Bileşimi ve Hazırlanması	13
3.4 Kültür Koşulları	14
3.5 Eksplant Tipi ve Eksplantın Kallus Ortamına Dikimi	15
3.6 Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Oluşturulması	17
3.7 YHB Uygulamaları ve Analiz İçin Örneklerin Hazırlanması	18
3.8 Fizyolojik ve Biyokimyasal Analizler	19
3.8.1 Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi	19

3.8.2 Malondialdehit analizi	20
3.8.3 Toplam protein miktarının belirlenmesi	20
3.8.4 Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi.....	20
3.8.4.1 Enzim ekstraktlarının hazırlanması	20
3.8.4.2 Süperoksit dismutaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi	21
3.8.4.3 Katalaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi.....	21
3.9 İstatistiksel Analizler	21
BÖLÜM IV BULGULAR	22
4.1 Malondialdehit Miktarındaki Değişimler	22
4.2 Toplam Fenolik Madde Miktarındaki Değişimler	23
4.3 Toplam Protein Miktarındaki Değişimler	24
4.4 Antioksidan Enzim Aktivitelerindeki Değişimler	25
4.4.1 Süperoksit dismutaz enzim aktivitesindeki değişimler	25
4.4.2 Katalaz enzim aktivitesindeki değişimler.....	27
BÖLÜM V TARTIŞMA VE SONUÇ.....	28
KAYNAKLAR	33
ÖZ GEÇMİŞ	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. MS temel besin ortamı (Murashige ve Skoog, 1962).....	14
Çizelge 4.1. Basınç uygulanan kallus dokularında MDA miktarındaki değişimler	22
Çizelge 4.2. Basınç uygulanan kallus dokularında toplam fenolik madde miktarındaki değişimler	23
Çizelge 4.3. Basınç uygulanan kallus dokularında toplam protein miktarındaki değişimler	24
Çizelge 4.4. Basınç uygulanan kallus dokularında SOD enzim aktivitesindeki değişimler	26
Çizelge 4.5. Basınç uygulanan kallus dokularında katalaz enzim miktarındaki değişimler	27

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Antikoksidan sistemlerin şematik olarak sınıflandırılması	5
Şekil 3.1. Biber tohumlarının steril besin ortamına ekimi	13
Şekil 3.2. Biber tohumunun ekimden 4 hafta sonraki gelişimi.....	15
Şekil 3.3. MS Besiyeri ortamında gelişen kallus dokuları.....	16
Şekil 3.4. Alt kültürde çoğalan kallus dokusu	17
Şekil 3.5. Çalkalayıcı üzerindeki hücre süspansiyon kültürleri.....	18
Şekil 3.6. Yüksek hidrostatik basınç sistemi	19
Şekil 4.1. Biber kallus dokularında MDA miktarındaki değişimler	23
Şekil 4.2. Biber kallus dokularında toplam fenolik madde miktarındaki değişimler	24
Şekil 4.3. Biber kallus dokularında toplam protein miktarındaki değişimler	25
Şekil 4.4. Biber kallus dokularında SOD enzim aktivitesindeki değişimler	26
Şekil 4.5. Biber kallus dokularında CAT enzim aktivitesindeki değişimler	27

SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrad Derece
mg	Miligram
mL	Mililitre
%	Yüzde
pH	Alkalilik ve Asitlik Faktörü
M	Molar

Kısaltmalar	Açıklama
YHB	Yüksek Hidrostatik Basınç
MPa	Mega Paskal
TCA	Trikloroasetik Asit
TBA	Tiyobarbütirik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
sn	Saniye
dak	Dakika

BÖLÜM I

GİRİŞ

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

In vitro ortamlarda, çeşitli doğal ve sentetik bitki büyüme düzenleyiciler ile desteklenerek hücre ve dokuların büyümesi teşvik edilerek morfojenetik yapının değiştirilmesi ve çeşitli metabolitlerin birikimi sağlanmaktadır. Üretimi artırmak için çeşitli fiziksel ve kimyasal maddelerde elisitörler (uyarıcılar) olarak kullanılır (Murthy vd., 2015). Bu uyarıcıların kullanımı ile kültür şartlarında oluşan stres koşullarının araştırılması ve bu koşulların optimize edilmesi üretim süreçleri açısından önemlidir.

Yüksek hidrostatik basınç (YHB) uygulaması, gıdaları oda sıcaklığında işleme ve koruma metotlarının en önemlilerinden biridir (Trujillo vd., 2002; Tülek ve Filizay, 2011). Yüksek basınç işlemi veya ultra yüksek basınç olarak da tanımlanan YHB, katı ve sıvı gıdaların ambalajlı veya ambalajsız olarak, 100 ve 1000 MPa (1000 ile 10000 bar) arasında basınca maruz bırakılmasını içine alan bir işlemdir (Akdemir Evrendilek vd., 2010; Arııcı, 2006).

Yüksek hidrostatik basınç (YHB) kullanımı günümüzden çok eski zamanlardan beri kendisine çeşitli uygulama alanları bulmaktadır. Orta Çağ'dan günümüze kadar yüksek basınç, sentetik elmas üretiminden; amonyak, üre, hidrokarbon v.b. maddelerin sentezine; ekstraksiyondan, sterilizasyona birçok değişik amaçla kullanılmaktadır (Bertucco ve Vetter, 2001).

Bu tez çalışmasında, biber hücre süspansiyon kültürleri hazırlanarak farklı oranlarda yüksek hidrostatik basınç uygulanmıştır ve basıncın belirli zamanlarda alınan örneklerde

bazı fizyolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.



BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

2.1 Bitki Doku Kültürü

Bitki doku kültürü, apikal meristem ve mezofil gibi dokuların; kök, gövde ve yaprak gibi organların; meristematik hücreler, kallus hücreleri gibi hücre ve hücre kısımlarının bitkiden ayrılarak steril (aseptik) koşullarda, yapay besin ortamları üzerinde in vitro olarak yetiştirilmesi ve bunlardan oluşan değişime açık hücre ve dokulardan (kallus) yeni bitkilerin yani klonların ya da bitkisel ürünlerin elde edilmesidir (Yağcı ve Toker, 2008).

Bitki doku kültürü çalışmalarında bitkiden ayrılarak ortama konulan parça eksplant olarak tanımlanmaktadır. Eksplant, küçük bir bitki olabileceği gibi organ, embriyo, tek hücre ve hatta çeperi kaldırılmış hücre (çıplak hücre, protoplast) olabilir. Önemli olan eksplanttaki hücrelerde totipotensi yeteneğinin bulunmasıdır. Totipotensi ise zigotta görülen ve mitoz bölünmelerle somatik hücrelere geçen tam bir bitki oluşturma özelliğidir (Yağcı ve Toker, 2008).

Günümüzde küresel ısınma, toprak veriminin azalması ve dünya nüfusunun hızla artması gibi nedenlerle aromatik bitkilerden elde edilen sekonder bileşiklerin in-vitro ortamda ekolojik faktörlerden etkilenmeksizin üretilmesi bilim insanlarını sorunu çözme yolunda doku kültürü uygulamalarına yöneltmiştir. Sekonder metabolitlerin üretiminde bitki doku ve hücre kültürü çalışmalarının hızlı, aynı kalitede ve ekolojik koşullardan etkilenmeden sürekli ürün sağlanmasıyla etkili alternatif bir yöntem olduğu bilinmektedir.

Sekonder metabolitlerin üretilmesi uygulamalarında doku kültüründe en yaygın kullanılan yöntemler kallus kültürü, süspansiyon kültürü ve organ kültürüdür.

2.1.1 Kallus kültürü

Kök, gövde, apikal meristem, kotiledon, yaprak gibi organlardan elde edilen küçük eksplantların kallus (bitki yara dokusu) oluşturmak için besin ortamlarına ekilmesiyle gerçekleştirilen yöntemdir (Yağcı ve Toker, 2008). Kallus oluşumu inkübasyon süresine,

ortam sıcaklığına, fotoperiyoda, bitkinin kallus oluşturabilme yeteneğine göre değişmektedir. Elde edilen kalluslardan sekonder metabolit üretimi ve süspansiyon kültürü yapılabilir (Yağcı ve Toker, 2008).

2.1.2 Süspansiyon kültürü

Üretilen kalluslar sıvı besin ortamına ekilip çalkalamalı inkübasyon yapılırsa süspansiyon kültürü kurulmuş olur. Hücreler sıvı ortamda serbest şekilde gelişir. Bu yöntem özellikle ekstrasellüler bileşiklerin üretiminde kullanılır. Arzu edilen madde ekstrasellüler değilse üreyen ve inkübasyon sonunda gelişen hücreler mekanik, kimyasal veya enzimatik olarak parçalanarak elde edilir (Yağcı ve Toker, 2008).

2.1.3 Organ kültürü

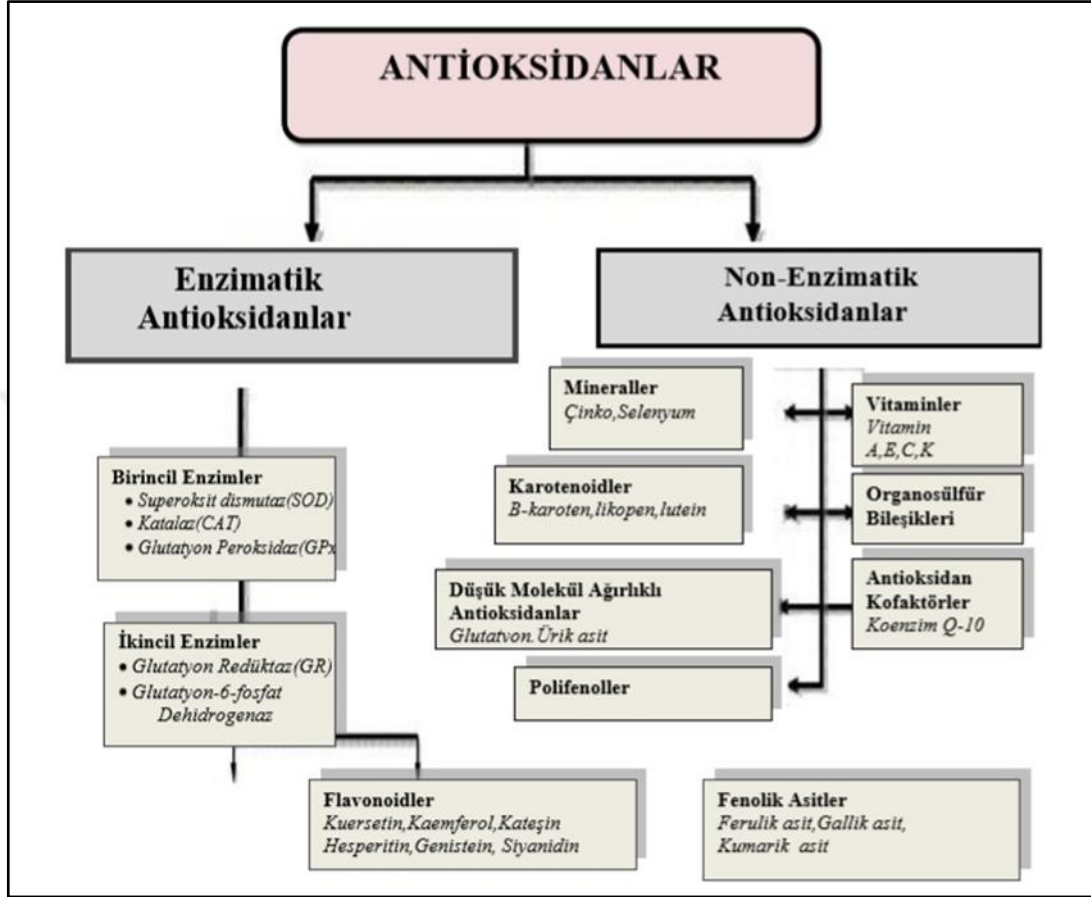
Üretilen kalluslardan veya doğrudan alınan eksplant üzerinden organ oluşturmaya yönelik yöntemdir. Organ kültürüyle sadece istenen organın gelişmesi sağlanabilir (örneğin köksüz bitkicik veya sadece kök oluşumu gibi). Bu kültür tipi organa özel sekonder metabolitlerin üretiminde oldukça avantajlıdır (Yağcı Tüzün, 2011).

2.2 Oksidatif Stresin Kontrolünde Antioksidan Sistemler

Bitkiler sesil doğaları gereği yaşam döngüleri boyunca büyüme ve gelişmelerini olumsuz yönde etkileyecek birçok stres faktörü ile karşılaşılırlar. Biyotik ve abiyotik kökenli olabilen bu stres faktörleri bitkilerde fizyolojik ve biyokimyasal zararlar oluşturarak, ürün nicelik ve niteliğini olumsuz yönde etkileyebilir (Büyük vd., 2012). Bitkiler oksidatif stres altında yaşamlarını devam ettirebilmek ve stresle başa çıkabilmek için Reaktif Oksijen Türleri (ROS)'nin kontrolü ve detoksifikasyonunu sağlayan çeşitli antioksidanlara sahiptirler. Antioksidanlar düşük konsantrasyonlar da oksidasyon yapabilen ve diğer bir substratın oksidasyonunu azaltan (elektron aktarımıyla) veya engelleyen yani oksidasyona karşı mücadele eden maddelerdir.

Antioksidanlar, enzimatik olmayan antioksidanlar ve enzimatik antioksidanlar olmak üzere iki kısımda incelenmektedir. Enzimatik olmayanlar, askorbik asit (AA), tokoferoller (vitamin E), karotenoidler, glutatyon ve fenolik bileşiklerdir. Enzimatik

antioksidanlar ise süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) olarak bilinmektedir. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar hücredeki lokalizasyonlarına ve rollerine göre farklılık göstermektedirler.



Şekil 2.1. Antikoksidan sistemlerin şematik olarak sınıflandırılması (Ratnam vd., 2006)

Süperoksit dismutaz enzimi 1968 yılında oksijenli solunum yapan canlılarda belirlenmiştir (Fridovich, 1983). Aerobik canlılarda $O_2^{\cdot-}$ 'lerin H_2O_2 'e çevrilmesi katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenir. Aynı zamanda süperoksit, hafif asidik koşullarda SOD olmadan kendiliğinden dismutasyonla H_2O_2 'e çevrilebilir (Büyük vd., 2012; Harbinson ve Hedley, 1993).

SOD enziminin yüksek katalitik etkisi nedeniyle hücrelerde $O_2^{\cdot-}$ birikimine izin verilmez. Ancak, çeşitli patolojik durumlarda süperoksit yapımının artmasıyla süperoksitde özgü tepkimeler görülmeye başlar. Süperoksit metal iyonlarını indirgeyerek bağlı olduğu proteinlerden salınımına neden olur. Metal iyonlarının katıldığı hidroksil radikali yapım tepkimelerini hızlandırır (Büyük vd., 2012; Harbinson ve Hedley, 1993).

Doğada özellikle bitkilerde bolca bulunan katalaz enzimi (CAT) H_2O_2 'yi indirgeyen veya parçalayan, peroksizomların ise yapısal bir bileşeni olan oksidaz enzimlerinden biridir (Halliwell ve Gutteridge, 1990; Higashi vd., 1974). CAT'ın temel fonksiyonu, moleküler oksijen mevcudiyetinde metabolizmanın bazı kademelerinde sentezlenen, hidrojen peroksitin ve ROOH gibi bir peroksidi giderek, özellikle membranlarda oluşturabilecekleri geri dönüşümsüz hasarları engellemektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 1997; Seriner ve Bilgin, 2012).

2.3 Malondialdehit

Lipit peroksidasyonu, yaşayan her canlı organizmada meydana gelen ve organizmaya en çok zarar veren aşama olarak düşünülür. Lipit peroksidasyonu; membrandaki doymamış yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri tarafından alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Serbest radikaller özellikleri nedeniyle lipitler, proteinler ve nükleik asitler ile etkileşerek hücreye zarar vermektedir. Malondialdehit (MDA), biyolojik sistemde lipitlerin oksidasyonu sonucunda oluşmaktadır. MDA reaktif bir aldehittir. MDA ölçümü ile Lipit peroksidasyonunun değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Bu bileşikler ya hücre olarak metabolize olurlar ya da başlangıçta etkili oldukları bölgeden difüze olarak hasarı hücrenin diğer bölümlerine yayarlar. MDA tipik şekilde bitki membranlarında peroksidize doymamış yağ asitlerinin üretimini bozar ve transkripsiyonel stres yanıtlarını tetikler (Diplock, 1991; Farmer ve Davoine, 2007).

2.4 Fenolik Bileşikler

Bir veya daha fazla hidroksil grubu içerirler. Bitkilerde oldukça fazla miktarda bulunan fenolik bileşikler, yapısında fenol grubu (aromatik halkasında bir hidroksil grup) taşıyan, çok çeşitli bileşiğin yer aldığı kimyasal maddelerdir (Taiz ve Zeiger, 2010). Genellikle bitki fenoliklerin önemli bir bölümünü hücre duvarının yapısına katılan lignin benzeri yapılar oluştursa da bitki yapısına direk olarak katılmayan çok farklı yapıda fenolik bileşikler bulunmaktadır. Örneğin, bitki savunmasında, ağaç türlerini birbirinden ayırma işleminde kullanılan farklı odun ve kabuk yapısının oluşmasında, farklı çiçek renkleri ve bitkiye özgü, spesifik tat ve kokuların oluşmasında fenolik bileşikler rol oynamaktadır. Bitki fenolikleri tarafından sağlanan bütün bu özellikler, tıpkı bütün sekonder

metabolitlerde olduğu gibi, bitkinin hayatta kalması için oldukça önemli biyoeolojik fonksiyonlardır (Croteau vd., 2000). Bitkilerde fenolik bileşikler, herbivorlara ve funguslara karşı savunma öğeleri olarak önemli görevler üstlenirler. Örneğin yapısında bir furan halkası barındıran bazı kumarinler (furokumarinler), güneş ışığının mor ötesi UV-A (320-400 nm) etkisi ile DNA'nın pirimidin bazlarına bağlanıp, hücrenin transkripsiyon ve onarım mekanizmalarını bozup hücrenin ölmesine sebep olabilir.

2.5 Yüksek Hidrostatik Basınç

Yüksek Hidrostatik Basınç (YHB); katı ve sıvı gıdaların ambalajlı veya ambalajsız olarak, 100 - 1000 MPa (1000 – 10000 bar) arasında basınca maruz bırakılmasını içine alan bir işlemdir (Arıcı, 2006). Gıda kaynaklı patojenleri inaktif etmek için 300 -600 MPa arasında uygulanan basınçların yeterli olduğu bildirilmektedir (Özcan ve Kurtuldu, 2011).

Günümüzde uygulanan gıda muhafaza tekniklerinin birçoğu ısıl işlem uygulamalarını içerdiği için hemen tamamında gıdanın besleyici değerinde azalma, tekstürü, ısıya duyarlı besleyici öğeleri, rengi, görünümü ve lezzetinde kaçınılmaz olumsuz değişimler görülmektedir. Bu nedenle, ısıl işlem içermeyen (non-thermal), iyonize radyasyon, yüksek hidrostatik basınç (YHB), vurgulu elektrik alanı, yüksek basınç homojenizasyonu, UV ışınlama gibi gıda muhafaza tekniklerinin kullanımı konusunda yoğun araştırmalar yapılmaktadır (Devlieghere vd., 2004; Ross vd., 2003). Bu yeni nontermal teknolojiler, gıda maddesinin renk, lezzet, tekstür ve besin değeri üzerine yüksek sıcaklığın yarattığı olumsuz etkilere yol açmadan, oda sıcaklıkları ve oda sıcaklıklarına yakın sıcaklıklarda mikroorganizmaları inaktive etme özelliğine sahiptirler (Ross vd., 2003). YHB uygulamaları, gıda maddeleri üretim proseslerinde mikroorganizma inaktivasyonu için sıcaklık uygulamalarına alternatif olarak kullanılan ve gıdalarda soğuk pastörizasyon yöntemi olarak son yıllarda ilgi uyandıran bir yöntem olarak büyük önem taşımaktadır (Alpas vd., 2003; Devlieghere vd., 2004). Bu nedenle, YHB uygulamaları alternatif yöntemler içinde en çok çalışılanı olmuş ve farklı işlem şartları altında mikroorganizmaların inaktivasyonunda başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Spilimbergo vd., 2002). Bu tekniğin gıda endüstrisindeki uygulamalarında en ilgi çekici yönü; gıdaların yapısında önemli değişiklikler oluşturmaksızın, ürünü mikrobiyal açıdan koruyabilen bir yöntem olmasıdır (Kınık vd., 2004).

YHB'nin en önemli kullanım alanları şöyle sıralanabilir: Mikroorganizma inaktivasyonu (Hoover, 1989), biyopolimer modifikasyonu, protein denaturasyonu (Heremans, 1982), enzim inaktivasyonu veya aktivasyonu (Anonim, 1997), jel formasyonu (Anonim, 1997; Şanal ve Çalıklı, 2000), tat-koku ve renk gibi duyuşal kalite öğelerinin korunması (Gökmen ve Acar, 1995), ekstraksiyonda verim artırılması (Şanal ve Çalıklı, 2000), yoğunluk, donma ve erime sıcaklıklarının veya tekstürel özelliklerin değişimini sağlamak (Farr, 1990).

Yüksek basınç, ticari olarak uzun yıllardan beri seramik materyal, sentetik kuarz ve diğer bir çok endüstriyel uygulaması olan bir teknolojidir (Gökmen ve Acar, 1995; Kınık vd., 2004; Trujillo vd., 2002). 1970 ve 1980'li yıllarda seramik ve metalurji endüstrisinde yüksek basınç kullanımında büyük gelişmeler kaydedilmiştir (Trujillo vd., 2002). Ancak, yüksek basıncın gıda endüstrisindeki uygulamaları çok yeni olup, henüz araştırma safhasındadır. Özellikle Japonya'da bu konuda yoğun çalışmalar yapılmakta ve bu teknik gıda endüstrisi için geliştirilmektedir (Gökmen ve Acar, 1995).

Günümüzde, gıda sanayinde bu teknik geniş bir uygulama alanı bulmuştur (Kınık vd., 2004). Bu tekniğin oda sıcaklığında, 100-900 MPa basınç aralığında, etten meyve suyuna kadar tüm gıdalarda başarıyla uygulandığı belirtilmektedir (Şanal ve Çalıklı, 2000). YHB uygulanmış ilk ticari ürünler 1991'de Japonya pazarında görülmüştür (Trujillo vd., 2002).

2.5.1 Yüksek hidrostatik basıncın mikroorganizmalar üzerine etkisi

Yüksek basınç mikroorganizmaların morfolojisi, biyokimyasal reaksiyonları, genetik mekanizmaları, hücre zarları ve duvarları ve spor kılıfları üzerinde değişimlere yol açar (Gökmen ve Acar, 1995; He vd., 2002; Şanal ve Çalıklı, 2000). Basınç altında gaz kofullarının sıkışması, hücre uzaması, hücre duvarının hücre zarından ayrılması, hücre zarının çekmesi, çekirdek veya hücre içi organellerin değişimi, hücre içi maddelerin hücre dışına sızması gibi morfolojik değişimler olur (İbanoğlu, 2002).

Mikroorganizmalar üzerine yüksek basıncın öldürücü etkisinin, denatürasyon sonrası bazı önemli enzimlerin inaktivasyonu sonucu gerçekleştiği, 100- 300 MPa basınçlar arasında tersinir olan denatürasyonun, 300 MPa üzeri basınçlarda geri dönüşümsüz hale geçtiği ifade edilmiştir (Hoover, 1989).

2.5.2 Yüksek hidrostatik basıncın hücre zarı üzerine etkisi

Hücre zarı yapısı, fosfolipit ve proteinlerden oluşmaktadır (Gökmen ve Acar, 1995). Hücre zarı geçirgenliğinde meydana gelebilecek değişimler hücrenin ölümüne yol açabilmektedir (Gökmen ve Acar, 1995; He vd., 2002). Basınç etkisi ile mikroorganizma ölümlerinin birincil nedeninin hücre zarındaki değişimler olduğu sanılmaktadır (Gökmen ve Acar, 1995; Hugas vd., 2002; Ross vd., 2003). 100-800 MPa arası basınç uygulamalarının hücre zarı geçirgenliğine yol açtığı bilinmektedir (Rastogi vd., 2000). Yüksek basınç uygulamaları sonucu hücre zarını oluşturan katmanların hacminde azalma olmakta, sıkıştırılmış zar genellikle normalden farklı geçirgenlik göstermektedir (Gökmen ve Acar, 1995).

Hücre duvarı mikrobiyal hücrelerin şeklini ve sağlamlığını vermektedir. Yüksek basıncın hücre duvarına zararı nedeniyle hücreler daha geçirgen olmaktadır (Rastogi vd., 2000). Hücre duvarı bozulması 400-500 MPa arasındaki uygulamalarda olmaktadır. Hücrenin iç yapısı, örneğin organellerin morfolojisi basınca daha duyarlıdır (Hartmann ve Delgado, 2004). Çekirdek zarı 100 MPa basınç uygulamaları altında etkilenmeye başlar, 400-500 MPa arası basınçlarda tüm organellerin membranları bozulur (Brul vd., 2000; Hartmann ve Delgado, 2004; Tülek ve Filizay, 2011).

Yüksek hidrostatik basıncın gıda muhafaza yöntemi olarak yerleştirilmesi konusunda yapılan çalışmaların birçoğu basınç uygulamalarının mikroorganizmalar üzerine olan etkilerini incelemektedir (Gökmen ve Acar, 1995). Basınç uygulamaları altında gıda enzimlerinin nasıl etkilendiği son yıllarda araştırılmaya başlanmıştır (Şanal ve Çalimli, 2000).

Mikroorganizmalar basınç uygulamaları sonucu genellikle inaktive olurken, enzimler inaktivasyon, aktivasyon veya varolan aktivitelerinin artması gibi tepkiler vermektedir (Gökmen ve Acar, 1995; Şanal ve Çalimli, 2000). Basınçla muamelede uygulanan basınç, uygulama süresine, sıcaklığa bağlı olarak enzimi tamamen veya belli bir ölçüde, dönüşümlü veya dönüşümsüz olarak inaktive edebilir (İbanoğlu, 2002). Yüksek basıncın enzimleri inaktive etmesi; intra-moleküler yapı değişimi veya enzimin aktif yerindeki değişim nedeni ile olmaktadır (Şanal ve Çalimli, 2000). Dönüşümlü aktivasyonun, basınç etkisiyle enzim veya substratın yapısında gerçekleşen değişimlerle oluştuğu

açıklanmaktadır (İbanoğlu, 2002). Araştırmacılar, gıda bileşiminde bulunan çözünebilir katı, şeker, protein ve yağ bileşenlerinin enzim inaktivasyonuna karşı koruyucu özellik gösterdiğini belirtmektedirler (Şanal ve Çalimli, 2000).

Yüksek basınç uygulaması ile tripsin aktivitesinde azalma gözlenmiştir (Gökmen ve Acar, 1995). 250 MPa basınç altında 15 dakika muamele ile çilek püresindeki polifenoloksidaz aktivitesinde %60 kayba, 230 MPa basınç peroksidaz aktivitesinde %25 kayba yol açarken, 250-400 MPa arasındaki basınçlarda her iki enzimin aktivitesinde de artış görülmüştür (İbanoğlu, 2002). Portakal sularında, 300 MPa ve üzerindeki basınç uygulamalarında pektinesteraz aktivitesinde azalma saptanmıştır (Gökmen ve Acar, 1995).

2.5.3 Yüksek hidrostatik basıncın proteinler üzerine etkisi

Genellikle, basınç altında hidrofobik ve iyonikbağların kırıldığı, hidrojen bağlarının kuvvetlendiği tespit edilmiştir (Hugas vd., 2002; İbanoğlu, 2002). Kovalent bağlar yüksek basınçtan etkilenmemektedir (Hugas vd., 2002; Needs vd., 2000; Ross vd., 2003; Şanal ve Çalimli, 2000).

Basınç, aminoasitlerin R gruplarındaki asit gruplarının ayrışmasına ve 300 MPa basıncın üzerinde ve oksijenli ortamda S-S bağlarının oluşumuna yol açmaktadır. Yapılan çalışmalar, 100- 400 MPa basınç altında moleküllerin polimer yapılarının ayrışarak parçalara ayrıldığını (hidrofobik etkileşimlerin zayıflaması nedeni ile) veya yapısının kısmen açılarak (hidrofobik ve iyonik bağların zayıflaması nedeni ile) denatüre olduğunu göstermektedir. Bu basınç aralığında yapıdaki değişim dönüşümlü olabilir. Yapıdaki bu değişim protein çözünürlüğünü etkiler (Hayakawa vd., 1996; İbanoğlu, 2002).

300-400 MPa üzerindeki basınç uygulamaları birçok proteinin yığılmasına yol açar. Yığılım, protein yapısına, uygulanan basınca, uygulama süresine, protein konsantrasyonu ve pH'ya bağlı olarak değişir. Yığılım, basınç ortadan kalktıktan sonra kısmen açılan proteinin, sulu ortama çıkan hidrofobik gruplar başta olmak suretiyle moleküller arası bağ oluşturmasından kaynaklanır. S-S bağlarının oluşması yığılımda rol oynar (İbanoğlu, 2002).

Proteinlerin yapısının kısmen açılması onların köpürme ve emülsiyon oluşturma özelliklerinde değişime yol açar. Yüksek basınç kontrollü yapısal değişim sağlayabilir. Böylece istenilen özelliklere sahip proteinler basınç uygulaması ile elde edilebilir (İbanoğlu, 2002).

Biyomoleküller, basınç altında Le Chatelier prensibine göre davranırlar. Bu prensibe göre, denge halindeki bir sistemde bir değişiklik yapılırsa, sistem bu değişikliğe karşılık bir tepki verecektir ve bir denge hali oluşacaktır. Bir sisteme basınç uygulandığında buna karşılık olarak hacmi küçültecek reaksiyonlar veya tepkiler teşvik edilecektir. Paskal prensibine göre yüksek basınç, ürünün büyüklüğü ve şekline bağlı olmadan gecikmesiz olarak etki gösterir. Basınç uygulaması oda sıcaklığında gerçekleştiğinden geleneksel yöntemlerdeki gibi termal enerjiye gereksinim duyulmaz ve ürün yapısında, ısının neden olduğu olumsuzluklar ortaya çıkmaz (Mertens ve Deplace, 1993; Sayın ve Tamer, 2014).

BÖLÜM III

MATERYAL VE METOT

3.1 Bitkisel Materyal

Tez çalışmasında kullanılan biber tohumu (Maraş-1) Doğu Akdeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma İstasyonu Müdürlüğü'nden temin edilmiştir.

3.2 Tohumların Yüzeysel Sterilizasyonu

Çalışmada kullanılan 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, %40'luk ticari sodyum hipoklorit ilave edilmiş ve 30 dakika süreyle çalkalayıcı da çalkalanarak, hipoklorit kısım ayrılmıştır. Daha sonra 3 kez 5'er dakika beklenerek şekilde steril su ilave edilmiş ve süzümüştür (Ellialtıoğlu vd., 1998). İçerisinde yaklaşık 50'şer mLsteril agarlı besi ortamı konulan magenta kaplarının her birinin içine yüzeysel sterilizasyonu biten tohumlardan yerleştirilmiştir (Şekil 3.1). Kapakları kapatılmış ve üzerine streç film sarılmıştır.



Şekil 3.1. Biber tohumlarının steril besin ortamına ekimi

3.3 Tohum Çimlendirme Ortamı Bileşimi ve Hazırlanması

Biber tohumlarının çimlendirilmesi için hormonsuz Murashige ve Skoog (1962) (MS) temel besi ortamı kullanılmıştır. MS besiyeri Sigma-Aldrich firmasından satın alınmıştır. MS besiyeri içeriği Çizelge 3.1’de gösterilmektedir. Besin ortamlarının hazırlanmasında kullanılan saf maddelerden hazırlanan stok çözeltiler +4°C’deki buzdolabında saklanmıştır. Vitaminlerin 100 kat derişik 250 mL’lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. Tohum çimlendirme ortamı olan hormonsuz MS besin ortamına %3 sakkaroz ile %0,7 agar ilave edilmiş ve besiyerinin pH’ı 5,7’e ayarlanmıştır.

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
Nikotinic Asit	0,5
Pridoksin-HCl	0,5

3.4 Kültür Koşulları

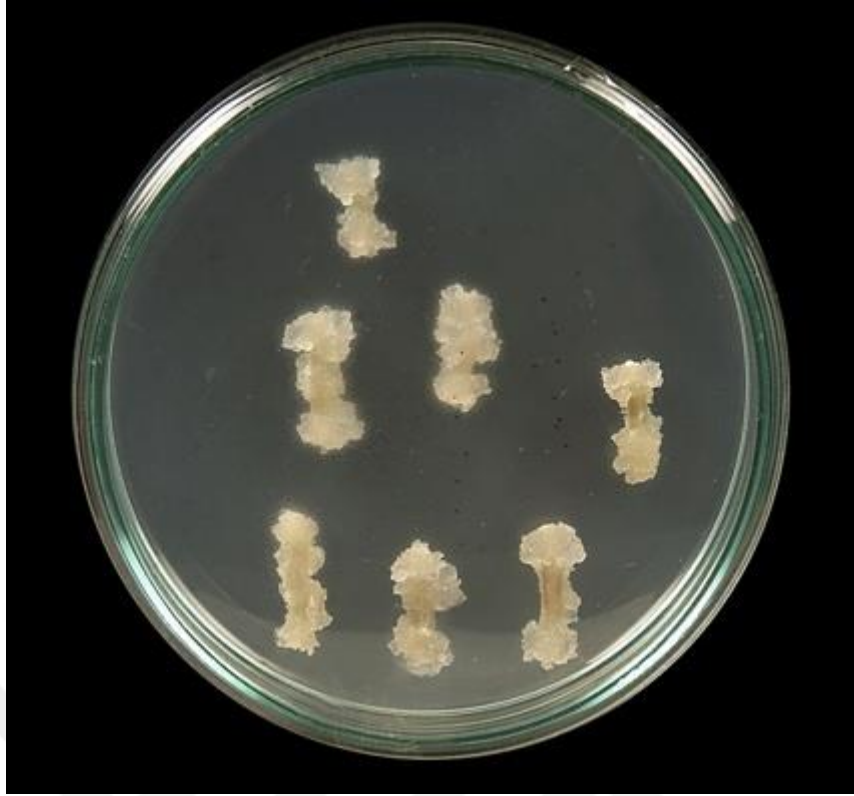
Tohum çimlendirme aşamasında magenta kutuları 25°C±1 sıcaklığına sahip iklim odasında bir hafta süreyle karanlıkta tutulmuş, tohumlarda çimlenmenin başladığı görüldükten sonra 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak şekilde fotoperiyodik düzene geçilmiştir. Biber tohumunun ekimden 4 hafta sonraki gelişimi Şekil 3.2’de görülmektedir.



Şekil 3.2. Biber tohumunun ekimden 4 hafta sonraki gelişimi

3.5 Eksplant Tipi ve Eksplantın Kallus Ortamına Dikimi

Steril koşullarda çimlendirilen tohumlardan gelişen biber fideleri, dört haftalık inkübasyon süresini tamamladıktan sonra eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Her bir fideden hipokotil eksplantı kesilmiştir. Öncelikle kökboğazından kesim yapılarak kökler uzaklaştırılmış, hipokotil bölgesi yaklaşık 1 cm'lik parçalara ayrılmış 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 fotoperiyodik düzende iki hafta süreyle iklim odasında geliştirilmiştir. Gelişen kallus dokuları Şekil 3.3'de görülmektedir.



Şekil 3.3. MS Besiyeri ortamında gelişen kallus dokuları

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 periyodik düzende iklim odasında geliştirilmiştir. Alt kültürde gelişen kallus dokusu Şekil 3.4'de görülmektedir.



Şekil 3.4. Alt kültürde çoğalan kallus dokusu

3.6 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 steril 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.



Şekil 3.5. Çalkalayıcı üzerindeki hücre süspansiyon kültürleri

3.7 YHB Uygulamaları ve Analiz İçin Örneklerin Hazırlanması

Basınç uygulama çalışması ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü'nde yürütülmüştür. Yüksek hidrostatik basınç uygulaması bir endüstriyel yüksek basınç sistemi olan SITEC CH-8124 (Zürich, Switzerland) cihazı ile yapılmıştır (Şekil 3.6). Basınç uygulaması sırasında iç sıcaklık Huber Circulation Thermostat (Offenburg, Germany) ısıtma-soğutma sistemi ile kontrol altında tutulmuştur. Basınç iletim ortamı olarak su seçilmiştir. Uygulama sırasında kompresyon ve dekompresyon süreleri 20 sn.'den küçük tutulmuştur. Uygulamada basınç oranları 50 MPa için 500 MPa/dak, 100 MPa için 450 MPa/dak, 200 MPa için 400 MPa/dak, 300 MPa için 350 MPa/dak ve 400 MPa için 300 MPa/dak şeklindedir. Her örnekten üçer paralel halinde basınçlama yapılmış olup, sonuçlar basınçlama yapılmamış örneklerle karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.6. Yüksek hidrostatik basınç sistemi

3.8 Fizyolojik ve Biyokimyasal Analizler

3.8.1 Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi

0,1 gr kallus örneği 5 mL %80 metil alkol ile homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnek 80°C’de 15 dak. inkübe edilmiş ve 500G’de 10 dak. Santrifüj edilmiştir. Pelet tekrar 2,5 mL %80 metil alkol ile homojenize edilmiş, 80°C’de 15 dak. inkübe edilerek 500g’de 10 dak. santrifüj edilmiştir. Peletten elde edilen süpernatant diğerine eklenmiştir. Süpernatant 80°C’de kurutulmuş ve 1 mL %80 metil alkol ile tekrar süspansiyon edilmiştir. Bu süspansiyon toplam fenolik madde miktarının tayininde kullanılmıştır (Gayoso vd., 2004). Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesinde Folin ciocaltaeu yöntemi kullanılmıştır (Singleton ve Rossi, 1965). 100 µl ekstrakt 10 kez seyreltilmiş Folin ciocaltaeu ile oda sıcaklığında 5 dak inkübe edilmiştir. Bu çözeltiye 750 µL sodyum bikarbonat solüsyonu eklenmiş ve oda sıcaklığında 90 dak. inkübe edilmiştir. 765 nm’de absorbans değeri spektrofotometrede kaydedilmiştir. Fenolik madde miktarı galik asit standartı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.8.2 Malondialdehit analizi

Malondialdehit (MDA) analizi Heath ve Packer (1968)'e göre belirlenmiştir. Taze örnek %1 TCA ile homojenize edildikten sonra elde edilen ekstrakta %20 TCA ve %0,5 TBA içeren çözelti ilave edilmiştir. 95°C'de 30 dak. su banyosunda inkübe edilmiş, 532 ve 600 nm'de spektrofotometrede okuma yapılmıştır. MDA miktarı ekstinksiyon katsayısı ($155\text{mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplanmıştır.

3.8.3 Toplam protein miktarının belirlenmesi

Toplam protein miktarının belirlenmesi için, kontrol ve uygulama gruplarından 3 tekrarlı olarak alınan 1'er g kallus örneği, 1 mM EDTA içeren, 5 mL pH 7,8'lik 0,05 M Na-fosfat tamponunda buz banyosu içerisinde ekstre edilmiştir. Elde edilen ekstrakt 13000 rpm'de soğutmalı santrifüjde 30 dakika süre ile santrifüj edilmiştir.

Santrifüj işlemi sonrası uygun hacimde alınan süpernatantlara, Coomassie Brilliant Blue protein boyası içeren 1 mL reaksiyon karışımı eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilen örneklerin, VIS Spektrofotometre ile 595 nm'deki absorbans değerleri alınmıştır. Elde edilen bu absorbans değerleri, BSA standartları (0,02-0,2 mg/mL) ile oluşturulan kalibrasyon eğrisine uygulanarak örneklerdeki çözünebilen toplam protein miktarı, mg.g yaş ağırlık⁻¹ olarak belirlenmiştir.

3.8.4 Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

3.8.4.1 Enzim ekstraktlarının hazırlanması

Süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktivitelerinin belirlenebilmesi amacıyla kontrol ve uygulama gruplarından üçer kez 1'er g kallus örneği tartılmıştır. 1 g kallus örneği SOD enzim aktivitesi tayini için 1 mM EDTA içeren, 5 mL pH 7,8'lik 0,05 M Na-fosfat tamponunda; CAT aktivitesi tayini için 1 mM EDTA içeren, 3 mL pH 7,6'lik 0,05 M Na-fosfat tamponunda buz banyosu içerisinde ekstaksiyona tabi tutulmuştur. Elde edilen ekstrakt 13000 rpm'de soğutmalı santrifüjde 30 dakika süre ile santrifüj edilmiştir.

3.8.4.2 Süperoksit dismutaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi

Süperoksit dismutaz (SOD) enziminin aktivitesi, Beauchamp ve Fridovich (1971) tarafından belirtilen yöntemle göre yapılmıştır. Yöntem, 560 nm'de nitroblue tetrazolium'un (NBT) fotokimyasal indirgenmesinin örnekte bulunan SOD enzimi tarafından engellenmesine dayanmaktadır. Reaksiyon karışımı, 50 mM Na-fosfat tamponu (pH 7,8), 33 µM NBT, 10 mM L-Methionine, 0,66 mM EDTA ve 0,0033 mM Riboflavin içermektedir. Süpernatant uygun miktarda seyreltilmiş ve reaksiyon karışımı (3 mL) ilave edilmiştir. Reaksiyonun gerçekleşmesi için karışım, 10 dakika $300 \mu\text{mol}^{-1} \text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti altında, oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu süre sonunda spektrofotometre ile 560 nm'de örneklerin absorbans değerleri alınmıştır. Enzim aktivitesi, NBT'nin %50 inhibisyonu için gerekli SOD miktarı, 1 enzim ünitesi olarak hesaplanmıştır. Spesifik enzim aktivitesi, enzim ünitesi $\text{mg protein}^{-1} \cdot \text{g yaş ağırlık}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

3.8.4.3 Katalaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi

Katalaz (CAT) enziminin aktivite analizi, Bergmeyer (1970) yöntemi uygulanarak yapılmıştır. Yukarıda verilen prosedür uygulanarak elde edilen süpernatantlara, 0,05 M Na-fosfat tamponu (pH 7,0), %3 H_2O_2 ve 1 mM EDTA ilave edilmiş ve Spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda, 1 dk süre ile H_2O_2 'in tüketilmesine bağlı absorpsiyon değişimi izlenmiştir. Dakikada tüketilen $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ miktarı 1 enzim ünitesi olarak saptanmıştır. 240 nm'de spesifik enzim aktivitesi, enzim ünitesi $\text{mg protein}^{-1} \cdot \text{g yaş ağırlık}^{-1}$ olarak belirtilmiştir.

3.9 İstatistiksel Analizler

Tez çalışmasında bütün deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Yapılan tüm ölçümler ve analizlerin verileri SPSS version 16.0 programında Varyans analizi (Multiple Range Testlerinden Tukey testi) ile $P < 0,05$ önemlilik derecesine göre değerlendirilmiştir. Ortalamaların standart hata ve standart sapma değerleri de yine aynı programda hesaplanmıştır.

BÖLÜM IV

BULGULAR

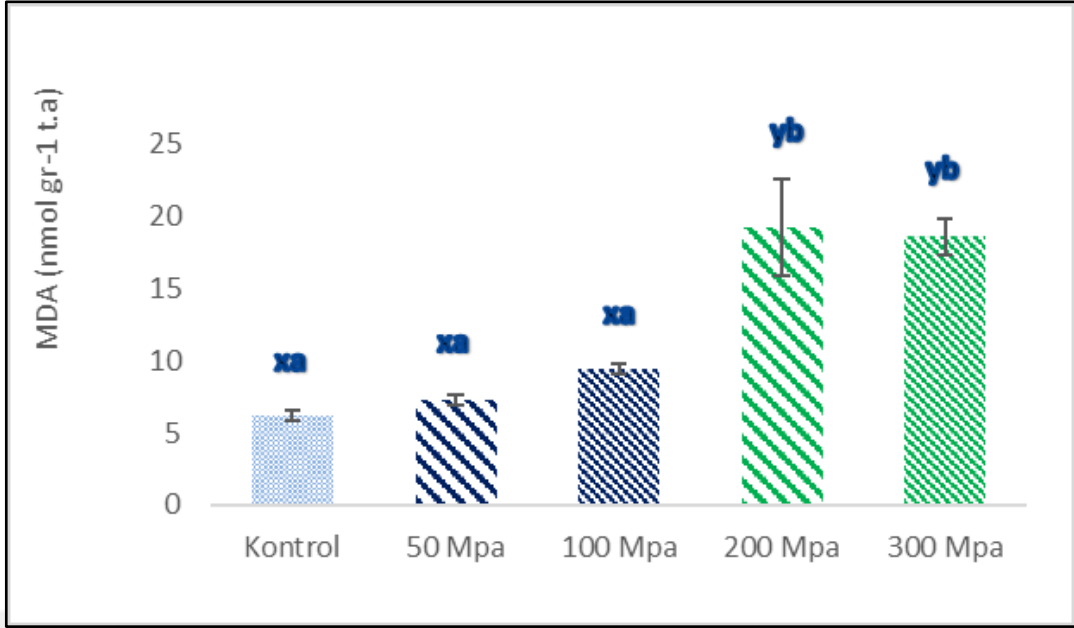
4.1 Malondialdehit Miktarındaki Değişimler

Biber kallus dokularında Malondialdehit (MDA) miktarındaki değişimler Çizelge 4.1’de ve Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Basınç uygulamasının doz artışı ile MDA miktarındaki değişimde artmaktadır. En fazla artış 200 MPa basınç uygulamasında elde edilmiştir. Fakat bu değişim istatistiksel olarak 300 MPa basınç uygulaması ile elde edilen miktardan istatistiksel olarak önemli değildir.

Çizelge 4.1. Basınç uygulanan kallus dokularında MDA miktarındaki değişimler

Uygulama	MDA (nmol gr-1 t.a)
Kontrol	6,237 ± 0,38 xa
50 Mpa	7,312 ± 0,35 xa
100 Mpa	9,462 ± 0,37 xa
200 Mpa	19,204 ± 3,33 yb
300 MPa	18,591 ± 1,23 yb

Kontrol ile karşılaştırıldığında 200 MPa ve 300 MPa basınç uygulaması ile belirlenen miktarlar istatistiksel açıdan önemlidir. MDA miktarındaki değişimler incelendiğinde kontrole göre en fazla artış (%207,9) 300 MPa basınç uygulamasında belirlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Biber kallus dokularında MDA miktarındaki değişimler (x,y kontrole göre, ab birbirlerine göre farklılığı göstermektedir, $p < 0,05$ n:3)

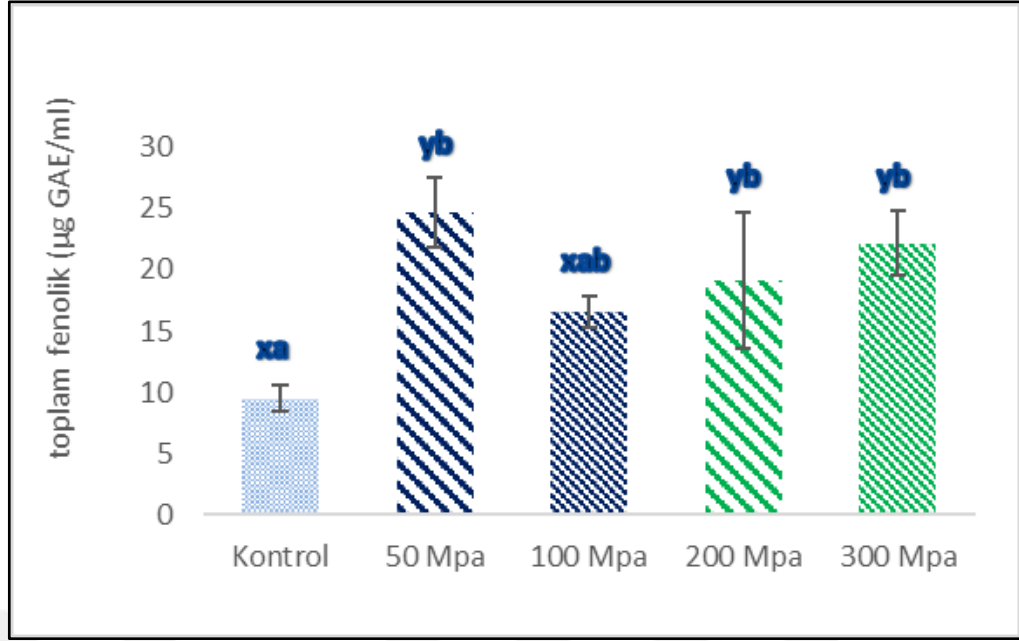
4.2 Toplam Fenolik Madde Miktarındaki Değişimler

Kontrol ile karşılaştırıldığında basınç uygulaması toplam fenolik madde miktarında artışa neden olmuştur. Ancak bu artış uygulanan basınç dozlarının artışı ile paralel değildir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Basınç uygulanan kallus dokularında toplam fenolik madde miktarındaki değişimler

Uygulama	Toplam fenolik ($\mu\text{g GAE/mL}$)
Kontrol	$9,475 \pm 1,06$ xa
50 Mpa	$24,704 \pm 2,89$ yb
100 Mpa	$16,582 \pm 1,28$ yab
200 Mpa	$19,120 \pm 5,57$ yb
300 MPa	$22,166 \pm 2,6$ yb

50 Mpa basınç uygulamasında toplam fenolik madde miktarı kontrole göre %160,7 artmıştır. Bu artış istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0,05$).



Şekil 4.2. Biber kallus dokularında toplam fenolik madde miktarındaki değişimler (x,y kontrole göre, ab birbirlerine göre farklılığı göstermektedir, $p < 0,05$ n:3)

Biber kallus dokularında kontrol ile karşılaştırıldığında toplam fenolik madde miktarında 200 Mpa basınç uygulamasında %102,6 artış belirlenirken 300 Mpa basınç uygulamasında %133,9 artış belirlenmiştir (Şekil 4.2).

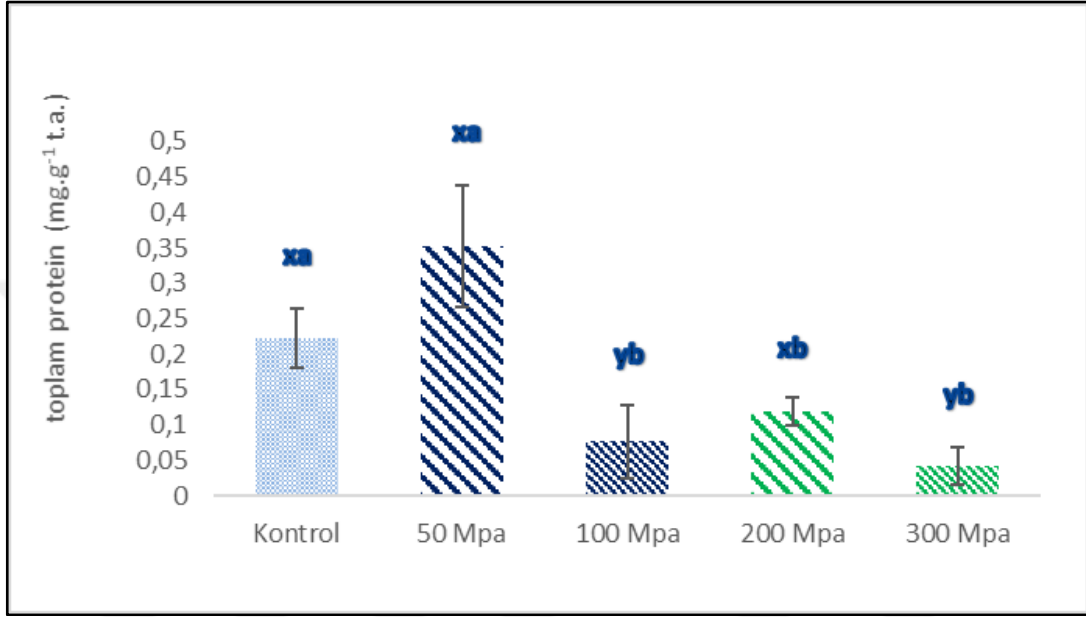
4.3 Toplam Protein Miktarındaki Değişimler

Kontrol uygulamaları ile karşılaştırıldığında basınç uygulanan kalluslarda 50 Mpa basınç uygulamasında toplam protein miktarı artarken diğer uygulamalarda ise azalmıştır (Çizelge 4.3). Toplam protein miktarındaki en önemli azalma 300 Mpa basınç uygulama dozundadır bu azalma kontrole göre %81 civarındadır.

Çizelge 4.3. Basınç uygulanan kallus dokularında toplam protein miktarındaki değişimler

Uygulama	Toplam protein (mg.g ⁻¹ t.a)
Kontrol	0,222 ± 2,21 xa
50 Mpa	0,352 ± 5,75 xa
100 Mpa	0,076 ± 8,11 yb
200 Mpa	0,120 ± 4,38 yc
300 Mpa	0,042 ± 23,51 yd

Uyarıcı uygulama dozları birbiri ile karşılaştırıldığında toplam protein miktarındaki değişim üzerine olan etkileri istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0,05$). 50 Mpa basınç uygulaması ile toplam protein miktarında gözlemlenen artış kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı bulunmamıştır. Toplam protein miktarındaki değişimler basınç dozu artışı ile pozitif bir korelasyon göstermemektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Biber kallus dokularında toplam protein miktarındaki değişimler (x,y kontrole göre, ab birbirlerine göre farklılığı göstermektedir, $p<0,05$ n:3)

4.4 Antioksidan Enzim Aktivitelerindeki Değişimler

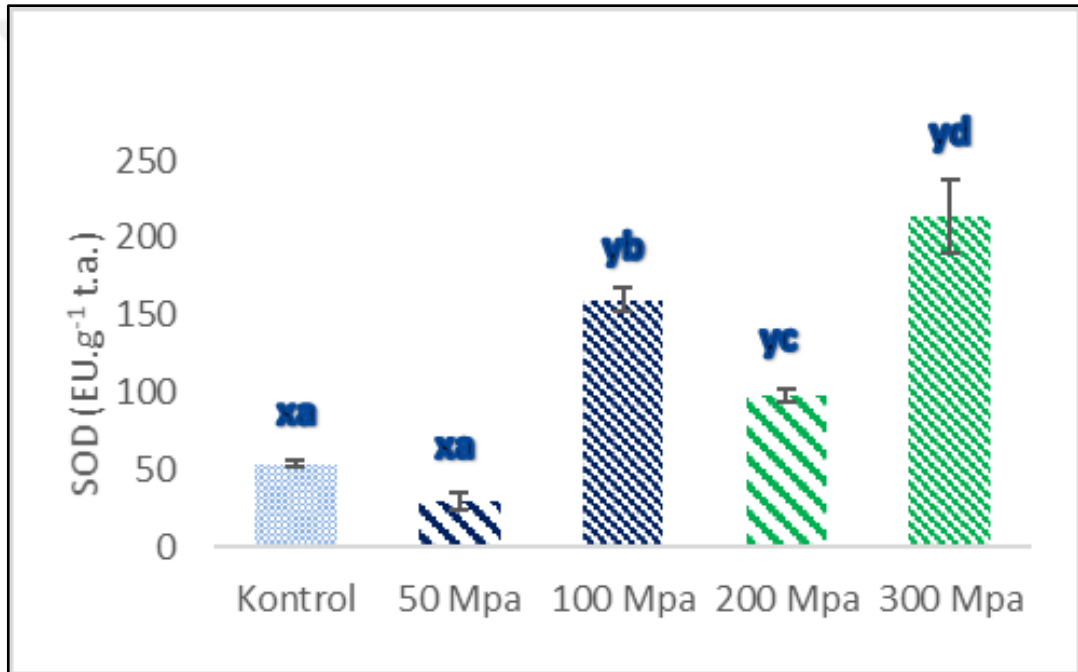
4.4.1 Süperoksit dismutaz enzim aktivitesindeki değişimler

Biber kalluslarında basınç uygulaması ile Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitelerindeki değişim incelendiğinde 50 Mpa basınç uygulaması ile aktivite kaybı olduğu belirlenmiştir. Ancak bu azalma kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.4.) ($p<0,05$).

Çizelge 4.4. Basınç uygulanan kallus dokularında SOD enzim aktivitesindeki değişimler

Uygulama	SOD (EU.g ⁻¹ t.a)
Kontrol	53,581 ± 2,21 xa
50 Mpa	29,547 ± 5,75 xa
100 Mpa	159,814 ± 8,11 yb
200 Mpa	97,829 ± 4,38 yc
300 MPa	213,631 ± 23,51 yd

50 Mpa haricinde uygulanan basınç artışı kalluslarda SOD enzim aktivitesinde artışa neden olmuştur. En önemli artış %298,7'lik artış ile 300 Mpa basınç uygulama dozunda belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Biber kallus dokularında SOD enzim aktivitesindeki değişimler (x,y kontrole göre, ab birbirlerine göre farklılığı göstermektedir, p<0,05 n:3)

Basınç uygulamalarının SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri birbirleri ile karşılaştırıldığında dozlar arası etkileşimler istatistiksel açıdan anlamlıdır (p<0,05). Uygulama dozlarının SOD enzim aktivitesi üzerine olan etkisi doz artışı ile paralellik göstermemektedir.

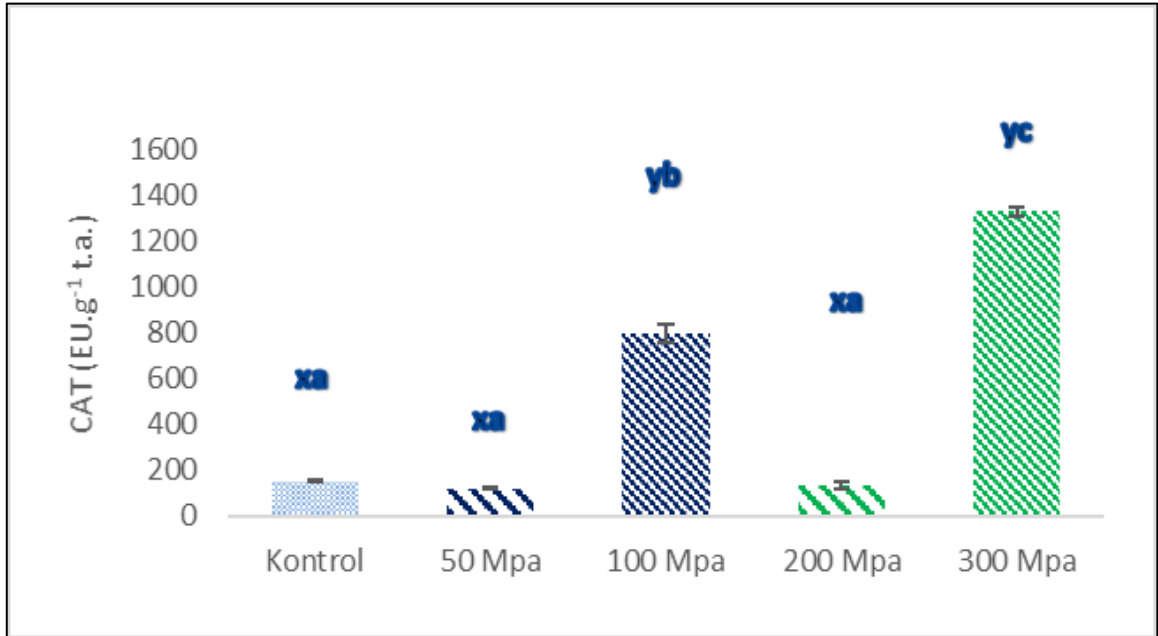
4.4.2 Katalaz enzim aktivitesindeki değişimler

Biber kalluslarında basınç uygulaması sonucu 12. günde alınan örneklerde katalaz (CAT) enzim miktarındaki değişimler Çizelge 4.5’de gösterilmiştir. Kontrole göre 50 ve 200 MPa basınç uygulamalarında CAT enzim aktivitesinde azalma belirlenmiştir. Bu azalma istatistiksel açıdan önemli değildir ($p < 0,05$).

Çizelge 4.5. Basınç uygulanan kallus dokularında katalaz enzim miktarındaki değişimler

Uygulama	CAT (EU.g ⁻¹ t.a)
Kontrol	153,883 ± 5,86 xa
50 Mpa	121,146 ± 3,15 xa
100 Mpa	794,684 ± 37,84 yb
200 Mpa	134,238 ± 15,10 xa
300 MPa	1327,090 ± 17,15 yc

Basınç uygulaması sonucu CAT enzim aktivitesindeki en önemli artış 300 Mpa uygulama dozunda belirlenmiştir. 300 Mpa basınç dozunda kontrol ile karşılaştırıldığında CAT enzim aktivitesinde %762,4’lük bir artış belirlenirken 100 Mpa basınç dozunda %416,4’lük bir artış tespit edilmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Biber kallus dokularında CAT enzim aktivitesindeki değişimler (x,y kontrole göre, ab birbirlerine göre farklılığı göstermektedir, $p < 0,05$ n:3)

BÖLÜM V

TARTIŞMA VE SONUÇ

YHB kullanımı çok eski zamanlardan beri kendisine çeşitli uygulama alanları bulmaktadır. Orta Çağ'dan günümüze kadar yüksek basınç, sentetik elmas üretiminden; amonyak, üre, hidrokarbon v.b. maddelerin sentezine; ekstraksiyondan, sterilizasyona birçok değişik amaçla kullanılmaktadır (Bertuccio ve Vetter, 2001).

Fiziksel uyarıcı olarak YHB kullanıldığında in vitro şartlarda biber kallus hücrelerinde fizyolojik ve biyokimyasal değişimlerin belirlenmesi bitki dokusunun YHB stresine karşı vermiş olduğu yanıtları belirleyebilme açısından önemlidir.

Tez çalışmasında biber kalluslarına farklı oranlarda YHB uygulanmış ve daha sonra kalluslardan hücre süspansiyonları oluşturularak 12. günde örnek alınmış ve bu YHB in biber kalluslarındaki MDA miktarı, toplam fenolik madde miktarı, toplam protein miktarı, SOD enzim aktivitesi ve CAT enzim aktivitesi üzerine potansiyel etkisi araştırılmıştır.

Bitkilerde stresin öncelikli etkilerinden biri olarak gösterilen lipid peroksidasyonun son ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) analizleriyle stresin öncelikli hedefi olan membranlardaki etkileri yansıtılmaktadır (Hodges vd., 1999). Günümüze dek gerçekleştirilmiş olan çalışmalarda stresle birlikte *Lycopersicon esculentum* L'da (domates) (Krupa ve Baszynski 1989, Quariti et al., 1997, Ben Ammar et al., 2005, Malik et al., 1992), *Triticum aestivum* L'da (buğday) (Vassiley 2004), *Hordeum vulgare* L'de (arpa) (Gaur ve Grupa 1994) ve daha birçok bitkide MDA düzeyinin yani lipid peroksidasyonunun arttığı gösterilmiştir (Büyük et al., 2012). İşlek ve arkadaşları (2015) yaptıkları çalışmada biber tohumundan gelişen fidelerde 200 Mpa basınç uygulamasında MDA konsantrasyonunun kontrole göre yaklaşık üç kat arttığını ifade etmişlerdir. Tez çalışmasında MDA miktarındaki değişimler incelendiğinde kontrole göre en fazla artış 300 MPa basınç uygulamasında belirlenmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.1).

Fenolik bileşiklerin; serbest radikalleri yok edici, antikanserojenik, bağışıklık sistemini düzenleyici, tümör oluşumuna neden olan enzimleri inhibe edici birçok biyokimyasal ve farmakolojik özelliğe sahip olduğu bildirilmektedir (Zhishen et al. 1999, Bermúdez Soto and Thomas-Barberan 2004). Fenolik bileşiklerin, yapılarındaki hidroksil gruplarından elektron veya hidrojen vererek serbest radikallere etki ettiği ve antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmektedir. Yaptığımız çalışmada basınç artışına paralel olarak fenolik madde miktarında artmaktadır (Şekil 4.2). Fenoliklerin artışı bitkinin antioksidan sistemini artırdığına işaret etmektedir.

İşlek ve arkadaşları (2013) yaptıkları çalışmada *Lepidium sativum* tere tohumlarına 50-400 Mpa basınç uygulamış ve bazı fizyolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine bu basınç uygulamasının etkisini araştırmışlardır. Toplam fenolik bileşiklerin kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında 200 ve 300 Mpa basınç uygulamasında arttığını, en yüksek artışın ise 300 Mpa basınç uygulamasında belirlendiğini ifade etmişlerdir. Tez çalışmasında ise 50 Mpa basınç uygulamasında en fazla artış belirlenirken yine 200 ve 300 Mpa basınç uygulamasında kontrole göre önemli artışlar gözlemlenmiştir (Şekil 4.2, Çizelge 4.2)

Proteinlere göre nükleik asitler yüksek basınca daha dayanıklıdır ve basınçtan daha az etkilenirler. Yapılan araştırmalarda 100 MPa basınç altında uzun süreli uygulamalarda bile bazı hücrelerin DNA yapısının korunduğu gözlemlenmiştir (Gökmen ve Acar, 1995). DNA ve proteinlerin basınca farklı toleransta olmasının nedeni olarak moleküller arası hidrojen bağlarının DNA'da yüksek derecede olması gösterilmektedir (Hoover vd., 1989).

Biber kalluslarında toplam protein miktarında 50 Mpa basınç uygulamasıyla oluşan artış, bu proteinlerin savunmayla ilişkili proteinler ya da tohumdaki uyarılma ile oluşan yeni proteinler olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, bu proteinlerin karakterize edilmesi için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Tez çalışmasında genel olarak basınç ile toplam protein miktarında azalma görülmüştür (Çizelge 4.3, Şekil 4.3). Elde edilen bu sonuçlar basınç dozunun artışı ile primer metabolizmadan sekonder

metabolizmaya doğru metabolik yolda bir tetikleme olduğu izlenimini vermektedir. Metabolik yollardaki enzimlerin araştırılarak bu hipotezin doğruluğu tartışılmalıdır.

YHB kullanımı, *Rubus coreanus* 'Miguel' meyvelerinin fenolik bileşiklerinin ekstraksiyonunu artırmıştır. Ekstraksiyondaki bir artış, çözücülerin sitoplazmaya kolayca nüfuz etmesine izin vererek, basınçlandırma sırasında membran hücre geçirgenliğinin değişmesi ile ilişkilendirilmiştir (Yong vd., 2011).

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 anormallığın, hücrelerin buldukları 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.

Chai vd., (2011), hidrostatik basıncın bir elisitör gibi fiziksel stres yaratarak membran geçirgenliğine neden olabileceğini ifade etmişlerdir. YHB etkisiyle membran geçirgenliğinde değişim olması antioksidant enzim ve MDA miktarındaki değişimlere neden olmuş olabilir.

Knorr (1994), *Vitis vinifera* kültürlerine 50 ve 100 MP basınç uyguladıklarında 50 MP Basınç uygulamasında antosiyanin sentezinin arttığını belirtmişlerdir. 100 MP basınç uygulandığında fenil amonyum liyaz enzim aktivitesinde arttığını ifade etmişlerdir. Bu artışın basıncın primer metabolizmayı etkileyip ikincil metabolizmaya doğru yönlendirmesi ve enzimatik yolu uyarması ile ilişkilendirmişlerdir. Dışarıdan dışarıdan basınç uygulanması gibi yöntemlerle ikincil metabolitlerin daha kısa sürede ve daha fazla elde edilebileceğini ifade etmişlerdir. Yüksek basınç ile metabolik yollar tetiklenebilir ve bitkilerde ikincil metabolit üretimi için alternatif bir yöntem olabilir (Dornenburg ve Knorr, 1998).

Liu vd., 2016, *Lonicera caerulea* ekstraktları ile yaptıkları çalışmada, kısa bir süre için düşük basınç uygulaması (200 MPa)'nın fenolik ve antosiyanin içeriğini artırdığını

belirtmişlerdir. Bununla birlikte, basınçtaki artışın, bazı bileşenlerin bozulmasına ve kaybına neden olabileceğini ifade etmişlerdir. Birlikte ele alındığında, aktif bileşenlerin korunma oranı düşük basınçta (400 MPa/20 dk), yüksek basınçta (600 MPa /10 dk)takinden daha yüksekti ve aynı sterilizasyon koşullarında ısı işlem görmüş gruba göre de önemli ölçüde daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Elde edilen sonuçlar, basınca karşı oluşturulan biyokimyasal adaptasyonda fenolik bileşik miktarının önemli olduğunu ve basınca karşı bitkinin dayanıklılığı ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Liu vd., 2016, *Lonicera caerulea* ekstraktları ile yaptıkları çalışmada, kısa bir süre için düşük basınç uygulaması (200 MPa)'nın fenolik ve antosiyanin içeriğini artırdığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte, basınçtaki artışın, bazı bileşenlerin bozulmasına ve kaybına neden olabileceğini ifade etmişlerdir. Birlikte ele alındığında, aktif bileşenlerin korunma oranı düşük basınçta (400 MPa/20 dk), yüksek basınçta (600 MPa /10 dk)takinden daha yüksekti ve aynı sterilizasyon koşullarında ısı işlem görmüş gruba göre de önemli ölçüde daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

SOD'un bir ürünün kalitesi üzerinde koruyucu etki yaptığını ifade eden Liu ve arkadaşları (2016) yaptıkları çalışmada 200 ve 400 MPa'daki basınç uygulamasının, SOD aktivitesini anlamlı şekilde etkilemediğini gözlemlemişlerdir. Ancak, bu aktivitelerde hafif bir artış belirlemişlerdir. Örnekler, sırasıyla 10 dakika boyunca 600 MPa ve termal sıcaklığa tabi tutulduğunda SOD aktivitesinin daha sonra azaldığını tespit etmişlerdir. Sonuç olarak , SOD'un yüksek basınca duyarlı olmadığını ve YHB işleminde iyi bir stabiliteyi koruduğunu gösterdiğini ifade etmişlerdir. Tez çalışmasında SOD aktivitesinde en önemli artış 300 Mpa basınç uygulama dozunda belirlenmiştir (Çizelge 4.4). 50 Mpa basınç üzerinde SOD enzim aktivitesi artmıştır ancak bu artış uygulama dozu artışı ile bir paralellik göstermemektedir.

Chai vd. (2011), *Vitis vinifera* hücre süspansiyon kültürlerine kimyasal elisitörler ve basınç uygulamışlardır. Basıncın hücre büyümesi üzerinde zararlı etkiler olmaksızın, istenilen ikincil metabolitlerin üretimini artırmak için optimize edilebileceğini ifade etmişlerdir.

Tez çalışmasından elde edilen bulgular basıncın biber kalluslarında fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklere neden olduğu bulunmuştur. Basıncın uygulamasının bitkilerde fizyolojik ve biyokimyasal etkileri ile yapılan çalışmalar yok ya da çok sınırlıdır. Bu araştırmanın da ileride yapılacak benzer çalışmalara destek olacağı düşünülmektedir.

YHB uygulaması ikincil metabolitlerin sentezi için yeni bir abiyotik elisitör olarak kullanılabilir. Dışarıdan YHB gibi uyarıcıların ilavesi ile bitki hücrelerinde stres sinyal iletim yollarının nasıl etkilendiğinin araştırılarak öğrenilmesi ikincil metabolit üretimini optimize etmek için denenebilir. Yine YHB uygulaması ile moleküler yapıda oluşan değişimler belirlenerek hedef ürünün artırımına yönelik çalışmalar yapılabilir. YHB ile birlikte başka bir kimyasal uyarıcının kullanılması sekonder metabolit üretimini artırma yönünde başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlayabilir.

Tez çalışmasında basınca karşı oluşan biyokimyasal ve fizyolojik parametreler çok sınırlı çalışılmıştır. Basıncın uygulamasıyla hücrelerdeki canlılığın ölçülmesi, kallus yaş ve kuru ağırlıklarının belirlenmesi, enzimatik yollardan daha çok parametrenin denenmesi, antioksidan enzim ilişkilerinin daha fazla enzimler üzerinde çalışılabilmesi amaçlanmalıdır. Özellikle basınç uygulaması ile oluşan moleküler mekanizmaların çalışılması gıda üretiminde önemli olan bu fiziksel uyarıcının bitkisel üretim yollarında da etkili olarak araştırılması yönünde önemli katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Akdemir Evrendilek, G., Çağrı Mehmetoğlu, A., oşansu, S. ve Erkmen, O., Yeni Yöntemlerle Gıdaların Korunması, *Efil Yayınevi*, Ankara, 2010.

Alpas, H., Alma, L. and Bozoglu, F., "Inactivation of Alicyclobacillus acidoterrestris vegetative cells in model system, apple, orange and tomato juices by high hydrostatic pressure", *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(6), 619-623, 2003.

Ammar, W. B., Nouairi, I., Tray, B., Zarrouk, M., Jemal, F. and Ghorbel, M. H., "Effets du cadmium sur l'accumulation ionique et les teneurs en lipides dans les feuilles de tomate (*Lycopersicum esculentum*)", *Journal de la Société de Biologie* 199(2), 157-163, 2005.

Anonim, "Gıda işlemlerinde hidrostatik basınç kullanımı", *Gıda Teknolojisi* 2(7/8), 49-55, 1997.

Arıcı, M., "Gıda muhafazasında yüksek hidrostatik basıncın mikroorganizmalar üzerine etkisi", *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi* 3(1), 41-49, 2006.

Beauchamp, C. and Fridovich, I., "Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels", *Analytical Biochemistry* 44(1), 276-287, 1971.

Bergmeyer, H. U., "Standardization of methods for estimation of enzyme activity in biological fluids", *Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie* 8, 658-660, 1970.

Bermúdez-Soto, M. J. and Tomás-Barberán, F. A., "Evaluation of commercial red fruit juice concentrates as ingredients for antioxidant functional juices", *European Food Research and Technology* 219(2), 133-141, 2004.

Bertucco, A. and Vetter, G., High Pressure Process Technology: Fundamentals and Applications, *Elsevier*, Amsterdam, Netherland, 2001.

Brul, S., Rommens, A. J. M. and Verrips, C. T., "Mechanistic studies on the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by high pressure", *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 1(2), 99-108, 2000.

Büyük, İ., Soydam Aydın, S. ve Aras, S., "Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar", *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji* 69(2), 97-110, 2012.

Cai, Z., Riedel, H., Saw, N. M. M. T., Mewis, I., Reineke, K., Knorr, D. and Smetanska, I., "Effects of elicitors and high hydrostatic pressure on secondary metabolism of *Vitis vinifera* suspension culture", *Process Biochemistry* 46(7), 1411-1416, 2011.

Croteau, R., Kutchan, T. M. and Lewis, N. G., "Natural products (secondary metabolites)", *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* 24, 1250-1319, 2000.

Devlieghere, F., Vermeiren, L. and Debevere, J., "New preservation technologies: possibilities and limitations", *International Dairy Journal* 14(4), 273-285, 2004.

Diplock, A. T., "Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview", *The American Journal of Clinical Nutrition* 53(1 Suppl), 189-193, 1991.

Ellialtıoğlu, Ő., Üstün, A. S. ve Mehmetoğlu, Ü., "Bazı biber çeşitlerinde *in vitro* kallus oluşunu için en uygun besin ortamı bileşiminin belirlenmesi", *II. Kızılırmak Uluslararası Fen Kongresi*, Kırıkkale, 20-22 Mayıs, 1998.

Farmer, E. E. and Davoine, C., "Reactive electrophile species", *Current Opinion in Plant Biology* 10(4), 380-386, 2007.

Farr, D., "High pressure technology in the food industry", *Trends in Food Science and Technology* 1, 14-16, 1990.

Fridovich, I., "Superoxide radical: an endogenous toxicant", *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 23(1), 239-257, 1983.

Gaur, A. and Gupta, S. K., "Lipid components of mustard seeds (*Brassica juncea* L.) as influenced by cadmium levels", *Plant Foods for Human Nutrition* 46(2), 93-102, 1994.

Gayoso, C., Pomar, F., Merino, F. and Bernal, M. A., "Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon", *Scientia Horticulturae* 102(1), 1-13, 2004.

Gökmen, V. ve Acar, J., "Yüksek basınç teknolojisinin gıda endüstrisinde uygulamaları", *GIDA* 20(3), 167-172, 1995.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, In: *Methods in Enzymology*, Elsevier, Netherland, 1990.

Harbinson, J. and Hedley, C. L., "Changes in P-700 oxidation during the early stages of the induction of photosynthesis", *Plant Physiology* 103(2), 649-660, 1993.

Hartmann, C. and Delgado, A., "Numerical simulation of the mechanics of a yeast cell under high hydrostatic pressure", *Journal of Biomechanics* 37(7), 977-987, 2004.

Hayakawa, I., Linko, Y. Y. and Linko, P., "Mechanism of high pressure denaturation of proteins", *LWT-Food Science and Technology* 29(8), 756-762, 1996.

He, H., Adams, R. M., Farkas, D. F. and Morrissey, M. T., "Use of high-pressure processing for oyster shucking and shelf-life extension", *Journal of Food Science* 67(2), 640-645, 2002.

Heath, R. L. and Packer, L., "Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation", *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125(1), 189-198, 1968.

Heremans, K., "High pressure effects on proteins and other biomolecules", *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 11(1), 1-21, 1982.

Higashi, T., Kawamata, F. and Sakamoto, T., "Studies on rat liver catalase: vii. double-labeling of catalase by ^{14}C -Leucine and ^3H - δ -Aminolevulinic acid", *The Journal of Biochemistry* 76(4), 703-708, 1974.

Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F. and Prange, R. K., "Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds", *Planta* 207(4), 604-611, 1999.

Hoover, D. G., "Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms", *Food Technology* 43, 99-107, 1989.

Hugas, M., Garriga, M. and Monfort, J. M., "New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology", *Meat Science* 62(3), 359-371, 2002.

İbanoğlu, E., "Gıdalarda yüksek hidrostatik basınç uygulaması", *GIDA* 27(6), 505-510, 2002.

İşlek, C., Altuner, E. M. and Alpas, H., "The effect of high hydrostatic pressure on the physiological and biochemical properties of pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings", *High Pressure Research* 35(4), 396-404, 2015.

İşlek, C., Altuner, E. M., Çeter, T. and Alpas, H., "Effect of high hydrostatic pressure on seed germination, microbial quality, anatomy–morphology and physiological characteristics of garden cress (*Lepidium sativum*) seedlings", *High Pressure Research* 33(2), 440-450, 2013.

Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., Biyokimya, Muhtelif Kısımlar, *Şafak Yayınevi*, Erzurum, 1997.

Kımk, Ö., Kavas, G., Uysal, H. ve Kesenkaş, H., "Yüksek hidrostatik basınç tekniğinin süt endüstrisindeki uygulamaları", *GIDA* 29(1), 95-102, 2004.

Knorr, D., "Plant cell and tissue cultures as model systems for monitoring the impact of unit operations on plant foods", *Trends in Food Science and Technology* 5(10), 328-331, 1994.

Krupa, Z. and Baszynski, T., "Acyl lipid composition of thylakoid membranes of cadmium-treated tomato plants", *Acta Physiologiae Plantarum (Poland)* 11, 111-116, 1989.

Malik, D., Sheoran, I. S. and Singh, R., "Carbon metabolism in leaves of cadmium treated wheat seedlings", *Plant Physiology and Biochemistry (France)* 30(2), 223-229, 1992.

Mertens, B. and Deplace, G., "Engineering aspects of high-pressure technology in the food industry", *Food Technology (USA)* 47(6), 164-169, 1993.

Murashige, T. and Skoog, F., "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures", *Physiologia Plantarum* 15(3), 473-497, 1962.

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

Needs, E. C., Stenning, R. A., Gill, A. L., Ferragut, V. and Rich, G. T., "High-pressure treatment of milk: effects on casein micelle structure and on enzymic coagulation", *Journal of Dairy Research* 67(1), 31-42, 2000.

Ouariti, O., Boussama, N., Zarrouk, M., Cherif, A. and Ghorbal, M. H., "Cadmium-and copper-induced changes in tomato membrane lipids", *Phytochemistry* 45(7), 1343-1350, 1997.

Özcan, T. ve Kurtuldu, O., "Sütün raf ömrünün uzatılmasında alternatif yöntemler", *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 25(1), 119-129, 2011.

Rastogi, N. K., Angersbach, A. and Knorr, D., "Synergistic effect of high hydrostatic pressure pretreatment and osmotic stress on mass transfer during osmotic dehydration", *Journal of Food Engineering* 45(1), 25-31, 2000.

Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K. and Kumar, M. N. V. R., "Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective", *Journal of Controlled Release* 113(3), 189-207, 2006.

Ross, A. I. V., Griffiths, M. W., Mittal, G. S. and Deeth, H. C., "Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms", *International Journal of Food Microbiology* 89(2-3), 125-138, 2003.

Sayın, L. ve Tamer, C. E., "Yüksek hidrostatik basınç ve ultrasonun gıda koruma yöntemi olarak kullanımı", *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 28(1), 83-93, 2014.

Seriner, R. ve Bilgin, R., "Katalaz enziminin hıyardan (*Cucumis sativus*) saflaştırılması", *Çukurova Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi* 28(4), 85-94, 2012.

Singleton, V. L. and Rossi, J. A., "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents", *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3), 144-158, 1965.

Spilimbergo, S., Elvassore, N. and Bertucco, A., "Microbial inactivation by high-pressure", *The Journal of Supercritical Fluids* 22(1), 55-63, 2002.

Şanal, İ. S. ve Çalımlı, A., "Yüksek hidrostatik basınç teknolojisi ve gıda endüstrisinde uygulamaları", *GIDA* 25(3), 193-201, 2000.

Taiz, L. and Zeiger, E., Cell walls: Structure, Biogenesis and Expansion, In: Plant Physiology, *Sinauer Associates*, Sunderland, United Kingdom, 2010.

Trujillo, A. J., Capellas, M., Saldo, J., Gervilla, R. and Guamis, B., "Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review", *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 3(4), 295-307, 2002.

Tülek, Y. ve Filizay, G., "Gıda endüstrisinde kullanılan yüksek hidrostatik basınç sistemleri", *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi* 12(2), 225-231, 2011.

Vanisree, M., Lee, C. Y., Lo, S. F., Nalawade, S. M., Lin, C. Y. and Tsay, H. S., "Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures", *Botanical Bulletin-Academia Sinica* 45(1), 1-22, 2004.

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

Zeleneva, I. V. and Khavkin, E. E., "Rearrangement of enzyme patterns in maize callus and suspension cultures", *Planta* 148(2), 108-115, 1980.

Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W., "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals", *Food Chemistry* 64(4), 555-559, 1999.

ÖZ GEÇMİŞ

Ersan KARTOPU 15.05.1984 tarihinde Adana’da doğdum. İlk, orta ve lise öğretimini Adana’da tamamladım. Niğde Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nden Temmuz 2014’de mezun oldum. 2014 yılında Niğde Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında başladığı yüksek lisans öğrenimine devam etmekteyim.



