

**T.C
TUNCELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**VURGULU ELEKTRİK ALAN UYGULAMALARININ DOMATES HÜCRE
KÜLTÜRÜNDEKİ BİYOAKTİF BİLEŞENLER ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Işıl GÜRSUL

Anabilim Dalı: Gıda Mühendisliği

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Alper GÜVEN**

TUNCELİ-2012

**T.C
TUNCELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**VURGULU ELEKTRİK ALAN UYGULAMALARININ DOMATES HÜCRE
KÜLTÜRÜNDEKİ BİYOAKTİF BİLEŞENLER ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Işıl GÜRSUL

(91101101)

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 11.10.2012
Tezin Savunulduğu Tarih : 16.11.2012**

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Alper GÜVEN (T.Ü)

Diğer Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Gülsün EVRENDİLEK AKDEMİR (AİB.Ü)

Yrd. Doç. Dr. Olcay KAPLAN İNCE (T.Ü)

Işıl GÜRSUL tarafından hazırlanan VURGULU ELEKTRİK ALAN UYGULAMALARININ DOMATES HÜCRE KÜLTÜRÜNDEKİ BİYOAKTİF BİLEŞENLER ÜZERİNE ETKİSİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Yrd. Doç. Dr. Alper GÜVEN

Tez Yöneticisi

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. Bu tez, Tunceli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Olcay KAPLAN İNCE (T.Ü)

Üye : Doç. Dr. Gülsün EVRENDİLEK AKDEMİR (AİB.Ü)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Alper GÜVEN (T.Ü)

Tarih : 16. 11. 2012

ÖNSÖZ

Isıl işlemlerin gıda maddelerinde besin öğeleri üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle yeni bir teknoloji olarak ısı olmayan işlemler kullanılmaya başlanmıştır. Bu işlemlerden vurgulu elektrik alan uygulaması daha çok sıvı gıdalarda kullanılmakta olup, ısı ve ısı olmayan işlemlerle de kombine edilebilmektedir.

Isıl olmayan işlemlerden vurgulu elektrik alan uygulaması son yıllarda biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaya başlamıştır. Biyoaktif özelliği olan ikincil metabolitlerin biyokimyasal sentezi hücrelerin stres koşullarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Sıvı hücre doku kültürleri vurgulu elektrik alan uygulamasına tabi tutularak bu hücre doku kültürlerinden ikincil metabolitlerin yüksek konsantrasyonlarda elde edilmesi mümkün olabilmektedir.

Bu çalışmada bir stres faktörü olarak vurgulu elektrik alan domates doku kültürü üzerinde uygulanmış ve bununla birlikte strese maruz kalma süresi ve bitki doku kültürlerini alt kültüre alma tekniğinin bitki doku kültüründeki biyoaktif maddeler üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Tez çalışmam süresince öncelikle bana her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen, bana Berlin Teknik Üniversitesi Gıda Biyoteknolojisi ve Prosesi Mühendisliği Bölümünde çalışma imkanı yaratan tez danışmanım sayın Yrd. Doç. Dr. Alper GÜVEN'e, ve yine beni Berlin Teknik Üniversitesi Gıda Biyoteknolojisi ve Prosesi Mühendisliği Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarlarına kabul eden ve tüm imkanlardan faydalanmama imkan veren Gıda Mühendisliği alanında Dünya'nın duayenlerinden olan sayın Prof. Dr. Dietrich KNORR'a, Berlin Teknik Üniversitesindeki Labaratuvar çalışmalarında bana yol gösteren ve yardım eden Dipl.-Ing. Anne GROHMANN'a, çalışmanın istatistik kısımlarında bilgilerini benden esirgemeyen, benimle paylaşan Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Murat ÇİMEN'e, tecrübeleriyle bana ışık tutan Arş. Gör. Taylan SANÇAR'a ve Arş. Gör. Alican AKTAĞ'a ve her zaman moral desteğiyle yanımda olan aileme teşekkürü borç bilirim.

Işıl GÜRSUL

TUNCELİ-2012

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	VI
SUMMARY.....	VII
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VIII
TABLolar LİSTESİ.....	XI
KISALTMALAR.....	XIII
SEMBOLLER.....	XIV
1. GİRİŞ.....	1
1.1. BİTKİ DOKU VE HÜCRE KÜLTÜRLERİ.....	1
1.1.1. Kallus ve Süspansiyon Hücre Kültürleri.....	2
1.1.2. Bitki Hücre Kültürlerinde Gelişme ve Sekonder Metabolitlerin Sentezi.....	3
1.1.3. Domates Hücre Kültürü (<i>Lycopersicon esculentum</i>).....	6
1.2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRLERİNDE PRİMER VE SEKONDER METABOLİZMA.....	9
1.2.1. Fenil Propanoid Metabolik Yolu.....	10
1.2.1.1. Polifenoller (Fenolik Bileşikler).....	13
1.2.1.1.1. Fenolik Asitler.....	14
1.2.1.1.2. Flavonoidler.....	14
1.2.1.1.3. Ligninler.....	17
1.2.1.1.4. Stilbenler.....	17
1.2.1.2. Fenilalanin Amonyum Liyaz Enzimi (Phenylalanine Ammonia Lyase – PAL).....	18
1.3. BİTKİ DOKU KÜLTÜRLERİNDE STRES FAKTÖRLERİ.....	19
1.3.1. Biyolojik Stres Kavramı.....	19
1.3.1.1. Biyotik ve Abiyotik Stresörleri ve Oksidatif Stres.....	22
1.3.1.2. Oksidatif Strese Karşı Polifenol Mekanizması.....	24

1.4.	BİTKİ DOKU KÜLTÜRLERİNDE VURGULU ELEKTRİK ALAN UYGULAMASI.....	24
1.4.1.	Tarihsel Gelişimi.....	25
1.4.2.	Vurgulu Elektrik Alan Ekipmanları.....	26
1.4.2.1.	PEF Sistemi.....	26
1.4.2.2.	İşlem Odacıkları.....	27
1.4.2.3.	Osiloskop.....	29
1.4.3.	Vurgulu Elektrik Alan Prosesi Parametreleri.....	29
1.4.3.1.	Elektrik Alan Şiddeti.....	29
1.4.3.2.	Spesifik Enerji Girdisi.....	29
1.4.3.3.	Vurgu Şekli ve Şiddeti.....	30
1.4.3.4.	Uygulama Sıcaklığı.....	31
1.4.4.	Ürün parametreleri.....	31
1.4.5.	Vurgulu Elektrik Alan Uygulamasının Biyolojik Membranlar Üzerine Etkisi.....	32
1.4.5.1.	Bitki Membran Yapısı.....	32
1.4.5.2.	Hücre Membran Elektroporasyon Mekanizması.....	33
1.4.5.3.	Hidrofobik ve Hidrofilik Por Oluşumu – Dönüşümlü Elektriksel Bozulma.....	34
1.4.5.4.	Dönüşümsüz Elektriksel Bozulma.....	35
1.4.6.	Vurgulu Elektrik Alanın Gıda Teknolojisi ve Biliminde Uygulamaları.....	35
2.	KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	37
3.	MATERYAL VE YÖNTEM.....	40
3.1.	Materyal.....	40
3.1.1.	Bitki Doku-Hücre Kültürü.....	40
3.1.2.	Besiyeri.....	40
3.1.3.	Kimyasallar.....	41
3.1.3.1.	Enzim Ekstraksiyonu.....	41
3.1.3.2.	Fenilalanin Amonyum Liyaz (PAL) Enzim Aktivitesi Analizi.....	41
3.1.3.3.	Toplam Polifenol Tayini – Gallik Asit Kalibrasyon Eğrisi.....	41

3.1.3.4.	Canlılık Testi (TTC).....	42
3.1.4.	Ekipmanlar.....	42
3.1.4.1.	Vurgulu Elektrik Alan Aparatları.....	42
3.1.4.2.	Kimyasal Analizler ve Hücre Doku Kültürünün Gelişmesi için Kullanılan Ekipmanlar.....	43
3.2.	Yöntem.....	45
3.2.1.	<i>Lycopersicon esculentum</i> (LE) Büyüme Eğrisi Oluşturma.....	45
3.2.2.	Vurgulu Elektrik Alan Uygulaması.....	45
3.2.3.	Kuru Madde Tayini.....	46
3.2.4.	pH ve İletkenlik Ölçümü.....	47
3.2.5.	Hücrelerde Canlılık Testi (TTC Testi).....	47
3.2.6.	Hücrelerde Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini.....	48
3.2.7.	Besiyerinde Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini.....	50
3.2.8.	Fenilalanin Amonyum Liyaz (PAL) Enzim Analizi.....	50
3.2.9.	İstatistik Analizler.....	51
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	52
4.1.	<i>Lycopersicon esculentum</i> (LE) BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ GELİŞME KARAKTERİSTİĞİ.....	52
4.1.1.	Büyüme Hızı & Kuru Madde.....	52
4.1.2.	pH & İletkenlik.....	52
4.1.3.	Canlılık.....	53
4.1.4.	Toplam Fenol (TF) Miktarı.....	54
4.1.4.1.	Hücrelerde Toplam Fenol Miktarı.....	54
4.1.4.2.	Besiyerinde Toplam Fenol Miktarı.....	55
4.1.5.	Fenilalanin Amonyum Liyaz (PAL) Aktivitesi.....	56
4.2.	BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜNDE VURGULU ELEKTRİK ALAN UYGULAMASI SONUCU ELDE EDİLEN BULGULAR.....	57
4.2.1.	Vurgulu Elektrik Alan Uygulamasının Kuru Madde Üzerine Etkisi....	58
4.2.2.	Vurgulu Elektrik Alan Uygulamasının pH ve İletkenlik Üzerine Etkisi.....	63
4.2.3.	Vurgulu Elektrik Alan Uygulamasının Canlılık Üzerine Etkisi.....	67

4.2.4.	Vurgulu Elektrik Alan Uygulamasının Toplam Fenolik Madde Üzerine Etkisi.....	78
4.2.4.1.	Vurgulu Elektrik Alan Uygulamasının Hücrelerdeki Toplam Fenolik Madde Üzerine Etkisi.....	78
4.2.4.2.	Vurgulu Elektrik Alan Uygulamasının Besiyerindeki Toplam Fenolik Madde Üzerine Etkisi.....	84
4.2.5.	Vurgulu Elektrik Alan Uygulamasının Fenilalanin Amonyum Liyaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	90
4.2.6.	Toplam Fenolik Madde Miktarı ile Fenilalanin Amonyum Liyaz Enzim Aktivitesi Korelasyonu.....	96
5.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	99
6.	ÖNERİLER.....	107
	KAYNAKLAR.....	108
	ÖZGEÇMİŞ.....	118

ÖZET

Son yıllarda ısıt işlemlerin gıda maddelerindeki besin öğelerinde yarattığı olumsuz etkilerden dolayı ısıt işlemlere alternatif yeni yöntemler popülerlik kazanmaktadır. Bu yöntemlerden vurgulu elektrik alan uygulaması özellikle sıvı gıdalar üzerinde kullanılmakta olup başarılı sonuçlar alınmaktadır. Bu yöntem bitki doku kültürlerinden insan sağlığı açısından son derece önemli etkileri olan sekonder metabolit üretiminde de bir stres faktörü olarak kullanılmaktadır. Sekonder (ikincil) metabolitler bioaktif özellikleri olan bileşenler olarak bilinmektedir. Bu çalışmada vurgulu elektrik alan uygulaması kullanılarak domates hücre kültüründe stres yaratılması amaçlanmış ve bu strese bağlı olarak enzim aktivitesinin artmasıyla sekonder metabolit üretiminin de artması beklenmiştir. Vurgulu elektrik alan (VEA) uygulamasının yanı sıra bitki doku kültürlerinde alt kültüre alma tekniğinin ve strese maruz kaldıktan sonra depolamanın bitki doku kültüründeki biyoaktif maddeler üzerindeki etkileri de incelenmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında domates doku kültürünün zamana bağlı olarak 17 gün süren depolama süresi boyunca gelişme eğrisi oluşturulmuş ve böylece 14 günden sonra hücre ölümlerinin meydana geldiği saptanarak depolamanın 14. günü alt kültüre alma tekniğinin yapılmasına karar verilmiştir. Ayrıca, gelişme eğrisi referans alınarak depolama süresince vurgulu elektrik alan tekniğinin bitki doku kültürlerine uygulanacağı zaman belirlenmiştir.

İkinci aşamada domates bitki doku kültürü 14 günlük depolama sonunda 2 kere alt kültüre alınmıştır. Alt kültürlerde lineer fazın başladığı (depolamanın 6. günü) zaman vurgulu elektrik alan uygulaması 600, 900, 1200 V/cm ve 1, 5, 9 kere olmak üzere bitki doku kültürlerine uygulanmış ve strese maruz kaldıktan hemen sonra (0.saat), 4 ve 96 saat sonra hücrelerdeki biyoaktif madde değişimleri analiz edilmiştir. Sonuçta, VEA uygulamasının şiddeti arttıkça canlılığın azaldığı ve PAL enzim aktivitesinin arttığı bulunmuş, stres reaksiyon süresinin arttıkça KM miktarında, iletkenlikte ve PAL enzim aktivitesinde azalma; toplam fenolik madde miktarında ise artma saptanmıştır. Ayrıca alt kültüre alma işleminin de hücre formunu iyileştirdiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Domates Bitki Doku Kültürü, Vurgulu Elektrik Alan Uygulaması, Fenolanin Amonyum Liyaz, Toplam Fenolik Madde, Sekonder Metabolit

SUMMARY

Because of the adverse effects of thermal process on nutrients in foods, novel technologies alternative to thermal methods are going popularity recently. Pulsed electric field (PEF) processing is used for especially liquid foods which give in promising results. This method is used in secondary metabolite production, which has crucial effects on human health, from plant tissue cultures as a stress factor.

Application of PEF to tomato tissue culture to create stress and increase in secondary metabolite production with increasing in enzyme activity was prompted in this study. Moreover, effects of storage after being exposed to the PEF stress were also investigated.

At the first stage of the study, the growth curve of tomato cell culture was generated during the 17 day storage and it was seen that cell deaths occurred on the 14th day of storage therefore sub-culture technique was carried out at 14th day of the storage. Additionally, the time when PEF should be applied to plant tissue culture was determined by the reference of the growth curve during storing time.

At the second stage, tomato cell culture was sub-cultured twice at the end of the 14th during storage time. At the beginning time of the linear phase (6th day of storage), pulsed electric field with 600, 900, 1200 V/cm for 1, 5 and 9 times was superimpose to plant sub-cultures and alteration of bioactive materials on cells were analyzed shortly after exposed to the stress (0 hour), 4 and 96 hours. As a result, it was found that when PEF application intensity increase, vitality decrease and PAL enzyme activity increase, and also when stress reaction time increase, dry matter amount, conductivity and PAL enzyme activity decrease; total phenolic amount increase. Furthermore, it was determined that culturing technique enhances the cell form.

Key Words: Tomato Plant Tissue Culture, Pulsed Electric Field Application, Phenylalanine Ammonium Lyase, Total Phenolic Material, Secunder Metabolite

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Fenilpropanoid metabolizmasındaki biyosentetik ilişkilerin genel gösterimi.....	12
Şekil 1.2. Fenolik asitlerin genel yapısı.....	14
Şekil 1.3. Flavonoidlerin genel yapısı	15
Şekil 1.4. Bitkilerde biyolojik stres konsepti.....	21
Şekil 1.5. Stres nedenli fenilpropanoid örnekleri.	23
Şekil 1.6. Üssel azalan vurguların üretimi için kullanılan bir PEF sistemi	26
Şekil 1.7. Sürekli uygulama için işlem odacıklarının konfigürasyonları	28
Şekil 1.8. PEF sisteminde uygulanan bazı vurgu modelleri.	31
Şekil 1.9. Çift katlı fosfolipid yapısı şematik gösterimi	32
Şekil 1.10. Hücre zarı akıcı mozaik zar modeli.....	33
Şekil 3.1. <i>Lycopersicon esculentum</i> bitki doku süspansiyon kültürü.	40
Şekil 3.2. PEF işlem odacıkları.	42
Şekil 3.3. Laboratuvar tipi vurgulu elektrik alan sistemi	45
Şekil 3.4. Toplam fenolik maddenin gallik asit (G.A) eşdeğeri olarak kalibrasyon eğrisi..	49
Şekil 4.1. Zamana göre <i>Lycopersicon esculentum</i> yaş ağırlık ve kuru madde miktar değişimi	52
Şekil 4.2. Zamana karşı pH değişimi.....	53

Şekil 4.3.Zamana karşı iletkenlik değişimi	53
Şekil 4.4.Zamana karşı canlılık	54
Şekil 4.5.Zamana karşı hücrelerde toplam fenol miktarı.....	55
Şekil 4.6. Zamana karşı besiyerinde toplam fenol miktarı	55
Şekil 4.7.Zamana karşı Fenilalanin Amonyum Liyaz akitivitesi	56
Şekil 4.8. LE birinci alt kültürüne ait vurgulu elektrik alan şiddeti ile vurgu sayısının stres reaksiyon sürelerine bağlı olarak etkilediği kuru madde miktarı.....	62
Şekil 4.9. LE ikinci alt kültürüne ait vurgulu elektrik alan şiddeti ile vurgu sayısının stres reaksiyon sürelerine bağlı olarak etkilediği kuru madde miktarı.....	63
Şekil 4.10. Vurgulu elektrik alan şiddeti (VEAŞ) - vurgu sayılarının (VS) LE pH & iletkenlik değişimi	66
Şekil 4.11. Vurgulu elektrik alan şiddeti (VEAŞ) - vurgu sayılarının (VS) LE pH & iletkenlik değişimi	66
Şekil 4.12. LE birinci alt kültürüne 0. saatteki VEAŞ ve vs'nin canlılık üzerine etkileri...	72
Şekil 4.13. LE birinci alt kültürüne 4. saatteki VEAŞ ve vs'nin canlılık üzerine etkileri...	72
Şekil 4.14. LE birinci alt kültürüne 96. saatteki VEAŞ ve vs'nin canlılık üzerine etkileri.	73
Şekil 4.15. LE ikinci alt kültürüne 0. saatteki VEAŞ ve vs'nin canlılık üzerine etkileri	76
Şekil 4.16. LE ikinci alt kültürüne 4. saatteki VEAŞ ve vs'nin canlılık üzerine etkileri	77
Şekil 4.17. LE ikinci alt kültürüne 96. saatteki VEAŞ ve vs'nin canlılık üzerine etkileri. .	77
Şekil 4.18. LE 1. Alt kültüre ait 600 V/cm VEAŞ uygulanmış hücrelerin toplam fenolik miktarındaki değişim.....	81

Şekil 4.19. LE 2. Alt kültüre ait 600 V/cm VEA şiddeti uygulanmış hücrelerin TF miktarındaki değişim.....	81
Şekil 4.20. LE 1. Alt kültüre ait 900 V/cm VEA şiddeti uygulanmış hücrelerin TF miktarındaki değişim.....	82
Şekil 4.21. LE 2. Alt kültüre ait 900 V/cm VEA şiddeti uygulanmış hücrelerin TF miktarındaki değişim.....	82
Şekil 4.22. LE 1. Alt kültüre ait 1200 V/cm VEA şiddeti uygulanmış hücrelerin TF miktarındaki değişimi.....	83
Şekil 4.23. LE 2. Alt kültüre ait 1200 V/cm VEA şiddeti uygulanmış hücrelerin TF miktarındaki değişimi.....	83
Şekil 4.24. LE 1. Alt kültüre ait 600 V/cm VEA şiddeti uygulanmış besiyerlerinin TF miktarındaki değişimi.....	87
Şekil 4.25. LE 2. Alt kültüre ait 600 V/cm VEA şiddeti uygulanmış besiyerlerinin TF miktarındaki değişimi.....	87
Şekil 4.26. LE 1. Alt kültüre ait 900 V/cm VEAŞ şiddeti uygulanmış besiyerlerinin TF miktarındaki değişimi.....	88
Şekil 4.27. LE 2. Alt kültüre ait 900 V/cm VEA şiddeti uygulanmış besiyerlerinin TF miktarındaki değişimi.....	88
Şekil 4.28. LE 1. Alt kültüre ait 1200 V/cm VEA şiddeti uygulanmış besiyerlerinin TF miktarındaki değişimi.....	89
Şekil 4.29. LE 2. Alt kültüre ait 1200 V/cm VEA şiddeti uygulanmış besiyerlerinin TF miktarındaki değişimi.....	89
Şekil 4.30. LE 1. Alt kültüre ait 600 V/cm VEA şiddeti uygulanmış örneklerin işlem görmemiş örneklere göre PAL aktivitesindeki değişimi.....	93
Şekil 4.31. LE 2. Alt kültüre ait 600 V/cm VEA şiddeti uygulanmış örneklerin işlem görmemiş örneklere göre PAL aktivitesindeki değişimi.....	93
Şekil 4.32. LE 1. Alt kültüre ait 900 V/cm VEA şiddeti uygulanmış örneklerin işlem görmemiş örneklere göre PAL aktivitesindeki değişimi.....	94
Şekil 4.33. LE 2. Alt kültüre ait 900 V/cm VEA şiddeti uygulanmış örneklerin işlem görmemiş örneklere göre PAL aktivitesindeki değişimi.....	94
Şekil 4.34. LE 1. Alt kültüre ait 1200 V/cm VEA şiddeti uygulanmış örneklerin işlem görmemiş örneklere göre PAL aktivitesindeki değişimi.....	95
Şekil 4.35. LE 2. Alt kültüre ait 1200 V/cm VEA şiddeti uygulanmış örneklerin işlem görmemiş örneklere göre PAL aktivitesindeki değişimi.....	95

TABLolar LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1.1. USDA gıda kompozisyon verilerine (USDA 2012) göre domates kompozisyonu	7
Tablo 1.2. Elektrik alan şiddeti ve enerji girdisi ihtiyacına göre gıda teknolojisinde elektrik alan uygulamaları.....	36
Tablo 3.1. PEF uygulama planı	46
Tablo 4.1. Sıfır, 4, 96. saatlerdeki stres reaksiyon süreleri, vurgulu elektrik alan şiddeti & vurgu sayılarının 1 ve 2. alt kültüre göre LE kuru madde miktarları.....	59
Tablo 4.2. VEAŞ-VS ‘nin kuru madde miktarı üzerindeki etkisinin istatistiki sonuçları...	60
Tablo 4.3. SRS ‘nin kuru madde miktarı üzerindeki etkisini gösteren istatistiki sonuçlar .	60
Tablo 4.4. VEAŞ-VS ‘nin kuru madde miktarı üzerindeki etkisini gösteren istatistiki sonuçlar.....	61
Tablo 4.5. SRS ‘nin kuru madde miktarı üzerindeki etkisini gösteren istatistiki sonuçlar .	61
Tablo 4.6. Vurgulu elektrik alan şiddeti (VEAŞ) - vurgu sayılarının (VS) 1 ve 2. alt kültüre göre LE bitki doku kültürü pH & iletkenlik değerleri.....	64
Tablo 4.7. VEAŞ-VS ‘nin pH ve iletkenlik üzerindeki etkisi.....	65
Tablo 4.8. SRS ‘nin pH ve iletkenlik üzerindeki etkisi.....	65
Tablo 4.9. Hücre canlılıklarının “Cevap Yüzey” analizi için deneysel sonuçları	67
Tablo 4.10. Birinci alt kültürün canlılık testinde cevap yanıt yöntemi quadratik model için ANOVA sonuçları.....	70
Tablo 4.11. Canlılık testi üzerinde PEF uygulamasının önemini gösteren ANOVA sonuçları	71
Tablo 4.12. İkinci alt kültürün canlılık testinde cevap yanıt yöntemi quadratik model için ANOVA sonuçları.....	74

Tablo 4.13. Canlılık testi üzerinde PEF uygulamasının önemini gösteren ANOVA sonuçları	75
Tablo 4.14. LE hücrelerinin 1 ve 2. alt kültürlerindeki VEAŞ – VS ve SRS’ne bağlı olarak ölçülen ortalama toplam fenolik madde (TF) sonuçları.....	78
Tablo 4.15. VEAŞ-VS ‘nın LE 1. ve 2. alt kültürlerindeki TF miktarı üzerindeki etkisi	80
Tablo 4.16. SRS ‘nin LE 1. ve 2. alt kültürlerindeki TF miktarı üzerindeki etkisi	80
Tablo 4.17. LE besiyerlerinin 1 ve 2. alt kültürlerindeki VEAŞ – VS ve SRS’ne bağlı olarak ölçülen ortalama toplam fenolik madde (TF) sonuçları.....	84
Tablo 4.18. VEAŞ-VS ‘nın LE besiyerindeki 1. ve 2. alt kültürlerinde bulunan TF miktarı üzerindeki etkisini gösteren istatistiki sonuçlar.....	86
Tablo 4.19. SRS ‘nin LE besiyerindeki 1. ve 2. alt kültürlerinde bulunan TF miktarı üzerindeki etkisini gösteren istatistiki sonuçlar.....	86
Tablo 4.20. LE besiyerlerinin 1 ve 2. alt kültürlerindeki VEAŞ – VS ve SRS’ne bağlı olarak ölçülen ortalama PAL enzim aktivitesi sonuçları.....	90
Tablo 4.21. VEAŞ-VS ‘nın LE besiyerindeki 1. ve 2. alt kültürlerinde bulunan PAL enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.....	92
Tablo 4.22. SRS ‘nin LE besiyerindeki 1. ve 2. alt kültürlerinde bulunan PAL enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.....	92
Tablo 4.23. LE birinci ve ikinci alt kültürlerindeki hücrelerin ve besiyerlerinin toplam fenolik madde miktarları, fenilalanin amonyum liyaz enzim aktiviteleri	96
Tablo 4.24. LE 1. ve 2. alt kültürlerdeki hücrelerde ve besiyerlerindeki toplam fenolik madde miktarları, fenilalanin amonyum liyaz enzim aktivitelerinin birbirileri ile korelasyonu	98

KISALTMALAR

adeq-precision	: Adequate Precision
adj-R²	: Adjusted R ²
ADP	: Adenosine Diphosphate
AK	: Alt Kültür
APX	: Askorbat peroksidaz
ATP	: Adenosine Triphosphate
CCD	: Central Composite Design
CCRD	: Central Composite Rotatable Dizayn
DC	: Direct Current
GA	: Gallik Asit
GAE	: Gallik Asit Eşiti
GR	: Glutation redüktaz
KM	: Kuru Madde
kV	: Kilovolt
LDL	: Low density lipoprotein
LE	: <i>Lycopersicon esculentum</i>
MDAR	: Monodehidroaskorbat redüktaz
PEF	: Pulsed Electric Field
POD	: Peroksidaz
PPO	: Polifenol oksidaz
PUFA	: Polyunsaturated Fatty Acids
R²	: Kareler Toplamındaki Artış
RNS	: Reactive Nitrogen Species
ROS	: Reactive Oxygen Species
RSM	: Response Surface Metodu
SOD	: Süperoksit dismutaz
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
SRS	: Stres Reaksiyon Süresi
TFb	: Besiyerindeki Toplam Fenolik Madde
TFh	: Hücrelerdeki Toplam Fenolik Madde
TP	: Toplam Fenol
USDA	: United States Department of Agriculture
V	: Volt
VEAŞ	: Vurgulu Elektrik Alan Şiddeti
VS	: Vurgu Sayısı
x	: Bir tane işleme alınan örnek

SEMBOLLER LİSTESİ

A	: Absorbsiyon
B_w	: Kör örnek absorbansı
C	: Kapasitörlerde depolanan kapasite
CH₄O	: Metanol
CHCl₃	: Kloroform
d	: İki nokta arasındaki uzaklık
d	: Küvet çapı
Df	: Dilüsyon faktörü
E	: Absorbans
E	: Elektrik alan şiddeti
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
H₃BO₃	: Borik Asit
Hz	: Hertz
kg	: Kilogram
KH₂PO₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
kJ	: Kilojoule
m	: Örnek kütlesi
n	: Vurgu sayısı
Na₂B₄O₇·10H₂O	: Borat
Na₂CO₃	: Sodyum Karbonat
NaH₂PO₄	: Sodyum fosfat
NO	: Nitrik oksit
O₂⁻	: Süperoksit
PAL	: Fenilalanin Amonyum Liyaz
t	: Reaksiyon süresi
TF	: Toplam Fenol
TTC	: 2,3,5 Trifeniltetrasodyumklorit
U	: Karşılık elektrik potansiyeli
U²	: Voltaj şarjını
V	: Test tüpü hacmi
V_r	: Kırılma potansiyeli
W_{pulse}	: Vurgu başına enerji
W_{spec}	: Spesifik enerji girdisi
Δ	: Örnek canlılığı – kör örnek canlılığı
ε₂₉₀	: Ekstraksiyon faktörü

1. GİRİŞ

1.1. BİTKİ DOKU VE HÜCRE KÜLTÜRLERİ

Bitki doku kültürleri, steril koşullar altında yapay bir besi ortamında büyütülen bitki hücrelerinden elde edilen kültürlerdir. Bitki doku kültürleri, bütün bir bitkiden veya bitkinin çeşitli kısımlarından üretilirler. Yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesi için bitkinin bütünü kullanıldığı gibi bitkinin hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi kısımları da kullanılmaktadır (Gözükırmızı, 2010). Bitkiler tohum oluşturup eşeyli olarak çoğalabilirler, bunun yanı sıra bitkilerin totipotensi olarak bilinen herhangi bir bitki parçasından eşeysiz olarak da çoğalabilme özellikleri sayesinde bitki doku kültürleri üretilir. Totipotensi özelliği, gelişimleri sırasında bitkileri hayvanlardan ayıran en önemli özelliktir (Aran, 2010; Taiz, 2006). Bu özellik sayesinde tek bir hücreden organizma üretilbildiği (Gözükırmızı, 2010) için bitkilerden hayvanlara oranla yüksek miktarda ve hızlı bir şekilde üretim sağlanır.

Bitki doku sistemleri, mikrobiyel hücreler veya kimyasal sentezler tarafından üretilmeyen değerli tıbbi bileşenlerin, tatlandırıcıların, esansların ve renklendiricilerin potansiyel yenilenebilir kaynağı olarak yer alır (DiCosmo ve Misawa, 1995). Bitki doku kültür teknolojisi günümüzde büyük miktarlarda ve oldukça homojen, farklılaşmamış hücrelerin üretimine olanak sağlayacak şekilde geliştirilmektedir. Ayrıca bitki doku kültürleri 30000 kimyasal bağdan fazla bağ içeren çok değerli fitokimyasalları sentezleyebilirler ve üstelik bu sentezlenen fitokimyasal miktarı mikroorganizmaların sentezlediğinden yaklaşık 4 kat fazladır (Zhong, 2001). Bitki hücre ve doku kültür sistemleri bütün bir bitki ekstraksiyonu ile kıyaslanınca tamamlayıcıdır ve rekabetçi metabolit üretim sistemleri sağlayabilirler (Staba, 1980).

Ayrıca bütün bir bitki bu çok değerli fitokimyasalları kendisi de sentezleyebilmesine rağmen üretim; coğrafik konuma, iklim koşullarına, mevsimsel varyasyonlara ve büyüme koşullarına bağlı kalmaktadır. Bununla birlikte laboratuvar koşullarında bitki doku kültüründen bu fitokimyasalların biyosentezinin gerçekleştirilmesi mümkündür (Gueven ve Knorr, 2011).

1.1.1. Kallus ve Süspansiyon Hücre Kültürleri

Kültüre edilmiş bitki hücreleri aseptik koşullarda ve agar gibi uygun katı besiyerlerinde kallus şeklinde veya süspansiyon kültürü adı verilen küçük hücre kümeleri şeklinde sıvı besiyerlerinde muhafaza edilir (DiCosmo ve Misawa, 1995; Pierik, 1987).

Kallus, düzensiz bitki hücrelerinin bir araya gelmiş, kısmen farklılaşmış ve hızlı üreyebilen hali olarak tanımlanabilir (Nunez-Paleniüs vd., 2005). Hemen hemen bütün bitki dokuları kallus indüksiyonundan sorumludur ve başarılı kallus oluşumunun çoğunlukla genotipe ve dışarıdan tedarik edilmiş büyüme düzenleyicilerinin etkisine bağlı olduğu bilinmektedir. Büyüme düzenleyici tipi ve besiyerindeki konsantrasyonu ağırlıklı olarak eksplantın türüne ve potansiyel endojen hormon içeriğine bağlıdır (Klein ve Rafalski, 2003). Doğa koşullarında kallus; bitki yaralandığı zaman veya *Agrobacterium tumefaciens* gibi bazı fitopatojenik organizmalar tarafından neden olunan bir tümör sonrası iyileştirici mekanizma olarak açığa çıkar (Nunez-Paleniüs vd., 2005; Taiz, 2006). Kallus, benzer karakterler gösteren parankima hücrelerinden oluşur fakat hücre bilim çalışmaları göstermiştir ki kallus hücresel kompozisyonda heterojen bir dokudur. Ciddi olarak incelendiğinde kallus kültürü homojen bir hücre kütlesi değildir çünkü genel olarak farklılaşmış ve farklılaşmamış olarak 2 tip dokudan oluşur (Klein ve Rafalski, 2003). Kallus dokusunun en önemli özelliklerinden biri “ufalanabilirlik”tir. Bu hücrelerin kümelerden kopma ve dağılma özelliğidir. Genelde, yüksek oksin konsantrasyonları kallus ufalanabilirliğini desteklerken sitokin varlığı kalinin sert konsistensli olarak üretilmesine yol açar. Ufalanabilirlik özellikle hücre süspansiyon kültürleri için istenen bir özelliktir (Klein ve Rafalski, 2003).

Hücre süspansiyon kültürleri hareketli sıvı besiyerine dağılmış, büyüyen hücrelerden ve küçük kümelerden oluşur. Genelde hücre süspansiyonu farklılaşmamış, ufalanabilir kalı parçalarının uygun bir cihazla devamlı çalkalanan sıvı bir besiyerine transferiyle oluşturulur. Hücre kültürleri çalkalanmalı veya havalandırılmaları için bir sistem olmalıdır ki yeterli bir gaz değişimi mümkün olabilsin (Mirjalili ve Linden, 1995; Perata ve Alpi, 1991). Süspansiyon kültürleri fidelerden, embriyolardan veya yapraklardan mekanik yöntemler ile başlatılabilir (Nunez-Paleniüs vd., 2005).

Kallus kültürleri, bitki organlarının kesilmiş taze kısımlarını büyüme düzenleyicileri (genelde oksin ve sitokinin) ve karbon kaynakları (sakaroz) ihtiva eden katı veya yarı-katı bir besiyeri ortamına koyarak oluşturulur. Bu ortamda eksplant, aile dokudan ayrılan kallus

yapısı gösterir. Ardından eksplant makul miktarlarda kallus dokusu elde etmek için taze besiyerine transfer edilir. Kallus kültüründen süspansiyon kültürleri elde etmek için, geliştirilen bu kallus dokusu sıvı bir besiyerine alınır ve bu besiyeri iyi kalitedeki süspansiyon hücrelerini arttırmak için devamlı çalkalama düzeneği olan bir sisteme konur (Klein ve Rafalski, 2003). Transfer edilen kalluslar, serbest hücreler ve yeni hücre grupları üreten küçük kümelerin oluşturulduğu fragmentasyon periyodunu başlatır. Bununla birlikte sadece özgün hücreler tarafından bir süspansiyon kültürü oluşturmak neredeyse imkansızdır (Manoharan ve Gnanam, 1992).

Teoride hücre süspansiyon kültürleri çalkalanan sıvı bir besiyerine inoküle edilmiş herhangi bir eksplanttan başlatılabilir ama gerçek başarı kallus dokusundan yapıldığı zaman gerçekleşir (Mirjalili ve Linden, 1995; Perata ve Alpi, 1991). Bunun sebebi; in vitro ortama uyum sağlamış belli bir büyüme oranı sabitine sahip kallus kültüründen alınan kısımlar ana bitkiden alınan parçalara göre sıvı ortama daha hızlı adapte olmalarıdır (Babaoğlu ve Akbudak, 2002). Kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinin uzun süre muhafaza edebilmesinde kültürlerin alt kültürlerini oluşturma potansiyelleri önem arz eder (Sökmen, 2001). Hücre süspansiyon kültürleri kallus kültürleriyle kıyaslanınca genelde daha sık alt kültürlere gereksinim duyarlar ve hücrenin canlılığını yitirmekten kaçınmak için hücreler duraklama fazına erişmeden kültürler alt kültüre edilmelidir. Hücre süspansiyonlarının sıvı besiyerinde geliştirilmesinin birçok avantajı vardır. Şöyle ki bütün hücreler besiyerine homojen bir biçimde dağılırken besin öğelerinde gradyan oluşmaz. Ayrıca besiyerinin devamlı karıştırılması hücreler için havalandırmaya olanak sağlar ve böylece gaz değişimi gerçekleşebilir (Nunez-Palenius vd., 2005). Bu sebeplerden ötürü genelde bitki doku çalışmalarında süspansiyon hücre kültürleri tercih edilmektedir.

1.1.2. Bitki Hücre Kültürlerinde Gelişme ve Sekonder Metabolitlerin Sentezi

Bitki hücrelerinde büyüme, hücre sayısında artış ve hücre hacminde artış olarak iki ana safhada gerçekleşir (Nunez-Palenius vd., 2005). Bitki hücre kültürlerinde büyüme olayı zamana karşı grafiğe alındığında, mikroorganizmalarda olduğu gibi sigmoidal bir eğri gösterir. Kültür büyümesi esas alındığında hücre gelişiminin bu sigmoidal davranışı 5 ana karakteristik büyüme fazını içerir:

- 1- Lag Faz: Bitki hücrelerinin bölünmeye başlamadan önce hazırlık periyodu
- 2- Log veya üssel Faz: Hızlı hücre bölünmesinden ötürü hücre sayısında üssel artış

- 3- Lineer Faz: Kùltürlerin yaş ve kuru ağırlıklarının arttığı hücre popùlasyonundaki doğrusal artış
- 4- Yavaşlama Fazı: Besiyeri azalması ve hücresele kalıntı birikiminden dolayı hücresele bölünme hızında aşamalı yavaşlama
- 5- Duraklama Fazı: Hücre bölünmesinde durma (Sökmen, 2001; Nunez-Palenius vd., 2005)

Bitki hücre kùltürlerinin bu büyüme fazları dikkate alındığında hücrelerin gelişiminde bazı faktörler dikkate alınmalıdır. Log safhasında alt kùltürü yapılan hücrelerde lag safhası gözlenmemektedir. Bununla birlikte ekim miktarı da bitki hücre süspansiyon kùltürlerinin büyümesinde etkili bir faktördür. Az sayıda hücre ile ekim yapılırsa alt kùltür ortamında lag safhası çok uzun olmakta ve logaritmik faza ait olan açi küçülmektedir. Buna karşılık, yüksek hücre yoğunluğuna sahip alt kùltürlerde duraklama fazına geçmeden önce sınırlı sayıda hücre bölünmesi olmaktadır. İdeal ekim hacmi kùltürler arasında farklılık göstermekte ve hücre kùltürü yapılan türe ve kùltür koşullarına göre değişmektedir (Sakuta, 1987).

Hücre kùltürlerinde sekonder metabolit birikimi ile büyüme arasındaki ilişki değerlendirilerek iki ana model oluşturulmuştur. Bunlar “antosiyanın tip” ve “betasiyanin tip” olarak adlandırılmıştır. Pek çok hücre kùltüründe sekonder metabolit (diosgenin, fenolik bileşikler, berberin, vb.) üretimi için geçerli olan birinci modelde (antosiyanın tip) büyüme ile metabolit birikimi arasında zıt ilişki bulunmaktadır. Örneğın *Daucus carota* (havuç) hücre süspansiyon kùltürlerinde büyüme kinetiğii ve metabolit (antosiyanın) birikimi incelendiğinde lag ve log fazlarında antosiyanın birikimi görülmemektedir. Birikim doğrusal artış fazının sonlarına doğru artmakta ve durgun safhada en yüksek düzeye ulaşmaktadır (Sökmen, 2001). Birinci modele diğeri bir örnek olarak *Dioscorea deltoidea* hücre süspansiyon kùltürlerindeki diosgenin biyosentezi için gerekli olan ara ürünlerin büyümenin log fazında şekillenip, diosgenine dönüşümün durgun safhada olması verilebilir (Tal ve Goldberg, 1984). Hızlı büyüyen hücrelerde alkaloid birikimi az iken, buna karşılık yavaş büyüyenlerde ise daha yüksek düzeylerde alkaloid birikimi gözlenmiştir. Bu durum da büyüme ile alkaloid birikimi arasındaki zıt ilişkiyi göstermektedir (Lindsey vd., 1983).

“Antosiyanın tip” modelde birikim ile büyüme arasındaki zıt orantıya ters olarak “betasiyanin tip” birikimde metabolit seviyesi hücre bölünmesi ile doğru orantılı olarak

artış göstermektedir (Sökmen, 2001). Bu modele örnek olarak *Phytolacta americana* hücre süspanسیون kültürlerinde büyüme ile betasiyanin pigmenti birikimi arasındaki ilişki verilebilir. Bu tip birikimde metabolit seviyesindeki artış hücre bölünmesinin en yoğun olduğu log safhasında en üst düzeye çıkmakta ve sonraki safhalarda düşmeye başlamaktadır (Sakuta, 1987). Bu iki tip model ve bitki doku hücrelerinin büyüme karakteristikleri göz önüne alındığında sekonder metabolitlerin birikimi için iki durum olduğu söylenebilir: birinci durumda farklılaşmamış büyüme söz konusu iken ikinci durumda ise farklılaşma var olmaktadır. Böylece betasiyanin tip birikim birinci durumda; antosiyanin tip birikim ise ikinci durumda meydana gelmektedir (Sökmen, 2001).

Sekonder metabolitler, bitkilerde çok önemli fonksiyonları olan kompleks kimyasal bileşenlerdir. Bu metabolitler, bitkiyi büyüme koşullarındaki varyasyonlardan koruyarak bitki gelişimine yardım eden metabolik aktiviteleri etkilerler (Gueven ve Knorr, 2011).

Bitki gelişimi iklim koşulları, toprak kompozisyonu gibi tüm dünyada aynı olmayan birçok faktöre bağlı olduğu için, bitki hücrelerinden bağımsız olarak değerli bileşenleri üretmek için büyük çaba sarfedilmektedir. Ancak kültüre alınmış bitki hücreleri in vitro koşullarda birçok avantaj sağlamaktadır. Bunların arasında en önemlilerinden biri hücre kültürlerinin bütün bir bitkiden daha yüksek oranda metabolizmaya sahip olduğudur. Çünkü hücre gelişimini kültürde başlatmak hücre kütlelerinde hızlı bölünmeye yol açar. Bundan dolayıdır ki sekonder metabolit oluşumu yaklaşık iki ile dört hafta gibi kısa bir gelişme zamanında meydana gelir (Dörnenburg ve Knorr, 1995). Dahası hücre kültürleri çevresel faktörlerden ve coğrafik konumdan bağımsız geliştikleri için kontrollü bir üretim gerçekleşir. Bu da kültürlerin sayısının hızlı bir şekilde artmasını sağlar. Ayrıca morfolojik varyasyonlar görsel seleksiyonla hızlıca seçilebilir ve rahatlıkla ayırt edilebilir. Bunun yanı sıra bazı bitki enzimleri kültür ortamında etkili bir şekilde salgılanabilir ve sonraki kullanımlar için sürdürülebilir. Kültür ortamı kullanmanın diğer bir avantajı ise standart mikrobiyel veya maya-küf besiyeri ortamlarıyla kıyaslanınca hücre kültürleri için ihtiyaç duyulan besiyerinin basit kompozisyonda olmasıdır. Örneğin, genelde protein eklenmesi gerekli değildir (Stafford, 1991).

Spesifik bileşenlerin ticari üretimi için in vitro geliştirilen kültürler kullanılabilir yalnız bazı zorluklar dikkate alınmalıdır. Geniş hücre büyüklüğüne bağlı olarak ve sıklıkla bir araya toplanarak geliştikleri için hücre kültürleri; aerasyonu kışkırtan kayma gerilimine, taşınım proseslerine oldukça duyarlıdırlar ve bunun yanı sıra substrat yükleme seviyesini

düşürürler (Hermann, 2010). Mikroorganizmalarla kıyaslanınca, büyüme hızı oldukça yavaştır ve değerli materyallerin kazanımı bütün bir bitkide bulunana göre sıklıkla düşük orandadır. Yüksek üretim olan hücre eğrilerini sürdürmekteki bilinmesi gereken diğer önemli faktör ise bitki hücre kültürleri bireysel hücrelerden yapılmamaktadır. Bu yüzden hücre kültürleri tamamen genetik olarak homojen değillerdir ve varyasyonlar üretimde büyük bir etki oluşturabilirler. Yine de bu durum, arzu edilen hücre popülasyonunun, heterojen hücre kütesinden ayrılması gibi kültür ortamındaki değişikliklerle tersine çevrilebilir (Dörnenburg ve Knorr, 1995).

1.1.3. Domates Hücre Kültürü (*Lycopersicon esculentum*)

Domates (*Lycopersicon esculentum*), orta ve güney Amerika orjinli 1500 tropikal ve sub-tropikal tür içeren, patatesin de dahil olduğu *Solanaceae* ailesinin bir üyesidir (Borguini ve Ferraz Da Silva Torres, 2009). Birçok üyesi yüksek alkaloid konsantrasyonlarının varlığında karakterize olsalar da *Solanaceae*, bir gıda kaynağı olarak önemli bir ailedir (Davies vd., 1981).

Domates günlük diyetle en çok tüketilen sebzelerden biridir. Domates antioksidanları likopen, β -karoten gibi karotenoidleri; askorbik asit, tokoferoller gibi vitaminleri ve flavonoidler, hidroksisünamik asit türevleri gibi fenolik bileşikler içerir (George vd., 2004; Lai vd., 2007; Pinela vd., 2012). Bu moleküller, domates ve serbest radikal süpürülmesi, metal şelatlaşması, hücresel çoğalmanın inhibasyonu, enzimatik aktivitenin değişimi ve uyarıcı transdüksiyon yolları aracılığı ile meydana gelen birçok önemli hastalıktan sorumlu reaktif oksijen türlerinin inhibasyonunda önemli bir rol oynarlar (Clinton, 1998; Pinela vd., 2012).

Domates besin öğeleri içeriği Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bölümünün (United States Department of Agriculture- USDA) gıda kompozisyonu verilerine göre Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1.1. USDA gıda kompozisyon verilerine (USDA 2012) göre domatesin kimyasal bileşimi

Besin Öğeleri	Birimler (birim/100g)	USDA Verileri
Su	%	94.5
Enerji	Kcal	18
Enerji	Kj	75
Protein	G	0.88
Toplam yağ	G	0.20
Kül	G	0.50
Karbonhidrat	G	3.92
Kalsiyum	Mg	10
Demir	Mg	0.27
Magnezyum	Mg	11
Fosfor	Mg	24
Potasyum	Mg	237
Sodyum	Mg	5
Çinko	Mg	0.17
Bakır	Mg	0.059
Mangan	Mg	0.114
C Vitamini, toplam askorbik asit	Mg	12.7
Tiamin	Mg	0.037
Riboflavin	Mg	0.019

Tablo 1.1'in devamı		
Niasin	Mg	0.594
Beta-karoten	µg	449
Alfa-karoten	µg	101
Likopen	µg	2573
Lutein+zeaksantin	µg	123

Domates ürünlerinin düzenli tüketilmesinin birçok kanser türü ve kardiyovasküler hastalık riskini azalttığı yapılan çalışmalarda vurgulanmıştır (Clinton, 1998). Bu pozitif etki özellikle karotenoidler (likopen ve β -karoten) ve fenolik bileşikler gibi antioksidanların, kısmen reaktif oksijen vasıtasıyla ortaya çıkan lipit peroksidasyonlarını engellemeleri sayesinde ortaya çıkmaktadır (Borguini ve Ferraz Da Silva Torres, 2009).

Likopen, bütün diğer antioksidanların arasında en yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir (Rao ve Agarwal, 1999). Bunun yanı sıra likopenin günlük diyetle tüketimi prostat kanseri riskinin azalması ile epidemiyolojik olarak bağlantılıdır ve likopenin α - ve β - karotene göre çeşitli insan epitel kanser hücre çizgisinde hücre çoğalmasını önlemede üstün olduğu bulunmuştur (Giovannucci, 1999). Domateslerde α - ve β - karoten ve lutein de makul miktarlarda bulunmaktadır. β - karoten provitamin A aktivitesi ile lutein ise akciğer kanseri riskini azaltması ile bilinmektedir (Sies, 1997). Bazı domates türlerinin yüksek miktarlarda özellikle kuersetin gibi flavonoller içerdiği çalışmalarda gösterilmiştir (Crozier vd., 1997). Flavonoller ve flavonlar potansiyel antioksidanlar oldukları ve gıdalarda serbest radikal süpürme aktivitesine sahip oldukları için önem arz ederken tüketimlerinin kanser riskini düşürdüğü belirtilmiştir (Kaur ve Kapoor, 2001). Ayrıca bu fenolik bileşikler antimikrobiyel savunma mekanizmasına sahip oldukları için bitkilerin patojen saldırılarına karşı direnç göstermesinde de çok önemli bir rol oynarlar (Dixon vd., 2002).

Diğer birçok bitkide olduğu gibi domateste de bulunan bu değerli fitokimyasalların çoğu sekonder metabolit olarak sentezlenmektedir (Ramachandra Rao ve Ravishankar, 2002).

1.2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRLERİNDE PRİMER VE SEKONDER METABOLİZMA

Bütün biyokimyasal proseslerin toplamı olarak bir hücre metabolizması, primer ve sekonder metabolizma olarak ayrılır. Primer metabolizma, hücrenin canlılığını sürdürebilmesi için gereken tüm metabolik yolları içerir. Bunlar; ADP (Adenosine Diphosphate), ATP (Adenosine Triphosphate) ve diğer nükleosid trifosfatlar ile enerji transferi, proton ve elektron alıcıları, glikoliz ve sitrik asit döngüsü, solunum zinciri, karbonhidrat döngüsü, enzim reaksiyonları ve lipit, nükleotid ve porfirin biyosentezidir (von Sengbusch, 2003). Görüldüğü üzere primer metabolizmada bütün temel metabolik prosesler, hücre komponentlerinin dönüşümü gibi transformasyon, enerji üretimi ve büyüme ile ilişkilidir. Primer metabolizmanın ürünleri, kimyasal reaksiyonları ve temel prensipleri tüm yaşayan organizmalarda hemen hemen aynıdır (Steingröver, 2001).

Sekonder metabolizmada ise bitki savunmasından sorumlu bileşenler üretilmektedir. Bu ürünler genelde sadece özel, farklılaşmış hücrelerde oluşmaktadır ve hücrenin yaşamını sürdürmesi için gerekli olmamakla birlikte bitkinin tamamı için kullanışlı olmaktadır. Sekonder metabolitler alkaloidler, izoprenoidler/terpenler, kauçuk benzeri polimerler/poliizoprenler, fenolik bileşikler, ender aminoasitler, bitki aminleri ve glukozitler olarak sınıflandırılabilir (Hermann, 2010; von Sengbusch, 2003). Bunların çoğu yüksek oranda toksiktir ve genelde özel kesecikler veya kofullarda depolanmaktadır (von Sengbusch, 2003). Polen taşıyıcılar ile iletişim üzerinden hormon uyarıcı veya bitkilerin mikroorganizmalar veya hayvanlar tarafından kullanılmasından korumaya kadar değişen fonksiyonlara sahiptirler (Hermann, 2010). Flavonoller gibi bazı sekonder metabolitler antibiyotik özelliklere sahiptirler (Kaur ve Kapoor, 2001).

Uzun süredir birçok sekonder bitki metabolit, morfin, meskalin gibi psikofarmakolojik etkilerinden dolayı tıp alanında önemli rol üstlenmiş (von Sengbusch, 2003), direkt veya kimyasal modifikasyondan sonra da kullanılmıştır.

Biyoteknolojik çalışmalar sonucunda hücre doku kültürlerini kullanarak sekonder metabolitlerin üretilmesi yönünde çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır.

Sekonder metabolitler bitki savunma mekanizması ile ilgili olduğu için sentez edilmeleri soğuk ve kuraklık (Beck vd., 2007), UV radyasyonu (Edreva, 2008), vurgulu

elektrik alan uygulaması (Ye vd., 2004) ve mikrobiyel invazyon (Nagy vd., 2004) gibi abiotik stresörler tarafından tetiklenebilir.

1.2.1. Fenil Propanoid Metabolik Yolu

Fenilalanin ve fenilpropanoid yolundan üretilen doğal bitkisel ürünler, geniş içerikli pigment, yapısal ve savunma bileşenlerinin kazanımı için seçilen bitkilerin gelişimi ve kimyasal çeşitliliği üzerine etkilidir. Bu bileşenler; bitkinin büyümesi ve gelişimi için önemlidirler ve tarımsal üretimde geniş etkisi olan çevresel strese karşı sorumludurlar (Ververidis vd., 2007).

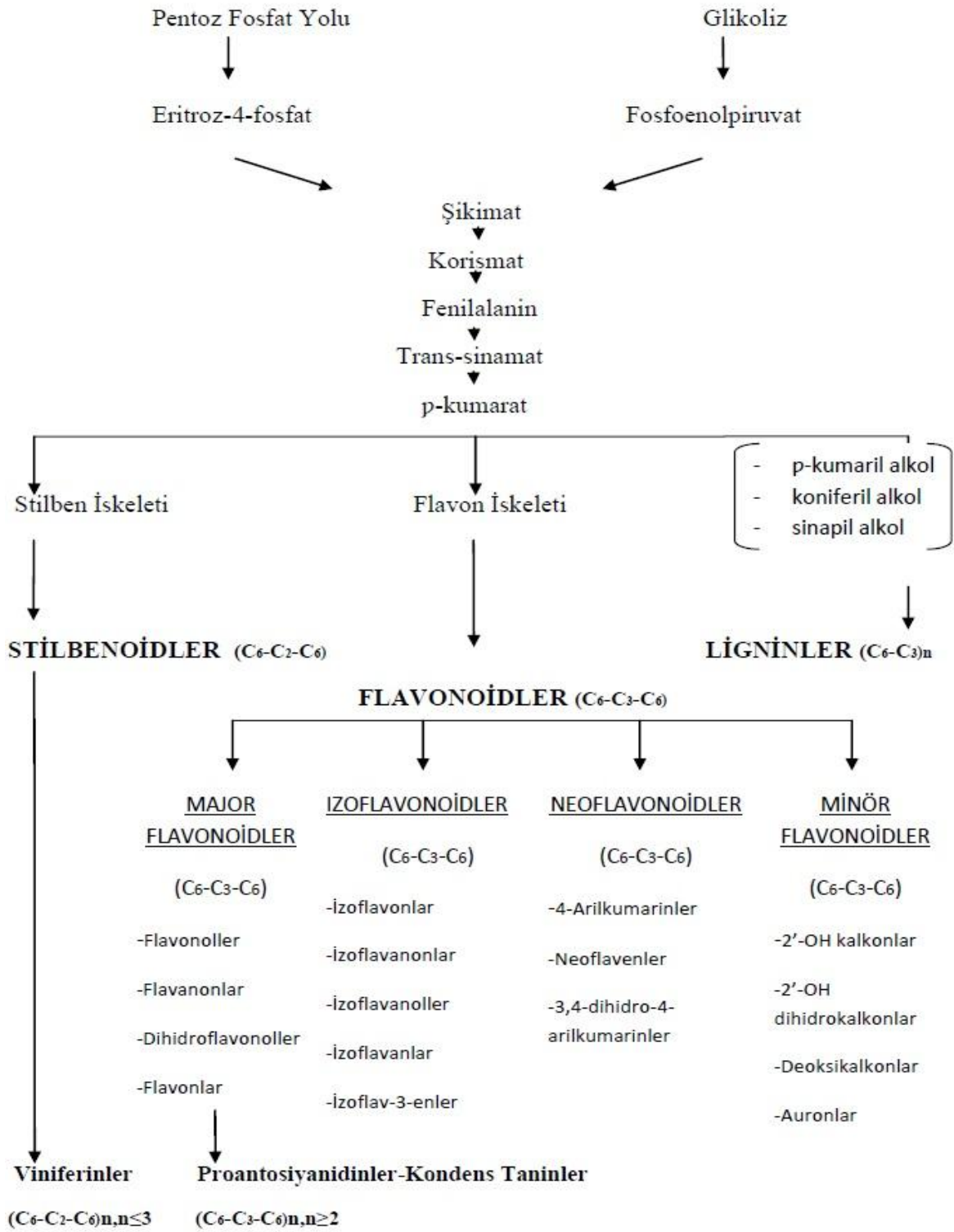
Bitkilere özgü, doğal ürünlerin metabolik yollarıyla çevrilmiş fenilpropanoid metabolizmasında fenilalanin (Phe) içinde ligninler, sinapat esterler, stilbenoidler ve flavonoidlerin bulunduğu çeşitli önemli sekonder ürünlere çevrilir. Fenilpropanoid metabolizmasının bu ürünleri, bütün bitkilerde bulunan metabolik yol aracığı ile normal büyüme ve gelişim için gerekli olmayan bitki sekonder metabolitleri ve bileşenlerinin büyük kısmını üretirler (Ververidis vd., 2007). Yapılan çalışmalara göre, 50000 ile 100000 arasında bitki sekonder metabolit ürünlerinin ve fotosentez ürünü karbonun yaklaşık % 20'sinin doğada bulunan fenolik bileşenlerin (flavonoidler ve stilbenoidler gibi) büyük çoğunluğunun üretildiği fenilpropanoid yoluna kanalize olduğuna inanılmaktadır (Metcalf ve Kogan, 1987; Ralston vd., 2005).

Fenilpropanoid bileşenlerinin biyosentezi sadece gelişmiş spesifik dokular ve hücre türlerinde değil aynı zamanda yaralanma, patojen enfeksiyonu veya UV radyasyonu gibi çevresel streslerden sorumlu diğer dokularda da aktiftir (Douglas, 1996). Fenilpropanoid metabolizmasında yer alan fenilpropanoid bileşenlerinin yapılarının ve primer metabolizmadan gelen biyosentetik orjinleri genel olarak şekil 1.1'de şematik olarak gösterilmiştir. Şikimat yolunun son ürünü olan fenilalanin, şekil 1.1'de de gösterildiği üzere fenilpropanoid, flavonoid, stilbenoid, lignin sekonder metabolik yolu ile primer metabolizmayı birbirine bağlayan anahtar ara üründür. Şikimat yolu ise fosfoenolpiruvatın ve eritroz-4-fosfatın kondense olması ile başlayan, korismatin sentezi ile biten yedi metabolik aşamadan oluşan ve asla hayvanlarda bulunmayan mikroorganizma ve bitkilerde çeşitli stres koşullarına bağlı olarak gerçekleşmektedir (Herrmann ve Weaver, 1999). Şikimat metabolik yolu fenilalanin, tirozin, triptofan gibi aromatik aminoasitlerin üretilmesine yol açmaktadır (Ververidis vd., 2007).

Fenilalaninden ve anahtar fenilpropanoid ara ürünü olan p-kumarattan türeyen şekil 1.2'de kısmen gösterilen fenilpropanoidlerin yapısal çeşitliliği bölgeye-özgü kondensasyon, siklizasyon, aromatisasyon, hidroksilasyon, glikosilasyon, asilasyon, prenilasyon, sulfatlaşma ve metilasyon reaksiyonlarına neden olan enzim ve enzim komplekslerinin aktivitesine dayanmaktadır (Noel vd., 2005). Bu çoklu dallanmış biyosentetik aşamalarda, birçok enzim merkez bir takım kimyasal dönüşümleri katalize ederken çeşitli substratlardan faydalanırlar ve böylelikle sentetik olarak p-kumarat fenilpropanoid iskeletini çok geniş sekonder metabolit dizilimine uzatma kabiliyetine sahip olurlar. Böylesine zengin enzimatik ürün çeşitliliği bitkilerin iklime uyum, savunma veya saldırı için kesintisiz dinamik bir kimyasal depo geliştirmesi gibi süregelen değişim prosesinin bir sonucudur (Harborne ve Williams, 2000; Noel vd., 2005; Dixon, 1995; Ververidis vd., 2007).

Bitkilerde çeşitli fonksiyonları olduğundan fenilpropanoidler arasında, flavonoidler ve stilbenoidler son yıllarda büyük önem arz etmeye başlamıştır. Örneğin fitoaleksinler gibi antimikrobiyel ajan, fotoreseptör, çiçek pigmenti, UV'ye karşı koruyucu, böcek ve herbivordan koruyucu, rhizobiumlegume simbiyosisinin erken aşamalarında sinyal, oksin taşınım düzenleyicisi ve polen filizlenme uyarıcısı olarak fonksiyonları vardır (Harborne ve Williams 2000, Williams vd., 2004). Ayrıca insan sağlığı üzerinde antialerjik, antitrombotik, anti-inflamatuvar ve antikanserojen ajan olarak etkileri olduğu da belirtilmiştir (Dixon, 1995; Ververidis vd., 2007; Williams vd., 2004).

Tüm bunlara ek olarak bu kompleks biyosentetik yolların anlaşılması bireysel biyosentetik reaksiyonların mekanizmalarının bütünüyle anlaşılmasına ve bazı durumlarda metabolik akış ve ara kanal kontrolü için belki de can alıcı olan multiprotein komplekslerinin üç boyutlu yapısı için bazı durumlarda kanıt olarak gösterilmesine yol açar (Winkel, 2004). Bu bilgiler aynı zamanda insan sağlığına faydalı önemli tarımsal bitkilerdeki ve model mikroorganizmalardaki kullanışlı metabolik karakterlerin mühendislik uygulamaları için pratik ve makul temeller sağlar (Becker vd., 2003; Davies, 2007; Treutter, 2005).



Şekil 1.1. Fenilpropanoid metabolizmasındaki biyosentetik ilişkilerin genel gösterimi (Dixon vd., 2002; Ververidis vd., 2007)

1.2.1.1. Polifenoller (Fenolik Bileşikler)

Bütün bitkiler metabolizmalarının doğal savunma mekanizmalarında (örneğin ultraviyole radyasyon ve patojen saldırılarına karşı) sekonder metabolit olarak rol alan çok sayıda fenolik madde bulundurmaktadırlar (Acar ve Gökmen, 2007; Manach vd., 2004). Bu nedenle, bitkisel kökenli bütün gıdalarda farklı nitelikte ve miktarda çeşitli fenolik bileşikler bulunmaktadır (Belitz ve Grosch, 1995). Aromatik halkaya sahip çeşitli hidroksil gruplarından oluşan polifenol yapısına sahip binlerce çeşit molekül yüksek bitkilerde tanımlanmıştır ve yüzlercesi de yenilebilir bitkilerde bulunmuştur.

Fenolik bileşikler bir gıda bileşeni olarak; insan sağlığı açısından işlevleri, tat ve koku oluşumundaki etkileri, renk oluşumu ve değişimine katılmaları, antimikrobiyel ve antioksidatif etki göstermeleri, enzim inhibisyonuna neden olmaları, değişik gıdalarda saflık kontrol kriteri olmaları gibi birçok açıdan önem taşımaktadırlar. Ayrıca fenolik bileşikler meyve ve sebzelerin kendilerine özgü buruk tattan sorumludurlar. Bu algılayış kalıcıdır ve bunun sebebinin fenolik bileşiklerin ağız mukozasındaki protein ve polisakkaritlerle gerçekleştirdiği tepkimeler olarak görülmektedir (Acar ve Gökmen, 2007).

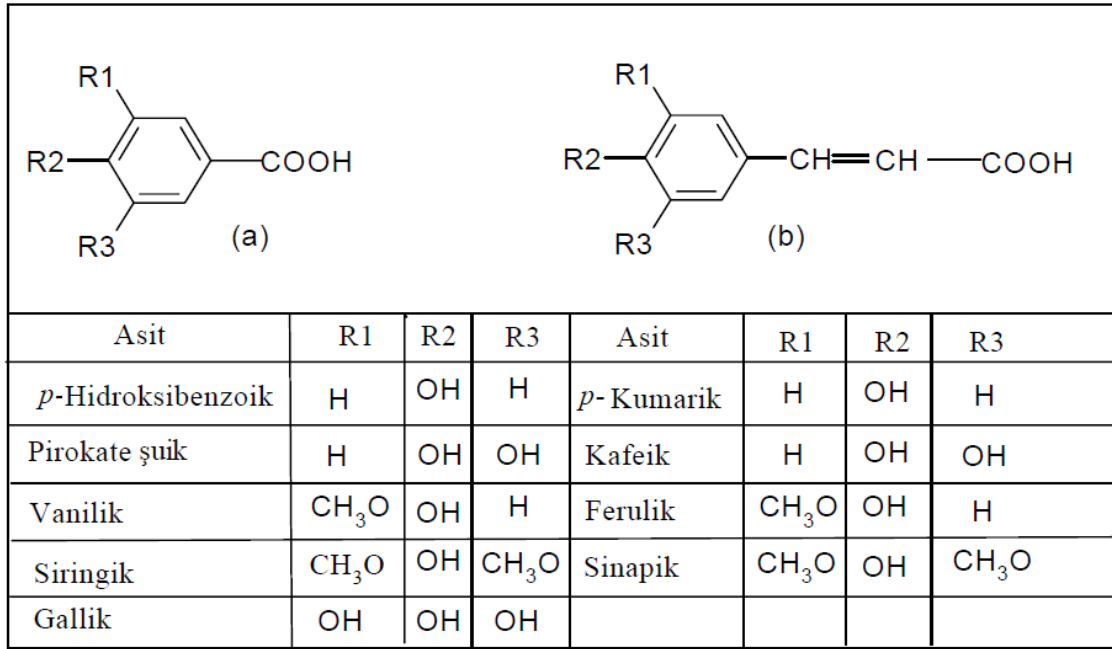
Fenolik bileşiklerin bir diğer özelliği de antioksidan etkileridir. Antioksidan etki, fenol halkasında bulunan –OH grubu ile doğru orantılıdır ve aynı bileşikte bu etki *meta-*, *orto-* ve *para-* sırasına göre artmaktadır. Antioksidan etki lipid, protein ve nükleik asitlere oksidatif hasar yapan, kanser ve arteroskleroz dahil birçok hastalığın patojenitesinde önemli olduğu bilinen serbest radikalleri nötralize etmektedirler (Acar ve Gökmen, 2007). En fazla antioksidan etkinin, sırasıyla üzüm, greyfurt, domates, portakal ve elma sularında olduğu tespit edilmiştir (Karadeniz, 1994)

Bu bileşenler, yapılarında bulundurduğu fenol halkası sayısının ve bu halkaları diğerlerine bağlayan yapısal elementlerin fonksiyonlarına göre farklı gruplar halinde sınıflandırılabilir. Buna göre fenolik bileşikler veya diğer adıyla polifenoller; fenolik asitler, flavonoidler, stilbenler ve ligninler olarak dört ana gruba ayrılabilir (Manach vd., 2004).

1.2.1.1.1. Fenolik Asitler

Şekil 1.2’de kimyasal yapıları gösterilen fenolik asitler; hidroksisünamik asitler ve hidroksibenzoik asitler olmak üzere iki grupta incelenirler.

Fenolik asitler genel olarak serbest halde bulunmazlar. Karboksil grupları karbonhidratlar, glikozitler, aminoasitler veya proteinlerle reaksiyona girebilirler ve alkollerle fenol esterler, amino bileşikleri ile de amidleri oluştururlar. Fenolik asitlerin büyük bir kısmı bitkilerde organik asitler veya şekerler ile esterleşmiş halde bulunurlar (Acar ve Gökmen, 2007). Fenolik asitlerin fenol halkasına bağlı hidroksil grupları da çok aktif olup, şekerle birleşerek glikozitleri oluştururlar (Maier vd., 1990).



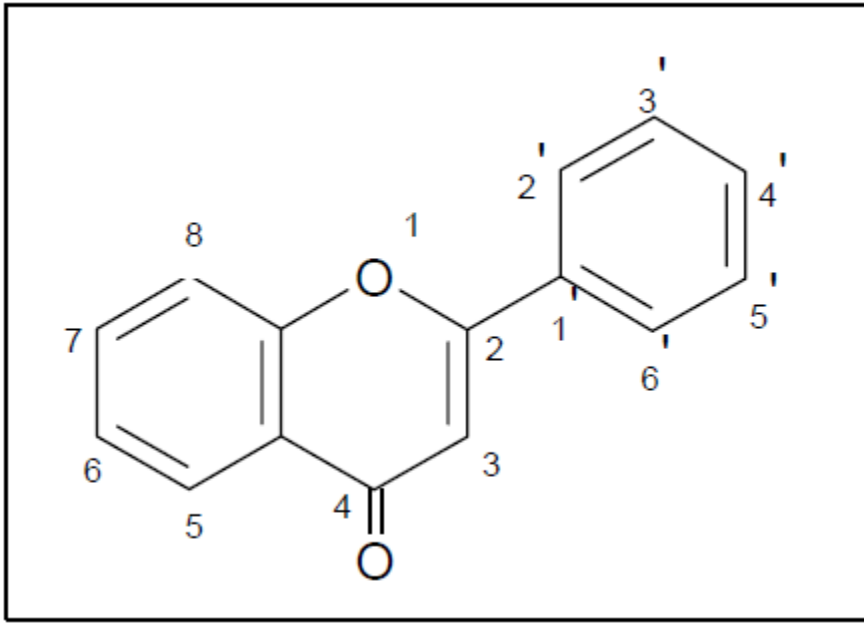
Şekil 1.2. Fenolik asitlerin genel yapısı a) Benzoik asit türevleri b) Sünamik asit türevleri (Shahidi, 2003).

1.2.1.1.2. Flavonoidler

Flavonoidlerin karbon iskeleti, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan (C₆-C₃-C₆) yapısındadır. Flavonoidlerin yapısındaki OH grupları, reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla glikozitlenir (Bilaloğlu ve Harmandar, 1999).

Şekil 1.3’te flavan türevleri olan flavonoidlerin genel yapısı görülmektedir. Flavonoidler gıdalarda en yaygın bulunan polifenollerdir. Yaklaşık 6500 farklı flavonoid bilinmektedir (Acar ve Gökmen, 2007). Yapısal olarak altı gruba ayrılırlar:

- Antosiyanidinler
- Flavonoller
- Flavonlar
- Flavanonlar
- Flavanoller
- İzoflavonoidler



Şekil 1.3. Flavonoidlerin genel yapısı (Shahidi, 2003)

Flavonoller, gıdalarda yaygın bulunan flavonoidlerdir ve ana olarak kuersetin ve kemferol şeklinde yer alırlar. Bu bileşenler glikozit formda bulunurlar. Çoğunlukla glukoz ve ramnoz ile ortaklaşırken galaktoz, arabinoz, ksiloz, glukoronik asit gibi şekerleri de içerir (Manach vd., 2004). Flavonollerin biyosentezi ışık tarafından uyarıldığı için bu flavonoller hava ile temas eden ve dış dokularda (kabuk ve yapraklar) birikirler. Flavonollerin konsantrasyonundaki önemli farklılıklar, güneş ışınlarına maruz kalmalarına bağlı olarak aynı ağaçtaki farklı meyvelerde ve tek bir meyvenin farklı kısımlarında görülmüştür (Price vd., 1995).

Flavonlar, meyve ve sebzelerde flavonollerden daha az yaygındırlar. Flavonlar glikozitlerden ana olarak luteolin ve apigenini içerirler. En önemli yenilebilir flavon kaynakları, maydonoz ve kerevizdir (Shahidi, 2003).

Flavanonlar, domateste ve nane gibi aromatik bitkilerde bulunmakla birlikte en çok turunçgillerde yüksek konsantrasyonlarda yer alırlar (Manach vd., 2004). Flavanonlarda flavan halkası C₄ pozisyonundan okside olmuş durumdadır ve flavanonlar doğada glikozit formda bulunurlar.

İzoflavonoidler, östrojenlerle yapısal benzerlikler gösteren flavonoidlerdir. İzoflavonoidler steorid olmamalarına rağmen, estradiol molekülündeki hidroksil grupların konfigürasyonuna paralellik gösteren 7 ve 4' pozisyonunda hidroksil grupları vardır. Bu durum izoflavonoidlere östrojen reseptörlerini bağlama becerisi gibi pseudohormonel özellikler verir ki buna bağlı olarak da izoflavonoidler fitoöstrojenler olarak sınıflandırılır. İzoflavonoidler, özellikle hemen hemen bütün baklagillerde bulunmaktadır. Soya ve ürünleri de insan diyetinde başlıca izoflavonoid kaynağıdır. Genistein, daidzein ve glisitein soya fasulyesinde bulunan izoflavonoidlerin üç temel aglikon formudur (Manach vd., 2004). İzoflavonoidlerin konsantrasyonları genellikle serbest aglikon ünitesi olarak belirtilir. Böylece vücutta izoflavonoid düzeyi ve biyoyararlılığı için birbirleriyle kıyaslanabilir birimler verilebilmektedir (Acar ve Gökmen, 2007). İzoflavonoidlerin bazı kanser türleri üzerindeki olumlu etkileri konusunda çeşitli çalışma sonuçları bulunmaktadır. Ayrıca izoflavonoidlerin damarların elastik özelliğini arttırdığı ve LDL (low density lipoprotein) oksidasyon direncini arttırdığı belirtilmektedir (Kulling ve Waltz, 2003).

Flavanoller hem monomer formda (kateşin) hem de polimer formda (proantosiyanidinler) bulunurlar. Hemen her meyvede bulunan kateşinler, flavonoid biyosentezinde ara ürün olarak yer alırlar. Gıdalarda en yaygın olarak bulunan flavonoid grubunu oluştururlar. Kateşinler, hem kimyasal hem de enzimatik olarak havadaki oksijen ile kolaylıkla reaksiyona girerler. Reaksiyon sonunda kondanse olarak proantosiyanidinleri oluştururlar. Proantosiyanidin oluşumunda kateşin ünitelerinin birbirleriyle bağlanmaları genelde C₄-C₈ kondensasyonu şeklindedir. Bitkisel kökenli gıdalarda yaygın olarak bulunan proantosiyanidinler; (-)-epikateşin ve (+)-kateşin kombinasyonlarından oluşan dimerlerle iki (-)-epikateşin ünitesinden oluşan prosiyanidin B₂'dir (Acar ve Gökmen, 2007).

Antosiyanidinler, doğal olarak genelde antosiyanin adı verilen glikozit formunda bulunurlar. Antosiyaninler, çiçekler ve meyvelerin epidermal dokularındaki koful özsuyunda çözünerek onlara pembe, kırmızı, mavi, mor renkleri veren pigmentlerdir (Mazza, 1993). pH'a bağlı olarak renkli veya renksiz olarak değişik kimyasal yapılarda bulunmaktadır. Aglikon formunda (anthosiyanidinler) oldukça kararsız olmalarına rağmen bitkilerin yapısında buldukları zaman ışığa, pH'a ve oksidasyon koşullarına karşı dirençli olurlar (Manach vd., 2004). Antosiyanidinler ile glikozid bağı yaparak antosiyaninleri oluşturan başlıca şekerler ramnoz, glukoz, galaktoz, ksiloz ve arabinoz olmakla birlikte bazı disakkaritler veya trisakkaritler de yapıya katılabilmektedir (Waltz vd., 2002). Diğer falvonoidler gibi antosiyaninlerin de antioksidan özellikleri vardır. Reaktif oksijen ve azot molekülleri ile kolaylıkla reaksiyona girerek DNA ve proteinlerin zarar görmesini ve lipidlerin oksidasyonunu önlerler. Ayrıca kanda trombosit agregasyonunu da engellerler (Waltz vd., 2002).

1.2.1.1.3. Ligninler

Ligninler 2 fenilpropan ünitesinden oluşurlar. Tahıllarda, tohumlarda, meyvelerde ve bazı sebzelerde lignin bulunur fakat keten tohumunda bulunan konsantrasyonu diğer gıda kaynaklarındakine göre yaklaşık 1000 kat daha fazladır (Adlercreutz ve Mazur, 1997). Ligninler, bağırsak florasında enterolakton ve enterodiole metabolize olurlar. Yapılan laboratuvar çalışmalarına göre keten tohumu en zengin lignin kaynağı olmakla birlikte yosun, baklagil bitkileri (mercimek), hububatlar (buğday, tritikale), sebzeler (kuşkonmaz, sarımsak, havuç) ve meyveler (şeftali, erik kurusu) de minör kaynaklardır (Thompson vd., 1991).

1.2.1.1.4. Stilbenler

Stilbenler insan beslenmesinde düşük miktarlarda yer almaktadır. Bunlardan bir tanesi olan resveratrol'un tıbbi bitkilerin araştırılması sırasında antikarsinogenik etki gösterdiği bulunmuştur. Fakat bununla birlikte resveratrol, 15 mg glycosides/L gibi düşük miktarlarda kırmızı şarapta bulunmuştur. Bu yüzden ki normal beslenmede bu molekülün hiçbir pozitif etkisi olmamaktadır (Manach vd., 2004).

1.2.1.2. Fenilalanin Amonyum Liyaz Enzimi (Phenylalanine Ammonia Lyase -PAL)

Fenilalanin amonyum liyaz enzimi (EC 4.3.1.24) karbon-nitrojen bağlarını ayıran amonyum liyazlara özgü olan bir liyaz enzimidir (Koukol and Conn 1961). Bulunuşundan bu yana, bitkilerdeki fenilpropanoid yolundaki önemi ve mikroorganizmalardaki katabolik rollerine bağlı olarak hakkında çok daha fazla bilgi toplanmıştır (MacDonald ve D'Cunha, 2007).

PAL enzimi bakteri ve hayvan dokularında bulunmaz; ancak bitkilerden, bazı funguslardan, mayalardan ve prokaryotlardan elde edilebilir (Koukol ve Conn, 1961). Buna ters olarak yapılan çalışmalara göre bilinen tek bakteriyel PAL olan *Streptomyces maritimus*'tan elde edilen PAL enziminin izolasyonu ve özellikleri de belirlenmiştir. Bu bakteriyel enzim, trans-sinamat ve benzoil-CoA yoluyla antibiyotik enterosin sentezinde kullanılır (Xiang ve Moore, 2002).

PAL enzimi kofaktöre ihtiyaç duymayan güçlü bir katalizördür (Snapper vd., 1940) ve sinamik asitten türemiş bütün fenilpropanoidler, primer (şikimat) ve sekonder (fenilpropanoid) metabolizmaları arasındaki dallanma noktasında yer alan PAL enzimi aktivitesi ile fenilalaninden oluşurlar (Dixon, 1995). PAL, birçok bitkinin sekonder metabolik yolunda kullanılan birinci ve anahtar enzim olarak içinde lignin ve flavanoidlerin de olduğu fenolik bileşiklerin sentezini sağlar (Olenichenko ve Zagoskina, 2005).

PAL enzimi stokiyometrik olarak yükseltgen olmayan deaminasyon ile L-fenilalanini trans-sinamik asit ve amonyaga dönüştürür. Tepkimenin denge sabiti L-fenilalaninin parçalanması yönünde büyüktür. Fakat yüksek NH_3 derisimi ve pH değerlerinde tepkime yönü trans-sinamik asitten L-fenilalanin oluşumuna doğru değişebilir (Akay, 1992).

1.3. BİTKİ DOKU KÜLTÜRLERİNDE STRES FAKTÖRLERİ

Bitki metabolizması çok değişkindir ve çevresel faktörlere bağlı olarak tepkiler verir. Bir faktörün bitkinin optimumundan her sapması mutlaka stresle sonuçlanmaz. Fakat doku yaralanması, hastalık veya anormal fizyolojiye sebep olan beklenmedik yüksek değişikler olduğu zaman bitki, kendi optimum durumunu kaybeder ve tüm fizyolojik prosesleri etkileyen stresi yaşar (Hermann, 2010). Bu değişimler yüksek ışık, sıcaklık varyasyonları, ozmotik basınç, patojen enfeksiyonu, herbivör saldırıları ve besin yetersizliği gibi hem biyotik hem abiyotik faktörleri kapsar (Grace ve Logan, 2000)

1.3.1. Biyolojik Stres Kavramı

Stres; normal koşullardaki bir yaşamdan, abiyotik veya biyotik orijinli herhangi bir içsel veya dışsal faktörün yol açtığı farklılıktır. Stresin yoğunluğuna göre östres olarak bilinen pozitif veya distres olarak bilinen negatif etkilere sebep olan güçlü veya düşük stres olarak ayrılabilir (Hermann, 2010).

Selye 'nin (1936) belirlediği orijinal stres konsepti ve Stocker (1947)'in sonuçları temel alınarak Larcher (1987) ve Lichtenthaler (1996) strese maruz kalan biyolojik sistemleri, başlangıç, onarım, bitiş ve yenilenme olmak üzere dört ana faza ayırmışlardır (Larcher, 1987; Lichtenthaler ve Rinderle, 1988; Selye, 1936; Stocker, 1947).

Strese maruz kalmadan önce bitkiler, limitleri büyüme, ışık ve mineral destekli koşullara göre ayarlanmış standart koşullardaki optimum fizyolojide olurlar (Lichtenthaler, 1996). Stresörler ve kompleks stres uygulamaları üç tepki fazına ve eğer zarar çok şiddetli değilse stresörler geri çekildikten sonra yenilenme fazına yol açarlar. Bu ardı ardına olan dört fazda gerçekleşen olaylar ise şu şekildedir:

1.Başlangıç Fazı (Stresin başlaması) : Alarm reaksiyonları

- fonksiyonel normdan ayrılma
- canlılığın azalması
- katabolik prosesin anabolizmaya geçişi

2.Onarım Fazı (Stresin devam ettirilmesi): Direnç aşaması

- adaptasyon prosesi
- onarım prosesi

-sertleşme (reaktivasyon)

3.Bitiş Fazı (Uzun-dönem stres): Tükenme aşaması

-stres yoğunluğu çok yüksek

-adaptasyon kapasitesinin fazla yüklenmesi

-kronik hastalık veya ölüm

4.Yenilenme Fazı : Fizyolojik fonksiyonların kısmi veya tam yenilenmesi (stresörler geri çekildiğinde ve hasar çok yüksek değilse)

Başlangıç fazında şekil 1.4'te görüldüğü üzere güçlü veya düşük strese göre bitkiler tepkilerini farklı verirler. Güçlü stres verildiği durumda hiç stres toleransı olmayan veya sadece düşük stres tolerans mekanizmasına sahip bitkilerde hızlı bir şekilde akut hasar meydana gelir. Fakat yoğun verilen stresin hemen geri çekildiği durumda, hücreler, gerçekleşen zararı onarma mekanizmalarına sahip olduklarından kendi normal seviyelerine geri dönerler.

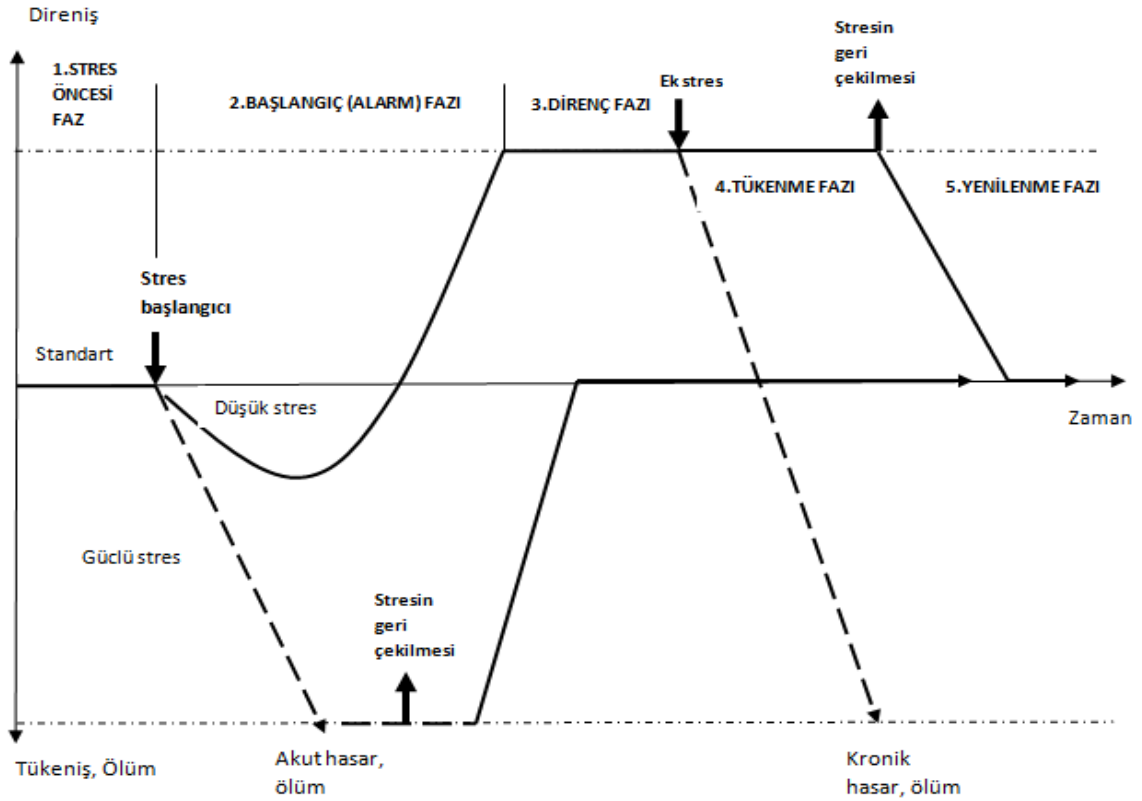
Eğer hücreler düşük strese maruz kaldıysa, bu durum muhtemelen onları sadece alarm fazı boyunca negatif yönde etkileyecektir. Stresin başlangıcında bitkiler; fotosentez, metabolitlerin taşıma veya birikimi, iyonların yer değiştirmesi ve/veya alım performansı gibi bir veya birden çok fizyolojik fonksiyonlarında düşüş yaşarlar. Metabolik aktivitelerindeki bu düşüşe bağlı olarak bitkiler normal fizyolojik standartlarından saparlar ve canlılıkları azalır (Lichtenthaler, 1996). Fakat alarm fazının bitiminde çoğu bitki stresle başa çıkma mekanizmalarını aktif hale getirerek onarım proseslerini ve uzun-dönem metabolik ve morfolojik adaptasyonlarını devreye sokarlar (Lichtenthaler, 1996). Onarım prosesleri ve adaptasyonları bitkinin önceki fizyolojik fonksiyonlarını tamir etmeye yol açmakla birlikte bitkinin maksimum direnç gösterdiği ve değişen çevresel koşullar altında optimum fizyolojide olduğu yeni bir fizyolojik standart kurarak bitkinin sertleşmesine de sebep olur (Lichtenthaler, 1996). Bununla birlikte bitkinin stresle başa çıkma mekanizmasına yüklenen uzun süreli stres ve yüksek doz stres bitkiyi tükenme fazına sürüklerken, bu fazda bitkinin fizyolojisi ve canlılığı kısmi olarak kaybolur. Bunun devamında da hasarlar meydana gelir ve sonunda hücre ölümü gerçekleşir. Fakat, stresörler doğru zamanda (aşırı olgunlaşma prosesi baskın hale gelmeden önce) geri çekilirse bitkiler yenilenir ve yeni fizyolojik standartlara doğru yol alır (Lichtenthaler, 1996). Bitkinin yeni

fizyolojik standartlarda ne kadar süre ile kalacağı ise dış ve iç faktörlere bağlıdır (Lichtenthaler, 1996).

Artık hücreler strese daha çok dirençlidir çünkü hücre savunması aktiftir ve böylece kötü durumlara karşı çıkabilme yeteneğine sahip olurlar. Buradan itibaren sonraki hücre gelişiminde iki muhtemel yol vardır:

- 1- Hücreler ek bir strese maruz bırakılırsa; bu durum kronik hasar ve daha önce belirtilen tükenme fazına yol açan fonksiyonların hızlı bir destabilizasyonuna sebep olur (Şekil 1.4).
- 2- Direnç fazından sonra orijinal düşük stres yok olabilir ve sonra sertleşme tersine döner ve pozitif stres etkilerinin ortadan kalktığı ve hücrelerin düşük strese maruz kalmadan önceki koşullarının olduğu normal yaşam tekrar oluşabilir (Şekil 1.4).

Özetle, bitkinin tolerans limitlerini aşmayan kısa-süreli stres olarak bilinen stres, sadece fizyolojik proseslerde geçici değişimlere neden olurken; uzun-süreli stres olarak tanınan uzatılmış strese maruz kalınması ise kalıcı hasarlara yol açar (Beck vd., 2007).



Şekil 1.4. Bitkilerde biyolojik stres konsepti (Beck ve Lüttge, 1990; Hermann, 2010; Lichtenthaler, 1996).

1.3.1.1. Biyotik ve Abiyotik Stresörleri ve Oksidatif Stres

Şekil 1.5'te bitkilerin çeşitli stres faktörlerine maruz kaldığında sentezlediği fenilpropanoid örnekleri görülmektedir. Bitkilerin çevresel strese maruz kalmaları sıklıkla serbest radikaller ve diğer oksidatif türlerin üretiminin artışıyla sonuçlanır (Hermann, 2010).

Abiyotik faktörler; hava kirliliği (ozon ve sülfürdioksit miktarının artışı), paraquat diklorid gibi oksitleyici oluşturan herbisidler, ağır metaller, sıcak ve soğuk stres, yaralanma, UV ışınları ve ışıl engellemeyi kışkırtan yüksek yoğunlukta ışık koşulları olmakla birlikte, bu faktörler serbest radikal ve diğer oksidatif türlerin oluşumunu tetikler (Gaspar vd., 2002).

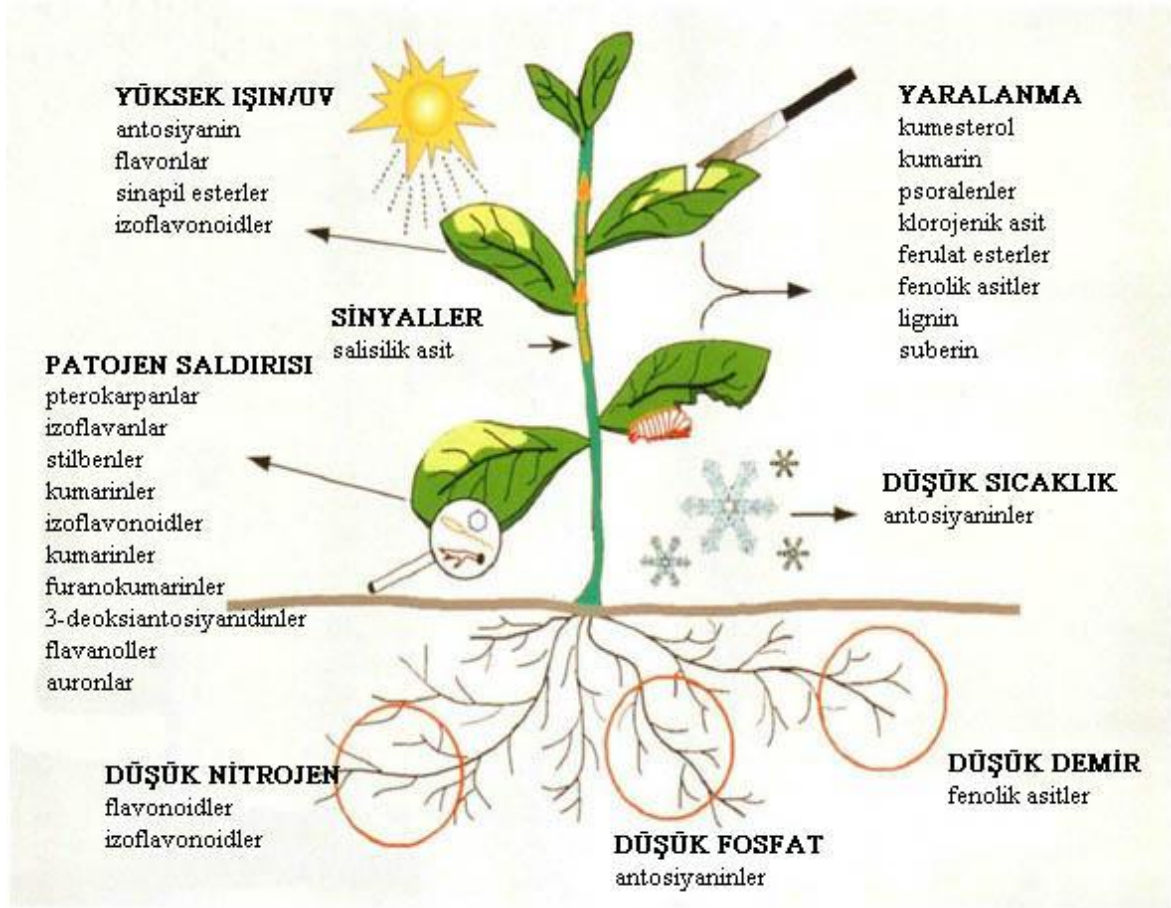
Biyotik faktörler ise viral, bakteriyel veya fungal patojenler, patojenlerden türemiş haberci moleküller ve aşırı olgunlaşma şeklinde görülür (Hermann, 2010).

En çok bilinen serbest radikaller; süperoksit (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri (ROS- Reactive Oxygen Species) ve nitrik oksit (NO) gibi reaktif nitrojen türleridir (RNS-Reactive Nitrogen Species). ROS mutlak redoks reaksiyonları, tamamlanmamış oksijen indirgenmesi ve mitokondriyal veya kloroplast elektron transfer zincirleri tarafından suyun oksidasyonu aracılığıyla oluşur (Hermann, 2010). Yine sitoplazmik ve plazma membran komponentlerinden oluşmuş süperoksit NADPH oksidaz kompleksi ve peroksidazın sentezlediği boşluklu H_2O_2 da ROS oluşumundan sorumlu tutulmaktadır (Gaspar vd., 2002).

Peroksidazın patojenlerin ölümüne direkt sebep olarak veya hastalığın etrafındaki konakçı hücrelere zarar vererek onların yayılımını engellediği öne sürülmektedir. Diğer taraftan peroksidazın bakteriyel veya spor gelişmesini ve patojenik fungi filizlenmesini de önlediği belirtilmektedir (Hermann, 2010). ROS lignifikasyon ve hücre duvarı stabilizasyonu için gerekli olan O_2^- ve H_2O_2 sağlayarak bitki savunmasını destekleyebilmektedir. Dahası, peroksidaz katalizli reaksiyonlar; hücre duvarı proteinlerinin, polifenollerin ve kütinin çapraz bağlanmasına yol açan serbest radikalleri oluşturmaktadır ve bununla birlikte patojenlere karşı daha iyi bir direnç oluşumunu destekler (Hermann, 2010). Belli sistemlerde, ROS ekstraselüler görev yaparak, bitkinin diğer kısımlarının da savunmasını tetikler (Gaspar vd., 2002).

ROS ve RNS, bitkinin normal organ fonksiyonlarının bir sonucu olarak düzenli olarak oluşmasına rağmen, aşırı oksidatif stres, organizmadaki prooksidanlar ve antioksidanlar arasında dengesizliğe yol açar. ROS, lipitler, proteinler ve nükleik asitler üzerindeki toksik etkileriyle birlikte oldukça yüksek reaktif maddeler olduklarından dolayı öncelikle hücreyi savunmak için üretilseler bile hücrede hasara yol açabilirler (Hermann, 2010).

Nitekim hücrelerin bu zarar verici ajanlara karşı hayatta kalma becerisi, detoksifikasyon mekanizmalarına karşı metabolik cevaplanabilirliğine bağlıdır. Bu mekanizmalar ROS ve RNS tarafından aktif edilirler ve ayrıca fenolik sekonder metabolizmayla ilişkili olanlar gibi nonenzimatik ve enzimatik antioksidanların üretimini de içerirler (Hermann, 2010).



Şekil 1.5. Stres nedenli fenilpropanoid örnekleri (Dixon, 1995).

1.3.1.2. Oksidatif Strese Karşı Polifenol Mekanizması

Hücredeki ROS ve RNS seviyelerindeki artış aralarında süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), monodehidroaskorbat redüktaz (MDAR), glutation redüktaz (GR) ve askorbat ve glutation gibi antioksidan metabolitlerin bulunduğu klasik antioksidan enzim aktivitesinin artışına neden olur. Buna ek olarak fenilpropanoid biosentetik metabolik yolu tarafından yönetilen fenolik bileşenlerin sentezinde de bir artış meydana gelir (Dixon, 1995).

Vaya ve Avirama (2001) göre dışsal stresörler üzerindeki bitki reaksiyonlarını açıklamak için iki temel mekanizma ön görülmüştür: Bir zincir-kırma mekanizması, birincil antioksidan, lipit radikali gibi sistemde var olan serbest radikallere bir elektron verir ve ilkinden daha stabil yeni bir radikal oluşur. Bu mekanizma, linoleik, linolenik ve araşidonik asitler gibi çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA- Polyunsaturated Fatty Acids) lipit peroksidasyonuna doğru giderse yer alır. Bu da ana olarak polifenoller veya askorbik asit gibi düşük moleküler ağırlıklı bileşenler tarafından yürütülür.

İkinci önerilen mekanizma ise sekonder antioksidanların zincir-başlatıcı katalistleri bastırıldığı yerde ROS/RNS başlatıcılarının ortadan kaldırılmasıyla açıklanmaktadır. Bu, tekli oksijen gibi yüksek enerjili türlerin deaktivasyonu, UV ışınlarının absorpsiyonu, oksijen süpürülmesi yani oksijen konsantrasyonunda azalma, serbest radikal reaksiyonu katalizleyen metal şelatlaşması veya NADPH oksidaz, ksantin oksidaz, dopamin-hidrolaz veya lipoksigenaz gibi peroksidazların inhibisyonu sırasında yer alır. Sekonder antioksidanlar ana olarak yüksek moleküler ağırlıklı proteinleri içerseler de polifenoller gibi bazı düşük moleküler ağırlıklı bileşenler, primer antioksidanların fonksiyonlarına ek olarak transisyonel metal iyonlarını şelatlayabilirler ve böylece serbest radikal oluşumunu engellerler (Vaya ve Aviram, 2001).

1.4. BİTKİ DOKU KÜLTÜRLERİNDE VURGULU ELEKTRİK ALAN UYGULAMASI

Vurgulu elektrik alan (Pulsed Electric Field – PEF), ısıtma işlemlerinin yerini alabilecek veya ısıtma işlemleriyle kombine kullanılan bir uygulama olup, gıdalarda duyu özelliklerinde değişim, besin değerinde azalma gibi olumsuzluklar meydana getirmeden gıda

sterilizasyonu, sekonder metabolit üretimi gibi uygulamalarda kullanılan bir yöntemdir (Gueven ve Knorr, 2011; Özcan ve Kurtuldu, 2011).

PEF teknolojisi iki elektrod arasına konulan akışkan gıdanın yüksek voltaj elektrik alanına (20-80 kV/cm) maruz bırakılmasını kapsar (Evrendilek vd., 2004; Karadağ vd., 2008). Ortama verilen yüksek voltajlı elektrik akımı sıvı gıdada bulunan ve elektrik akımı taşıyıcı iyonların konsantrasyonuna bağlı olarak gıdaya geçmektedir (Hitit, 2011). PEF uygulamasının gıdalardaki enzim ve mikroorganizma konsantrasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir (Evrendilek vd., 2004). PEF uygulaması sonucunda mikroorganizmadaki hücre organelleri çatlamakta, hücre içeriği azalmakta, bunun sonucunda da hücrenin temel fonksiyonları yavaşlayarak, inaktivasyonu sağlanmaktadır (Kavas vd., 2007).

Gıdalarda PEF uygulamalarıyla mikroorganizma inaktivasyonunun, enzim çalışmasının başarılı olması için seçilen gıdanın çeşidi, uygulanan yöntem ve mikrobiyel faktörler önem arz etmektedir (Toepfl, 2006).

PEF uygulaması, oda sıcaklığına yakın sıcaklıklarda uygulandığından düşük enerji kullanımı gibi avantajı bulunmaktadır. Ayrıca iletken maddelerle çalışma zorluğu, üretim ortamında elektriksel sızdırmazlığın sağlanması gibi güvenlik önlemlerinin bulunması zorunluluğu bu teknolojide dezavantaj yaratmaktadır (Özcan ve Kurtuldu, 2011).

1.4.1. Tarihsel Gelişimi

Elektrik akımının biyolojik hücreler üzerindeki etkileri elektriğin ticari kullanımından kısa bir süre sonra ilk olarak araştırılmıştır. Direk ve değişen elektrik akımın bakterisidal etkileri ile ilgili en eski yayınlar onsekizinci yüzyılın sonlarında (Prochownik ve Spaeth, 1890; Thiele ve Wolf, 1899) ortaya çıkmıştır (Hermann, 2010).

“Elektropor” olarak adlandırılan proses 1920’lerde Avrupa ve Amerika’da süt üzerine 220 ve 420 V arasında değişen akım uygulanmasıyla hayata geçirilmiştir (Beattie ve Lewis, 1925; Fettermann, 1928).

Gıda materyalleriyle hücre bozulmasına yönelik vurgulu elektrik alan (PEF-Pulsed Electric Field) uygulaması faz ayrılmasının iyileştirilmesi için ilk olarak Doevenspeck tarafından tanımlanmış ve patent almıştır (Doevenspeck, 1960; 1961). Sale ve Hamilton (1967) tarafından yapılan daha sonraki araştırmalarda mikroorganizmalar üzerine PEF’in non-termal öldürücü etkisi incelenmiştir (Sale ve Hamilton, 1967). Bununla birlikte meyve

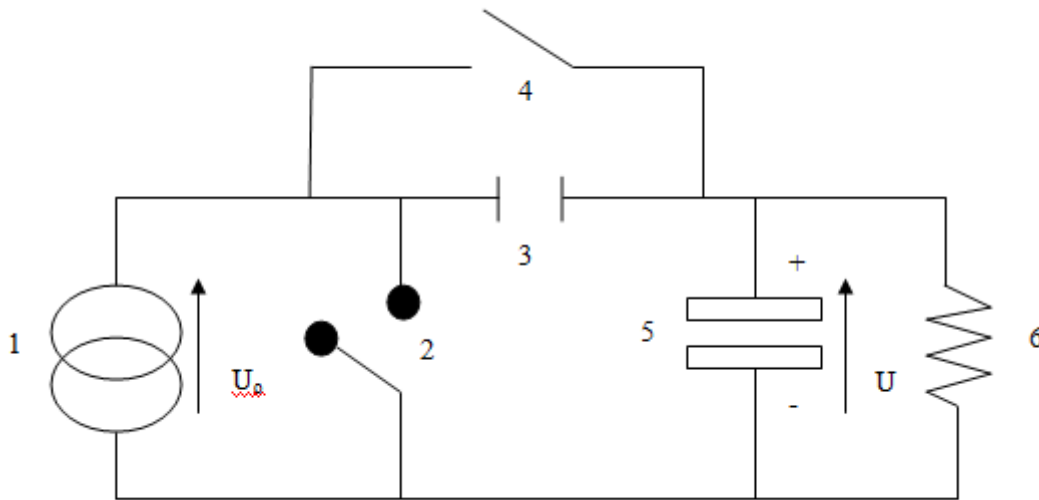
ve bitkilerin elektoplazmolizi üzerine bazı tekil uygulamaları (Flaumenbaum, 1968), sıvı yumurtaların pastörizasyonu ve 1980'lerin başında meyve ürünlerinin prosesi dışında PEF uygulamalarına verilen önem zayıf kalmıştır. 1980'lerin sonlarında Krupp Maschinenteknik Elcrack® ve Elsteril® olarak adlandırılan iki prosesi uygulamaya koyunca tekrardan hayata dönmüştür. Elcrack® prosesi hayvan hücrelerinden yağ geri kazanımını iyileştirilmesini amaçlarken Elsteril® prosesi pompalanabilir gıdalarda mikrobiyel inaktivasyon kazanımına yönelik dizayn edilmiştir (Krupp, 1988). Bundan itibaren gıda teknolojisinde PEF uygulamaları kesintisiz bir şekilde artmıştır.

1.4.2. Vurgulu Elektrik Alan Ekipmanları

PEF sistemi temel olarak 3 kısımda incelenebilir:

- Vurgu oluşturan sistem: Yüksek voltaj DC (Direct Current) jeneratörü, bir veya birden fazla paralel bağlı kapasitör ve bir yüksek voltaj anahtarı (Şekil 1.6)
- İşlem odacıkları
- Osiloskop (Barsotti vd., 1999)

1.4.2.1. PEF Sistemi



Şekil 1.6. Üssel azalan vurguların üretimi için kullanılan bir PEF sistemi 1- yüksek voltaj jeneratörü, 2- yüksek voltaj anahtarı, 3- kapasitör, 4- güvenlik anahtarı, 5- paralel plaka elektrotları ile işlem odacığı, 6- kapasitör şarj indüktansı (Barsotti vd., 1999)

Şekil 1.6'daki 1 numara ile gösterilen yüksek voltaj DC jeneratörü elektrik gücünü düşük voltajlı seviyeden yüksek yoğunluklu voltaja dönüştürür. Bunun için 3 numara ile

gösterilen kapasitörlerde depo edilen düşük seviyeli voltaj yüksek seviyeli voltaja çevrilip elektrik akımı üretilir. Bu enerji, 2 numara ile gösterilen yüksek voltaj anahtarı kapatılır kapatılmaz anahtar üzerinden devreye ve tabii ki uygulama odacığına (5 numara) geçmelidir (Barsotti vd., 1999).

1.4.2.2. İşlem Odacıkları

İşlem odacıkları sürekli veya kesintili sistemlere göre dizayn edilebilir. Gıda materyallerinin elektrik akımına maruz kaldığı bu odacıklar seri halde bağlı olan en az iki elektrottan oluşur. Farklı geometrik konfigürasyonlardaki yalıtım materyalleri ile ayrılan bu elektrotlardan biri yüksek voltaj üzerindeyken diğeri ise topraklama potansiyelindedir. Laboratuvar ölçümleri için manuel ayarlanabilir kesikli sistemler uygun olmakla birlikte küçük miktarlarda materyale ihtiyaç duyulması, sıcaklığın kolaylıkla kontrol edilebilmesi gibi avantajlar sağlamaktadır. Ayrıca homojen bir elektrik alan yarattığı için paralel plakalar kesikli sistemlerde tercih edilir (Hermann, 2010; Toepfl, 2006). Fabrika ölçüsünde ise ekonomik ve etkili uygulama yapılabilmesi için elektrik alana maruz kalırken gıdanın pompalandığı doğrultuda yüksek akış hızlı kapasiteye sahip sürekli bir sisteme ihtiyaç vardır. İşlem odacıkları otoklavlanabilir olmalıdır ve genelde de yalıtkanlarla ayrılmış içbükey silindirik elektrotlar içeren ko-lineer elektrot konfigürasyonu seçilmektedir (Hermann, 2010). Elektrot yerleşimi ve ortam iletkenliğinin yanı sıra işlem odacığının geometrisi toplam direnç üzerinde büyük bir etkiye sahiptir ve homojen elektrik alan dağılımını sağlayacak şekilde en avantajlı yol dizayn edilmelidir (Toepfl, 2006).

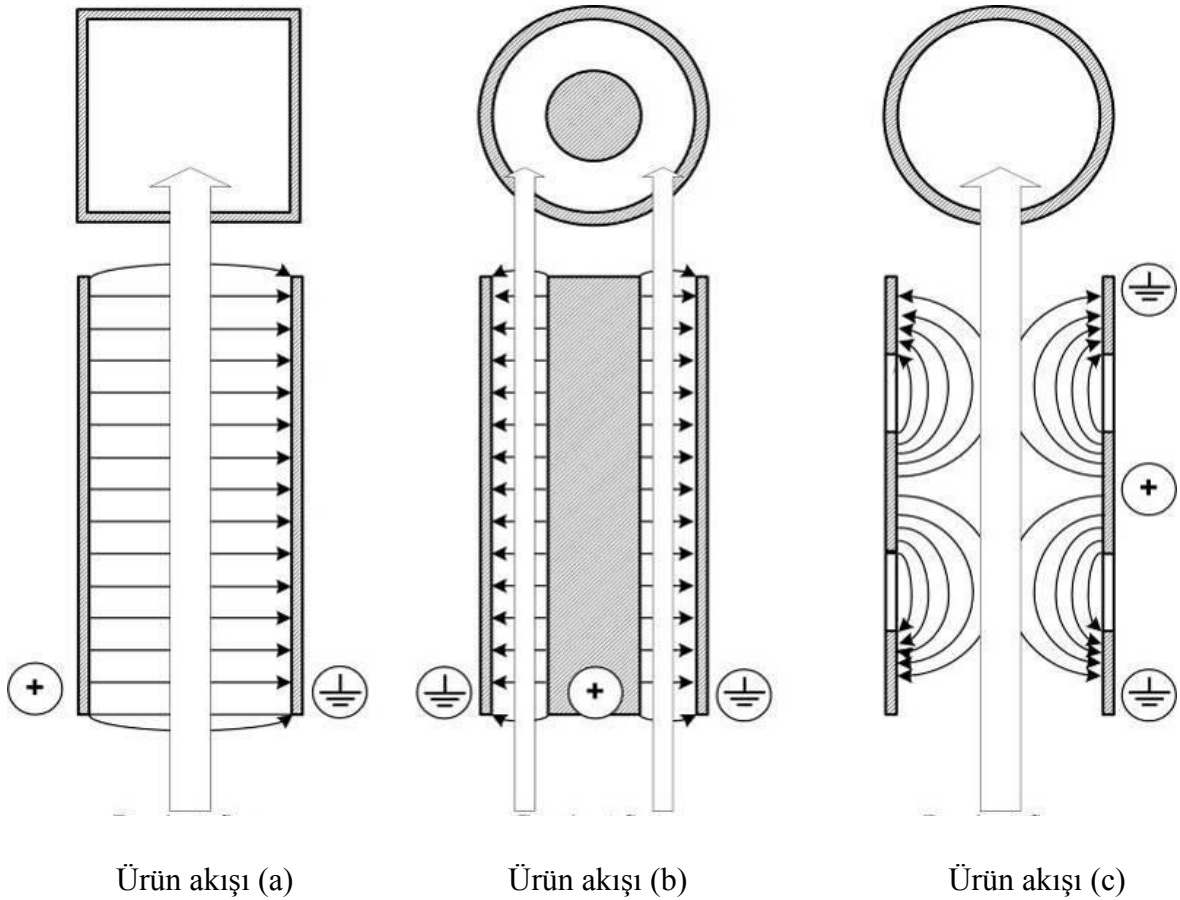
Elektrotlar genelde karbon veya metalden yapılmaktadır ve sıvı gıda örneğiyle direkt temas halinde olmalıdırlar. Dizayn ve düzenlemelerine bağlı olarak farklı elektrik alan türleri yaratırlar. Şekil 1,7'de gösterildiği üzere sürekli PEF sistemlerinde kullanılan farklı konfigürasyonlar; paralel plakalar, koaksiyel ve ko-lineer silindirlerdir (Toepfl, 2006).

Paralel plaka elektrot konfigürasyonu homojen elektrik alan dağılımı sağlar ve böylece ürün akışında en eşit uygulamayı sağlar (Toepfl, 2006). Yalnız paralel plakaların dezavantajı endüstriyel alana uyum sağlayamamasının nedeni olan düşük odacık direnci ve odacığın sınır bölgelerinde elektrik uygulama yoğunluğunun düşmesidir (Hermann, 2010; Toepfl, 2006).

Koaksiyel konfigürasyonda elektrotlar silindiriktir. Yüksek voltaj elektrodu içsel silindir oluştururken toprak elektrodu dışsal silindir oluşturur. Elektrik potansiyeli merkez

elektrottan dışakine yükselen bir şekilde dağıldığı için odacığın içindeki elektrik alan dağılımı homojen değildir. Fakat elektrik alan kuvvetinin lokal pikleri minimize edilmiştir ve dolayısıyla hiçbir lokal aşırı ısınma meydana gelmez. Bu türdeki odacıklar düşük dirence sahip olmalarına rağmen genelde düşük viskoziteli sıvı gıdalarda ve sürekli sistemlerde kullanılırlar (Barsotti vd., 1999).

Ko-lineer işlem odacığı türleri ise iki yalıtkan tüpün çevrelediği yüksek voltaj elektrot tüpünün merkezde olduğu üç elektrot tüpünden ve iki yalıtkan tüpten oluşur. Her iki tarafın bitiminde topraklayıcı elektrot yer alır. Bu konfigürasyon tipi yüksek voltaj elektrodu tamamen yalıtkanlarla çevrildiği için güvenli bir çalışma alanı sağlar. Bu tip odacıkların elektrik alan kuvveti dağılımı yalıtkanların geometrisine bağlıdır. Bunlar homojen değildirler ve bu yüzden aynı pozisyondaki sıcaklık piklerine yol açan elektrik alan kuvveti sıcak noktaları oluşabilir. Bununla birlikte en büyük avantajı ise yüksek odacık direnciyle sonuçlanan küçük etkili elektrot yüzey alanlarının var olması ve böylece tüplerin çaplarının endüstriyel ölçüde uygulanabilir boyutlara arttırılma olanağı sağlanır (Hermann, 2010).



Şekil 1.7. Sürekli uygulama için işlem odacıklarının konfigürasyonları; (a) paralel plaka, (b) koaksiyel ve (c) ko-lineer (Toepfl, 2006)

1.4.2.2. Osiloskop

Elektrotlar arasındaki voltajı ölçen ve vurgu şeklini gösteren osiloskop, PEF sistemine sonradan dahil edilebilir. Yalnız osiloskopun elektrotlardan geçen akımı ölçebilmesi için düşük değerde bir direnç uygulama odacığı ile birlikte serilere konulması gerekir.

1.4.3. Vurgulu Elektrik Alan Prosesi Parametreleri

Vurgulu elektrik alan prosesi farklı proses parametrelerinden etkilenmektedir. Bunların arasında en önemlileri; elektrik alan şiddeti, spesifik enerji girdisi, uygulama sıcaklığı ve vurgu şekli ve şiddetidir.

1.4.3.1. Elektrik Alan Şiddeti

Elektrik alan şiddeti (E) iki nokta arasındaki uzaklığa (d) karşılık elektrik potansiyeli (U) olarak tanımlanmaktadır. Paralel plaka elektrotları olduğu durumda elektrik alan şiddeti aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmaktadır:

$$E = U_{tc} / d \quad (1.1)$$

U_{tc} 'nin işlem odacığındaki elektrik potansiyeli olduğu yerde d elektrotlararası aralığı ifade etmektedir. Eğer kritik elektrik alan şiddeti var ise elektriksel iletken ortamdaki askıda olan hücrelerin transmembran potansiyelini aşar ve pore oluşumu meydana gelir. Birçok gıda örneği için materyallerin dielektrik şiddetinin artışı 60 ile 80 kV/cm arasında sınırlandırılması yerde alan şiddeti yükseldiği zaman bunu hücre bozulmasının artışı takip eder (Toepfl, 2006).

1.4.3.2. Spesifik Enerji Girdisi

Spesifik enerji girdisi (W_{spec}) işlem gören örneğin kilogram başına elektrik enerji girdisini karakterize eder. Gıdada dağılan kapasitörlerde depolanmış enerji miktarına eşittir ve aşağıdaki eşitlikle gösterilir:

$$W_{spec} = (W_{pulse} * n) / m \quad (1.2)$$

W_{pulse} vurgu başına enerjiyi ifade ederken n , vurgu sayısı ve m ise örnek kütlelerdir. Vurgu başına enerji girdisi ise şu şekilde ifade edilir:

$$W_{\text{pulse}} = \frac{1}{2} * U^2 * C \quad (1.3)$$

U^2 voltaj şarjını gösterir ve C de kapasitörlerde depolanan kapasiteyi işaret eder. Spesifik enerji girdisi enerji tüketimine eşittir. Böylelikle geleneksel yöntemlerle PEF uygulamasını kıyaslamak için kullanışlı bir değerdir (Hermann, 2010).

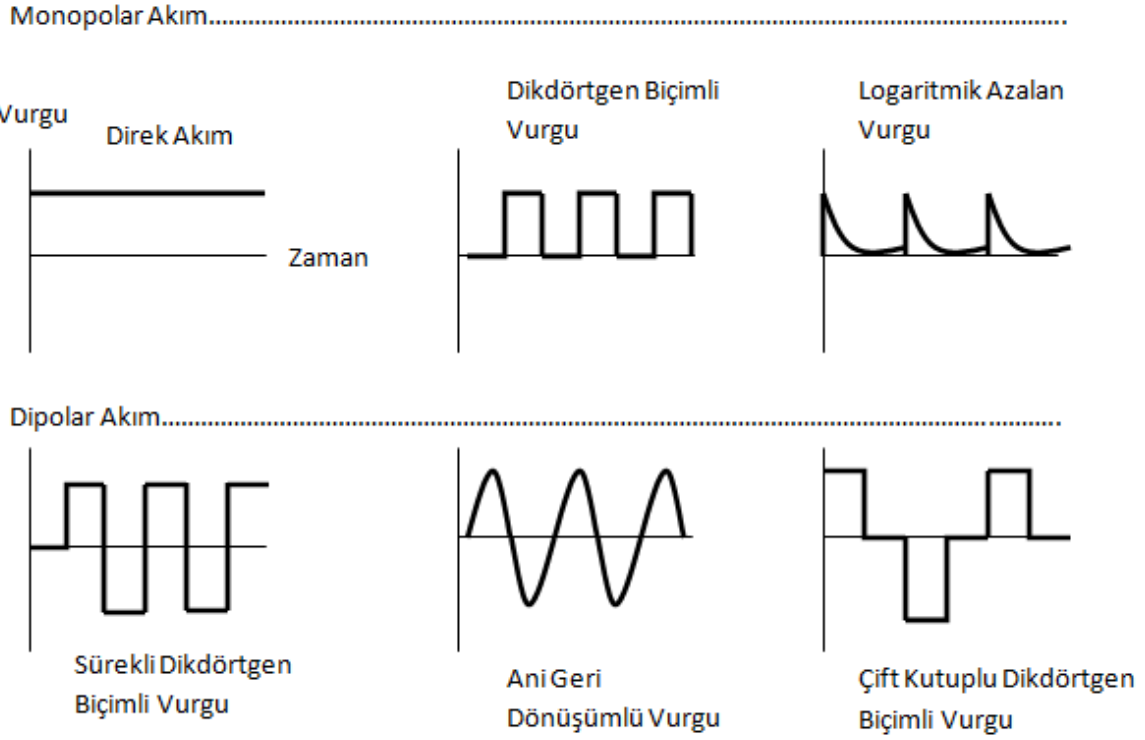
1.4.3.3. Vurgu Şekli ve Şiddeti

Vurgu şekli genelde vurgu modülatörünün yapısına bağlıdır ve en çok logaritmik azalan, kare şeklinde olmakla birlikte titreşimli ve ani geri dönüşümlü dalga modelleri de kullanılmaktadır.

Logaritmik azalan vurgu sırasında, voltaj pik yakalayana kadar çabucak artar ve sıfır seviyesine yavaşça iner (Hermann, 2010).

Kare dalga vurgu sırasında, voltaj hızlı bir şekilde artar ve biranda sıfıra inene kadar belirli bir period boyunca maksimumda kalır (Hermann, 2010).

Vurgular monopolar (tek kutuplu) ve bipolar (çift kutuplu) olarak uygulanabilmektedir. Monopolar dalga formları sabit, dörtgensel, logaritmik veya karışık dalga şekillerine sahipken bipolar dalga formları sinüzoidal, üçgensel, yamuksal, sürekli, kesikli üçgensel veya kesikli logaritmiktir (Şekil 1.8). Bipolar vurgular ve çok kısa süreli vurgular kullanmanın avantajı istenmeyen elektrokimyasal reaksiyonların ve elektrot aşınma miktarını azaltmasıdır. Bununla birlikte PEF uygulamasında kullanılan dalga formları çoğunlukla logaritmik azalan veya kare dalga vurgularının üretilmesi zor olmasına rağmen yine de kare dalgadır (Hermann, 2010).



Şekil 1.8. PEF sisteminde uygulanan bazı vurgu modelleri (Altuntaş, 2007; Ngadi, 2003).

1.4.3.4. Uygulama Sıcaklığı

Uygulama sıcaklığı akışkanlık ve hücre membranları stabilitesi üzerinde çok önemli bir etkiye sahiptir. Düşük sıcaklıklarda membranların fosfolipid bilayeri jel yapısı gösterirken artan sıcaklıklar, yapının elastik özelliklerinin iyileşmesi ve yüksek membran akışkanlığının eşlik etmesiyle sıvı bir kristal durum göstermesine sebep olur. Bu durumda pore oluşumu kolaylıkla meydana geldiğinden PEF-uygulamaları yükseltilmiş sıcaklıklarda daha etkilidir (Hermann, 2010).

1.4.4. Ürün Parametreleri

PEF uygulamasının etkileyen en önemli ürün parametresi dirençle ters orantılı olan elektrik iletkenliğidir. Eğer iletkenlik minimum olursa biyolojik hücrelerin elektroporasyonu iyileştirilir. Dahası iletkenlik ortamın sıcaklığı ile lineer orantılı olduğu için yüksek iletkenlik non-termal prosesin olabilirliğini sınırlar (Hermann, 2010).

Çok az gıda örneği baloncuk ve partikül bulundurmeyen saf sıvı haldedir, büyük çoğunluğu bulundurduğu katı partiküllere bağlı olarak heterojen iletken çoklu-aşamalı sistemlere sahiptirler. Bu örnekler yüksek bir dirence sahiptirler ve yüksek bir iletkenlik sağlayan sıvı ortama yayılmışlardır. Bu durumda eğer akım partiküllerden etkilenmeden doğrudan sıvı üzerinden geçerse PEF etkisinin sonuçlarını ciddi bir şekilde düşürür (Toepfl,

2006). Ayrıca gıda örneklerinin deaerasyonu baloncuklar içerir ve gaz fazları bu aşamalarda elektrik alanı iyileştirdiği ve sıklıkla delektrik kırılmasına yol açtığı için dikkate alınmalıdır (Barsotti vd., 1999).

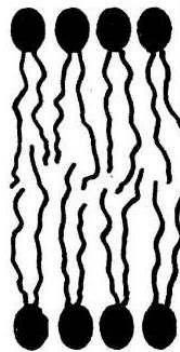
1.4.5. Vurgulu Elektrik Alan Uygulamasının Biyolojik Membranlar Üzerine Etkisi

PEF'in aktif kuralı biyolojik membranlar üzerindeki etkisine dayanmaktadır. Hücre membranındaki hasar derecesine bağlı olarak bu etkinin dönüşümlü veya dönüşümsüz olduğu belirlenir.

1.4.5.1. Bitki Membran Yapısı

Hücre membranı hücreyi dış çevreden ayıran seçici geçirgen canlı yapıdır. Genelde kalınlığı 60 ile 100 angstrom arasındadır (Green vd., 1973). Sitoplazmayı çevreleyerek hücreye şekil verir ve dağılmasını engellerken madde alış verişini de düzenler. Ayrıca ozmotik dengenin düzenlenmesinde görev alır. Bununla birlikte salgı ve enzimleri taşıyıcı görevi vardır. Uyarı iletimi yapar ve hücrelerin birbirlerini tanımalarını sağlar.

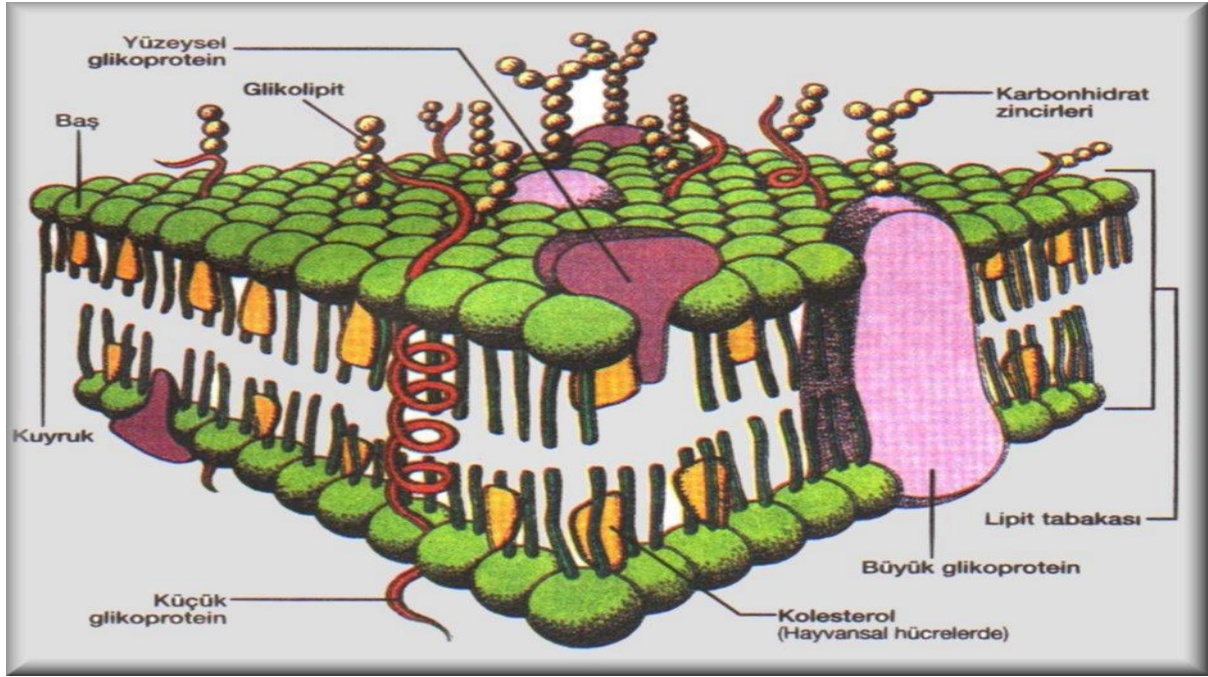
1972 yılında Singer ve Nicholson tarafından ortaya atılan akıcı mozaik zar modeli günümüzdeki en geçerli modeldir. Bu modele göre, zarın yapısında hareketli, iki sıra lipit tabakası bulunur. Zarın yapısına katılan lipitler çoğunlukla fosfolipitleridir. Çift katlı lipit tabakası zarın esas çatısını oluşturur. Çift katlı fosfolipit yapısında apolar yağ asit zincirleri suyla temas etmeyecek şekilde birbirilerine doğru yönelirler. Fosfolipid moleküllerinin polar ve iyonik baş grupları da suyla temas ederler (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Çift katlı fosfolipid yapısı şematik gösterimi (Singer, 1972)

Şekil 1.10'de görüldüğü üzere fosfolipit yapısına ek olarak protein moleküllerinin de bazıları fosfolipit tabakasının her iki tarafına yüzeysel olarak yerleşirken, bazıları lipid molekülleri arasına düzensiz bir şekilde gömülmüştür. Büyük proteinlerden bazıları zarına uzanarak dış ortam ve sitoplazma arasında por adı verilen yapılar oluşturur. Porlar

hücre zarından madde taşınmasında önemlidir. Lipit tabakası devamlı hareket halinde ve akıcı durumdadır. Ayrıca zardaki glikoz proteinlerle birleşerek glikoproteinleri; lipitlerle birleşerek de glikolipitleri oluşturur. Her hücrenin hücre zarı, yapısındaki moleküler dağılımın farklılığı nedeni ile kendine özgü özellikler taşır. Hücrenin özgülüğü de zardaki glikoprotein, lipoprotein, glikolipitlerin miktarına ve dağılımına bağlıdır.



Şekil 1.10. Hücre zarı akıcı mozaik zar modeli (Singer, 1972)

Hem hücrenin normal aktivitelerini sürdürmek hem de membran potansiyelini korumak için gereken membran proteinlerinin ana görevi membran içine entegre olmuş kanallardan taşınım aktivitelerini gerçekleştirmektir. Hareketsiz hücrelerin membran potansiyeli çoğu hücrede her zaman bulunan transmembran voltaj değeri olarak açıklanabilir. Hücre membranları 10 mV civarındaki membran potansiyelinin statik seviyelerini sürdürmelerine göre dizayn edilmişlerdir (Toepfl, 2006).

1.4.5.2. Hücre Membran Elektroporasyon Mekanizması

Biyolojik hücrelerin dış elektrik alana maruz kalmaları elektroporasyon diye adlandırılan hücre membranında bozulmaya sebep olur. Elektroporasyon mekanizması tam olarak anlaşılamamış olsa da bir çok teori ortaya atılmıştır (Barsotti vd., 1999) En çok kabul gören Zimmermann'ın teorisine göre biyolojik hücreler düşük elektrik iletkenlikli dielektrik materyal ile dolu olan kapasitör olarak görev yapar ve 2 civarında dielektrik sabitine sahiptir. Hem membran yüzeylerinin hem de çift katmanlı fosfolipit içi olmamak

üzere içsel ve dışsal zıt polarların serbest yükleri vardır (Zimmermann vd., 1974). İç ve dış hücre potansiyelin arasındaki fark başlangıç transmembran potansiyel farkını açıklar.

Elektriksel iletken ortamdaki yüzen bir hücre dış bir elektriksel alana maruz kalırsa yüklerin elektriksel alan boyunca hareket etmesiyle ek bir potansiyel oluşur. Bu da yüzey yüklerinin birikimine neden olur ve bu yüzden lokal transmembran potansiyelinde bir artış meydana gelir. Membranın çift tarafındaki yüklerin hareketinden dolayı oluşan zıt polaritenin yüklerinin çekimi membranda incelmeye neden olur. Membran incilmesi aracılığıyla boşluk ayrılması yüzünden elektriksel yükler azalır ve membranın iki tarafının arasında elektrostatik çekim artışı görülür (Barsotti vd., 1999).

Belli bir noktada elektrokompresyon elastik membran direncini baskın kılar ve por oluşumu ile birlikte lokal membran bozulması meydana gelir. Bu durum uyarılmış potansiyel örneğin kırmızı kan hücrelerinde 0.7 ile 1.1 kV miktarında olan kırılma potansiyelini (V_r) geçerse olur (Zimmermann vd., 1974).

V_r sıcaklığa bağlıdır membranlar yüksek sıcaklıklarda daha akışkan oldukları için mekanik direnç düşer ve sonuç olarak membran geçirgenliği için düşük bir potansiyel yeterli olur (Barsotti vd., 1999). Yapılan deneysel çalışmalar sonucu membran bozulması için gerekli elektrik alanının hücre büyüklüğü ile orantılı olduğu bulunmuştur (Angersbach vd., 2000).

1.4.5.3. Hidrofobik ve Hidrofilik Por Oluşumu- Dönüşümlü Elektriksel Bozulma

Por gelişimi farklı fazlarda meydana gelir: 1 μ s ile membran yüklenmesi kritik transmembran potansiyeline ulaşıldığı zaman gerçekleşir (Angersbach vd., 2000). Membran üzerindeki potansiyel fark lipit çift katmanında fosfolipid moleküllerinin pozisyonlarında yanlara doğru dalgalanmalara sebep olur. Kritik eşik değere ulaşıncaya bu dalgalanmalar spontane hidrofobik por oluşumuna yol açarlar (Glaser vd., 1988). Eğer bu por yarıçapları 0.3 ile 0.5 nm'ye büyürse lipit moleküllerinin tutumu değişir ve hidrofilik porlar oluşur. Membran iletkenliğinin sağlanmasındaki artıştan sorumlu olan 0.6'dan 1 nm'nin fazlasına kadarki yarıçap değerini hemen kazanırlar (Glaser vd., 1988). Başlangıç vurgusundan birkaç mikro saniye sonra membranın iletken safhası tamamlanır (Angersbach vd., 2000). Örneğin bitki hücreleri için membran bozunumunda gerekli alan şiddeti 0.7-2.2 V elektriksel potansiyelle yol açan 150 ile 200 V/cm arasında uzanmaktadır.

PEF-uygulamasından sonra por oluşumu tekrar eski haline dönüyorsa por oluşumunun etkisi dönüşümlüdür ve tekrar tekrar yapılabilir. Porların kapanması voltaj gevşetmesi sırasında hızla başlangıç fazına düşen örnek iletkenliğinin denetlenmesi ile analiz edilebilir (Angersbach vd., 2000). Dielektrik bozunumunun dönüşümlülüğü elektrik alan şiddeti, vurgu genişliği, vurgu süresi ve vurgular arası bekleme gibi vurgu protokolü ile yakından ilişkilir (Hermann, 2010).

1.4.5.4. Dönüşümsüz Elektriksel Bozulma

Eğer çok yüksek elektrik alan ve uzun uygulama süresi veya vurguların tekrarı uygulanırsa orijinal membran özellikleri yeniden oluşturulamaz ve porlar kalıcı olur. Sonuç olarak da hücre hasarı çok yüksek olur ve hücre ölümüne bile yol açabilir (Hermann, 2010).

Çeşitli hipotezler yapılması ile birlikte geniş uygulama koşulları uygulandığında porların hücre membranında neden kalıcı olduğu konusu tam olarak anlaşılamamış olsa da bunu takiben hücre ölümlerinin neden meydana geldiği konusunda farklı nedenler açıklanmıştır. İlk olarak porun kendisinin örneğin 1-4 s gibi geniş bir vurguda hızla membran üzerinde kalıcı bir boşluk bıraktığına inanılmıştır. Ardından bunu ikinci bir etki olarak liziz takip eder ve turgor kaybına ve hücre içi metabolit kaybına yol açar (Hermann, 2010). Dahası bitki hücrelerindeki kofuların geçirgenliği sağlanmış olur ve bu durum da hücre ölümlerini destekler (Hermann, 2010).

1.4.6. Vurgulu Elektrik Alanın Gıda Teknolojisi ve Biliminde Uygulamaları

Vurgulu elektrik alan uygulamaları gıda proseslerinde yararlı metotlara alternatifler yaratmakta veya onları iyileştirmekte büyük bir potansiyel sağlamaktadır. PEF uygulaması ve geniş spektrumlu uygulamalar arasındaki ilişkinin canlı hücre sistemlerine etkisi vurgu protokolüne sıkıca bağlıdır (Şekil 1.12). Burada uygulamanın alanını stres yanıtının nedeni, kütle taşınımının iyileştirilmesi ve mikrobiyel inaktivasyon olarak ayırmak mümkündür.

Tablo 1.2. Elektrik alan şiddeti ve enerji girdisi ihtiyacına göre gıda teknolojisinde elektrik alan uygulamaları (Hermann, 2010; Toepfl, 2006)

Elektrik alan şiddeti (kV/cm)	Toplam enerji girdisi (kJ/kg)	Uygulama alanı
0.1 – 1.5	0.01 - 5	Stres yanıt nedeni
0.7 – 3	1 - 20	Kütle taşınımının iyileştirilmesi
15 – 40	40 – 1000	Mikrobiyel inaktivasyon

Bitkiler rüzgar, yağmur, yaralanmalar gibi beklenmeyen koşullara maruz kaldıklarında savunma tepkisi şeklinde reaksiyon verirler (Hermann, 2010). Daha önce de değinildiği üzere bu tepki fenilpropanoid yolu ile yakından ilişkilidir ve antioksidan özellikleri olan ve hayli değerli gıda bileşenleri olan sekonder metabolit depolanmasını iyileştirir.

Normal koşullarda bu metabolitlerin birikimini doğal stresörler tetikler fakat uygun PEF uygulamasının da stres reaksiyonlarına ve böylece bitki sistemlerinde sekonder metabolit birikimine neden olduğuna dair kanıt bulunmaktadır (Dörnenburg ve Knorr, 1995). Örneğin üssel büyüme fazının erken dönemindeki *Taxus chinensis* süspansiyon kültürlerine 50 Hz, 10 V/m, 30 dak gibi uygun bir PEF uygulaması bir biyoaktif sekonder metabolit olan taxuuyunnanin C (Tc) seviyesinde % 30 artışa yol açmıştır (Ye vd., 2004). Yine soya fasulyeleri ve zeytinlere yapılan bir uygulama sadece yağ değil; ayrıca izoflavonoid bileşenlerinin de kazanımına yol açmıştır (Guderjan ve Knorr, 2005). Bu da PEF potansiyeli kullanılarak hücrelerin bioreaktörlerde yüksek konsantrasyonlu fonksiyonel bileşenler üretilebileceğine dair yeni proses konseptleri geliştirilebileceğini gösterir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Hermann (2010) *Vitis vinifera* bitki hücre kültürlerine 300, 350, 600 ve 1200 V/cm elektrik alan şiddetinde PEF uygulayarak stres yaratmayı amaçlamış ve 0, 2, 4, 24 ve 48 saat stres reaksiyon sürelerinde işlem görmemiş ve işlem görmüş bitki hücrelerinde polifenol oksidaz (PPO) ve peroksidaz (POD) enzimleri ile toplam fenol (TP) içeriğini incelemiştir. İşlem görmüş ve görmemiş hücre kültürleri kıyaslandığında işlem odacıklarına transferden ötürü oluşan mekanik stresin dışında PEF uygulaması ile tetiklenmiş stres reaksiyonlarının oluştuğu tespit edilmiştir. Genellikle enzim aktiviteleri artmasına rağmen polifenol içeriği 300 V/cm (uygulamadan 2 ve 4 saat sonra), 350 V/cm (uygulamadan hemen sonra), 600 V/cm (uygulamadan 24 saat sonra) şiddetinde PEF uygulamaları dışında bütün işlem görmüş ve görmemiş kültürlerde aynı veya işlem görmüş kültürlerin işlem görmemişlerden daha düşük olduğu saptanmıştır (Hermann, 2010).

300 V/cm şiddetinde PEF uygulanmış kültürlerde 2 saat sonra ve 350 V/cm şiddetinde PEF uygulanmış kültürlerde hemen (sıfırıncı saat) POD ve PPO aktivitesi ile birlikte TP seviyesinde de artış belirtilmiştir. Böylece yüksek elektrik şiddeti uygulamasının strese yanıt vermeyi tetiklediği görülmüştür. 600 V/cm şiddetinde PEF uygulanmış hücrelerde daha düşük şiddetlere göre çok daha güçlü bir stres reaksiyonu gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Burada PEF uygulamasının hemen ardından TP seviyesinin 24 saat sonrakine göre önemli bir biçimde yüksek olduğu belirtilmiştir. Bu da fenoliklerin PEF uygulaması yüzünden meydana gelen hasarı onarma ve ROS süpürülmesi için hücreler tarafından kullanıldığını göstermektedir (Hermann, 2010).

Kültüre alma yöntemi denemeler süresince hücre formunu iyileştirmiş ve 350, 600 ve 1200 V/cm şiddetindeki PEF uygulanmış alt kültürlerde stres direncine sebep olmuştur. Bu da 1200 V/cm şiddetinde PEF uygulanmış hücrelerde yüksek yoğunluğa rağmen dönüşümsüz olarak hasar görmemiş olmasına rağmen hücredeki bazı metabolik aktivitelerin nedenini açıklamaktadır (Hermann, 2010).

Cai vd. (2011) yaptığı çalışmaya göre PEF uygulaması ve etefon kombine olarak *Vitis vinifera L. cv.* üzerinde uygulanmış ve hücre kültüründe antosiyanin ve fenolik asit konsantrasyonlarında biyokütlede artış gözlenmiştir. Ayrıca ekstraselüler fenolik asitler, 3-O-glukosil-resveratrol üretim seviyelerinde kontrole göre yükselme saptanmıştır. PEF

uygulamasını ve etefonun kombine kullanımını sekonder metabolit üretimini arttırmıştır (Cai vd., 2011).

Gueven ve Knorr (2011) metil jasmonat eklenmesi, yüksek hidrostatik basınç ve PEF uygulamasının kesikli sistemde soya bitki kallus süspansiyon kültürü tarafından üretilen izoflavonoidlerin aglikon formları (Genistein ve Daidzein) ve β -glikozidik tipleri (Genistin ve Daidzin) üzerindeki etkisini incelemiştir. Besiyerine metil jasmonat eklenmesi izoflavonoid biyosentezini 5-6 kat arttırırken 7 günlük kültürde 1.6 kV şiddetinde PEF uygulanması izoflavonoid üretimini büyük oranda etkilemiştir. Uygulanan 1.6 ile 2.0 kV şiddetinde PEF işlemi geri dönüşümlü membran geçirgenliği sağlayarak izoflavonoid konsantrasyonlarında artış sağlarken daha yüksek voltaj uygulamalarının izoflavonoid konsantrasyonlarında azalmaya neden olduğu saptanmıştır (Gueven ve Knorr, 2011).

Dörnenburg ve Knorr (1993) *Chenopodium rubrum* ve *Morinda citrifolia* bitki hücre kültürlerine 0 ile 1.6 kV/cm şiddetinde ve 0 ile 30 vurgu PEF uygulanarak hücre geçirgenlikleri incelenmiştir. Çalışmaya göre *C. rubrum* kültürlerinde metabolit iyileşmesi ile birlikte büyük oranda hücre canlılığı yitilirken amaranthin pigmentlerinde artış gözlenmiş ve pigment salınımında elektrik alan şiddetini arttırmanın vurgu sayısını arttırmaktan daha etkili olduğu saptanmıştır. *M. citrifolia* hücre kültürlerinde de metabolit iyileşmesi ile birlikte 0.5 kV/cm şiddeti ve 3 vurgu sayısında hücre canlılığı yiterken pigment salınımında önemli bir artış gözlenmemiştir (Dörnenburg ve Knorr, 1993).

Guderjan vd. (2005) yaptıkları çalışmaya göre 1.3 kV/cm şiddetinde 50 ile 20 vurgu sayısında PEF uygulanmış soya bitkisindeki daidzein izoflavonoidi kontrole göre 20 % oranında artarken genistein de % 21 oranında artmıştır (Guderjan vd., 2005).

Janositz vd. (2011) 5 kV/cm şiddetinde ve 20 vurgu sayısındaki PEF uygulamasını *Asparagus officinalis* L. üzerinde uygulayarak kompozisyon ve tekstürdeki elektroporasyonun etkisini incelemiştir. PEF uygulamasının lignin ve kuru madde içeriğinde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Kompleks bir fenolik polimer olan ligninin azalması ise PEF uygulamasının tetikleme ile lignin-selüloz bağlarının bitkinin daha yumuşak yapı kazanması için delignifikasyona sebep olduğu düşünülmektedir (Janositz vd., 2011).

Balasa vd. (2006) üzüm bitkisinde 0.5 kV/cm şiddetinde 50 vurgu PEF uygulanmış örneklerde, kontrol örneğine kıyasla preslenmiş üzüm suyunda toplam fenol miktarında 13 % ve üzüm posasında 24 % artış gözlenmiştir. Üzüm örneklerine 2.4 kV/cm şiddetinde 20 vurgu PEF uygulanmış ve kontrol örneğine kıyasla preslenmiş üzüm suyunda 28 % ve posasında 14 % artış saptanmıştır (Balasa, 2006; Soliva-Fortuny vd., 2009).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Doku - Hücre Kültürü

Bitki hücre kültürü *Lycopersicon esculentum* (LE) (Şekil 3.1) kallus kültürü olarak Almanya, Berlin eyaletindeki Tarım ve Ormancılık Federal Biyolojik Araştırma Merkezinden ticari olarak elde edilmiştir. Kültürler 60 mL hücre süspansiyonu içeren 250 mL'lik erlenmayerlerde 25 °C'de sürekli bir ışık altında LE için hazırlanmış besiyerinde 100 rpm'deki orbital çalkalayıcıda muhafaza edilmiştir.

Kültüre alma boyunca hücre kültürleri her 14 günde bir inoküle edilmiştir.



Şekil 3.1. *Lycopersicon esculentum* bitki doku süspansiyon kültürü, sol: sıvı besiyerinde, sağ: vakum filtreden geçirilmiş.

3.1.2. Besiyeri

Lycopersicon esculentum besiyeri ortamı 1 mL/L Fe-EDTA, 2.5 mL/L 2,4-diklorofenoksiasetik asit(2,4 D), 0.9 mL/L kinetin, 10 µL/L naphtylasetik asit (NAA), 40 g/L sukroz ile desteklenmiştir.

3.1.3. Kimyasallar

3.1.3.1. Enzim Ekstraksiyonu

- Fosfat tamponu (0.1 M, pH 6.5): 13.609 g potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4 ; Merck No: 104873) 800 mL distile suda çözülür ve pH 0.1 N NaOH ile 6.5'a ayarlanır ve yine distile su ile 1000 mL'ye tamamlanır ve 4 °C'de karanlıkta muhafaza edilir.

3.1.3.2. Fenilalanin Amonyum Liyaz (PAL) Enzim Aktivitesi Analizi

- Borik asit – borat tamponu (100 mL pH 8.8): 60.7 mL 0.05 M borat solüsyonu ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$; Merck No: 0024611) ile 39.3 mL borik asit çözeltisi (H_3BO_3 ; Merck No: 1.00165.0100 ve 0.05 M NaCl; J.T. Baker B.V.-Deventer No: 7647-14-6 0278) karıştırılır ve karanlıkta muhafaza edilir.

- L- fenilalanin (0.1 M): 0.1652 g fenilalanin (Roth No: 17092) 10 mL borik asit-borat tamponu içinde çözündürülür ve substrat olarak kullanılmak üzere karanlıkta muhafaza edilir.

3.1.3.3. Toplam Polifenol Tayini – Gallik Asit Kalibrasyon Eğrisi

- Bligh & Dyer Çözeltisi (Metanol: kloroform: distile su = 10: 5: 4 V/V)

-Metanol: CH_4O ; VWR (BDH-prolabo) No: UN 1230

-Kloroform: CHCl_3 ; Merck No: 1.02445.2500

-Folin Ciocalteu reaktifi: Sigma- Aldrich No: F9252

-Sodyum karbonat çözeltisi: (Na_2CO_3) 200g susuz Na_2CO_3 800 mL distile suda kaynama noktasına gelene kadar çözülür. Soğuttuktan sonra birkaç Na_2CO_3 kristali eklenir ve 24 saat bekledikten sonra çözelti filtre edilir ve distile su ile filtrat 1000 mL 'ye tamamlanır.

- Gallik Asit: (3,4,5- Trihidrobenzoic asit; Sigma No: G 7384) 0.250 g gallik asit % 96'lık 5 mL etanol ile çözündürülür ve distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.

-Etanol (%96'lık): Carl Roth No: K928.1

3.1.3.4. Canlılık Testi (TTC)

- TTC Çözeltisi: 0.75 g TTC (2,3,5 Trifeniltetrasodyumklorit; Merck No: 1.08380) alüminyum ile kaplanmış erlen içinde sodyum fosfat tamponu (TTC tamponu: %0.1 0.066 M NaH_2PO_4 pH 7.7) ile çözündürülür ve balon jöjeye aktarılarak TTC tamponu ile 250 mL'ye tamamlanır. Kahverengi cam şişelerde buzdolabında saklanır.

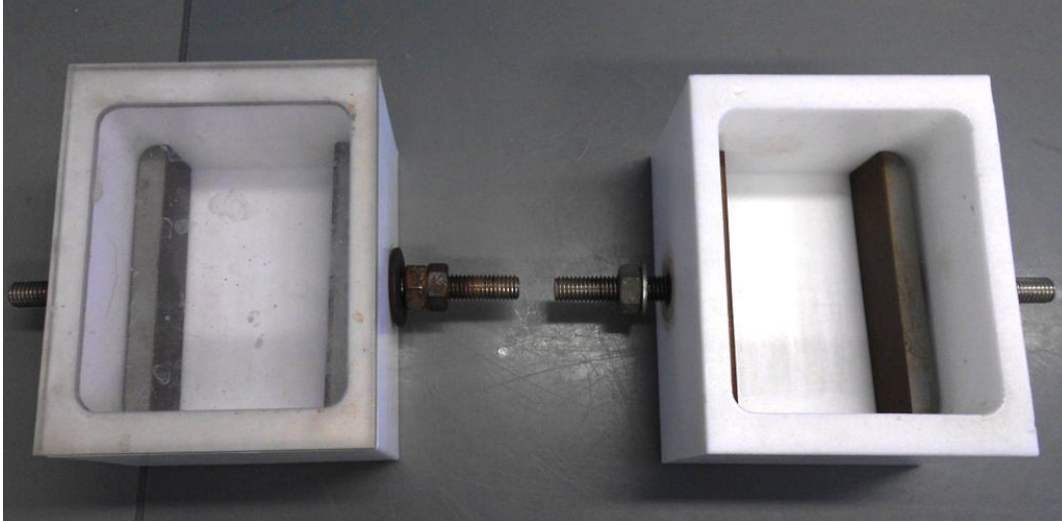
- Sodyum fosfat tampon çözeltisi (TTC Tampon Çözeltisi): Na_2HPO_4 (Merck No: 6580), KH_2PO_4 (Merck No: 1.04873),

- Etanol (%96'lık): Carl Roth No: K928.1

3.1.4. Ekipmanlar

3.1.4.1. Vurgulu Elektrik Alan Aparatları

- İşlem odacıkları: Steril koşullar altında çalışmak için propilenden yapılmıştır. TUB'de dizayn edilmiş olup Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e.V.'de yapılmıştır (Şekil 3.2) (Toepfl, 2006).



Şekil 3.2. PEF İşlem Odacıkları (Toepfl, 2006).

- Elektrotlar; paslanmaz çelikten yapılmıştır.

- Plakalar; BEHLKE

- Kapasitörler; HCK-800-M-20 000 (FUG Rosenheim, Almanya) tarafından kontrol edilmiştir.

- Osiloskop; Tetronix TDS 220
- Jeneratör; Sony tektronix AFG 320 (Arbitrary Function Generatory)
- Akım Prob Amplifikatör; Tektronix AM 503 B
- Kabin; Certomat ® HK

3.1.4.2. Kimyasal Analizler ve Hücre Doku Kültürünün Gelişmesi için Kullanılan Ekipmanlar

- Buz Cihazı; CMM
- Cam Malzemeler; Schott Duran, SIMAX
- Cam Tüpler ve Kapakları; Schott GL 18
- Desikatör; Lenz- DIN- NS2429, Schott-24/29
- Etüv; Heraeus Instruments D-63450 UT6060, 300°C, IP 20, 1 N/PE, 50 Hz, 230 V, 7.1 A, 1.64 kW
- Filtre Kağıdı; Whatman 589/2 no: 10 300 107
- Hassas Teraziler; Scaltec- SBA 31, Sartorius-handy H120
- İletkenlik Ölçer; WTW Cond 3110 SET 1 2CA101
- Küvetler; Carl- Roth RatioLabo® , VWR
- Liyofilizatör; CT2 Leybold- Heraeus
- Liyofilizatör Pompası; qerlikon leyboldvacuum TRIVAC
- Manyetik Karıştırıcı; Janke & Kungel IKA- Labortechnik RCT IKAMAG® 335613
- Mikro Test Tüpleri; eppendorf 1.5 mL ve 2.0 mL
- Orbital çalkalayıcı; Certomat HK, B. Braun Melsungen AG (Almanya), model kodu: 886352/0, 220V, 50 Hz, 550 W, 2.5 A, 40-440 rpm
- Otoklav; HMC HV50L

- Petri kapları; Greiner
- pH elektrot; Sen Tix HW
- pH-metre; Victor Recker- Knick Dijital pH-metre
- Pipetler; Labmate Abimed 1-10 μL ; 2-20 μL ; 10-100 μL ; 10-1000 μL ; 100-1000 μL , Eppendorf 50-250 μL ; 100-1000 μL ; 500-2500 μL
- Sıcak Su Banyoları; GFL 10626634e, Haake W26
- Santrifüjler; Thermo Scientific Megafuge 1.0 R, Eppendorf Centrifuge 5804R, Sorvall RC5B
- Spektrofotometre; PerkinElmer Lambda 25 UV/VIS
- Steril Kabin; Heraeus- LaminAir TL 2472, Thermo Electron Corporation tarafından kontrollü
- Ultra-turrax; Janke&Kunkel IKA® Labortechnik
- Vakum Aparatı; GAM
- Vakum Erlenii; Schott/Duran
- Vakum Filtrasyon Aparatı; Schlecher&Schuell
- Vakum Pompası; AEG AMEB 90 SY 4R3
- Vorteksler; Janke&Kunkel IKA® Labortechnik VF2, IKA® MS2 Minishaker, Eppendorf Mixer 5432

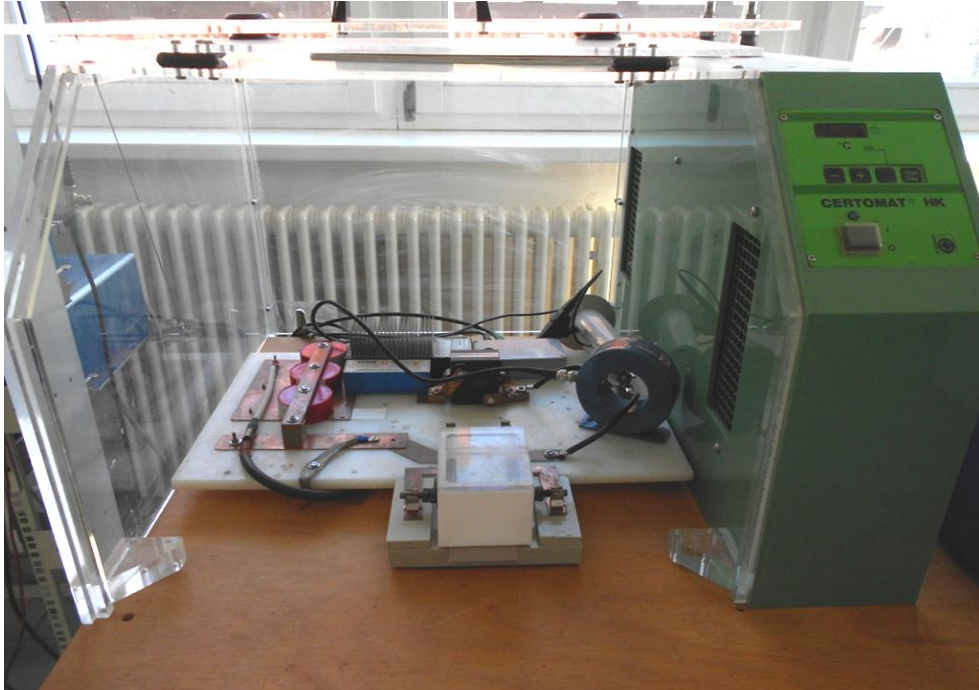
3.2. Yöntem

3.2.1. *Lycopersicon esculentum* (LE) Büyüme Eğrisi Oluşturma

Kültürlerin inokülasyon yapıldıktan sonra depolama süresi boyunca 0, 3, 6, 9, 11, 13, 15 ve 17. günlerdeki kuru madde, pH ve iletkenlik, fenilalanin amonyum liyaz enzim aktivitesi, kültür ve besiyerindeki toplam fenol miktarı ve canlılık testi ölçümleri yapılarak LE büyüme eğrisi oluşturulmuştur.

3.2.2. Vurgulu Elektrik Alan Uygulaması

Vurgulu elektrik alan uygulaması LE büyüme eğrisi baz alınarak kültür inokülasyonunun altıncı gününde steril koşullar altında otoklavlanarak sterilize edilmiş işlem odacıkları kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3.). İkinci alt kültür ilk inokülasyondan 14 gün sonra gerçekleştirilmiş ve aynı işlemler ikinci alt kültür için de gerçekleştirilmiştir. Kontaminasyondan kaçınmak için erlenmayerlerde bulunan hücre kültür örneklerinin işlem odacıklarına doldurma ve boşaltma işlemleri steril kabinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. Laboratuvar tipi vurgulu elektrik alan sistemi

Uygulama planı design expert 7.0® programına göre central composite design (CCD) esas alınarak yapılmış olup üssel azalan vurgu şekli tüm uygulamalarda kullanılmış ve

analizlerdeki her ölçüm üç tekrar şeklinde yapılmıştır (Tablo 3.1). İşleme alınan bu örneklere ek olarak üçer örnek de PEF uygulanmayan kontrol grubu için kullanılmıştır. Bu kontrol örneklerine PEF uygulanan örneklerde transfer sırasında oluşabilecek hücrel stresin aynısını oluşturmak için aynı şekilde steril kabinde erlenmayerden işlem odacığına transfer edilmiş ve tekrar geri erlenmayere alınmıştır. Sonuçta PEF uygulanmış ve uygulanmamış kültürler aynı yolla analiz edilmiştir.

Tablo 3.1. PEF uygulama planı. SRS; Stres Reaksiyon Süresi, VEAŞ: Vurgulu Elektrik Alan Şiddeti, VS: Vurgu Sayısı, x; bir tane işleme alınan örnek

SRS(saat)		0			4			96		
VEAŞ(V/cm)		600	900	1200	600	900	1200	600	900	1200
VS	1	xxx		xxx	xxx		xxx	Xxx		xxx
	5		xxx			xxx			xxx	
	9	xxx		xxx	xxx		xxx	Xxx		xxx

PEF uygulanmış hücreler 0, 4 ve 96. saatlerde analize alınmışlardır. Analizlerde kullanılmak üzere erlenmayerlerdeki strese alınmış kültürlerle bir dakika boyunca vakum filtrasyon yapılmıştır. Filtratların bir kısmı enzim ekstrasyonunda, bir kısmı 4 °C’de buzdolabında petri kaplarında kuru madde analizi için ve kalan kısmı da toplam fenol analizinde kullanılmak üzere liyofilizatörde kurutulularak muhafaza edilmiştir. Besiyeri ortamı ise pH ve iletkenlik ölçümlerinde ve toplam fenol analizinde kullanılmak üzere dondurulmuştur.

3.2.3. Kuru Madde Tayini

Hassas tartımı (Scaltec- SBA 31) yapılan alüminyum folyo kaba konulan kültürlerin yaş ağırlığı da tartıldıktan sonra 105 °C’deki etüvde 24 saat kurumaya bırakılmıştır. Ardından 1 saat süre ile desikatörde bekletilmiş ve kap ile kap içeriğinin tartımı yapıp boş kabın ağırlığı çıkarılarak kuru hücrelerin ağırlığı belirlenmiştir. Kuru madde miktarı ise kuru hücre ağırlığının kap ağırlığı çıkarılarak bulunan sonucun yaş hücre ağırlığına oranının 100 ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır.

$$\text{KM (g / 100 g)} = \frac{c-a}{b-a} * 100 \quad (3.1)$$

a = kap ağırlığı

b = kap ile yaş hücre ağırlığı

c = kap ile kuru hücre ağırlığı

3.2.4. pH ve İletkenlik Ölçümü

pH ve iletkenlik hücrelerin besiyerleri kullanılarak dijital pH metre (Victor Recker-Knick) ve dijital iletkenlik ölçer (WTW Cond 3110 SET 1 2CA101) ile ölçülmüştür. Her ölçüm 2 kere tekrarlanmıştır.

3.2.5. Hücrelerde Canlılık Testi (TTC Testi)

Towill ve Mazur (1974) metodu esas alınarak yapılan TTC testinde aynı vurgu şiddeti ve sayısına maruz kalmış vakum filtrelenmiş petri kaplarındaki 3 paralel örnekten 0.15 ile 0.20 g tartım alınarak yeni bir petri kabında 3 örnek 0.5 g oluşturacak şekilde karıştırılmıştır. Ardından bu petri kabındaki 3 paralel hücrenin karışımından 1 tanesi kör örnek için 4 tanesi ana örnek için olmak üzere 5 tane cam test tüplerine 0.1 g kültür tartılmıştır. Kör örnek tüpüne 1 mL sodyum fosfat tamponu ana örnek tüplerine de 1 mL TTC çözültisi eklenip tüplerin kapakları kapatılarak oda sıcaklığında karanlıkta 22 saat inkübasyona bırakılmıştır. 22 saat sonunda bütün tüplere 5 mL % 96 'lık etanol eklenerek reaksiyon sonlandırılmış ve 15 saniye vortexte (Janke&Kunkel IKA® Labortechnik VF2) karıştırılarak spektrofotometrik ölçüm için kültürlerin taze kalması amacı ile dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Spektrofotometrik ölçümde kültürlerin çözünmesini sağlamak üzere 60 °C'de 15 dakika tüpler sıcak su banyosunda (GFL 10626634e) tutulmuş ve 15 saniye vortexte karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir (Thermo Scientific Megafuge 1.0 R). Süpernatantlar yeni cam test tüplerine alınmış ve pelletlere 5 mL % 96'lık etanol eklenerek 60 °C'de 15 dakika tüpler sıcak su banyosunda tutulduktan sonra 15 saniye vortexte karıştırılıp tekrar oda sıcaklığında 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. İkinci süpernatantlar da test tüplerine eklendikten sonra tüp içeriği vortexte karıştırılmıştır. Yarım küvetlere alınan 1 mL süpernatantların 485 nm dalga

boyundaki UV spektrofotometresindeki (PerkinElmer Lambda 25 UV/VIS) absorbansları ölçülmüş ve sonuçlar birim/g kuru madde üzerinden verilmiştir (Towill ve Mazur, 1974).

$$\text{Canlılık (Birim /g KM)} = \Delta \frac{E \cdot df}{\text{Örnek Ağırlığı (g)} \cdot \left(\frac{\text{Kuru madde ağırlığı}}{100} \right)} \quad (3.2)$$

Δ = Örnek canlılığı – kör örnek canlılığı

E = Absorbans

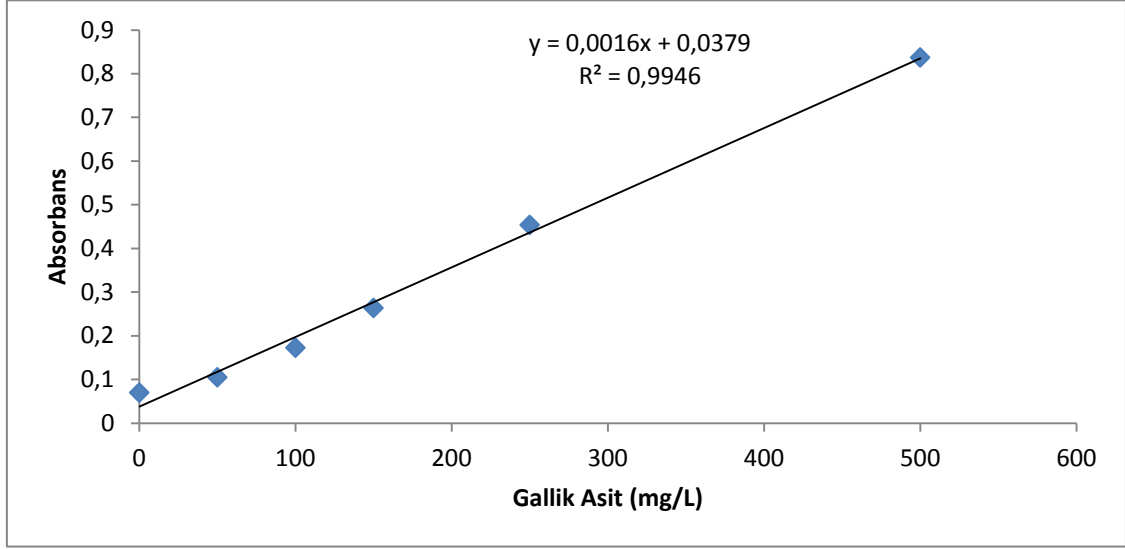
Df = dilüsyon faktörü

3.2.6. Hücrelerde Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Galinski (1986) tarafından modifiye edilen Dyer (1959) yöntemine göre 0.01 g liyofilize hücre tartılmış ve 0.5 mL Bligh & Dyer çözeltisi ile birlikte 1.5 mL'lik mikro tüplere aktarılmış ve 30 dakika boyunca mikro test tüpleri çalkalayıcısında (IKA® MS2 Minishaker) oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Ardından tüplere 0.13 mL kloroform ve 0.13 mL distile su eklenerek tüpler 15 dakika daha çalkalandıktan sonra 10000 rpm oda sıcaklığında 5 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatantlar yeni tüplere alınmıştır (Bligh and Dyer 1959, Galinski 1986). Toplam fenolik ölçümü üzerinde değişiklik yapılarak Waterhouse (2001)'e göre yapılmış olup buna göre 2 mL'lik mikro test tüplerine kör örnek için 1.6 mL ana örnekler için 1.59 mL distile su, ana örneklere 0.01 mL polifenol ekstraktı (süpernatant) eklenip vortexte (Eppendorf Mixer 5432) karıştırıldıktan sonra kör ve ana örneklere 0.1 mL Folin-Ciocalteu çözeltisi eklenip 30 saniye ile 8 dakika arasında karıştırılmış ve 0.3 mL sodyum karbonat çözeltisi de eklenerek yine aynı şekilde vortexte karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakılmıştır (Waterhouse 2001).

Spektrofotometrik olarak ölçümleri yapılan örneklerin 765 nm'deki absorbansları belirlenmiş ve gallik asitle hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre toplam fenol miktarı mg gallik asit/ g kuru madde (mg GAE/ g KM) olarak sonuçlar verilmiştir. Her örnek için 3 tekrar yapılmıştır.

Hesaplamalar Waterhouse (2001) belirttiği üzere aşağıdaki formüllere göre yapılmıştır:



Şekil 3.4. Toplam fenolik maddenin gallik asit (G.A) eşdeğeri olarak hazırlanan kalibrasyon eğrisi

Şekil 3.4 'te görüldüğü üzere kalibrasyon eğrisi denklemi kullanılarak toplam fenol miktarının gallik asit eşdeğeri (GAE) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$TF \text{ (mg GAE /L)} = \frac{(E - B_w) - 0,0379}{0,0016} \quad (3.3)$$

E = Örnek absorbansı

B_w = Kör örnek absorbansı

$$TF \text{ (mg GAE /g KM)} = \frac{TF \text{ (mg GAE/L)}}{\text{Örnek Ağırlığı(g)} * 2000} \quad (3.4)$$

3.2.7. Besiyerinde Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Bazı değişiklik yapılan Waterhouse (2001) yöntemine göre dondurulmuş sıvı besiyeri çözündürüldükten sonra 0.4 mL besiyeri, 1.2 mL distile su 2 mL'lik mikro test tüplerine eklenip vortexte (Eppendorf Mixer 5432) karıştırıldıktan sonra kör ve ana örneklere 0.1 mL Folin-Ciocalteau çözeltisi eklenip 30 saniye ile 8 dakika arasında karıştırılmış ve 0.3 mL sodyum karbonat çözeltisi de eklenerek yine aynı şekilde vortexte karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakılmıştır (Waterhouse, 2001).

Spektrofotometrik olarak ölçümleri yapılan örneklerin 765 nm'deki absorbanları belirlenmiş ve gallik asitle hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre toplam fenol miktarı mg gallik asit/ litre (mg GAE/ L) olarak verilmiştir. Her örnek için 3 tekrar yapılmıştır.

Hesaplamalar Waterhouse (2001) belirttiği üzere şekil 3.4 'teki kalibrasyon eğrisi denklemi kullanılarak aşağıdaki formüle göre yapılmıştır:

$$TF \text{ (mg GAE /L)} = \frac{(E - B_w) - 0,0379}{0,0016} \quad (3.6)$$

E = Örnek absorbanı

B_w = Kör örnek absorbanı

3.2.8. Fenilalanin Amonyum Liyaz (PAL) Enzim Analizi

Enzim ekstrasyonu hazırlamak için vakum filtre edilmiş kültür örneklerinden buz kabı içinde bulunan test tüplerine 1.7 g tartılmış ve 3 mL borik asit-borat tamponu ile ultraturrax (Janke&Kunkel IKA® Labortechnik) kullanılarak 3 kere 30 saniye aralıklarla 30 saniye boyunca 13500 rpm'de homojenize edilmiştir. Ardından kültürler 14000 rpm 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir (Eppendorf Centrifuge 5804R). Süpernatantlar spektrofotometrik ölçüm için buz kabındaki yeni tüplere alınmıştır.

PAL enzim aktivitesini spektrofotometre (PerkinElmer Lambda 25 UV/VIS) kullanarak kör standarta karşı oda sıcaklığında 290 nm'de absorban ölçümleri yapılmıştır. Ölçüm için 36 °C'deki su banyosunda tutulan 2 mL'lik mikro tüplere kör örnek için 2.5 mL ana örnekler için 1.9 mL borik asit-borat tamponu, 0.5 mL enzim ekstraktı ve ana örneklere 0.6 mL fenilalanin substratı eklenmiştir. 15 dakika ve 75 dakika (Δt = 60 dakika) bekledikten

sonra 2 mL'lik makro küvetlere (Carl- Roth RatioLabo®) aktarılarak ölçümler yapılmıştır. Hesaplamalar aşağıdaki formüle göre birim / g kuru madde üzerinden verilmiştir (Seitz 1985).

$$\text{PAL Aktivitesi} = \frac{\Delta A}{t} * \frac{V}{d * \epsilon_{290}} \quad (3.7)$$

A = Absorbsiyon

t = Reaksiyon süresi

V = Test tüpü hacmi (3 mL)

d = Küvet çapı (1 cm)

ϵ_{290} = Ekstraksiyon faktörü (10 mL/cm* mol)

3.2.9. İstatistikî Analizler

Canlılık sonuçları ve grafikleri için Design Expert 7 ® programı kullanılmıştır. Bu amaçla deneme planı Response Surface Metodu (RSM) kullanılarak belirlenmiş ve veriler Central Composite Rotatable Design (CCRD) deneme planı izlenerek elde edilmiştir.

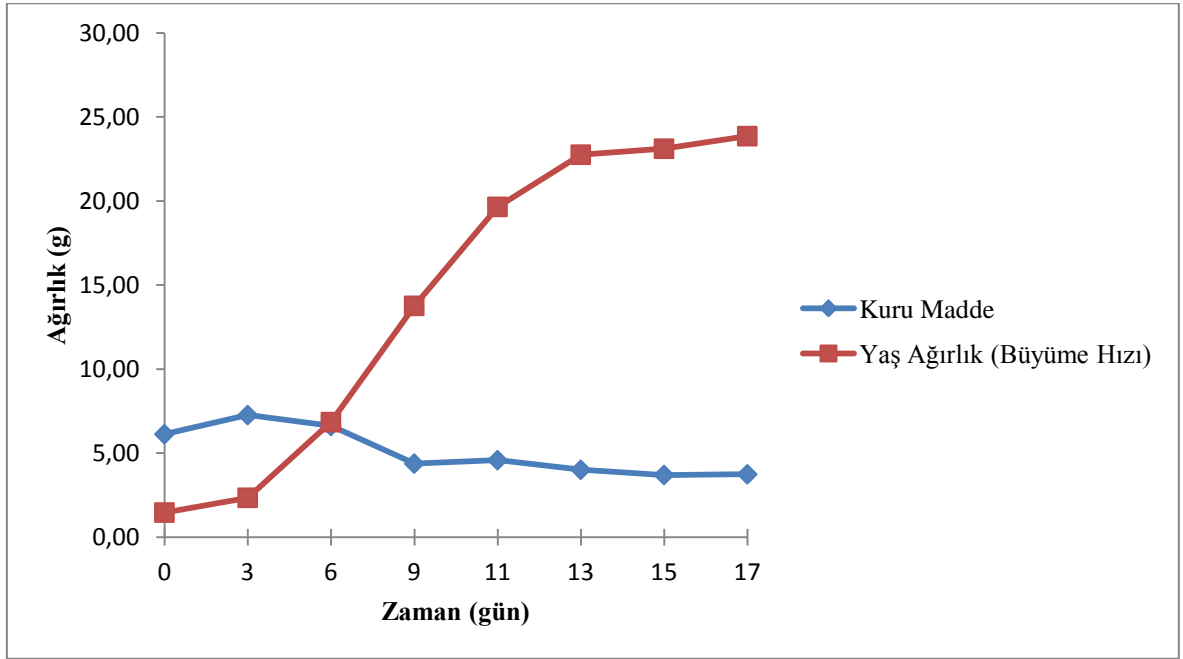
Vurgulu elektrik alan şiddeti (VEAŞ) – vurgu sayısı (VS) ile stres reaksiyon sürelerinin (SRS) kuru madde miktarı üzerindeki etkilerini birlikte olan etkilerini incelemek amacı ile SPSS 18 programından yararlanılmış ve istatistikî analizde varyans analizi (çift yön ANOVA) uygulanmıştır. Gruplar arasında görülen farklılıkların hangi gruplar arasında kaynaklandığını belirlemek amacı ile de Duncan çoklu karşılaştırma testinden yararlanılmıştır. VEAŞ – VS ile birinci ve ikinci alt kültürlerin (AK) çift yön olarak pH ve iletkenlik üzerindeki değişimleri ve VEAŞ – VS ile SRS çift yön olarak LE hücrelerinin ve besiyerlerinin birinci ve ikinci alt kültürlerindeki toplam fenolik madde miktarı ve fenilalanin amonyum liyaz enzim aktivitesi üzerindeki değişimleri SPSS 18 programı çift yönlü MANOVA varyans analizi ve Duncan çoklu karşılaştırma testi ile istatistikî olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca hücrelerdeki ve besiyerlerindeki TF miktarları ve PAL enzim aktivitesinin arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde korelasyon analizi uygulanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *LYCOPERSICON ESCULENTUM* (LE) BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ GELİŞME KARAKTERİSTİĞİ

4.1.1. Büyüme Hızı & Kuru Madde

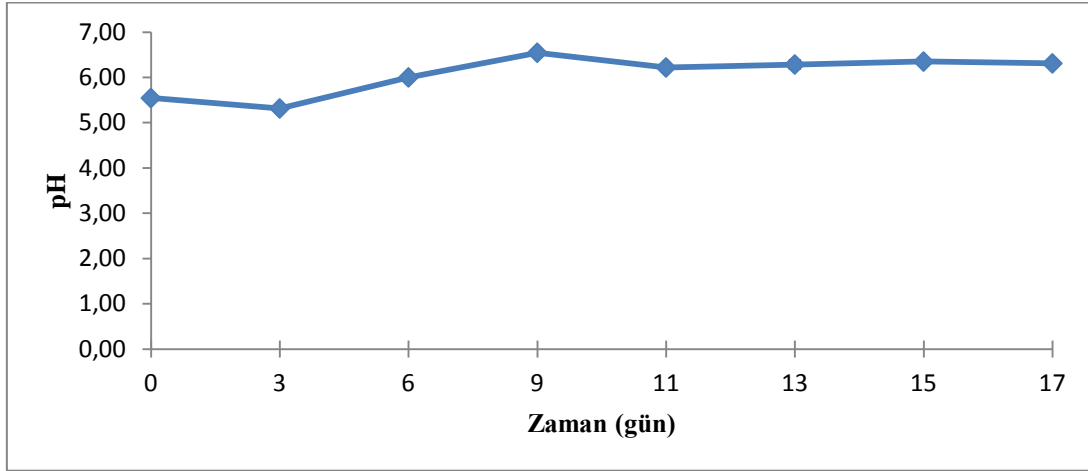
17 gün boyunca çalkalayıcının içinde erlenmayerlerde depolanan hücre kültürlerinin şekil 4.1.de de görüldüğü üzere kuru madde ve yaş ağırlıklarına göre 3.günden sonra hızlı hücre bölünmesi ile hücre sayısında üssel artışın görüldüğü logaritmik (log) faza girdikleri ve 6. günden sonra 13. güne kadar kültürlerin yaş ağırlıklarının arttığı lineer fazda olduğu saptanmıştır. 13.günden sonra ise besiyeri azaldığı ve hücresel kalıntı birikimi olduğu için yavaşlama ve ardından da duraklama fazına geçtiği görülmüştür.



Şekil 4.1. Zamana göre LE bitki doku kültüründe yaş ağırlık ve kuru madde miktar değişimi

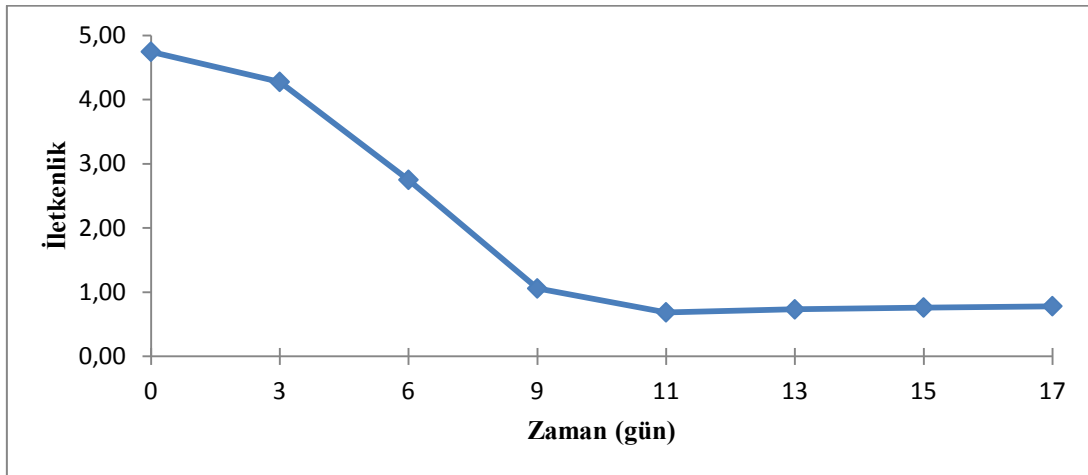
4.1.2. pH & İletkenlik

Dijital pH metre ve dijital iletkenlik ölçer ile yapılan ölçümlerde her ölçümün 2 kere tekrarlanmış ve tekerrürlerin ortalaması alınarak depolama zamanına karşı pH ve iletkenlik grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 4.2). Buna göre 3 ile 9. günler arasında yani log faz ve lineer fazda pH'da artış görülürken 9.günden sonra 11. güne kadar biraz azalmayı takiben sabitlenme saptanmıştır.



Şekil 4.2.Zamana karşı pH değişimi

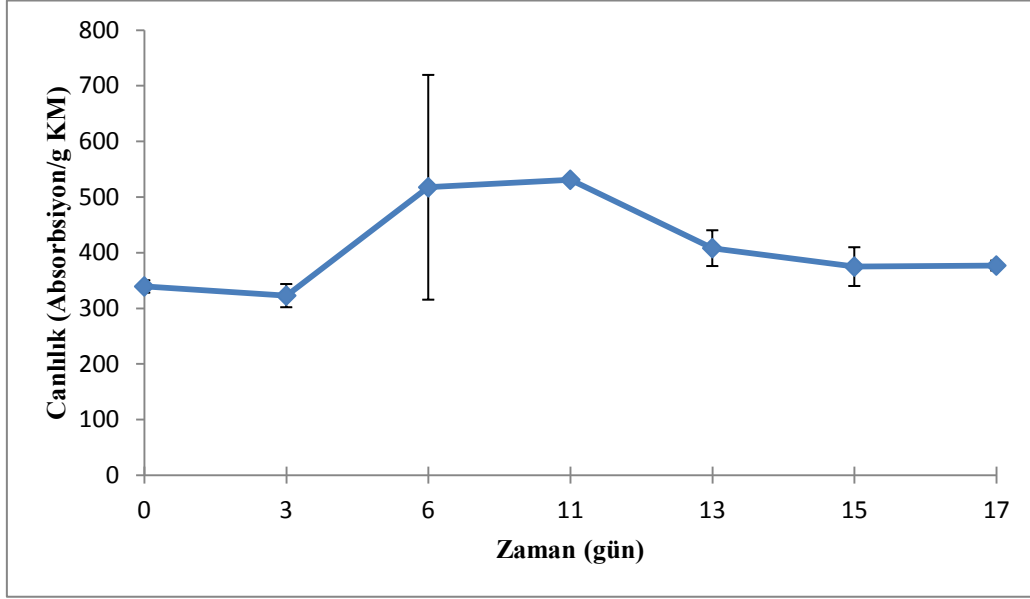
İletkenlikte ise ekimin yapılmasını takiben depolama boyunca alınan ölçümlerde lag ve log fazda ve lineer fazın 9.gününe kadar hızlı bir azalma görülmüştür. 9 ile 11. gün arasında daha yavaş bir azalmayı takiben 11. günden sonra kısmen sabitlenme saptanmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3.Zamana karşı iletkenlik değişimi

4.1.3. Canlılık

Spektrofotometrik ölçümlerle belirlenen kuru maddedeki absorbansa göre şekil 4.4.'te görüldüğü üzere hücrelerdeki canlılık log fazın başlaması ile birlikte lineer faza kadar (6.gün) hızlı bir artış gösterirken lineer fazda 11.güne kadar yavaş bir artış olmuştur. 11.günden sonra ise 15.güne kadar ise besiyeri azaldığı ve hücresel kalıntı birikimi olduğu için canlılık azalmış ve 15 ile 17. gün arasında canlılık sabitlenmiştir.



Şekil 4.4.Zamana karşı canlılıktaki değişim

4.1.4. Toplam Fenol (TF) Miktarı

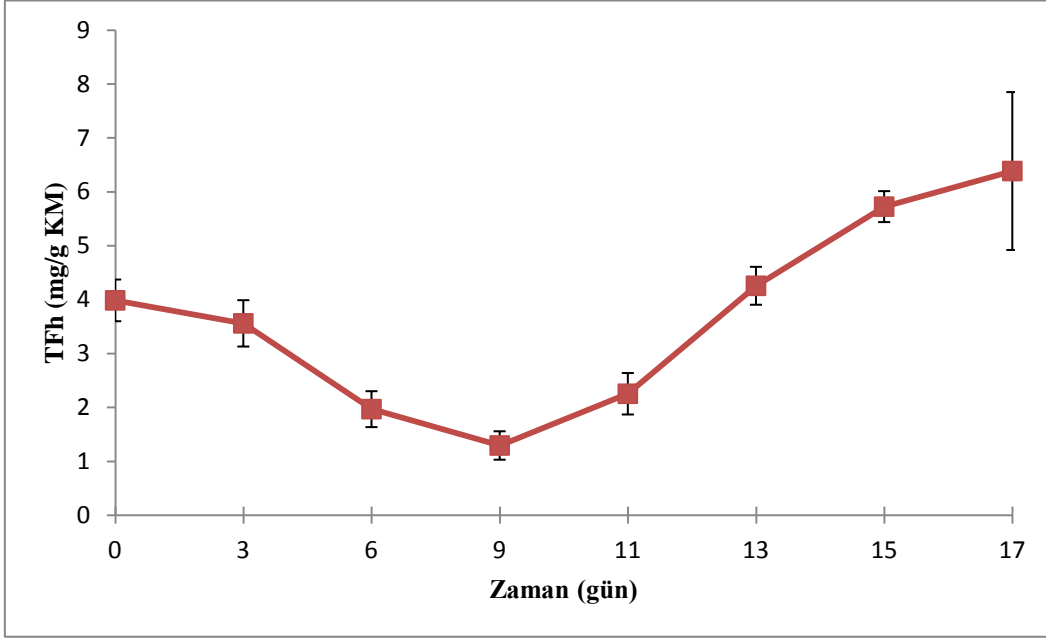
Oluşturulan kalibrasyon eğrisinden elde edilen doğrusal eşitlik (eşitlik 4.1) ile yapılan hesaplamalar sonucu hücrelerde g kuru maddede mg ve besiyerinde litre besiyerinde mg olarak toplam fenol miktarı bulunmuştur.

$$y = 0,0013x + 0,0735 \quad (4.1)$$

$$R^2 = 0,9997$$

4.1.4.1. Hücrelerde Toplam Fenol Miktarı

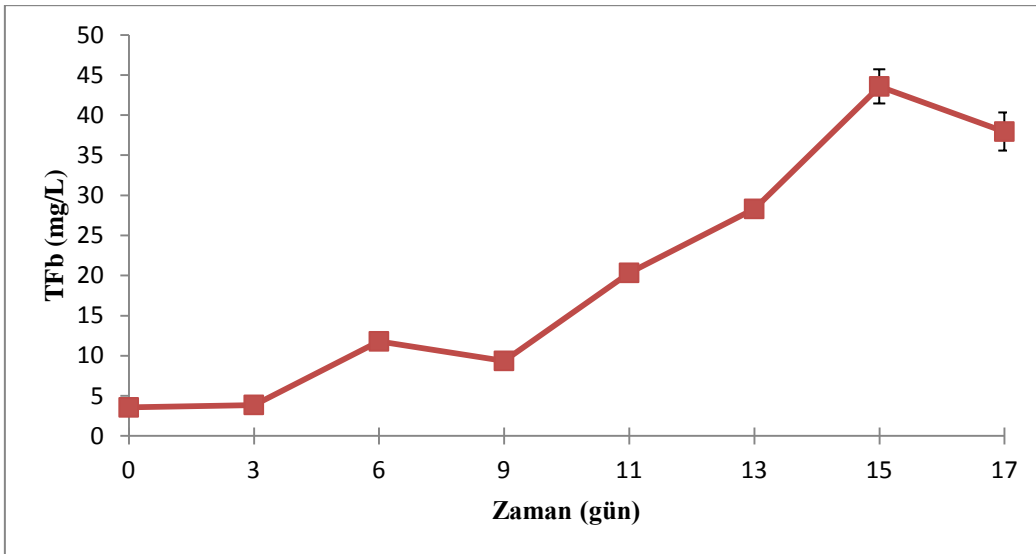
Şekil 4.5’de görüldüğü üzere hücrelerde fenilalanin amonyum liyaz aktivitesine zıt bir şekilde ilk gün 3,9863 mg/g KM olan toplam fenol miktarı 9. güne kadar 1,2941 mg /g KM’ye kadar düşüş göstermiş ardından depolama süresinin sonuna kadar 6,3860 mg/g KM olana kadar artmıştır.



Şekil 4.5. Zamana karşı hücrelerde toplam fenol miktarı

4.1.4.2. Besiyerinde Toplam Fenol Miktarı

Besiyerinde toplam fenol miktarı 3 ile 6. günler arası hızlı olmak üzere 3.gün 3,8654 mg/L'den 6. gün 11,7885 mg/L' ye artış göstermiş; fakat 6 ile 9. günler arası 9. gün 9,3526 mg/L olacak şekilde düşüş yaşamıştır. 9.günden sonra ise 15. güne kadar 43,5705 mg/L olacak şekilde artan toplam fenol 15. günden sonra 37,9423 mg/L olana kadar depolama sonunda düşmeye başlamıştır (Şekil 4.6).

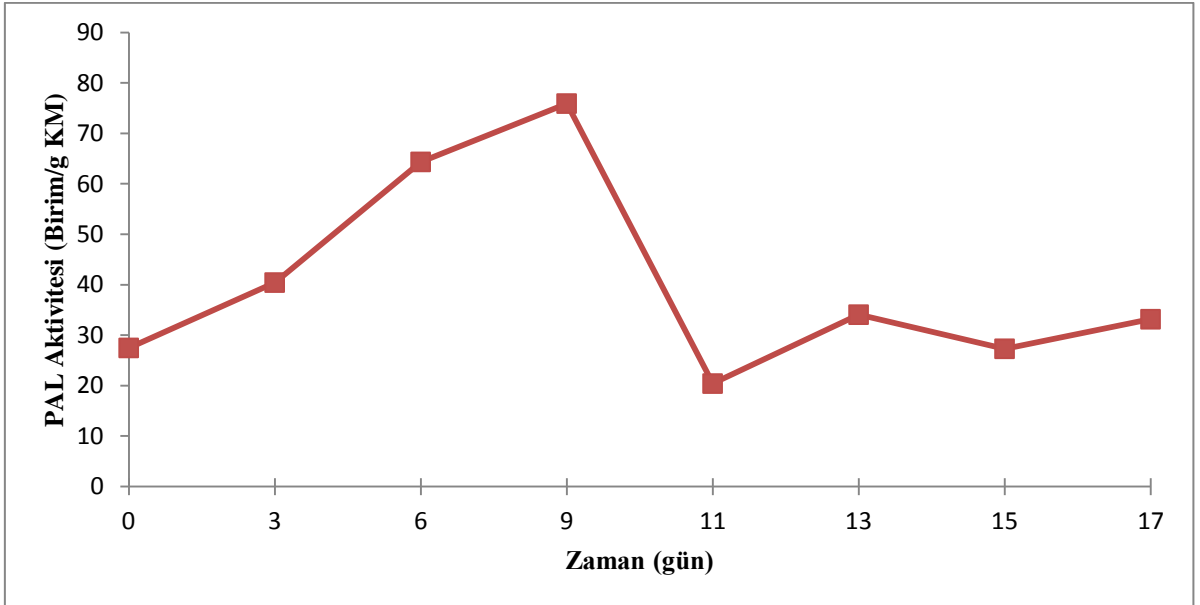


Şekil 4.6. Zamana karşı besiyerinde toplam fenol miktarı

4.1.5. Fenilalanin Amonyum Liyaz (PAL) Aktivitesi

Enzim aktivitesi spektrofotometrik ölçümler sonucu okunan absorbanstan yararlanarak yapılan hesaplamalar ile birim / g kuru madde (KM) olarak verilmiştir.

Bitkilerde sekonder metabolit üretimde kritik bir noktada yer alan fenilalanin amonyum liyaz enzimi inokülasyonu takiben depolama süresi boyunca 27,4757 birim/g KM'den 9. güne kadar 75,9015 birim/g KM olacak şekilde büyüme hızıyla paralel olarak artış göstermiştir. Ancak PAL aktivitesi 9 ile 11. gün arasında 20,4102 birim/g KM'e hızlı bir düşüş yaşamış ve ardından tekrar artarak inokülasyonun yapıldığı zamandaki aktivitesine yakın bir seviyede seyretmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7.LE Bitki doku kültüründe zamana karşı PAL akitivitesi

4.2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜNDE VURGULU ELEKTRİK ALAN UYGULAMASI SONUCU ELDE EDİLEN BULGULAR

Vurgulu elektrik alan uygulaması, stres reaksiyon süresi ve alt kültüre alma işleminin domates hücre kültüründeki (*Lycopersicon esculentum*-LE) biyoaktif maddeler üzerine etkisini incelemek üzere LE bitki doku 14 gün boyunca depolanıp kültüre alınmıştır. Kültüre alma işlemi 2 kere yapıp PEF uygulaması her iki alt kültüre yapılmıştır. LE bitki doku kültürlerine PEF uygulaması her iki alt kültür için kültürlerde büyümenin lineer fazının başladığı zaman (6.gün) yapılmıştır. Deneme planı Design Expert 7.0® programı aracılığı ile Response Surface Metodu (RSM) kullanılarak belirlenmiş ve veriler Central Composite Rotatable Dizayn (CCRD) deneme planı izlenerek elde edilmiştir. Deneme planında vurgulu elektrik alan şiddeti (VEAŞ), vurgu sayısı (VS), stres reaksiyon süresi (SRS), alt kültür (AK) işlem değişkenleri seçilmiştir. Bu değişkenlere bağlı olarak da canlılık, hücrelerdeki toplam fenolik madde (TFh), besiyerindeki toplam fenolik madde (TFb), fenilalanin amonyum liyaz (PAL) enzim aktivitesi, kuru madde (KM) miktarı ve pH& iletkenlik ölçülerek takip edilmiştir.

Canlılık sonuçları ve grafikleri design expert 7 ® programı kullanılarak, toplam fenolik madde, fenilalanin amonyum liyaz enzim aktivitesi, kuru madde miktarı ve pH & iletkenlik sonuçları SPSS 18 programı ile grafikleri ise excell programı kullanılarak verilmiştir.

İşlem bağımsız değişkenleri ile her bir yanıt arasındaki ilişkiyi ifade eden matematiksel modeller çoklu lineer regresyon analizi yapılarak oluşturulmuştur. Denemelere en uygun model olan ikinci dereceden polinomial denklemler matematiksel model olarak alınmıştır. Deneysel verilerin ikinci dereceden polinomial modele fit ettirilmesine ilişkin varyans analizinde kareler toplamındaki artış (R^2) değerleri, “lack of fit” testi ve “adequate precision (adeq-precision)” değerleri verilmiştir.

Model parametrelerinin tahminlenmesinde en küçük kareler yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem, bilinmeyen katsayıların tahminlenmesinde deneysel veriler ile model arasındaki farklar toplamının karesinin minimize edilmesi prensibine dayanmaktadır. Bu yöntemde modele bir değişken eklenmesi ile bu değişken istatistiksel olarak önemsiz de olsa R^2 'yi her zaman arttırmaktadır. Dolayısıyla yüksek R^2 değerleri, gözlemler ile model tahminleri arasında her zaman iyi sonuçlar vereceğini garanti etmez. Bu nedenle R^2 yerine

düzeltilmiş (adj-) R^2 değerlerinin kullanılması önerilmektedir. Bununla birlikte modelin sunduğu tahmini R^2 ile adj- R^2 değerleri arasındaki farkın yüksek olması da istatistiksel olarak önemsiz terimlerin modele katılmış olduğunun bir göstergesidir (Eren, 2004).

Ölçüm sonuçlarının istatistiksel olarak bir anlam ifade edebilmesi için analizler sırasında yapılan varsayımların geçerliliği test edilmektedir. Yapılan varsayımlarda seçilen model matematiksel forma uygundur, denemelerde normal dağılım gösterir ve rastgele hatalar birbirinden bağımsızdır (Eren, 2004). Kalıntılar rastgele hata teriminin davranışını yansıtır. Bu sebeple yapılan varsayımların test edilmesinde ve modelin uygunluğunun belirlenmesinde önemli rol oynar. Dizayn edilmiş denemelerden alınan verilere fit ettirilen regresyon modeli gerçek yanıt fonksiyonuna bir yaklaşım olduğundan tahminlenen değerler ile deneysel veriler arasındaki fark (kalıntı), saf deneysel hatayı ve “lack of fit” testini içerir (Eren, 2004).

Adeq precision, pred R^2 ve PRESS istatistikleri kullanılarak regresyon modelinin sonra yapılacak denemeler için tahminleme modeli olarak kullanılıp kullanılmayacağını belirlenmektedir. Burada adeq precision değeri en az 4 olması gerekirken pre- R^2 ve adj- R^2 değerlerinin birbirine en az % 20 oranında yakın olması ve düşük PRESS değerleri fit edilen modellerin tahminleme açısından uygun olduğunu gösterir.

Her bir yanıt için regresyon analizi sonucunda elde edilen ikinci dereceden polinomial modeller kodlanmış değişkenler cinsinden verilecektir.

4.2.1. Vurgulu Elektrik Alan Uygulamasının Kuru Madde Üzerine Etkisi

Tablo 4.1’de vurgulu elektrik alan uygulaması yapılmamış ve yapılmış örneklerin 0, 4, 96. stres reaksiyon sürelerindeki birinci ve ikinci alt kültürlerle ait kuru madde miktarlarının sonuçları verilmiştir. Bu sonuçlara göre birinci ve ikinci alt kültürlerle göre istatistiki hesaplamalar yapılmıştır.

Tablo 4.1. 0, 4, 96. saatlerdeki stres reaksiyon süreleri, vurgulu elektrik alan şiddeti (VEAŞ) & vurgu sayılarının (VS) 1 ve 2. alt kültüre göre LE kuru madde miktarları

VEAŞ (V/cm) & VS	0. Saat		4. Saat		96. Saat	
	1.A.K. KM (g/100 g)	2. A.K. KM (g/100 g)	1. A.K. KM (g/100 g)	2. A.K. KM (g/100 g)	1. A.K. KM (g/100 g)	2. A.K. KM (g/100 g)
0	6,283186	6,351191	6,271038	6,417403	4,759052	5,19865
600 - 1	5,678239	6,338128	5,775676	6,364784	4,71845	4,952916
600- 9	6,319598	6,580719	5,999189	7,027178	4,55762	4,879616
900-5	6,073917	6,783621	6,214169	6,70211	4,554375	5,057088
1200-1	3,566016	6,255657	6,259034	7,466482	5,021372	4,998755
1200-9	5,97168	6,076836	6,235769	5,950266	5,140627	4,733029

Birinci Alt Kültür

VEAŞ-VS ve SRS etkilerinin birlikte değerlendirildiği iki yönlü ANOVA varyans analizi testi sonuçlarına bakıldığında VEAŞ-VS'nin LE birinci hücre alt kültüründeki kuru madde miktarı üzerinde etkisi olmadığı ($p > 0,05$) fakat SRS'nin önemli etkisi olduğu ($p < 0,05$) bulunmuştur.

Tablo 4.3'te Duncan çoklu karşılaştırma sonuçlarına bakıldığında stres reaksiyon süresi bakımından 4 saat beklemiş hücrelerde kuru madde miktarının 96 saat bekleyenlerden daha yüksek olduğu belirlenmekle birlikte 0. saatteki kuru madde miktarları ile benzer ortalamaya sahip oldukları saptanmıştır ($p > 0,05$). Ayrıca strese maruz kaldıktan hemen sonraki (0.saat) ve 96 saat sonraki alınan ölçümlerde de hücrelerdeki KM miktarı benzer bir ortalamaya sahiptir.

Tablo 4.2. VEAŞ-VS ‘nın KM miktarı üzerindeki etkisinin istatistiki sonuçları

VEAŞ (V/cm) – VS	KM (g / 100g)
0	5,771 ± 0,386 ^a
600-1	5,391 ± 0,386 ^a
600-9	5,625 ± 0,386 ^a
900-5	5,614 ± 0,386 ^a
1200-1	4,949 ± 0,386 ^a
1200-9	5,783 ± 0,386 ^a

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (p < 0,05).

Tablo 4.3. SRS ‘nin KM miktarı üzerindeki etkisini gösteren istatistiki sonuçlar

SRS (saat)	KM (g / 100g)
0	5,649 ± 0,273 ^{ab}
4	6,126 ± 0,273 ^b
96	4,792 ± 0,273 ^a

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (p < 0,05).

İkinci Alt Kültür

VEAŞ-VS ve SRS etkilerinin birlikte değerlendirildiği iki yönlü ANOVA varyans analizi testi sonuçlarına bakıldığında VEAŞ-VS’nin LE birinci hücre alt kültüründeki kuru madde miktarı üzerinde etkisi olmadığı (p > 0,05) fakat SRS’nin önemli etkisi olduğu (p < 0,05) bulunmuştur.

Bu durumda kuru madde miktarı üzerinde önemli etkisi olan stres reaksiyon süreleri açısından Tablo 4.5’te Duncan çoklu karşılaştırma sonuçlarına bakıldığında 0 ve 4 saat beklemiş hücrelerde en yüksek kuru madde miktarının olduğu saptanmış fakat 0. saatte ölçümleri alınan hücrelerdeki ortalama kuru madde miktarıyla 4. saatte ölçümleri alınanların aralarında istatistiki bir farklılığa rastlanılmamıştır (p> 0,05). Bununla birlikte

hücrelerin strese maruz kaldıktan 96 saat sonra alınan ölçümlerdeki KM miktarı 0 ve 4 saat beklemiş hücrelerinkinden istatistiki olarak daha düşük ortalama değerler göstermişlerdir ($p < 0,05$).

Tablo 4.4. VEAŞ-VS 'nın KM miktarı üzerindeki etkisini gösteren istatistiki sonuçlar

VEAŞ (V/cm) - VS	KM (g / 100g)
0	5,989 ± 0,180 ^{ab}
600-1	5,885 ± 0,180 ^{ab}
600-9	6,163 ± 0,180 ^{ab}
900-5	6,181 ± 0,180 ^{ab}
1200-1	6,240 ± 0,180 ^b
1200-9	5,587 ± 0,180 ^a

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($p < 0,05$).

Tablo 4.5. SRS 'nin KM miktarı üzerindeki etkisini gösteren istatistiki sonuçlar

SRS (saat)	KM (g / 100g)
0	6,398 ± 0,127 ^b
4	6,665 ± 0,127 ^b
96	4,970 ± 0,127 ^a

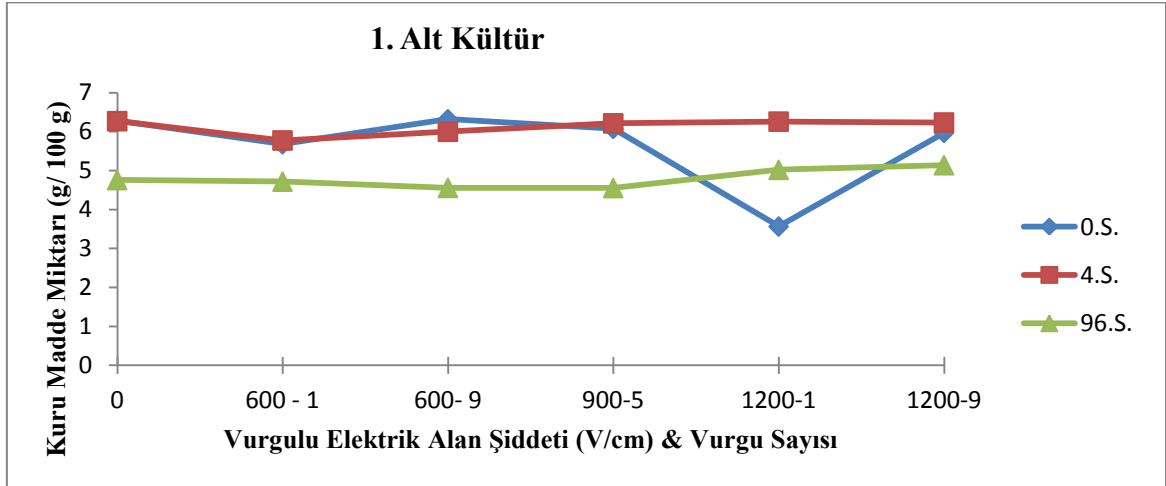
*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($p < 0,05$).

Şekil 4.8 ve 4.9'da LE birinci ve ikinci alt kültürüne ait vurgulu elektrik alan şiddeti ile vurgu sayısının stres reaksiyon sürelerine bağlı olarak etkilediği kuru madde miktarını gösteren grafikler verilmiştir.

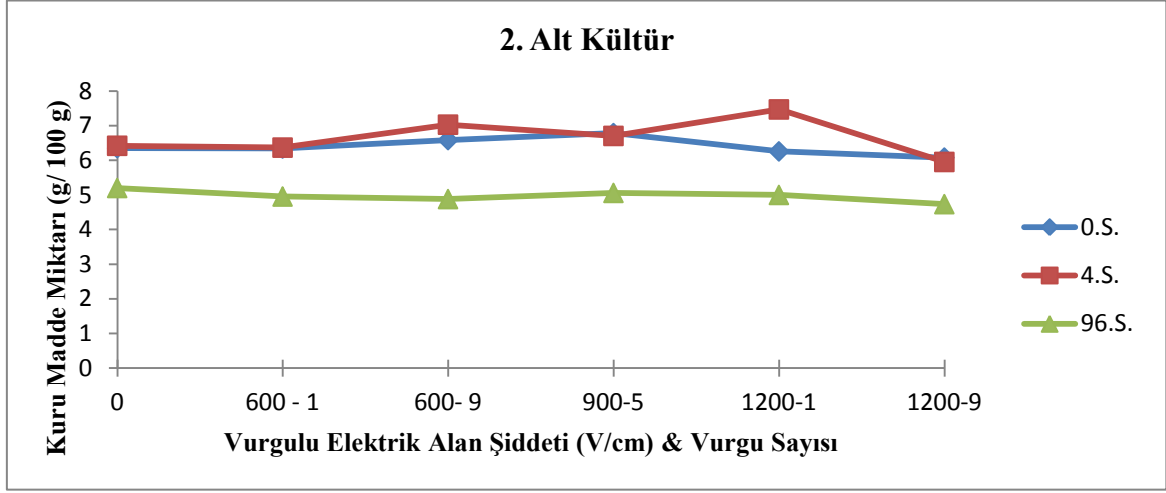
Şekil 4.8'de görüldüğü üzere işlem görmüş ve görmemiş tüm hücrelerin kuru madde miktarları stres reaksiyon süresinin 0. saatindeki 1200 V/cm uygulanmış hücreleri hariç 0 ve 4. saatlerinde 96. saate göre yüksektir. LE birinci alt kültürlerde vurgulu elektrik alan

uygulandıktan 4 ve 96 saat sonra alınan ölçümlerde kontrole göre elektrik alan şiddetinin artması kuru madde miktarında ilk etapta azalmaya sebep olsa da az miktarda artışa yol açmıştır. Fakat vurgulu elektrik alan uygulandıktan hemen sonra alınan ölçümlerde kontrole göre 600 V/cm uygulanmış hücrelerdeki kuru madde miktarında bir artış gözlenirse de 900 V/cm uygulanması ile ciddi bir düşüş yaşanmış ve ardından 1200 V/cm ile tekrar artış gözlenmiştir.

LE ikinci alt kültürlerde de birinci alt kültürde olduğu gibi işlem görmüş ve görmemiş tüm hücrelerin kuru madde miktarları stres reaksiyon sürelerinin 0 ve 4. saatlerinde 96. saate göre yüksektir (Şekil 4.9). LE ikinci alt kültürlerde vurgulu elektrik alan uygulandıktan hemen sonra ve 96 saat sonra alınan ölçümlerde kontrole göre elektrik alan şiddetinin artması önemsiz bir azalmaya sebep olmuştur. Bununla birlikte vurgulu elektrik alan uygulandıktan 4 saat sonra alınan ölçümlerde kontrole göre 600 V/cm elektrik alan şiddetinin 1 kere uygulanması önemli bir değişiklik yaratmazken 9 kere uygulanması hücrelerdeki kuru madde miktarını arttırmıştır. Fakat 900 V/cm uygulanması kuru madde miktarını düşürmüştür. Yine 1200 V/cm elektrik alan şiddetinin 1 kere uygulanması kuru maddeyi arttırmış fakat 9 kere uygulanması ise yine bir düşüşe sebep olmuştur.



Şekil 4.8. LE birinci alt kültürüne ait vurgulu elektrik alan şiddeti ile vurgu sayısının stres reaksiyon sürelerine bağlı olarak etkilediği kuru madde miktarı



Şekil 4.9. LE ikinci alt kültürüne ait vurgulu elektrik alan şiddeti ile vurgu sayısının stres reaksiyon sürelerine bağlı olarak etkilediği kuru madde miktarı

Birinci ve ikinci alt kültürler için tablo 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5 ile şekil 4.8 ve 4.9 birlikte değerlendirildiğinde ise ikinci kez alt kültüre alınan hücrelerdeki kuru madde miktarının bir kere alt kültüre alınan hücrelerdeki kuru madde miktarından fazla olduğu görülmüştür. Bu değerlendirilmeler sonucunda yapılan çalışmalarda stres reaksiyon süresinin hücrelerdeki KM miktarı üzerinde etkili olduğu bulunurken 4 saate kadar hücrelerin beklemesinin kuru madde miktarını arttırdığı fakat 96 saat beklemenin KM miktarında azalmaya sebep olduğu bulunurken doku kültürlerinin alt kültüre alınması da hücrelerde KM miktarında artışa yol açtığı saptanmıştır.

4.2.2. Vurgulu Elektrik Alan Uygulamasının pH ve İletkenlik Üzerine Etkisi

Tablo 4.6’da vurgulu elektrik alan şiddeti (VEAŞ) - vurgu sayılarının (VS) 1 ve 2. alt kültüre göre LE pH & iletkenlik değerlerini gösteren sonuçlar verilmiştir. Bu sonuçlara göre hesaplamalar yapıp istatistiki değerlendirmeler verilmiştir.

Tablo 4.6. Vurgulu elektrik alan şiddeti (VEAŞ) - vurgu sayılarının (VS) 1 ve 2. alt kültüre göre LE bitki doku kültürü pH & iletkenlik değerleri

	1. Alt Kültür					
	0. Saat		4. Saat		96. Saat	
VEAŞ (V/cm) & VS	pH	İletkenlik (mS/cm)	pH	İletkenlik (mS/cm)	pH	İletkenlik (mS/cm)
0	6,131667	3,53	6,02	2,798333	6,575	2,936833
600-1	6,24	3,393333	5,915	2,925	6,926667	1,081833
600-9	6,238333	3,57	5,986667	2,813333	6,86	1,032667
900-5	6,436667	3,993333	5,968333	2,87	6,826667	1,017
1200-1	5,97	3,623333	5,841667	3,006667	6,783333	1,2955
1200-9	6,356667	3,446667	5,915	3,088333	6,941667	1,274167
	2. Alt Kültür					
0	6,133333	4,32	5,566667	4,471666667	6,871667	1,321166667
600-1	6,163333	3,753333333	5,668333	3,653333333	7,021667	1,3945
600-9	5,911667	4,245	5,58	3,518333333	6,925	1,391333333
900-5	6,081667	4,19	5,531667	3,77	6,516667	1,926333333
1200-1	6,065	4,095	5,616667	3,908333333	6,25	1,6895
1200-9	6,266667	3,88	5,565	4,121666667	6,246667	1,770166667

VEAŞ-VS ve SRS etkilerinin birlikte değerlendirildiği iki yönlü MANOVA varyans analizi testi sonuçlarına bakıldığında VEAŞ-VS'nin birinci ve ikinci alt kültürlerde pH ve iletkenlik üzerinde etkisi olmadığı ($p > 0,05$) bulunmuştur. SRS'nin ise birinci ve ikinci alt kültürlerde hem pH ($p < 0,05$) hem de iletkenlik ($p < 0,05$) üzerinde önemli etkisinin olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.7'da Duncan çoklu karşılaştırma sonuçlarına bakıldığında her iki alt kültürde VEAŞ – VS 'nin pH ve iletkenlik sonuçları üzerinde farklılık yaratmamıştır. Tablo 4.8'de ise SRS'nin her iki alt kültürde pH değerlerini 4 saate kadar düşürdüğü 96 saatte tekrar arttırdığı iletkenlik değerlerini ise her iki alt kültürde düşürdüğü görülmektedir. Ayrıca her iki alt kültürde pH değerleri birbirinden farklı bulunmuş, iletkenlik değerleri ise birinci alt

kültürlerde farklı iken ikinci alt kültürlerde 0 ve 4 saat bekleyen hücrelerin benzer olduğu ve 96 saat bekleyenlerden farklı olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.7. VEAŞ-VS 'nın pH ve iletkenlik üzerindeki etkisini gösteren istatistiki sonuçlar

VEAŞ (V/cm) - VS	1. Alt kültür		2. Alt Kültür	
	pH	İletkenlik (mS/cm)	pH	İletkenlik (mS/cm)
0	6,242±0,065 ^a	3,088±0,275 ^a	6,191±0,127 ^a	3,371 ±0,157 ^a
600-1	6,361±0,065 ^a	2,467 ±0,275 ^a	6,284 ±0,127 ^a	2,934 ±0,157 ^a
600-9	6,362±0,065 ^a	2,472 ±0,275 ^a	6,139 ±0,127 ^a	3,052 ±0,157 ^a
900-5	6,411±0,065 ^a	2,627 ±0,275 ^a	6,043 ±0,127 ^a	3,295 ±0,157 ^a
1200-1	6,198±0,065 ^a	2,642 ±0,275 ^a	5,977 ±0,127 ^a	3,231 ±0,157 ^a
1200-9	6,404±0,065 ^a	2,603 ±0,275 ^a	6,026 ±0,127 ^a	3,257 ±0,157 ^a

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (p < 0,05).

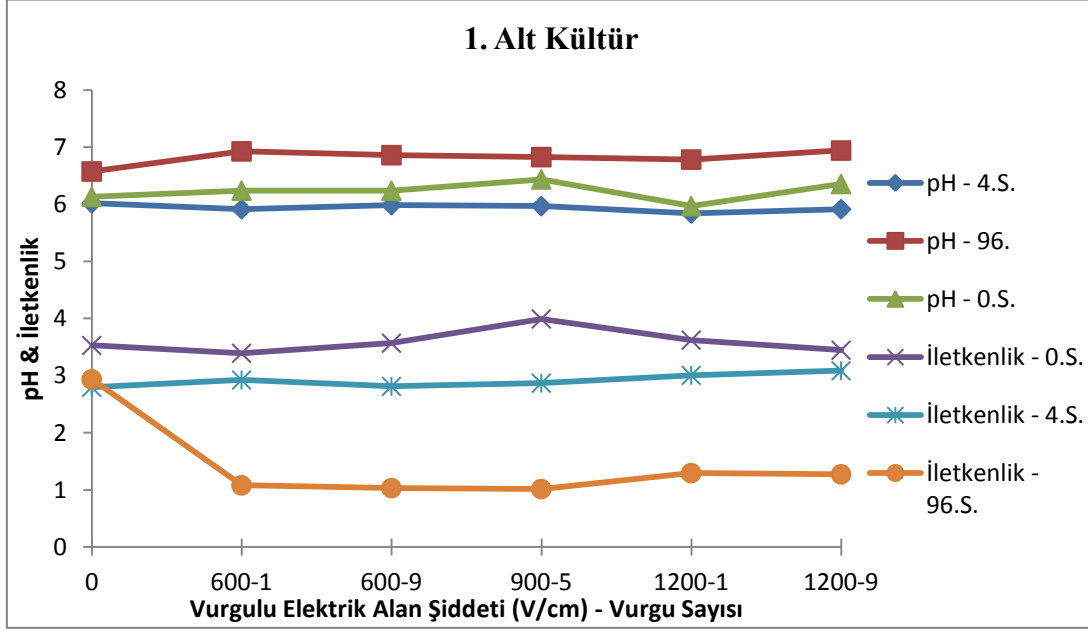
Tablo 4.8. SRS 'nin pH ve iletkenlik üzerindeki etkisini gösteren istatistiki sonuçlar

SRS	1. Alt kültür		2. Alt kültür	
	pH	İletkenlik (mS/cm)	pH	İletkenlik (mS/cm)
0	6,229 ±0,046 ^b	3,593 ±0,195 ^c	6,104 ±0,090 ^b	4,081 ±0,111 ^b
4	5,941 ±0,046 ^a	2,917 ±0,195 ^b	5,588 ±0,090 ^a	3,907 ±0,111 ^b
96	6,819 ±0,046 ^c	1,440 ±0,195 ^a	6,639 ±0,090 ^c	1,582 ±0,111 ^a

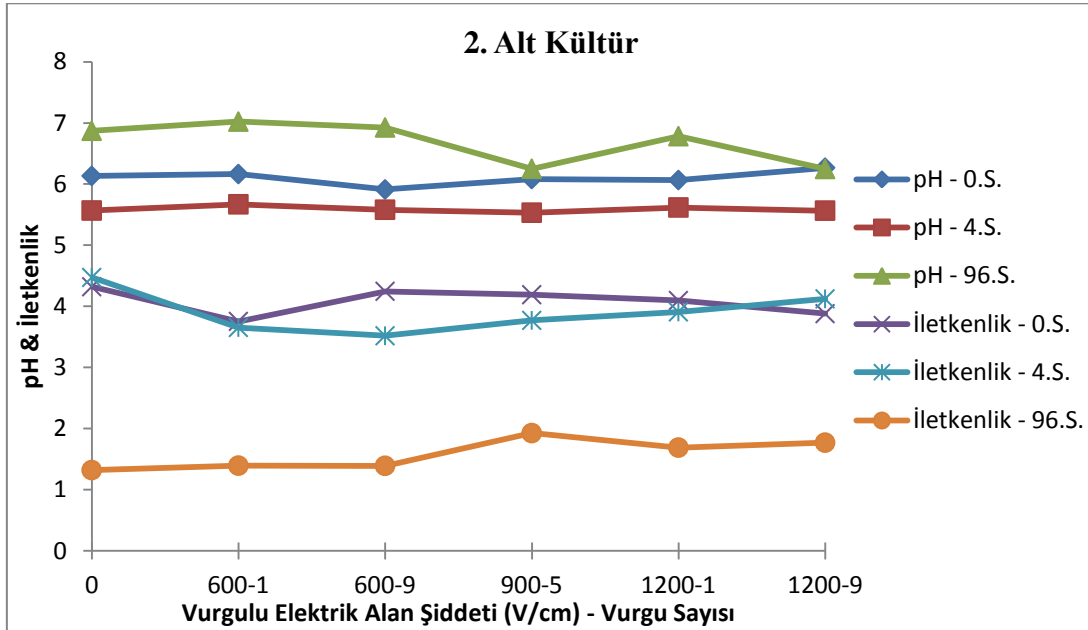
*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (p < 0,05).

Birinci ve ikinci alt kültürler için tablo 4.7 ve 4.8 ile şekil 4.10 ve 4.11 birlikte değerlendirildiğinde ise vurgulu elektrik alan uygulamasının pH ve iletkenlik üzerinde etkisinin olmadığı ancak SRS 'nin LE birinci alt kültürlerinde pH değerini önce düşürdüğü

ardından 96 saatte arttırdığı saptanmıştır. Diğer taraftan SRS 'nin artması iletkenlik değerlerini düşürmüştür.



Şekil 4.10. Vergülu elektrik alan şiddeti (VEAŞ) - vergü sayılarının (VS) LE pH & iletkenlik değişimi



Şekil 4.11. Vergülu elektrik alan şiddeti (VEAŞ) - vergü sayılarının (VS) LE pH & iletkenlik değişimi

4.2.3. Vurgulu Elektrik Alan Uygulamasının Canlılık Üzerine Etkisi

Vurgulu elektrik alan uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi spektrofotometrik ölçümler sonucu elde edilmiş olup CCRD deneme planına göre sonuçlar tablo 4.9’da verilmiştir.

Tablo 4.9. Hücre canlılıklarının “Response Surface” analizi için deneysel sonuçları

SRS (saat)	Alt Kültür	VEAŞ (V/cm)	VS	Canlılık (Birim/g KM)	SRS (saat)	Alt Kültür	VEAŞ (V/cm)	VS	Canlılık (Birim/g KM)
0	1	600	9	-12,9973391	0	2	1200	9	37,2954233
0	1	900	5	54,0643414	0	2	600	9	30,5086213
0	1	600	1	53,2061	0	2	900	5	15,4619115
0	1	600	1	53,2061	0	2	600	9	30,5086213
0	1	900	5	54,0643414	0	2	1200	1	8,29964106
0	1	900	5	54,0643414	0	2	1200	9	37,2954233
0	1	1200	9	-47,8360324	0	2	600	9	30,5086213
0	1	600	9	-12,9973391	0	2	1200	1	8,29964106
0	1	1200	9	-47,8360324	0	2	600	1	46,736865
0	1	600	9	-12,9973391	0	2	600	1	46,736865
0	1	1200	1	-8,11969643	0	2	1200	1	8,29964106
0	1	1200	9	-47,8360324	0	2	600	1	46,736865
0	1	600	1	53,2061	0	2	1200	9	37,2954233
0	1	1200	1	-8,11969643	0	2	900	5	15,4619115
0	1	1200	1	-8,11969643	0	2	900	5	15,4619115

Tablo 4.9 'un devamı									
4	1	1200	1	37,1095513	4	2	1200	1	-59,2947699
4	1	900	5	60,6781547	4	2	600	1	-28,5415877
4	1	1200	1	37,1095513	4	2	1200	9	-204,942365
4	1	900	5	60,6781547	4	2	600	9	-47,4580349
4	1	600	1	47,0849131	4	2	1200	1	-59,2947699
4	1	600	9	52,9925503	4	2	1200	1	-59,2947699
4	1	900	5	60,6781547	4	2	600	1	-28,5415877
4	1	1200	9	38,1942992	4	2	600	9	-47,4580349
4	1	1200	1	37,1095513	4	2	1200	9	-204,942365
4	1	1200	9	38,1942992	4	2	600	1	-28,5415877
4	1	600	1	47,0849131	4	2	600	9	-47,4580349
4	1	1200	9	38,1942992	4	2	1200	9	-204,942365
4	1	600	9	52,9925503	4	2	900	5	-18,1621446
4	1	600	1	47,0849131	4	2	900	5	-18,1621446
4	1	600	9	52,9925503	4	2	900	5	-18,1621446
96	1	1200	9	-26,1707422	96	2	600	1	9,14103915
96	1	600	9	7,45468626	96	2	600	9	-0,91575906
96	1	600	1	14,3314891	96	2	1200	1	16,7910086
96	1	1200	9	-26,1707422	96	2	1200	9	-2,45693376
96	1	900	5	8,10757541	96	2	900	5	-27,4500764
96	1	1200	1	-6,72601751	96	2	1200	1	16,7910086

Tablo 4.9'un devamı									
96	1	900	5	8,10757541	96	2	900	5	-27,4500764
96	1	1200	1	-6,72601751	96	2	600	1	9,14103915
96	1	900	5	8,10757541	96	2	600	1	9,14103915
96	1	600	9	7,45468626	96	2	1200	1	16,7910086
96	1	1200	9	-26,1707422	96	2	900	5	-27,4500764
96	1	600	1	14,3314891	96	2	1200	9	-2,45693376
96	1	600	1	14,3314891	96	2	1200	9	-2,45693376
96	1	1200	1	-6,72601751	96	2	600	9	-0,91575906
96	1	600	9	7,45468626	96	2	600	9	-0,91575906

Birinci ve ikinci alt kültür için “Response Surface” metodu (RSM) polinomiyal quadratik modele göre yapılan varyans analizi (ANOVA) sonuçları tablo 4.10 ve tablo 4.12’de verilmiştir.

Birinci Alt Kültür

Tablo 4.10’da görüldüğü üzere model F-değerinin 44.85 olması modelin önemli olduğunu göstermekte ve ayrıca model F-değerinin gürültüye bağlı olarak oluşması 0.01 % ihtimalde gerçekleşmektedir.

Prob > F değerinin 0.05’ten düşük olması değişkenlerin analizler üzerinde önem arz ettiğini göstermektedir. Bu durumda tablodan da görüldüğü üzere VEAŞ, VS, SRS, VEAŞ & SRS, VS & SRS hücrelerin canlılığı üzerinde önemlidir.

Tablo 4.10. Birinci Alt Kültürün Canlılık Testinde Response Surface Quadratik Model için ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Ortalama Kare	F-Değeri	p-Değeri Prob > F	
Model	44079.46	4897.72	44.85	< 0.0001	Önemli
A-VEAŞ	7710.69	7710.69	70.61	< 0.0001	Önemli
B-VS	3921.82	3921.82	35.91	< 0.0001	Önemli
C-SRS	19592.04	9796.02	89.70	< 0.0001	Önemli
AC	1927.99	963.99	8.83	0.0008	
BC	5048.71	2524.36	23.12	< 0.0001	Önemli
A ²	5878.22	5878.22	53.83	< 0.0001	Önemli

Tablo 4.11'den görüleceği üzere 0.8794 olan Pred R² değeri 0.8997 olan Adj R² değeri ile uyumluluk göstermektedir. Böylece fit edilen modellerin tahminleme açısından uygun olduğu görülmektedir. Adeq Precision oranının 4'ten büyük olması istenmektedir. Buna göre oranı 24.084 olan adeq precision bu modelin deneme uzayına uygulanabilirliğini göstermektedir.

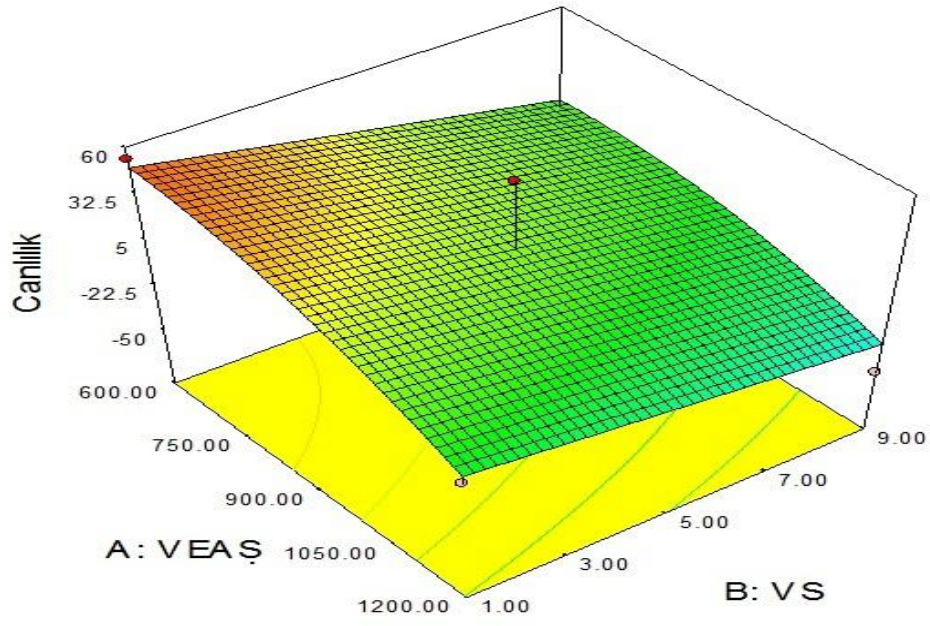
Tablo 4.11.Canlılık testi üzerinde PEF uygulamasının önemini gösteren ANOVA sonuçları

R ²	0.9202	Std. Dev.	10.45
Adj R ²	0.8997	Mean	18.09
Pred R ²	0.8794	PRESS	5779.19
Adeq Precision	24.084		

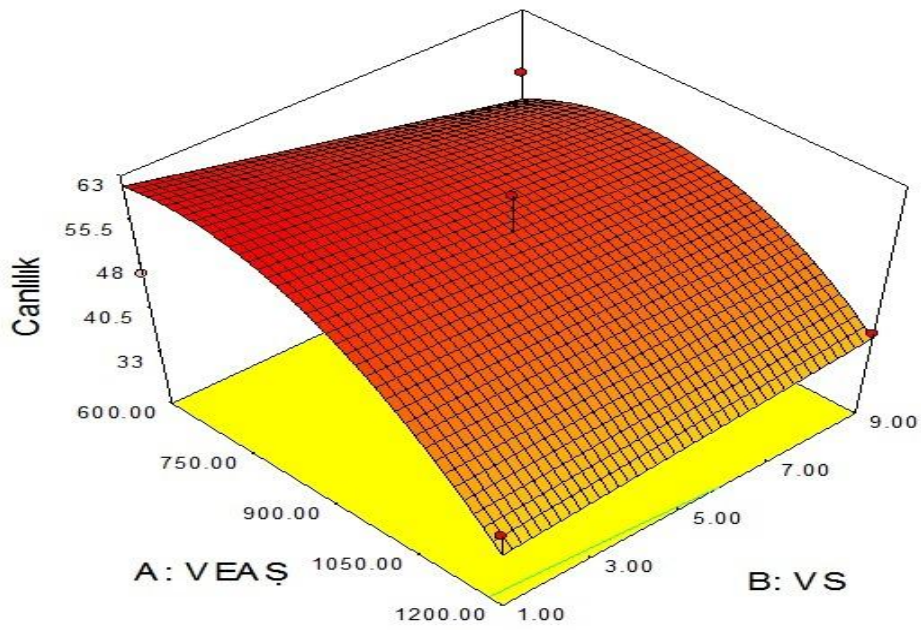
Kodlu değerler cinsinden önerilen quadratik matematiksel modele ait formül ise aşağıda verilmiştir:

$$\begin{aligned} \text{Canlılık} = & +40.95 -14.64 * \text{VEAŞ} -10.44 * \text{VS} -10.43 * \text{SRS (1)} +29.12 * \text{SRS (2)} -9.41 * \\ & \text{VEAŞ} * \text{SRS (1)} +8.44 * \text{VEAŞ} * \text{SRS (2)} -16.04 * \text{VS} * \text{SRS (1)} +12.19 * \text{VS} * \text{SRS (2)} - \\ & 28.57 * \text{VEAŞ} * \text{VEAŞ} \end{aligned} \quad (4.2)$$

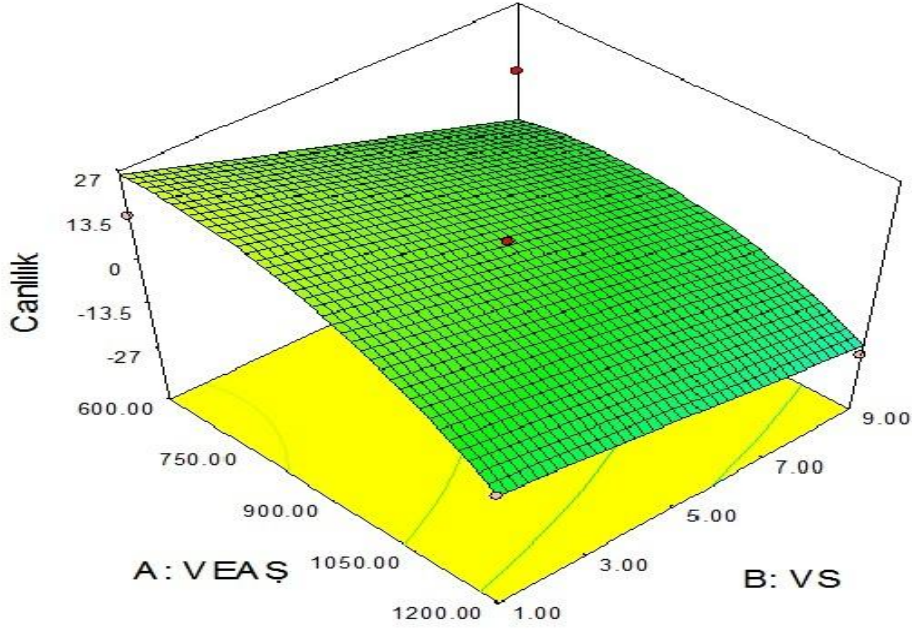
Şekil 4.12, 4.13 ve 4.14 'de ise birinci alt kültüre ait 0, 4 ve 96. stres reaksiyon zamanlarındaki vurgulu elektrik alan şiddeti (VEAŞ) ve vurgu sayısının (VS) hücre canlılığı üzerine etkilerini gösteren 3 boyutlu grafikler verilmiştir. Şekil 4.12, 4.13 ve 4.14'e göre vurgulu elektrik alan şiddeti arttıkça canlılık azalmaktadır aynı zamanda vurgu sayısı arttıkça da canlılık azalmaktadır. Ayrıca stres reaksiyon sürelerine göre grafikler incelendiğinde strese maruz kaldıktan hemen sonraki alınan ölçümlere göre 4 saat sonraki ölçümlerde canlılığın arttığı fakat 96 saat bekleyen hücrelerin canlılığında ciddi bir azalış olduğu görülmektedir. Hücre canlılığının azalması hücrelerde difüzyon mekanizmasının düzenlenmesi açısından önemlidir (Janositz vd.,2011). Fakat vurgulu elektrik alanın 1200 V/cm şiddetine ve stres reaksiyon süresinin ise 96 saate yükselmesi hücrelerde canlılığın tamamen yitirilmesine sebep olmuştur.



Şekil 4.12. LE birinci alt kültürüne ait 0. saatteki veaş ve vs'nın canlılık üzerine etkileri



Şekil 4.13. LE birinci alt kültürüne ait 4. saatteki veaş ve vs'nın canlılık üzerine etkileri



Şekil 4.14. LE birinci alt kültürüne ait 96. saatteki veaş ve vs'nın canlılık üzerine etkileri

İkinci Alt Kültür

Tablo 4.12 'den görüleceği üzere model F-değerinin 30.50 olması modelin önemli olduğunu göstermektedir ve ayrıca model F-değerinin gürültüye bağlı olarak oluşması 0.01 % ihtimalde gerçekleşmektedir.

Prob > F değerinin 0.05'ten düşük olması değişkenlerin analizler üzerinde önem arz ettiğini göstermektedir. Bu durumda tablodan da görüldüğü üzere SRS ve VEAŞ & VS hücrelerin canlılığı üzerinde önemlidir.

Tablo 4.12. İkinci Alt Kültürün Canlılık Testinde Response Surface Quadratik Model için ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Ortalama Kare	F-Değeri	p-Değeri Prob > F	
Model	31123.22	6224.64	30.50	< 0.0001	Önemli
A-VEAS	676.17	676.17	3.31	0.0771	
B-VS	113.29	113.29	0.56	0.4611	
C-SRS	27313.65	13656.82	66.91	< 0.0001	Önemli
AB	1321.71	1321.71	6.48	0.0154	

Tablo 4.13'te ise canlılık testi üzerinde PEF uygulamasının önemini gösteren ANOVA tablosu görülmektedir. Buna göre 0.7544 olan Pred R² değeri 0.7825 olan Adj R² değeri ile uyumluluk göstermektedir. Bu durumda fit edilen modellerin tahminleme açısından uygun olduğu görülmektedir. Adeq Precision oranının 4'ten büyük olması istenmektedir. Buna göre oranı 15.946 olan adeq precision bu modelin deneme uzayına uygulanabilirliğini göstermektedir.

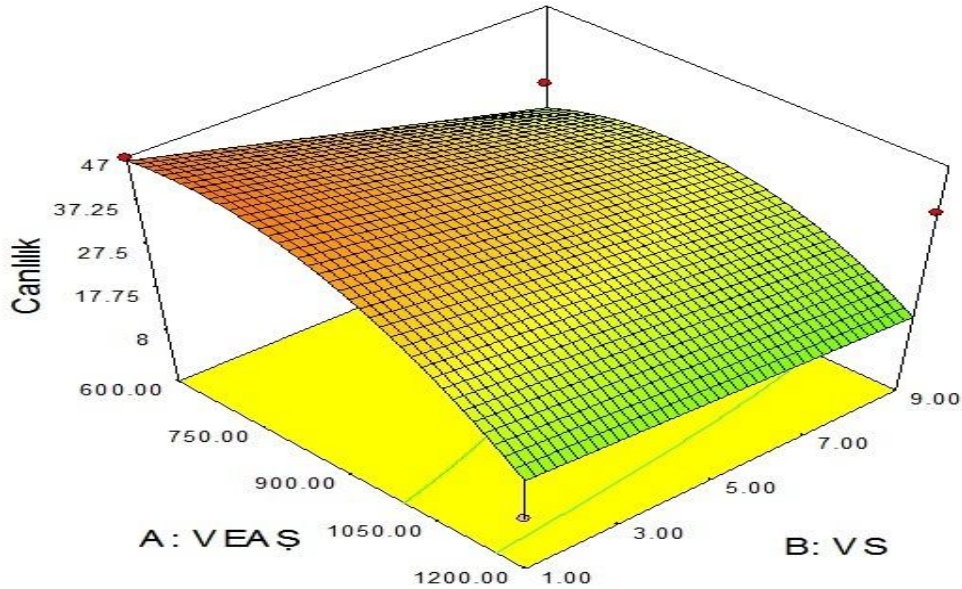
Tablo 4.13.Canlılık testi üzerinde PEF uygulamasının önemini gösteren ANOVA sonuçları

R ²	0.8090	Std. Dev.	14.29
Adj R ²	0.7825	Mean	-1.43
Pred R ²	0.7544	PRESS	9447.93
Adeq Precision	15.946		

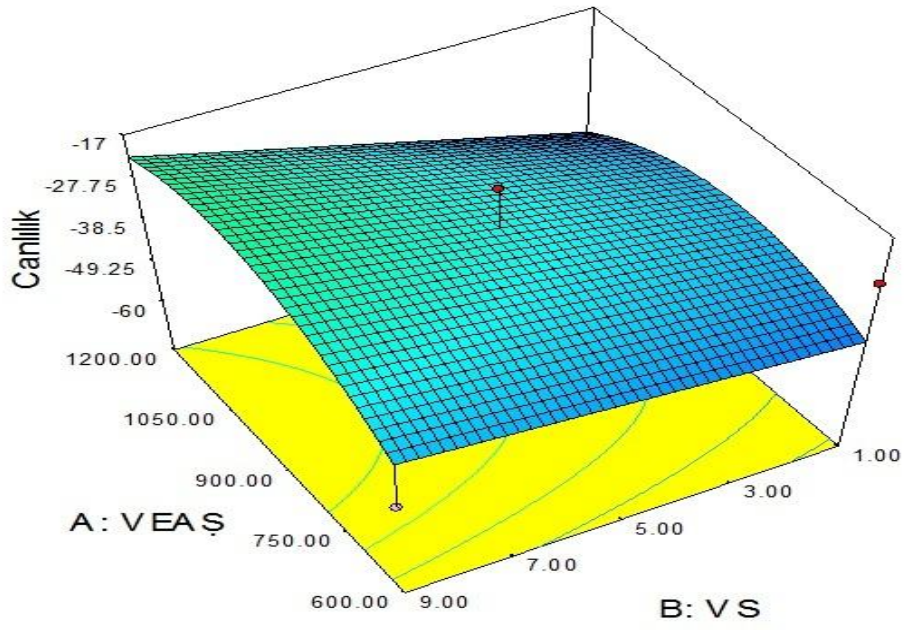
Kodlu değerler cinsinden önerilen matematiksel modele ait formül ise aşağıda verilmiştir:

$$\text{Canlılık} = -3.75 - 3.75 * \text{VEAŞ} - 1.03 * \text{VS} + 31.41 * \text{SRS [1]} - 34.18 * \text{SRS [2]} + 6.50 * \text{VEAŞ} * \text{VS} \quad (4.3)$$

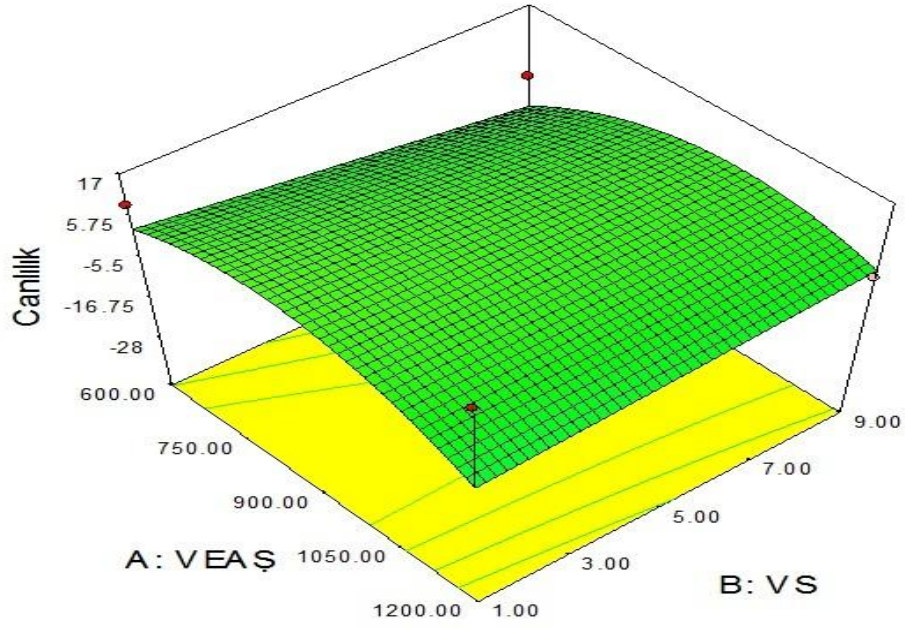
Şekil 4.15, 4.16 ve 4.17 'de ise ikinci alt kültüre ait 0, 4 ve 96. stres reaksiyon zamanlarındaki vurgulu elektrik alan şiddeti (VEAŞ) ve vurgu sayısının (VS) hücre canlılığı üzerine etkilerini gösteren 3 boyutlu grafikler verilmiştir. Şekil 4.15, 4.16 ve 4.17'e göre vurgulu elektrik alan şiddeti arttıkça canlılık azalmaktadır aynı zamanda vurgu sayısı arttıkça da canlılık azalmaktadır. Ayrıca stres reaksiyon sürelerine göre grafikler incelendiğinde strese maruz kaldıktan hemen sonraki alınan ölçümlere göre 4 saat sonraki ölçümlerde canlılığın bir anda ciddi bir düşüş yaşadığı fakat 96 saat bekleyen hücrelerin canlılığında tekrar arttığı görülmektedir. Bu durum birinci alt kültürle tezatlık göstermekle birlikte ikinci alt kültürde R^2 ve $adj-R^2$ değerlerinin düşük olması ikinci alt kültürlerdeki hücre davranışlarının gözlemleri tam olarak yansıtmadığını göstermektedir. Böylece ikinci alt kültürlerin canlılık testinde 2,3,5 trifenil tetrazolium klorürün trifenilformazona dönüşümü gerçekleşmesi gerekirken reaksiyonun tamamlanmadığı anlaşılmaktadır. Bu durum alt kültüre alma işlemi sırasında ekimleri yapılan hücrelerin mekanik olarak strese uğrayıp canlılığını yitirdiğini veya çalışmaların yeterince hassas yapılmadığını göstermektedir. Şekil 4.16 ve 4.17'den görüldüğü üzere 4 ve 96. stres reaksiyon sürelerinde elektriksel alan şiddetinin 1200 V/cm olması hücrelerde ölüme yol açmıştır.



Şekil 4.15. LE ikinci alt kültürüne ait 0. saatteki veaş ve vs'nın canlılık üzerine etkileri



Şekil 4.16. LE ikinci alt kültürüne ait 4. saatteki veaş ve vs'nın canlılık üzerine etkileri



Şekil 4.17. LE ikinci alt kültürüne ait 96. saatteki veaş ve vs'nın canlılık üzerine etkileri

4.2.4. Vurgulu Elektrik Alan Uygulamasının Toplam Fenolik Madde Üzerine Etkisi

4.2.4.1. Vurgulu Elektrik Alan Uygulamasının Hücrelerdeki Toplam Fenolik Madde Üzerine Etkisi

Tablo 4.14’de LE hücrelerinin 1 ve 2. alt kültürlerindeki VEAŞ – VS ve SRS’ne bağlı olarak ölçülen ortalama toplam fenolik madde (TF) sonuçlarını gösteren tablo verilmiştir. Bu sonuçlara göre hesaplamalar yapılmış olup istatistiksel değerlendirmeler yorumlanmıştır.

Tablo 4.14. LE hücrelerinin 1 ve 2. alt kültürlerindeki VEAŞ – VS ve SRS’ne bağlı olarak ölçülen ortalama toplam fenolik madde (TF) sonuçları

VEAŞ(V/cm)- VS	SRS (saat)	1. AK- TF (mg/g KM)	2. AK- TF (mg/g KM)
0	0	1,368159412	2,320526
0	4	1,584005704	2,729131
0	96	1,839415141	1,815683
600-1	0	1,355347656	2,031977
600-1	4	1,245572934	1,712963
600-1	96	1,616583796	1,489846
600-9	0	1,613622656	2,319242
600-9	4	1,399535199	2,085672
600-9	96	1,811361655	1,645292
900-5	0	1,359413927	2,198939
900-5	4	1,56906906	2,40868
900-5	96	2,232838703	1,367656
1200-1	0	1,743112127	2,342208
1200-1	4	1,519239332	2,495992
1200-1	96	2,249305556	2,184903

Tablo 4.14'ün devamı			
1200-9	0	1,48542827	2,189518
1200-9	4	1,631662292	2,967748
1200-9	96	1,632639451	2,294845

VEAŞ-VS ve SRS etkilerinin birlikte değerlendirildiği iki yönlü MANOVA varyans analizi testi sonuçlarına bakıldığında tablo 4.15'ten de görüldüğü üzere VEAŞ-VS'nın LE birinci hücre alt kültüründe etkili olmadığı ($p > 0,05$) fakat ikinci hücre alt kültürlerindeki TF miktarları üzerinde etkisi olduğu ($p < 0,05$) saptanmıştır. Bu durumda ikinci alt kültürler değerlendirildiğinde VEAŞ ve VS göz önünde bulundurularak 1200 V/cm PEF şiddetine 1 ve 9 kere maruz kalmış hücrelerde toplam fenolik madde oranı 600 V/cm PEF şiddetine 1 kere maruz kalmış hücrelerden yüksek olmakla birlikte işlem görmemiş hücrelerle aralarında istatistiksel olarak bir fark bulunamamış ve 600 V/cm PEF şiddetine 9 kere ve 900 V/cm PEF şiddetine 5 kere maruz kalmış hücrelerle de aralarında benzerlik saptanmıştır. Buna ilaveten SRS'nin hem birinci hem ikinci alt kültürlerdeki TF miktarları üzerinde önemli etkisi olduğu ($p < 0,05$) bulunmuştur (tablo 4.16).

Tablo 4.16'da Duncan çoklu karşılaştırma sonuçlarına bakıldığında stres reaksiyon süresi bakımından 0 ve 4 saat beklemiş ve LE ikinci alt kültürdeki hücrelerde en yüksek toplam fenolik madde miktarının olduğu ve aralarında bir fark olmadığı saptanmıştır. Bununla birlikte 0 ve 4. saatteki toplam fenolik madde miktarları 96. saatte ölçümleri alınan TF miktarlarından farklıdır ($p < 0,05$).

Tablo 4.15. VEAŞ-VS 'nın LE 1. ve 2. Alt kültürlerindeki TF miktarı üzerindeki etkisini gösteren istatistikî sonuçlar

VEAŞ (V/cm) - VS	1. AK – TFh (mg)	2. AK – TFh (mg)
0	1,597 ± 0,102 ^{ab}	2,288 ± 0,148 ^b
600-1	1,406 ± 0,102 ^a	1,745 ± 0,148 ^a
600-9	1,608 ± 0,102 ^{ab}	2,017 ± 0,148 ^{ab}
900-5	1,720 ± 0,102 ^{ab}	1,992 ± 0,148 ^{ab}
1200-1	1,837 ± 0,102 ^b	2,341 ± 0,148 ^b
1200-9	1,583 ± 0,102 ^{ab}	2,484 ± 0,148 ^b

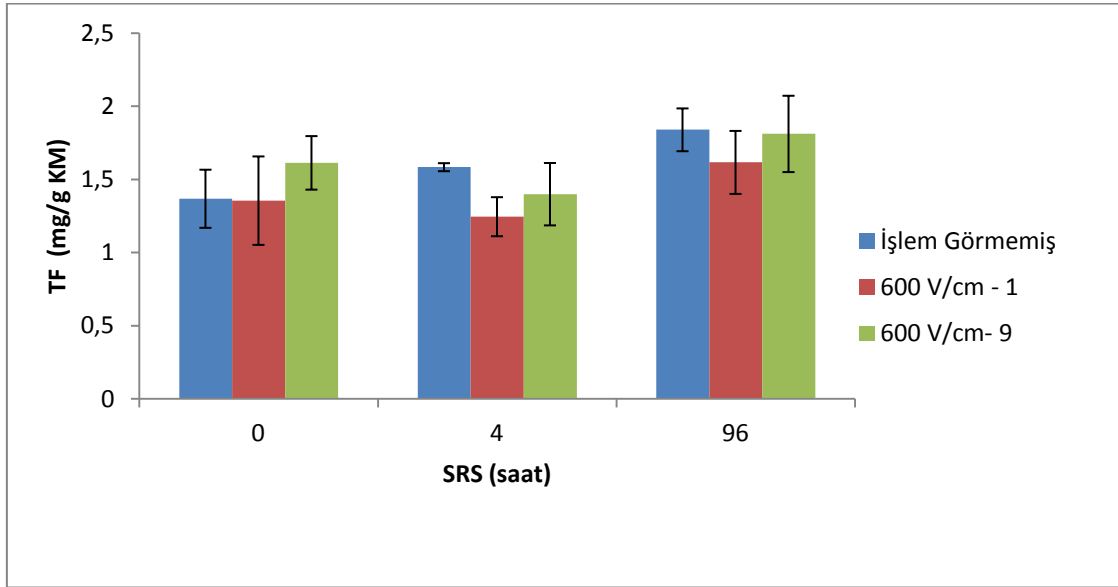
*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (p < 0,05).

Tablo 4.16. SRS 'nin LE 1. ve 2. Alt kültürlerindeki TF miktarı üzerindeki etkisini gösteren istatistikî sonuçlar

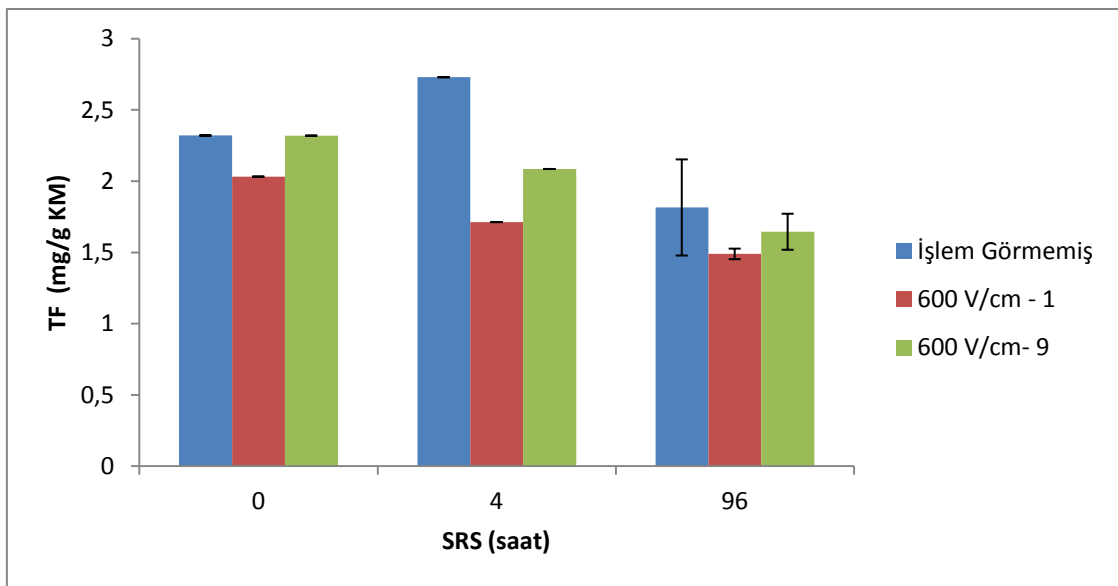
SRS (saat)	1. AK – TFh (mg)	2. AK – TFh (mg)
0	1,488 ± 0,072 ^a	2,234 ± 0,105 ^b
4	1,492 ± 0,072 ^a	2,400 ± 0,105 ^b
96	1,897 ± 0,072 ^b	1,800 ± 0,105 ^a

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (p < 0,05).

Şekil 4.18 ve 4.19'dan da görüldüğü üzere 600 V/cm vurgulu elektrik alan şiddeti uygulanmış hücrelerin strese maruz kaldıktan 96 saat sonra alınan ölçümlerinde toplam fenol miktarı 0 ve 4 saate göre yüksektir. Bununla birlikte 96. saatteki birinci alt kültürlerde ikinci alt kültüre göre TF miktarı yüksek olmakla birlikte birinci alt kültürdeki işlem görmüş hücrelerde kontrol örneğine göre TF miktarı daha düşüktür.

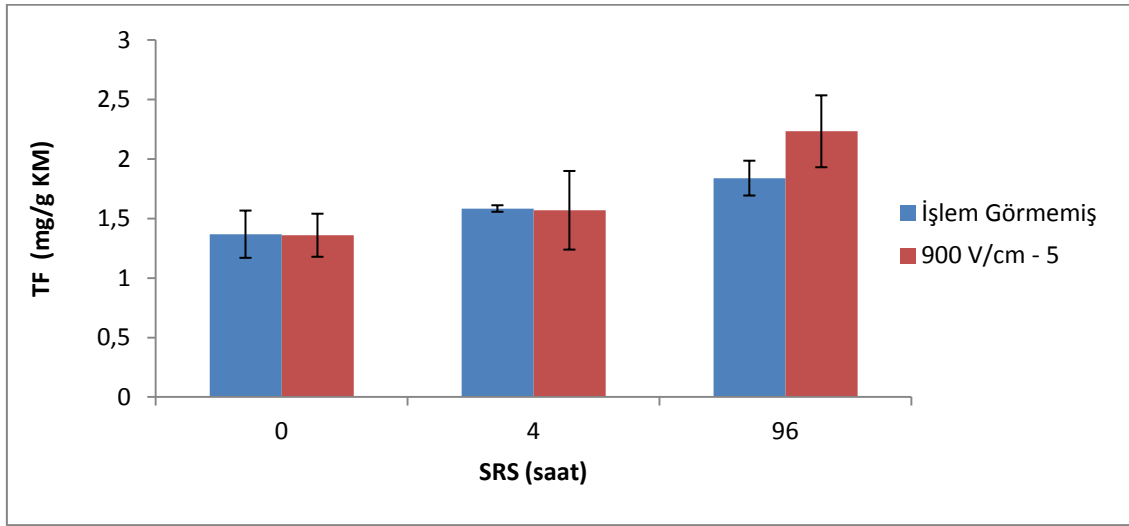


Şekil 4.18. LE 1. Alt kültüre ait 600 V/cm VEA şiddeti uygulanmış hücrelerin TF miktarındaki değişim

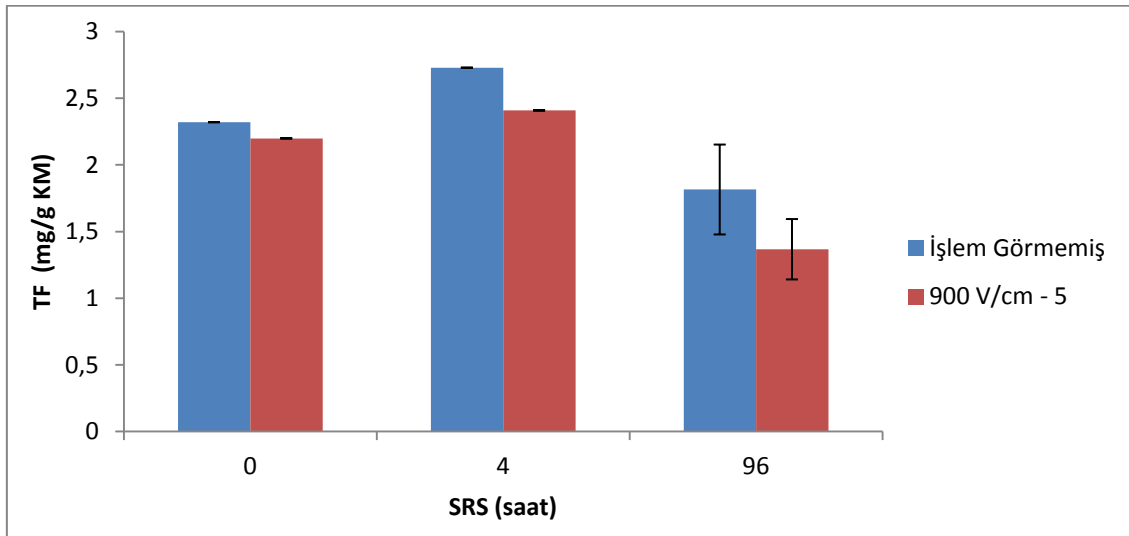


Şekil 4.19. LE 2. Alt kültüre ait 600 V/cm VEA şiddeti uygulanmış hücrelerin TF miktarındaki değişim

Şekil 4.20 ve 4.21'den de görüldüğü üzere 600 V/cm VEAŞ uygulanmış hücrelerde olduğu gibi 900 V/cm vurgulu elektrik alan şiddeti uygulanmış hücrelerin strese maruz kaldıktan 96 saat sonra alınan ölçümlerinde birinci alt kültürlerde toplam fenol miktarı 0 ve 4 saate göre yüksektir. Bununla birlikte ikinci alt kültürlerde strese maruz kaldıktan sonra 96 saat bekleyen hücrelerdeki TF miktarı 0 ve 4 saat beklemiş hücrelerdeki TF miktarından düşüktür. Birinci alt kültürlerde stres reaksiyon süresinin artmasıyla kontrol örneğine göre işlem görmüş örneklerde TF miktarı artış gösterirken ikinci alt kültürlerde strese maruz kaldıktan 4 saat sonrasına kadar TF miktarı artmış fakat 96 saat bekleyen hücrelerde düşmüştür. Ayrıca ikinci alt kültürlerde kontrol örneğine göre işlem görmüş hücrelerde TF miktarının daha düşük olduğu saptanmıştır.

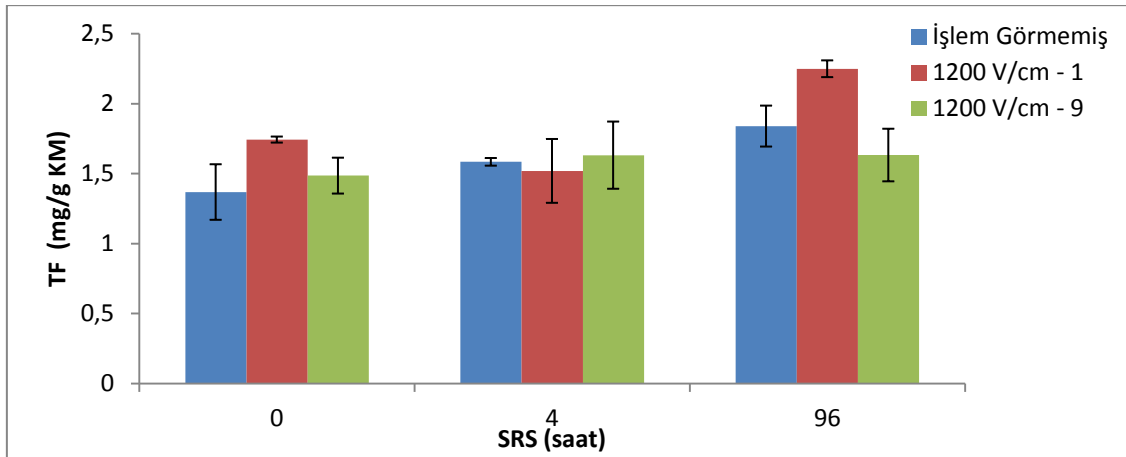


Şekil 4.20. LE 1. Alt kültüre ait 900 V/cm VEA şiddeti uygulanmış hücrelerin TF miktarındaki değişim

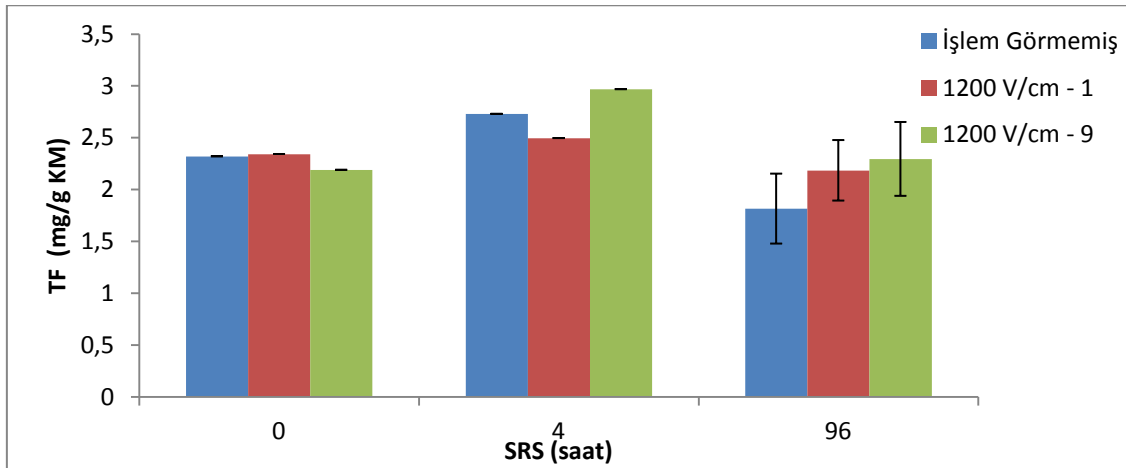


Şekil 4.21. LE 2. Alt kültüre ait 900 V/cm VEA şiddeti uygulanmış hücrelerin TF miktarındaki değişim

Şekil 4.22 ve 4.23'den de görüldüğü üzere 1200 V/cm vurgulu elektrik alan şiddeti uygulanmış birinci alt kültürdeki hücrelerin strese maruz kaldıktan 96 saat sonra alınan ölçümlerinde toplam fenol miktarı 0 ve 4 saate göre yüksektir. Bununla birlikte birinci alt kültüre zıt bir şekilde strese maruz kaldıktan 96 saat sonra ölçümleri alınan ikinci alt kültürlerde TF miktarı 0 ve 4 saat beklemiş hücrelerdeki TF miktarından daha düşüktür. Aynı zamanda birinci alt kültürdeki 1200 V/cm VEAŞ'nin 1 kere uygulanmış ve 4 saat beklemiş ve 1200 V/cm VEAŞ'nin 9 kere uygulanmış ve 96. saatte ölçümleri alınmış LE hücrelerin dışındaki işlem görmüş hücrelerde bulunan toplam fenol miktarı işlem görmemiş hücrelere göre yüksektir. İkinci alt kültürde ise 1200 V/cm VEAŞ'nin 9 kere uygulanmış ve hiç beklenmeden ölçümleri alınmış hücrelerin ve 1200 V/cm VEAŞ'nin 1 kere uygulanmış ve 4 saat bekledikten sonra ölçümleri alınmış hücrelerin dışındaki işlem görmüş hücrelerde bulunan toplam fenol miktarı kontrol örneklerine göre yüksektir.



Şekil 4.22. LE 1. Alt kültüre ait 1200 V/cm VEA şiddeti uygulanmış hücrelerin TF miktarındaki değişimi



Şekil 4.23. LE 2. Alt kültüre ait 1200 V/cm VEA şiddeti uygulanmış hücrelerin TF miktarındaki değişimi

4.2.4.2. Vurgulu Elektrik Alan Uygulamasının Besiyerindeki Toplam Fenolik Madde Üzerine Etkisi

Bitki doku kültürlerinde stres yaratılarak hücrelerde fenolik madde bileşen miktarlarının incelenmiştir. Bununla birlikte stres ile birlikte membran geçirgenliklerinin artması ve buna bağlı olarak hücrelerin bulunduğu besiyerlerine üretilen fenolik maddelerin geçme ihtimali düşünülerek besiyerlerinde de toplam fenolik madde ölçümleri yapılmıştır.

Tablo 4.17’de LE besiyerlerinin 1 ve 2. alt kültürlerindeki VEAŞ – VS ve SRS’ne bağlı olarak ölçülen ortalama toplam fenolik madde (TF) sonuçlarını gösteren tablo verilmiştir. Bu sonuçlara göre hesaplamalar yapılmış olup istatistiksel değerlendirmeler yorumlanmıştır.

Tablo 4.17. LE besiyerlerinin 1 ve 2. alt kültürlerindeki VEAŞ – VS ve SRS’ne bağlı olarak ölçülen ortalama toplam fenolik madde (TF) sonuçları

VEAŞ(V/cm)- VS	SRS (saat)	1. AK- TF (mg GAE/L)	2. AK- TF (mg GAE/L)
0	0	14,51972	10,81439
0	4	13,72329	17,32178
0	96	23,46979	20,73572
600-1	0	13,96125	27,6656
600-1	4	14,9325	20,02671
600-1	96	21,24563	24,37306
600-9	0	15,26272	9,420649
600-9	4	14,6654	18,49699
600-9	96	25,55798	25,39287
900-5	0	14,32061	16,04944
900-5	4	13,62131	16,36995
900-5	96	24,03312	24,12539
1200-1	0	14,1992	22,27516

Tablo 4.17'nin devamı			
1200-1	4	15,35014	16,84586
1200-1	96	19,77904	41,72883
1200-9	0	16,6419	20,61917
1200-9	4	14,46144	19,48281
1200-9	96	20,59975	46,54138

VEAŞ-VS ve SRS etkilerinin birlikte değerlendirildiği iki yönlü MANOVA varyans analizi testi sonuçlarına bakıldığında tablo 4.18'den de görüldüğü üzere VEAŞ-VS'nin LE birinci ve ikinci hücre alt kültürlerindeki TF miktarları üzerinde etkisi olmadığı ($p > 0,05$) saptanmıştır. Fakat SRS'nin hem birinci hem ikinci alt kültürlerdeki TF miktarları üzerinde önemli etkisi olduğu ($p < 0,05$) bulunmuştur (tablo 4.19).

Tablo 4.19'da Duncan çoklu karşılaştırma sonuçlarına bakıldığında stres reaksiyon süresi bakımından 96 saat beklemiş LE hem birinci ve hem de ikinci alt kültürdeki besiyerlerinde en yüksek toplam fenolik madde miktarı elde edilmiştir. Ayrıca 0 ve 4. saatte ölçümleri alınan toplam fenolik madde miktarlarının hem birinci hem de ikinci alt kültürlerde benzer ortalama gösterdiği saptanmıştır.

Tablo 4.18. VEAŞ-VS 'nın LE besiyerindeki 1. ve 2. Alt kültürlerinde bulunan TF miktarı üzerindeki etkisini gösteren istatistiki sonuçlar

VEAŞ (V/cm) - VS	1. AK – TFb (mg GAE/L)	2. AK – TFb (mg GAE/L)
0	17,238 ± 0,913 ^a	16,291 ± 3,797 ^a
600-1	16,713 ± 0,913 ^a	24,022 ± 3,797 ^a
600-9	18,495 ± 0,913 ^a	17,770 ± 3,797 ^a
900-5	17,325 ± 0,913 ^a	18,848 ± 3,797 ^a
1200-1	16,443 ± 0,913 ^a	26,950 ± 3,797 ^a
1200-9	17,234 ± 0,913 ^a	28,881 ± 3,797 ^a

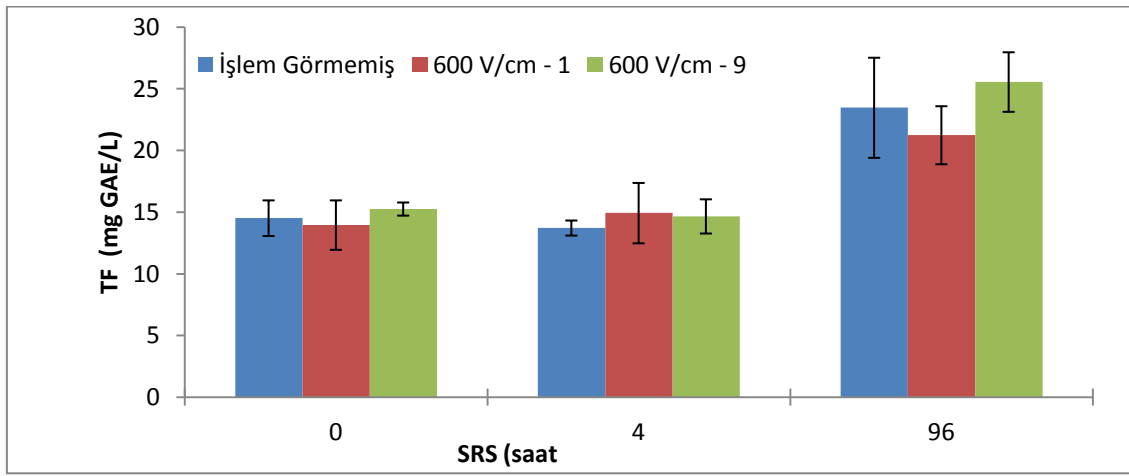
*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (p < 0,05).

Tablo 4.19. SRS 'nin LE besiyerindeki 1. ve 2. Alt kültürlerinde bulunan TF miktarı üzerindeki etkisini gösteren istatistiki sonuçlar

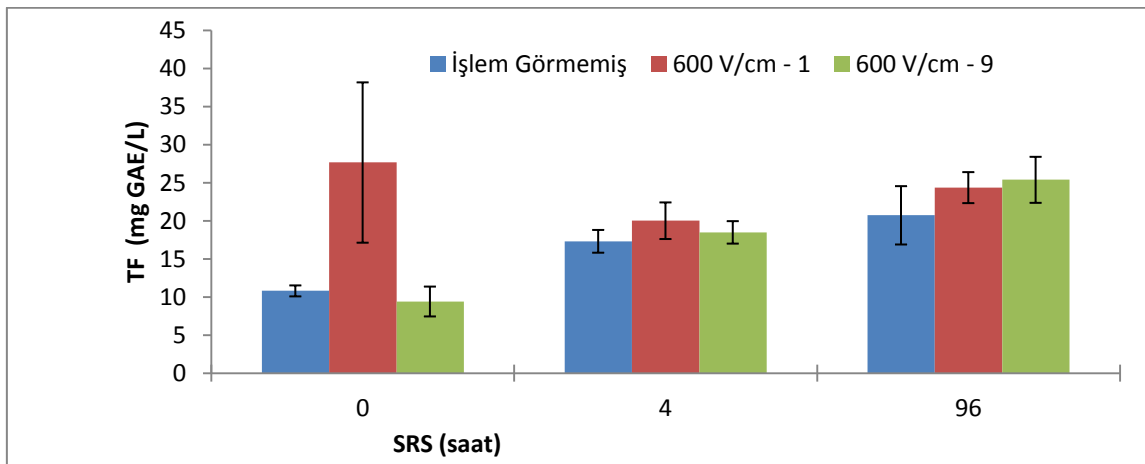
SRS (saat)	1. AK – TFb (mg GAE/L)	2. AK – TFb (mg GAE/L)
0	14,818 ± 0,646 a	17,807 ± 2,685 a
4	14,459 ± 0,646 a	18,091 ± 2,685 a
96	22,448 ± 0,646 b	30,483 ± 2,685 b

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (p < 0,05).

Şekil 4.24 ve 4.25'dan görüldüğü üzere 600 V/cm vurgulu elektrik alan şiddeti uygulanmış besiyerlerinin strese maruz kaldıktan 96 saat sonra alınan ölçümlerinde toplam fenol miktarı 0 ve 4 saate göre yüksektir (2. alt kültürdeki 600 V/cm elektrik alan şiddetinde 1 kere strese maruz kaldıktan hemen sonraki besiyerlerindeki TF miktarı hariçtir). Burada standart sapmanın da yüksek çıkması yapılan ölçümlerden veya besiyerleri dondurulup çözündürüldüğü için toplam fenol miktarında değişiklik yarattığından bu durum ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte 96. saatteki ikinci alt kültürlerde birinci alt kültüre ve ikinci alt kültürdeki işlem görmüş hücrelerde kontrol örneğine göre TF miktarı daha yüksektir.

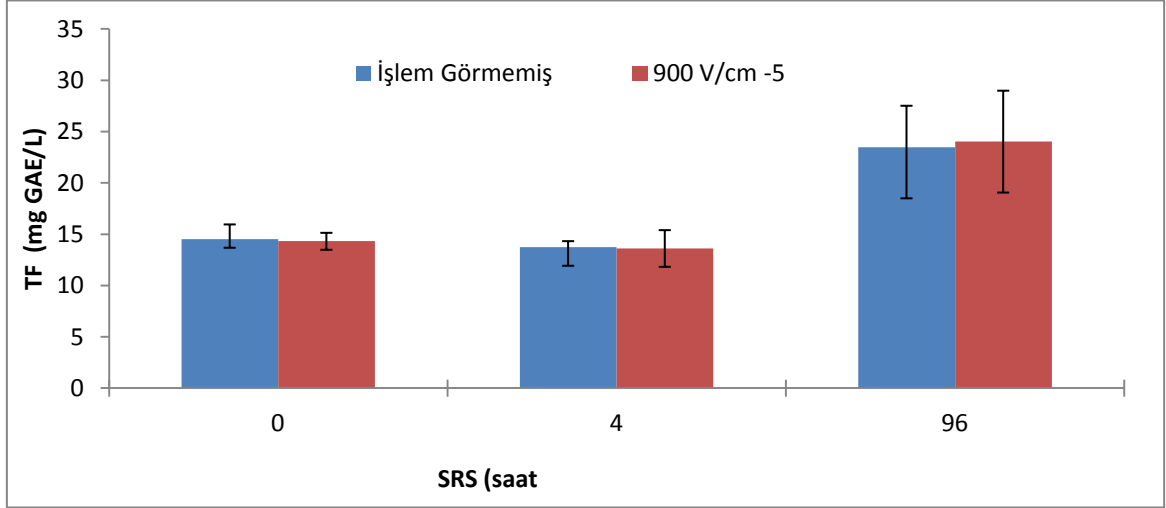


Şekil 4.24. LE 1. Alt kültüre ait 600 V/cm VEA şiddeti uygulanmış besiyerlerinin TF miktarındaki değişimi

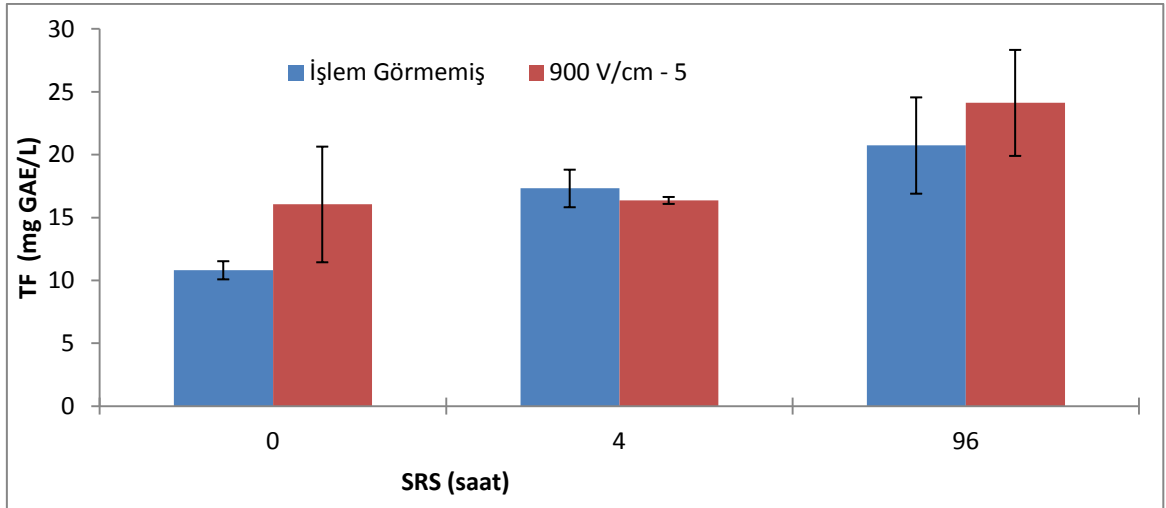


Şekil 4.25. LE 2. Alt kültüre ait 600 V/cm VEA şiddeti uygulanmış besiyerlerinin TF miktarındaki değişimi

Şekil 4.26 ve 4.27’den de görüldüğü üzere 900 V/cm vurgulu elektrik alan şiddeti uygulanmış kültürlerin strese maruz kaldıktan 96 saat sonra alınan ölçümlerinde toplam fenol miktarı 0 ve 4 saate göre yüksektir. Bununla birlikte aynı şekilde 96. saatteki 2. alt kültürlerde 1. alt kültüre ve 2. alt kültürdeki işlem görmüş hücrelerde kontrol örneğine göre TF miktarı daha yüksektir.

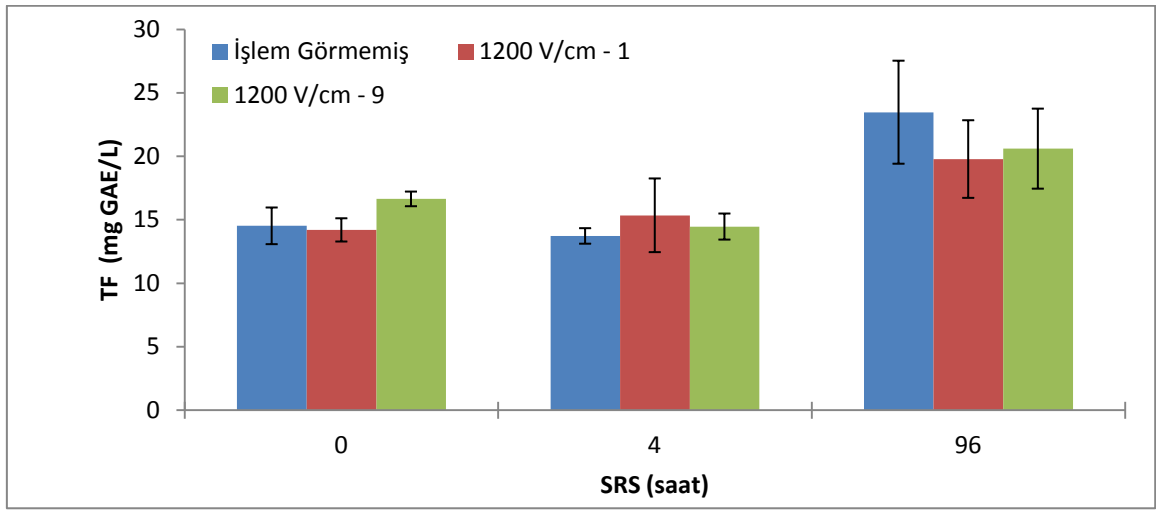


Şekil 4.26. LE 1. Alt kültüre ait 900 V/cm VEAŞ şiddeti uygulanmış besiyerlerinin TF miktarındaki değişimi

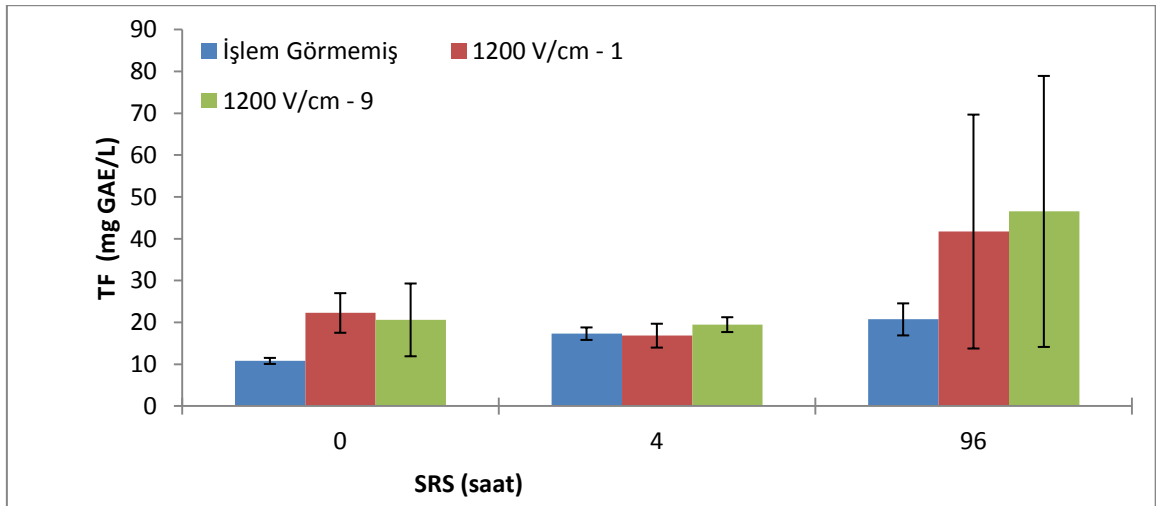


Şekil 4.27. LE 2. Alt kültüre ait 900 V/cm VEA şiddeti uygulanmış besiyerlerinin TF miktarındaki değişimi

Şekil 4.28 ve 4.29'dan da görüldüğü üzere 1200 V/cm vurgulu elektrik alan şiddeti uygulanmış hücrelerin strese maruz kaldıktan 96 saat sonra alınan ölçümlerinde toplam fenol miktarı 0 ve 4 saate göre yüksektir. Bununla birlikte 96. saatteki 2. alt kültürlerde standart sapma oldukça yüksek olmakla birlikte 1. alt kültürlerle göre TF miktarı yüksektir. Standart sapmanın yüksek oluşu deneysel hatadan kaynaklanabileceği gibi dondurulup çözündürmekten de kaynaklanabilmektedir.



Şekil 4.28. LE 1. Alt kültüre ait 1200 V/cm VEA şiddeti uygulanmış besiyerlerinin TF miktarındaki değişimi



Şekil 4.29. LE 2. Alt kültüre ait 1200 V/cm VEA şiddeti uygulanmış besiyerlerinin TF miktarındaki değişimi

4.2.5. Vurgulu Elektrik Alan Uygulamasının Fenilalanin Amonyum Liyaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Tablo 4.20’de LE besiyerlerinin 1 ve 2. alt kültürlerindeki VEAŞ – VS ve SRS’ne bağlı olarak ölçülen ortalama PAL enzim aktivitesi sonuçlarını gösteren tablo verilmiştir. Bu tabloya göre hesaplamalar yapılmış ve sonuçlar grafiklerle desteklenmiş istatistikî değerlendirmeler ile birlikte yorumlanmıştır.

Tablo 4.20. LE besiyerlerinin 1 ve 2. alt kültürlerindeki VEAŞ – VS ve SRS’ne bağlı olarak ölçülen ortalama PAL enzim aktivitesi sonuçları

VEAŞ(V/cm)- VS	SRS (saat)	1. AK- PAL (Birim /g KM)	2. AK – PAL (Birim /g KM)
0	0	5,621	9,083
0	4	21,229	3,524
0	96	30,484	9,698
600-1	0	43,923	10,135
600-1	4	51,832	12,154
600-1	96	70,724	20,013
600-9	0	25,208	17,402
600-9	4	40,816	11,843
600-9	96	50,071	18,017
900-5	0	63,509	18,454
900-5	4	71,418	20,473
900-5	96	90,310	28,332
1200-1	0	15,096	19,770

Tablo 4.20'nin devamı			
1200-1	4	30,704	14,211
1200-1	96	39,958	20,385
1200-9	0	53,397	20,822
1200-9	4	61,306	22,841
1200-9	96	80,198	30,7

VEAŞ-VS ve SRS etkilerinin birlikte değerlendirildiği iki yönlü MANOVA varyans analizi testi sonuçlarına bakıldığında VEAŞ-VS'nin LE birinci alt kültürlerindeki PAL enzim aktivitesi üzerinde çok önemli etkisi olduğu ($p < 0,05$) görülürken ikinci alt kültürler üzerinde etkisinin olmadığı saptanmıştır ($p > 0,05$). Bununla birlikte SRS'nin hem birinci hem ikinci alt kültürlerdeki PAL miktarları üzerinde önemli etkisi olduğu ($p < 0,05$) bulunmuştur.

Tablo 4.21'de Duncan çoklu karşılaştırma sonuçlarına bakıldığında vurgulu elektrik alan şiddeti ve vurgu sayısı bakımından en yüksek aktivite 1200 V/cm elektriksel alan şiddetine 9 kere vurgu yapılmış birinci alt kültürlerde olduğu ve diğer değişkenlerden farklı olduğu görülmektedir. Ayrıca 900 V/cm 5 kere ve 1200 V/cm 1 kere vurgu yapılan birinci alt kültürlerde VEAŞ-VS benzer etkiyi yapmaktadır. Birinci alt kültürlerde işlem görmüş kültürlerin kontrol örneklerine göre farklı etki gördüğü ve 600 V/cm elektriksel alan şiddetine maruz kalmış örneklerde vurgu sayısının 1 kere ve 9 kere yapılması da bu örneklerde farklı etki yaratmaktadır. İkinci alt kültürlerde VEAŞ-VS önemli bir etkiye sahip değildir.

Tablo 4.21. VEAŞ-VS 'nın LE besiyerindeki 1. ve 2. alt kültürlerinde bulunan PAL enzim aktivitesi üzerindeki etkisini gösteren istatistiki sonuçlar

VEAŞ (V/cm) - VS	1. AK – PAL (Birim/g KM)	2. AK – PAL (Birim/g KM)
0	15,3083 ± 3,215 ^a	15,4180 ± 4,300 ^{ab}
600-1	30,9164 ± 3,215 ^b	9,8594 ± 4,300 ^a
600-9	40,1709 ± 3,215 ^c	16,0332 ± 4,300 ^{ab}
900-5	53,6096 ± 3,215 ^d	16,4703 ± 4,300 ^{ab}
1200-1	61,5188 ± 3,215 ^d	18,4893 ± 4,300 ^{ab}
1200-9	80,4106 ± 3,215 ^e	26,3483 ± 4,300 ^b

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (p < 0,05).

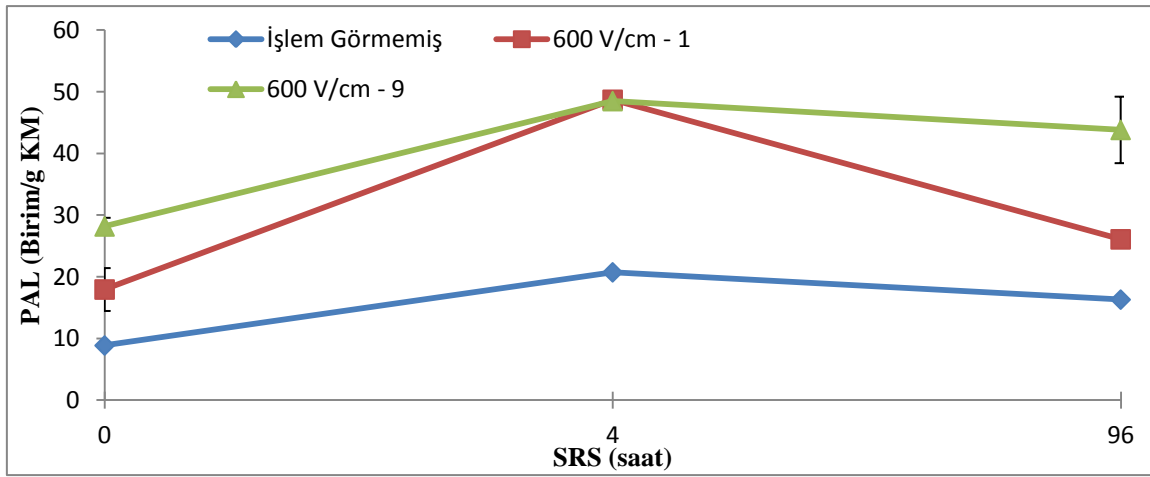
Tablo 4.22'de görüldüğü üzere farklı stres reaksiyon süreleri (SRS) birinci alt kültürdeki örneklerde farklı etki yaratırken ikinci alt kültürdeki örneklerde 4 ve 96. saatlerde benzer etkiyi göstermektedir. Bununla birlikte en yüksek enzim aktivitesi birinci alt kültürlerde strese maruz kaldıktan 4 saat sonra ölçümleri alınan örneklerde olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.22. SRS 'nin LE besiyerindeki 1. ve 2. alt kültürlerinde bulunan PAL enzim aktivitesi üzerindeki etkisini gösteren istatistiki sonuçlar

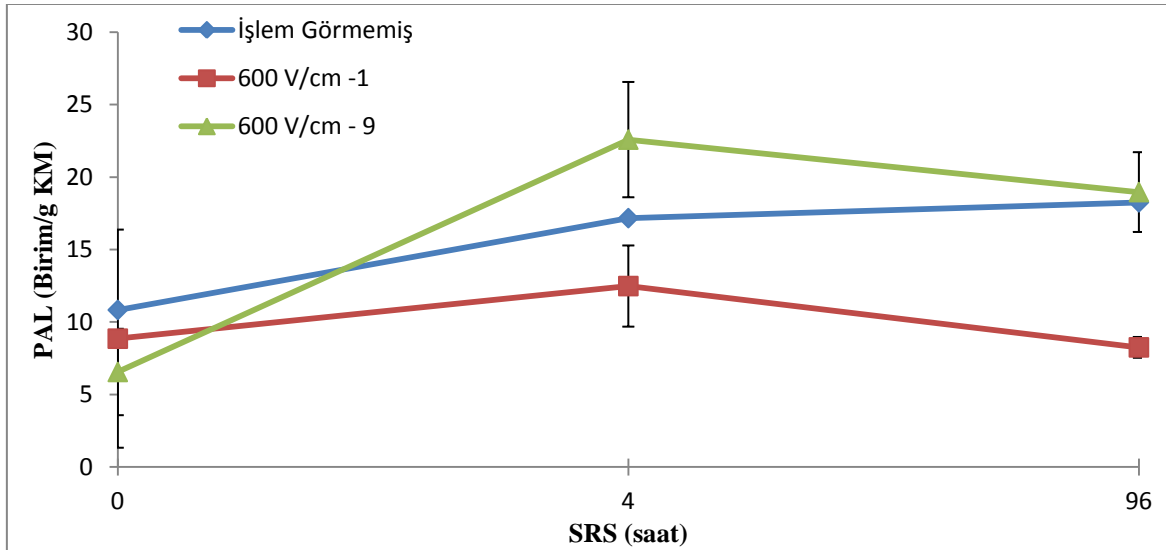
SRS (saat)	1. AK- PAL (Birim /g KM)	2. AK – PAL (Birim /g KM)
0	37,3021 ± 3,215 ^a	10,7678 ± 4,300 ^a
4	56,8887 ± 3,215 ^c	19,0869 ± 4,300 ^b
96	46,7765 ± 3,215 ^b	21,4547 ± 4,300 ^b

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (p < 0,05).

Şekil 4.30 ve 4.31 birlikte incelendiğinde birinci alt kültürlerde 600 V/cm elektriksel alana maruz kalmış örneklerin işlem görmemişlere göre PAL aktivitesinin yüksek olduğu fakat ikinci alt kültürlerde 600 V/cm elektriksel alanın 9 kere vurgu yapıldığı hücrelerde yüksek olduğu görülmektedir. Bununla birlikte her iki alt kültürde strese maruz kaldıktan 4 saat sonra enzim aktiviteleri en yüksek olurken 4 saatten fazla beklenildiğinde düşüş olmaya başlamıştır. Bu durumda 600 V/cm uygulanan LE hücre kültürlerinde 9 kere vurgu yapıлып strese maruz kaldıktan sonra 4 saat beklemek enzim aktivitesini arttırmıştır.

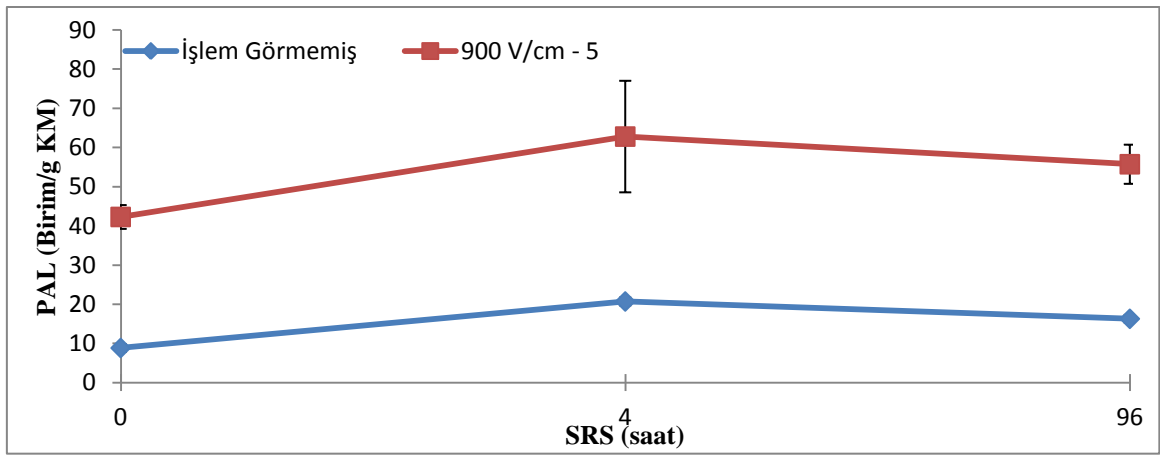


Şekil 4.30. LE 1. Alt kültüre ait 600 V/cm VEA şiddeti uygulanmış örneklerin işlem görmemiş örneklere göre PAL aktivitesindeki değişimi

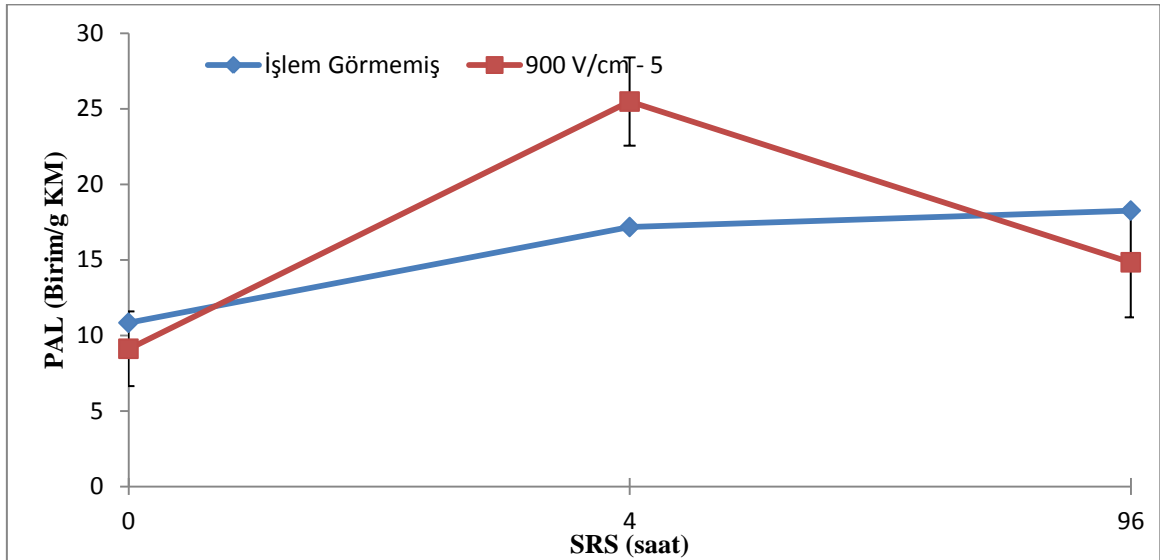


Şekil 4.31. LE 2. Alt kültüre ait 600 V/cm VEA şiddeti uygulanmış örneklerin işlem görmemiş örneklere göre PAL aktivitesindeki değişimi

Şekil 4.32 ve 4.33 birlikte incelendiğinde hem birinci hem de ikinci alt kültürlerde 900 V/cm elektriksel alana maruz kalmış örneklerin işlem görmemişlere göre PAL aktivitesinin yüksek olduğu görülmektedir. Bununla birlikte 600 V/cm elektriksel alana maruz kalmış LE kültürlerinde olduğu gibi 900 V/cm elektriksel alana maruz kalmış kültürlerde de strese maruz kaldıktan 4 saat sonra enzim aktiviteleri en yüksek olurken 4 saatten fazla beklenildiğinde düşüş olmaya başlamıştır. Ayrıca birinci alt kültürlerde enzim aktiviteleri ikinci alt kültürlere oranla daha yüksektir.

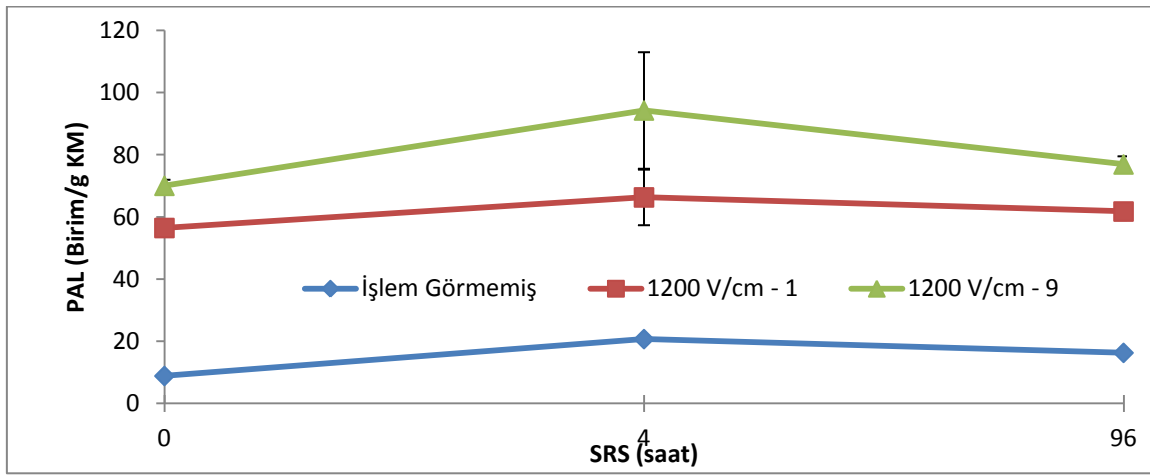


Şekil 4.32. LE 1. Alt kültüre ait 900 V/cm VEA şiddeti uygulanmış örneklerin işlem görmemiş örneklere göre PAL aktivitesindeki değişimi

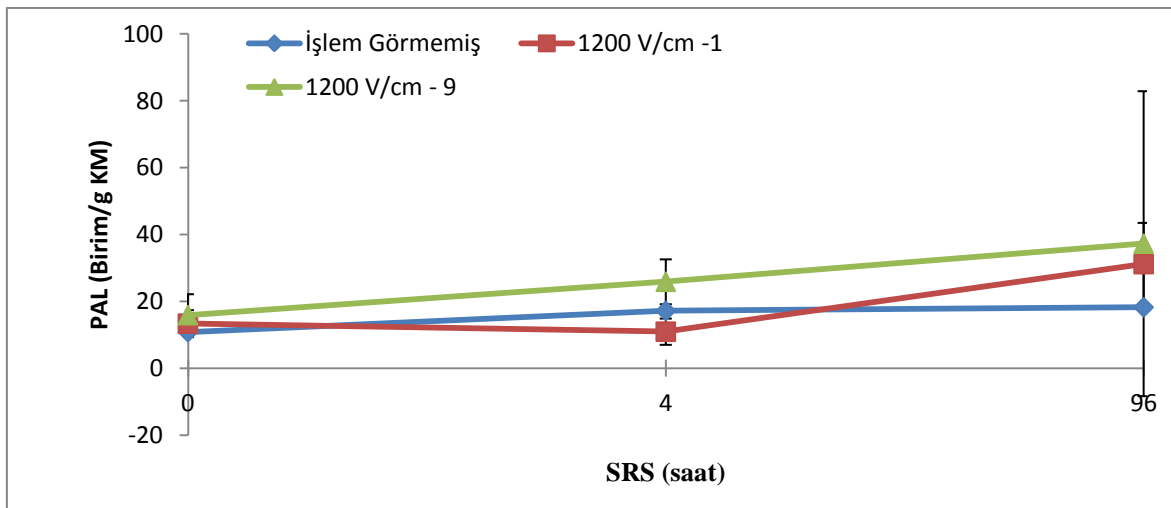


Şekil 4.33. LE 2. Alt kültüre ait 900 V/cm VEA şiddeti uygulanmış örneklerin işlem görmemiş örneklere göre PAL aktivitesindeki değişimi

Şekil 4.34 ve 4.35 birlikte incelendiğinde birinci alt kültürlerde 1200 V/cm elektriksel alana maruz kalmış örneklerin işlem görmemişlere göre PAL aktivitesinin yüksektir. ikinci alt kültürlerde ise vurgulu elektrik alan ve vurgu sayısının etkisi istatistiki olarak önemsizdir. Bu durumda her iki alt kültüre etki eden stres reaksiyon süresidir. Hem bir hem de ikinci alt kültürler için strese maruz kaldıktan 4 saat sonraki alınan ölçümlerde 2. alt kültürlerde 1200 V/cm 1 kere vurgu yapılan hücreler hariç hepsinde enzim aktivitesi artmıştır. Ayrıca birinci alt kültürlerde enzim aktiviteleri ikinci alt kültürlerle oranla daha yüksektir. Yalnız burada ikinci alt kültürlerde istatistiki açıdan vurgulu elektrik alanın önem arz etmemesi ikinci alt kültürlerde enzim aktivitesinin düşük olduğunu göstermez.



Şekil 4.34. LE 1. Alt kültüre ait 1200 V/cm VEA şiddeti uygulanmış örneklerin işlem görmemiş örneklere göre PAL aktivitesindeki değişimi



Şekil 4.35. LE 2. Alt kültüre ait 1200 V/cm VEA şiddeti uygulanmış örneklerin işlem görmemiş örneklere göre PAL aktivitesindeki değişimi

4.2.6. Toplam Fenolik Madde Miktarı ile Fenilalanin Amonyum Liyaz Enzim Aktivitesi Korelasyonu

Primer ve sekonder metabolizmaların dallanma noktasında yer alan fenilalanin amonyum liyaz enzim aktivitesi sonucu fenilalaninden sekonder olarak fenolik bileşikler oluşmaktadır (Dixon, 1995). Bu ilişkiden ötürü toplam fenolik madde miktarı ile PAL enzim arasındaki korelasyon incelenmiştir.

Tablo 4.23’de LE birinci ve ikinci alt kültürlerindeki hücrelerin ve besiyerlerinin toplam fenolik madde miktarları, fenilalanin amonyum liyaz enzim aktivitesi sonuçlarını gösteren tablo verilmiştir. Bu sonuçlar kullanılarak hücrelerdeki ve besiyerlerindeki TF miktarları ve PAL enzim aktivitelerinin birbirileri ile ilişkileri SPSS 18 programı korelasyon modeli kullanılarak istatistiksel olarak verilmiştir.

Tablo 4.23. LE birinci ve ikinci alt kültürlerindeki hücrelerin ve besiyerlerinin toplam fenolik madde miktarları, fenilalanin amonyum liyaz enzim aktiviteleri sonuçları

1. AK- TFh (mg)	2.AK- TFh (mg)	1.AK- TFb (mg GAE/L)	2.AK-TFb (mg GAE/L)	1.AK PAL (Birim/g KM)	2.AK PAL (Birim/g KM)
0,46	0,64	14,52	10,81	8,87	10,83
0,58	0,8	13,72	17,32	20,74	17,17
1,5	1,21	23,47	20,74	16,31	18,26
0,53	0,56	13,96	27,67	17,95	8,85
0,38	0,53	14,93	20,03	48,71	12,48
1,58	1,09	21,25	24,37	26,09	8,25
0,49	0,58	15,26	9,42	28,18	6,55
0,65	0,61	14,67	18,5	48,5	22,58
1,5	1,27	25,56	25,39	43,83	18,96
0,49	0,57	14,32	16,05	42,29	9,11
0,55	0,7	13,62	16,37	62,8	25,47

Tablo 4.23'ün devamı					
1,78	1,03	24,03	24,13	55,74	14,83
0,4	0,61	14,2	22,28	56,47	13,36
0,5	0,66	15,35	16,85	66,31	10,95
1,84	1,64	19,78	41,73	61,77	31,16
0,48	0,63	16,64	20,62	70,04	15,91
0,54	0,54	14,46	19,48	94,27	25,87
1,35	1,7	20,6	46,54	76,92	37,26

Tablo 4.24'de görüldüğü üzere birinci alt kültürlerdeki hücrelerin toplam fenolik madde miktarındaki değişimle yine 1. alt kültürdeki besiyerlerinin TF miktarındaki değişim arasında pozitif yönde, orta düzeyde ve önemli bir ilişki ($r = 0,905$; $p = 0,002$) bulunmuştur. Bu durum LE bitki doku kültürlerindeki hücrelerde ve besiyerinde bulunan toplam fenol miktarının paralel bir şekilde arttığını veya azaldığını gösterir. Bununla birlikte birinci alt kültürdeki besiyerlerinde bulunan TF miktarındaki değişim ile ikinci alt kültürdeki LE bitki doku kültürü hücrelerinde bulunan TF miktarındaki değişim arasında negatif yönde orta düzeyde ve önemli bir ilişki saptanmıştır ($r = -0,686$; $p = 0,002$).

PAL enzim aktivitesinin ise enzimlerin alt kültürleri arasında ve ikinci alt kültürdeki enzimler ile hücrelerde ve besiyerlerinde bulunan TF miktarları arasında çok önemli ilişkiler bulunmuştur. Buna göre enzimlerin 1. ve 2. alt kültürleri arasında pozitif yönde, orta düzeyde ve önemli ($r = 0,592$; $p = 0,010$) korelasyon vardır. Bununla birlikte 2. alt kültürlerdeki enzim aktiviteleri ile yine 2. alt kültürlerdeki besiyerlerinin TF miktarındaki değişim arasında pozitif yönde, orta düzeyde ve önemli bir ilişki ($r = 0,676$; $p = 0,002$) olmaktadır.

Tablo 4.24. LE 1. ve 2. alt kültürlerdeki hücrelerde ve besiyerlerindeki toplam fenolik madde miktarları, fenilalanin amonyum liyaz enzim aktivitelerinin birbirileri ile korelasyonunu gösteren istatistiki sonuçlar

Korelasyon katsayısı (r)	1.TFh	2.TFh	1.TFb	2.TFb	1.PAL	2.PAL
1.TFh	1	-0,263	0,670**	0,459	0,201	0,371
2.TFh	-0,263	1	-0,686**	-0,185	0,320	0,260
1.TFb	0,670**	-0,686**	1	0,467	-0,023	0,221
2.TFb	0,459	-0,185	0,467	1	0,356	0,676**
1.PAL	0,201	0,320	-0,023	0,356	1	0,592**
2.PAL	0,371	0,260	0,221	0,676**	0,592**	1

** p < 0,01.

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada ilk aşamada *Lycopersicon esculentum* bitki doku kültürünün zamana bağlı olarak 17 gün süren depolama süresi boyunca gelişme eğrisi oluşturulmuştur. İkinci aşamada LE bitki doku kültürü 14 günlük depolama sonunda 2 kere alt kültüre alınmıştır. Alt kültürlerde gelişme eğrisi referans alınarak lineer fazın başladığı (depolamanın 6. günü) zaman PEF uygulaması bitki doku kültürler üzerinde denenmiş ve strese maruz kaldıktan hemen sonra (0.saat), 4 ve 96 saat sonra hücrelerdeki biyoaktif maddelerin değişimleri analiz edilmiştir.

Kültüre alınmış bitki hücreleri in vitro koşullarda birçok avantaj sağlamaktadır. Bunların arasında en önemlilerinden biri hücre kültürlerinin bütün bir bitkiden daha yüksek oranda metabolizmaya sahip olduğudur. Çünkü hücre gelişimini kültürde başlatmak hücre kütlelerinde hızlı bölünmeye yol açar. Bundan dolayıdır ki sekonder metabolit oluşumu yaklaşık iki ile dört hafta gibi kısa bir gelişme zamanında meydana gelir (Dörnenburg ve Knorr, 1995). Alt kültüre alma işlemi ise bitki doku kültürlerindeki hücre canlılığı ve yenilenmesi açısından dikkate alınmalıdır. Kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinin uzun süre muhafaza edebilmesinde kültürlerin alt kültürlerinin oluşturulması önem arz eder (Sökmen, 2001). Hücre süspansiyon kültürlerinde hücrenin canlılığını yitirmekten kaçınmak için hücreler duraklama fazına erişmeden kültürler alt kültüre aşılmalıdır (Nunez-Paleniuss vd., 2005).

İlk aşamada LE bitki doku kültürüne ait gelişme eğrisinin oluşturulması kültürlerin ne kadar süre ile depolanarak, hangi zamanda alt kültüre alınacağı ve vurgulu elektrik alan uygulamasının hangi fazda yapılacağı hususunda gerekli görülmüştür. Bu sebeple LE bitki doku kültürüne ait gelişme eğrisinin kuru madde ve yaş ağırlıklarına göre büyüme hızı incelendiğinde depolamanın 3. gününden sonra logaritmik faza girerek hızlı hücre bölünmesi ile hücre sayısında üssel artış gerçekleşmiştir. Altıncı gün itibari ile lineer faz başlamış ve on üçüncü güne kadar kültürlerin yaş ve kuru ağırlıklarının arttığı hücre popülasyonundaki doğrusal artış devam etmiştir. 13. günden sonra besiyerindeki bitki gelişmesinde rol oynayan bileşenlerin azalması ve hücre kalıntı birikimine bağlı olarak büyüme hızında yavaşlama ve ardından duraklama fazına geçiş olmuştur. Kuru madde ve yaş ağırlıkların ölçümlerinin yanı sıra TTC testi ile canlılık ölçümünde hücrelerdeki

canlılık log fazın başlaması ile birlikte hızlı bir artış göstermiş ve lineer fazda artış yavaşlamış ve lineer fazdan sonra canlılık azalmıştır. Bunlara ek olarak depolama süresi boyunca hücrelerde ve besiyerlerinde bulunan toplam fenolik madde ölçümlerinde hücrelerde lineer fazın ortalarına kadar fenolik maddede bir düşüş gerçekleşmiş ardından depolama süresinin sonuna kadar artmaya başlamıştır. Bu durum hücre bölünmelerinin hızlı gerçekleştiği fazlarda hücrelerin fenolik maddeleri kullandığı şeklinde yorumlanabilir (Ververidis vd., 2007). Bununla birlikte besiyerlerinde hücrelerdeki zıt bir şekilde lineer fazın ortalarına kadar artış olmuştur. Bu durum da hücrelerde üretilen polifenollerin besiyerine geçmesiyle açıklanabilir. Ayrıca polifenol üretimini tetikleyen fenilalanin amonyum liyaz enzimi (PAL) lineer faza kadar hızlı bir artış göstermiş ardından hızlı bir düşüş ile birlikte ardından tekrar artarak inokülasyonun yapıldığı zamandaki aktivitesine yakın bir seviyede seyretmiştir. Tüm bu bilgilerin ışığında ve literatür çalışmalarına bağlı olarak LE bitki doku kültürüne ait gelişme eğrisinin incelenmesi ile hücrelerin duraklama fazına geçmeden depolamanın 14. günü alt kültüre alma işlemleri yapılmıştır. Yine LE gelişme eğrisinde yapılan ölçümler dikkate alınarak ve Sökmen'nin (2001) de belirttiği üzere *Daucus carota* hücre süspansiyon kültürlerinde büyüme kinetiği ve metabolit birikimi incelendiğinde lag ve log fazlarında antosiyanin birikimi görülmediğinden vurgulu elektrik alan uygulamasının lineer fazın başladığı gün (altıncı gün) işleme konulması uygun bulunmuştur.

İkinci aşamada, yapılan analizlerden elde edilen sonuçlara göre Hermann'nın (2010) *Vitis vinifera* bitki hücre kültürlerine PEF uyguladığı araştırma sonuçlarında da olduğu gibi işlem görmüş ve görmemiş LE bitki doku kültürleri kıyaslandığında işlem odacıklarına transfer ve PEF uygulamasına kadar olan taşımadan kaynaklı oluşan mekanik stresin dışında PEF uygulaması ile tetiklenmiş stres reaksiyonlarının oluştuğu tespit edilmiştir.

Biyokütlerdeki artışın takibi için yapılan kuru madde analiz sonuçlarına göre birinci ve ikinci alt kültürlerdeki LE bitki doku hücreleri için vurgulu elektrik alan şiddeti ve vurgu sayısının kuru madde miktarı üzerinde etkisinin olmadığı ($p > 0,05$) fakat stres reaksiyon sürelerinin önemli etkisi ($p < 0,05$) olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte her iki alt kültürdeki hücrelerde strese maruz kaldıktan 0 ve 4 saat sonra en yüksek kuru madde miktarı görülmüş ve 0. saatte ölçümleri alınan hücrelerdeki ortalama KM miktarlarıyla 4. saatte ölçümleri alınanların aralarında istatistiksel bir farklılığa rastlanılmamıştır. Ayrıca 2. kez alt kültüre alınan hücrelerin kuru madde miktarı 1 kez alt kültüre alınanlarınkinden

yüksektir. Janositz vd. (2011) yaptığı çalışmalarda PEF uygulamasının kuru madde içeriğinde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Janositz vd. 'ne (2001) göre bu durum PEF uygulamasının özellikle düşük moleküler ağırlıklı maddelerin hücre dışına transfer olması için yeterli olduğunu göstermektedir. Dahası PEF uygulamasından sonra endojen enzimler (örn. hidrolaz) gibi düşük moleküler maddelerin açığa çıkmasının depolama boyunca kuru madde ağırlığında düşüşe sebebiyet verdiği düşünülmektedir . Böylece LE bitki doku kültürü üzerinde yapılan çalışmalarda PEF uygulamasını takiben stres reaksiyon süresinin artmasıyla kuru madde içeriğinin azalması da bu düşüncüyü doğrulamaktadır. Ayrıca 2. alt kültürlerde kuru madde miktarının birinci alt kültürlerden yüksek olması da göstermektedir ki alt kültüre alma işlemi hücre canlılığının korunmasına ve hücrelerin yenilenmesine yol açmıştır (Nunez Palenius vd., 2005; Sökmen, 2001).

Bitki doku kültürlerinin 4.0 – 7.5 pH aralığında en iyi çalıştığı bilindiğinden (Ziv, 2000) pH ölçümleri herhangi bir kontaminasyon varlığını tespit etmek amacı ile ölçülmüştür. İletkenlik analizleri ise hücrelerdeki membran geçirgenliklerinin değişimini saptamak amacıyla yapılmıştır. Buna göre pH ve iletkenlik analizlerinde vurgulu elektrik alan şiddeti ve vurgu sayısının her iki alt kültürde pH ve iletkenlik üzerinde etkisi olmadığı ($p > 0,05$) bulunmuştur. Stres reaksiyon süresinin ise hem pH hem de iletkenlik üzerinde önemli etkisinin olduğu ($p < 0,05$) saptanmış olup stres reaksiyon süresinin artmasının iletkenlik değerini düşürdüğü ve pH değerini önce düşürüp ardından arttırdığı görülmüştür. Yapılan çalışmaların tümünde pH değeri optimum aralıkta kalmıştır, bu da çalışmalarda önemli bir kontaminasyonun var olmadığını göstermektedir. Gueven ve Knorr (2011) soya bitki kallus süspansiyon kültürü üzerinde yaptıkları çalışmada da bitkinin logaritmik büyüme fazı sırasında elektrik iletkenliğinde düşüş saptamışlar ve bu durumu hücrelerin kendi gelişimleri için amonyum ve nitrat iyonlarını kullandıkları şeklinde açıklamışlardır. Yapılan bu çalışmada da elektriksel iletkenliğin düşük olması Gueven ve Knorr (2011)'un açıklamasını doğrulamaktadır. Bununla birlikte alt kültüre alma işlemi ile iletkenliğin artması ise alt kültüre alma işleminin membran geçirgenliğini arttırdığını göstermektedir. Jaeger vd., (2009) ve Janositz (2011)'e göre elektriksel iletkenliğin yüksek olması hücre bileşenlerinin salınımının yüksek olduğunu ve böylece düşük moleküler ağırlıklı bileşenlerin difüzyonunun daha kolay gerçekleştiğini göstermektedir. Bu durumda LE bitki doku kültürü üzerinde yapılan çalışmada elektriksel iletkenlik referans alınarak söylenebilir ki stres reaksiyon süresinin artmasıyla iletkenliğin düşmesi hücrelerde strese

bağlı olan bozunmaya karşın hücreler onarım ve gelişim için ortamda bulunan iyonları kullanmışlardır. Bununla birlikte ikinci kez alt kültüre alınan hücrelerde iletkenliğin bir kere alt kültüre alınan hücelere oranla yüksek olması ise kültüre alma işleminin membran geçirgenliğini arttırdığını göstermektedir.

Kültürlerde canlı hücre birikimi olduğu koşullarda 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloridin (TTC) formazona indirgendiği canlılık testi sonuçlarına göre ise her iki alt kültürlerde vurgulu elektrik alan şiddeti ve vurgu sayısının artması hücre canlılıklarında azalmaya sebep olmuştur. Hücre canlılığının azalması hücrelerde difüzyon mekanizmasının düzenlenmesi açısından önemlidir (Janositz vd., 2011). Dörnenburg ve Knorr'un (1993) *Chenopodium rubrum* ve *Morinda citrifolia* bitki hücre kültürleri üzerinde yaptıkları çalışmada da 0 ile 1.6 kV/cm şiddetinde ve 0 ile 30 vurgu PEF uygulanan *C. rubrum* kültürlerinde PEF şiddeti ve vurgu sayısı artmasıyla metabolit iyileşmesi ile birlikte hücre canlılıkları büyük oranda yitirmeye başlanmış fakat amaranthin pigmenti salınımında artış gözlenmiştir. *M. citrifolia* hücre kültürlerinde de metabolit iyileşmesi ile birlikte 0.5 kV/cm ve 3 vurgu sayısında hücre canlılığı yitirilmiştir. Stres reaksiyon sürelerine göre sonuçlar değerlendirildiğinde ise birinci alt kültürlerde 4 saate kadar canlılık artarken 96 saatte hücre canlılığında ciddi bir düşüş olmuştur. Ayrıca 1200 V/cm vurgulu elektrik alan şiddeti uygulanmış ve 96 saat beklemiş hücrelerde ölüm meydana gelmiştir. 600 V/cm PEF şiddetine 9 kere maruz kalmış ve 96 saat beklemiş birinci alt kültürlerdeki hücre canlılığı en düşük olmakla birlikte toplam fenolik madde miktarları göz önüne alındığında, 600 V/cm PEF şiddetine maruz kalmış hücrelerdeki TF miktarının 1200 V/cm PEF şiddetinin 9 kere vurgu sayısına maruz kalan hücrelerdekine göre yüksek olduğu saptanmıştır. Böylece hücre canlılığının düşmesiyle birlikte hücrelerdeki difüzyon mekanizması iyileşmekte, membran geçirgenliği artmakta ve hücre içi sentezlenen metabolitler açığa çıkmaktadır (Janositz vd., 2011). İkinci alt kültürlerde ise birinci alt kültürlere tam ters bir şekilde 4 saate kadar canlılıklarda düşüş olurken 96 saat beklemiş hücrelerde tekrar artış gözlenmiştir. Fakat ikinci alt kültürlerdeki R^2 ve $adj-R^2$ değerlerinin düşük olması sebebiyle hücre davranışlarının gözlemleri tam olarak yansıtmadığını göstermektedir. Bu durum ikinci kez alt kültüre alma işlemi sırasında ekimleri yapılan hücrelerin mekanik olarak strese uğrayıp veya mikrobiyel kontaminasyona maruz kalarak canlılığını yitirmiş olmasından ve buna ilaveten de bitki doku kültürlerinin stabil olmayan biyosentezlerinden kaynaklandığı düşünülebilir.

Stres yaratılarak bitki doku kültürlerinde sekonder metabolit üretiminde artış olup olmadığını saptamak amacıyla yapılan toplam fenolik madde ölçümlerinde ise vurgulu elektrik alan şiddeti ve vurgu sayısının birinci alt kültürler üzerinde etkisinin olmadığı ($p > 0,05$) fakat ikinci kültürler üzerinde kontrol örneklerine göre işlem görmüş örneklerde farklı bir etki yarattığı ($p < 0,05$) görülmüştür. Bununla birlikte stres reaksiyon süreleri her iki alt kültür üzerinde önemli etki ($p < 0,05$) yaratmıştır. İstatistiki sonuçlar göz önüne alındığında ikinci alt kültürlerde VEAŞ ve VS göz önünde bulundurularak 1200 V/cm PEF şiddetine 1 ve 9 kere maruz kalmış hücrelerde toplam fenolik madde oranı yüksek olmakla birlikte işlem görmemiş hücrelerle aralarında istatistiksel olarak bir fark bulunamamış ve 600 V/cm PEF şiddetine 9 kere ve 900 V/cm PEF şiddetine 5 kere maruz kalmış hücrelerle de aralarında benzerlik Buna ek olarak ikinci alt kültürlerde 600 ve 900 V/cm PEF şiddetine maruz kalmış hücrelerin kontrol örneklerine göre TF miktarları daha düşük olarak bulunmuştur. Hermann'ın (2010) yaptığı çalışmada *Vitis vinifera* bitki hücrelerine 300, 350, 600 ve 1200 V/cm şiddetinde PEF uygulayarak 0, 2, 4, 24 ve 48 saat stres reaksiyon sürelerinde polifenol oksidaz (PPO), peroksidaz (POD) enzimleri ile toplam fenol içeriğini (TF) incelemiştir. Buna göre genelde enzim aktiviteleri artmasına rağmen polifenol içeriğinin 300 V/cm (2 ve 4 saat sonra), 350 V/cm (hemen sonra), 600 V/cm (24 saat sonra) şiddetindeki PEF uygulamaları dışında işlem görmüş ve görmemiş kültürlerde aynı veya işlem görmüş kültürlerin işlem görmemiş kültürlerinkinden daha düşük olduğu saptanmıştır. Dörnenburg ve Knorr (1993) yaptıkları çalışmada *Chenopodium rubrum* ve *Morinda citrifolia* bitki hücre kültürlerine 0 ile 1.6 kV/cm şiddetinde ve 0 ile 30 vurgu PEF uygulanarak hücre geçirgenlikleri incelenmiştir. *M. citrifolia* hücre kültürlerinde metabolit iyileşmesi ile birlikte 0.5 kV/cm şiddeti ve 3 vurgu sayısında hücre canlılığı yiterken pigment salınımında önemli bir artış gözlenmemiştir. Ayrıca Janositz vd. (2011) 5 kV/cm şiddetinde ve 20 vurgu sayısındaki PEF uygulamasını *Asparagus officinalis* L. üzerinde uygulamış ve PEF uygulamasının lignin içeriğinde azalmaya sebep olduğunu tespit etmişlerdir. Kompleks bir polimer olan lignindeki bu azalmanın sebebi PEF uygulamasının tetiklemesi ile lignin – selüloz bağlarının bitkinin daha yumuşak yapı kazanması için delignifikasyona uğradığı şeklinde düşünülmektedir. Bu durumda Hermann (2010), Dörnenburg ve Knorr (1993), Janositz vd. (2011)'in çalışmalarıyla benzer bir şekilde LE bitki doku kültürü üzerinde yapılan çalışmada 1200 V/cm PEF şiddetinin altında uygulanan elektrik alan şiddetlerinde TF içeriğinin kontrol örneğine göre düşük olması, fenolik maddelerin PEF uygulaması yüzünden meydana gelen hasarı onarma veya ROS

süpürülmesi için hücreler tarafından kullanıldığını ve daha fazla fenolik madde sentezi yapılması için yaratılan stresin yeterli olmadığını göstermektedir. 1200 V/cm PEF şiddeti ve üzerinde yapılan çalışmalarda ise PEF uygulamasının stresi tetikleyerek fenolik madde sentezini arttırdığı görülmüştür. Örnek olarak Gueven ve Knorr (2011)'un soya doku kültürü üzerinde yaptıkları çalışmada 7 günlük kültürde 1.6 kV şiddetinde PEF uygulamasının izoflavonoid üretimini büyük oranda arttırdığını saptamışlardır. Diğer bir çalışmada ise Guderjan ve Knorr (2005) soya bitkisine 1.3 kV/cm şiddetinde ve 20 ile 50 vurgu sayısında PEF uygulamış ve bitkideki daidzein izoflavonoidinde kontrole göre 20 %, genisteinde ise 21 % artış saptamışlardır. Ayrıca stres reaksiyon süresi bakımından 0 ve 4 saat beklemiş ve LE ikinci alt kültürdeki hücrelerde en yüksek toplam fenolik madde miktarının olduğu ve aralarında bir fark olmadığı saptanmıştır. Bununla birlikte 0 ve 4. saatteki toplam fenolik madde miktarları 96. saatte ölçümleri alınan TF miktarlarından farklıdır ($p < 0,05$). Değişkenler birlikte değerlendirildiğinde ise vurgulu elektrik alan şiddeti ve vurgu sayısına göre 1200 V/cm şiddetinde 9 kere vurgu yapılan ikinci alt kültürlerde ise strese maruz kaldıktan 4 saat sonrasına kadar TF miktarında düşüş yaşanmış ardından 96 saat beklemiş hücrelerde tekrar artış olmuştur. Bu da göstermektedir ki doku kültürlerinin bünyesinde bulundurduğu fenolik maddeleri stresle karşılaştığında öncelikle hücre zedelenmesini onarmak için kullandığını ardından enzimlerin de etkisiyle fenolpropanoid metabolik yolu aracılığı ile tekrar fenolik madde oluşturmaya başlamaktadır (Dixon, 1995). Bunlara ek olarak PEF şiddeti ve vurgu sayısı ile stres reaksiyon süreleri göz önüne alınarak yapılan ölçümlerde görülmüştür ki hem PEF şiddeti ve vurgu sayısı hem de stres reaksiyon süreleri açısından ikinci kez alt kültüre alınan hücrelerde toplam fenolik madde miktarı birinci alt kültürlere oranla daha yüksektir. Bu durum da alt kültüre alma işlemi Hermann (2010)'nun da araştırmasında açıkladığı üzere denemeler süresince hücre formunu iyileştirmiş ve PEF uygulaması karşısında alt kültürlerde stres direncine sebep olmuş ve bu direnç mekanizması sayesinde sekonder metabolit üretimi artmıştır.

Stres ile birlikte membran geçirgenliklerinin artması ve buna bağlı olarak hücrelerin bulunduğu besiyerlerine üretilen fenolik maddelerin geçme ihtimali düşünülerek besiyerlerinde de toplam fenolik madde ölçümleri yapılmış ve analiz sonuçları genelde hücrelerdeki toplam fenolik madde miktarının değişimine paralel sonuçlar vermiştir. İstatistiksel verilere göre vurgulu elektrik alan şiddeti ve vurgu sayısının LE birinci ve ikinci

hücre alt kültürlerindeki TF miktarları üzerinde etkisi olmadığı ($p > 0,05$) fakat stres reaksiyon süresinin hem birinci hem de ikinci alt kültürlerdeki TF miktarları üzerinde önemli etkisinin ($p < 0,05$) olduğu bulunmuştur. Bu değerlendirmelere göre tüm vurgulu elektrik alan şiddetleri ve sayılarında stres reaksiyon süreleri boyunca birinci ve ikinci alt kültürlerde 96 saate kadar TF miktarında artış gözlenmiştir. Ayrıca stres reaksiyon sürelerine karşın vurgulu elektrik alan şiddeti - vurgu sayısına bağlı olarak çizilen besiyerindeki toplam fenolik madde miktar değişim grafikleri incelendiğinde görülmüştür ki birinci alt kültürlerde ve ikinci alt kültürlerin 1200 V/cm PEF şiddetine maruz kalmış kültürlerinde strese maruz kaldıktan hemen sonrasında 4 saat sonrasına kadar TF miktarında azalma olup ardından 96 saat sonrasında tekrar artış meydana gelmiştir. Bu durum hücrelerdeki toplam fenolik madde miktarı değişimiyle paralellik göstermektedir.

Bitki doku kültürlerinde sinamik asitten türemiş bütün fenilpropanoidler, primer ve sekonder metabolizmaları arasındaki dallanma noktasında yer alan PAL enziminin aktivitesi sonucu fenilalaninden oluşurlar (Dixon, 1995). Sekonder metabolit üretiminde çok önemli bir role sahip olan PAL enzim aktivitesi sonuçları değerlendirildiğinde stres reaksiyon sürelerinin her iki alt kültür üzerinde önemli etkisinin olduğu ($p < 0,05$), vurgulu elektrik alan şiddeti ve vurgu sayısının ise birinci alt kültürlerde önemli etkisi olurken ($p < 0,05$) ikinci alt kültürlerde olmadığı ($p > 0,05$) saptanmıştır. Bu durumda enzim aktivitesi vurgulu elektrik alan şiddeti ve sayısı arttığında artmıştır. En yüksek aktivite 1200 V/cm elektrik alan şiddetine 9 kere vurgu yapılmış birinci alt kültürdeki hücrelerde saptanmıştır. Ayrıca stres reaksiyon süreleri açısından strese maruz kaldıktan 4 saat sonra alınan ölçümlerde en yüksek enzim aktivitesi değerleri tespit edilmiştir. Bu durum PEF uygulamasının toplam fenolik madde miktar değişimi üzerindeki etkisiyle beklenildiği üzere paralellik göstermekte ve PEF şiddeti ve vurgu sayısının artması enzim aktivitesini ve TF miktarını arttırmaktadır. Stres reaksiyon sürelerine karşın vurgulu elektrik alan şiddeti – vurgu sayısına bağlı olarak çizilen PAL enzimi aktivitesi grafikleri değerlendirildiğinde de görülmektedir ki genel olarak 4 saat stres reaksiyon süresine kadar enzim aktiviteleri artmakta ardından 96 saat beklemeyle birlikte düşmeye başlamaktadır. Stres reaksiyon süresinin toplam fenolik madde miktar değişimi üzerindeki etkisiyle zıtlık gösteren bu durumda bitki doku kültürlerinin metabolik aktivitelerinin çok kompleks olmalarına bağlı olduğu ve ayrıca fenolik madde oluşumunda polifenol oksidaz ve peroksidaz gibi farklı enzimlerin de rol aldığı (Vámos-Vigyázó ve Haard, 1981) bu sebeple

PAL enzim aktivitesi düşmesine rağmen TF miktarının artabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Enzim aktivitesi ve toplam fenolik madde miktarlarındaki değişim korelasyonu incelendiğinde ise beklenen şekilde kültüre alma işlemi ve PEF uygulamasının ikinci alt kültürlerde PAL enzimi ile besiyerindeki TF miktarları üzerinde paralel bir şekilde pozitif yönde, orta düzeyde ve çok önemli ilişki oluşturduğu bulunmuştur. Buna ek olarak 1. alt kültürlerdeki enzim aktiviteleri ile yine 1. alt kültürlerdeki hücrelerde ve besiyerlerinde bulunan TF miktarları arasında pozitif yönde bir ilişki bulunmuş ancak hem korelasyon katsayısı çok zayıf hem de önemlilik derecesi çok düşük olduğundan değerlendirmeye alınmamıştır.

Kültüre alma sonuçları birlikte değerlendirildiğinde görülmektedir ki biyokütlede, iletkenlikte, hücre canlılıklarında ve toplam fenolik madde miktarı ikinci kez kültüre alınmış hücrelerde artış olmuş; enzim aktivitesinde ise ikinci kez kültüre alınmış hücrelerde azalma olmuştur. Bunun sebebi kültüre alma yöntemi denemeler süresince hücre formunu iyileştirmiş ve 600, 900 ve 1200 V/cm şiddetindeki PEF uygulanmış alt kültürlerde stres direncine sebep olmuştur (Nunez Palenius vd., 2005; Sokmen 2001). Enzim aktivitesinde düşüş olması ise aktivite tayininde kullanılan yöntemde yeterince hassas çalışılmadığını düşündürmektedir.

6. ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında vurgulu elektrik alan şiddeti ve vurgu sayısı ile birlikte stres reaksiyon süresi ve alt kültüre alma işlemlerinin *Lycopersicon esculentum* (domates) bitki doku kültürü üzerinde yarattığı etkilerin kuru madde miktarı, pH ve iletkenlik, canlılık, hücrelerde ve besiyerlerinde toplam fenolik madde miktarı ve PAL enzim aktivitesi tayini ile belirlenmeye çalışılmıştır. Literatürdeki araştırmalar ve yapılan bu çalışmada da görülmüştür ki bitki doku kültürlerinin metabolik aktiviteleri çok kompleks olduğundan analizler çok yönlü yapılmalıdır. Tez çalışmasında PEF uygulamasının ve kültüre alma işleminin sekonder metabolit sentezi üzerindeki etkisi toplam fenolik madde miktar ölçümü ile belirlenmeye çalışılmıştır. Ancak toplam fenolik madde oluşum metabolik yolunda ligninler, stilbenoidler, flavonoidler yer aldığından ve her metabolitin farklı enzimlerle katalizlenen metabolik aktivitelerinin olması sebebiyle TF miktar ölçümü yalnız başına yeterli olmamaktadır. Gueven ve Knorr (2011)'in izoflavonoidlerin aglikon formları olan genistein ve daidzein gibi daha spesifik sekonder metabolitler üzerinden yaptıkları araştırma gibi LE bitki doku kültüründe de TF miktar tayini yanı sıra likopen gibi domateste yüksek miktarda yer aldığı bilinen karotenoid ölçümü ile desteklenebilir. Ayrıca fenilpropanoid metabolik yolu göz önünde bulundurularak bu metabolizmada tirozin amonyum liyaz (TAL), Flavon 3-hidroksilaz (F3OH) ve şalkon izomeraz (CHI) gibi anahtar rol oynayan enzimlerin mümkün olduğunca hepsi analiz edilip kıyaslanmalıdır. Bunlara ek olarak enzim aktivitesi, canlılık testi gibi analizlerde hassasiyet büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple deneysel hata yapma riski yüksek olmaktadır.

Günümüzde önemi anlaşılan ve üzerinde yapılan çalışmaların büyük hız kazandığı bitki doku kültürlerinden çok değerli olan sekonder metabolit sentezinin arttırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda fiziksel stres faktörü olarak ısı olmayan tekniklerden vurgulu elektrik alan uygulamasının kullanımının yanı sıra kimyasal veya biyolojik stresörler de fiziksel stresörler ile kombine edilerek sekonder metabolit sentezinin arttırılması sağlanabilir. Ayrıca vurgulu elektrik alan yöntemi gibi ısı olmayan tekniklerle stres tetikleyiciliğinin yapılmasının ardından sentezlenen bu çok değerli metabolitlerin üretiminin endüstriyel boyutlara taşınması ve seri üretiminin sağlanması açısından mühendislik yaklaşımları ile biyoreaktör kullanımı ve optimizasyonunun sağlanması gerçekleştirilebilir. Bunların yanı sıra genetik yöntemler kullanılarak bitki genetik materyalleri üzerinde modifikasyonlar yapılarak veya gen transferi ile sekonder metabolit sentezi arttırılabilir.

KAYNAKLAR

Acar, J., Gökmen, V., 2007. Fenolik Bileşikler ve Doğal Renk Maddeleri. Pages 463-492 in Saldamlı İ, ed. Gıda Kimyası, vol. **3**. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları.

Adlercreutz, H., Mazur, W., 1997. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Annals of medicine* **29**: 95-120.

Akay, B., 1992. L-Fenilalaninin biyodönüşümle üretim kinetiginin incelenmesi. Ankara Üni, Ankara.

Altuntaş, J.A., 2007. Atımlı Elektrik Akım (PEF) uygulaması ile vişne suyu, kayısı ve şeftali nektarlarının bazı teknolojik özellikleri ve mikrobiyolojik inaktivasyonunun incelenmesi. Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay.

Angersbach, A., Heinz, V., Knorr, D., 2000. Effects of pulsed electric fields on cell membranes in real food systems. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **1**: 135-149.

Aran, N., 2010. Gıda Biyoteknolojisi.

Babaoğlu, M., Akbudak, M. A., 2002. Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri. Pages 1-35 in Mehmet Babaoğlu EG, Sebahattin Özcan, ed. Bitki Biyoteknolojisi, vol. **1**. Konya: Selçuk Üniversitesi Basımevi.

Balasa, A., Toepfl, S., & Knorr, D. 2006. Pulsed electric field treatment of grapes. *Food Factory of the Future* **3**, Gothenburg, Sweden.

Barsotti, L., Merle, P., Cheftel, J.C., 1999. Food processing by pulsed electric fields. I. Physical aspects. *Food Reviews International* **15**: 163-180.

Beattie, J.M., Lewis, F.C., 1925. The electric current (Apart from the Heat Generated). A Bacteriological Agent in the sterilization of Milk and other fluids. *Journal of Hygiene* **24**: 123-137.

Beck, E., Lüttge, U., 1990. Streß bei Pflanzen. *Biologie in unserer Zeit* **20**: 237-244.

- Beck, E., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K., Bhattarai, T., 2007.** Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Biosciences* **32**: 501-510.
- Becker, JVV., Armstrong, GO., van der Merwe, MJ., Lambrechts, MG., Vivier, MA., Pretorius, IS., 2003.** Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. *FEMS Yeast Research* **4**: 79-85.
- Belitz, H-D., Grosch, W., 1995.** Food Chemistry. Springer Verlag, Heidelberg: 992.
- Bilaloğlu, GV., Harmandar, M., 1999.** Flavonoidler. *Aktif Yayınevi, İstanbul*: 334-354.
- Bligh, E. G., Dyer, W. J., 1959.** A Rapid Method Of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37 (8)**: 911-917.
- Borguini, RG., Ferraz Da Silva Torres, EA., 2009.** Tomatoes and Tomato Products as Dietary Sources of Antioxidants. *Food Reviews International* **25**: 313-325.
- Cai, Z., Riedel, H., Thaw Saw, N.M.M., Kütük, O., Mewis, I., Jäger, H., Knorr, D., Smetanska, I., 2011.** Effects of Pulsed Electric Field on Secondary Metabolism of *Vitis vinifera* L. cv. Gamay Fréaux Suspension Culture and Exudates. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **164**: 443-453
- Clinton, SK., 1998.** Lycopene: Chemistry, Biology, and Implications for Human Health and Disease. *Nutrition Reviews* **56**: 35-51.
- Crozier, A., Lean, MEJ., McDonald, MS., Black, C., 1997.** Quantitative Analysis of the Flavonoid Content of Commercial Tomatoes, Onions, Lettuce, and Celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**: 590-595.
- Davies, JN., Hobson, GE., McGlasson, WB., 1981.** The constituents of tomato fruit — the influence of environment, nutrition, and genotype. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **15**: 205-280.
- Davies, KM., 2007.** Genetic modification of plant metabolism for human health benefits. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **622**: 122-137.

- DiCosmo, F., Misawa, M.**, 1995. Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production. *Biotechnology Advances* **13**: 425-453.
- Dixon, R.A.**, 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell* **7**: 1085-1097.
- Dixon, R.A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C-J., Reddy, M.S.S., Wang, L.**, 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* **3**: 371-390.
- Doevenspeck, H.**, 1960. Verfahren und Vorrichtung zur Gewinnung der einzelnen Phasen aus dispersen systemen.
- Doevenspeck, H.**, 1961. Influencing cells and cell walls by electrostatic impulses. *Fleischwirtschaft* **13**: 968-987.
- Douglas, C.J.**, 1996. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. *Trends in Plant Science* **1**: 171-178.
- Dörnenburg, H., Knorr, D.**, 1995. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology* **17**: 674-684.
- Edreva, A., Velikova, V., Tsonev, T., Dagnon, S., Gürel, A., Aktas, L., Gesheva, E.**, 2008. Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *Genet. Appl. Plant Physiology* **34**: 67-78.
- Eren, İ.**, 2004. Patateslerin osmotik dehidrasyonunun “response surface” metodu kullanılarak optimizasyonu. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, İzmir, Türkiye.
- Evrendilek, G.A., Zhang, Q.H., Richter, E.R.**, 2004. Application of Pulsed Electric Fields to Skim Milk inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Biosystems Engineering* **87**: 137-144.
- Fettermann, J.C.**, 1928. The electrical conductivity method of processing milk. *Agricultural Engineering* 107-108.

- Flaumenbaum, B.L.**, 1968. Anwendung der Elektropasmolyse bei der Herstellung von Fruchtsäften. *Flüssiges Obst* **35**: 19-22.
- Galinski, E. A.**, 1986. Salzadaptation durch kompatible Solute bei halophilen phototrophen Bakterien. PhD Thesis. University of Bonn.
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J.F., Dommès, J.**, 2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* **37**: 263-285.
- George, B., Kaur, C., Khurdiya, D.S., Kapoor, H.C.**, 2004. Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype. *Food Chemistry* **84**: 45-51.
- Giovanucci, E.**, 1999. Tomatoes, Tomato-Based Products, Lycopene, and Cancer: Review of the Epidemiologic Literature. *Journal of the National Cancer Institute* **91**: 317-331.
- Gözükırmızı, N.**, 2010. *Gıda Biyoteknolojisi*. Ankara: Nobel Yayın Dağıtım. vol. **1**: 393-414
- Grace, S.C., Logan, B.A.**, 2000. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **355**: 1499-1510.
- Green, D.E., Ji, S., Brucker, R.F.**, 1973. Structure-function unitization model of biological membranes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **4**: 253-284.
- Guderjan, M., Knorr, D.**, 2005. Application of pulsed electric fields for the development of a gentle processing concept for the recovery of oils of plant origin. DFG Projekttreffen *Fette und Lipide in der Ernährung*.
- Gueven, A., Knorr, D.**, 2011. Isoflavonoid production by soy plant callus suspension culture. *Journal of Food Engineering* **103**: 237-243.
- Harborne, J.B., Williams, C.A.**, 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**: 481-504.

- Hermann, M.**, 2010. Influence of pulsed electric fields on polyphenol production, peroxidase and polyphenol oxidase activity of grape cell culture (*Vitis vinifera*). Diplomarbeit. Technical University of Berlin, Berlin.
- Herrmann, K.M., Weaver, L.M.**, 1999. THE SHIKIMATE PATHWAY. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **50**: 473-503.
- Hitit, B.**, 2011. Atımlı Elektrik Alanı Prosesinin Meyve Sularının Kalite Kriterleri Üzerine Etkisi. Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bolu.
- Jaeger, H., Schulz, A., Karapetkov, N., Knorr, D.** (2009). Protective effect of milk constituents and sublethal injuries limiting process effectiveness during PEF inactivation of *Lb. rhamnosus*. International Journal of Food Microbiology, **134**, 154–161.
- Janositz, A., Semrau, J., Knorr, D.**, 2011. Impact of PEF treatment on quality parameters of white asparagus (*Asparagus officinalis L.*). Innovative Food Science and Emerging Technologies **12**: 269–274
- Karadağ, A., Ömeroğlu, P.Y., Saner, S.**, 2008. Gıda muhafazasında yeni teknolojilerin kullanımı-Hakemli Makale. (04.06 2012)
- Karadeniz, F.**, 1994. Elma suyunda fenolik madde dağılımı ve konsantreye işlenmesi sırasında değişimi. Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Kaur, C., Kapoor, H.C.**, 2001. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. International Journal of Food Science & Technology **36**: 703-725.
- Kavas, G., Kavas, N., Gönç, S., Kınık, Ö.**, 2007. Süt teknolojisinde pulse elektrik alan uygulamaları. Paper presented at Gıda Mühendisliği 5. Kongresi; 8-10 Kasım 2007, Ankara.
- Klein, T., Rafalski, A.**, 2003. Introduction to plant biotechnology: Second Edition, 2002. H.S. Chwala. Science Publishers, Inc. Enfield, NH, USA. Plymbridge Distributors, Plymouth, UK. 538 pp. Plant Science **164**: 1119.
- Koukol, J., Conn, E.E.**, 1961. The Metabolism of Aromatic Compounds in Higher Plants. Journal of Biological Chemistry **236**: 2692-2698.

- Krupp.** 1988. Fish processing by the Elcrack process. Brochure Krupp Maschinentechnik GmbH, Hamburg, Germany.
- Lai, A., Santangelo, E., Soressi, G.P., Fantoni, R.,** 2007. Analysis of the main secondary metabolites produced in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) epicarp tissue during fruit ripening using fluorescence techniques. *Postharvest Biology and Technology* **43**: 335-342.
- Larcher, W.,** 1987. Streß bei Pflanzen. *Naturwissenschaften* **74**: 158-167.
- Lichtenthaler, H.K.,** 1996. Vegetation Stress: an Introduction to the Stress Concept in Plants. *Journal of Plant Physiology* **148**: 4-14.
- Lichtenthaler, H.K., Rinderle, U.,** 1988. The Role of Chlorophyll Fluorescence in The Detection of Stress Conditions in Plants. *C R C Critical Reviews in Analytical Chemistry* **19**: S29-S85.
- Lindsey, K., Yeoman, M.M., Black, G.M., Mavituna, F.,** 1983. A novel method for the immobilisation and culture of plant cells. *FEBS Letters* **155**: 143-149.
- MacDonald, M.J., D'Cunha, G.B.,** 2007. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochemistry and Cell Biology* **85**: 273-282.
- Maier, G., Mayer, P., Dietrich, H., Wucherpfennig, K.,** 1990. Flüssiges Obst. **57**: 230-239.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L.,** 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* **79**: 727-747.
- Manoharan, K., Gnanam, A.,** 1992. Growth stimulation by conditioned medium and spermidine in low density suspension cultures of rice. *Plant Cell Physiology* **33**: 1243-1246.
- Mazza, G.M.E.,** 1993. Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. Pages 362.
- Metcalf, R.L., Kogan, M.,** 1987. Plant volatiles as insect attractants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **5**: 251-301.
- Mirjalili, N., Linden, J.C.,** 1995. Gas composition effects on suspension cultures of *Taxus cuspidata*. *Biotechnology Bioengineering* **48**: 123-132.

- Nagy, N.E., Fossdal, C.G., Krokene, P., Krekling, T., Lönneborg, A., Solheim, H.,** 2004. Induced responses to pathogen infection in Norway spruce phloem: changes in polyphenolic parenchyma cells, chalcone synthase transcript levels and peroxidase activity. *Tree Physiology* **24**: 505-515.
- Noel, J.P., Austin, M.B., Bomati, E.K.,** 2005. Structure–function relationships in plant phenylpropanoid biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 249-253.
- Nunez-Palenius, H.G., Harry, H.K., Ochoa-Alejo, N., Ramirez-Malagon, R., and Perez-Molphe, E.,** 2005. Food Biotechnology in Kalidas Shetty GP, Anthony Pometto , and Robert E . Levin, ed. *Methods in Plant Tissue Culture*, CRC Press.
- Olenichenko, N., Zagorskina, N.,** 2005. Response of Winter Wheat to Cold: Production of Phenolic Compounds and L-Phenylalanine Ammonia Lyase Activity. *Applied Biochemistry and Microbiology* **41**: 600-603.
- Özcan, T., Kurtuldu, O.,** 2011. Sütün Raf Ömrünün Uzatılmasında Alternatif Yöntemler. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* **25**: 119-129.
- Pierik, R.L.M.,** 1987. *In Vitro Culture of Higher Plants*. Dordrecht Boston Lancaster: Martinus Nijhoff Publishers.
- Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R.,** 2012. Nutritional composition and antioxidant activity of four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmer' varieties in Northeastern Portugal homegardens. *Food and Chemical Toxicology* **50**: 829-834.
- Price, S.F., Breen, P.J., Valladao, M., Watson, B.T.,** 1995. Cluster Sun Exposure and Quercetin in Pinot noir Grapes and Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **46**: 187-194.
- Prochownik, L., Spaeth, F.,** 1890. Über die keimtötende Wirkung des galvanischen Stroms. *Deutsche MEDizinische Wochenschrift*: 564-565.
- Ralston, L., Subramanian, S., Matsuno, M., Yu, O.,** 2005. Partial Reconstruction of Flavonoid and Isoflavonoid Biosynthesis in Yeast Using Soybean Type I and Type II Chalcone Isomerases. *Plant Physiology* **137**: 1375-1388.

- Rao, A.V., Agarwal, S.**, 1999. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review. *Nutrition Research* **19**: 305-323.
- Sakuta, M.K.A.**, 1987. Cell growth and accumulation of secondary metabolites. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* **4**: 97-113.
- Selye, H.**, 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* **138**: 32-34.
- Shahidi, M.**, 2003. Biosynthesis, Classification, and Nomenclature of Phenolics in Food and Nutraceuticals. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*, CRC Press.
- Sies, H.**, 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* **82**: 291-295.
- Singer, S.J., Nicolson, G.L.**, 1972. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. Science Publishers, Inc. Enfield, NH: 720-731.
- Snapper, I., Yü, T.F., Chiang, Y.T.**, 1940. Cinnamic Acid Metabolism in Man. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.) **44**: 30-34.
- Sökmen, A.**, 2001. Sekonder Metabolit Üretimi. Pages 221-224 in Mehmet Babaoğlu EG, Sebahattin Özcan, ed. *Bitki Biyoteknolojisi*. **1**. Konya: Selçuk Üniversitesi Basımevi.
- Staba, E.J.**, 1980. *Plant tissue culture as a source of biochemicals*: CRC Press (Boca Raton, Fla.).
- Stafford, A.**, 1991. The manufacture of food ingredients using plant cell and tissue cultures. *Trends in Food Science & Technology* **2**: 116-122.
- Stocker, O.**, 1947. Probleme der pflanzlichen Dürresistenz. *Naturwissenschaften* **34**: 362-371.
- Taiz, L.E.**, 2006. *Plant Physiology*. Berlin Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Tal, B.R.J., Goldberg, I.**, 1984. Timing of diosgenin appearance in suspension cultures of *Dioscorea deltoidea* *Planta Medica* **50**: 239-241.
- Thiele, H., Wolf, K.**, 1899. Über die Einwirkung des elektrischen Stroms auf Bakterien. *Centralblatt Bakterien und Parasitenkunde*: 650-655.

Thompson, L.U., Robb, P., Serraino, M., Cheung, F., 1991. Mammalian lignan production from various foods. *Nutrition and Cancer* **16**: 43-52.

Toepfl, S., 2006. Pulsed Electric Fields (PEF) for Permeabilization of Cell Membranes in Food- and Bioprocessing – Applications, Process and Equipment Design and Cost Analysis. Doctorate. Technical University of Berlin, Berlin.

Towill, L., Mazur, P., 1974. Studies on the reduction of 2,3,5 triphenyltetrazoliumchloride as a viability assay for plant tissue cultures. *Canadian Journal of Botanic* **53**, 1097–1102.

Treutter, D., 2005. Significance of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of Their Biosynthesis. *Plant Biology* **7**: 581-591.

URL-1, www.molecular-plant-biotechnology.info. 20.03.2012.

URL-2,<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=17476>. USDA National Database for Standard Reference, Release 20. Nutrient Laboratory. 11 Nisan 2012.

Vámos-Vigyázó, L., Haard, N.F., 1981. Polyphenol oxidases and peroxidases in fruits and vegetables. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **15**: 49-127.

Vaya, J., Aviram, M., 2001. Nutritional Antioxidants Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications. *Current Medicinal Chemistry - Immunology, Endocrine & Metabolic Agents* **1**: 99-117.

Ververidis, F., Trantas, E., Douglas, C., Vollmer, G., Kretzschmar, G., Panopoulos, N., 2007. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnology Journal* **2**: 1214-1234.

von Sengbusch, P., 2003. Botanik online. <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e19/19.htm>. 2012.

Waterhouse, A., 2001. Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine. <http://waterhouse.ucdavis.edu/phenol/foolinmicro.htm>. 2011

Williams, R.J., Spencer, J.P.E., Rice-Evans, C., 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine* **36**: 838-849.

- Winkel, B.S.J.**, 2004. Metabolic Channeling In Plants. Annual Review of Plant Biology **55**: 85-107.
- Xiang, L., Moore, B.S.**, 2002. Inactivation, Complementation, and Heterologous Expression of *encP*, a Novel Bacterial Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene. Journal of Biological Chemistry **277**: 32505-32509.
- Ye, H., Huang, L-L., Chen, S-D., Zhong, J-J.**, 2004. Pulsed electric field stimulates plant secondary metabolism in suspension cultures of *Taxus chinensis**. Biotechnology and Bioengineering **88**: 788-795.
- Zhong, J-J.**, 2001. Biochemical Engineering of the Production of Plant-Specific Secondary Metabolites by Cell Suspension Cultures Plant Cells. Pages 1-26 in Zhong J, et al., eds, vol. **72** Springer Berlin / Heidelberg.
- Zimmermann, U., Pilwat, G., Riemann, F.**, 1974. Dielectric Breakdown of Cell Membranes. Biophysical Journal **14**: 881-899.
- Ziv, M.**, 2000. Bioreactor technology for plant micropropagation. Horticultural Reviews **24**, 1–29.
- Adlercreutz H, Mazur W. 1997. Phyto-oestrogens and Western diseases. Annals of medicine **29**: 95-120.

ÖZGEÇMİŞ

Işıl Gürsul, 10.10.1986'de Malatya'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Mersin'de tamamladı. 2004 yılında Mersin Ticaret ve Sanayi Odası Anadolu Lisesinden mezun oldu. 2004 yılında başladığı Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünü 2009 yılında bitirdi. Tunceli Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği bölümünde araştırma görevlisi olarak 2009 yılında işe başladı. Halen aynı görevi sürdürmektedir.