

# Utjecaj poplave i suše na fitokemijski sastav i antioksidacijski kapacitet pekinškog kupusa (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt)

---

Stić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:116180>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Petra Stić

UTJECAJ POPLAVE I SUŠE NA FITOKEMIJSKI SASTAV I  
ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET PEKINŠKOG KUPUSA  
(*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt)

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2020.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za fitokemiju na Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Ivane Šola, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### UTJECAJ POPLAVE I SUŠE NA FITOKEMIJSKI SASTAV I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET PEKINŠKOG KUPUSA (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt)

Petra Stić  
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Pojava ekstremnih uvjeta okoliša, kao što su poplave i suše, sve je češća. Biljke se okolišu prilagođavaju promjenama kemijskog sastava. Varijacije kemijskog sastava mogle bi imati značajan utjecaj na nutritivnu vrijednost biljaka, što je posebno važno kod prehrambenih vrsta, uključujući kupusnjače. S obzirom da je pekinški kupus sve zastupljeniji u prehrani, a podataka o njegovom metaboličkom odgovoru na sušu i poplavu nema, cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti utjecaj simuliranih uvjeta suše i poplave na sadržaj fenolnih spojeva, šećera i fotosintetskih pigmenta, te antioksidacijski kapacitet ove vrste. Spektrofotometrijski je određen udio ukupnih fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina, flavonola, tanina, proantocijanidina, antocijana, topivih šećera te fotosintetskih pigmenta (klorofila *a* i *b*, karotenoida). Metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja razdvojeni su, identificirani i kvantificirani kempferol, kvercetin, ferulična, sinapinska i *L*-askorbinska kiselina. Antioksidacijski kapacitet određen je metodama ABTS, DPPH, FRAP i metodom moći reduciranja. Poplava je uzrokovala povećanje koncentracije ferulične i sinapinske kiseline, kvercetina i kempferola, kao i antioksidacijskog kapaciteta određenog metodom ABTS, međutim smanjenje udjela fotosintetskih pigmenta u kineskom kupusu. Suša je uzrokovala povećanje koncentracije *L*-askorbinske kiseline. I suša i poplava povećale su udio šećera, a smanjile udio ukupnih tanina u pekinškom kupusu. Ostale mjerene parametre suša i poplava nisu značajno promijenile.

(80 stranica, 38 slika, 2 tablice, 143 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: klimatske promjene, kupusnjače, biljni metaboliti, flavonoidi, fenolne kiseline, vitamin C, tanini, šećeri, HPLC, spektrofotometrija

Voditelj: Dr. sc. Ivana Šola, doc.

Ocjenitelji: Doc. dr. sc. Ivana Šola

Izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Rad prihvaćen: 02.04.2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### IMPACT OF FLOOD AND DROUGHT ON PHYTOCHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF CHINESE CABBAGE (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (LOUR.) HANELT)

Petra Stić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Extreme environmental conditions such as flooding and drought are becoming more common. Plants adapt to environment by changing phytochemical composition. Chemical composition variations could have a significant impact on plant nutritional value, which is especially important in plants intensely represented in diet, like most Brassicaceae species. Since Chinese cabbage is increasingly prevalent in diet and there is no information on its metabolic response to water stress, the aim of this work was to investigate the impact of simulated flooding and drought conditions on phenolic compounds content, sugars and photosynthetic pigments, and antioxidant capacity of this species. The content of total phenols, flavonoids, hydroxycinnamic acids, flavonols, tannins, proanthocyanidins, anthocyanins, soluble sugars and photosynthetic pigments (chlorophyll *a* and *b*, carotenoids) was determined spectrophotometrically. Using a high-performance-liquid-chromatography method, kaempferol and quercetin, ferulic, sinapic and *L*-ascorbic acid were separated, identified and quantified. The antioxidant capacity was determined by methods ABTS, DPPH, FRAP and reducing power. Flooding increased ferulic and sinapic acid, quercetin and kaempferol concentration, and antioxidant capacity determined by the ABTS method, however, decreased photosynthetic pigments in Chinese cabbage. Drought increased *L*-ascorbic acid concentration. Both flooding and drought increased concentration of soluble sugars, and reduced total tannins in Chinese cabbage.

(80 pages, 38 figures, 2 tables, 143 references, original in: croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: climate change, Brassicaceae, plant metabolites, flavonoids, phenolic acids, vitamin C, tannins, sugars, HPLC, spectrophotometry

Main supervisor: Ivana Šola, PhD, Assist. Prof.

Reviewers: Ivana Šola, PhD, Assist. Prof.

Jasna Lajtner, PhD, Assoc. Prof.

Sofia Ana Blažević, PhD, Assist. Prof.

Thesis accepted: April 2<sup>nd</sup>, 2020

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Kupusnjače .....	1
1.1.1. <i>Brassica rapa</i> L. subsp. <i>pekinensis</i> (Lour.) Hanelt.....	2
1.2. Specijalizirani biljni metaboliti .....	3
1.2.1. Fenolni spojevi .....	4
1.2.1.1. Flavonoidi.....	6
1.2.1.2. Fenolne kiseline.....	8
1.2.1.3. Antocijani .....	9
1.2.1.4. Tanini.....	10
1.3. Šećeri.....	12
1.4. L-askorbinska kiselina .....	14
1.5. Porfirini .....	15
1.6. Fotosintetski pigmenti.....	16
1.6.1. Karotenoidi .....	17
1.6.2. Klorofili.....	19
1.7. Slobodni radikali i antioksidansi.....	20
1.8. Utjecaji okolišnih faktora na biljni organizam.....	22
1.8.1. Suša .....	23
1.8.2. Poplava.....	24
1.9. Cilj rada.....	26
2. MATERIJAL I METODE.....	27
2.1. Materijal .....	27
2.2. Metode.....	28
2.2.1. Priprema ekstrakata .....	28
2.2.2. Određivanje ukupnih fenola .....	28
2.2.3. Određivanje ukupnih flavonoida .....	29
2.2.4. Ukupne hidroksicimetne kiseline i flavonoli.....	29

2.2.5. Antocijani.....	30
2.2.6. Tanini .....	31
2.2.7. Proantocijanidini .....	31
2.2.8. Topivi šećeri.....	32
2.2.9. Fotosintetski pigmenti i porfirini .....	32
2.2.10. Tekućinska kromatografija visoke moći razlučivanja .....	33
2.2.11. Antioksidacijski kapacitet određen metodom ABTS.....	34
2.2.12. Antioksidacijski kapacitet određen metodom DPPH.....	35
2.2.13. Antioksidacijski kapacitet određen metodom FRAP .....	36
2.2.14. Antioksidacijski kapacitet određen metodom redukcijske moći .....	37
2.2.15. Statistička obrada podataka.....	38
3. REZULTATI.....	39
3.1. Utjecaj poplave i suše na ukupne fenole.....	39
3.2. Utjecaj poplave i suše na ukupne flavonoide.....	39
3.3. Utjecaj poplave i suše na ukupne hidroksicimetne kiseline i flavonole .....	40
3.4. Utjecaj poplave i suše na ukupne antocijane .....	42
3.5. Utjecaj poplave i suše na ukupne tanine .....	42
3.6. Utjecaj poplave i suše na ukupne proantocijanidine.....	43
3.7. Utjecaj poplave i suše na topive šećere.....	44
3.8. Utjecaj poplave i suše na fotosintetske pigmente i porfirine .....	45
3.9. Utjecaj poplave i suše na pojedinačne fitokemikalije pekinškog kupusa .....	49
3.10. Utjecaj poplave i suše na antioksidacijski kapacitet pekinškog kupusa .....	55
3.10.1. Antioksidacijski kapacitet određen metodom ABTS.....	55
3.10.2. Antioksidacijski kapacitet određen metodom DPPH.....	56
3.10.3. Antioksidacijski kapacitet određen metodom FRAP .....	57
3.10.4. Antioksidacijski kapacitet određen metodom redukcijske moći .....	58
4. RASPRAVA.....	60

5. ZAKLJUČAK .....	68
6. LITERATURA.....	69
7. ŽIVOTOPIS .....	80



# 1. UVOD

## 1.1. Kupusnjače

Kupusnjače (Brassicaceae) čine jednu od najvećih porodica u biljnom carstvu obuhvaćajući 338 rodova i 3700 vrsta (Al-Shehbaz i sur. 2006). Nastale su u eocenu na području irano-turanske regije iz koje su se dalje proširile svijetom (Franzke i sur. 2011). Mnoge vrste ove porodice od velike su ekonomske, agronomске i znanstvene važnosti; tu pripadaju lisnato i korjenasto povrće, začini, biljke uljarice, ali i štetni korovi (Sharma i sur. 2014). Kupusasto povrće je osnovni prehrambeni proizvod u svakom nastanjenom dijelu svijeta, s izuzetkom tropskih krajeva (OECD 2016). Najviše se uzgajaju u umjerenim dijelovima sjeverne hemisfere: na području jugozapadne i centralne Azije, Kine i Japana, Europe, Mediteranske regije i Sjeverne Amerike (Francisco i sur. 2017). Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih Naroda procijenila je da je svjetska komercijalna proizvodnja cvjetače, brokule i ostalih kupusnjača 2013. godine iznosila preko 93 milijuna tona, s vrijednošću od 31 milijarde američkih dolara (FAOSTAT 2013).

Na razini svjetske poljoprivredne proizvodnje i trgovine, varijeteti iz roda *Brassica* (kao što su brokula, kelj, cvjetača, pekinški kupus) pripadaju u skupinu 10 ekonomski najvažnijih tipova povrća (Francisco i sur. 2017). Za povrće se najviše uzgajaju *B. napus* (uljana repica), *B. rapa* (repa), *B. oleraceae* (u koje ubrajamo kupus, brokulu, cvjetaču, brokulicu, korabu, kelj), *Raphanus sativus* (radič), *Lepidium sativum* (sjetvena grbica) i *Nasturtium officinale* (potočarka). Biljke uzgajane kao začini uključuju *B. juncea* (smeđi senf), *Sinapis alba* (žuti senf), *B. nigra* (crni senf), *A Armoracia rusticana* (hren) i *Eutrema japonica* (wasabi) (OECD 2016). Bitno je spomenuti i vrstu *Arabidopsis thaliana* koja se najčešće koristi kao modelni organizam, a čije je sekvencioniranje genoma revolucionariziralo svako područje u biologiji biljaka i položilo temelje genomike i komparativne biologije (Sharma i sur. 2014).

Blagotvorni učinci kupusastog povrća na zdravlje ljudi povezani su s fitokemikalijama koje sadrže. Najčešće se spominju fenolni spojevi (posebno flavonoli i hidroksicimetne kiseline) koji na razne načine sprječavaju oksidativni stres, detoksificiraju enzime, stimuliraju imunost, smanjuju proliferaciju stanica raka i inhibiraju kancerogene mutacije. Oni štite ljudsko tijelo od slobodnih radikala koji uzrokuju oštećenja DNA, utječu na ekspresiju gena, modifikaciju baza i oksidaciju lipida i proteina (Kapusta-Duch i sur. 2012, Sanlier i Guler-Saban 2018). Kupusnjače su najpoznatiji izvor glukozinolata (tj. izotiocijanata i drugih produkata hidrolize nastalih djelovanjem endogenih mirozinaza koje se oslobađaju uslijed

oštećenja biljnog tkiva i/ili mikrobnom razgradnjom u probavnom sustavu čovjeka) (Francisco i sur. 2017, Kapusta-Duch i sur. 2012). U njima nalazimo i vitamine A, B-6, C i K,  $\beta$ -karoten, lutein, zeaksantin i slične karotenoide, te tokoferole (vitamin E), koji svi zajedno doprinose njihovom antioksidativnom, protuupalnom, antimikrobnom i antialergijskom djelovanju, njihovoj sposobnosti inhibicije enzima, te antitumorskoj aktivnosti (Francisco i sur. 2017). Također imaju i visoki udio minerala i vlakana, a nizak udio masti. Sadrži i folate koji umanjuju rizik od vaskularnih bolesti, raka i defekta neuralne cijevi kod fetusa (Sanlier i Guler-Saban 2018).

Uzimajući u obzir važnost vrsta roda *Brassica* u cijelom svijetu, potrebni su integrirani pristupi istraživanju i uzgoju biljaka kako bi se moglo odgovoriti na buduće zahtjeve, poput povećane potražnje za visoko kvalitetnom hranom, smanjenja otpada i održavanja stalnih prinosa u promjenjivom okruženju s održivim sustavom uzgoja (Eckes i sur. 2017).

#### 1.1.1. *Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt

Pekinški kupus (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis*) (Sl. 1) je dvogodišnje lisnato zeleno povrće i uključuje razne sorte koje pokazuju različite fenotipove, poput onih povezanih s bojom i oblikom (Park i sur. 2019). Klasificiramo ga u tri varijeteta: var. *cylindrica* ima široke, ali tanke, zgužvane i uočljivo zelene listove s bijelim peteljka. Listovi su obično čvrsto zamotani u cilindričnu formaciju kako bi tvorili glavu duljine 30-60 cm i promjera oko 10-17 cm. Var. *cephalata* tvori ravnu glavu sličnu kupusu s glavom bubnja, dok var. *laksa* tvori labavo srce. U drugoj godini rasta biljka snažno ojača, cvate i raste dostižući visinu od 1,5 metra i nosi karakterističan trnac s tipičnim žutim cvijetovima. Uobičajeni nazivi za ovu skupinu uključuju pe-tsai i wombok (Lešić i sur. 2002). Pekinški kupus najviše se konzumira u Aziji, iako se njegova potrošnja postupno povećava i u zapadnim zemljama, a najviše se koristi u slanim i fermentiranim jelima, poput kimchija (Seong i sur. 2016).

S obzirom na uočen pozitivan utjecaj konzumacije pekinškog kupusa na organizam čovjeka, istražena je njegova sposobnost hvatanja reaktivnih kisikov vrsta (ROS) koje posreduju u starenju i oksidativnim oštećenjima te uzrokuju patološke promjene poput upala i ateroskleroze (Seong i sur. 2016).



**Slika 1.** Fenotip zrelog pekinškog kupusa (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis*) (preuzeto s <https://www.dpi.nsw.gov.au/agriculture/horticulture/vegetables/commodity-growing-guides/asian-vegetables/m-z/wombok-embrassica-rapa-subsp.-pekinensisem>)

## 1.2. Specijalizirani biljni metaboliti

Metabolizam biljaka dijelimo na primarni i sekundarni tj. specijalizirani. Metaboliti koji su za život neophodni i time ključni za održavanje stanica (lipidi, proteini, ugljikohidrati i nukleinske kiseline) proizlaze iz primarnog metabolizma. S druge strane, spojevi koji proizlaze iz raznih biosintetskih puteva i ograničeni su na određene grupe organizama su rezultat specijaliziranog metabolizma, nisu neophodni ali doprinose boljoj prilagodbi biljaka okolišu (Reis Giada 2013). Biljni specijalizirani metaboliti uključuju ogroman niz spojeva koji se danas broje u više od 200.000 definiranih struktura, a biljni sekundarni metabolizam pokriva sve fiziološke i biokemijske aspekte specijaliziranih metabolita, uključujući i one funkcionalne i evolucijske (Hartmann 2007). Specijalizirane metabolite klasificiramo prema njihovoj kemijskoj strukturi, a najčešća podjela je na fenolne spojeve, terpene i alkaloide (spojeve koji sadrže dušik). Dobar primjer široko rasprostranjenih sekundarnih metabolita su fenolni spojevi koji su uključeni u sintezu lignina, a oni su zajednički svim višim biljkama. S druge strane, alkaloidi su rijetko distribuirani u biljnom carstvu i mnogo su specifičniji za određeni rod ili čak vrstu biljke (Bourgand i sur. 2001).

Velika raznolikost specijaliziranih metabolita je ključna za interakciju biljaka s okolišem i njihovu prilagodbu na biotički i abiotički stres. Uključeni su u zaštitu protiv herbivora, bakterija, gljiva, virusa, čak i drugih biljaka, neke biljke ih koriste kao signale u komunikaciji s drugim biljkama i simbiotskim mikroorganizmima, a služe i za privlačenje oprašivača i raspršivača sjemenki (Yang i sur. 2018). Također štite biljku i od toksina koje ispuštaju susjedne biljke (alelopatija). Osim toga, apsorbiraju UV zračenje i na taj način

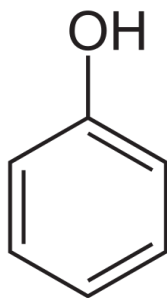
sprječavaju ozbiljna oštećenja listova od svjetlosti. Djeluju i na životinje poput insekata (svojstva protiv hranjenja) ili čak na goveda koja pasu biljke poput djeteline ili lucerne; iskazuju estrogena svojstva i utječu na plodnost ljudi (Hussein i El-Ansary 2018).

Kod većine biljaka vanjski faktori (svjetlost, temperatura, voda u tlu, plodnost tla i slanost tla) mogu značajno utjecati na procese povezane uz njihov rast i razvoj, pa čak i na njihovu sposobnost sintetiziranja i akumuliranja specijaliziranih metabolita, što na kraju dovodi do promjene ukupnog fitokemijskog profila. Drugim riječima, specijalizirani metaboliti se mogu postupno stvarati kao odgovor na okolišni stres, pa se prema tome biljni sekundarni metabolizam može promatrati kao dijelom prilagodbe i preživljavanja na okolišne promjene (Yang i sur. 2018).

Zbog velikih bioloških aktivnosti, biljni specijalizirani metaboliti stoljećima se koriste u tradicionalnoj medicini. Danas su vrijedni spojevi industrijama kao što su farmaceutska, kozmetička i kemijska (Bourgaud i sur. 2001, Yang i sur. 2018). Također se koriste za dobivanje aroma, lijekova za smirenje i esencijalnih ulja (Kabera i sur. 2014). Nedavna istraživanja su utvrdila da je u zapadnim zemljama, gdje je kemija okosnica farmaceutske industrije, 25% korištenih molekula prirodnog biljnog podrijetla, primjerice aspirin (acetilsalicilna kiselina) koji potiče iz salicilata (Bourgaud i sur. 2001).

### 1.2.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su među najzastupljenijom i najbrojnijom skupinom biljnih specijaliziranih metabolita, a zbog bioloških učinaka koje pokazuju također su i jedna od najistraživanijih (Reis Giada 2013). Generički nazivi “fenolni spojevi“, “fenoli“ i “polifenoli“ odnose se na više od 8000 spojeva u biljnom carstvu. Premda se radi o vrlo heterogenoj skupini spojeva, njihovo osnovno obilježje je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova (Sl. 2), uključujući i funkcionalne derivate poput estera, metil etera, glikozida i dr. (Cartea i sur. 2011).



**Slika 2.** Osnovna kemijska struktura fenolnih spojeva (preuzeto od Reis Giada 2013).

Postoji nekoliko podjela fenolnih spojeva, ali najčešća je ona prema Harbornu (1989) u kojoj se dijele ovisno o broju atoma ugljika (Tab. 1). Najraširenija i najraznolikija skupina fenolnih spojeva kod kupusnjača su flavonoidi (najviše flavonoli, ali i antocijani) i hidroksicimetne kiseline (Cartea i sur. 2011).

**Tablica 1.** Podjela fenolnih spojeva prema broju ugljikovih atoma prema Harborne (1989).

Skupina fenolnih spojeva	Broj ugljikovih atoma	Osnovna struktura	Primjer
<b>Jednostavni fenolni spojevi, benzokinoni</b>	6	C <sub>6</sub>	Katehol, hidrokinon
<b>Fenolne kiseline</b>	7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Galna i salicilna kiselina
<b>Acetofenoni, feniloctene kiseline</b>	8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	<i>p</i> -hidroksifeniloctena kiselina
<b>Hidroksicimetne kiseline, fenilpropani, kumarini</b>	9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Ferulična kiselina, eugenol, bergenin, eugenin
<b>Naftokinoni</b>	10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Juglon, plumbagin
<b>Ksantoni</b>	13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Mangiferin
<b>Stilbeni, antrakinoni</b>	14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Lumularična kiselina
<b>Flavonoidi, izoflavonoidi</b>	15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Kvercetin
<b>Lignani, neolignani</b>	18	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Eusiderin
<b>Biflavonoidi</b>	30	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Amentoflavon
<b>Lignini</b>	mnogo	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Pinorezinol
<b>Kondenzirani tanini</b>	mnogo	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Prodelfinidin

U prirodi se uglavnom nalaze u konjugiranom obliku, tj. u obliku glikozida, s jednom ili više šećernih jedinica koje su vezane na hidroksilne skupine (premda postoje i oblici u kojima su šećerne jedinice vezane izravno na aromatski ugljikov atom). Vezani šećeri mogu biti u

obliku monosaharida, disaharida pa čak i oligosaharida, a najzastupljenija šećerna jedinica je glukoza. Šećerna komponenta može sadržavati i mnoge druge šećere, poput galaktoze, ramnoze, ksiloze i arabinoze, kao i glukuronsku te galakturonsku kiselinu. Fenolni spojevi mogu konjugirati i s drugim spojevima, kao što su različite karboksilne i organske kiseline, amini i lipidi. Česte su i konjugacije s drugim fenolnim spojevima (Bravo 1998). Slobodni fenolni spojevi su nešto rjeđa pojava, što se pripisuje činjenici da su u tom obliku otrovni, a vezanjem se (barem djelomično) detoksificiraju (Reis Giada 2013).

Fenolni spojevi u biljkama mogu djelovati kao signalne molekule, sudjeluju u hormonskoj regulaciji rasta biljaka, štite ih od infekcija mikroorganizmima (baktericidno djelovanje), djeluju kao zaštitni agensi od UV zračenja, privlače oprašivače, pridonose pigmentaciji biljaka, dok u namirnicama pridonose boji, okusu (gorčini, oštrini), mirisu i oksidativnoj stabilnosti (Berend i Grabarić 2008).

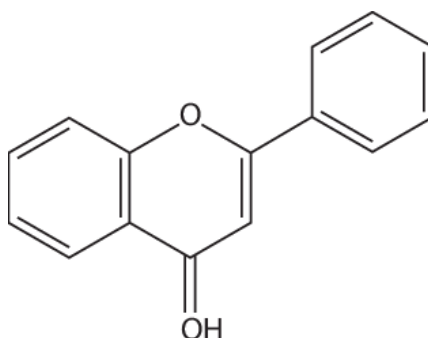
Fenolni spojevi se mogu sintetizirati na 2 načina: putem šikiminske kiseline u kojem su glavni proizvodi fenilpropanoidi i putem octene kiseline u kojem nastaju jednostavni fenoli. Većina biljnih fenolnih spojeva se sintetizira iz fenilpropanoida, dok se kombinacijom oba načina stvaraju flavonoidi, najbrojnija skupina fenolnih spojeva u prirodi (Cartea i sur. 2011, Reis Giada 2013).

Posljednjih godina raste interes za prirodnim fenolnim spojevima koje nalazimo u biljkama jer se konzumiranjem hrane i pića s visokom razinom fenolnih spojeva može smanjiti rizik od određenih bolesti (Reis Giada 2013). Dokazana su protuupalna, antialergijska i antikancerogena djelovanja nekih fenolnih spojeva, kao i namirnica koje ih sadržavaju, npr. crno vino i zeleni čaj (Rice-Evans i sur. 1997). Od fenolnih spojeva, fenolne kiseline, flavonoidi i tanini smatraju se najčešćima u ljudskoj prehrani. Mnoge studije pokazuju snažnu povezanost između sadržaja fenolnih spojeva i antioksidacijskog potencijala voća i povrća (Reis Giada 2013).

#### 1.2.1.1. Flavonoidi

Sveprisutni kod kritosjemenjača, flavonoidi su izrazito raznoliki u svojoj kemijskoj strukturi, boji i biološkoj funkciji. Osnovna struktura svih flavonoida je fenilpropanoidna jezgra s 15 ugljikovih atoma ( $C_6-C_3-C_6$ ) raspoređena u dva aromatska prstena (A i B) koji su povezani heterocikličkim piranskim prstenom (Sl. 3). Prema oksidacijskom stanju i

zasićenosti heterocikličkog prstena, flavonoide dijelimo na: flavone, flavanone, izoflavone, flavonole, 3-deoksiflavonoide i antocijane (Jiang i sur. 2016).



**Slika 3.** Osnovna kemijska struktura flavonoida (preuzeto od [https://www.researchgate.net/figure/Basic-structural-backbone-of-flavonoids\\_fig2\\_283162468](https://www.researchgate.net/figure/Basic-structural-backbone-of-flavonoids_fig2_283162468))

Svi flavonoidi se sintetiziraju iz aromatske aminokiseline fenilalanina (i u manjoj mjeri iz tirozina). Struktura im varira ovisno o stupnju i mjestu hidroksilacije, prenilacije, alkalizacije ili glikolizacije koja modificira primarnu molekulu. Ove modifikacije mogu utjecati na topivost flavonoida u vodi, što zatim utječe na njihovu biodostupnost (Gutiérrez-Grijalva i sur. 2018). U biljnom tkivu se najčešće nalaze u obliku glikozida jer imaju sposobnost vezanja raznih šećernih molekula u raznim pozicijama - postoji preko 10 000 flavonoida. Jedna aglikonska molekula poput kvercetina u biljkama se pojavljuje u više od 170 glikozidnih oblika (Mageney i sur. 2017).

Nekoć su smatrani otpadnim proizvodima pohranjenim u vakoli, no danas se zna da imaju razne biološke učinke - djeluju kao fitoaleksini, zaštita od UV zračenja, sudjeluju u transportu biljnog hormona auksina te time utječu na strukturu biljke (Nix i sur. 2017). Antocijanidini i njihovi glikozidi antocijani su pigmenti u cvijeću i povrću i pouspješuju oprašivanje i raspršivanje sjemenki. Ovi crveno do plavi pigmenti su često popraćeni blijedo žutim ili bezbojnim flavonolima koji djeluju kao ko-pigmenti i imaju ulogu u zaštiti od UV zračenja, otpornosti na bolesti i hormonskoj signalizaciji (Dudek i sur. 2016).

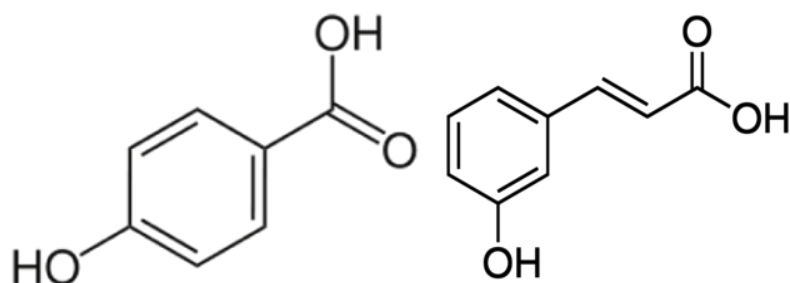
Flavonoidi se povezuju sa širokim spektrom pozitivnih učinaka na zdravlje i nezamjenjiva su komponenta u različitim prehrambenim, farmaceutskim, medicinskim i kozmetičkim proizvodima. Ovo se temelji prije svega na njihovim antioksidativnim, protuupalnim, antimutagenim i antikancerogenim svojstvima, zajedno s njihovom sposobnošću regulacije funkcija ključnih staničnih enzima. Također je poznato i da su snažni inhibitori nekih enzima kao što su npr. ksantin oksidaza, ciklo-oksigenaza, lipoksigenaza i fosfoinozimid-3-kinaza (Panche i sur. 2016).



### 1.2.1.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su, kao i flavonoidi, aromatski specijalizirani metaboliti široko rasprostranjeni u biljnom carstvu. Voću i povrću daju okus, aromu i ljekovita svojstva. Fenolne kiseline se odnose na fenolne spojeve koji sadrže karboksilnu skupinu. U prirodi se najčešće pojavljuju u 2 karakteristična oblika: kao derivati hidroksibenzojeve i kao derivati hidroksicimetne kiseline bazirani na C6-C1 i C6-C3 strukturi (Tsao 2010). Ove spojeve se proučava zbog njihovih antioksidacijskih svojstava kojima ublažavaju simptome raznih degenerativnih bolesti, primjerice kardiovaskularnih, upalnih i raka (Saxena i sur. 2012).

Za razliku od voća i povrća koje sadrži slobodne fenolne kiseline, u žitaricama i sjemenkama dolaze u vezanom obliku. Fenolne kiseline nastaju u putu šikimata koji uključuje nekoliko enzimatskih reakcija odgovornih za pretvaranje intermedijera pentoza fostatnog puta i glikolize u tri esencijalne aminokiseline: fenilalanin, tirozin i triptofan. Iz fenilalanina i tirozina dalje nastaju 2 glavne skupine fenolnih kiselina: hidroksibenzojeve i hidroksicimetne. Hidroksicimetne kiseline su najveća grupa fenolnih kiselina. Osnovnu strukturu im čini C6-C3 kostur (Sl. 4b), a u prirodi su najčešća kavena, ferulična, *p*-kumarinska, sinapska te *o*-kumarinska i cimetna u nešto manjoj količini. Hidroksibenzojeve kiseline imaju C6-C1 kostur, poput galne, *p*-hidroksibenzojeve, vanilinske i siringične (Sl. 4a) (Taofiq i sur. 2017).

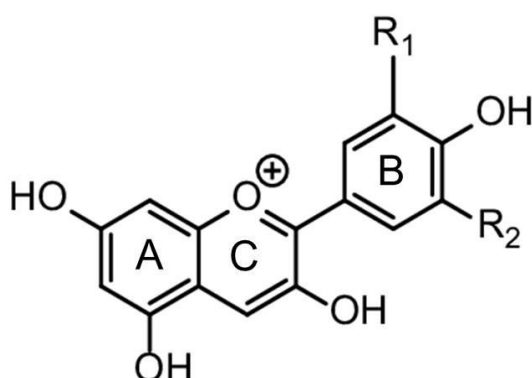


**Slika 4.** Osnovna kemijska struktura a) hidroksibenzojevih i b) hidroksicimetnih kiselina (preuzeto od [https://www.researchgate.net/figure/Basic-structures-of-phenolic-acids-and-flavonoids\\_fig1\\_235689961](https://www.researchgate.net/figure/Basic-structures-of-phenolic-acids-and-flavonoids_fig1_235689961)).

Struktura hidroksicimetnih kiselina ovisi o broju i o položaju hidroksilnih skupina na aromatskom prstenu. Također se mogu naći i u obliku derivata, poput amida (kombinacija s aminokiselinom ili peptidom) i estera (kombinacija s hidroksi kiselinom ili glikozidom) (Vinholes i sur. 2015).

### 1.2.1.3. Antocijani

Antocijani su najveća skupina fenolnih pigmenta i najvažnija skupina u vodi topivih biljnih pigmenta. Pronalazimo ih u gotovo svim biljkama višeg stupnja razvoja, ali zato nisu toliko prisutni kod algi, jetrenjarki i ostalih biljaka nižeg stupnja razvoja (Delgado-Vargas i sur. 2000). Antocijani pripadaju flavonoidima, široko rasprostranjenoj skupini fenolnih spojeva, koje biljke sintetiziraju u sklopu njihovog specijaliziranog metabolizma. U kemijskom smislu su glikolizirani antocijanidini (Sl. 5). U prirodi je moguće naći stotine različitih antocijana zbog složenih obrazaca glikolizacije njihovih aglikona, tj. antocijanidina (Ramos i sur. 2014). Iako je u prirodi identificirano 25 različitih aglikona, samo ih je 6 (cijanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin i petunidin) široko rasprostranjeno u prirodi i čine preko 90% identificiranih antocijanidina (Khoo i sur. 2017). Do danas je u prirodi otkriveno više od 600 antocijana i svi potječu od 6 spomenutih antocijanidinskih aglikona procesima glikolizacije i acilacije. Različiti konjugati antocijana apsorbiraju svjetlost na 500 nm i odgovorni su za crvenu, ljubičastu i plavu boju u raznom voću, povrću, žitaricama i cvijeću (Ramos i sur. 2014).



**Slika 5.** Osnovna kemijska struktura antocijana (preuzeto od [https://www.researchgate.net/figure/Basic-structure-of-anthocyanin\\_fig1\\_330814262](https://www.researchgate.net/figure/Basic-structure-of-anthocyanin_fig1_330814262))

Antocijani su intenzivnih boja pri niskom pH zbog prisustva osam konjugiranih dvostrukih veza koje daju pozitivan naboj molekuli (Ramos i sur. 2014). Boja im u velikoj mjeri ovisi o broju hidroksilnih skupina na B prstenu: što je veći broj skupina, to će boja biti tamnija. Do varijacija u boji dolazi zbog različitih supstitucija na B prstenu; plava nastaje hidroksilnom, a crvena metoksilnom supstitucijom (Ramos i sur. 2014, Tanaka i sur. 2008). Stabilnost antocijana ovisi o pH, svjetlosti, temperaturi i njegovoj strukturi (Khoo i sur. 2017).

Mnoge studije su potvrdile da antocijani imaju antikancerogena i protuupalna svojstva, pružaju zaštitu od kardiovaskularnih bolesti, omogućuju kontrolu pretilosti i dijabetesa i poboljšavaju vidne i moždane funkcije (Ramos i sur. 2014). U posljednje vrijeme raste interes za razumijevanjem mehanizama pomoću kojih antocijani pomažu biljkama nositi se s abiotičkim stresovima, što je najvažnije u kontekstu smanjenja prinosa uslijed globalnih klimatskih promjena. Antocijani se obično induciraju u biljnom vegetativnom tkivu kao odgovor na brojne različite abiotičke stresove, uključujući sušu, povećani salinitet, višak svjetla, sub-ili supraoptimalne temperature, te manjak dušika i fosfora. Predložene uloge antocijana tijekom abiotičkih stresova su hvatanje ROS-ova, zaštita od UV zraka, signalizacija stresa i ksenohormeza (biološki princip koji podrazumijeva „prijenos“ signala stresa u okolišu od biljaka koje su mu se prilagodile mijenjanjem udjela bioaktivnih spojeva do životinja koje se hrane tim „stresom imuniziranim“ biljkama i na taj način percipiraju promjene u okolišu) (Kovinich i sur., 2015).

#### 1.2.1.4. Tanini

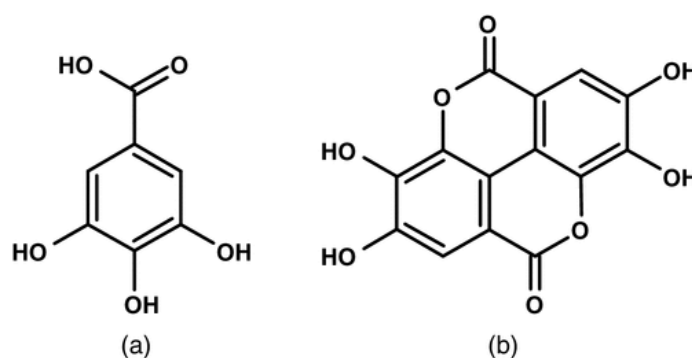
Bate-Smith i Swain su 1975. godine definirale biljne tanine kao fenolne spojeve topive u vodi molekularne mase između 500 i 3000 Daltona. Njihova karakteristična svojstva uključuju formiranje netopivih kompleksa s proteinima, polisaharidima, nukleinskim kiselinama ili alkaloidima. Zajedno s ovim karakteristikama, tanini također sudjeluju u raznim biološkim aktivnostima koje su često povezane s njihovim antioksidativnim svojstvima (Koleckar i sur. 2008). Tradicionalno su tanini bili opisivani kao modulatori u interakcijama biljaka i biljojeda, te kao zaštitni agensi od infekcija, a zbog njihovog kiselog okusa i svojstva taloženja proteina glavna im je funkcija odbijanje mikrobnih patogena, štetnih insekata i biljojeda. Tanini su prisutni u listovima, kori, plodovima i sjemenkama mnogih biljaka (Furlan i sur. 2011). Obavljaju više zaštitnih funkcija i olakšavaju interakciju biljaka s njihovim biotičkim i abiotičkim okruženjem tijekom aktivnog rasta tkiva i nakon starenja tkiva. U zelenim tkivima, kao zaštitni spojevi, tanini imaju vrlo važnu ulogu u zaštiti biljke od UV zraka (Kraus i sur. 2003).

Tanine klasificiramo u dvije glavne grupe, ovisno o njihovoj strukturi: u kondenzirane i hidrolizirane tanine (Sl. 6) (Kraus i sur. 2003). Kondenzirani tanini su oligomeri ili polimeri flavan-3-ola kao što su katehin i galokatehin. Također se nazivaju proantocijanidinima jer se u zagrijanoj etanolnoj otopini razgrađuju na antocijanidine (Koleckar i sur. 2008, Top i sur.

2017). Pokazuju visok stupanj strukturne varijabilnosti: ovisno o strukturi njihovih monomera (propelargonidini, procijanidini, prodelfinidini, profisetinidini i prorobinetinidini), njihovoj interflavanskoj vezi (A i B proantocijanidini) i stupnju polimerizacije (Navarro-Hoyos i sur. 2017). Najčešće se sastoje od (+) katehinskih i (-) epikatehinskih jedinica, ponekad su esterificirani galnom kiselinom na epikatehinskim dijelovima (Zhou i Raffoul 2012), a sintetiziraju se fenilpropanoidnim i flavonoidnim putem (He i sur. 2008).

Identificirano je 15 potklasa proantocijanidina, međutim samo se nekoliko njih ističe u hrani i dodacima prehrani biljnog podrijetla. Različite potklase su imenovane na temelju pretvorbe monomernih jedinica u odgovarajuće antocijanidine tijekom depolimerizacije katalizirane kiselinom. Iz tog razloga je ova široka klasa polimera imenovana proantocijanidinima. Primjeri uključuju pretvorbu (epi)katehina u cijanidin (procijanidini) i (epi)galokatehina u delfinidin (prodelfinidini). Veličina proantocijanidina varira od dimera do velikih polimera (Beecher 2010).

Široko su rasprostranjeni u biljnom carstvu, imaju raznolike biološke funkcije, uključujući zaštitu od predatora (biljojeda), napada patogena (bakterija i gljivica), kao i ograničavanje rasta susjednih biljaka. Proantocijanidini su također široko rasprostranjeni u hrani biljnog podrijetla, posebno u voću, mahunarkama, žitaricama i različita pićima poput vina, jabukovače, čaja i kaka, gdje pridonose gorkom okusu i adstringenciji (He i sur. 2008). Posljednjih godina znatnu pozornost su privukli zbog potencijalnih blagotvornih učinaka na ljudsko zdravlje poput imunomodulacijskih i antikancerogenih aktivnosti, antioksidacijskih svojstava, protuupalnog djelovanja, zaštite kardiovaskularnog sustava te zaštite od UV zračenja (Zhou i Raffoul 2012).



**Slika 6.** Osnovna kemijska struktura a) hidroliziranih i b) kondenziranih tanina (preuzeto od <https://ascelibrary.org/doi/10.1061/%28ASCE%29EE.1943-7870.0001196>).

Tanini koji se mogu hidrolizirati sastoje se od jedinica galne kiseline povezane preko esterskih veza s funkcionalnom skupinom glukoze, a mogu se dalje klasificirati kao galotanini i elagitanini prema odgovarajućem prisustvu ili odsutstvu C-C povezanih galnih skupina (Top i sur. 2017). Hidrolizirani tanini su spojevi koje čini centralna molekula, poput glukoze ili drugog poliola, esterificirana galnom kiselinom - tada se nazivaju galotanini. Kada je glukoza esterificirana elaginskom kiselinom (dilakton heksahidroksidifenska kiselina) nazivaju se elagitanini. Do raznolikosti u strukturi ovih spojeva dolazi zbog različitih načina stvaranja oksidativne veze. Biljke sintetiziraju galotanine, elagitanine ili njihove kombinaciju, i dok su kondenzirani tanini prisutni kod mnogih viših biljaka, hidrolizirani su limitirani na dvosupnice; porodice Ericaceae, Geranieceae i Fagaceae sintetiziraju galotanine, a vrste podrazreda Dilleniidae i Rosidae elagitanine (Koleckar i sur. 2008). Glosjemenjače i jednosupnice proizvode prvenstveno kondenzirane tanine, a dvosupnice mogu proizvoditi ili hidrolizirane ili kondenzirane, ili njihove kombinacije (Kraus i sur. 2003).

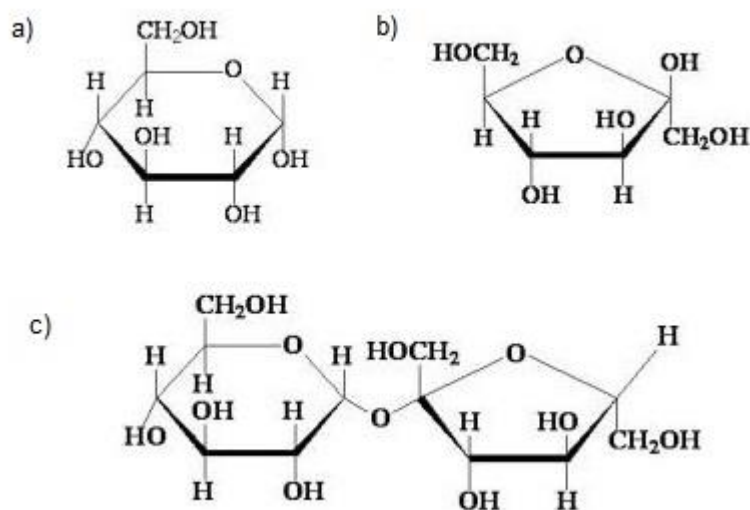
Utvrđeno je da se fenoli i tanini sintetiziraju u biljkama ne samo prema genetskoj osnovi, fiziološkim zahtjevima i obrambenim potrebama kontroliranim evolucijom, već i pod utjecajem okolišnog stresa poput suše, UV-B zračenja i zagađenja atmosfere (Furlan i sur. 2011). Dakle, u biljkama je proizvodnja tanina uvjetovana ne samo genetski, već i ekološki. Uvjeti okoliša koji utječu na proizvodnju tanina uključuju fotoperiodičnost, pH tla, dostupnost vlage i hranjivih sastojaka, prisutnost biljojeda, te količina CO<sub>2</sub> i O<sub>3</sub> u atmosferi (Top i sur. 2017).

### 1.3. Šećeri

Biljke su fotosintetski autotrofni organizmi koji sami proizvode i konzumiraju šećere (Rosa i sur. 2009). Sintetiziraju ih iz ugljikovog dioksida (CO<sub>2</sub>) i koriste kao prekursore za brojne spojeve potrebne za održavanje homeostaze biljaka, pa čak i kao signalne molekule tijekom stresa (Maness 2010). Šećeri u biljnom organizmu imaju raznolike funkcije, oni su proizvod hidrolitičkih procesa, supstrati u biosintetskim putevima, sudjeluju u proizvodnji energije, te u signalnim sustavima. Također mogu funkcionirati i kao tipične osmotski aktivne tvari stabilizirajući stanične membrane i održavajući turgor. Poznato je da biljke osmotsku ravnotežu održavaju nakupljanjem slobodnih aminokiselina, prolina i šećera u korijenu i izdancima (Mohammadkhani i Heidari 2008). Neke transgene biljke akumuliraju šećerne alkohole koji povećavaju osmotski potencijal stanica i toleranciju prema stresu (Maness

2010). Topivi šećeri su univerzalna strukturna komponenta svih živih organizama i temeljna jedinica biosintetskih procesa stoga ne čudi činjenica da njihove kvalitativne i kvantitativne promjene često prate odgovor biljke na stres (Maness 2010, Rosa i sur. 2009). Te promjene mogu biti posljedica povećane ili smanjene biosinteze šećera, pretvaranja škroba ili drugih oblika skladištenja u topive šećere, raspada polisaharida stanične stijenke i/ili promjena brzine prijenosa šećera. Ovisno o brzini početka djelovanja stresa, biljna tkiva mogu pokazati brze i vrlo specifične promjene u količini topivih šećera - potrebno je brzo i precizno prikupljanje i stabilizacija tkiva ako želimo analitičke rezultate koji uistinu predstavljaju sastav šećera u trenutku berbe (Maness 2010).

Glukoza, fruktoza i saharoza (Sl. 7) imaju glavnu strukturnu i metaboličku ulogu kod biljaka, i na staničnoj i na razini cijelog organizma. Uključene su u brojne reakcije prilagodbe na stres i djeluju kao signalne molekule koje aktiviraju specifične reakcije, rezultirajući važnim promjenama ekspresije gena i proteomskih obrazaca (Couée i sur. 2006).



**Slika 7.** Kemijska struktura a) glukoze, b) fruktoze i c) saharoze (preuzeto i prilagođeno od <https://cdavies.wordpress.com/2009/01/27/simple-sugars-fructose-glucose-and-sucrose/>).

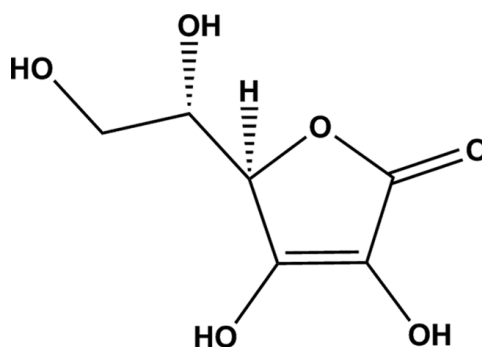
Različite metaboličke reakcije direktno povezuju topive šećere sa stopama proizvodnje ROS-ova, poput respiracije ili regulacije fotosinteze, i obratno, s antioksidacijskim procesima, poput oksidacijskog pentoza-fosfatnog puta i biosinteze karotenoida. Nadalje, stresne situacije u koje su uključeni topivi šećeri, poput niskih temperatura, tretmana herbicidima ili napada patogena, povezane su s važnim promjenama u ravnoteži ROS-ova. Ovi sinergistički ili antagonistički odnosi između topivih šećera, stvaranja ROS-ova i antioksidacijskih procesa

sugeriraju da su signalizacija šećerima i ekspresija gena moduliranih šećerima povezani s kontrolom oksidativnog stresa (Couée i sur. 2006).

#### 1.4. *L*-askorbinska kiselina

*L*-askorbinska kiselina (vitamin C) je najzastupljeniji u vodi topivi antioksidans koji djeluje u reakcijama s jednim elektronom i ključan je mikronutrijent za metabolizam gotovo svih živih organizama (Paciolla i sur. 2019). Unatoč činjenici da ga većina sisavaca može sintetizirati, ljudi (zajedno s drugim primatima, šišmišima i zamorcima) nisu u mogućnosti sami stvarati vitamin C (Gallie 2012). Za razliku od jedinstvenog puta odgovornog za biosintezu askorbinske kiseline kod životinja, biljke koriste četiri puta sinteze, što odražava važnost ove molekule za homeostazu biljnog organizma (Gallie 2012). Biosinteza askorbinske kiseline u višim biljkama odvija se u mitohondrijama na nekoliko načina, a primarni, koji je ujedno i najrazjašnjeniji, put je Smirnoff-Wheelerov koji je također nazvan i *D*-manoza/*L*-galaktoza put (Akram i sur. 2017, Venkatesh i sur. 2014).

Strukturu vitamina C otkrio je Norman Haworth 1933. godine, a činjenica da može spriječiti skorbut dovela je do toga da je imenovana askorbinskom kiselinom (Paciolla i sur. 2019). *L*-askorbinska kiselina je jedan od najjednostavnijih vitamina (Mazid i sur. 2011). Sadrži nekoliko strukturnih elemenata koji doprinose njenom kemijskom ponašanju (Sl. 8): struktura laktona, dvije enolne hidroksilne skupine (položaji 2 i 3) i primarna i sekundarna hidroksilna skupina (položaji 5 i 6) (Barrita i sur. 2013).



**Slika 8.** Kemijska struktura *L*-askorbinske kiseline (preuzeto od [https://www.researchgate.net/publication/277975610\\_An\\_unpaved\\_journey\\_of\\_vitamin\\_C\\_in\\_cancer\\_treatment/figures?lo=1](https://www.researchgate.net/publication/277975610_An_unpaved_journey_of_vitamin_C_in_cancer_treatment/figures?lo=1)).

*L*-askorbinska kiselina djeluje kao elektron donor i antioksidans iz čega proizlaze sva njezina fiziološka i biokemijska djelovanja (Barrita i sur. 2013). Među biljnim antioksidansima *L*-askorbat je glavni antioksidans i u suradnji s drugim komponentama antioksidacijskog sustava štiti biljke od oksidativnih oštećenja koja proizlaze iz aerobnog metabolizma, fotosinteze i od niza zagađivača poput ozona, teških metala i povišenog saliniteta (Mazid i sur. 2011). Djeluje i kao modulator stanične signalizacije u brojnim staničnim procesima, uključujući diobu stanica, širenje stanica i rast stanične stijenke (Venkatesh i sur. 2014, Gallie 2012), a uz to je i kofaktor metaboličkih enzima koji su uključeni u osnovne razvojne procese biljaka i odgovor na stres u okolišu (Mazid i sur. 2011). Na brojne enzimske aktivnosti koje reagiraju na stres utječe sinergijskim djelovanjem s drugim antioksidansima kao što su glutation i  $\alpha$ -tokoferol te smanjuje oksidacijsko oštećenje stanica. Nedavna istraživanja sugeriraju njezinu ulogu u fotosintezi kao alternativnog donora elektrona u fotosustavu II u uvjetima abiotičkog stresa, te glavnu ulogu u zaštiti fotosintetskog aparata u kloroplastu držeći pod nadzorom aktivnost ROS-ova (Venkatesh i sur. 2014).

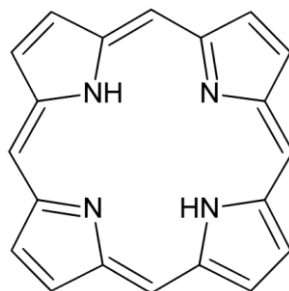
Fiziološki aktivni oblik askorbinske kiseline je rezonancijom stabilizirani anionski oblik (nastaje deprotoniranjem hidroksilne skupine na C<sub>3</sub> atomu) koji se naziva askorbat. Citoplazma stanice je najbogatija askorbatom, a do određene mjere se preko plazma membrane prenosi (obično 5%) u apoplast. Pretpostavlja se da bi sadržaj askorbata u apoplastu mogao biti od presudne važnosti za percepciju stresa u okolišu, te naknadnu signalizaciju i reakciju biljaka na stres (Akram i sur. 2017). Biljke s niskom stopom biosinteze askorbata prilično su osjetljive na različite stresne uvjete u okolišu koji utječu na njihov rast i razvoj, stoga se uloga askorbata u zaštiti od različitih okolišnih stresova poput suše, povećanog saliniteta, ozona, niskih/visokih temperatura i visokog intenziteta svjetlosti sve više istražuje (Venkatesh i sur. 2014). Također, neka istraživanja sugeriraju da je endogeni askorbat uključen u složene signalizacijske mreže posredovane fitohormonima (Mazid i sur. 2011).

## 1.5. Porfirini

Evolucijski odvedenije skupine biljaka proizvode 4 grupe porfirina: klorofile, hem, sirohem i fitokromobilin. Sve četiri grupe nastaju zajedničkim biosintetskim putem iz glutamata koji se odvija u plastidima (Tanaka i sur. 2011). Struktura im je makrociklička i izuzetno stabilna – četiri pirolska aromatska prstena, od kojih svaki sadrži četiri atoma ugljika



i jedan atom dušika, povezana metinskim skupinama (Sl. 9). Atomi dušika u unutrašnjosti čine središnji džep idealno pozicioniran za čvrsto povezivanje s metalnim kelatnim ionom na tetradentski način (Fe, Co ili Mg prevladavaju u biološkim sustavima) (Auwärter i sur. 2015, Larkin 2016).



**Slika 9.** Kemijska struktura porfirina (preuzeto od <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Porphyrin>).

Navedene strukturne značajke, zajedno s raznim supstituentima prstena, doprinose različitim funkcijama porfirina koje se iskorištavaju u prirodnim i umjetnim sustavima (Auwärter i sur. 2015; Larkin 2016). Porfirini se *in vivo* odvajaju kako bi ih se spriječilo od stvaranja singletnog kisika ( $^1\text{O}_2$ ), toksične reaktivne vrste kisika koja uzrokuje stres i smrt stanica. Imaju bitne uloge u širokom rasponu bioloških procesa, uključujući fotosintezu, disanje, asimilaciju dušika/sumpora, detoksifikaciju ROS-ova i apoptozu (Tanka i sur. 2011). Također posreduju u katalitičkim pretvorbama i transportu dišnih plinova (Auwärter i sur. 2015).

## 1.6. Fotosintetski pigmenti

Biljke sintetiziraju više od 200 000 različitih tipova spojeva, uključujući i mnogo obojenih/pigmentiranih (Tanaka i sur. 2008). Pigmenti su kemijski spojevi koji apsorbiraju svjetlost pri određenoj valnoj duljini vidnog spektra. Prisutni su u (skoro) svim živućim organizmima, pa tako i u biljkama kao njihovim glavnim proizvođačima. Nalaze se u listovima, voću, povrću i cvijeću, a također su prisutni i u koži, očima i drugim životinjskim strukturama, kao i u bakterijama i gljivama (Delgado-Vargas i sur. 2000).

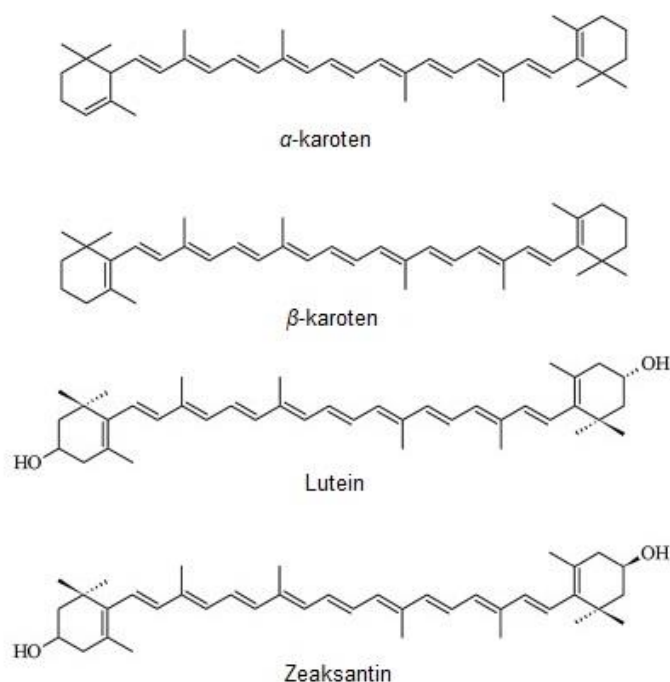
Uz obojenost, pigmenti vrše i razne bitne biološke funkcije; klorofili i karotenoidi u biljnim stanicama sudjeluju u fotosintezi, hemoglobin u životinjskim stanicama veže i prenosi kisik, melanin u koži kralježnjaka štiti od sunca, a kod nekih gljiva je ključan za životni ciklus (Delgado-Vargas i sur. 2000). Osim toga, biljni pigmenti su bitni za signalizaciju; privlače

oprašivače i raspršivače, te odbijaju biljojede (Eldahshan i sur. 2013), a početkom ovog stoljeća je otkriveno i da mnogi od ovih pigmenata igraju pozitivnu ulogu u ljudskom zdravlju (Eldahshan i sur. 2013).

### 1.6.1. Karotenoidi

Karotenoidi čine jednu od najvažnijih skupina biljnih pigmenata. Sadrže ih biljke, alge i fotosintetske bakterije, gdje imaju ulogu u fotosintetskim procesima. Također su nađeni kod nefotosintetskih bakterija, kvasaca i plijesni, gdje imaju zaštitnu ulogu protiv oštećenja uzrokovanih svjetlošću i kisikom. Odgovorni su za crvene, narančaste i žute nijanse listova, voća i cvijeća, kao i za boje nekih ptica, insekata, riba i rakova. Biljni karotenoidi su crveni, narančasti i žuti u lipidima topivi pigmenti ugrađeni u membrane kloroplasta i kromoplasta. Njihova boja je u fotosintetskim tkivima prikrivena klorofilima (u zelenim biljnim tkivima karotenoidi su vidljivi samo nakon degradacije fotosintetskog aparata u jesen), ali u kasnijim stadijima razvoja biljaka doprinose žarkim bojama cvijeća, voća i korijena mrkve (Bartley i Scolnik 1995).

Karotenoidi su izoprenoidni spojevi (uglavnom  $C_{40}$ ) s polienskim lancima koji mogu sadržavati do 15 konjugiranih dvostrukih veza (Sl. 10) (Tanaka i sur. 2008). Sve karotenoide možemo smatrati derivatima likopena, ovisno o reakcijama kojima nastaju: hidrogenacijom, dehidrogenacijom, ciklizacijom, umetanjem kisika, dvostrukom migracijom veze, migracijom metilne skupine, produživanjem ili skraćivanjem lanca (Delgado-Vargas i sur. 2000).



**Slika 10.** Strukture glavnih predstavnika karotenoida (preuzeto i prilagođeno od <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444639325000061>).

Po kemijskoj strukturi se klasificiraju na sljedeći način: ugljikovodični karotenoidi koji su poznati kao karoteni ( $\beta$ -karoten) i oksigenirani karotenoidi koji su derivati ugljikovodika poznati kao ksantofili (zeaksantin i lutein) (Eldahshan i sur. 2013). Također se mogu dijeliti i na primarne i sekundarne. Primarni karotenoidi su oni koje su potrebni biljci pri fotosintezi ( $\beta$ -karoten, violaksantin i neoksantin), dok su sekundarni lokalizirani u voću i povrću ( $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -kriptoksantin, zeaksantin, anteraksantin, kapsantin, kapsorubin) (Delgado-Vargas i sur. 2000).

U kromoplastima svih viših biljaka se akumuliraju kao mješavina  $\alpha$ - i  $\beta$ -karotena,  $\beta$ -kriptoksantina, luteina, zeaksantina, violaksantina i neoksanina. Pronađeni su kao kompleksi vezani nekovalentnim vezama s proteinima. U zelenom lišću karotenoidi su slobodni, neesterificirani, a sastav im ovisi o okolišnim uvjetima i stadiju razvoja biljke (Delgado-Vargas i sur. 2000).

Od antocijana se razlikuju po tome što imaju ključne uloge u biljkama, na primjer, štite fotosintetske organizme od štetnih fotooksidativnih procesa te su sastavne komponente fotosintetskih antena i kompleksa reakcijskog centra. Neki karotenoidi su prekursori abscizinske kiseline, biljnog hormona koji modulira razvoj i stresne procese (Tanaka i sur. 2008).

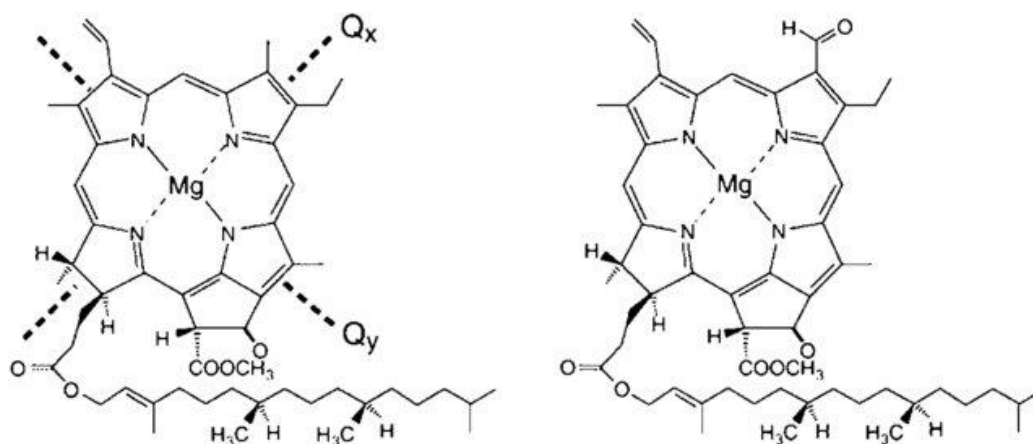
Identificirano je više od 700 prirodnih karotenoida (Tanaka i sur. 2008), njih oko 40 je prisutno u čovjekovoj prehrani, a od tih 40 samo njih 14 je identificirano u krvi i tkivu čovjeka.  $\beta$ -karoten je najproučavaniji i najčešći karotenoid u ljudskoj prehrani. Žute je i narančaste boje, nalazimo ga u mrkvi, bundevi, slatkom krumpiru, marelicama, itd. (Eldahshan i sur. 2013).  $\beta$ -karoten je provitamin kojeg tijelo pretvara u vitamin A i najobilniji je oblik vitamina A u voću i povrću (Bartley i Scolnik 1995, Eldahshan i sur. 2013). Ukupna proizvodnja karotenoida u prirodi procijenjuje se na  $10^8$  tona godišnje, od čega većinu čine četiri karotenoida: fukoksantin u morskim algama, te lutein, violaksantin i neoksantin u zelenim listovima biljaka (Delgado-Vargas i sur. 2000).

### 1.6.2. Klorofili

Klorofili su jedinstveni pigmenti zelene boje koje nalazimo u biljkama, algama i cijanobakterijama (Inanc 2011). Pomoću ovih molekula zelene biljke vrše pretvorbu svjetlosne u kemijsku energiju. Osim toga, klorofili pozitivno utječu i na ljudsko zdravlje; sprječavaju bolesti poput raka, kardiovaskularnih i drugih kroničnih bolesti. Pošto ljudi ne mogu sami sintetizirati klorofil, unose ga biljnom prehranom (Sangeetha i Baskaran 2010).

Glavni izvor života na Zemlji je sunčeva energija koju iskorištavaju zelene biljke, alge i razne fotosintetske bakterije. Iako postoji više fotosintetskih pigmenata poput karotenoida i fikobilina, klorofil je najvažniji jer pretvara sunčevu energiju u esencijalne ugljikohidrate (glukozu) koja je izvor hrane svim biljkama (Pareek i sur. 2017).

Osnovnu kemijsku strukturu klorofila čini ciklički tetrapirolski prsten, velika planarna struktura simetričnog rasporeda u kojoj su četiri pirolska prstena međusobno povezana metinskim skupinama, a četiri dušikova atoma su kordinirana atomom metala u središtu (Scheer 1991). Molekula klorofila sastoji se od „glave“ i „repa“. Glava se sastoji od porfirinskog prstena ili tetrapirolske jezgre na koju je vezan rep od 20 ugljikovih atoma zvan fitol (Sl. 11). Porfirin klorofila je strukturno sličan hem grupi hemoglobina, osim što je kod hemoglobina centralni atom željezo, a kod klorofila magnezij (Inanc 2011). Uz to imaju i fitolsku skupinu koja daje hidrofobnu karakteristiku.



**Slika 11.** Kemijska struktura klorofila *a* i *b*

(preuzeto s [https://www.researchgate.net/publication/317923316\\_Leaf\\_Pigment\\_Content/figures?lo=1](https://www.researchgate.net/publication/317923316_Leaf_Pigment_Content/figures?lo=1)).

Refleksija i/ili prijenos neapsorbirane zelene svjetlosti (srednja valna duljina) daju karakterističnu zelenu boju biljkama i otopinama klorofila. Biljke, zelene alge i prokariotski organizam prokloron imaju samo dva klorofila (*a* i *b*) (Pareek i sur. 2017). Klorofili apsorbiraju plavo i crveno sunčevo zračenje između 430 i 660 nm, a reflektiraju zeleni spektar (Inanc 2011).

Klorofil *a* glavni je fotosintetski pigment u zelenim biljkama i sudjeluje u prijenosu svjetlosne energije na kemijski akceptor. Apsorbira plavu svjetlost (uglavnom na 430 nm) i crvenu svjetlost (uglavnom na 660 nm). Reflektira zelene valne duljine te iz tog razloga ljudskim očima izgleda zeleno (Inanc 2011). Klorofil *a* posjeduje dugačak hidrofobni rep kojim se molekula veže za hidrofobne proteine unutar tilakodne membrane plastida (Pareek i sur. 2017). Prisutan je u kompleksima koji hvataju svjetlost, reakcijskim centrima, fotosustavu I i fotosustavu II, a apsorbira crvenu svjetlost (Scheer 1991). U odnosu na klorofil *a*, klorofil *b* na sedmom C atomu umjesto metilne (-CH<sub>3</sub>) ima aldehidnu (-CHO) skupinu zbog koje je topiviji u polarnim otapalima (Sumanta i sur. 2014). Utvrđeno je da klorofil *b* postoji u zelenim algama, ali i u evolucijski odvedenijim skupinama biljaka. Ovaj pigment ima žutu boju u svom prirodnom stanju, ali upija plavu svjetlost iz cijelog solarnog spektra, a zajedno s klorofilom *a* sudjeluje u fotosintezi (Pareek i sur. 2017).

## 1.7. Slobodni radikali i antioksidansi

Metabolizam podrazumijeva oksidativne procese vitalne za opstanak stanica tijekom kojih dolazi do stvaranja niza reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Reaktivne vrste mogu biti kisikovi ili nitrogenizirani slobodni radikali definirani kao kemijske vrste koje imaju

nespareni elektron u valentnoj ljusci (superoksidni anionski radikal  $O_2^{\cdot -}$ , hidroksil  $HO^{\cdot}$ , hidroperoksil  $HO_2^{\cdot}$ , peroksil  $ROO^{\cdot}$ , alkoksil  $RO^{\cdot}$ , dušikov oksid  $NO^{\cdot}$ , peroksinitrit  $ONOO^{\cdot}$  i dušikov dioksid  $NO_2$ ) ili neutralne molekule ( $H_2O_2$  ili  $HClO$ ) (Bhalodia i sur. 2013, Lobo i sur. 2010, Pisoschi i sur. 2016). Prisutnost nesparenog elektrona rezultira određenim zajedničkim svojstvima koje dijeli većina radikala. Mnogi radikali su nestabilni i visoko reaktivni. Mogu ili donirati jedan elektron ili prihvatiti elektron iz drugih molekula, tim se ponašajući kao oksidansi odnosno reducensi. To su vrlo reaktivne vrste, sposobne oštetiti biološki relevantne molekule poput DNA, proteina, ugljikohidrata i lipida (Lobo i sur. 2010)

Slobodni radikali nastali aerobnim metabolizmom uključeni su u niz regulatornih procesa kao što su stanična proliferacija, apoptoza i ekspresija gena, ali ako ih se nakupi višak mogu suzbiti sposobnost obrane antioksidacijskog sustava, oštećujući esencijalne biomolekule u stanici oksidacijom membranskih lipida, staničnih proteina, ugljikohidrata, DNA i enzima. Oksidativni stres rezultira pojavom citotoksičnih spojeva (malonil dialdehid, 4-hidroksinonenal) i mijenja ravnotežu oksidansa i antioksidanasa (redoks homeostaza) koja karakterizira normalno funkcioniranje stanica (Pisoschi i sur. 2016). Nekontrolirana proizvodnja kisika dobivena iz slobodnih radikala može dovesti do mnogih bolesti poput raka, reumatoida artritisa, kao i do degenerativnih procesa povezanih sa starenjem, pa čak i do Parkinsonove i Alzheimerove bolesti (Almeida i sur. 2011).

U posljednje vrijeme mnoštvo epidemioloških studija je sugeriralo da konzumacija prirodnih antioksidansa putem voća, povrća i čajeva ima zaštitne učinke protiv spomenutih bolesti, a njihova zaštita djelomično proizlazi iz prisutstva spojeva kao što su vitamini, flavonoidi, antocijanini i drugi fenolni spojevi. Spomenuti spojevi koji pročišćavaju slobodne radikale mogu smanjiti razinu oksidativnog stresa i sprečiti oksidaciju biomolekula (Almeida i sur. 2011, Bhalodia i sur. 2013). Antioksidacijska aktivnost se primarno pripisuje njihovim redoks svojstvima koja im omogućuju da inaktiviraju reaktivne oblike kisika, da djeluju kao reducensi i donori vodika (Minatel i sur. 2017). Sposobnost čišćenja radikala je pokazatelj antioksidativne funkcionalnosti i aktivnosti i povezana je s prisutnošću bioaktivnih spojeva (Kowitcharoen i sur. 2018).

Prirodni antioksidansi čine ključni dio obrambenog mehanizma stanice i mogu biti endogeni ili egzogeni. Endogeni se dijele na neenzimatske (glutation, bilirubin, albumin i dr.) i enzimatske (superoksid dismutaza, katalaza, peroksidaza i dr.). Egzogeni antioksidansi su primjerice karotenoidi, tokoferoli, vitamin D, fenolne kiseline, flavonoidi, tanini ili askorbinska kiselina, a u ljudski metabolizam ulaze putem prehrane, lijekova i suplemenata.

Važni su u suzbijanju slobodnih radikala kada endogeni spojevi nisu u stanju osigurati temeljitu zaštitu (Pisoschi i sur. 2016).

### 1.8. Utjecaji okolišnih faktora na biljni organizam

Biljke su pod utjecajem raznih vanjskih uvjeta koji nepovoljno utječu na njihov rast, razvoj ili produktivnost, a kategoriziramo ih kao abiotički i biotički stres. Abiotički stres uzrokuje većinu štete na biljkama diljem svijeta, a uključuje štetne UV zrake, povećani salinitet, poplave, suše, ekstremne temperature, prisutnost teških metala i sl. S druge strane, napadi raznih patogena, poput gljivica, bakterija, oomiceta i nematoda u tlu, te biljojedi predstavljaju biotički stres za biljke (Gull i sur. 2018). U prirodnim uvjetima kombinacija dva ili više tipova stresa, poput suše i povišenog saliniteta, ili suše s ekstremnim temperaturama ili visokim intenzitetom svjetlosti uobičajene su u mnogim poljoprivrednim područjima širom svijeta i mogu utjecati na produktivnost usjeva (Suzuki i sur. 2014). Procjenjuje se da zbog štetnih utjecaja okoliša usjevi dostižu svega 25% predviđenih prinosa (Khan i sur. 2017).

Zbog svojeg sesilnog načina života, biljke su kontinuirano izložene širokom rasponu okolišnih faktora zbog čega su razvile brojne mehanizme prilagodbe na promjene u okolišu (Suzuki i sur. 2014). Sintetiziranjem raznovrsnih specijaliziranih metabolita koji sudjeluju u njihovom rastu i razvoju, te odgovoru na promjene u okolišu, biljke mogu funkcionirati pod utjecajem okolišnih faktora bez da to značajno mijenja njihove stanične i razvojne fiziološke procese (Isah 2019). Promjene mogu biti izazvane: *i*) sastavnicama okoliša koje uključuju lokalne geo-klimatske i sezonske promjene, vanjske uvjete poput temperature, svjetlosti, vlagom te *ii*) razvojnim procesima, a mogu utjecati i na biomasu i biosintezu specijaliziranih metabolita (Isah 2019). Uslijed okolišnih stresova dolazi do smanjenja fotosintetskog kapaciteta i dodatnog svjetlosnog stresa što dovodi do smanjenog rasta i biomase biljke. Biljke s dugim periodom rasta, poput višegodišnjih usjeva i drvenastih biljaka, posebno su osjetljive na drugotrajne stresove (Osakabe i sur. 2014).

Kod biljaka izloženih raznim abiotičkim i biotičkim stresovima dolazi do intenzivnog stvaranja ROS-ova poput vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ), hidroksiperoksidnog ( $HO_2$ ), superoksidnog ( $O_2^{\cdot-}$ ) i singletnog kisika ( $^1O_2$ ) (Venkatesh i sur. 2014). ROS-ovi su visoko reaktivni spojevi i općenito imaju tendenciju interakcije s različitim makromolekulama rezultirajući oksidacijom proteina, membranskih lipida i nukleinskih kiselina te uzrokuje stanično oštećenje, što u konačnici utječe na rast i produktivnost biljke (Venkatesh i sur. 2014,

Khan i sur. 2017). Da bi se zaštitile od nepovoljnih uvjeta, biljke su razvile brojne stanične odbrambene mehanizme, uključujući antioksidanse poput *L*-askorbinske kiseline, glutationa i tokoferola, kao i ROS-detoksifikacijske enzime poput superoksidne dismutaze, peroksidaze i katalaze (Venkatesh i sur. 2014). Pomoću takvog antioksidacijskog obrambenog sustava, koji se sastoji od enzimatskih i neenzimatskih komponenti, stanice najčešće uspiju održati količinu ROS-ova stabilnom (Khan i sur. 2017).

Globalne klimatološke promjene značajno utječu na životni ciklus i funkcije biljaka. Povišena razina CO<sub>2</sub> i O<sub>3</sub>, ekstremne temperature, kao i sve učestalije suše i poplave mijenjaju sadržaj biljnih metabolita, narušavajući fiziološku ravnotežu u biljkama, čime utječu na njihovu distribuciju i opstanak (Top i sur. 2017). Tijekom proteklog desetljeća u svim dijelovima svijeta došlo je do ekstremnih klimatskih pojava, uključujući sušu, toplinske valove i poplave (IPCC 2012, IPCC 2013), a predviđa se da će okolišni stresovi uzrokovani klimatskim promjenama biti sve češća i ozbiljnija pojava (Osakabe i sur. 2014). Očekuje se da će se temperatura zemlje u sljedećih 50–100 godina povećati za 3–5°C, a u tim će se okolnostima biljke sve češće susretati istodobno s abiotičkim i biotičkim stresom (Gull i sur. 2018). Vodni stres jedan je od najvažnijih tipova okolišnog stresa koji može regulirati morfološki rast i razvoj biljaka i promijeniti njihova biokemijska svojstva. Poznato je da nedostatak vode smanjuje rast biljaka, međutim istovremeno povećava koncentraciju nekih specijaliziranih metabolita (Yang i sur. 2018, Selmar i Kleinwächter 2012), što upućuje na obrambenu ulogu metabolita u biljci.

### 1.8.1. Suša

Suša je jedan od glavnih tipova abiotičkog stresa i jedna od najozbiljnijih prijetnji svjetskim zalihama hrane. Značajno utječe na rast i razvoj biljaka, a ima i važnu ulogu u njihovoj geografskoj raspodjeli. Prema Organizaciji za prehranu i poljoprivredu (Food and Agriculture Organization, FAO), 45% poljoprivredne površine je izloženo suši. Manjak vode izaziva skup fizioloških i biokemijskih reakcija u biljkama i jedan je od najsloženijih nepovoljnih uvjeta jer ne ovisi samo o intenzitetu i trajanju pojave stresa, već i o stadiju razvoja biljke i njevoj morfologiji u trenutku stresa (Khan i sur. 2017).

Do suše dolazi uslijed smanjene dostupnosti vode koja je često popraćena snažnim sunčevim zračenjem i visokim temperaturama. To može uzrokovati mnoge promjene u fiziologiji i biokemiji biljaka, uključujući zaustavljanje rasta stanica i fotosinteze s pojačanom



respiracijom (Isah 2019). Na molekularnoj razini, suša uzrokuje porast koncentracije ROS-ova, što vodi do oksidacijskog stresa i oštećenja stanica. Kako bi se nosile s povećanom količinom ROS-ova, biljke aktiviraju složen niz enzimatskih i neenzimatskih detoksifikacijskih mehanizama. Pod neenzimatske spada sinteza spojeva male molekularne mase, kao što je *L*-askorbinska kiselina (vitamin C), karotenoidi, flavonoidi ili glutationi (Seminario i sur. 2017). Novija istraživanja su pokazala da izlaganje biljaka suši potiče veću proizvodnju različitih specijaliziranih biljnih metabolita koji uključuju terpene, složene fenole i alkaloida. Međutim, potvrđeno je da dolazi i do smanjenja biomase (Isah 2019).

U razdoblju između 1980. i 2012. godine u SAD-u je kombinacija suše i toplinskog stresa uzrokovala velike poljoprivredne gubitke od približno 200 milijardi dolara. U istom je razdoblju suša sama nanijela 50 milijardi dolara štete poljoprivrednoj proizvodnji. Uz to, trenutni modeli predviđanja klime ukazuju na postupno povećanje temperature i povećanje frekvencije i amplitude toplinskog stresa u bliskoj budućnosti (Suzuki i sur. 2014). Visoke će temperature biti popraćene produženim sušnim razdobljima, koja bi mogla drastično utjecati na poljoprivredu širom svijeta (IPCC 2008).

Utjecaj sušnog stresa na fitokemijski sastav i antioksidacijski kapacitet biljaka tema je mnogih radova. Primjerice, Selmar i Kleinwächter (2012) su zabilježili da izlaganje kadulje (*Salvia officinalis* L.) suši dovodi do povećane sinteze specijaliziranih metabolita, a Kowitchareon i sur. (2018) su detektirali da suša poboljšava antioksidacijski kapacitet ljuskaste anone (*Annona squamosa* L.).

### 1.8.2. Poplava

Poplava podrazumijeva različite situacije u kojima količina vode može biti u rasponu od tla zasićenog vodom do dubokih vodenih stupova što uzrokuje potpuno potapanje biljaka (Striker 2012). Opseg šteta od poplave teško je predvidjeti zbog složene prirode njihovih pojava, koje mogu značajno varirati ovisno o količini, intenzitetu, trajanju i prostornoj raspodjeli oborina, čineći mnoge ekosustave širom svijeta ranjivim (Ruperti i sur. 2019).

Učestalost poplava, koje globalno uzrokuju veće katastrofe nego bilo koji drugi ekstremni klimatski događaj, povećala se za oko 65% u posljednjih 25 godina (FAO i ostale organizacije, 2018), a Međuvladino vijeće za klimatske promjene (<http://www.ipcc.ch>) izvijestilo je da će svjetske klimatske promjene uzrokovane čovjekom povećati učestalost ozbiljnijih oborina kao i aktivnost tropskih ciklona. Kao rezultat, očekuje se da će poplave na

ravnicama (nizinama) i kultiviranim zemljištima biti sve češća pojava (Striker 2012). Jake kiše u Europi postale su u prosjeku intenzivnije i učestalije, a najmanje jedna desetina (oko 12 milijuna ha) navodnjavanih kultura u zemljama u razvoju izgubila je svoju produktivnost uslijed poplava (Rupert i sur. 2019).

Stres uzrokovan poplavama snažan je pokretač adaptivne evolucije. To je rezultiralo širokim rasponom morfoloških, anatomskih, biokemijskih i molekularnih prilagodbi koje biljke razvijaju kako bi se mogle nositi s djelomičnim potapanjem nametnutim poplavom (Jackson i Colmer 2005). Na morfološkoj razini, uobičajeni odgovori na poplave uključuju rast adventivnog korijenja i povećanje visine biljaka. Najčešći anatomski odgovor je stvaranje aerenhima u tkivima, što olakšava prijenos kisika od izdanaka do korijena. Na fiziološkoj razini, poplava mijenja odnose vode i fiksaciju ugljika. Zatvaranje puči, sa ili bez dehidracije listova, smanjenje transpiracije i inhibicija fotosinteze, reakcije su koje se mogu dogoditi unutar nekoliko sati ili dana nakon poplave, ovisno o toleranciji biljne vrste (Striker 2012).

Poplavljanje je kompleksan stres koji stvara nekoliko, često istodobnih, izazova normalnom funkcioniranju biljke. Glavni problem je manjak kisika i ugljikovog dioksida do čega dolazi zbog iznimno spore difuzije plinova kroz vodu u odnosu na zrak (Jackson i Colmer 2005). Hipoksični uvjeti naglašavaju konkurenciju za kisik između korijena i mikroorganizama, što utječe na sposobnost mikrobiološke nitrifikacije i time dostupnost nitrata (Rupert i sur. 2019). Manjak ili nedostatak kisika u tlu (hipoksija ili anoksija), kao i ukupno smanjenje kvalitete tla na koje utječu anaerobni mikroorganizmi, dovode do nakupljanja toksičnih metabolita (uključujući  $H_2S$ ,  $N_2$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ) i ROS-ova, a utječu i na sintezu hormona stresa (tj. apscizinske kiseline i etilena) u korijenu (Jackson i Colmer 2005; Rupert i sur. 2019). U slučaju kada se poplava proširi i na nadzemne dijelove biljke, fotosinteza postaje ograničena nedostatkom ugljikovog dioksida, ali i sunčeve energije. Nadalje, potpuno potapanje biljke može utjecati na cvjetanje i oprašivanje koji su ključni za završetak reproduktivnog ciklusa (Striker 2012).

## 1.9. Cilj rada

Poplave i suše su, zbog ekstremnih klimatskih promjena kojima smo izloženi, sve češća pojava. Biljke se okolišnim čimbenicima prilagođavaju svojim biokemijskim, fiziološkim i molekularnim procesima, što rezultira promjenama sadržaja njihovih fitokemikalija (Ashraf i sur. 2018), a samim time i njihovih bioloških učinaka. Obrambeni odgovor spram okolišnog stresa ovisi o više čimbenika (biljnoj vrsti, stadiju razvoja, biljnom organu i tkivu, tipu stresa), te je stoga vrlo specifičan i potrebno ga je istražiti kako bi se sakupilo što više informacija o kemijskoj prilagodbi, prehrambenoj vrijednosti i biološkim učincima biljaka uzgojenih u takvim uvjetima. S obzirom da je pekinški kupus (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt) sve zastupljeniji u našoj prehrani, a podataka o utjecaju kritičnih razina vode u tlu na ovu podvrstu nema, cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj, u stakleničkim uvjetima simuliranih, uvjeta poplave i suše na: I) ukupne fenole, flavonoide, hidroksicimetne kiseline i flavonole, II) antocijane i proantocijanidine, III) tanine, IV) topive šećere, V) fotosintetske pigmente (klorofile *a* i *b*, karotenoide i porfirine), VI) *L*-askorbinsku kiselinu (vitamin C), sinapinsku, feruličnu, klorogensku i *p*-kumarinsku kiselinu, VII) flavonoide kempferol i kvercetin, te VIII) antioksidacijski kapacitet ove podvrste.

## 2. MATERIJAL I METODE

## 2.1. Materijal

Kao modelni organizam u sklopu ovog diplomskog rada korištena je podvrsta pekinški kupus (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt). Sjemenke pekinškog kupusa kupljene su od firme International Seeds Processing GmbH, Quedlinburg (Njemačka). Uzgoj i prikupljanje biljnog materijala (tri biološke replike) provedene su u razdoblju od travnja do lipnja 2019 (Sl. 12). Sjeme je klijalo na vlažnom filter-papiru u mraku, pri temperaturi od 23°C i stupnju vlažnosti 65%. Nakon četiri do pet dana klijanja klice su presađene u posude sa sterilnim supstratom Stender B400 (Schermebeck, Njemačka), te su uzgajane u stakleniku u konstantnim uvjetima (22-25°C, režim svjetlosti 16 h dan/8 h noć, vlaga 65%). Svaka biološka replika sastojala se od 3 grupe biljaka: kontrolnih biljaka (redovno zalijevanje svaki drugi dan), biljaka podvrgnutih poplavi (posude s biljkama uronjene u stupac vode visine 3 cm) i biljaka podvrgnutih suši (zalijevanje jednom tjedno) do vremena sakupljanja. Nadzemni dio biljaka sakupljen je 30 dana nakon sadnje na supstrat, smrznut u tekućem dušiku i liofiliziran.



**Slika 12.** Pekinški kupus (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) uzgojen u travnju. K=kontrola, P=poplava, S=suša.

## 2.2. Metode

### 2.2.1. Priprema ekstrakata

Masu od 30 mg liofiliziranog tkiva sam izvagala na analitičkoj vagi i zatim dodala otapalo do volumena od 1 mL. Kao otapalo sam koristila 70%-tni etanol (EtOH), 80%-tni metanol (MeOH) te 80%-tni aceton, ovisno o metodi analize. Uzorci su inkubirani 60 minuta pri sobnoj temperaturi na vrtložnoj mješalici pri 20 okretaja u minuti, a potom centrifugirani na sobnoj temperaturi 5 minuta pri 11000 rpm u centrifugi Eppendorf Centrifuge 5804R. Supernatante sam odvojila u čiste epruvete i spremila na -20°C do daljnjih analiza.

### 2.2.2. Određivanje ukupnih fenola

Za određivanje ukupnih fenola koristila sam etanolne ekstrakte koncentracije 15 mg/mL (koje sam pripremila razrjeđivanjem izvornih ekstrakata koncentracije 30 mg/mL) i metodu s Folin-Ciocalteu reagensom prema Zhishen i sur. (1999). Metoda se temelji na reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom koji predstavlja smjesu fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline koje se pri oksidaciji fenolnih spojeva reduciraju u plavo obojene volframov-oksidi i molibdenov-oksidi (Ough i Amerine 1998). Koncentraciju ukupnih fenola odredila sam spektrofotometrijski, mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri valnoj duljini 765 nm. U epruvetu sam ispipetirala 790 µL deionizirane vode (dH<sub>2</sub>O), 10 µL 15 mg/mL EtOH ekstrakta pekinškog kupusa i 50 µL Folin-Ciocalteu (FC) reagensa. Dobivenu otopinu promiješala sam na vrtložnoj miješalici. Nakon miješanja dodala sam 150 µL 1,88 M otopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, sve još jednom promiješala, a zatim inkubirala 30 minuta na 45°C. Po 200 µL svake otopine ispipetirala sam na mikrotitarsku pločicu u triplikatu. Kao kontrolu sam umjesto ekstrakta koristila 70%-tni EtOH. Apsorbanciju sam očitavala spektrofotometrom FLUOstar Optima na 734 nm.

Baždarni pravac za određivanje koncentracije ukupnih fenola, kao ekvivalenata galne kiseline, prikazuje ovisnost apsorbancije otopine pri 734 nm o masenoj koncentraciji galne kiseline. Koncentraciju ukupnih fenola u uzorcima odredila sam očitavanjem s baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancije EtOH otopina galne kiseline različitih koncentracija (0,05 – 1 mg/mL) pri 734 nm.

Jednadžba baždarnog pravca za galnu kiselinu:  $y = 0,6218x + 0,0255$ ;  $R^2 = 0,9943$   
pri čemu je:

y – apsorbancija pri 765 nm

x – masena koncentracija galne kiseline

### 2.2.3. Određivanje ukupnih flavonoida

Koncentraciju ukupnih flavonoida u etanolnim ekstraktima odredila sam spektrofotometrijski mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri valnoj duljini 517 nm, prema Zhishen i sur. (1999). Koristila sam ekstrakte koncentracije 15 mg/mL (koje sam priredila razrijeđivanjem izvornog ekstrakta koncentracije 30 mg/mL). Određivanje flavonoida temelji se na sposobnosti flavonoida da tvore kompleks s aluminijevim kloridom (AlCl<sub>3</sub>). Intenzitet obojenja ovisi o količini prisutnih flavonoida.

U epruvetu sam ispipetirala 280 μL dH<sub>2</sub>O, 70 μL ekstrakta i 21 μL 5%-tne vodene otopine NaNO<sub>2</sub>. Dobivenu otopinu sam promiješala na vrtložnoj mješalici i inkubirala 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije dodala sam 21 μL 10%-tne vodene otopine AlCl<sub>3</sub>, te je ponovno uslijedilo miješanje i inkubacija 6 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga sam dodala 140 μL 1M NaOH, 168 μL dH<sub>2</sub>O i smjesu još jednom promiješala na vrtložnoj mješalici. Volumen od 200 μL svake otopine ispipetirala sam na mikrotitarsku pločicu u triplicatu. Kao kontrolu sam umjesto ekstrakta koristila 70%-tni etanol. Apsorbanciju sam očitala spektrofotometrom FLUOstar Optima na 517 nm.

Koncentraciju ukupnih flavonoida u uzorcima odredila sam očitavanjem s baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancije etanolnih otopina kvercetina različitih koncentracija (0,05 – 1 mg/mL) pri 517 nm spektrofotometrom FLUOstar Optima. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije ukupnih flavonoida, kao ekvivalenta kvercetina, prikazuje ovisnost apsorbancije otopine pri 517 nm o masenoj koncentraciji kvercetina.

Jednadžba baždarnog pravca za kvercetin:  $y = 0,1694x + 0,0741$ ;  $R^2 = 0,9857$   
pri čemu je:

y – apsorbancija pri 517 nm

x – masena koncentracija kvercetina

### 2.2.4. Ukupne hidroksicimetne kiseline i flavonoli

Koncentraciju ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola izmjerila sam na spektrofotometru Thermo Scientific Nanodrop 2000c modificiranom metodom prema Howard i sur. (2003). U epruvetu sam ispipetirala 25 μL 15 mg/mL EtOH ekstrakta, 25 μL otopine

klorovodične kiseline (HCl) u 96%-tnom EtOH masene koncentracije 1 g/L i 455  $\mu$ L vodene otopine HCl masene koncentracije 2 g/L. Otopine sam 5 sekundi miješala na vrtložnoj mješalici nakon čega sam 500  $\mu$ L ispipetirala u kivete. Ukupne hidroksicimetne kiseline mjerila sam na valnoj duljini 320 nm, a ukupne flavonole na 360 nm.

Za izradu baždarne krivulje za hidroksicimetne kiseline koristila sam otopine cimetine kiseline (0,01 – 1 mg/mL), a za flavonole otopine kvercetina različitih koncentracija (0,1 – 1 mg/mL) u 96%-tnom etanolu. Koncentraciju ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola odredila sam pomoću jednadžbi baždarnih pravaca dobivenih mjerenjem apsorbancije otopina cimetine kiseline, odnosno kvercetina u 96%-tnom etanolu.

Jednadžba baždarnog pravca za cimetnu kiselinu:  $y = 3,9073x + 0,0113$ ;  $R^2 = 0,9999$

Jednadžba baždarnog pravca za kvercetin:  $y = 36,64x + 0,1183$ ;  $R^2 = 0,9979$

pri čemu je:

y – apsorbancija pri 320 nm (za hidroksicimetne kiseline) i 360 nm (za flavonole)

x – masena koncentracija cimetine kiseline (za hidroksicimetne kiseline) i kvercetina (za flavonole)

Koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina izražena je kao miligram ekvivalenata cimetine kiseline po gramu suhe mase uzorka (mg ECK/g sm), dok je sadržaj flavonola izražen u miligramu ekvivalenta kvercetina po gramu suhe mase uzorka (mg QE/g sm).

### 2.2.5. Antocijani

Koncentraciju ukupnih antocijana odredila sam pomoću spektrofotometrijske pH diferencijacijske metode prema Lo Scalzo i sur. (2008). Koristila sam metanolne ekstrakte koncentracije 30 mg/mL. Reakcije su provođene u dvije otopine: 0.025 M KCl (pH=1) i 0,4 M CH<sub>3</sub>COONa x 3H<sub>2</sub>O (pH=4,5). U jednu epruvetu je ispipetirano 140  $\mu$ L 30 mg/mL ekstrakta i 560  $\mu$ L vodene otopine KCl, a u drugu je ekstraktu dodano 560  $\mu$ L vodene otopine CH<sub>3</sub>COONa x 3H<sub>2</sub>O, te su otopine promiješane na vrtložnoj mješalici. Iz svake otopine sam, u triplicatu, ispipetirala po 200  $\mu$ L u mikrotitarsku pločicu, te mjerila apsorbanciju na spektrofotometru FLUOstar Optima pri 520 nm i 740 nm.

Koncentraciju antocijana odredila sam korištenjem sljedećih formula:

$$A = (A_{520} - A_{740})_{\text{pH } 1.0} - (A_{520} - A_{740})_{\text{pH } 4.5}$$

$$\gamma \text{ (mg/L)} = (A \times M \times DF \times 1000) / 26900 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$



pri čemu je: A = apsorbancija, M = molekulska masa, DF = faktor razrijeđenja.

### 2.2.6. Tanini

Za određivanje ukupnih tanina koristila sam modificiranu metodu prema Sangeetha i Vedesree (2012). Otopine sam pripremila na sljedeći način: 10  $\mu$ L 30 mg/mL etanolnog ekstrakta sam pomiješala s 840  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O, 50  $\mu$ L FC reagensa i 100  $\mu$ L 3,5%-tne vodene otopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Za kontrolu je umjesto ekstrakta korišten 70%-tni etanol. Po 500  $\mu$ L je zatim ispipetirano u kivetu te je apsorbancija izmjerena na spektrofotometru FLUOstar Optima pri 700 nm.

Koncentraciju tanina odredila sam očitavanjem baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancije otopina taninske kiseline različitih koncentracija (0,1 – 5 mg/mL).

Jednadžba baždarnog pravca za taninsku kiselinu:  $y = 0,2194x + 0,0082$ ;  $R^2 = 0,9969$  pri čemu je:

y – apsorbancija pri 700 nm

x – masena koncentracija taninske kiseline

### 2.2.7. Proantocijanidini

Za određivanje ukupnih proantocijanidina koristila sam metodu prema Weidner i sur. (2009). U epruvetu sam ispipetirala 70  $\mu$ L metanolnog ekstrakta (koncentracije 30 mg/mL), 420  $\mu$ L 4%-tne vodene otopine vanilina i 210  $\mu$ L koncentrirane HCl te sve promiješala na vrtložnoj mješalici. Otopine sam inkubirala u mraku 15 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim, u triplicatu, ispipetirala po 200  $\mu$ L otopine u mikrotitarske pločice. Pripremlila sam i kontrolu (bez dodavanja ekstrakta). Apsorbancija sam izmjerila na spektrofotometru FLUOstar Optima na 485 nm DPPH metodom. Kao standard je korištena otopina katehina različitih koncentracija (0,02 - 0,1 mg/mL) pripremljena istim postupkom. Koncentracija proantocijanidina sam odredila pomoću baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancije otopina katehina. Baždarni pravac za određivanje sadržaja ukupnih proantocijanidina, kao ekvivalenata katehina, prikazuje ovisnost apsorbancije otopine pri 485 nm o masenoj koncentraciji katehina.

Jednadžba baždarnog pravca za katehin:  $y = 0,4321x + 0,065$ ;  $R^2 = 0,9704$  pri čemu je:

y – apsorbancija pri 485 nm

x – masena koncentracija otopine katehina

### 2.2.8. Topivi šećeri

Jednostavni šećeri, oligosaharidi, polisaharidi i njihovi derivati (uključujući i metil etere sa slobodnim reducirajućim grupama) u reakciji s fenolom i koncentriranom sumpornom kiselinom daju narančasto-žutu boju. To svojstvo koristi se za mjerenje koncentracije šećera u uzorku metodom prema Dubois i sur. (1956). Metoda je jednostavna, brza i daje reproducibilne rezultate.

Volumen od 200 mL etanolnog ekstrakta koncentracije 0,6 mg/mL ispipetirala sam u epruvetu, zajedno sa 100  $\mu$ L 5%-tnog fenola i 500  $\mu$ L koncentrirane sumporne kiseline ( $H_2SO_4$ ). Sve sam promiješala na Vortex vrtložnoj mješalici, inkubirala 10 minuta pri sobnoj temperaturi, ponovno promiješala te stavila u termostatiranu tresilicu inkubirati 20 minuta pri 30°C. Apsorbanciju sam izmjerila spektrofotometrom FLUOstar Optima na 485 nm TPA metodom. Sadržaj topivih šećera određen je pomoću baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancije otopina glukoze različitih koncentracija (0,05 – 0,75 mg/mL).

Jednadžba baždarnog pravca za glukožu:  $y = 2,798x + 0,1145$ ;  $R^2 = 0,0081$  pri čemu je:

y – apsorbancija pri 485 nm

x – masena koncentracija otopine glukoze

### 2.2.9. Fotosintetski pigmenti i porfirini

Fotosintetski pigmenti lista uključuju klorofil *a*, klorofil *b* i karotenoide koji su potrebni za proces fotosinteze, a njihov sadržaj varira ovisno o vrsti (Denffer i Ziegler 1982). Koncentracije ovih spojeva odredila sam prema metodi Sumanta i sur. (2014). Pripremila sam ekstrakte koncentracije 15 mg/mL u 80%-tnom acetonu (razrijeđivanjem izvornog metanolnog ekstrakta koncentracije 30 mg/mL). Smjesu sam promiješala na vrtložnoj mješalici i potom odcentrifugirala na sobnoj temperaturi pri 6000 rpm, 5 min. Supernatant sam odvojila u epruvetu, a talog još dva puta ekstrahirala 80%-tnim acetonom (dok talog nije postao potpuno bijel). Apsorbancije sam izmjerila na spektrofotometru Thermo Scientific Nanodrop 2000c pri 470, 575, 590, 628, 647 i 663 nm.

Koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida odredila sam korištenjem sljedećih formula:

$$\text{Chl } a = 12,25 A_{663} - 2,79 A_{647}$$

$$\text{Chl } b = 21,5 A_{647} - 5,1 A_{663}$$

$$\text{Car} = (1000 A_{470} - 1,82 C_a - 85,02 C_b) / 198$$

Porfirini

$$= \frac{(12,25 \cdot A_{663}) - (2,55 \cdot A_{647})}{892} + \frac{(20,31 \cdot A_{647}) - (4,91 \cdot A_{663})}{906} + [(196,25 \cdot A_{575}) - (46,6 \cdot A_{590}) - (58,68 \cdot A_{628})] + [(61,81 \cdot A_{590}) - (23,77 \cdot A_{575}) - (3,55 \cdot A_{628})] + [(42,59 \cdot A_{628}) - (34,32 \cdot A_{575}) - (7,25 \cdot A_{590})]$$

pri čemu je:

A = apsorbancija (pri odgovarajućoj valnoj duljini)

C<sub>a</sub> = koncentracija Chl *a*

C<sub>b</sub> = koncentracija Chl *b*

## 2.2.10. Tekućinska kromatografija visoke moći razlučivanja

Tekućinska kromatografija visoke moći razlučivanja (eng. *High-Performance Liquid Chromatography* – HPLC) koristi se za razdvajanje komponenti iz smjese na osnovi kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze u stupcu. U ovom radu provela sam je u svrhu kvalitativne i kvantitativne analize aglikona fenolnih spojeva i *L*-askorbinske kiseline pekinškog kupusa. Na 200 µL ekstrakta dodala sam koncentriranu klorovodičnu kiselinu (HCl) tako da je njena konačna koncentracija iznosila 1,2 M. Uzorke sam zatim 2 sata inkubirala na termostatoranoj tresilici pri temperaturi od 80°C i 300 okretaja u minuti. Nakon završetka hidrolize ekstrakta sam do daljnje upotrebe skladištila na -20°C.

Za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju fenolnih spojeva koristila sam uređaj Agilent 1100 Series s UV/VIS detektorom. Razdvajanje sam provela na nepolarnoj koloni Poroshell 120 SB-C18 dimenzija 4,6 x 75 mm s veličinom čestica 2,7 µm uz upotrebu pretkolone Zorbax Rx-C18 dimenzija 4,6 x 12,5 mm s veličinom čestica 5 µm. Metodu razdvajanja, identifikacije i kvantifikacije radila sam prema radu Šola i sur. (2020).

Flavonoide sam analizirala pri valnoj duljini od 360 nm, fenolne kiseline pri 310 nm, a *L*-askorbinsku kiselinu pri 254 nm. Spojeve sam identificirala usporedbom retencijskih vremena pikova dobivenih analizom ekstrakata s retencijskim vremenima pikova dobivenih analizom standarda. Kvantifikaciju spojeva provela sam upotrebom baždarnih pravaca odgovarajućih standarda (Tab. 2) prema formuli:

$$x = \frac{y-b}{a} \quad (\text{mg/kg})$$

pri čemu je:

x = masa spoja

y = apsorbancija

Baždarne pravce za svaki spoj definirala sam analizom otopina različitih koncentracija (0,01-0,25 mg/mL) standarda istom metodom kao i za ekstrakte.

**Tablica 2.** Jednadžbe baždarnih pravaca i  $R^2$  vrijednosti standarda odabranih fenolnih spojeva

Spoj	Jednadžba baždarnog pravca	$R^2$
Sinapinska kiselina	$y = 1842,1x + 25,56$	0,9982
Ferulična kiselina	$y = 2815,8x - 36,454$	0,9985
Klorogenska kiselina	$y = 3035,1x - 49,184$	0,9993
<i>p</i> -kumarinska kiselina	$y = 3502,6x + 40,25$	0,9989
Kempferol	$y = 1076,9x - 36,287$	0,9954
Kvercetin	$y = 944,51x - 39,118$	0,9991
<i>L</i> -askorbinska kiselina	$y = 649,31x - 42,759$	0,9987

### 2.2.11. Antioksidacijski kapacitet određen metodom ABTS

Metoda ABTS se u literaturi naziva i TEAC metoda (engl. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), a njen mehanizam je sličan mehanizmu metode DPPH. Kod metode ABTS koristi se plavo-zeleni radikal-kation 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfonske kiseline) koji dodatkom antioksidansa blijedi što ovisi o antioksidacijskoj aktivnosti i koncentraciji ispitivanog antioksidansa te trajanju reakcije. Ova je metoda primjenjiva za procjenu lipofilnih i hidrofilnih antioksidansa uključujući fenole, hidroksicinamate, karotenoide i plazmatske antioksidanse. Za određivanje antioksidacijske aktivnosti koristi se otopina  $ABTS^{+\cdot}$  radikala koji se formira kemijskom ili enzimskom oksidacijom molekule ABTS pomoću otopine kalijevog peroksodisulfata.

Na mikrotitarsku pločicu ispipetirala sam 200  $\mu\text{L}$  radikala  $ABTS^{+\cdot}$  i 2  $\mu\text{L}$  70%-tnog etanola kao kontrolu, te 200  $\mu\text{L}$  radikala  $ABTS^{+\cdot}$  i 2  $\mu\text{L}$  ekstrakta. Otopine sam inkubirala 6 minuta na sobnoj temperaturi, u mraku. Maksimum apsorbancije radikal  $ABTS^{+\cdot}$  dostiže pri valnim duljinama od 645 nm, 734 nm ili 815 nm, a u ovom istraživanju apsorbancije sam

mjerila pri 734 nm, na spektrofotometru FLUOstar Optima. Postotak inhibicije radikala ABTS<sup>•+</sup> izračunala sam prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} * 100$$

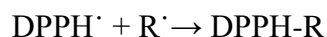
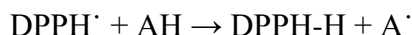
pri čemu je:

$A_0$  – apsorbancija kontrole (bez ekstrakta)

$A_t$  – apsorbancija uzorka

### 2.2.12. Antioksidacijski kapacitet određen metodom DPPH

DPPH<sup>•</sup> (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil) je stabilni slobodni radikal jer se slobodni elektroni u molekuli delokaliziraju na cijelu molekulu što dovodi do njegove veće stabilnosti. Zbog svojeg nesparenog elektrona intenzivno apsorbira u vidljivom dijelu spektra (ljubičasta boja) pri valnoj duljini 517 nm. U prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans koji gasi slobodne radikale) ili radikala – R dolazi do sparivanja elektronskog para i tvorbe neradikalnog oblika DPPH (DPPH-H). Njihovom reakcijom dolazi do promjene ljubičaste boje otopine u žutu i smanjenja apsorbancije. Antioksidacijska aktivnost ispitivanog spoja očituje se obezbojenjem otopine DPPH-radikala koje je posljedica njegove redukcije. Za mjerenje antioksidacijske aktivnosti metodom DPPH koristila sam protokol prema Radić Brkanac i sur. (2015).



U epruvetu sam ispipetirala 665  $\mu\text{L}$  0,1 mM DPPH<sup>•</sup> u 96%-tnom etanolu i 35  $\mu\text{L}$  ekstrakta, a zatim sam otopinu promiješala na vrtložnoj miješalici te inkubirala 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije smjese, otopinu sam prenijela na mikrotitarsku pločicu (svaku otopinu sam prenijela u triplikatu). Za kontrolu sam u 3 jažice mikrotitarske pločice ispipetirala 190  $\mu\text{L}$  0,1 mM otopine DPPH<sup>•</sup> reagensa u 96%-tnom etanolu i 10  $\mu\text{L}$  70 %-tnog etanola. Smjese sam također inkubirala 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije apsorbanciju sam očitala spektrofotometrom FLUOstar Optima na 517 nm. Reakciju uklanjanja slobodnog radikala prati promjena boje od intenzivno ljubičaste na početku reakcije do žute, a što se detektira smanjenjem apsorbancije na navedenoj valnoj duljini. Postotak inhibicije radikala DPPH<sup>•</sup> izračunala sam prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} * 100$$

pri čemu je:

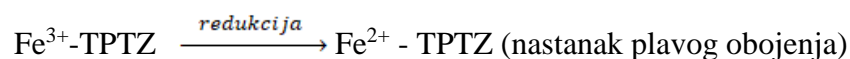
$A_0$  – apsorbancija kontrole (bez ekstrakta)

$A_t$  – apsorbancija uzorka

### 2.2.13. Antioksidacijski kapacitet određen metodom FRAP

FRAP (eng. *Ferric reducing/Antioxidant power*) je jednostavni direktni test antioksidacijskog kapaciteta u kojem se antioksidacijsku aktivnost opisuje kao sposobnost reduciranja. Neenzimski antioksidansi (npr. vitamin C i bioflavonoidi) mogu se smatrati reducensima koji uzrokuju redukciju oksidansa. U metodi FRAP oksidans se reducira pomoću reducensa u redoks reakciji - redukcija žuto obojenog kompleksa  $\text{Fe}^{3+}$  - TPTZ u intenzivno plavi kompleks  $\text{Fe}^{2+}$  - TPTZ pri niskom pH (kolorimetrijska reakcija). Intenzitet boje je proporcionalan redukcijskoj sposobnosti antioksidansa (Benzie i Strain, 1999).

Reakcija se odvija u prisutnosti antioksidansa koji donira elektron te se spektrofotometrijski mjeri na valnoj duljini od 593 nm na kojoj kompleks pokazuje intenzivno obojenje.



Na mikrotitarsku pločicu ispipetirala sam 190  $\mu\text{L}$  reagensa FRAP i 10  $\mu\text{L}$  70 %-tnog etanola kao kontrolu, te 190  $\mu\text{L}$  reagensa FRAP i 10  $\mu\text{L}$  15 mg/ml etanolnog ekstrakta pekinškog kupusa. Svaku reakciju sam ponovila 3 puta. Otopine sam ostavila na sobnoj temperaturi 4 minute. Nakon inkubacije izmjerila sam apsorbanciju na valnoj duljini od 593 nm. Postotak redukcije kompleksa  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ izračunala sam prema formuli:

$$\% \text{ redukcije} = \frac{A_t - A_0}{A_t} * 100$$

pri čemu je:

$A_0$  – apsorbancija kontrole (bez ekstrakta)

$A_t$  – apsorbancija uzorka

#### 2.2.14. Antioksidacijski kapacitet određen metodom redukcijske moći

Moć reduciranja izmjerila sam spektrofotometrom Thermo Scientific Nanodrop 2000c korištenjem modificirane metode prema Bhalodia i sur. (2013). Ova metoda temelji se na principu da tvari koje imaju redukcijski potencijal reagiraju s kalijevim(III)-heksacijanoferatom ( $\text{Fe}^{3+}$ ) čime nastaje kalijev(II)-heksacijanoferat ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Kalijev(II)-heksacijanoferat ( $\text{Fe}^{2+}$ ) zatim reagira sa željezovim(III)-kloridom stvarajući kompleks koji ima apsorbancijski maksimum na 700 nm.

U epruvetu sam dodala 120  $\mu\text{L}$  15 mg/mL etanolnog ekstrakta, 300  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera pH 6.6 ( $\text{Na}_2\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ ) i 300  $\mu\text{L}$  1%-tnog kalijevog heksacijanoferata ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN}_6)]$ ). Uslijedila je inkubacija 20 minuta na  $50^\circ\text{C}$ , a potom sam dodala 300  $\mu\text{L}$  10%-tne trikloroetene kiseline te otopinu centrifugirala 10 minuta pri 3000 rpm. Odvojila sam supernatant i prenijela ga u epruvetu u koju sam dodala 300  $\mu\text{L}$  deionizirane  $\text{H}_2\text{O}$  i 120  $\mu\text{L}$  0,1%-tnog željezovog(III)-klorida ( $\text{FeCl}_3$ ). Smjesa je ponovno centrifugirana, ali 3 minute pri 1500 rpm, nakon čega sam odvojila talog. Također sam pripremila i kontrolu, bez dodavanja ekstrakta. Apsorbanciju sam izmjerila na spektrofotometru Thermo Scientific Nanodrop 2000c pri 700 nm. Kao standard koristila sam askorbinsku kiselinu u rasponu koncentracija 0,04 do 0,2 mg/mL. Moć reduciranja odredila sam očitavanjem vrijednosti s baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancije otopina *L*-askorbinske kiseline.

Jednadžba baždarnog pravca za *L*-askorbinsku kiselinu:  $y = 1,9291x - 0,0453$ ;  $R^2 = 0,9999$  pri čemu je:

$y$  – apsorbancija pri 700 nm

$x$  – masena koncentracija otopine *L*-askorbinske kiseline

Baždarni pravac izradila sam u Excelu, a moć reduciranja izračunala prema formuli:

$$x = \frac{y-b}{a} \quad (\text{mg/kg})$$

pri čemu je:

$x$  = moć reduciranja

$y$  = apsorbancija

### 2.2.15. Statistička obrada podataka

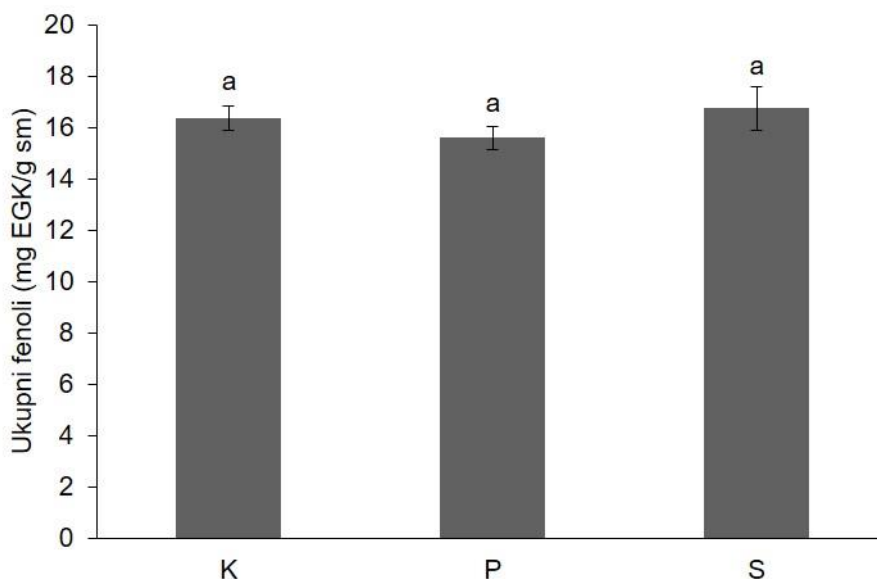
Dobivene podatke statistički sam obradila u programu Statistica 13,1 (Stat Soft Inc., SAD). Usporedbu uzoraka provela sam pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA) te primjenom testa "Duncan's New Multiple Range Test" (DNMRT), tj. post hoc testa višestrukih usporedbi. Vrijednosti označene različitim slovima smatraju se međusobno statistički značajno različitima (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ).



## 3. REZULTATI

### 3.1. Utjecaj poplave i suše na ukupne fenole

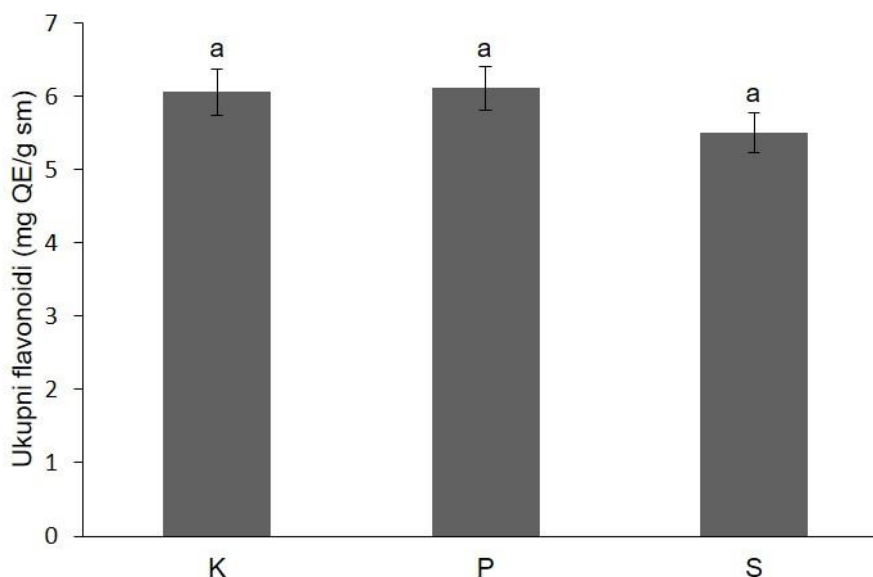
Rezultati na slici 13 prikazuju utjecaj poplave i suše na količinu ukupnih fenola u pekinškom kupusu. Najveći udio je zabilježen u biljkama uzgojenim u uvjetima suše (16,75 mg EGK/g sm), a najmanji u biljkama uzgojenim u uvjetima poplave (15,59 mg EGK/g sm), ali ne radi se o statistički značajnoj razlici u odnosu na kontrolne biljke (16,35 mg EGK/g sm).



**Slika 13.** Udio ukupnih fenola pekinškog kupusa izražen u miligramima ekvivalenta galne kiseline po gramu suhe mase uzorka (mg EGK/g sm). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. K = kontrola, P = poplava, S = suša, EGK = ekvivalent galne kiseline.

### 3.2. Utjecaj poplave i suše na ukupne flavonoide

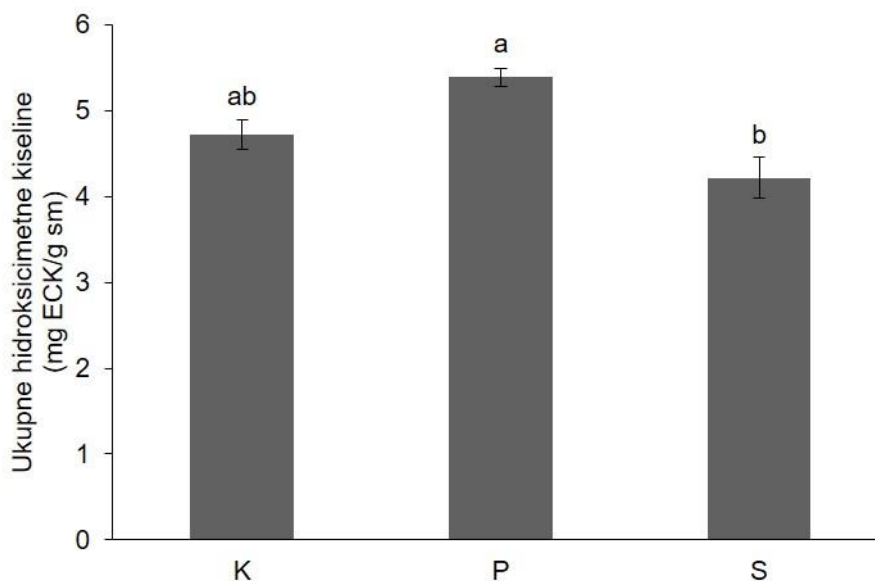
Rezultati na slici 14 prikazuju utjecaj poplave i suše na količinu ukupnih flavonoida u pekinškom kupusu. Najveći udio je zabilježen u biljkama uzgojenim u uvjetima poplave (6,11 mg QE/g sm), a najmanji u biljkama uzgojenim u uvjetima suše (5,50 mg QE/g sm), ali ne radi se o statistički značajnoj razlici u odnosu na kontrolne biljke (6,06 mg QE/g sm).



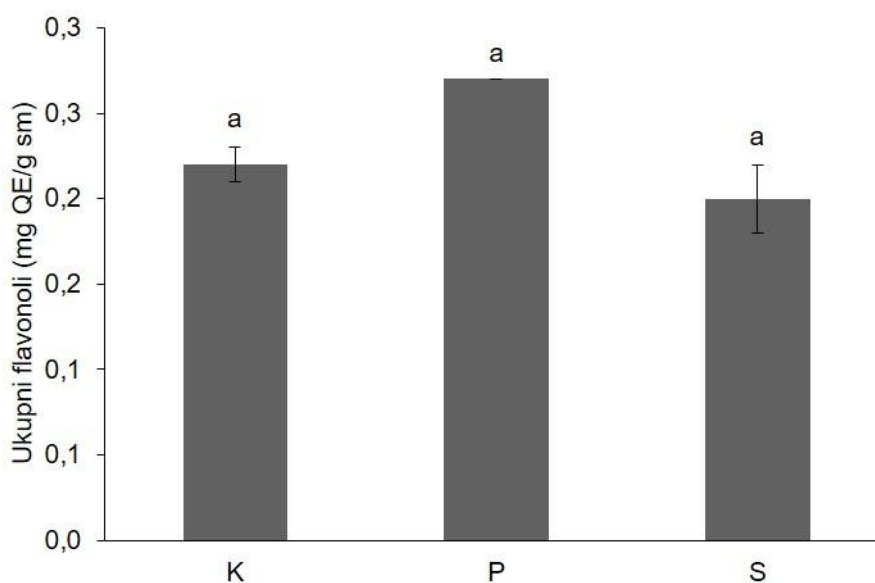
**Slika 14.** Udio ukupnih flavonoida pekinškog kupusa izražen u miligramima ekvivalenta kvercetina po gramu suhe mase uzorka (mg QE/g sm). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. K = kontrola, P = poplava, S = suša, QE = ekvivalent kvercetina.

### 3.3. Utjecaj poplave i suše na ukupne hidroksicimetne kiseline i flavonole

Udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina (Sl. 15) i flavonola (Sl. 16) određen je spektrofotometrijski pomoću modificirane metode prema Howard i sur. (2003). Najniži udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina zabilježen je kod biljaka uzgojenih u uvjetima suše (4,22 mg ECK/g sm), a najviši u biljkama uzgojenim u uvjetima poplave (5,39 mg ECK/g sm) i, iako se njihova zastupljenost međusobno statistički značajno razlikuje, u odnosu na kontrolne biljke (7,72 mg ECK/g sm) nije došlo do statistički značajne promjene udjela ovih spojeva u biljci. Najveći udio ukupnih flavonola je izmjeren kod biljaka uzgojenih u uvjetima poplave (0,27 mg QE/g sm), a najniži kod onih uzgojenih u uvjetima suše (0,20 mg QE/g sm), ali ne radi se o statistički značajnoj promjeni u odnosu na kontrolne biljke (0,22 mg QE/g sm).



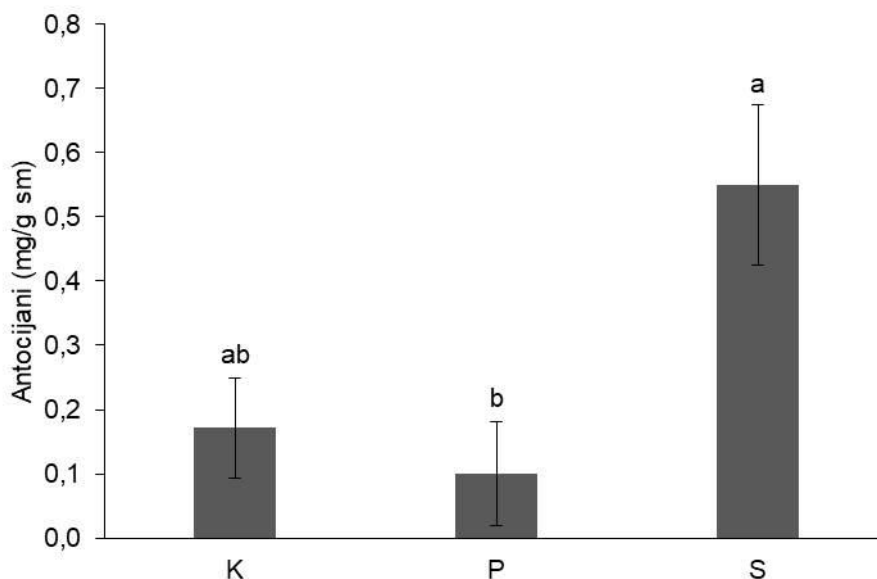
**Slika 15.** Udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina pekinškog kupusa izražen u miligramima ekvivalenta cimetine kiseline po gramu suhe mase uzorka (mg ECK/g sm). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. K = kontrola, P = poplava, S = suša, ECK = ekvivalent cimetine kiseline.



**Slika 16.** Udio ukupnih flavonola pekinškog kupusa izražen u miligramima ekvivalenta kvercetina po gramu suhe mase uzorka (mg QE/g sm). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. = kontrola, P = poplava, S = suša, QE = ekvivalent kvercetina.

### 3.4. Utjecaj poplave i suše na ukupne antocijane

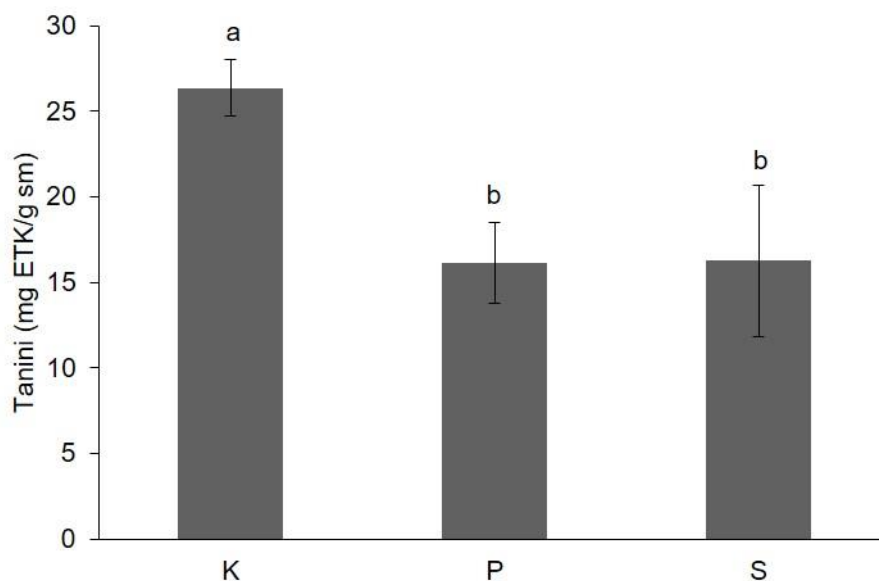
Najviši udio antocijana je izmjereno kod biljaka uzgojenih u uvjetima suše (0,55 mg/g sm), a najniži u biljkama uzgojenim u uvjetima poplave (0,1 mg/g sm) (Sl. 17). Ove dvije skupine biljaka se s obzirom na zastupljenost ukupnih antocijana međusobno značajno razlikuju, međutim u odnosu na udio antocijana u kontrolnim biljkama (0,17 mg/g sm) nema statističke značajne razlike.



**Slika 17.** Udio ukupnih antocijana pekinškog kupusa izražen u miligramima po gramu suhe mase uzorka (mg/g sm). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. K = kontrola, P = poplava, S = suša.

### 3.5. Utjecaj poplave i suše na ukupne tanine

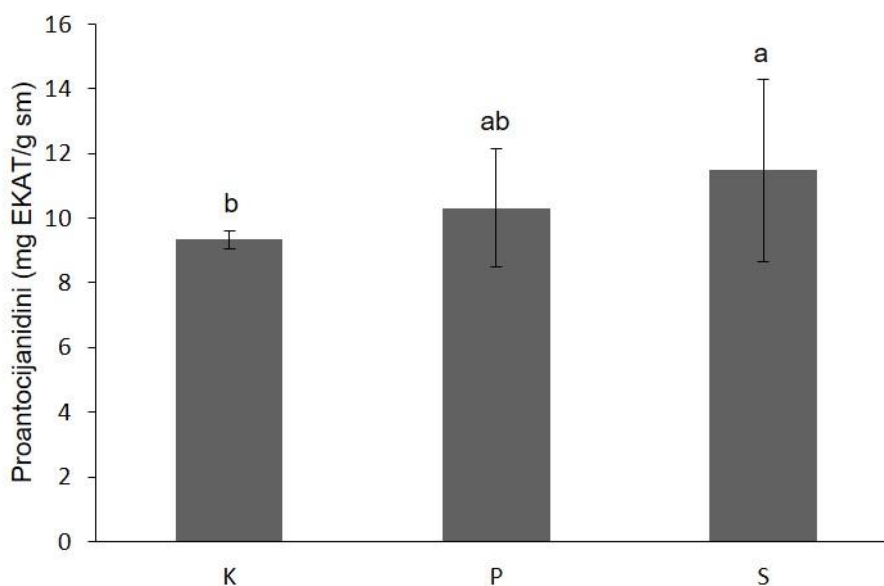
Zastupljenost ukupnih tanina se u odnosu na kontrolne biljke statistički značajno smanjila i kod biljaka uzgojenih u uvjetima suše (16,28 mg ETK/g sm) i kod biljaka uzgojenih u uvjetima poplave (16,12 mg ETK/g sm) (Sl. 18). Kod kontrolnih biljaka zabilježeni udio tanina je značajno veći (26,35 mg ETK/g sm).



**Slika 18.** Udio ukupnih tanina pekinškog kupusa izražen u miligramima ekvivalenta taninske kiseline po gramu suhe mase uzorka (mg ETK/g sm). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. K = kontrola, P = poplava, S = suša. ETK = ekvivalent taninske kiseline.

### 3.6. Utjecaj poplave i suše na ukupne proantocijanidine

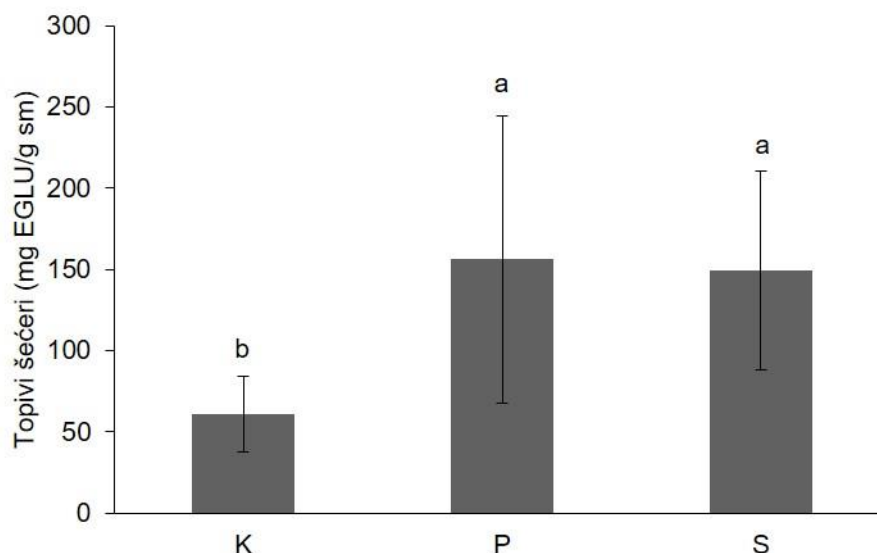
Zastupljenost proantocijanidina se, u odnosu na kontrolne biljke (9,34 mg KAT/g sm), statistički značajno povećala kod biljaka uzgojenih u uvjetima suše (11,48 mg KAT/g sm) (Sl. 19). Udio izmjeren kod biljaka uzgojenih u uvjetima poplave (10,31 mg KAT/g sm) statistički je sličan udjelima ovih spojeva u kontrolnih i biljaka uzgojenih u uvjetima suše.



**Slika 19.** Udio ukupnih proantocijanidina pekinškog kupusa izražen u miligramima ekvivalenta katehina po gramu suhe mase uzorka (mg KAT/g sm). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. K = kontrola, P = poplava, S = suša, EKAT = ekvivalent katehina.

### 3.7. Utjecaj poplave i suše na topive šećere

Udio topivih šećera je, u odnosu na kontrolne biljke (60,96 mg EGLU/g sm), značajno porastao kod biljaka izloženih uvjetima suše i poplave (Sl. 20). Najviši je kod biljaka uzgojenih u uvjetima poplave (156,3 mg EGLU/g sm), dok kod biljaka uzgojenih u uvjetima suše iznosi 149,9 mg EGLU/g sm.

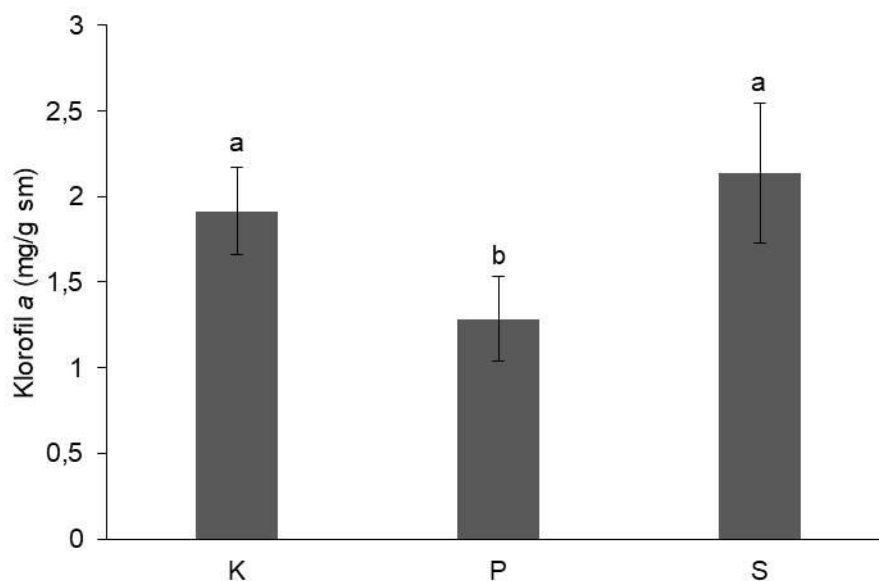


**Slika 20.** Udio ukupnih topivih šećera pekinškog kupusa izražen u miligramima ekvivalenta glukoze po gramu suhe mase uzorka (mg EGLU/g sm). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. K = kontrola, P = poplava, S = suša, EGLU = ekvivalent glukoze.

### 3.8. Utjecaj poplave i suše na fotosintetske pigmente i porfirine

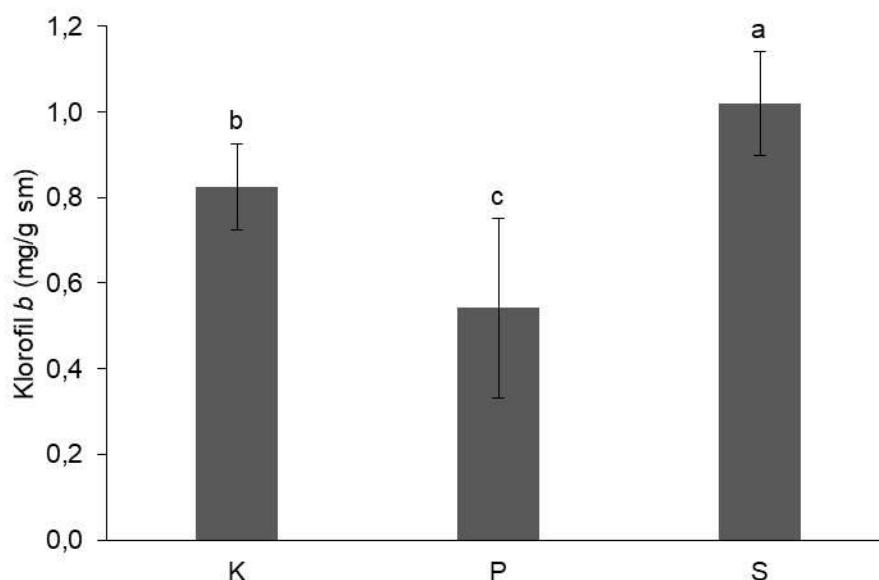
Na slici 21 je prikazana promjena udjela klorofila *a* nakon izlaganja biljaka poplavnom i sušnom stresu. Poplava je značajno smanjila njegov udio (0,54 mg/g sm), dok ga je suša povisila (1,02 mg/g sm). Udio klorofila *a* u kontrolnih biljaka iznosi 0,82 mg/g sm.





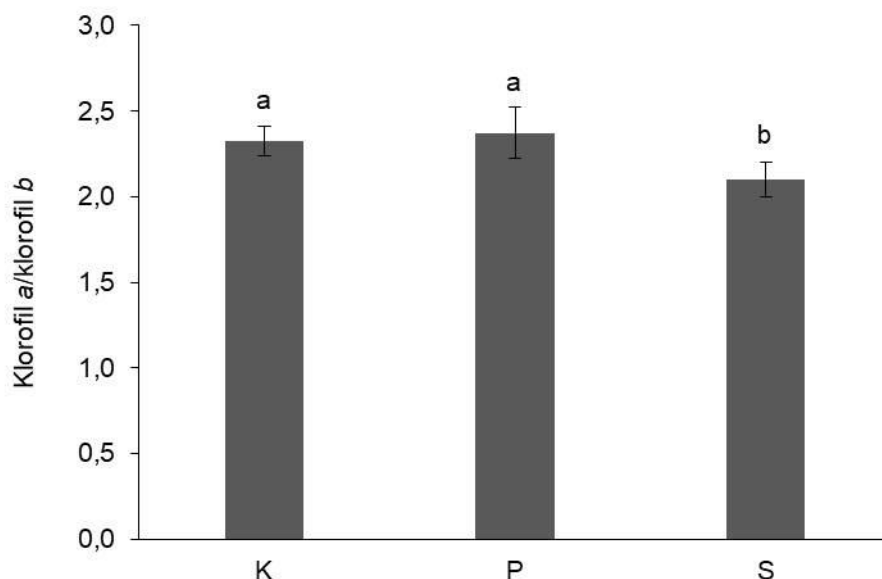
**Slika 21.** Udio klorofila *a* pekinškog kupusa izražen u miligramima po gramu suhe mase uzorka (mg/g sm). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. K = kontrola, P = poplava, S = suša.

Na slici 22 prikazan je utjecaj poplave i suše na udio klorofila *b* u pekinškom kupusu. Poplava je značajno smanjila njegov udio (0,54 mg/g sm), dok ga je suša povisila (1,02 mg/g sm). Udio klorofila *b* u kontrolnih biljaka iznosi 0,82 mg/g sm.



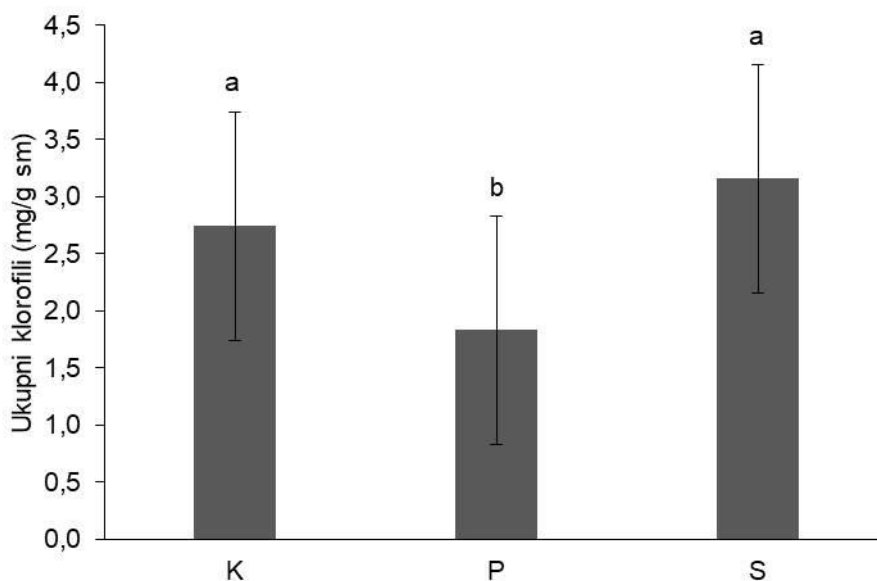
**Slika 22.** Udio klorofila *b* pekinškog kupusa izražen u miligramima po gramu suhe mase uzorka (mg/g sm). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. K = kontrola, P = poplava, S = suša.

Kao što je prikazano na slici 23, omjer klorofil *a/b* je kod biljaka izloženih uvjetima poplave ostao nepromijenjen (i iznosio je 2,37) u odnosu na kontrolne biljke gdje je iznosio 2,32, ali je zabilježen statistički značajan pad kod biljaka uzgojenih u uvjetima suše (iznosio je 2,1).



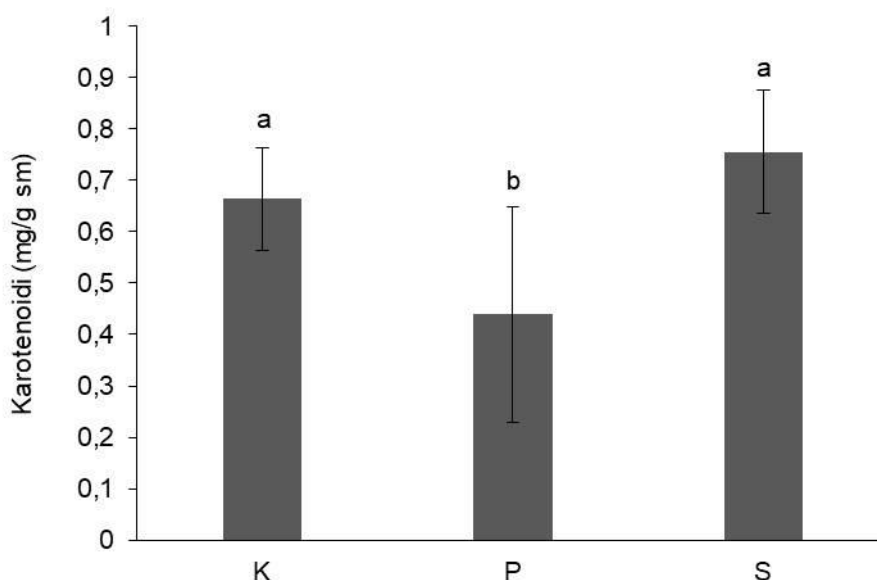
**Slika 23.** Omjer klorofila *a*/klorofila *b* pekinškog kupusa. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. K = kontrola, P = poplava, S = suša.

Dok suša nije značajno utjecala na zastupljenost ukupnih klorofila (3,16 mg/g sm), njihov udio se kod biljaka izloženih poplavi značajno smanjio (1,83 mg/g sm) u odnosu na kontrolni uzorak (2,74 mg/g sm) (Sl. 24).



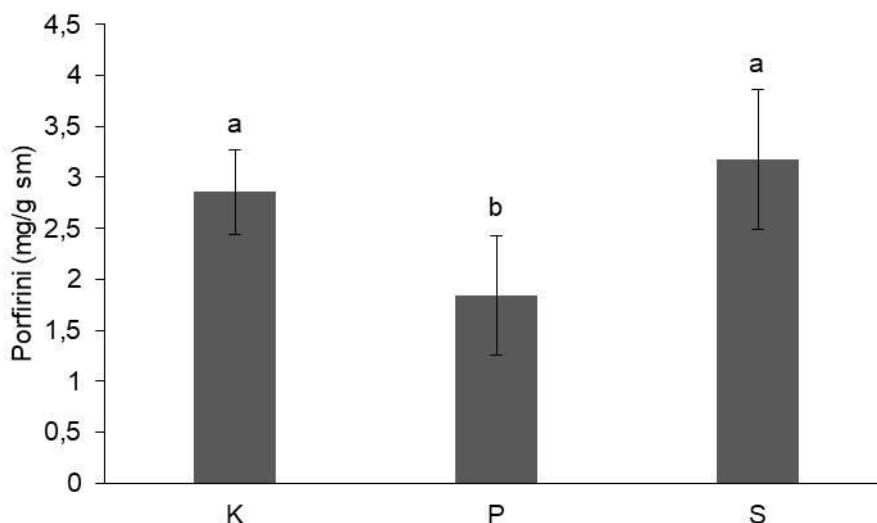
**Slika 24.** Udio ukupnih klorofila pekinškog kupusa izražen u miligramima po gramu suhe mase uzorka (mg/g sm). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. K = kontrola, P = poplava, S = suša.

Suša nije imala utjecaja na zastupljenost karotenoida (0,75 mg/g sm) u pekinškom kupusu, ali poplava je, te se njihov udio kod biljaka uzgojenih u uvjetima poplave statistički značajno smanjio u odnosu na kontrolne biljke (0,66 mg/g sm) i iznosi 0,44 mg/g sm (Sl. 25).



**Slika 25.** Udio ukupnih karotenoida pekinškog kupusa izražen u miligramima po gramu suhe mase uzorka (mg/g sm). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. K = kontrola, P = poplava, S = suša.

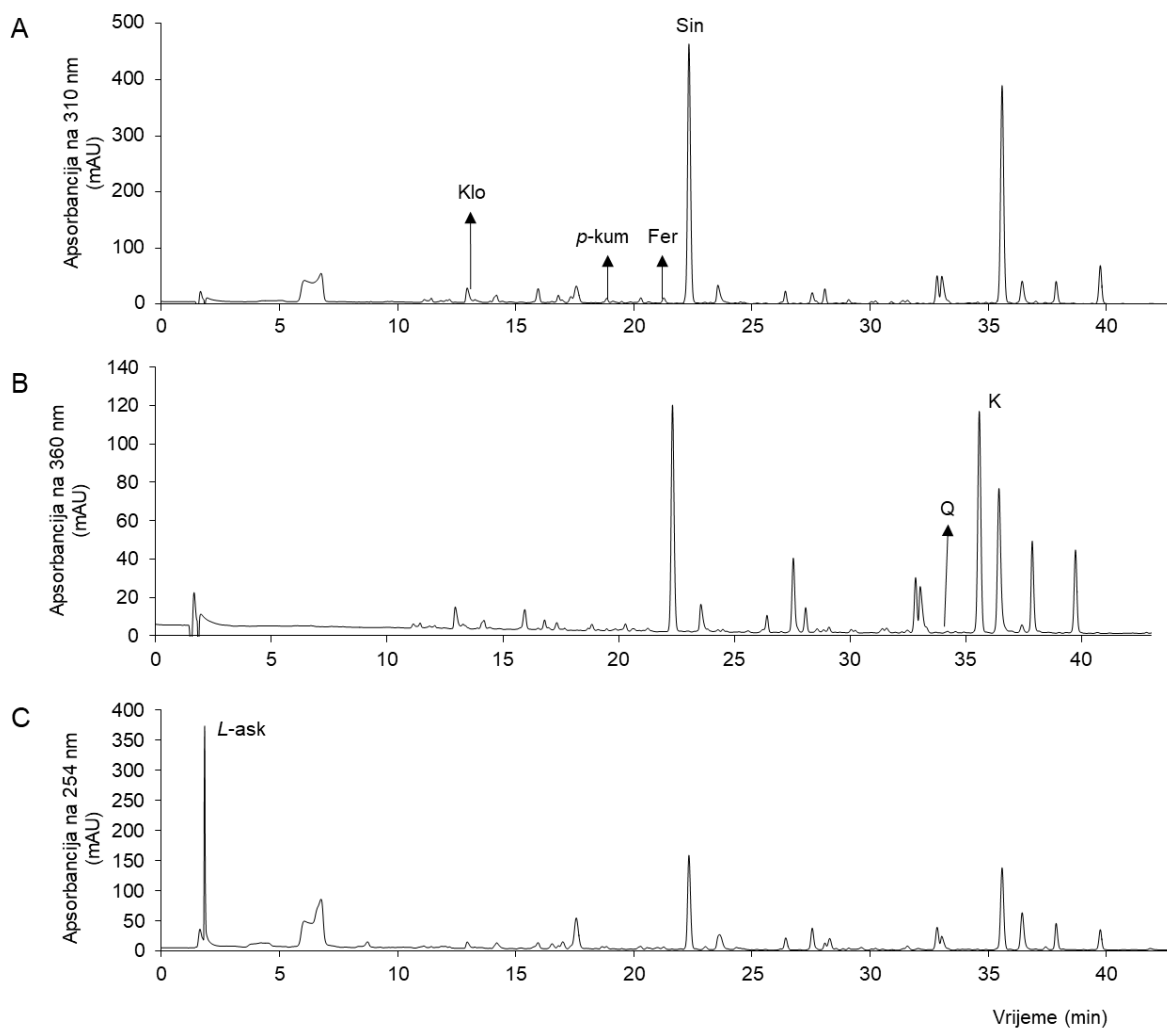
Kao i kod karotenoida i ukupnih klorofila, suša nije imala utjecaja na zastupljenost porfirina (3,17 mg/g sm) u pekinškom kupusu. Zabilježeni udio kod biljaka uzgojenih u uvjetima poplave statistički se značajno smanjio u odnosu na kontrolne biljke (2,86 mg/g sm) i iznosi 1,84 mg/g sm (Slika 26).



**Slika 26.** Udio ukupnih porfirina pekinškog kupusa izražen u miligramima po gramu suhe mase uzorka (mg/g sm). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. K = kontrola, P = poplava, S = suša.

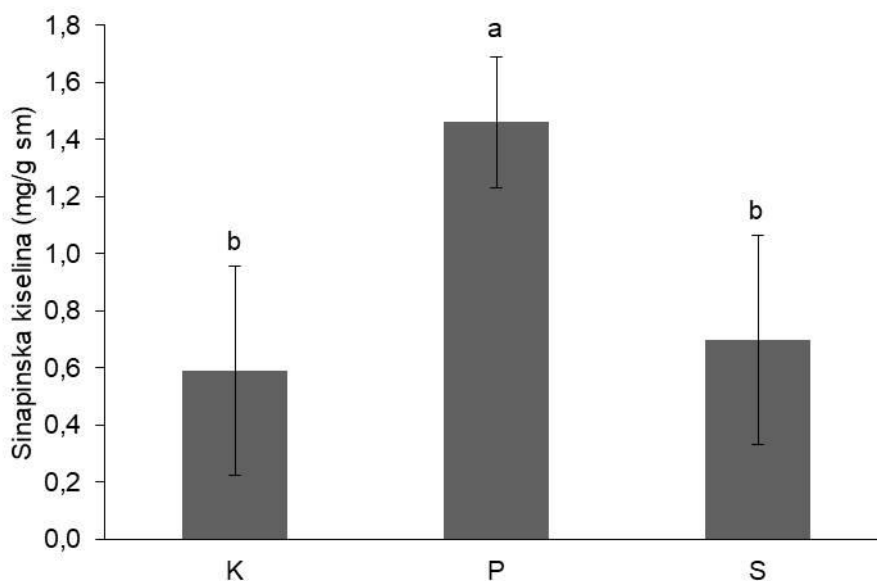
### 3.9. Utjecaj poplave i suše na pojedinačne fitokemikalije pekinškog kupusa

Metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) razdvojene su, identificirane i kvantificirane hidroksicimetne kiseline (Sl. 27 A), flavonoidi (Sl. 27 B) i *L*-askorbinska kiselina (Sl. 27 C) pekinškog kupusa. Od hidroksicimetnih kiselina identificirala sam klorogensku, *p*-kumarinsku, feruličnu i sinapinsku kiselinu, a od flavonoida kvercetin i kempferol.



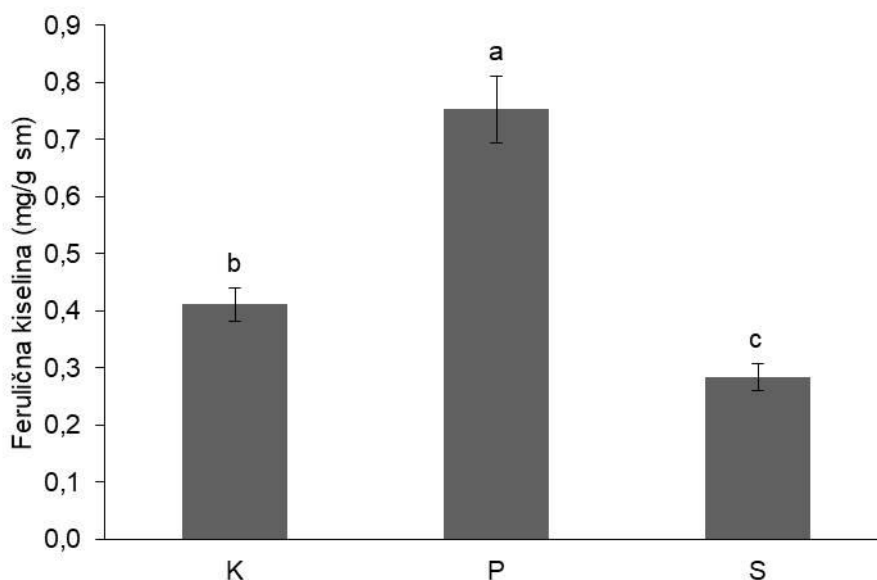
**Slika 27.** A) Hidroksicimetne kiseline, B) flavonoidi i C) *L*-askorbinska kiselina pekinškog kupusa razdvojeni metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja. Klo = klorogenska kiselina, *p*-kum = kumarinska kiselina, Fer = ferulična kiselina, Sin = sinapinska kiselina, Q = kvercetin, K = kempferol, *L*-ask = *L*-askorbinska kiselina, mAU = *miliabsorbance unit* (jedinica apsorbancije).

Uvjeti poplave su povisili udio sinapinske kiseline te ona iznosi 1,462 mg/g suhe mase. Između kontrolnih biljaka (0,590 mg/g sm) i biljaka uzgojenih u uvjetima suše (0,698 mg/g sm) nije došlo do značajne promjene u udjelu sinapinske kiseline (Sl. 28).



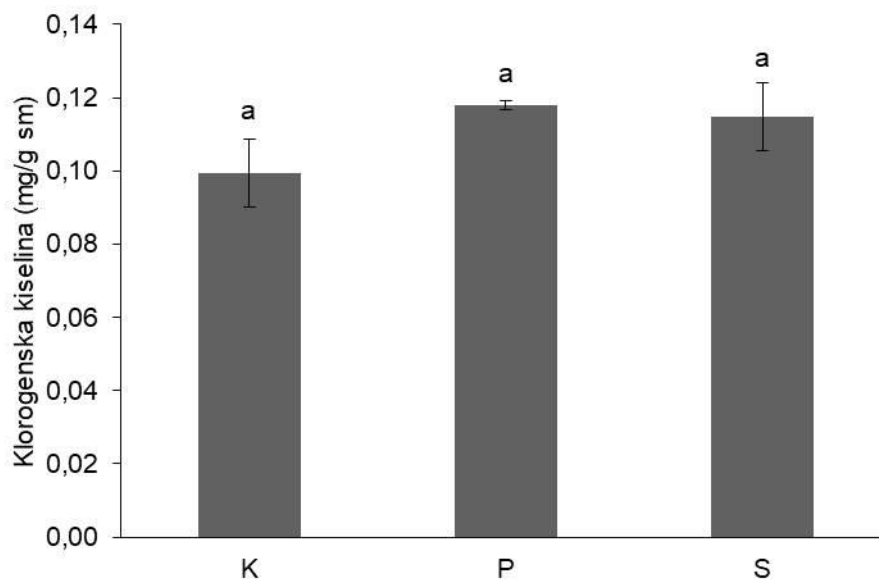
**Slika 28.** Udio sinapinske kiseline pekinškog kupusa izražen u mg/g suhe mase. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. K = kontrola, P = poplava, S = suša.

Udio ferulične kiseline je, kao i kod sinapinske, značajno porasao u uzorku P (poplava) u odnosu na kontrolne biljke (0,411 mg/g suhe mase) te iznosi 0,712 mg/g suhe mase, dok se u uzorku S (suša) značajno smanjila (0,283 mg/g suhe mase) (Sl. 29).



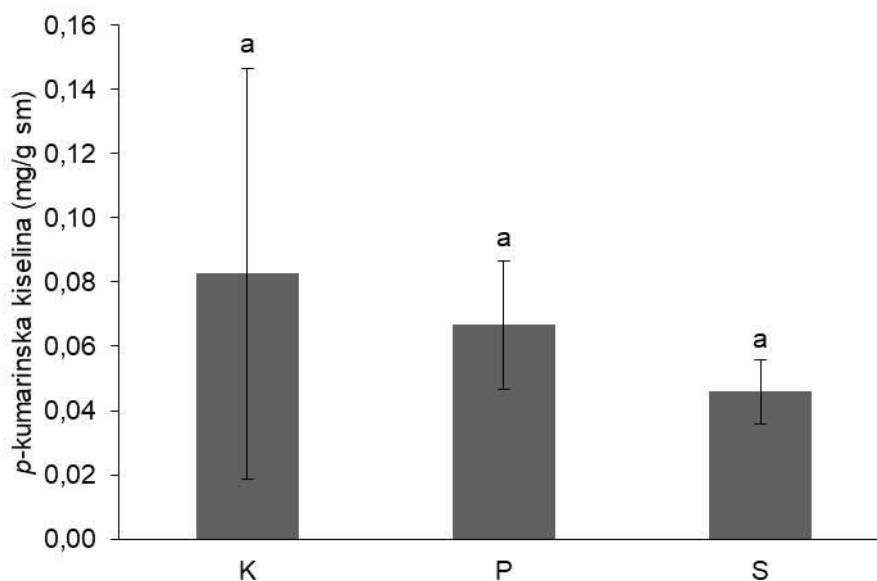
**Slika 29.** Udio ferulične kiseline pekinškog kupusa izražen u mg/g suhe mase. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. K = kontrola, P = poplava, S = suša.

Udio klorogenske kiseline se, u odnosu na kontrolne biljke (0,099 mg/g suhe mase), nije značajno promijenio, te tako u uzorku P iznosi 0,118 mg/ g suhe mase, a u uzorku S 0,115 mg/g suhe mase (Sl. 30).



**Slika 30.** Udio klorogenske kiseline pekinškog kupusa izražen u mg/g suhe mase. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. K = kontrola, P = poplava, S = suša.

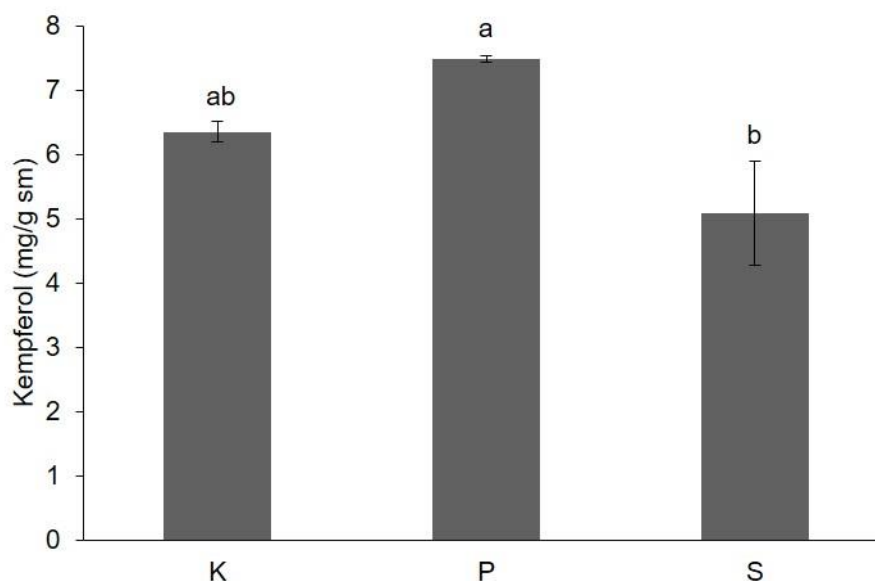
Ni udio *p*-kumarinske kiseline se nije značajno promijenio nakon izlaganja biljaka poplavnom ili sušnom stresu (Sl. 31). Kod kontrolnih biljaka iznosi 0,084 mg/g suhe mase, kod biljaka izloženih poplavi 0,067 mg/g suhe mase, a kod onih izloženih suši 0,046 mg/g suhe mase.



**Slika 31.** Udio *p*-kumarinske kiseline pekinškog kupusa izražen u mg/g suhe mase. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. K = kontrola, P = poplava, S = suša.

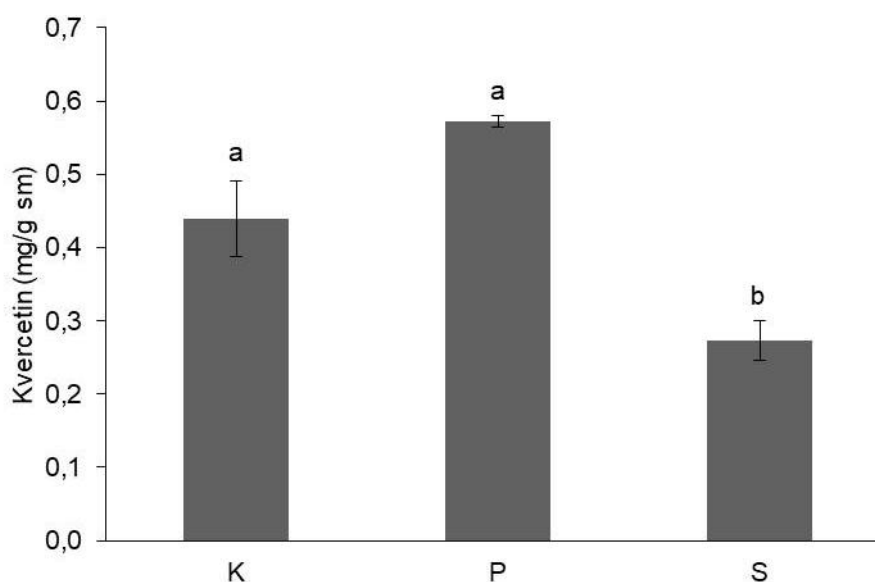
Kempferol je fenolni spoj s najvećim zabilježenim udjelom (Sl. 32). U uvjetima suše se njegov udio smanjio i iznosi 5,091 mg/g suhe mase, dok se u uvjetima poplave povisio (7,484 mg/g suhe mase). Kod kontrolnih biljaka je izmjeren udio od 6,354 mg/g suhe mase i, iako sam primijetila tendenciju rasta, odnosno pada udjela ovog spoja nakon poplave i suše, te promjene nisu statističke značajne u odnosu na udio kempferola u kontrolnim biljkama. S druge strane, udio kempferola u biljkama pod utjecajem poplave i suše se međusobno značajno razlikovao.





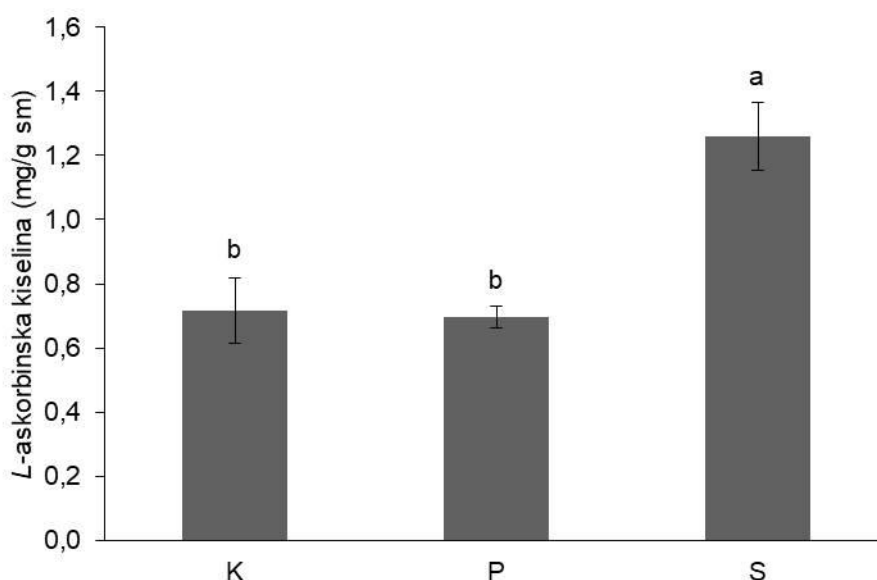
**Slika 32.** Udio kempferola u pekinškom kupusu izražen u mg/g suhe mase. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. K = kontrola, P = poplava, S = suša.

Na slici 33 prikazan je utjecaj poplave i suše na udio kvercetina u pekinškom kupusu. Poplava nije značajno utjecala na njegovu zastupljenost (0,569 mg/g suhe mase), ali se kod biljaka uzgojenih u uvjetima suše značajno smanjila (0,273 mg/g suhe mase) u odnosu na kontrolne biljke (0,387 mg/g suhe mase).



**Slika 33.** Udio kvercetina pekinškog kupusa izražen u mg/g suhe mase. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. K = kontrola, P = poplava, S = suša.

Na slici 34 prikazan je utjecaj poplave i suše na udio vitamina C (u obliku *L*-askorbinske kiseline) u pekinškom kupusu. Primjećujem da je suša utjecala na količinu *L*-askorbinske kiseline čiji se udio statistički značajno povećao u odnosu na kontrolni uzorak (0,715 mg/g sm) i iznosi 1,26 mg/g sm. Kod biljaka uzgajanih u uvjetima poplave (0,696 mg/g sm) nije došlo do značajne promjene udjela *L*-askorbinske kiseline u odnosu na kontrolne biljke.

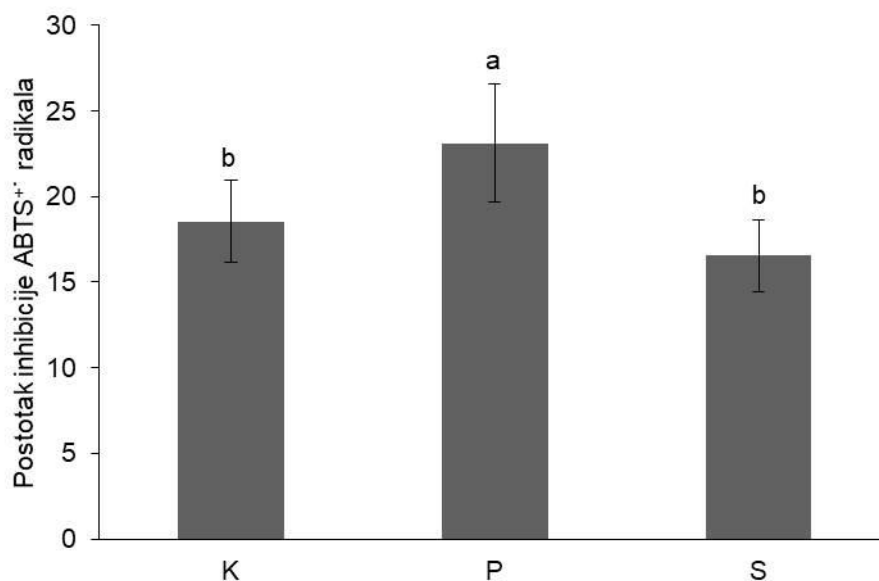


**Slika 34.** Udio *L*-askorbinske kiseline u pekinškom kupusu izražen u mg/g suhe mase. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. K = kontrola, P = poplava, S = suša.

### 3.10. Utjecaj poplave i suše na antioksidacijski kapacitet pekinškog kupusa

#### 3.10.1. Antioksidacijski kapacitet određen metodom ABTS

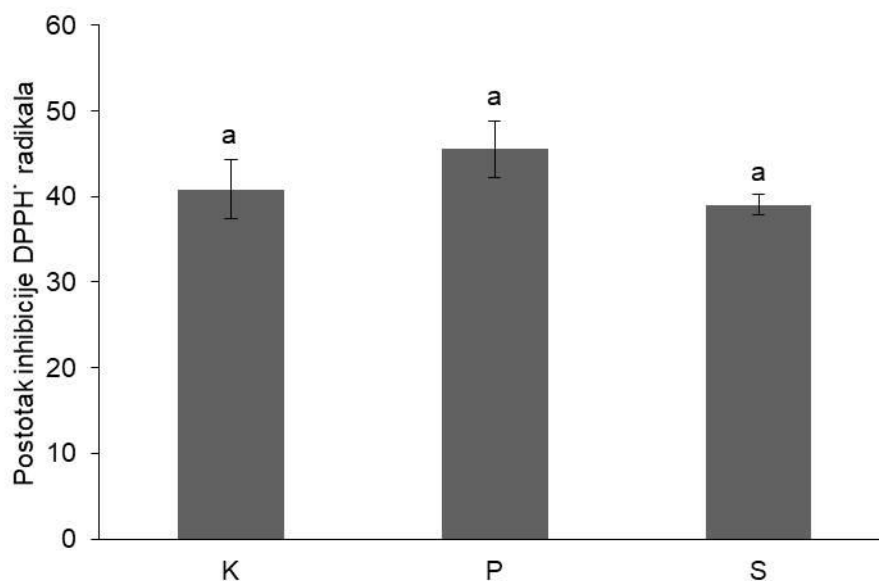
Najveći antioksidacijski kapacitet zabilježen je kod biljaka uzgojenih u uvjetima poplave s 23,13% inhibicije radikala  $ABTS^{+\cdot}$ , a najmanji kod biljaka uzgojenih u uvjetima suše i iznosi 16,55%. Porast antioksidacijskog kapaciteta kod skupine P (poplava) je statistički značajan u odnosu na kontrolne biljke (18,55%) (Sl. 35).



**Slika 35.** Antioksidacijski kapacitet pekinškog kupusa izmjeren metodom ABTS i prikazan kao postotak inhibicije radikala ABTS<sup>+</sup>. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike ± standardna devijacija. K = kontrola, P = poplava, S = suša.

### 3.10.2. Antioksidacijski kapacitet određen metodom DPPH

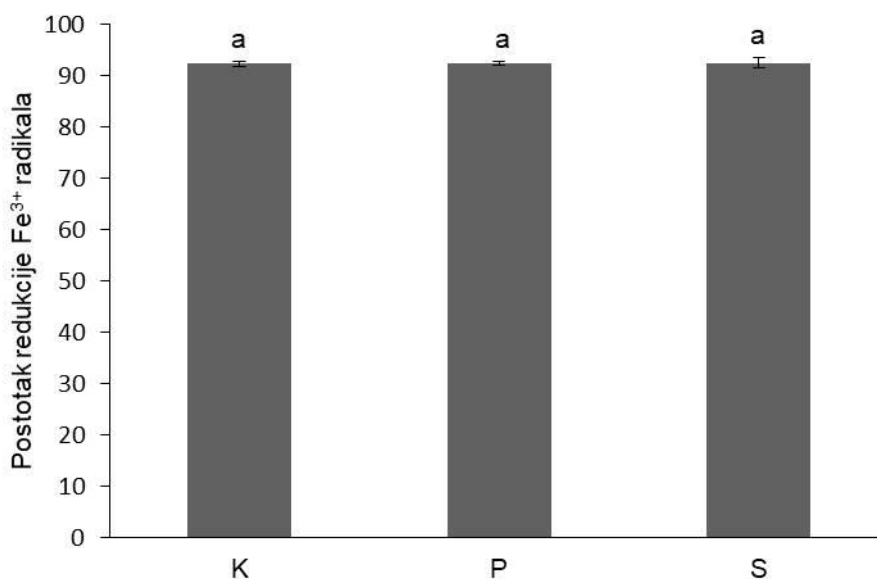
Metodom DPPH nije zabilježena promjena antioksidacijskog kapaciteta uslijed izlaganja pekinškog kupusa vodnom stresu te su sve vrijednosti bliske (Sl. 36). Najniži postotak inhibicije zabilježen je kod uzorka S (suša) te iznosi 39%, dok je kod uzorka P najviši (45,52 % inhibicije DPPH<sup>•</sup> radikala).



**Slika 36.** Antioksidacijski kapacitet pekinškog kupusa izmjeren metodom DPPH i prikazan kao postotak inhibicije DPPH' radikala. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. K = kontrola, P = poplava, S = suša.

### 3.10.3. Antioksidacijski kapacitet određen metodom FRAP

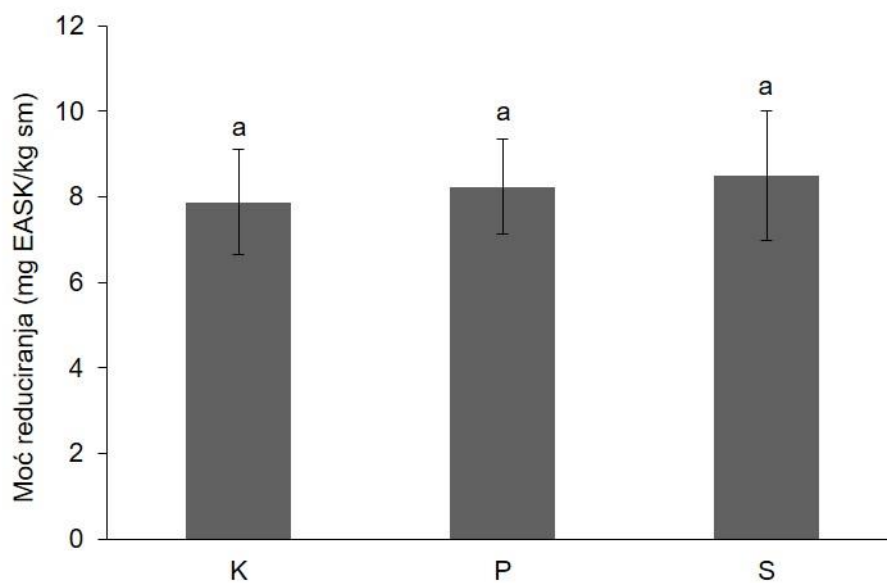
Kao i metodom DPPH, metodom FRAP nije zabilježena statistička značajna promjena antioksidacijskog kapaciteta (Sl. 37), a postotak redukcije  $\text{Fe}^{3+}$  iznosio je redom 92,24%, 92,36% i 92,37% za kontrolne biljke, te one uzgojene pod uvjetima poplave i suše.



**Slika 37.** Antioksidacijski kapacitet pekinškog kupusa izmjeren metodom FRAP i prikazan kao postotak redukcije Fe<sup>3+</sup>-TPTZ u Fe<sup>2+</sup>-TPTZ kompleks. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike ± standardna devijacija. K = kontrola, P = poplava, S = suša.

#### 3.10.4. Antioksidacijski kapacitet određen metodom redukcijske moći

Na slici 38 prikazana je redukcijaska moć pekinškog kupusa uzgojenog pri normalnim i uvjetima poplave i suše. Kao što je vidljivo, vrijednost redukcijske moći te nije se promijenila nakon izlaganja biljaka poplavi i suši i u sva tri uzorka iznosi otprilike 8 mg ekvivalenta aksorbinske kiseline po kg suhe mase.



**Slika 38.** Redukcijska moć pekinškog kupusa izražena u miligramima ekvivalenta *L*-askorbinske kiseline po kilogramu suhe mase uzorka (mg EASK/kg sm). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. K = kontrola, P = poplava, S = suša.

## 4. RASPRAVA

Zbog ekstremnih klimatskih promjena, biljke su izložene ne samo izraženijim promjenama u temperaturi, već i promjenama u količini vode u tlu, odnosno poplavi i suši. Biljke se stresu prilagođavaju svojim biokemijskim, fiziološkim i molekularnim procesima, što rezultira promjenama u razini endogenih metabolita (Ashraf i sur. 2018). Kupusnjače su od iznimne važnosti za ljude zbog svoje visoke razine hranjivih tvari i fitokemikalija kao što su fenoli, glukozinolati, vitamini i minerali (Francisco i sur. 2017). Promjene u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu tih fitokemikalija, zbog aklimatizacije na stres u okolišu, mogu dovesti do značajnih promjena biljnog fenotipa i kemotipa (Moore i sur. 2014). Razumijevanje biljnog odgovora na uvjete poplave i suše od iznimne je važnosti s poljoprivrednog i prehrambenog aspekta jer nudi mogućnost sigurnijeg uzgoja i ekonomičnijeg korištenja povrća. Također, sa znanstvenog stajališta, pridonosi boljem razumijevanju plastičnosti metabolizma biljaka tijekom promjena okoliša. Što se tiče pekinškog kupusa, podvrste kupusa koja je sve češće zastupljena u svakodnevnoj prehrani Europljana, trenutno su u literaturi dostupni podaci o sadržaju njegovih fenolnih spojeva i antioksidacijskom kapacitetu (Seong i sur. 2016), kao i njihovim promjenama kroz razvojne stadije (Šola i sur. 2020), međutim nema podataka kako abiotički stres tj. poplava ili suša utječu na te parametre pa je cilj moga rada bio istražiti posljedice simuliranih uvjeta poplave i suše na fenotip, fitokemijski sastav i antioksidacijski kapacitet ove podvrste.

Kao što je prikazano na slici 12, fenotip pekinškog kupusa osjetljiviji je na sušu (biljke su manje i kržljave, a listovi smečkasti, smanjene su biomasa i visina) nego na poplavu (biljke su nešto manjeg rasta od kontrolne grupe, ali zdrave i izrazito zelenih listova). Očekivala sam da će poplava zbog hipoksije koju uzrokuje značajnije smanjiti biomasu i visinu pekinškog kupusa, no ova podvrsta fenotipski očigledno dobro podnosi višak vode u tlu. S druge strane, suša je značajno smanjila prinos ove podvrste. Pretpostavljam da bi to moglo biti zbog činjenice da suša može smanjiti prijenos hranjivih tvari iz korijena u izdanke zbog smanjene stope transpiracije i ometati aktivni prijenos i propusnost membrane, kao što su Stagnari i sur. (2016) već diskutirali. Naime, prva reakcija svih biljaka tijekom dužeg perioda suše jest zatvaranje porusa puči kako bi se spriječio gubitak vode transpiracijom, a to za posljedicu ima smanjivanje stope fotosinteze i koncentracije CO<sub>2</sub> u biljci (Macar i Ekmekci 2008). Smanjena dostupnost CO<sub>2</sub> u kloroplastima podrazumijeva ograničenu mogućnost sinteze ugljikohidrata i posljedično negativan utjecaj na fenotip biljke.

Što se tiče utjecaja poplave i suše na koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola pekinškog kupusa, ni kod biljaka uzgojenih



u uvjetima poplave (uzorak P) ni kod biljaka uzgojenih u uvjetima suše (uzorak S) nisam detektirala značajne promjene (Sl. 13, 14, 15 i 16), što me navodi na zaključak da su koncentracije ovih skupina spojeva u pekinškom kupusu stabilne u uvjetima vodnog stresa. Za usporedbu, kod vinove loze (*Vitis vinifera* L.) je zabilježeno da dugotrajno izlaganje biljaka suši inhibira sintezu fenolnih spojeva i fenolnih kiselina i u listovima i u korijenu (Król i sur. 2014). Nogués i sur. (1998) su zabilježili porast količine ukupnih flavonoida u grašku (*Pisum sativum* L. cv. Meteor) koji je pretrpio sušu od čak 45%. U vrste stolisnika *Achillea pachycephala* zabilježeno je da suša povećava koncentraciju ukupnih fenola i flavonoida (Gharibi i sur. 2019). Utjecaj suše na bioaktivne spojeve vrste *Amaranthus tricolor* istraživali su Sarker i Oba (2018); zaključili su da, uslijed sušnog stresa, dolazi do povećanja koncentracije nutritivnih i bioaktivnih spojeva, fenolnih kiselina i flavonoida. Koncentracije ukupnih fenola i flavonoida mediteranske vrste *Cistus clusii* Dunal su porasle u uvjetima suše, što su autori pripisali njihovim antioksidacijskim svojstvima i ulozi u borbi protiv oksidacijskog oštećenja (Hernández i sur. 2004). Iako se sušni stres smatra negativnim faktorom u poljoprivredi, s obzirom da je odgovoran za smanjene usjeve, Selmar i Kleinwächter (2012) koji su istraživali učinak suše na fitokemijski sastav začinskih i ljekovitih biljaka, zaključili su da izlaganje suši često dovodi do poboljšanog sadržaja specijaliziranih biljnih metabolita povećavajući kvalitetu biljnih proizvoda, ali također dovodi i do smanjene veličine biljaka ili početka starenja. S obzirom na dostupnu literaturu, utjecaj poplave na fitokemijski sastav biljaka znatno je manje istražen od utjecaja suše. Kod listova tri varijeteta batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) zabilježen je značajno smanjen sadržaj ukupnih fenola pod utjecajem poplave, dok se sadržaj flavonoida nije značajno promijenio (Lin i sur. 2006). Kod luka (*Allium cepa* L.) je poplava smanjila koncentraciju i ukupnih fenola i flavonoida (Ghodke i sur. 2018). Wang i sur. (2019b) su detektirali akumulaciju flavonoida nakon poplavnog stresa u kultivaru *Chrysanthemum morifolium*. Khang i sur. (2016) su usporedili utjecaj poplave na sadržaj fenolnih kiselina otpornog i neotpornog kultivara riže (*Oryza sativa* L.) i zapazili su da je koncentracija 3 tipa kiselina porasla kod neotpornog kultivara, a čak 10, i to u puno višoj mjeri, kod otpornog kultivara. Ovakav rezultat ih je doveo do zaključka da fenolne kiseline riže sudjeluju u njezinoj prilagodbi na poplavni stres.

Antocijane smatramo pokazateljima stresa jer se akumuliraju u biljkama tijekom nepovoljnih uvjeta (Chalker-Scott 1999). Iako nisam zabilježila statistički značajnu razliku u zastupljenosti antocijana između biljaka uzgojenih u stresnim uvjetima i kontrolnih biljaka,

kod uzorka S uočljiva je tendencija rasta (Sl. 17). S obzirom da sušu obično prati i povećana količina UV zraka, protiv kojih se biljke bore akumulacijom pigmenata za zaštitu od sunca, tendenciju porasta ukupnih antocijana objašnjavam zaštitom biljke od štetnih posljedica fotoinhibicije i ROS-ova. Li i sur. (2018) uočili su da 5 tipova stresa (temperatura, svjetlost, suša, povećani salinitet i ranjavanje) povećavaju udio antocijana u durum pšenici (*Triticum turgidum* L. subsp. *turgidum* (L.) convar. *durum* (Desf.)). I kod vrste *Vaccinium myrtillus* L. je detektirana njihova povišena koncentracija kod biljaka izloženih suši (Tahkokorpi 2010), kao i kod graška (*Pisum sativum* L. cv. Meteor) (Nogués i sur. 1998). S druge strane, Wang i sur. (2019b) otkrili su da poplava uzrokuje smanjenje koncentracije antocijana u vrsti *Chrysanthemum morifolium* Hemsl. U vrsti *Arabidopsis thaliana* izloženoj abiotičkim stresovima pronađeni su različiti tipovi antocijana, što sugerira da nemaju svi iste funkcije i pruža osnovu za pojašnjenje njihovih uloga, ovisno o tipu stresa (Kovinich i sur. 2015).

Tanini su u vodi topivi fenolni spojevi sposobni vezati i precipitirati proteine i druge makromolekule u vodenim otopinama, na čemu se i temelji njihovo djelovanje protiv biljojeda (Salminen i sur. 2011). Proantocijanidini (kondenzirani tanini) pokazuju snažno antioksidativno djelovanje (Santos-Buelga i Scalbert 2000), dok je za elaginsku kiselinu, koja je dio topivih tanina, dokazano antimutageno, protutumorsko i protuvirusno djelovanje (Khanduja i sur. 1999). Okolišni čimbenici kao dostupnost nutrijenata, suša, pH, biljojedi, koncentracija ozona i CO<sub>2</sub> utječu na zastupljenost tanina u biljci (Tharayil i sur. 2011). U svom radu detektirala sam da su i poplava i suša značajno smanjile količinu tanina u kineskom kupusu (Sl. 18). Suprotan rezultat zabilježili su Weidner i sur. (2009) koji su izmjerili povećanje količine ukupnih tanina u korijenu vinove loze nakon suše. Što se tiče proantocijanidina (kondenziranih tanina), primijetila sam značajan porast njihove zastupljenosti nakon izlaganja biljaka suši, a takav rezultat zapazili su i Zhang i sur. (2012) u klijancima vrste *Casuarina equisetifolia*, te Malisch i sur. (2016) u vrsti *Onobrychis viciifolia* Scop. Štoviše, Malisch i sur. (2016) zaključili su da ontogenetski stadij u kojemu se biljka nalazi u trenutku izlaganja stresu značajno utječe na njen obrambeni odgovor.

Zastupljenost topivih šećera značajno se povećala kod biljaka izloženih stresu (Sl. 20) iz čega se može zaključiti da imaju bitnu ulogu u osmotskoj prilagodbi na vodni stres. Takav rezultat već je zabilježen i kod dva varijeteta kukuruza (Mohammadkhani i Heidari 2008). Nezhadahmadi i sur. (2014) istraživali su utjecaj suše na udio topivih šećera kod tri varijeteta jagoda; udio saharoze i fruktoze bio je niži, dok se udio glukoze povećao u biljkama uzgojenim u uvjetima suše. Arabzadeh (2012), i Granda i Camarero (2017) također su

zabilježili akumulaciju topivih šećera uslijed sušnog stresa u vrstama *Haloxylon persicum* i *Haloxylon aphyllum*, te u drvenastim vrstama, kao i Kowitcharoen i sur. (2018) koji su detektirali porast udjela šećera kod ljuskaste anone (*Annona squamosa* Linn.). Utjecaj poplave na udio šećera istražili su Bender i sur. (2016) na vrsti *Inga marginata* Wild. iz porodice Fabaceae. Koristeći istu metodu kao i ja u svom radu (prema Dubois i sur. (1956)) zabilježili su porast količine topivih šećera uslijed poplave. Na temelju ovih rezultata zaključujem da je akumulacija topivih šećera povezana s mehanizmima prilagodbe biljaka na suvišak vode u tlu. I Hsu i sur. (1999) su spomenutom metodom došli do istog rezultata: listovi vodene jabuke (*Syzygium samarangense* Merr. et Perry) iz poplavljenih područja imali su veću koncentraciju topivih šećera od onih iz nepoplavljenih područja. S druge strane, Jaiphong i sur. (2016) nisu zabilježili promjene u zastupljenosti šećera saharoze kod šećerne trske (*Saccharum* spp.) uzgojene u uvjetima suše ili poplave, dok su Pourabdal i sur. (2008) detektirali značajan porast zastupljenosti topivih šećera u stabljikama i korijenu kukuruza (*Zea mays* L.) tijekom rasta u uvjetima poplave. Porast udjela šećera uslijed poplavnog stresa zapažen je i kod vrste *Triarrhena sacchariflora* (Maxim.) (Wang i sur. 2019a). Ismail i sur. (2009) su zaključili da klijanci riže uzgojene u poplavljenom tlu imaju povećan udio šećera zato što zadržavaju sposobnost korištenja zaliha škroba putem povećane aktivnosti amilaze i anaerobnog disanja.

Kao što je prikazano na slikama 21, 22, 24 i 25, poplava je uzrokovala značajan pad udjela svih mjenjenih fotosintetskih pigmenata (klorofila *a* i *b*, ukupnih klorofila, karotenoida). Sličan rezultat, vezano uz klorofile, zabilježen je i kod ječma te je predloženo da smanjenje fotosinteze nakon poplave može biti rezultat *a*) neizravnog učinka, posredovanog putem zatvaranja puči, uzrokujući smanjenje opskrbe CO<sub>2</sub> i visoku razinu molekularnog kisika ili *b*) učinka poplave na kapacitet listova za fiksaciju CO<sub>2</sub>, neovisno o jačem ograničenju njegove difuzije u unutrašnjost biljke (Yordanova i sur. 2004). Wang i sur. (2019a) također su zabilježili pad koncentracije klorofila *a* i *b* te karotenoida u vrste *Triarrhena sacchariflora* nakon izlaganja biljaka poplavi. I u stabljici, korijenu i listovima kukuruza (*Zea mays* L.) je uslijed poplave izmjerena značajno smanjena koncentracija klorofila *a* i *b* (Pourabdal i sur. 2008, Yan i sur. 1996). Suprotno poplavi, suša je značajno povećala udio klorofila *b*, dok su udjeli ostalih mjenjenih pigmenata u pekinškom kupusu bili stabilni (vrijednosti su slične onima kod kontrolnih biljaka). Za usporedbu, u ječmu, slanutku i listovima afričkih patlidžana zabilježen je pad koncentracije ukupnih klorofila uslijed izlaganja biljaka sušnom stresu (Li i sur. 2006, Macar i Ekmekci 2008, Mibei i sur. 2017). Omjer klorofila *a* i *b* u pekinškom kupusu nije se promijenio u poplavom tretiranim biljkama, ali se nakon suše značajno smanjio

(Sl. 23). Sličan rezultat zabilježen je i nakon uzgoja vrste *Jatropha curcas* u sušnim uvjetima (Sapeta i sur. 2013), kao i u dva kultivara bobica (*Vicia faba* L.) tijekom suše (El-Tayeb 2006). Štoviše, Sapeta i sur. (2013) su zaključili da je do smanjenja omjera došlo zbog povećanja udjela klorofila *b*, a isto to primjećujem i ja u slučaju pekinškog kupusa. Nakon zalijevanja sušom tretirane vrste *Jatropha curcas*, vrijednost omjera klorofila *a* i *b* je porasla do iste one kakva je bila u kontrolnoj grupi, što ukazuje na to da je smanjenje omjera specifičan odgovor na sušu (Sapeta i sur. 2013).

Vezano za karotenoide, slično kao i kod slanutka uzgojenog u sušnim uvjetima (Macar i Ekmekci 2008), kod dva kultivara jabuka (Šircelj i sur. 1999), te listova batata (Lin i sur. 2006) ni kod pekinškog kupusa nije došlo do promjene udjela ovih spojeva. Lin i sur. (2006) smatraju da je količina karotenoida u listovima batata i prije izlaganja biljaka stresu bila dovoljno visoka za obranu od fotooksidacije i ROS-ova te stoga nije bila potrebna njihova dodatna biosinteza. Suprotno ovome, Altangerel i sur. (2017) su zabilježili pad koncentracije karotenoida kod vrste *Plectranthus scutellarioides* izložene suši, a rezultat su objasnili činjenicom da se uslijed stresa  $\beta$ -karoten pretvara u hlapivi signal  $\beta$ -ciklocitral. Suša je značajno utjecala i na pigmente listova amaranta; osim ukupnih karotenoida, udio pigmenta betacijanina, betaksantina, betalaina, klorofila *a* i klorofila *b* se značajno i postupno smanjivao s povećanjem intenziteta sušnog stresa (Sarker i Oba 2018).

S obzirom na ključnu ulogu porfirina u procesima prijenosa energije i signala, te katalizi, za biljku je nužno održati ravnotežu ovih spojeva (Phung i sur. 2011). Zastupljenost porfirina u pekinškom kupusu značajno se smanjila nakon poplavnog stresa, no nije se promijenila djelovanjem suše (Sl. 26). Suprotno mom rezultatu na pekinškom kupusu, u transgeničnoj riži je došlo do značajnog pada udjela porfirina nakon sušnog stresa (Phung i sur. 2011).

Metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja (HPLC) identificirala sam i kvantificirala pojedinačne flavonoide i fenolne kiseline, te *L*-askorbinsku kiselinu pekinškog kupusa (Sl. 27). Među fenolnim kiselinama sinapinska je bila prisutna u najvišoj koncentraciji, a nakon nje ferulična; klorogensku i *p*-kumarinsku kiselinu sam detektirala u vrlo malim koncentracijama (Sl. 28, 29, 30 i 31). Koncentracija dominantnih kiselina (sinapinske i ferulične) u pekinškom kupusu nakon poplavnog stresa je značajno porasla. Poplavom potaknuto povećanje koncentracije sinapinske kiseline zabilježeno je i u pšenici (Chen i sur. 2020) i cvjetači (Kałużewicz i sur. 2017). S druge strane, u biljkama uzgojenim u uvjetima suše zabilježila sam pad koncentracije ferulične kiseline u odnosu na kontrolne

biljke (koncentracija sinapinske kiseline nije bila znatno promijenjena). Sličan rezultat zabilježen je u listovima i korijenu mladih biljaka vinove loze (*Vitis vinifera*) kultivar Kizmisz Łuczistyj (Krol i sur. 2014), no suprotan kod korijena vinove loze kultivar Himrod izložene sušnom stresu (Weidner i sur. 2009). Među flavonoidima pekinškog kupusa, identificirala sam kempferol i kvercetin; kempferol je prisutan u višoj koncentraciji nego kvercetin. Suša je značajno smanjila koncentraciju kvercetina, dok je koncentracija kempferola niža nego u kontrolnih biljaka, ali razlika nije značajna na razini  $p \leq 0,05$  (Sl. 32 i 33). S druge strane, poplava je uzrokovala povećanje koncentracije oba flavonoida, ali ne značajno. Povećanje koncentracije flavonoida uslijed poplave zabilježeno je i u vrste *Chrysanthemum morifolium*, te je pozitivno korelirano s ekspresijom gena za ključne enzime u flavonoidnom biosintetskom putu (Wang i sur. 2019b). Suprotno mojemu rezultatu dobivenom na pekinškom kupusu, u uročnjaku (*Arabidopsis thaliana* L.) su Shojaie i sur. (2016) zabilježili porast koncentracije kempferola i kvercetina nakon izlaganja suši, a slično su primjetili i Khan i sur. (2011) koji su izmjerili povećanu koncentraciju kempferola u brokuli (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck) nakon izlaganja poplavi i suši.

Koncentracija *L*-askorbinske kiseline bila je znatno veća u biljkama uzgojenim pod sušnim stresom nego onima u kontrolnim i uvjetima poplave, koje se međusobno po koncentraciji ovog vitamina nisu razlikovale (Sl. 34). S obzirom da je *L*-askorbinska kiselina primarni u vodi-topivi antioksidans biljaka i životinja, te u biljkama sudjeluje kao kofaktor enzimima u procesu fotosinteze, biosintezi hormona i regeneraciji antioksidansa kao što je  $\alpha$ -tokoferol (Gallie 2013), očekivala sam povećanje koncentracije ovog vitamina nakon oba tipa primijenjenog stresa. S obzirom da u uvjetima poplave nije došlo do povećanja koncentracije ovog spoja, pretpostavljam da su neki drugi tipovi antioksidansa (kao glutation, fenolni spojevi, tokoferoli, te enzimi koji hvataju ROS-ove i regeneriraju aktivni oblik antioksidansa kao što su superoksid-dismutaza, katalaza, askorbat-peroksidaza, glutation-reduktaza) prevladali u obrambenom odgovoru pekinškog kupusa spram poplave. Što se tiče rezultata na drugim biljnim vrstama, suša je i kod ljuskaste anone (*Annona squamosa* Linn.) izazvala porast količine *L*-askorbinske kiseline (Kowitcharoen i sur. 2018). Hernández i sur. (2004) su također detektirali porast udjela ovog vitamina kod vrste *Cistus clusii* Dunal; nakon 15 dana suše povećao se dva puta, a maksimum je dostigao 50 dana nakon početka sušnog razdoblja. Povećan udio vitamina C nakon sušnog stresa detektiran je i u paprici (Ahmed i sur. 2014), rajčici (Stagnari i sur. 2016) i listovima amaranta (Sarker i Oba 2018), stoga zaključujem da *L*-askorbinska kiselina ima važnu ulogu u zaštiti biljke od oksidacijskog oštećenja

uzrokovanog sušnim stresom. Suprotno mojem i prethodno spomenutim rezultatima, kod soje (*Glycine max* L. Merr) je zabilježeno smanjivanje udjela *L*-askorbinske kiseline uslijed sušnog stresa (Seminario i sur. 2017), što upućuje na specifičnost odgovora biljnih vrsta spram suše na razini ovog vitamina.

Reaktivni kisikovi spojevi stvaraju se tijekom normalnog staničnog metabolizma, no kada su prisutni u visokim koncentracijama postaju toksični jer dovode do oštećenja DNA, proteina, lipida, membrana (Ferreira i sur. 2007). Prirodni antioksidansi koji mogu neutralizirati slobodne radikale od presudne su važnosti za obranu biljke od spomenutih oštećenja. Laboratorijske metode kojima se mjeri sposobnost čišćenja slobodnih radikala koriste se za procjenu antioksidacijskog kapaciteta uzorka od interesa. S obzirom da antioksidacijskom kapacitetu biljke doprinose različiti antioksidansi koji djeluju različitim mehanizmima, potrebno je kombinirati više metoda mjerenja kako bi konačna procjena kapaciteta bila što preciznija. U sklopu svog rada, utjecaj poplave i suše na antioksidacijski kapacitet pekinškog kupusa izmjerila sam korištenjem četiri metode – ABTS, DPPH, FRAP i metodom mjerenja moći reduciranja. Metode podrazumijevaju redukciju obojenog oksidansa (ABTS, DPPH, FRAP ili kompleks  $\text{Fe}^{3+}$ /fericijanid) i međusobno se razlikuju s obzirom na kemijske reakcije na kojima se baziraju (Floegel i sur. 2011). Sve četiri metode temelje se na prijenosu elektrona, no metode ABTS i DPPH uključuju slobodne radikale ( $\text{ABTS}^{\cdot+}$  i  $\text{DPPH}^{\cdot}$ ), a FRAP i metoda moći reduciranja podrazumijevaju redukciju  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$ . Od četiri primijenjene, samo sam metodom ABTS zabilježila povećanje antioksidacijskog kapaciteta biljaka uzgojenih pod uvjetima poplave (Sl. 35); ostalim metodama nisam zabilježila promjene u odnosu na kontrolne biljke ni kod sušnog ni kod poplavnog stresa. Ovakav rezultat pripisujem činjenici da je metoda ABTS osjetljivija od ostale tri (Floegel i sur. 2011, Almeida i sur. 2011). Naime, ABTS je topiv i u vodenom i u organskom mediju što ga, za analizu hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa i pigmenata, čini osjetljivijim i prikladnijim od DPPH, FRAP i kompleksa  $\text{Fe}^{3+}$ /fericijanid (Floegel i sur. 2011, Almeida i sur. 2011). Primjećujem da su metodom FRAP izmjerene vrijednosti između uzoraka slične (Sl. 37). Pretpostavljam da je razlog tome činjenica da svaka komponenta koja posjeduje niži standardni potencijal od redoks-para ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ)/( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ), neovisno o tome ima li antioksidacijsku sposobnost ili ne, dovodi do redukcije kompleksa i tako povećava antioksidacijsku vrijednost uzorka (tj. daje lažno veći rezultat) (Rayan i sur. 2010). Slično uočavam i za rezultate dobivene metodom moći reduciranja (Sl. 38). Za usporedbu, suša je povećala antioksidacijski kapacitet listova amaranta (Sarker i Oba 2018), ali smanjila onaj

ljuskaste anone (*Annona squamosa* L.) (Kowitcharoen i sur. 2018), listova i korijena vinove loze uzgajane u dugotrajnim uvjetima suše (Król i sur. 2014). Daniels i sur. (2015) su u listovima vrste *Gethyllis multifolia* L. Bolus izloženih suši metodom ABTS zabilježili smanjeni antioksidacijski kapacitet, dok metodom FRAP nije detektirana promjena u odnosu na kontrolne biljke, ali je u korijenu s obje metode zabilježen porast antioksidacijskog kapaciteta što ukazuje na to da vodni stres specifično djeluje na razini pojedinih biljnih organa. Lin i sur. (2006) su metodom DPPH i mjerenjem moći reduciranja istražili kako suša i poplava utječu na tri varijeteta batata (*Ipomea batatas* (L.) Lam.). Iako su međusobno između varijeteta s obje metode zabilježene razlike, pojedinačno za svaki varijetet nije došlo do promjene u antioksidacijskom kapacitetu, dok je poplava smanjila, a suša povećala moć reduciranja. Sahitya i sur. (2018) su uočili da antioksidacijski kapacitet paprike (*Capsicum annuum* L.) nakon izlaganja suši ovisi o genotipu.

## 5. ZAKLJUČAK



Rezultati u sklopu ovog diplomskog rada pokazuju da pekinški kupus dobro podnosi dugi period poplave i moglo bi ga se uzgajati na tlima bogatim vodom. U takvim uvjetima uzgoja biljke postižu značajno veći antioksidacijski kapacitet (određen metodom ABTS) nego one uzgajane u tlu normalne količine vlage. Također, takve biljke imaju značajno veću koncentraciju sinapinske i ferulične kiseline (fenolnih kiselina s nizom pozitivnih bioloških učinaka), a pokazuju i tendenciju porasta koncentracije flavonoida kempferola i kvercetina (snažnih prirodnih antioksidansa); udio topivih šećera im je također značajno veći. S druge strane, poplava je značajno smanjila udio klorofila *a* i *b*, ukupnih klorofila, karotenoida, porfirina i tanina. Pekinški kupus dugotrajnu sušu ne podnosi, dolazi do značajnog gubitka biomase i biljke odumiru, pa je nužno osigurati navodnjavanje kako bi biljke ostale zdrave i primijenjive u prehrambenoj industriji. Što se tiče fitokemijske pozadine obrambenog odgovora pekinškog kupusa na sušu, uočila sam da se antioksidacijski kapacitet biljaka nije promijenio u odnosu na kontrolnu grupu, značajno je porasla koncentracija *L*-askorbinske kiseline, klorofila *b*, ukupnih proantocijanidina i topivih šećera, a smanjila se koncentracija ferulične kiseline, kvercetina i ukupnih tanina, te omjer klorofila *a/b*; zastupljenost ostalih mjerenih parametara nije se znatno promijenila.

## 6. LITERATURA

- Ahmed A. F., Yu H., Yang X., Jiang W. (2014): Deficit irrigation affects growth, yield, vitamin C content, and irrigation water use efficiency of hot pepper grown in soilless culture. *HortScience* **49**: 722–728.
- Akram N. A., Shafiq F., Ashraf M. (2017): Ascorbic acid - A potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science* **8**: 613.
- Almeida M. M. B., Sousa P. H. M., Arriaga Â. M. C., Prado G. M., Carvalho Magalhães C. E., Maia G. A., Lemos T. L. G. (2011): Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International* **44**: 2155-2159.
- Altangerel N., Ariunbold G. O., Gorman C., Alkahtani M. H., Borrego E. J., Bohlmeier D., Hemmer P., Kolomiets M. V., Yuan J. S., Scully M. O. (2017): *In vivo* diagnostics of early abiotic plant stress response via Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**: 3393–3396.
- Al-Shehbaz I. A., Beilstein M. A., Kellogg E. (2006): Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): An overview. *Plant Systematics and Evolution* **259**: 89-120.
- Arabzadeh N. (2012): The effect of drought stress on soluble carbohydrates (sugars) in two species of *Haloxylon persicum* and *Haloxylon aphyllum*. *Asian Journal of Plant Sciences* **11**: 44-51.
- Ashraf M. A., Iqbal M., Rasheed R., Hussain I., Riaz M., Arif M. S. (2018): Environmental stress and secondary metabolites in plants: an overview. U: Ahmad P., Ahanger M. A., Singh V. P., Tripathi D. K., Alam P., Alyemeni M. N. (ur.) *Plant metabolites and regulation under environmental stress*. Amsterdam, Elsevier, 153-336.
- Auwärter W., Écija D., Klappenberger F., Barth J. V. (2015): Porphyrins at interfaces. *Nature Chemistry* **7**: 105–120:
- Barrita J. L. S, Sanchez M. S. S. (2013): Antioxidant role of ascorbic acid and his protective effects on chronic diseases. U: Morales-Gonzales J. A. (ur.) *A Role for Antioxidants*. IntechOpen.
- Bartley G. E., Scolnik P. A. (1995): Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell* **7**: 1027-1038.
- Beecher G. R. (2010): Proanthocyanidins. U: Coates P. M. (ur.) *Encyclopedia of Dietary Supplements*. Informa Healthcare, 555-568.
- Bender B., Capellesso E., Lottici M., Sentkovski J., Mielniczki-Pereira A., Luís Mauro R., Sausen T. (2016): Growth responses and accumulation of soluble sugars in *Inga marginata* Wild. (Fabaceae) subjected to flooding under contrasting light conditions. *Brazilian Journal of Biology* **77**.
- Berend S., Grabarić Z. (2008): Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **59**: 205-212.

- Bhalodia N. R., Nariya P. B., Acharya R. N., Shukla V. J. (2013): *In vitro* antioxidant activity of hydro alcoholic extract from the fruit pulp of *Cassia fistula* Linn. *Ayu* **34**: 209-14.
- Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. (2001): Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* **161**: 839-851.
- Bravo L. (1998): Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **56**: 317-333.
- Cartea M. E., Francisco M., Soengas P., Velasco P. (2011): Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. *Molecules* **16**: 251-280.
- Chalker-Scott L. (1999): Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology* **70**: 1-9.
- Chen C., Chen S., Jha R. K., Cotrozzi L., Nali C., Lorenzini G., Ma L. (2020): Phenol metabolism of two cultivars of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) as affected by ozone and flooding stress. *Journal of Agronomy and Crop Science* **00**: 1-14.
- Couée I., Sulmon C., Gouesbet G., Amrani A. (2006): Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**: 449-459.
- Daniels C. W., Rautenbach F., Marnewick J. L., Valentine A. J., Babajide O. J., Mabuselad W. T. (2015): Environmental stress effect on the phytochemistry and antioxidant activity of a South African bulbous geophyte, *Gethyllis multifolia* L. Bolus. *South African Journal of Botany* **96**: 29-36.
- Denffer D., Ziegler H. (1982): *Morfologija i fiziologija*. Zagreb, Školska knjiga, 246-254.
- Delgado-Vargas F., Jiménez A. R., Paredes-López O. (2000): Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **40**: 173-289.
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. (1956): Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**: 350-356.
- Dudek B., Warskulat A. C., Schneider B. (2016): The occurrence of flavonoids and related compounds in flower sections of *Papaver nudicaule*. *Plants* **5**: 28.
- Eckes A. H., Gubała T., Nowakowski P., Szymczyszyn T., Wells R., Irwin J. A., Horro C., Hancock J. M., King G., Dyer S. C., Jurkowski W. (2017): Introducing the *Brassica* information portal: Towards integrating genotypic and phenotypic *Brassica* crop data. *F1000Research* **6**: 465.
- El-Tayeb M. A. (2006): Differential Response of two *Vicia faba* cultivars to drought: growth, pigments, lipid, peroxidation, organic solutes, catalase, and peroxidase activity. *Acta Agronomica Hungarica* **54**: 25– 37.

- Eldahshan O. A., Singab A. N. B. (2013): Carotenoids. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **2**, 225-234.
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP, WHO (2018): *The State of Food Security and Nutrition in the World 2018. Building Climate Resilience for Food Security and Nutrition*. Rome: FAO.
- Franzke A., Lysak M., Al-Shehbaz I., Koch M., Mummenhoff K. (2011): Cabbage family affairs: The evolutionary history of Brassicaceae. *Trends in Plant Science* **16**: 108-16.
- Ferreira I. C. F. R., Baptista P., Vilas-Boas M., Barros L. (2007): Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry* **100**: 1511–1516.
- Floegel A., Kim D.-O., Chung S.-J., Koo S.I., Chun O.K. (2011): Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, **24**: 1043–1048.
- Francisco M., Tortosa M., Martínez-Ballesta M. C., Velasco P., García-Viguera C, Moreno D. A. (2017): Nutritional and phytochemical value of *Brassica* crops from the agri-food perspective. *Annals of Applied Biology* **170**: 273-285.
- Furlan C. M., Motta L. B, Cursino dos Santos D. Y. A. (2011): Tannins: What do they represent in plant life? U: Petridis G. K. (ur.) *Tannins: types, foods containing and nutrition*. Hauppauge, Nova Science Publishers, Inc, 251-263.
- Gallie D. R. (2012): *L-Ascorbic acid: a multifunctional molecule supporting plant growth and development*. *Scientifica* **24**.
- Gharibi S., Sayed Tabatabaei B. E., Saeidi G., Talebi M., Matkowski A. (2019): The effect of drought stress on polyphenolic compounds and expression of flavonoid biosynthesis related genes in *Achillea pachycephala* Rech. f. *Phytochemistry* **162**: 90-98.
- Ghodke P. H., Shirsat D. V., Thangasamy A., Mahajan V., Salunkhe V. N., Khade Y., Singh M. (2018): Effect of water logging stress at specific growth stages in onion crop. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **7**: 3438–3448.
- Granda E., Camarero J. J. (2017): Drought reduces growth and stimulates sugar accumulation: new evidence of environmentally driven non-structural carbohydrate use. *Tree Physiology* **37**: 997–1000.
- Gull A., Lone A. A., Wani N. U. I. (2018): *Biotic and abiotic stresses in plants*. U: Oliveira A.B. (ur.) *Abiotic and Biotic Stress in Plants*. IntechOpen.
- Gutiérrez-Grijalva E. P., Picos-Salas M. A., Leyva-López N., Criollo-Mendoza M. S., Vazquez-Olivo G., Heredia J. B. (2018): Flavonoids and phenolic acids from oregano: occurrence, biological activity and health benefits. *Plants* **7**: 2.

- Hartmann T. (2007): From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **68**: 2831–2846.
- He F., Pan Q., Duan Y. S., Duan C. Q. (2008): Biosynthesis and genetic regulation of proanthocyanidins in plants. *Molecules* **13**: 2674-2703.
- Hernández I., Alegre L., Munné-Bosch S. (2004): Drought-induced changes in flavonoids and other low molecular weight antioxidants in *Cistus clusii* under Mediterranean field conditions. *Tree Physiology* **24**:1303-11.
- Howard L. R., Clar J. R., Brownmiller C. (2003): Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**: 1238-1247.
- Hsu Y., Tseng M., Lin C. (1999): The fluctuation of carbohydrates and nitrogen compounds in flooded wax-apple trees. *Botanical Bulletin of Academi Sinica* **40**: 193-198.
- Hussein R. A., El-Anssary A. A. (2018): Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. U: Builders P. F. (ur.) *Herbal Medicine*. IntechOpen.
- Inanc A. L. (2011): Chlorophyll: structural properties, health benefits and its occurrence in virgin olive oils. *Akademik Gida* **9**: 26–32.
- IPCC (2008) *Climate Change and Water*. Technical Paper of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Ur: Bates B. C., Kundzewicz Z. W., Wu S., Palutikof J. P. IPCC Secretariat, Geneva, 210.
- IPCC (2012): *Managing the Risks of Extreme Events and Disasters to Advance Climate Change Adaptation*. A Special Report of Working Groups I and II of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Ur: Field C. B., Barros V., Stocker T. F., Qin D., Dokken D. J., Ebi K. L., Mastrandrea M. D., Mach K. J., Plattner G.-K., Allen S. K., Tignor M., Midgley P. M. Cambridge University Press, Cambridge, UK, and New York, NY, USA, 582.
- IPCC (2013): *Climate Change 2013: The Physical Science Basis*. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Ur: Stocker T. F., Qin D., Plattner G.-K., Tignor M., Allen S. K., Boschung J., Nauels A., Xia Y., Bex V., Midgley P. M. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535.
- Isah T. (2019): Stress and defense responses in plants secondary metabolite production. *Biological Research* **52**: 39.
- Ismail A. M., Ella E. S., Vergara G. V., Mackill D. J. (2009): Mechanisms associated with tolerance to flooding during germination and early seedling growth in rice (*Oryza sativa*). *Annals of Botany* **103**: 197–209.

- Jackson M. B., Colmer T. D. (2005): Response and adaptation by plants to flooding stress. *Annals of Botany* **96**: 501-505.
- Jaiphong T., Tominaga J., Watanabe K., Nakabaru M., Takaragawa H., Suwa R., Ueno M., Kawamitsu Y. (2016): Effects of duration and combination of drought and flood conditions on leaf photosynthesis, growth and sugar content in sugarcane. *Plant Production Science* **19**: 427-437.
- Jiang N., Doseff A. I., Grotewold E. (2016): Flavones: from biosynthesis to health benefits. *Plants* **5**: 27.
- Kabera J. N., Semana E., Mussa A. R., He X. (2014): Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2**: 377-392.
- Kałużewicz A., Lisiecka J., Gąsecka M., Krzesiński W., Spizewski T., Zaworska A., Frąszczak B. (2017): The effects of plant density and irrigation on phenolic content in cauliflower. *Horticultural Science (Prague)*, **44**: 178-185.
- Kapusta-Duch J., Kopeć A., Piatkowska E., Borczak B., Leszczyńska T. (2012): The beneficial effects of Brassica vegetables on human health. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* **63**: 389-95.
- Khanduja K. L., Gandhi R. K., Pathania V., Syal N. (1999) Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. *Food Chemistry and Toxicology* **37**: 313-318.
- Khan A., Anwar Y., Hasan M., Iqbal A., Ali M., Alharby H. F., Hakeem K. R., Hasanuzzaman M. (2017): Attenuation of drought stress in *Brassica* seedlings with exogenous application of Ca<sup>2+</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plants* **6**: 20.
- Khan M. A. M., Ulrichs C., Mewis I. (2011): Effect of water stress and aphid herbivory on flavonoids in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck). *Journal of Applied Botany and Food Quality* **84**: 178-182.
- Khang D. T., Ha P. T. T., Lang N. T., Tuyen P. T., Minh L. T., Minh T. N., Bach D. T., Xuan T. D. (2016): Involvement of phenolic compounds in anaerobic flooding germination of rice (*Oryza sativa* L.). *International Letters of Natural Sciences* **56**: 73-81.
- Khoo H. E., Azlan A., Teng Tang S., Lim S. M. (2017): Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food and Nutrition Research* **61**.
- Koleckar V., Kubikova K., Rehakova Z., Kuca K., Jun D., Jahodar L., Opleta L. (2008): Condensed and hydrolysable tannins as antioxidant influencing the health. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry* **8**: 436-447.
- Kovinich N., Kayanja G., Chanoca A., Otegui M. S., Grotewold E. (2015): Abiotic stresses

induce different localizations of anthocyanins in *Arabidopsis*. Plant Signaling and Behaviour **10**.

Kowitcharoen L., Wongs-Areea C., Setha S., Komkhuntod R., Kondo S., Srilaong V. (2018): Pre-harvest drought stress treatment improves antioxidant activity and sugar accumulation of sugar apple at harvest and during storage. Agriculture and Natural Resources **52**: 146-154.

Kraus T. E. C., Dahlgren R. A., Zasoski R. J. (2003): Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems - a review. Plant and Soil **256**: 41–66.

Król A., Amarowicz R., Weidner S. (2014): Changes in the composition of phenolic compounds and antioxidant properties of grapevine roots and leaves (*Vitis vinifera* L.) under continuous of long-term drought stress. Acta Physiologiae Plantarum **36**: 1491–1499.

Larkin R. M. (2016): Tetrapyrrole signaling in plants. Frontiers in plant science **7**: 1586.

Lešić R., Borošić J., Buturac I., Čustić M., Poljak M., Romić D. (2002): Povrčarstvo. Zrinski d.d. Čakovec.

Li R., Guo P., Baum M., Grando S., Ceccarelli S. (2006): Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley. Agricultural Sciences in China **5**: 751-757.

Li X., Lv X., Wang X., Wang L., Zhang M., Ren M. (2018): Effects of abiotic stress on anthocyanin accumulation and grain weight in purple wheat. Crop and Pasture Science **69**: 1208–1214.

Lin K. H., Chao P. Y., Yang C. M., Cheng W. C., Lo H. F., Chang T. R. (2006): The effects of flooding and drought stresses on the antioxidant constituents in sweet potato leaves. Botanical Studies **47**: 417-426.

Lo Scalzo R., Genna A., Branca F., Chedin M., Chassaing H. (2008): Anthocyanin composition of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) and cabbage (*B. oleracea* L. var. *capitata*) and its stability in relation to thermal treatments. Food Chemistry **107**: 136–144.

Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. (2010): Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. Pharmacogn Reviews **4**: 118-126.

Macar T. K., Ekmekci Y. (2008): PSII photochemistry and antioxidant responses of a chickpea variety exposed to drought. Zeitschrift fur Naturforschung **63**: 583-594.

Mageney V., Neugart S., Albach D. C. (2017): A guide to the variability of flavonoids in *Brassica oleracea*. Molecule **22**: 252-268.

Malisch C. S., Salminen J. P., Kölliker R., Engström M. T., Suter D., Studer B., Lüscher A. (2016): Drought effects on proanthocyanidins in sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) are dependent on the plant's ontogenetic stage. Journal of Agricultural and Food Chemistry **64**: 9307-9316.



- Maness N. (2010): Extraction and analysis of soluble carbohydrates. U: Sunkar R. (ur.) Plant Stress Tolerance. Methods in Molecular Biology **639**. Totowa, Humana Press.
- Mazid M., Khan T. A., Khan Z. H., Quddusi S., Mohammad F. (2011): Occurrence, biosynthesis and potentialities of ascorbic acid in plants. International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences **1**: 167-184.
- Mibei E. K., Ambuko J., Giovannoni J. J., Onyango A. N., Owino W. O. (2017): Carotenoid profiling of the leaves of selected african eggplant accessions subjected to drought stress. Food Science and Nutrition **5**: 113–122.
- Minatel I. O., Borges C. V., Ferreira M. I., Gomez H. A., Chen C. O., Lima G. P. (2017): Phenolic compounds: functional properties, impact of processing and bioavailability. U: Soto-Hernandez M., Palma-Tenango M., Garcia-Mateos M. R. (ur.) Phenolic compounds - biological activity. IntechOpen.
- Mohammadkhani N., Heidari R. (2008): Drought-induced accumulation of soluble sugars and proline in two maize varieties. World Applied Sciences Journal **3**: 448-453.
- Moore B. D., Andrew R. L., Külheim C., Foley W. J. (2014): Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. New Phytologist **201**: 733-750.
- Navarro-Hoyos M., Lebrón-Aguilar R., Quintanilla-López J. E., Cueva C., Hevia D., Quesada S., Azofeifa G., Moreno-Arribas M. V., Monagas M., Bartolomé B. (2017): Proanthocyanidin characterization and bioactivity of extracts from different parts of *Uncaria tomentosa* L. (Cat's Claw). Antioxidants **6**.
- Nezhadahmadi A., Golam F., Rashid K. (2014): Analysis of soluble sugar contents of three strawberry varieties under drought stress conditions in different growing environments. Pakistan Journal of Nutrition **13**.
- Nix A., Paull C., Colgrave M. (2017): Flavonoid profile of the cotton plant, *Gossypium hirsutum*. Plants **6**: 43.
- Nogués S., Allen D. J., Morison J. I., Baker N. R. (1998): Ultraviolet-B radiation effects on water relations, leaf development, and photosynthesis in droughted pea plants. Plant Physiology **117**: 173-81.
- OECD (2016): *Brassica* crops (*Brassica* species), U: Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment, Volume 5: OECD Consensus Documents, OECD Publishing, Paris.
- Osakabe Y., Osakabe K., Shinozaki K., Tran L. P. (2014): Response of plants to water stress. Frontiers in Plant Science **5**: 86.
- Ough C. S., Amerine M. A. (1988): Phenolic compounds. U: Ough C. S. i Amerine M. A. (ur.) Methods for analysis of musts and wines. New York, John Wiley & Sons Inc., 203-221.

- Paciolla C., Fortunato S., Dipierro N., Paradiso A., Leonardis S., Mastropasqua L., Pinto M. C. (2019): Vitamin C in plants: from functions to biofortification. *Antioxidants* **8**: 519.
- Panche A. N., Diwan A. D., Chandra1 S. R. (2016): Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science* **5**.
- Park C. H., Yeo H. J. , Park S., Kim J. K., Park S. U. (2019): Comparative phytochemical analyses and metabolic profiling of different phenotypes of chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Foods* **8**: 587-600.
- Pareek S., Sagar N., Sharma S., Yadav V., Agarwal T., Aguilar G., Yahia E. (2017): Chlorophylls: chemistry and biological functions. U: Yahia E. M. (ur.) *Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry and human health*. Ney York, John Wiley & Sons Inc, 269-284.
- Phung T. H., Jung H., Park J. H., Kim J. G., Back K., Jung S. (2011): Porphyrin biosynthesis control under water stress: sustained porphyrin status correlates with drought tolerance in transgenic rice. *Plant Physiology* **157**: 1746–1764.
- Pisoschi A. M., Pop A., Cimpeanu C., Predoi G. (2016): Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: a review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Pourabdol L., Heidary R., Farboodnia T. (2008): Effects of three different flooding periods on some anatomical, morphological and biochemical changings in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Asian Journal of Plant Sciences* **7**: 90-94.
- Radić Brkanac S., Gerić M., Gajski G., Vujčić V., Garaj-Vrhovac V., Kremer D., Domijan A. M. (2015): Toxicity and antioxidant capacity of *Frangula alnus* Mill. bark and its active component emodin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **73**: 923-929.
- Ramos P., Herrera R., Moya-León M. A. (2014): Anthocyanins: food sources and benefits to consumer's health. U: Warner L. M. (ur.) *Handbook of Anthocyanins*. Hauppauge, Nova Science Publishers, 373-394.
- Rayan G., Guet J. E., Taulier N., Pincet F., Urbach W. (2010): Recent Applications of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) to membrane bio-macromolecules. *Sensors* **10**: 5927-5948.
- Reis Giada M. L. (2013): Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. U: Morales-Gonzales J. A. (ur.) *Oxidative stress and chronic degenerative diseases: a role for antioxidants*. IntechOpen, 87-112.
- Rice-Evans C., Miller N., Paganga G. (1997): Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* **2**: 152-159.
- Rosa M., Prado C., Podazza G., Interdonato R., González J. A., Hilal M., Prado F. E. (2009): Soluble sugars - metabolism, sensing and abiotic stress: a complex network in the life of plants. *Plant Signaling and Behavior* **4**: 388–393.

- Ruperti B., Botton A., Populin F., Eccher G., Brilli M., Quaggiotti S., Trevisan S., Cainelli N., Guarracino P., Schievano E., Meggio F. (2019): Flooding responses on grapevine: a physiological, transcriptional, and metabolic perspective. *Frontiers in Plant Science* **10**: 339.
- Sahitya U. L., Krishna M., Deepthi R. S., Prasad G. S., Kasim D. P. (2018): Seed antioxidants interplay with drought stress zolerance indices in chilli (*Capsicum annuum* L.) seedlings. *BioMed Research International*, 14.
- Salminen J. P., Karonen M. (2011): Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Functional Ecology* **25**: 325–338.
- Sangeetha R. K., Baskaran V. (2010): Carotenoid composition and retinol equivalent in plants of nutritional and medicinal importance: efficacy of  $\beta$ -carotene from *Chenopodium album* in retinol-deficient rats. *Food Chemistry* **119**: 1584–1590.
- Sangeetha R., Vedesree N. (2012): *In vitro*  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of the leaves of *Thespesia populnea*. *International Scholarly Research Notices Pharmacology*.
- Sanlier N., Guler Saban M. (2018): The benefits of *Brassica* vegetables on human health. *Journal of Human Health Research* **1**: 104-117.
- Santos-Buelga C., Scalbert A. (2000): Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**: 1094-1117.
- Sapeta H., Costa J. M., Lourenc T., Maroco J., van der Linde P., Oliveira M. M. (2013): Drought stress response in *Jatropha curcas*: growth and physiology. *Environmental and Experimental Botany* **85**: 76– 84.
- Saxena M., Saxena J., Pradhan A. (2012): Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* **16**: 130-134.
- Scheer H. (1991): Chemistry and occurrence of chlorophylls. U: Chlorophylls, Ur: CRC-Press.
- Selmar D., Kleinwächter M. (2012): Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Industrial Crops and Products* **42**: 558-566.
- Seminario A., Song L., Nguyen H. R., González E. M., Larrainzar E. (2017): Drought stress causes a reduction in the biosynthesis of ascorbic acid in soybean plants. *Frontiers in Plant Science* **8**: 1042.
- Seong G. U., Hwang I. W., Chung S. K. (2016): Antioxidant capacities and polyphenolics of chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) leaves. *Food Chemistry* **199**: 612-618.

- Sharma A., Li X., Lim Y. P. (2014): Comparative genomics of Brassicaceae crops. *Breeding science* **64**: 3–13.
- Shojaie B., Mostajeran A., Ghannadian M. (2016): Flavonoid dynamic responses to different drought conditions: amount, type, and localization of flavonols in roots and shoots of *Arabidopsis thaliana* L. *Turkish Journal of Biology* **40**: 612-622.
- Stagnari F., Galieni A., Pisante M. (2016): Drought stress effects on crop quality. U: Ahmad P. (ur.) *Water stress and crop plants*. New York, John Wiley & Sons, Inc., 375-392.
- Striker G.G. (2012): Flooding stress on plants: anatomical, morphological and physiological responses. U: Mworio J. (ur.) *Botany*. IntechOpen.
- Sumanta N., Haque C. I., Nishika J., Suprakash R. (2014): Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Research Journal of Chemical Sciences* **4**: 63-69.
- Suzuki N., Rivero R. M., Shulaev V., Blumwald E., Mittler R. (2014): Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist* **203**: 32–43.
- Šircelj H., Batič F., Štampar F. (1999): Effects of drought stress on pigment, ascorbic acid and free amino acids content in leaves of two apple tree cultivars. *Phyton: "Plant Physiology"* **39**: 97-100.
- Šola I., Vujčić Bok V., Dujmović M., Rusak G. (2020): Developmentally-related changes in phenolic and L-ascorbic acid content and antioxidant capacity of Chinese cabbage sprouts. *Journal of Food Science and Technology* **57**: 702–712.
- Tahkokorpi M. (2010): Anthocyanins under drought and drought-related stresses in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). University of Oulu, Faculty of Science, Department of Biology. Doctoral Dissertation.
- Tanaka R., Kobayashi K., Masuda T. (2011): Tetrapyrrole metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book* **9**.
- Tanaka Y., Sasaki N., Ohmiya A. (2008): Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* **54**: 733–749.
- Taofiq O., González-Paramás A. M., Filomena Barreiro M., Ferreira I. C. (2017): Hydroxycinnamic acids and their derivatives: cosmeceutical significance, challenges and future perspectives. *Molecules* **22**: 281-305.
- Tharayil N., Suseela V., Triebwasser D. J., Preston C. M., Gerard P. D., Dukes J. S. (2011): Changes in the structural composition and reactivity of *Acer rubrum* leaf litter tannins exposed to warming and altered precipitation: climatic stress-induced tannins are more reactive. *New Phytologist* **191**: 132–145.

- Top S. M., Preston C. M., Dukes J. S., Tharayil N. (2017): Climate influences the content and chemical composition of foliar tannins in green and senesced tissues of *Quercus rubra*. *Frontiers in Plant Science* **8**: 423.
- Tsao R. (2010): Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2**: 1231-1246.
- Venkatesh J., Park S. W. (2014): Role of *L*-ascorbate in alleviating abiotic stresses in crop plants. *Botanical Studies* **55**: 38.
- Vinholes J., Silva B. M., Silva L. R. (2015): Hydroxycinnamic acids (HCAS): structure, biological properties and health effects. *Advances in Medicine and Biology* **88**.
- Wang J., Sun H., Sheng J., Jin S., Zhou F., Hu Z., Diao Y. (2019): Transcriptome, physiological and biochemical analysis of *Triarrhena sacchariflora* in response to flooding stress. *BMC Genetics* **20**: 88.
- Wang T., Zou Q., Guo Q., Yang F., Wu L., Zhang W. (2019): Widely targeted metabolomics analysis reveals the effect of flooding stress on the synthesis of flavonoids in *Chrysanthemum morifolium*. *Molecules* **2**: 3695.
- Weidner S., Karolak M., Karamać M., Kosínska A., Amarowicz R. (2009): Phenolic compounds and properties of antioxidants in grapevine roots (*Vitis vinifera* L.) under drought stress followed by recovery. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **78**: 97-103.
- Yan B., Dai Q., Liu X., Huang S., Wang Z. (1996): Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. *Plant and Soil* **179**: 261-268.
- Yang L., Wen K. S., Ruan X., Zhao Y. X., Wei F., Wang Q. (2018): Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules* **23**: 762.
- Yordanova R., Yordanova<sup>1</sup>, Christov K. N., Popova L. P. (2004): Antioxidative enzymes in barley plants subjected to soil flooding. *Environmental and Experimental Botany* **51**: 93–101.
- Zhang L. H., Shao H. B., Ye G. F., Lin Y. M. (2012): Effects of fertilization and drought stress on tannin biosynthesis of *Casuarina equisetifolia* seedlings branchlets. *Acta Physiologiae Plantarum* **34**: 1639–1649.
- Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W. (1999): The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Journal of Food Chemistry* **64**: 555.
- Zhou K., Raffoul J. J. (2012): Potential anticancer properties of grape antioxidants. *Journal of Oncology*.

## 7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 30.06.1994. u Zagrebu. Osnovnu školu Marina Držića završila sam 2009. godine, a potom upisala XVI. Jezičnu gimnaziju u Zagrebu. Nakon završetka gimnazije, 2013. godine sam upisala Preddiplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu. Zvanje Sveučilišne prvostupnice biologije (univ. bacc. biol.) stekla sam 2017. godine. Iste godine sam upisala Diplomski studij eksperimentalne biologije, smjer botanika. Drugu godinu diplomskog studija sam u sklopu Erasmus studentske razmjene provela na Sveučilištu u Beču. Aktivno se služim engleskim i njemačkim, a slobodno vrijeme najradije provodim čitajući i baveći se fizičkim aktivnostima, poput joge, penjanja ili vježbanjem u teretani.