

Gamay Üzüm Çeşidine Ait Kallus Kültürlerinde Fenolik Bileşikler ile α -Tokoferol Üretiminin Artırılması: Potansiyel Bir Elisitör Olarak UV-C

Emine Sema ÇETİN

Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 32260, Isparta
Yazışma yazarı: semacetin@sdu.edu.tr

Geliş tarihi: 23.03.2012, Yayına kabul tarihi: 12.12.2012

Özet: Bu araştırma, UV-C radyasyonu uygulamalarının, Gamay üzüm çeşidine ait yaprak saplarından elde edilen kallus kültürlerinde, bazı fenolik bileşikler (*trans*-resveratrol, (+)-kateşin ve ferulik asit) ile α -tokoferol üretimi üzerine olan etkilerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Yaprak saplarının 0.5 mg/L benzilaminopürin (BA) ve 0.5 mg/L indol asetik asit (IAA) içeren B5 besin ortamında kültüre alınmasının ardından 6 hafta sonra kallus oluşumu gerçekleşmiştir. Oluşan kalluslar 5 hafta süre ile iki kez alt kültüre alınmıştır. İkinci alt kültürün ardından 12 günlük kalluslar UV-C radyasyonuna maruz bırakılmıştır. UV-C uygulamaları iki farklı süre (5 ve 10 dakika) ve üç farklı mesafede [10 cm (6,6 W/m²), 20 cm (4,1 W/m²) ve 30 cm (2,3 W/m²)] 254 nm dalga boyuna sahip (30 watt) UV-C lambaları ile gerçekleştirilmiştir. UV-C uygulamalarını takip eden 0., 24. ve 48. saatlerde alınan örneklerde fenolik bileşikler ile α -tokoferol miktarları yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenmiştir. Araştırma sonucunda kalluslarda fenolik bileşikler ile α -tokoferol birikiminin UV-C uygulamalarına bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir. 10 dakika süre ile 30 cm mesafeden UV-C uygulanan ve 48 saat sonra alınan örnekler en yüksek *trans*-resveratrol miktarlarını gösterirken, (+)- kateşin bakımından 5 dakika süre, 10 cm mesafe ve 48 saat inkübasyon süresi en uygun kombinasyon olarak belirlenmiştir. En yüksek ferulik asit konsantrasyonu 30 cm mesafeden 10 dakika süre ile radyasyona maruz bırakılarak 24 saat sonra alınan kalluslardan elde edilmiştir. α -Tokoferol içeriği bakımından ise 10 dakika süre, 20 ve 30 cm mesafe ve 48 saat inkübasyon süresi kombinasyonunun daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak UV-C uygulamalarının Gamay üzüm çeşidine ait kallus kültürlerinde sekonder metabolit üretimini artırmak amacıyla başarıyla kullanılabilir bir yöntem olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Asma, fenolik bileşikler, kallus, UV-C, α -tokoferol

Enhancement of Phenolic Compounds and α -Tocopherol Production in Callus Culture of Gamay Grape Cultivar: UV-C as a Potential Elicitor

Abstract: The present study aimed to determine the effects of UV-C irradiation on the production of some phenolic compounds (*trans*-resveratrol, (+)-catechin and ferulic acid) and α -tocopherol in callus cultures obtained from petioles of Gamay grape cultivar. Calli initiated from petioles cultured on the medium supplemented with 0,5 mg/L benzylaminopurine (BA) and 0.5 mg/L indole acetic acid (IAA) on B5 media, formed after 6 weeks. Callus tissues were subcultured two times each of 5 week duration. After the second subculture, 12 days old calli were exposed to UV-C irradiation. UV-C applications were carried out two different duration (5 and 10 minute) and three different distance [10 cm (6,6 W/m²), 20 cm (4,1 W/m²) and 30 cm (2,3 W/m²)] using UV-C lamps (30 watt) at 254 nm. Samples were collected at hours 0., 24. and 48. after UV-C treatments. The phenolic compounds and α -tocopherol were determined by the high performance liquid chromatography (HPLC). As a conclusion, phenolic compounds and α -tocopherol production in callus cultures were affected depending on UV-C treatments. While samples were exposed to UV-C at 30 cm for 10 min and collected at 48 hour showing the highest *trans*-resveratrol content, the combination of 5 min, 10 cm and 48 hour sampling time was the most suitable for production of (+)- catechin. The highest ferulic acid concentration was obtained from calli irradiated for 10 min at 30 cm after 24 hours. The highest

α -tocopherol production was determined at samples were exposed to UV-C at 20 and 30 cm for 10 min application duration and 48 hour sampling time. As a result, UV-C may be used successfully in order to increase the production of secondary metabolites in callus cultures.

Key words: Callus, phenolic compounds, UV-C, *Vitis*, α -tocopherols

Giriş

Bitkiler, sekonder metabolitler olarak ifade edilen ve hastalık ve zararlılar gibi biyotik ya da kuraklık, tuzluluk, UV gibi abiyotik stres faktörlerine karşı korunmalarında etkileri olan bileşikler içermektedirler (Saldamlı, 2007). Bu bileşikler içerisinde en yaygın olanı fenolik bileşikler olup, bitkinin meyve, tohum, yaprak ve gövde gibi farklı kısımlarında bulunabilmektedirler (Coşkun, 2006). Fenolik bileşiklerin özellikle insan sağlığı üzerine olan olumlu etkilerinin ortaya konulması ile bu bileşiklere olan ilgi günümüzde önemli ölçüde artmıştır. Nitekim fenolik bileşikler, serbest radikaller olarak adlandırılan ve zararlı bileşikler kendilerine bağlama yeteneğinde olan antioksidan özellikler sergileyen bileşiklerdir. Bunlar içerisinde fitoaleksinler grubundan stilben ailesine ait bir molekül olan resveratrolün ise koroner hastalıklar ile kanser oluşumunu önlediği ve kötü kolesterol olarak bilinen LDL'yi düşürdüğü (Sgambato et al., 2001) bilinmektedir. Yapılan araştırmalar bugüne kadar 72 bitki türünde resveratrolün üretilbildiğini göstermekle birlikte (Dong, 2003), asıl kaynağını asmanın oluşturduğu bilinmektedir (Tassoni et al., 2005). Fenolik bileşiklerin flavonoidler grubunda yer alan ve insan sağlığı üzerindeki etki mekanizması kesin olarak tespit edilememiş olan bir diğer bileşik grubunu ise kateşinler oluşturmaktadır (Warden et al., 2001). Bununla birlikte kateşinlerin ülser oluşumunu engellemede son derece etkin rol oynadığı (Arunachalama et al., 2003), ayrıca kardiovasküler hastalıklar (Xia et al., 2010) ile özellikle kolon, deri, akciğer, meme, mide, pankreas ve prostat kanserini önlemede etkili oldukları bilinmektedir (Goodarznia and Govar 2009). Kateşinin kaynağının yeşil çay bitkisi olduğu (Goodarznia and Govar 2009), bununla

birlikte üzümde de özellikle çekirdekte ve kabukta yüksek miktarlarda kateşin bulunduğu tespit edilmiştir (Yılmaz and Toledo 2004; Göktürk Baydar et al., 2011). Ferulik asit de bitkilerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan ve antioksidan özelliği oldukça yüksek olan fenolik asitler grubunda yer alan bir fenolik bileşiktir (Rice-Evans et al., 1996). Ferulik asitin hücre duvarı sentezi sırasında, polisakkarit zincirlere bağlanmasında ve dolayısıyla hücre duvarının sağlam bir yapıda olmasına yardımcı olduğu bilinmektedir (Mathew and Abraham 2004). Günlük diyetle bol miktarlarda kullanılabilen ve toksisitesi son derece düşük olan bu bileşiğin (Zhao et al., 2004), aynı zamanda C ve E vitamini ile sinerjik etkide bulunduğu da bilinmektedir (Lin et al., 2005). Ayrıca antimutagenik özellikte olup (Ferguson et al., 2003), hücreleri oksidatif DNA zararından koruduğu da yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir (Lin et al., 2005).

Sekonder metabolitler içerisinde yer alan ve α , β , γ ve δ olmak üzere 4 farklı izomeri bulunan bir diğer bileşik grubunu da tokoferoller oluşturmaktadır. Tokoferoller yağda çözünen ve bitkilerde doğal olarak oluşan bileşikler olup, tıpkı fenolik bileşikler gibi insan sağlığı üzerinde de önemli roller üstlendikleri bilinmektedir (Kushi et al., 1996). Bunlardan α -tokoferol (E vitamini) besin değeri en yüksek olan tokoferol olup, insanlarda bazı hastalıkların önlenmesinde ve tedavi edilmesinde de etkili bir bileşik olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (Tucker and Townsend 2005). Genel olarak yağlı tohumlu bitkilerde yüksek miktarlarda bulunduğu bilinen bu bileşiğin (Kamal Eldin and Appelqvist 1996), taze üzümde (Göktürk Baydar, 2006), üzüm çekirdeği ile cibrede (Göktürk Baydar and Özkan 2006) ve üzüm çekirdeği yağında (Göktürk Baydar

and Akkurt 2001) da bulunduğu tespit edilmiştir. Tüm bu olumlu özellikleri nedeniyle, fenolik bileşikler ile α -tokoferol tıp, eczacılık, gıda ve bitki koruma alanlarında geniş bir kullanım olanağı bulmuştur. Sekonder metabolitler uzun yıllar bitkilerin değişik kısımları kullanılarak geleneksel metotlarla ekstrakte edilmişlerdir. Ancak bu bileşiklerin hücresel düzeyde daha yüksek miktar ve kalitede elde edilebileceğinin belirlenmesi üzerine, çalışmalar kallus ve hücre süspansiyon kültürleri üzerinde yoğunlaşmaya başlamıştır. Elisitör olarak tanımlanan ve stres ortamının oluşmasına neden olarak metabolitlerin sentezini artıracak uygulamaların da kültür ortamlarında kolaylıkla yapılabilmesi, kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinin bir diğer avantajlı yönünü oluşturmaktadır. Nitekim elisitör uygulamalarıyla söz konusu metabolitlerin daha yüksek miktarlarda elde edilebildikleri araştırma sonuçları ile de tespit edilmiş bulunmaktadır (Antognoni et al., 2007; Çetin, 2010). Bu çalışmada da Gamay üzüm çeşidine ait yaprak saplarından elde edilen kalluslara, elisitör olarak farklı süre (5-10 dakika) ve mesafelerde (10, 20 ve 30 cm) yapılan UV-C uygulamalarının birer sekonder metabolit olan *trans*-resveratrol, (+)-kateşin ve ferulik asit ile α -tokoferol üretimi üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Bitkisel materyal olarak Gamay üzüm çeşidine ait yaprak saplarından elde edilen kallusların kullanıldığı bu araştırma, 2011 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarında yapılmıştır.

Kallus kültürü

Araştırmada Gamay üzüm çeşidine ait yaprak sapları önce yüzey dezenfeksiyonuna hazırlık olarak akan çeşme suyu altında yıkanmış, ardından % 15'lik sodyum hipoklorit ve 1-2 damla % 0,01'lik Tween 20 içeren çözelti içerisinde 15 dakika süre ile dezenfekte edilerek 3 kez steril saf su ile durulanmışlardır. Ardından yaprak sapları steril kabin içinde yaklaşık 1 cm

uzunluğunda parçalara ayrılmış ve asmada yaprak sapı eksplantlarından kallus oluşumu üzerine olumlu etkileri olduğu belirlenen (Shure and Acree 1994; Çetin, 2010) ve içeriğini 0,5 mg/L benzil amino pürin (BAP), 0,5 mg/L indol asetik asit (IAA), 30 g/L sakkaroz ve 8 g/L agar agarın oluşturduğu B5 (Gamborg et al., 1968) besin ortamına dikilmişlerdir. Dikim işlemi, içerisinde 30 ml besin ortamı bulunan standart, 9 cm çapındaki petri kutularında, her birine 30'ar adet yaprak sapı olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve sıcaklığı 25 ± 1 °C olan karanlık koşullarda kültüre alınmışlardır (Çetin, 2010).

UV-C radyasyonu uygulaması

Yaprak sapı eksplantlarının kültüre alınmalarını takip eden 6. haftada kallus oluşumları gerçekleşmiş olup, gelişen bu kalluslar aynı içeriğe sahip besin ortamlarında 5 haftalık süreler ile iki kez alt kültüre alınmışlardır. İkinci alt kültürü takip eden 12. günde (Keskin ve Kunter 2007) kalluslar steril kabin içerisine getirilmiş ve petri kutularının kapakları açılarak uygulamalara hazır hale getirilmişlerdir. UV-C uygulamalarında 254 nm dalga boyuna sahip 30 Watt'lık lambalar kullanılmıştır. Uygulamalar iki farklı süre (5 ve 10 dakika) ve üç farklı mesafede [10 cm ($6,6 \text{ W/m}^2$), 20 cm ($4,1 \text{ W/m}^2$) ve 30 cm ($2,3 \text{ W/m}^2$)] gerçekleştirilmiştir. UV-C uygulamalarının ardından her bir uygulama grubundan 0.saat örnekleri (5 g) alınmış ve kültürün gerçekleştirildiği petri kutuları tekrar iklim dolabına yerleştirilmiştir. Uygulamayı takip eden 24. ve 48. saatlerde de örnekler alınmış; alınan tüm örnekler analizler gerçekleştirilene kadar -18 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır. Kontrol grubu örnekleri de UV-C uygulama grupları ile eş zamanlı olacak şekilde alınmış ve aynı koşullarda saklanmıştır.

Fenolik madde ekstraksiyonu

trans-Resveratrol, (+)-kateşin ve ferulik asit miktarlarının belirlenmesi amacıyla, alınan kallus örnekleri öncelikle havanda sıvı azot kullanılarak iyice ezilmişlerdir. Ekstraksiyon, Kiselev et al. (2007)'un yöntemine göre yapılmış olup, buna göre sıvı azotla ezilen örneklerden 2 g alınarak,

üzerine 10 mL % 96'lık etil alkol ilave edilmiş, ardından iki dakika süre ile homojenizatörde karıştırılmıştır. Daha sonra da 1 gece 45 °C'deki su banyosuna bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda örnekler, 5 dakika süreyle 4000 d/d'de santrifüjlenerak fenolik bileşikleri içeren süpernatant kısım alınmış ve 45 °C sıcaklıkta rotary evaporatörde tamamen kuruyuncaya kadar bekletilmiştir. Elde edilen kuru ekstrakt metanolde çözülmüş ve bu şekilde elde edilen sıvı ekstrakt HPLC analizlerinde kullanılmıştır.

HPLC ile fenolik bileşiklerin belirlenmesi

Fenolik bileşenler, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) ile Caponio et al. (1999) tarafından açıklanan yöntemin modifiye edilmesi ile analiz edilmiştir (Çetin, 2010). Kolon olarak Agilent Eclipse XDB-C18 (250x4,60 mm, 5 µm), dedektör olarak da DA (diode-array) dedektörün kullanıldığı araştırmada, dedektör UV dalga boyu 278 olarak ayarlanmıştır. Mobil faz A: %2 asetik asit, B: metanolden oluşmuştur. Akış hızı 0.8 mL/dak., kolon sıcaklığı 30 °C ve enjeksiyon hacmi de 20 µL olarak ayarlanmıştır. Araştırma sonucunda elde edilen veriler "Shimadzu Class-VP Chromatography Laboratory Automated Software System" kullanılarak analiz edilmiştir. İncelenen fenolik bileşikler, standart çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon körvesinden yararlanılarak hesaplanmış ve sonuçlar µg/g yaş ağırlık (YA) cinsinden verilmiştir. Analizler 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

α-Tokoferol ekstraksiyonu

Kalluslarda α-tokoferol analizlerinde ekstraksiyon işlemi Caretto et al., (2004)'a göre yapılmıştır. Buna göre daha önce sıvı azotla iyice ezilmiş halde bulunan kalluslardan 750 mg alınmış ve koyu renkli bir şişe içerisine konulmuştur. Üzerine 2,5 mL etanol pyrogallol, 1 mL etanol (%95), 1 mL NaCl (10 g/L) ve 1 mL KOH (600 g/L) ilave edilmiştir. 70°C'de 30 dakika süre ile su banyosunda inkübe edildikten sonra hızla buzda soğutulmuş ve üzerine tekrar 7.5 mL NaCl ilave edilmiştir. Vorteks ile iyice

karıştırılmasının ardından iki kez *n*-hekzan ve etil asetat (9:1) karışımı ile ekstrakte edilmiş, üst kısımda bulunan organik fazlar toplanmış ve tamamen kuruyuncaya kadar 60°C'de rotary evaporatörde uçurulmuştur. Kuru kısım 500 µL heptan-tetrahidrafuran (19:1) karışımında çözülmüş ve HPLC analizlerinde kullanılmıştır.

HPLC ile α-tokoferolün belirlenmesi

α-Tokoferol miktarlarının belirlenmesi de HPLC (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) de gerçekleştirilmiştir. Kolon olarak Luna Silica (250 x 4,6 mm, 5 µm), dedektör olarak da RF-10AXL Floresan dedektör (Ex 295nm-Em 330 nm) kullanılmıştır. Mobil faz heptan/THF (95:5), akış hızı 1.2 mL/dak. ve enjeksiyon hacmi de 20 µL olarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler "Shimadzu Class-VP Chromatography Laboratory Automated Software System" kullanılarak analiz edilmiştir. Örneklerde α-tokoferol miktarları, α-tokoferol standardı ile hazırlanan kalibrasyon körvesinden yararlanılarak hesaplanmış ve sonuçlar µg/g YA cinsinden verilmiştir. Analizler 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır.

İstatistiksel analizler

Araştırmada gerçekleştirilen analizlere ilişkin verilerin değerlendirilmesinde SPSS (16.0) istatistiki analiz programı kullanılmış olup, uygulamalar ve analizler üç tekerrürlü olarak yapılmıştır. UV-C'nin uygulama mesafesi, uygulama süresi ve örnek alım dönemleri olmak üzere üç faktörlü deneme desenine göre gerçekleştirilen bu araştırmada uygulamalar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Gamay üzüm çeşidine ait kalluslara farklı süre ve mesafelerde uygulanan UV-C'nin *trans*-resveratrol, (+)-kateşin, ferulik asit ve α-tokoferol üretimi üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu araştırmada 0., 24. ve 48. saatlerde örnek alım işlemleri gerçekleştirilmiştir. Örneklerin ilk aşamadaki sahip oldukları metabolitlerin belirlenmesi amacı ile 0. saatte örnek alım işlemleri yapılmıştır.

Benzer çalışmalarda da örnek alım işlemlerinde belirli saatlerdeki zaman dilimlerinin kullanıldığı bilinmektedir (Keskin and Kunter 2010; Liu et al., 2010). Araştırmada ikinci alt kültürü takip eden 12 günlük kalluslar kullanılmıştır. Nitekim bu dönemin asma kalluslarında sekonder metabolitlerin üretimi için en uygun dönem olduğu bildirilmektedir (Keskin ve Kunter 2007).

Araştırmada fenolik bileşikler ile α -tokoferol analizleri HPLC ile gerçekleştirilmiştir. HPLC, özellikle fenolik bileşiklerde de olduğu gibi yüksek sıcaklıklarda bozulan bileşikler için son derece uygun bir metot olması, aynı anda nicel ve nitel analizlerin yapılmasına olanak tanınması, yüksek çözünürlük sağlaması, basit, hızlı ve tekrarlanabilir olması, yüksek oranda geri kazanımın sağlanması ve farklı dedektörler kullanılarak farklı kimyasal yapıdaki bileşiklerin tespit edilebilmesi gibi nedenlerle son derece avantajlı bir analiz metodu olarak değer taşımaktadır (Yiğit ve ark., 2008).

UV-C'nin, kallus kültürlerinde *trans*-resveratrol (Çizelge 1), (+)-kateşin (Çizelge 2) ferulik asit (Çizelge 3) ile α -tokoferol (Çizelge 4) miktarları üzerine olan etkilerinin incelendiği araştırma sonucunda elde edilen bulgular değerlendirildiğinde incelenen tüm kriterlerin gerek UV-C uygulama süresine, gerek uygulama mesafesine ve gerekse örnek alım zamanına göre istatistiksel olarak önemli ölçüde değiştiği belirlenmiştir ($P \leq 0.05$).

Araştırmada incelenen fenolik bileşiklerden ilki *trans*-resveratrol olup, uygulamalara göre en yüksek değer UV-C radyasyonunun daha uzun süreli uygulanmış olduğu 10 dakika gruplarından elde edildiği göze çarpmaktadır (Çizelge 1). Nitekim istatistiksel olarak en yüksek değer (1,99 $\mu\text{g/g}$ YA), 10 dakika süre ile 30 cm mesafeden UV-C radyasyonuna maruz bırakılarak 48. saatte alınan kalluslarda tespit edilmiştir. UV-C uygulaması ile en

yüksek *trans*-resveratrol üretiminin sağlandığı kallusların sahip oldukları miktarın, kontrol grubuna oranla çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, Keskin and Kunter (2010) tarafından Öküzgözü üzüm çeşidine ait kalluslara uygulanan UV-C ile *trans*-resveratrol miktarının kontrol gruplarına oranla çok daha yüksek düzeylerde elde edildiğinin belirtildiği araştırma sonuçları ile uyum içindedir.

Asmalarda 254 nm dalga boyuna sahip UV-C radyasyonunun resveratrol uyarımı için son derece etkili olduğu tespit edilmiştir (Barlass et al., 1987). Benzer şekilde Sardi et al. (2000) da türler arası melezler ile *V. vinifera* çeşitlerinde *trans*-resveratrol birikimini en yüksek düzeyde arttıran abiyotik elisitörün UV ışını olduğunu vurgulamışlardır. Versari et al. (2001), UV uygulamasının ben düşme döneminde Corvina üzüm çeşidine ait tanelerde stilben sentaz enziminin aktivitesini artırdığını, Paronetto ve Mattivi (1999) de Corvina ve Corvinone üzüm çeşitlerinde UV uygulamasının, bu üzümlerden yapılan şaraplarda *trans*-resveratrol miktarını iki katına çıkardığını ifade etmişlerdir.

UV-C'nin farklı süre ve mesafelerde uygulanmış olması, radyasyonun etkilerinin daha net olarak ortaya konulmasını sağlamıştır. Nitekim Cantos et al. (2003) da asma kalluslarında *trans*-resveratrol içeriğinin farklı süre ve mesafelerde uygulanan UV-C'ye göre değiştiğini belirtmişlerdir. Farklı örnek alım dönemleri ile de hücrelerin radyasyon uygulaması ile strese girmeleri ve bu strese karşı savunma mekanizmalarını harekete geçirmeleri arasındaki sürenin de tespit edilmesi mümkün olabilmektedir. Benzer şekilde Keskin ve Kunter (2007) de farklı sürelerde UV-C'nin Erciş üzüm çeşidine ait kalluslarda *trans*-resveratrol içeriğini örnek alım zamanlarına göre değiştiğini ifade etmişlerdir.

Çizelge 1. UV-C uygulamalarının Gamay kalluslarında *trans*-resveratrol birikimi üzerine etkileri ($\mu\text{g/g YA}$)
 Table 1. The effects of UV-C treatments on *trans*-resveratrol production in Gamay calli ($\mu\text{g/g FW}$)

Uygulama süresi (dakika) <i>Application duration</i> (minute)	Uygulama mesafesi (cm) <i>Application distance</i> (cm)	Örnek alım zamanı (saat) <i>Sampling time (hour)</i>			Ortalama <i>Mean</i>
		0	24	48	
5	10	1,01 Bb2*	0,88 Bb3	1,67 Bb1	1,18
	20	1,09 Bb2	0,75 Bb3	1,12 Bb1	0,99
	30	1,06 Ba2	1,25 Ba3	1,61 Ba1	1,31
Ortalama <i>Mean</i>		1,05	0,96	1,47	
10	10	0,67 Ab2	0,98 Ab3	1,82 Ab1	1,16
	20	1,72 Ab2	0,98 Ab3	1,71 Ab1	1,47
	30	0,95 Aa2	0,78 Aa3	1,99 Aa1	1,24
Ortalama <i>Mean</i>		1,11	0,91	1,84	
Kontrol ortalama <i>Control mean</i>		0,56	0,48	0,61	
		2	3	1	

*Büyük harfler uygulama süresi, küçük harfler uygulama mesafesi, rakamlar ise örnek alım zamanı arasındaki farklılıkları göstermektedir ($P \leq 0,05$).

Araştırmada herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubu kalluslarında da incelenen metabolitlerin varlığı dikkati çekmektedir. Benzeri çalışmalarda da tespit edilen bu durumun (Keskin ve Kunter 2007; Liu et al., 2010) bir taraftan özellikle resveratrolün kallus kültürleri için de yapı maddesi olma olasılığından (Sardi et al., 2000), diğer taraftan da *in vitro* koşulların da

hücreler için stres faktörleri oluşturma olasılığından kaynaklandığı ifade edilmektedir (Keskin ve Kunter 2007).

Araştırmada incelenen bir diğer fenolik bileşik (+)- kateşin olup, bu bileşiğin miktarının UV-C uygulamasının süresine, mesafesine ve örnek alım zamanlarına göre değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. UV-C uygulamalarının Gamay kalluslarında (+)- kateşin birikimi üzerine etkileri ($\mu\text{g/g YA}$)
 Table 2. The effects of UV-C treatments on (+)- catechin production in Gamay calli ($\mu\text{g/g FW}$).

Uygulama süresi (dakika) <i>Application duration</i> (minute)	Uygulama mesafesi (cm) <i>Application distance</i> (cm)	Örnek alım zamanı (saat) <i>Sampling time (hour)</i>			Ortalama <i>Mean</i>
		0	24	48	
5	10	4,45 Aa3*	5,39 Aa2	8,77 Aa1	6,20
	20	1,31 Ac3	1,27 Ac2	4,44 Ac1	2,34
	30	1,32 Ab3	5,27 Ab2	2,77 Ab1	3,12
Ortalama <i>Mean</i>		2,36	3,98	5,33	
10	10	2,33 Ba3	2,79 Ba2	4,48 Ba1	3,20
	20	2,95 Bc3	4,81 Bc2	4,28 Bc1	4,01
	30	1,32 Bb3	6,51 Bb2	3,34 Bb1	3,72
Ortalama <i>Mean</i>		2,20	4,71	4,03	
Kontrol ortalama <i>Control mean</i>		1,32	1,68	1,68	
		3	2	1	

*Büyük harfler uygulama süresi, küçük harfler uygulama mesafesi, rakamlar ise örnek alım zamanı arasındaki farklılıkları göstermektedir ($P \leq 0,05$).

Kalluslarda UV-C uygulamasının, *trans*-resveratrolde olduğu gibi (+)-kateşin içeriklerinin artırılması bakımından etkili bir uygulama olduğu görülmektedir. Nitekim en yüksek (+)-kateşin içeriği (8,77 µg/g), 5 dakika süre ile 10 cm mesafeden radyasyona maruz bırakılarak 48 saat sonra alınan kalluslarda belirlenmiştir. Bununla birlikte yapılan literatür araştırmalarında asma kalluslarında (+)-kateşin içeriğinin artırılmasına yönelik bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak Antognoni et al. (2007), *Passiflora* kallus kültürlerinde UV uygulamaları ile kontrollere kıyasla daha yüksek miktarlarda flavonoid sentezinin

gerçekleştiğini, Chappel ve Hahlbrock (1984) da maydonozda süspansiyon kültürlerinde UV'nin fenil alanin amonyaliyaz ile kalkon sentaz enzimlerinin aktivitesini artırdığını ve flavonoid üretiminde mutlak gerekli olduğunu ifade etmişlerdir.

Gıda, tıp ve eczacılık alanında yaygın olarak kullanılan bir diğer bileşik de ferulik asit olup (Zhao et al., 2004), bu bileşik bakımından da kalluslara farklı süre ve mesafelerde UV-C uygulamasının neden olduğu değişime ilişkin veriler Çizelge 3' de sunulmuştur.

Çizelge 3. UV-C uygulamalarının Gamay kalluslarında ferulik asit birikimi üzerine etkileri (µg/g YA)

Table 3. The effects of UV-C treatments on ferulic acid production in Gamay calli (µg/g FW).

Uygulama süresi (dakika) <i>Application duration</i> (minute)	Uygulama mesafesi (cm) <i>Application distance</i> (cm)	Örnek alım zamanı (saat) <i>Sampling time (hour)</i>			Ortalama <i>Mean</i>
		0	24	48	
5	10	5,02 Bc2*	7,81 Bc1	7,64 Bc3	6,82
	20	7,22 Bb2	15,47 Bb1	7,14 Bb3	9,94
	30	13,59 Ba2	14,45 Ba1	7,16 Ba3	11,73
Ortalama <i>Mean</i>		8,61	12,58	7,31	
10	10	12,38 Ac2	3,27 Ac1	6,37 Ac3	7,34
	20	6,67 Ab2	7,07 Ab1	7,87 Ab3	7,20
	30	14,16 Aa2	22,43 Aa1	14,92 Aa3	17,17
Ortalama <i>Mean</i>		11,07	10,92	9,72	
Kontrol ortalama <i>Control mean</i>		11,69	3,68	2,94	
		2	1	3	

*Büyük harfler uygulama süresi, küçük harfler uygulama mesafesi, rakamlar ise örnek alım zamanı arasındaki farklılıkları göstermektedir ($P \leq 0,05$).

Çizelge 3 incelendiğinde en yüksek değer (22,43 µg/g) 10 dakika, 30 cm ve 24 saat inkübasyon süresi kombinasyonundan elde edildiği görülmektedir. Çizelgedeki değerler bir bütün olarak değerlendirildiğinde, özellikle 10 dakika süre ve 30 cm mesafeden yapılan uygulamaların kontrol grubuna oranla çok daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Kontrol grubunda ise özellikle 0. ve 24. saat örneklerinde oldukça değişken verilerin elde edildiği belirlenmiştir. Bu durumun kallus kültürlerinde tıpkı hücre süspansiyon kültürlerinde olduğu gibi söz konusu metaboliti üreten ve üretmeyen hücrelerin

bir arada bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Kim et al., 2004). Benzer şekilde Keskin ve Kunter (2007) de elisitör uygulanan kallusun kalitesinin başarıyı önemli ölçüde etkilediğini ifade etmişlerdir.

UV'nin bitkilerde farklı şekillerde zararlanmalara neden olduğu bilinmektedir (Stapleton, 1992). Bu zararın içsel bir takım uyarıcılardan ve aktif oksijen türlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Foyer et al., 1994). Yapılan çalışmalar, α-tokoferolün antioksidan etki göstererek çoklu doymamış yağ asitlerinin zincir reaksiyonunu ve serbest radikalleri sonlandırdığını göstermektedir (Havaux et al., 2005).

Dolayısıyla UV-C stresi karşısında artan bu bileşiğin, aynı zamanda bitkiyi bu zararlanmadan korumada önemli rolü olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle

araştırmada UV-C'nin α -tokoferol üzerindeki etkileri de incelenmiştir (Çizelge 4).

Çizelge 4. UV-C uygulamalarının Gamay kalluslarında α -tokoferol birikimi üzerine etkileri ($\mu\text{g}/100\text{g YA}$)
Table 4. The effects of UV-C treatments on α -tocopherol production in Gamay calli ($\mu\text{g}/100\text{g FW}$).

Uygulama süresi (dakika) <i>Application duration (minute)</i>	Uygulama mesafesi (cm) <i>Application distance (cm)</i>	Örnek alım zamanı (saat) <i>Sampling time (hour)</i>			Ortalama <i>Mean</i>
		0	24	48	
5	10	19,14 Bb2*	37,48 Bb3	61,57 Bb1	39,40
	20	27,12 Ba2	27,64 Ba3	46,68 Ba1	33,81
	30	17,78 Ba2	22,54 Ba3	44,62 Ba1	28,31
Ortalama <i>Mean</i>		21,35	29,22	50,96	
10	10	20,64 Ab2	19,75 Ab3	25,34 Ab1	21,91
	20	15,34 Aa2	41,82 Aa3	87,92 Aa1	48,36
	30	37,28 Aa2	55,68 Aa3	74,86 Aa1	55,94
Ortalama <i>Mean</i>		24,42	39,08	62,71	
Kontrol ortalama <i>Control mean</i>		19,21	43,34	48,76	
		2	3	1	

*Büyük harfler uygulama süresi, küçük harfler uygulama mesafesi, rakamlar ise örnek alım zamanı arasındaki farklılıkları göstermektedir ($P \leq 0,05$).

Çizelge 4 incelendiğinde *trans*-resveratrol ve ferulik asit bakımından en yüksek değerlerin elde edildiği süre olan 10 dakikalık uygulama süresinin α -tokoferol birikimi için de en uygun süre olduğu görülmektedir. Araştırmada en yüksek değerlerin (87,92 - 74,86 $\mu\text{g}/100\text{g YA}$), 10 dakikalık süre ile 20 ve 30 cm mesafelerden uygulama yapılarak 48 saat sonra alınan kalluslardan elde edildiği saptanmıştır. Hücre süspansiyon kültürleri ile α -tokoferol miktarının artırılmasına yönelik olarak asmada sakkaroz, metil jasmonat, kadmiyum sülfat ve aydınlık uygulamalarının etkileri belirlenmiş (Çetin, 2010) ancak asma kallus kültürlerinde UV-C'nin α -tokoferol içeriğine etkisinin belirlenmesine yönelik yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

UV radyasyonunun tokoferol içeriği üzerine etkisi genotiplere göre değişmektedir. Kacharava et al. (2009), UV'nin barbunya ve beyaz pancarda tokoferol içeriğini artırdığını, kırmızı pancarda ise düşürdüğünü belirtmişlerdir. Işık, sıcaklık gibi çevresel faktörler, oksidatif zararlanmadan kaynaklanan α -tokoferol içeriğini etkilemektedir (Wise and

Naylor 1987; Tanaka et al., 1990). Kozak et al. (1999) soya fasulyesi kotiledonlarında UV-B+UV-C uygulamasının α -tokoferol içeriğini kontrol ve UV-B uygulamasına kıyasla iki kat artırdığını, bu durumun UV-B ve UV-C radyasyonunun hücresel düzeydeki mekanizmaları etkilemesinden, UV-C'nin ise metabolik yoldan çok moleküler sinyalleri tetiklemesinden kaynaklandığını ifade etmişlerdir.

Sonuç

Gamay üzüm çeşidine ait yaprak saplarından elde edilen kalluslara farklı süre ve mesafelerde UV-C uygulamalarının, bazı fenolik bileşikler (*trans*-resveratrol, (+)-kateşin ve ferulik asit) ile α -tokoferol üretimi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla planlanmış bu araştırmanın sonucunda bu bileşiklerin sentezinin UV-C uygulamalarına göre değiştiği ve kallus kültürlerinde başarıyla kullanılacak bir yöntem olduğu tespit edilmiştir.

Gerek bitki bünyesinde gerekse insan sağlığı üzerinde son derece önemli rolleri olan sekonder metabolitlerin üretimi büyük

önem taşımaktadır. Günümüzde kullanılan ilaçların yaklaşık dörtte birinin bitkisel kaynaklı olduğu düşünüldüğünde, bu tip doğal ürünlerin yüksek miktarlarda elde edilebilmesinin ne denli önemli olduğu daha iyi anlaşılmaktadır. Diğer taraftan elde edilecek başarının üretimi artırmada uygulanan stres faktörlerinin yanında kullanılan bitki türüne ve çeşidine göre büyük oranda değiştiği de bilinmektedir. Nitekim bu alanda yapılan araştırmalardan farklı olarak çalışmada Gamay üzüm çeşidinden elde edilen bulgular, çeşit seçiminin özellikle *trans*-resveratrol üretimi bakımından sonucu büyük ölçüde değiştirdiğini göstermektedir. Tokoferol üretimi ile UV-C uygulaması arasındaki ilişkinin belirlenmesine yönelik ise herhangi bir araştırmaya rastlanılmamış olup, bu alanda bir ilk olması araştırmanın önemini artırmaktadır. Bununla beraber yapılacak çeşitli stres faktörü ve farklı çeşit denemeleri ile bu stresörlerin sekonder metabolitleri üretme kapasitelerinin incelenmesi ve özellikle kimya, tıp ve eczacılık bilimleri ile birlikte gerçekleştirilecek multidisipliner çalışmalarla potansiyellerinin ortaya konulmasının büyük önem taşıdığı düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Antognoni, F., Zheng, S., Pagnucco, C., Baraldi, R., Poli, F. and Biondi, S. 2007. Induction of Flavonoid Production by UV-B Radiation in *Passiflora quadrangularis* Callus Cultures. *Fitoterapia*, 78: 345-352.
- Arunachalama, M., Mohan Raj, B., Mohan, N. and Mahadevan, A. 2003. Biodegradation of Catechin. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 4: 353-370.
- Barlass, M., Miller, R. M. and Douglas, T. J. 1987. Development of Methods for Screening Grapevines for Resistance to Infection By Downy Mildew. II. Resveratrol Production. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38: 65-68.
- Cantos, E., Espin, J.C., Fernandez, M.J., Oliva, J. and Tomas-Barberan, F.A. 2003. Postharvest UV-C-Irradiated Grapes As A Potential Source For Producing Stilbene-Rich Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1208-1214.
- Caponio, F., Alloggio, V. and Gomes, T. 1999. Phenolic Compounds of Virgin Olive Oil: Influence of Paste Preparation Techniques. *Food Chemistry*, 64: 203-209.
- Caretto, S., Speth, B., Fachechi, C., Gala, R., Zacheo, G. and Giovinazzo, G. 2004. Enhancement of Vitamin E Production in Sunflower Cell Cultures. *Plant Cell Reports*, 23: 174-179.
- Chappel, J. and Hahlbrock, K. 1984. Transcription of Plant Defence Genes in Response to UV Light or Fungal Elicitor. *Nature*, 311: 76-78.
- Coşkun, F. 2006. Gıdalarda Bulunan Doğal Koruyucular. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2: 27-33.
- Çetin, E.S. 2010. Asmada Hücre Süspansiyon Kültürleri ile Sekonder Metabolit Üretimi Üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 132 sayfa, Isparta.
- Dong, Z. 2003. Molecular Mechanism of the Chemopreventive Effect of Resveratrol. *Mutation Research*, 523: 145-150.
- Ferguson, L.R., Lim, I.F., Pearson, A.E., Ralph, J. and Harris, P.J. 2003. Bacterial Antimutagenesis by Hydroxycinnamic Acids from Plant Cell Walls. *Mutation Research*, 542: 49-58.
- Foyer, C.H., Lelandais, M. and Kunert, K.J. 1994. Photooxidative Stress in Plants. *Physiologia Plantarum*, 92: 696-717.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Okajima, K. 1968. Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. *Experimental Cell Research*, 50: 151-156.
- Goodarznia, I. and Govar, A.A. 2009. Superheated Water Extraction of Catechins from Green Tea Leaves: Modeling and Simulation *Transactions C: Chemistry and Chemical Engineering*. 16(2): 99-107.

- Göktürk Baydar, N. 2006. Organic Acids, Tocopherols and Phenolic Compositions of Some Turkish Grape Cultivars. *Chemistry of Natural Compounds*, 42(2): 156-159.
- Göktürk Baydar, N. and Akkurt, M. 2001. Oil Content and Oil Quality Properties of Some Grape Seeds. *Turkish Journal of Agricultural and Forestry*, 25: 163-168.
- Göktürk Baydar, N. and Özkan, G. 2006. Tocopherol Contents of Some Turkish Wine by-Products. *European Food Research and Technology*, 223: 290-293.
- Göktürk Baydar, N., Babalık, Z., Hallaç Türk, F. and Çetin, E.S. 2011. Phenolic Composition and Antioxidant Activities of Wines and Extracts of Some Grape Varieties Grown in Turkey. *Journal of Agricultural Science*, 17: 67-76.
- Havaux, M., Eymery, F., Porfirova, S., Rey, P. and Dörmann, P. 2005. Vitamin E Protects against Photoinhibition and Photooxidative Stress in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 17:3451-3469.
- Kacharava, N., Chanishvili, S., Badridze, G., Chkhubianishvili, E. and Janukashvili, N. 2009. Effect of Seed Irradiation on the Content of Antioxidants in Leaves of Kidney Bean, Cabbage and Beet Cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, 3(3): 137-145.
- Kamal Eldin, A. and Appelqvist, L.A. 1996. The Chemistry and Antioxidant Properties of Tocopherols and Tocotrienols. *Lipids*, 31: 671-701.
- Keskin, N. ve Kunter, B. 2007. Erciş Üzüm Çeşidinin Kallus Kültürlerinde UV Işını Etkisiyle Resveratrol Üretimine Uyarılması. *Ankara Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 13 (4): 379-384.
- Keskin, N. and Kunter, B. 2010. Production of *trans*-resveratrol in Callus Tissue of Öküzgözü (*Vitis vinifera* L.) in Response to Ultraviolet-C Irradiation. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 20(3): 197-200.
- Kim, B.J., Gibson, D.M. and Shuler, M.L. 2004. Effect of Subculture and Elicitation on Instability of Taxol Production in *Taxus* sp. Suspension Cultures. *Biotechnology Progress*, 20: 1666-1673.
- Kiselev, K.V., Dubrovina, A.S., Veselova, M.V., Bulgakov, V.P., Fedoreyev, S.A. and Zhuravlev, Y.N. 2007. The rolB gene-Induced Overproduction of Resveratrol in *Vitis amurensis* Transformed Cells. *Journal of Biotechnology*, 128: 681-692.
- Kozak, R.G., Ricco, R.A., Gurni, A.A., Boveris, A.D. and Puntarulo, S. 1999. Antioxidant Response of Soybean Cotyledons (*Glycine max*) to Ultraviolet Irradiation. *Canadian Journal of Plant Science*, 79: 181-189.
- Kushi, L.H., Folsom, A.R., Prineas, R.J., Mink, P.J., Wu, Y. and Bostick, R.M. 1996. Dietary Antioxidant Vitamins and Death From Coronary Heart Disease in Postmenopausal Women. *The New England Journal of Medicine*, 334: 1156-1162.
- Lin, F.H., Lin, J.Y., Gupta, R.D., Tournas, J.A., Burch, J.A., Angelica Selim, M., Monteiro-Riviere, N.A., Grichnik, J.M., Zielinski, J. and Pinnell, S.R. 2005. Ferulic Acid Stabilizes a Solution of Vitamins C and E and Doubles It's Photoprotection of Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 125: 826-832.
- Liu, W., Liu, C., Yang, C., Wang, L. and Li, S. 2010. Effect of Grape Genotype and Tissue Type on Callus Growth and Production of Resveratrols and Their Piceids After UV-C Irradiation. *Food Chemistry*, 122: 475-481.
- Mathew, S. and Abraham, T.E. 2004. Ferulic Acid: An Antioxidant Found Naturally in Plant Cell Walls and Feruloyl Esterases Involved in It's Release and Their Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 24: 59-83.
- Paronetto, L. and Mattivi, F. 1999. The Resveratrol in Oenology and Application of UV-C Rays to Increase It's Concentration in Amarone Wines. *L'Enoteca*, 35: 73-81.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. 1996. Structure-Antioxidant

- Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20: 933-956.
- Saldamlı, İ. 2007. Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 463-492, Ankara.
- Sardi, E., Korbuly, J., Kiralyne Veghely, Z.S. and Minsovcics, E. 2000. Effect of Different Stresses on the Resveratrol Level in Various Parts of *Vitis* Genotypes. *Acta Horticulturae*, 528: 597-603.
- Sgambato, A., Ardito, R., Faraglia, B., Boninsegna, A., Wolf, F. and Cittadini, A. 2001. Resveratrol, A Natural Phenolic Compound, Inhibits Cell Proliferation and Prevents Oxidative DNA Damage. *Mutation Research*, 496:171-180.
- Shure, K. and Acree, T. 1994. Production of β -damascenone Precursors in Cell Cultures of *Vitis labrusca* cv. Concord Grapes. *Plant Cell Reports*, 13: 477-480.
- Stapleton, A.E. 1992. Ultraviolet Radiation and Plants: Burning questions. *Plant Cell*, 4: 1353-1358.
- Tanaka, K., Masuda, R. and Sugimoto, T. 1990. Water Deficiency-Induced Changes in the Contents of Defensive Substances Against Active Oxygen in Spinach Leaves. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54 (10): 2629-2634.
- Tassoni, A., Fornale, S., Franceschetti, M., Federica, M., Michael, A., Perry, B. and Bagni, N. 2005. Jasmonates and Na Orthovanadate Promote Resveratrol Production in *Vitis vinifera* cv. Barbera Cell Cultures. *New Phytologist*, 166: 895-905.
- Tucker, J.M. and Townsend, D.M. 2005. *alpha*-Tocopherol: Roles in Prevention and Therapy of Human Disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 59: 380-387.
- Versari, A., Parpinello, G.P., Tornelli, G.B., Ferrarini, R. and Giulivo, C. 2001. Stilbene Compounds and Stilbene Synthase Expression During Ripening, Wilting and UV Treatment in Grape cv. Corvina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5531-5536.
- Warden, B.A., Smith, L.S., Beecher, G.R., Balentine, D.A. and Clevidence, B.A. 2001. Catechins are Bioavailable in Men and Women Drinking Black Tea Throughout the Day. *Journal of Nutrition*, 131: 1731-1737.
- Wise, R.R. and Naylor, A.W. 1987. Chilling Enhanced Photooxidation. *Plant Physiology*, 83: 278-282.
- Xia, E.Q., Deng, G.F., Guo, Y.J. and Li, H.B. 2010. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 622-646.
- Yılmaz, Y. and Toledo, R.T. 2004. Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins: Antioxidant Capacity of Catechin, Epicatechin and Gallic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2): 255-260.
- Yiğit, N., Bayhan Öktem, A. ve Aksu, P. 2008. Gıdalarda Pestisit Kalıntı Analizlerinde Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC)' nin Kullanımı. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs, 2008, Erzurum, 1079-1082.
- Zhao, Z., Egashira, Y. and Sanada, H. 2004. Ferulic Acid is Quickly Absorbed from Rat Stomach as the Free Form and Then Conjugated Mainly in Liver. *Journal of Nutrition*, 134: 3083-3088.