

# Određivanje specijaliziranih metabolita u raštici (*Brassica oleracea* var. *acephala*)

---

Ivanišević, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:735423>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-20**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Petra Ivanišević

Određivanje specijaliziranih metabolita u raštici

(*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

## ZAHVALA

Veliko hvala mojoj mentorici dr. sc. Dunji Šamec na sveobuhvatnoj pomoći i stručnom vodstvu pri izradi i pisanju ovog diplomskog rada, kao i na suradnji, svim savjetima i smjernicama. Također, zahvaljujem na pruženoj prilici za izradu ovog rada.

Zahvaljujem i docentici dr. sc. Ivani Šola, kao suvoditeljici ovog rada, na danim uputama, uloženom trudu i ukazanom povjerenju.

Nadalje, hvala svim mojim kolegama i prijateljima koji su mi godine studiranja učinili ljepšima i zabavnijima.

Za kraj, posebno hvala mojim roditeljima i djedu koji su mi pružali potporu kroz protekle godine, omogućili školovanje i bili uvijek uz mene.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za kemijsku biologiju na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Dunje Šamec u sklopu Unity Through Knowledge Found projekta „Metabolomic and transcriptomic response of kale to low temperature stress“ (12717). Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

## ODREĐIVANJE SPECIJALIZIRANIH METABOLITA U RAŠTICI (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)

Petra Ivanišević

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Raštika (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) je biljka iz porodice kupusnjača bogata specijaliziranim metabolitima s pozitivnim utjecajima na ljudsko zdravlje. U Hrvatskoj nije razvijena komercijalna proizvodnja sjemena te postoji znatna intra- i interpopulacijska varijabilnost. U ovom radu hidroponski je uzgojena raštika čije je sjeme bilo podrijetlom iz Mostara, Vrgorca, Gornje Brele, Pule, Pelješca i od komercijalnog proizvođača *Bejo* te su ispitani klijavost, morfološke karakteristike, sadržaj specijaliziranih metabolita i antioksidacijska aktivnost kako bi se odredilo potencijalne razlike između populacija. Najbolju klijavost i prinos pokazale su populacije iz Mostara i Vrgorca, a najmanju ona s Pelješca. Sadržaj ukupnih polifenola, fenolnih kiselina, glukozinolata i karotenoida nije se statistički značajno razlikovao u uzorcima uzgojenim od različitih proizvođača sjemena. Sadržaj ukupnih flavonoida bio je statistički najviši kod raštike od proizvođača sjemena s Pelješca dok je najvišu antioksidacijsku aktivnost pokazala raštika uzgojena iz sjemena iz Vrgorca. Sve istražene populacije sadrže značajne količine specijaliziranih metabolita na koje podrijetlo sjemena nema značajan utjecaj (osim na sadržaj ukupnih flavonoida i antioksidacijsku aktivnost).

(41 stranica, 22 slika, 6 tablica, 45 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Brassicaceae, hidroponski uzgoj, fitokemikalije, antioksidacijska aktivnost

Voditelj: dr. sc. Dunja Šamec, zn. sur.

Suvoditelj: dr. sc. Ivana Šola, doc.

Ocjenitelji: dr. sc. Ivana Šola, dr. sc. Iva Juranović Cindrić, dr. sc. Mirela Sertić Perić

Rad prihvaćen: 31.listopada 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

### EVALUATION OF SPECIALIZED METABOLITES IN KALE (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)

Petra Ivanišević

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) is a cruciferous plant rich in specialized metabolites with positive effects on human health. There is no commercially available kale seeds in Croatia what results with the considerable intra- and interpopular variability. In the present work, we grown soilless plants from the seeds originated from Mostar, Vrgorac, Gornja Brela, Pula, Pelješac and from only commercial producer *Bejo* in order to determinate the influence of seed origin on germination percentige, morphological characteristics, specialized metabolites level and antioxidant activity. The best germination and yield had populations from Mostar and Vrgorac while the smallest ones has Peljesac. The content of total polyphenols, phenolic acids, glucosinolates and carotenoids did not differ significantly in the samples grown from different seed producers. The content of total flavonoids was the highest in kale from Peljesac while the highest antioxidant activity was shown by kale from Vrgorac seeds. All evaluated populations contain significant amounts of specialized metabolites with health benefites and seed origin mostly did not have significant effect on metabolites level, except slightly on the total flavonoid content and antioxidant activity.

(41 pages, 22 figures, 6 tables, 45 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Key words: Brassicaceae, hydroponic breeding, phytochemicals, antioxidant activity

Supervisor: dr. sc. Dunja Šamec, Res. Assoc.

Cosupervisor: dr. sc. Ivana Šola, Asst. Prof.

Reviewers: dr. sc. Ivana Šola, dr. sc. Iva Juranović Cindrić, dr. sc. Mirela Sertić Perić

Thesis accepted: 31<sup>th</sup> October 2018.

# Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	<b>1</b>
1.1. Kupusnjače (Brassicaceae).....	1
1.2. Raštika ( <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i> ) .....	2
1.3. Specijalizirani biljni metaboliti .....	4
1.4. Specijalizirani metaboliti u raštici .....	5
1.4.1. Glukozinolati .....	6
1.4.2. Polifenoli .....	7
1.4.3. Karotenoidi .....	8
1.5. Cilj istraživanja .....	9
<b>2. Materijali i metode</b> .....	<b>10</b>
2.1. Materijali .....	10
2.2. Oprema i kemikalije .....	10
2.2.1. Oprema .....	10
2.2.2. Kemikalije .....	11
2.3. Metode .....	12
2.3.1. Priprema podloge, sterilizacija sjemena i test klijavosti .....	12
2.3.2. Hidroponski uzgoj .....	13
2.3.3. Sakupljanje materijala i liofilizacija .....	15
2.3.4. Određivanje specijaliziranih metabolita .....	15
2.3.4.1. Polifenolni spojevi .....	15
2.3.4.2. Glukozinolati .....	16
2.3.4.3. Pigmenti: klorofil <i>a</i> i <i>b</i> , ukupni klorofili i ukupni karotenoidi .....	16
2.3.5. Antioksidacijska aktivnost .....	17
2.3.6. Statistička obrada .....	17
<b>3. Rezultati</b> .....	<b>18</b>

3.1. Klijavost .....	18
3.2. Morfološke karakteristike i masa biljaka .....	18
3.3. Polifenolni spojevi.....	20
3.3.1. Ukupni polifenoli.....	20
3.3.2. Ukupni flavonoidi.....	22
3.3.3. Ukupne fenolne kiseline.....	23
3.4. Glukozinolati.....	24
3.5. Pigmenti: klorofil <i>a</i> i <i>b</i> , ukupni klorofili i ukupni karotenoidi.....	25
3.6. Antioksidacijska aktivnost .....	28
3.7. Pearsonov koeficijent korelacije .....	29
<b>4. Rasprava .....</b>	<b>31</b>
4.1. Klijavost, morfološke karakteristike i masa biljaka .....	31
4.2. Specijalizirani metaboliti u raštici .....	32
4.2.1. Polifenolni spojevi .....	32
4.2.2. Glukozinolati .....	33
4.2.3. Pigmenti: klorofil <i>a</i> i <i>b</i> , ukupni klorofili i ukupni karotenoidi .....	33
4.3. Antioksidacijska aktivnost .....	34
<b>5. Zaključak .....</b>	<b>36</b>
<b>6. Literatura .....</b>	<b>37</b>



# 1. Uvod

## 1.1. Kupusnjače (Brassicaceae)

Porodica Brassicaceae, poznata pod nazivom kupusnjače ili krstašice, obuhvaća mnoge gospodarski važne biljne vrste koje se danas uzgajaju u cijelom svijetu prvenstveno zbog dobre prilagodbe različitim klimatskim uvjetima. Porodica kupusnjača obuhvaća oko 338 rodova i 3 709 vrsta koje su rasprostranjene po cijelom svijetu osim na Antarktici (Al-Shehbaz i sur., 2006). Kupusnjače potječu s područja Irano-Turanske regije odakle su se proširile diljem svijeta (Franzke i sur., 2011). Prema sanskrtskim zapisima kupusnjače su korištene u Indiji 3 000 g. pr. Kr. dok su prema drugim izvorima korištene uz obalni dio Europe čak prije 8 000 godina (Al-Shehbaz, 2011). Danas se kupusnjače ponajviše uzgajaju u mediteranskoj Europi, Aziji i Sjevernoj Americi gdje se često koriste u prehrani (Al-Shehbaz, 2011). Komercijalno najznačajniji rod ove porodice je rod *Brassica* koji obuhvaća vrste s dugom poviješću poljoprivrednog uzgoja na svim kontinentima (Chen i sur., 2011). Povrće koje se najčešće uzgaja obuhvaća vrste *Brassica oleracea* i *Brassica rapa* čiji su gotovo svi dijelovi jestivi – lišće, cvat, korijen, stabljika i sjeme dok su kod pojedinih vrsta jestive samo sjemenke (*Brassica nigra*, *Brassica carinata*, *Brassica juncea*) (Šamec i Salopek-Sondi, 2019) (**Tablica 1.**). Prema bazi podataka Američkog udruženja za hranu i poljoprivredu (FAOSTAT-a) (<http://www.fao.org/faostat/en/#home>), uljarice *Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Brassica juncea* i *Brassica carinata* zadovoljavaju 12% svjetske potrebe za jestivim biljnim uljima, a neke od njih koriste se i kao korjenasto ili lisnato povrće. Neke od kupusnjača najčešće korištenih u prehrani su kupus, kelj, raštika, brokule, prokulice, cvjetača, korabica i drugi, a sve pripadaju vrsti *Brassica oleracea* unutar koje se na temelju morfologije i razvojnih oblika dijele u sedam glavnih kultiviranih skupina. *B. oleracea* var. *capitata* (karakterizira ih formiranje glave), *B. oleracea* var. *acephala* (ne formiraju glavu - lisnati kelj i raštika), *B. oleracea* var. *alboglabra* (kineska brokula), *B. oleracea* var. *botrytis* (cvjetača), *B. oleracea* var. *italica* (brokula), *B. oleracea* var. *gemmifera* (prokulica) i *B. oleracea* var. *gongylodes* (korabica) (Rakow, 2004).

**Tablica 1.** Neke od najvažnijih biljaka iz porodice Brassicaeae korištene za prehranu ljudi (Šamec i Salopek-Sondi, 2019)

VRSTA	KULTIVAR (grupa)	HRVATSKO IME	JESTIVI DIO
<i>B. oleracea</i>	var. <i>capitata</i>	kupus	listovi
	var. <i>acephala</i>	kelj, raštika	listovi
	var. <i>alboglabra</i>	kineska brokula, Kai-lan	listovi
	var. <i>gemmifera</i>	prokulice	pupoljci
	var. <i>botrytis</i>	karfiol	cvat
	var. <i>italica</i>	brokula	cvat
<i>B. rapa</i>	ssp. <i>rapa</i>	repa	korijen
<i>B. napus</i>	var. <i>oleifera</i>	uljana repica	sjemenke
<i>B. nigra</i>		crna gorušica	sjemenke
<i>Raphanus sativus</i>		rotkvica	korijen
<i>B. carinata</i>		Etiopski senf	listovi, sjemenke
<i>B. juncea</i>	var. <i>rugosa</i> ili <i>integrifolia</i>	gorušica	listovi
		smeđi indijski senf	sjemenke

Naširoko je poznata upotreba kupusnjača u kulinarstvu, no poznata je i njihova upotreba u tradicionalnoj medicini mnogih kultura diljem svijeta. Epidemiološke studije u posljednjih su nekoliko godina pokazale da ljudi koji u prehrani koriste više kupusnjača imaju manji postotak obolijevanja od malignih i nekih kroničnih bolesti (Šamec i Salopek-Sondi, 2019). Stoga ne čudi veliki interes znanstvenika u posljednjih nekoliko godina za istraživanja o kupusnjačama. Prvenstveno, istraživanja su usmjerena na određivanje komponenata koje pridonose pozitivnim učincima na zdravlje ljudi te na određivanje biološke aktivnosti pojedinih kupusnjača (Šamec i Salopek-Sondi, 2019).

## 1.2. Raštika (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)

Raštika (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) je biljka iz porodice kupusnjača čije su divlje vrste pronađene kao izolirane populacije na atlantskoj obali Španjolske, Francuske i Velike Britanije (Christensen i sur., 2011). Za raštiku se pretpostavlja da potječe iz istočnog Mediterana, a neki zapisi spominju njenu upotrebu prije 2 000 godina (Batelja i sur., 2009). Raštika je zeljasta, dvogodišnja biljka koju karakterizira razgranati i jako razvijeni korijen koji joj omogućava rast i razvoj u različitim vrstama tla. Visina stabljike može varirati, a

najčešće je to 60 – 120 cm što ovisi o nizu čimbenika (područje uzgoja, gnojidba, vrijeme sadnje i slično) (**Slika 1.**). Tradicionalno se uzgaja na manjim parcelama i služi kao hrana ljudima ili životinjama (stariji listovi) (Cartea i sur., 2002).



**Slika 1.** Raštika (preuzeto iz rada Šamec, Urlić i Salopek Sondi, 2018)

Za listove raštike su karakteristične duge peteljke i zelene plojke koje su vrlo dobro razvijene, a na njima su jako izražene žile. Upravo se listovi raštike upotrebljavaju za jelo, a mogu se brati tijekom cijele zime pa sve do ranog proljeća (Ozimec i sur., 2009) jer raštika je biljka koja je otporna na niske temperature. Raštika ima važno mjesto u kulinarstvu i prehrani stanovništva u Europi, Aziji i Americi (Balkaya i Yanmaz, 2005; Velasco i sur., 2007; Lemos i sur., 2011; Batelja i sur., 2009). U Hrvatskoj komercijalni uzgoj raštike nije razvijen te se na priobalnom području Dalmacije, Dalmatinske zagore, Istre i otoka raštika tradicionalno uzgaja kao povrtna kultura (Batelja i sur., 2009). Pošto ne postoji komercijalno dostupno sjeme raštike, uzgoj je karakteriziran razmjenom sjemena među proizvođačima kod kojih je još prisutna jednostavna selekcija bez pravog cilja, a ona je rezultirala velikom intra- i interpopulacijskom varijabilnosti među hrvatskim populacijama raštike. Intrapopulacijska varijabilnost nastaje kao posljedica nepažljivog rukovanja sa sjemenom pri proizvodnji što dovodi do križanja s drugim *Brassica* vrstama, a interpopulacijska varijabilnost je rezultat različitog uzgoja od strane pojedinog poljoprivrednika kao i adaptacije na lokalne uvjete staništa (Batelja i sur., 2009). To može rezultirati različitim morfološkim karakteristikama

listova koji se razlikuju po obliku, boji, intenzitetu kovrčavosti te mjehuravosti na rubu plojke (Batelja i sur., 2009).

Unazad deset godina povrće iz *Brassica oleracea* L. var. *acephala* grupe postalo je iznimno popularno u Sjedinjenim Američkim Državama gdje se prema podacima Američkog ministarstva za poljoprivredu (USDA) od 2007. do 2012. proizvodnja tog povrća udvostručila (USDA, 2012). Povrće iz grupe *acephala* u popularnoj kulturi često se naziva „superhrana“ te mu se pripisuju mnogi pozitivni učinci na zdravlje. Za popularnost i povećanu proizvodnju tog povrća zaslužna je i činjenica da je to povrće, kao i ostale kupusnjače, bogato specijaliziranim metabolitima koji pokazuju pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. Osim toga, ono dobro uspijeva u različitim klimatskim uvjetima i podnosi ekstremne okolišne uvjete kao što su visoke temperature, niske temperature, suša, povećani salinitet i sl. što pojednostavljuje te pojeftinjuje njegovu proizvodnju (Šamec i sur., 2018). U Hrvatskoj, iako se raštika tradicionalno uzgaja već stoljećima te je glavni sastojak nekih tradicionalnih hrvatskih jela, rijetko se može naći u ponudi restorana ili slobodnoj prodaji.

### 1.3. Specijalizirani biljni metaboliti

Pod pojmom biljni metaboliti podrazumijeva se velik broj molekula koje se sintetiziraju u biljci, a odgovorni su za različite funkcije bez kojih biljka ne bi mogla opstati. To su molekule koje biljci omogućuju razvoj, rast, opstanak u nepovoljnim okolišnim uvjetima, ali i komunikaciju s okolinom. Tradicionalna podjela biljnih metabolita jest na primarne i sekundarne. Primarni metaboliti nalaze se u svim biljkama, a obuhvaćaju nukleinske kiseline, masne kiseline, šećere, aminokiseline i sl. Oni omogućavaju odvijanje osnovnih funkcija biljke. Druga skupina je dugi niz godina bila poznata pod nazivom sekundarni biljni metaboliti koji sudjeluju u specijaliziranim funkcijama kao što je interakcija biljaka s okolinom i sl. Međutim, nova istraživanja pokazuju da su upravo ti metaboliti esencijalni za pravilan razvoj biljke i preživljavanje u nepovoljnim uvjetima (Kliebenstein i Osbourn, 2012). Iz tog razloga se naziv sekundarni metaboliti sve rjeđe koristi, već se u novijoj literaturi koristi termin specijalizirani metaboliti kako bi se istaknula njihova važnost za opstanak biljke i njihove specijalizirane funkcije. Za razliku od primarnih metabolita koji su prisutni u svim biljkama, specijalizirani metaboliti sintetiziraju se samo u određenim biljnim rodovima/vrstama/kultivarima i često samo u specifičnim okolišnim uvjetima što pokazuje i njihovu ulogu u interakciji s okolinom. Specijalizirani metaboliti su, između ostalog, odgovorni za specifičnu boju ili miris pojedinih dijelova biljke. Procjenjuje se da u jednoj biljnoj vrsti ima nekoliko tisuća specijaliziranih metabolita, a do danas je ukupno

okarakterizirano preko 200 000 metabolita (Ribera i Zuniga, 2012). Ipak ta se brojka svakim danom povećava, posebice s razvojem novih suvremenijih metoda za njihovu detekciju pa neki noviji izvori govore i o brojcima od 1 000 000 metabolita (Ribera i Zuniga, 2012). Osim važnih uloga u interakciji biljaka s okolinom, upravo su mnogi specijalizirani metaboliti odgovorni za dugogodišnju upotrebu biljaka u tradicionalnoj medicini te je sve više i znanstvenih spoznaja koje podupiru njihov dobar i iznimno pozitivan učinak na zdravlje ljudi. Upravo iz tog razloga, specijalizirani metaboliti poznati su i pod drugim nazivima kao što su bioaktivne komponente ili fitokemikalije. Specijalizirani metaboliti se prema svojoj kemijskoj strukturi dijele u nekoliko skupina, a njihova osnovna podjela prikazana je na **Slici 2**.



**Slika 2.** Podjela specijaliziranih metabolita biljaka

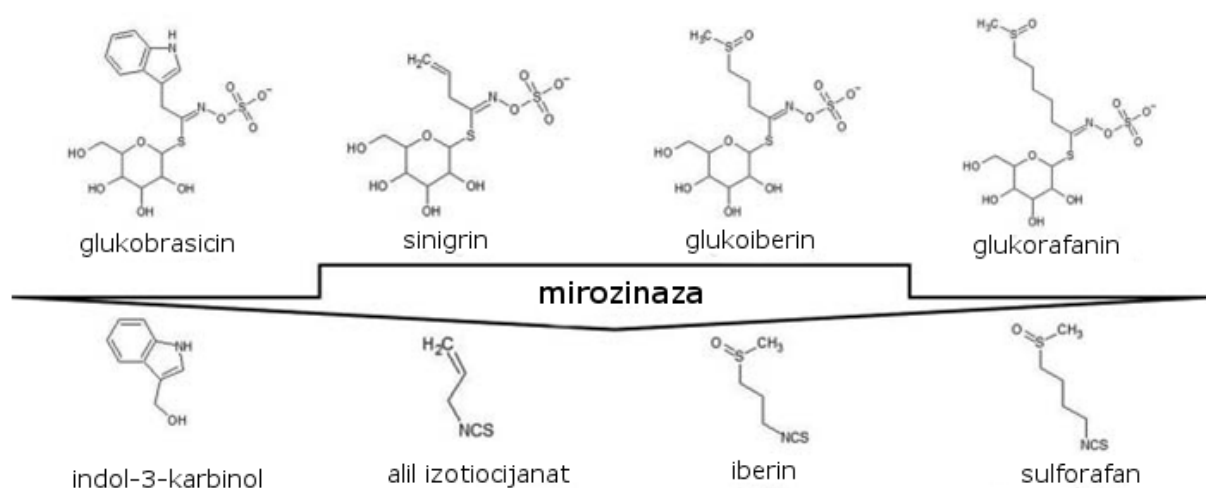
#### 1.4. Specijalizirani metaboliti u raštici

Kao što je već spomenuto, specijalizirani metaboliti imaju mnoge blagotvorne učinke na zdravlje ljudi. Unazad nekoliko godina mnoge epidemiološke studije pokazale su da prehrana bogata kupusnjačama smanjuje rizik od obolijevanja mnogih vrsta karcinoma te se takva djelovanja povezuju s prisutnošću specijaliziranih metabolita iz skupine glukozinolata, polifenola i karotenoida (sumirano u odlomku Šamec i Salopek-Sondi, 2019). Osim antikancerogenog učinka, navedeni specijalizirani metaboliti imaju i antioksidacijsko

djelovanje te pozitivno utječu na kardiovaskularni i gastrointestinalni trakt (Šamec, Urlić i Salopek Sondi, 2018).

#### 1.4.1. Glukozinolati

Glukozinolati su spojevi koji u svojoj strukturi sadrže sumpor, a pronađeni su u svim biljkama roda *Brassica* i upravo se njih povezuje sa zdravstvenim prednostima povrća iz ovog roda. Karakterizira ih jezgra koja se sastoji od sulfatirane izotiocijanatne skupine povezane tioglukozom, a daljnje modifikacije jezgrene strukture (vezanjem različitih lančanih skupina) rezultiraju velikom raznolikošću glukozinolata (Vaughn i Berhow, 2005; Cartea i Valesco, 2008). Danas je poznato oko 200 različitih glukozinolata koji se dijele na alifatske, aromatske i indolske, a njihova prisutnost u različitim vrstama roda *Brassica* je genetski unaprijed određena (Fahey i sur., 2013). Svaka pojedina vrsta sadrži više od deset različitih glukozinolata od čega 3 – 4 prevladavaju (Fahey i sur., 2013). Dokazano je da se omjer indolnih i alifatskih glukozinolata razlikuje u uzorcima s različitih mjesta pa osim genetskih faktora na njihovu prisutnost utječu i okolišni čimbenici (Šamec i Salopek-Sondi, 2019). U uzorcima raštike najčešće detektirani glukozinolati su glukobrasicin, glukoiberin, sinigrin i glukorafanin (**Slika 3.**) (Šamec, Urlić i Salopek-Sondi, 2018).



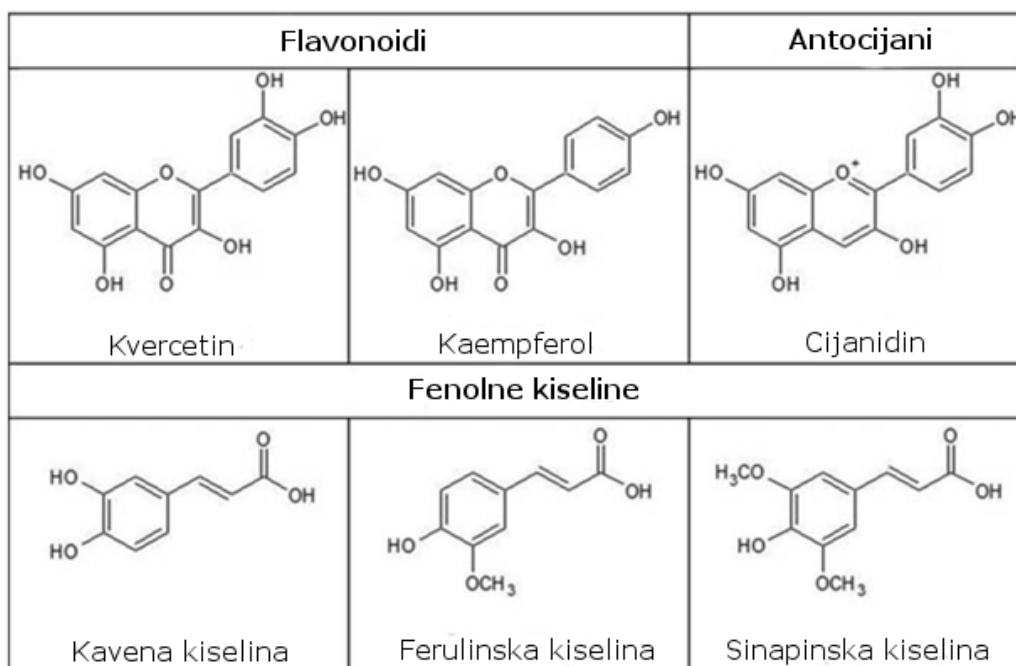
**Slika 3.** Najčešći glukozinolati u raštici te njihovi produkti hidrolize (prilagođeno i preuzeto iz rada, Šamec, Urlić i Salopek-Sondi, 2018)

Glukozinolati postaju biološki aktivni tek nakon hidrolize koja se odvija uz pomoć enzima mirozinaze te se upravo produkti hidrolize glukozinolata povezuju s pozitivnim učincima na zdravlje. Produkt hidrolize sinigrina, alil izotiocijanat, povezuje se s protuupalnim

djelovanjem (Mazumder, Dwivedi i Plessis, 2016) dok produkt hidrolize glukorafanina, sulforafan, smanjuje rizik od različitih vrsta raka, dijabetesa, ateroskleroze i respiratornih bolesti. (Elbarbry i Elrody, 2011).

#### 1.4.2. Polifenoli

Polifenoli su do sada najbolje istražena skupina specijaliziranih biljnih metabolita. To su spojevi koji se pojavljuju u svim biljnim vrstama, a u različitim biljnim vrstama identificirano je više od 8 000 polifenolnih spojeva (Pandey i Rizvi, 2009). Najviše istražena skupina polifenola su flavonoidi, a identificirano je više od 4 000 vrsta flavonoida od kojih su mnogi odgovorni za atraktivne boje cvjetova, voća i lišća. Prema varijacijama u strukturi, flavonoidi se mogu podijeliti u šest podskupina: flavonoli, flavoni, flavanoni, flavanoli, antocijani i izoflavoni (Pandey i Rizvi, 2009). Fenolne kiseline predstavljaju veliku skupinu fenolnih spojeva široko rasprostranjenih u biljkama. Izvedene su iz benzojeve i cimetine kiseline te se također povezuju s brojnim pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje, a mogu imati utjecaja i na organoleptička svojstva biljne hrane (Gruz, Novak i Strnad, 2008). Veliko je značenje polifenola i za ljude jer brojne epidemiološke studije upućuju na to da dugotrajna konzumacija hrane bogate polifenolima pruža zaštitu u prevenciji karcinoma, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa i osteoporoze. Polifenoli, zajedno s ostalim spojevima u biljkama iz roda *Brassica*, značajno doprinose biološkoj aktivnosti tih biljaka (Šamec i sur., 2011; Šamec, Pavlović i Salopek-Sondi, 2017). Njihova razina u raštici ovisi o fazi rasta, lokaciji staništa i uvjetima okoliša. Dominantni i najprisutniji flavonoidi u raštici su kvercetin i kaempferol, najčešće fenolne kiseline su kavena, ferulinska i sinapinska dok je od antocijana često prisutan cijanidin i njegovi derivati (Šamec, Urlić i Salopek-Sondi, 2018) (**Slika 4.**).



**Slika 4.** Najčešći polifenolni spojevi u rašici (prilagođeno i preuzeto iz rada Šamec, Urlić, Salopek-Sondi, 2018)

#### 1.4.3. Karotenoidi

Karotenoidi su drugi najzastupljeniji prirodni pigmenti na zemlji, a sintetiziraju se u svim fotosintetskim organizmima. S obzirom na strukturu, to su uglavnom terpenoidi s 40 C atoma (Nisar i sur., 2015). Razlikuju se primarni i sekundarni karotenoidi, a glavna razlika je u tome što se primarni nalaze u dijelovima biljki koji obavljaju fotosintezu dok su sekundarni odgovorni npr. za boju cvjetova i plodova (Lichtenthaler, 1987). Karotenoidi, osim u fotosintezi, sudjeluju i u mnogim drugim biološkim procesima u biljci (npr. fotomorfogenezi), a imaju važnu ulogu i u razvoju biljke. Postoje različiti karotenoidi (bezbojni, žuti, narančasti, crveni), a upravo se to odražava u boji mnogih plodova, cvijeća i povrća. Neki od najpoznatijih svima dobro poznatih primjera su  $\beta$ -karoten u mrkvi i likopen u rajčici (Nisar i sur., 2015). Kupusnjače su također dobar izvor  $\beta$ -karotena (provitamin A) i luteina koji su zajedno sa zeaksantinom zbog jake oksidativne aktivnosti važni za očuvanje dobrog vida kod ljudi (Manikandan i sur., 2016). Alfa karoten kao prekursor vitamina A također je prisutan u kupusnjačama, a važan je za zdravlje kostiju, lijepu i zdravu kožu te doprinosi radu gastrointestinalnog i respiratornog sustava. Najzastupljeniji karotenoidi u rašici su lutein,  $\beta$ -karoten, violaksantin i neoksantin (Azevedo i Rodriguez-Amaya, 2005), a prema novijim istraživanjima prisutni su i 13-cis- $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten, 9-cis- $\beta$ -karoten i likopen (Jeon i sur., 2018). Prisutnost određene količine karotenoida u biljkama ovisi o različitim okolišnim



čimbenicima tijekom faze razvoja i zrelosti bijaka (Azevedo i Rodriguez-Amaya, 2005; Lefsrud i sur., 2007).

### 1.5. Cilj istraživanja

U Hrvatskoj komercijalna proizvodnja sjemena raštike nije razvijena te među hrvatskim populacijama postoji znatna intra- i interpopulacijska varijabilnost koja može rezultirati fenotipskim razlikama, ali i razlikama u sastavu specijaliziranih metabolita ili fitokemikalija. U posljednjih nekoliko godina kupusnjače iz grupe *acephala* u središtu su pozornosti zbog pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje. Najvažnije grupe fitokemikalija u raštici koje se povezuju s tim učinkom su polifenoli, karotenoidi i glukozinolati pa postoje težnje da se i u Hrvatskoj raštika popularizira kao tradicionalna kultura s mogućim pozitivnim učincima na zdravlje. Međutim, zbog intra- i interpopulacijske varijabilnosti nije poznato koliko podrijetlo sjemena utječe na sadržaj glavnih fitokemikalija - polifenola, glukozinolata i karotenoida pa je cilj ovog rada utvrditi utjecaj podrijetla sjemena na razinu navedenih fitokemikalija. Kako bi se ispitaio utjecaj podrijetla sjemena, raštika je uzgojena hidroponski iz sjemena različitih proizvođača iz Hrvatske (Pula, Vrgorac, Pelješac, Gornja Brela), Bosne i Hercegovine (Mostar) te od komercijalnog proizvođača (*Bejo Zaden*). Hidroponski uzgoj u specijaliziranoj komori omogućuje potpunu kontrolu okolišnih uvijeta koji su za sve uzorke potpuno jednaki kako bi se ispitaio samo utjecaj podrijetla sjemena. Uz hidroponski uzgoj raštike, cilj rada je i odrediti potencijalne fenotipske razlike, razinu glavnih grupa specijaliziranih metabolita (polifenola, glukozinolata i karotenoida), pigmentata i antioksidacijsku aktivnost.

## 2. Materijali i metode

### 2.1. Materijali

Sjemenke raštike pribavljene su iz različitih dijelova Hrvatske – Pule, Vrgorca, Gornje Brele, s Pelješca te područja Bosne i Hercegovine – Mostara (**Slika 5.**). Također, u analizi su korištene i sjemenke na tržištu jedinog (do 2017., sada niti to sjeme više nije dostupno) komercijalnog proizvođača sjemenki raštike *Bejo Zaden*. Sve sjemenke su pribavljene početkom siječnja 2018. godine. Do početka sadnje sjemenke su čuvane u vrećicama u hladnjaku, a izbor sjemenki za sadnju bio je nasumičan.



**Slika 5.** Područja iz kojih su pribavljene sjemenke raštike

### 2.2. Oprema i kemikalije

#### 2.2.1. Oprema

Pribor korišten za uzgoj biljaka na agaroznom gelu steriliziran je u autoklavu, a nasađivanje sjemenki na agarozni gel radilo se u sterilnim uvjetima u laminaru.

Hidroponski uzgoj rađen je u sustavu koji se sastojao od plastične posude, poklopaca odgovarajuće veličine s izbušenim rupama, male plastične čaše s probušenim dnom i pumpe.

Za ekstrakcije i određivanje razine specijaliziranih metabolita korišteni su sljedeći pribor i uređaji:

- liofilizator, LYOVAC GT 2
- mikser visoke frekvencije, MM 400
- centrifuga, Centrifuge 5424 R
- spektrofotometar, BioSpec-1601 E (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)
- termoblok, Bio TDB-100
- rotirajuća miješalica, Bio RS-24
- miješalica (Vortex), EV-102
- magnetska miješalica s vrućom pločom, MSH-300
- analitička vaga
- ultrazvučna kupelj
- pipete različitih veličina
- plastične i staklene čaše
- menzure
- pinceta
- Eppendorf epruvete
- Falcon epruvete
- stalci za Eppendorf epruvete

### 2.2.2. Kemikalije

Korištene kemikalije:

- 3% -tni izosan, Izosane – G (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- hranjiva za biljke: FloraGro; hranjivo EC – NPK 3-1-6

FloraMicro; hranjivo EC – NPK 5-0-1

FloraBloom; hranjivo EC – NPK 0-5-4

- tekući dušik
- 80% -tni metanol, CH<sub>3</sub>OH (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- galna kiselina, C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub> (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- etanol, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- fenol, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev karbonat (zasićena otopina),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- otopina natrijeva nitrita (1:20),  $\text{NaNO}_2$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- otopina aluminijeva klorida (1:10),  $\text{AlCl}_3$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- natrijev hidroksid ( $c=1 \text{ mol/dm}^3$ ),  $\text{NaOH}$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- katehin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Arnovov reagens (svježe pripremljen)
- klorovodična kiselina ( $c=0,5 \text{ mol/dm}^3$ ),  $\text{HCl}$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kavena kiselina,  $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- 80% -tni aceton,  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), ( $c=0,094 \text{ mmol/dm}^3$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- reagens Paladium (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)

## 2.3. Metode

### 2.3.1. Priprema podloge, sterilizacija sjemena i test klijavosti

*Priprema podloge:* Test klijavosti rađen je na 1% -tnoj agaroznoj podlozi. Za pripremu podloge otopljeno je 5 g agara u 500 mL redestilirane vode te je otopina sterilizirana u autoklavu 20 minuta na 120 °C. Još vruća otopina razlivena je, u laminaru u sterilnim uvjetima, u okrugle Petrijeve zdjelice. Petrijeve zdjelice s podlogom, nakon hlađenja, čuvane su u hladnjaku na +4 °C do upotrebe, najviše 7 dana.

*Sterilizacija sjemena:* Nasumično odabrane sjemenke stavljene su u zasebne plastične epruvete volumena 2 mL. Zatim je u svaku dodano po 1 mL 3% -tnog izosana (Izosane – G) i potom su epruvete stavljene u miješalicu 10 minuta na 300 rpm. Nakon toga epruvete su prenesene u laminar te isprane tri puta steriliziranom destiliranom vodom kako bi se uklonili ostaci izosana.

*Test klijavosti:* U laminaru, sjemenke su pomoću sterilizirane pincete stavljene na agarozni gel u Petrijevim zdjelicama tako da u svakoj zdjelici bude po 20 sjemenki. Označene Petrijeve zdjelice stavljene su potom u hladnjak na 48h nakon čega su prebačene na svijetlo u komoru

na +21 °C na fotoperiod 16h dan, 8h noć. Nakon dodatna tri dana na svjetlu, prebrojane su proklijale i ne proklijale sjemenke te je izražen postotak klijavosti prema formuli: (broj proklijalih sjemenki/ukupan broj sjemenki) • 100.

### 2.3.2. Hidroponski uzgoj

Priprema za hidroponski uzgoj:




U velike plastične posude nalivena je destilirana voda te su posude prekrivene neprozirnim poklopcima s odgovarajućim rupama. U svaku posudu uronjena je pumpa za aeraciju. U plastične čaše kojima su prethodno pomoću plamenika i staklenog štapića probušene rupe na dnu, pincetom su prebačeni klijanci s agarozne podloge tako da korijen viri van (jedan klijanac – jedna čašica). Čašice su bile uronjene u posudu s vodom tako da korijen bude u vodi (**Slika 6.**).



**Slika 6.** Prikaz hidroponskog uzgoja raštike

Biljke su uzgajane u komori na +21 °C u fotoperiodu 16h dan te 8h noć. Odmah nakon postavljanja hidroponskog uzgoja i zatim jednom tjedno, biljke su prihranjivane s 1,4 mL hranjiva A, B i C (**Tablica 2.**).

**Tablica 2.** Sastav hranjiva korištenih u hidroponskom uzgoju raštike u sklopu ovog rada

A	B	C
FloraGro; hranjivo EC – NPK 3-1-6	FloraMicro; hranjivo EC – NPK 5-0-1	FloraBloom; hranjivo EC – NPK 0-5-4
		
Ukupni dušik (N) 3% Amonijski dušik 1% Nitratni dušik 2% Oslobodeni fosfor pentoksid (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) 1% Topljivi kalijev oksid (K <sub>2</sub> O) 6% Topljivi magnezij (MgO) 0,8%	Ukupni dušik (N) 5% Amonijski dušik 1,5% Nitratni dušik 3,5% Topljivi kalijev oksid (K <sub>2</sub> O) 1,3% Bor (B) 0,01% Kalcijev oksid (CaO) 1,4% Bakar (Cu) kelat EDTA 0,01% Željezni (Fe) kelat EDDHA - 11% DPTA 0,12% Mangan (Mn) kelat EDTA 0,05% Molibden (Mo) 0,002% Cink (Zn) kelat EDTA 0,015%	Oslobodeni fosfor pentoksid (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) 5% Topljivi kalijev oksid (K <sub>2</sub> O) 4% Topljivi magnezij (MgO) 3% Topljivi sumpor trioksid (SO <sub>4</sub> ) 5%

### 2.3.3. Sakupljanje materijala i liofilizacija

Nakon 28 dana rasta u hidroponskom uzgoju biljke su pažljivo izvađene iz sustava za uzgoj, zabilježene su im morfološke karakteristike prema radu Batelja i sur. (2009), izvagan je nadzemni dio te su nakon toga biljke zamrznute u tekućem dušiku i čuvane na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do liofilizacije. Smrznuti materijal stavljen je na liofilizaciju u uređaj LYOVAC GT 2 te je do potpunog sušenja trebalo sedam dana. Nakon liofilizacije biljke su usitnjene u prah u tekućem dušiku i uzorci su čuvani na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analize.

### 2.3.4. Određivanje specijaliziranih metabolita

#### 2.3.4.1. Polifenolni spojevi

*Ekstrakcija:* Nakon usitnjavanja osušenog biljnog materijala u prah, odvagano je po 60 mg uzoraka u epruvete volumena 2 mL te je u svaku dodano po 2 mL 80% -tnog metanola i sadržaj u epruvetama je kratko (tri sekunde) homogeniziran na miješalici. Nakon toga, uzorci su dodatno homogenizirani u mikseru visoke frekvencije na 400 Hz (dvije minute). Nadalje, ekstrakcija je vršena uz pomoć ultrazvučne kupelji (osam minuta) te rotacijskog homogenizatora (miješalice) (45 minuta) brzinom okretaja 15 rpm. Potom su uzorci centrifugirani pet minuta na 14 000 rpm nakon čega je supernatant odvojen od taloga. Ekstrakcija je rađena za šest bioloških replika. Uzorci su čuvani u mraku na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analize i korišteni su za određivanje antioksidacijske aktivnosti i polifenolnih komponenti spektrofotometrijskim metodama.

*Ukupni polifenoli:* Za određivanje ukupnih polifenola korištena je modificirana metoda po Folin-Ciocalteu (Slinkard i Singleton, 1977). U plastične kivete dodano je po 1,58 mL destilirane vode, 20  $\mu\text{L}$  ekstrakta (uzorka) i 100  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa te je sve dobro promiješano. Zatim je dodano 300  $\mu\text{L}$  zasićene otopine natrijeva karbonata i ponovno dobro promiješano. Za slijepu probu korišten je 80% -tni metanol. Nakon dva sata u mraku mjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm s obzirom na slijepu probu. Otopina galne kiseline (0 – 1200 mg/L) korištena je za izradu baždarne krivulje.

*Ukupni flavonoidi:* Za određivanje ukupnih flavonoida korištena je metoda s aluminijskim kloridom (Zhishen i sur., 1999) s malim modifikacijama. U kivete je dodano po 800  $\mu\text{L}$  destilirane vode i 200  $\mu\text{L}$  uzorka. Potom je dodano 60  $\mu\text{L}$  natrijeva nitrata (1:20), a nakon pet minuta i 60  $\mu\text{L}$  aluminijska klorida (1:10). Nakon dodatnih šest minuta dodano je 400  $\mu\text{L}$  1 M

otopine natrijeva hidroksida te 480  $\mu\text{L}$  destilirane vode kako bi ukupni volumen bio 2 mL. Sve kivete su dobro promiješane. Potom je mjerena apsorbanacija pri valnoj duljini od 510 nm. Za pripremu slijepe probe korišten je 80% -tni metanol, a za pripremu baždarne krivulje katehin u koncentraciji 0 – 300 mg/L.

*Fenolne kiseline:* Za određivanje fenolnih kiselina korištena je metoda prema European Pharmacopoeia (2004). Na početku je pripremljen Arnovov reagens na način da je u 10 mL destilirane vodi otopljeno 1 g  $\text{NaNO}_2$  i 1,17 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Potom je u kivete redom dodano po 300  $\mu\text{L}$  destilirane vode, 300  $\mu\text{L}$  uzorka, 100  $\mu\text{L}$  0,5 M HCl i 100  $\mu\text{L}$  Arnovova reagensa. Kivete su protresene te je dodano po 100  $\mu\text{L}$  1 M natrijeve lužine (NaOH) i 100  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Apsoorbancija je mjerena na 490 nm, a otopina kavene kiseline (10 – 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) je korištena za izradu baždarne krivulje.

#### 2.3.4.2. Glukozinolati

U plastične epruvete odvagano je po 30 mg svakog uzorka i potom u svaku od njih dodano po 1 mL 80% -tnog metanola te su nakon toga epruvete stavljene u termoblok (pet minuta) na temperaturu od +90 °C kako bi se inaktivirala mirozinaza. Nakon toga uzorci su ohlađeni u ledu, centrifugirani na 3 000 rpm (tri minute) te je supernatant odpipetiran u nove epruvete. Određivanje glukozinolata bazirano je na metodi s natrij-tetraklorpaladijumom (Aghajanzadeh i sur., 2014). U kivete je dodano po 30  $\mu\text{L}$  ekstrakta i 900  $\mu\text{L}$  reagensa dobivenog otapanjem 58,8 mg  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  i 170  $\mu\text{L}$  HCl u 100 mL vode. Nakon 60 minuta, apsorbanacija je mjerena na 425 nm pri čemu je za izradu baždarne krivulje korišten sinigrin (0 – 300 mg/L).

#### 2.3.4.3 Pigmenti: klorofil *a* i *b*, ukupni klorofili i ukupni karotenoidi

Po 10 mg uzoraka odvagano je u epruvete od 2 mL te je u svaku dodano po 2 mL 80% -tnog acetona. Uzorci su homogenizirani u mikseru visoke frekvencije (tri minute) na frekvenciji od 400 Hz, potom centrifugirani te je zatim supernatant odpipetiran u nove epruvete. Talog je još jednom, na isti način, re-ekstrahiran 80% -tnim acetonom te su supernatanti spojeni. Apsoorbancija svakog uzorka mjerena je pri valnim duljinama od 470 nm, 646,8 nm i 663,2 nm u odnosu na slijepu probu (80% -tni aceton), a količina fotosintetskih pigmenata (klorofila *a* i *b* ( $c_a$ ,  $c_b$ ), ukupnih klorofila ( $c_a+c_b$ ) i karotenoida ( $c_{(x+c)}$ ) izračunata je prema metodi Lichtenthaler i Buschmann (2001).



Formule za izračunavanje:

$$c_a = 12,25A_{663,2} - 2,79A_{646,8} [\mu\text{g/ml}]$$

$$c_b = 21,50A_{646,8} - 5,10A_{663,2} [\mu\text{g/ml}]$$

$$(\text{ukupni klorofil}) = c_a + c_b [\mu\text{g/ml}]$$

$$c_{(x+c)} = (1000A_{470} - 1,82c_a - 85,02c_b)/198 [\mu\text{g/ml}]$$

### 2.3.5. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidacijska aktivnost određena je prema Brand-Williams metodi (1995) koja se temelji na redukciji DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala antioksidansima prisutnim u uzorcima. U obliku radikala, DPPH apsorbira na 515 nm, ali nakon redukcije antioksidansom apsorbancija izostaje tj. otopina s vremenom mijenja boju od ljubičaste do žute. Za reakciju, po 20  $\mu\text{L}$  uzorka pomiješano je s 980  $\mu\text{L}$  svježe pripremljenog 0,0094 mmol/L DPPH otopljenog u metanolu te je nakon 30 minuta mjerena apsorbancija na 511 nm. Za izradu baždarne krivulje korištena je otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) (0 – 0,5 mM).

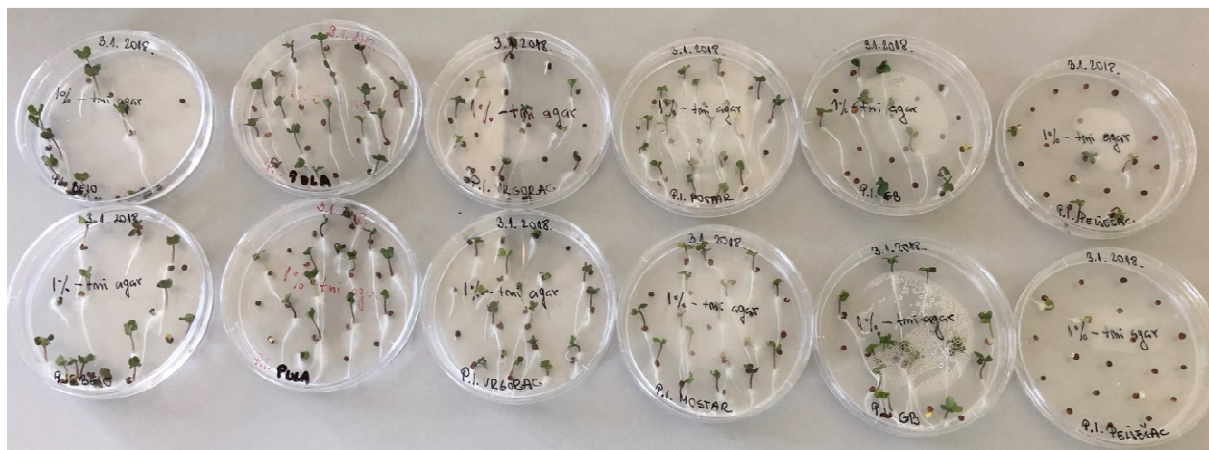
### 2.3.6. Statistička obrada podataka

Sva mjerenja provedena su na šest bioloških replika svake populacije, a ukupan broj uzoraka je bio 36 (šest različitih populacija po šest bioloških replika). Statistička obrada provedena je u Microsoft Office Excel 2007 programu s nadogradnjom XLStat. Usporedba je provedena pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA) i primjenom Tukey testa, tj. post-hoc testa višestrukih usporedbi. Statistički značajnim smatrane su vrijednosti koje se razlikuju na razini  $p < 0,05$  te su statistički značajno različiti uzorci označeni različitim slovima (a, b, c...). Također, izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije za parametre specijaliziranih metabolita, pigmenata i antioksidacijske aktivnosti.

### 3. Rezultati

#### 3.1. Klijavost

**Slika 7.** prikazuje sjemenke raštike na 1% -tnom agaru nakon pet dana (dva dana na +4 °C i tri dana na +21 °C).



**Slika 7.** Klijanci raštike uzgojeni na hranjivom mediju

Postotak klijavosti pet dana nakon stavljanja na 1% -tni agar (dva dana na +4 °C i još tri dana na svjetlu na +21 °C) prikazan je u **Tablici 3.** Najbolju klijavost pokazivalo je sjeme od proizvođača iz Mostara (90%), a zatim je slijedilo sjeme iz Pule i Vrgorca. Najnižu klijavost, od samo 25% pokazivalo je sjeme s Pelješca.

**Tablica 3.** Postotak (%) klijavosti sjemena različitih proizvođača

	Klijavost / %
BEJO	65
PELJEŠAC	25
VRGORAC	85
PULA	83
GORNJA BRELA	65
MOSTAR	90

#### 3.2. Morfološke karakteristike i masa biljaka

Na **Slici 8.** prikazane su biljke stare 28 dana, uzgojene hidroponski iz sjemena različitog podrijetla.

BEJO



PELJEŠAC



VRGORAC



PULA



GORNJA BRELA



MOSTAR



**Slika 8.** Fenotip biljaka raštike nakon 28 dana hidroponskog uzgoja

Svi listovi, biljaka uzgojenih iz različitog sjemena, bili su u obliku lire, zelene boje bez obojenosti ili kovrčavosti lista. Listovi su se razlikovali po veličini te su najveći primijećeni kod biljaka uzgojenih iz sjemena iz Gornje Brele dok su najmanji bili oni iz sjemena s Pelješca. Kod uzoraka s Pelješca primijećene su i dulje lisne peteljke u usporedbi s ostalim uzorcima. Po šest biljaka je izvagano i masa nadzemnog dijela prikazana je u **Tablici 4**.

**Tablica 4.** Srednja vrijednost te minimalna i maksimalna vrijednost mase nadzemnog dijela biljaka

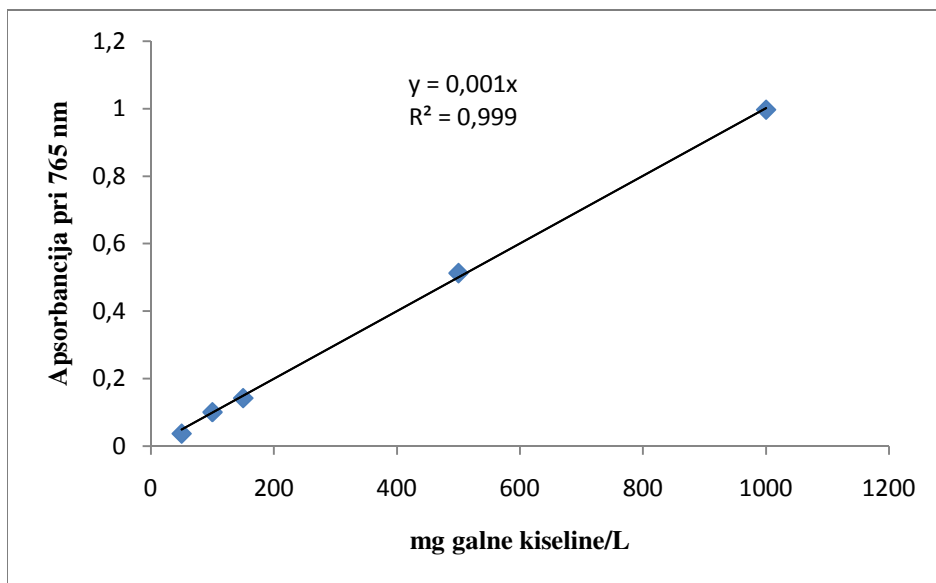
	srednja vrijednost mase (g)	minimalna masa (g)	maksimalna masa (g)
<i>BEJO</i>	9,60±2,93 <sup>bc</sup>	6,45	13,29
PELJEŠAC	3,45±1,56 <sup>a</sup>	1,96	5,49
VRGORAC	7,16±1,86 <sup>ab</sup>	5,10	10,12
PULA	5,77±4,06 <sup>ab</sup>	2,59	13,82
GORNJA BRELA	9,04±2,74 <sup>bc</sup>	6,16	14,17
MOSTAR	11,74±4,20 <sup>c</sup>	6,67	17,15

Najvišu srednju vrijednost mase nadzemnog dijela biljaka pokazivale su biljke uzgojene iz sjemena podrijetlom iz Mostara (11,74±4,20 g) dok su najnižu, gotovo tri i pol puta nižu srednju vrijednost mase imale biljke uzgojene iz sjemena podrijetlom s Pelješca. Zanimljivo je da biljka uzgojena iz sjemena s Pelješca koja ima maksimalnu masu (5,49 g) ima nižu masu nego biljke s najnižom masom uzgojene iz sjemena iz Mostara ili od proizvođača *Bejo* što upućuje na puno niži prinos.

### 3.3. Polifenolni spojevi

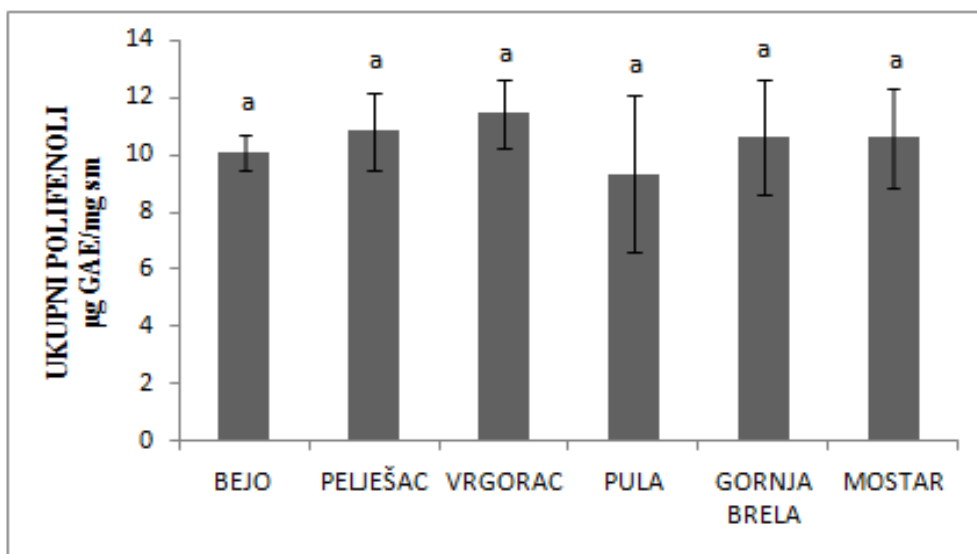
#### 3.3.1. Ukupni polifenoli

Za izradu baždarnog pravca korištena je galna kiselina (0 – 1200 mg/L), a baždarni pravac prikazan je na **Slici 8**.



**Slika 8.** Baždarni pravac galne kiseline korišten za određivanje ukupnih polifenola

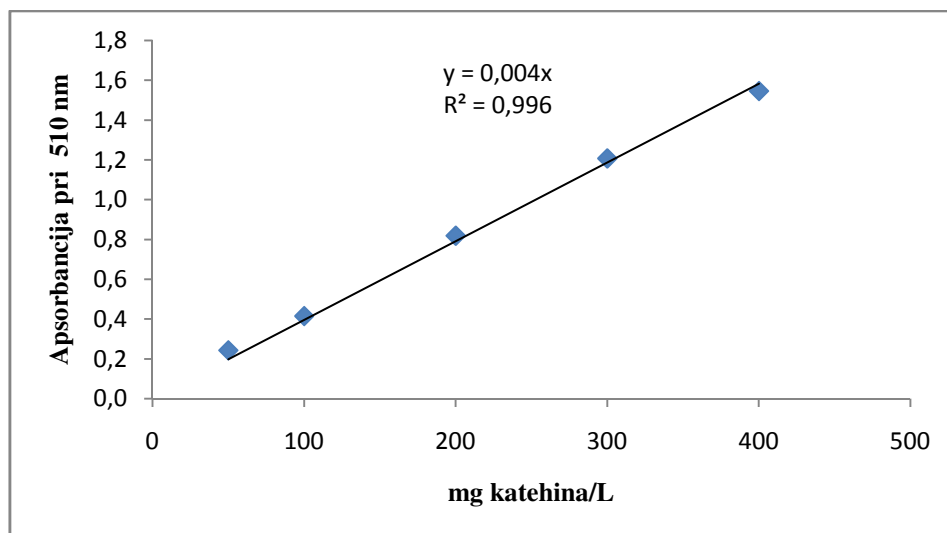
Sadržaj ukupnih polifenola izražen po miligramu suhog tkiva prikazan je na **Slici 9**. Stupci prikazuju srednju vrijednost šest bioloških replika iz određenog područja i njima odgovarajuću standardnu devijaciju. Sadržaj ukupnih polifenola u uzorcima kretao se od  $9,34 \pm 2,72$  mikrograma ekvivalenta galne kiseline po miligramu suhe mase ( $\mu\text{g GAE}/\text{mg sm}$ ) (uzorak Pula) do  $11,44 \pm 1,21$   $\mu\text{g GAE}/\text{mg sm}$  (uzorak Vrgorac) i sadržaj se nije značajno razlikovao u uzorcima uzgojenih iz sjemena različitih proizvođača. Srednja vrijednost za sadržaj ukupnih polifenola za sve uzorke iznosila je  $10,5$   $\mu\text{g GAE}/\text{mg sm}$ .



**Slika 9.** Sadržaj ukupnih polifenola. GAE – ekvivalent galne kiseline, sm – suha masa

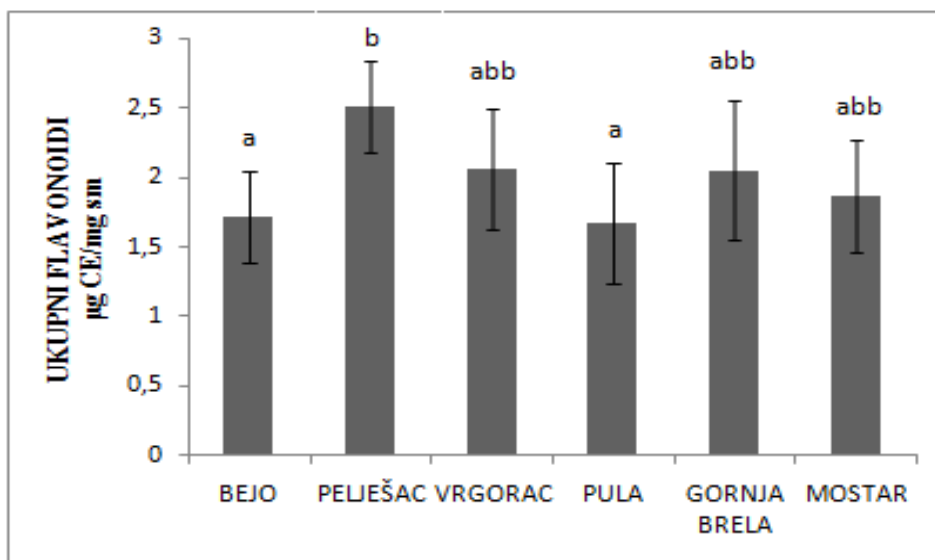
### 3.3.2. Ukupni flavonoidi

Za izradu baždarnog pravca za određivanje ukupnih flavonoida korišten je katehin u koncentraciji 0 – 300 mg/L, a pravac je prikazan na **Slici 10**.



**Slika 10.** Baždarni pravac katehina korišten za određivanje ukupnih flavonoida

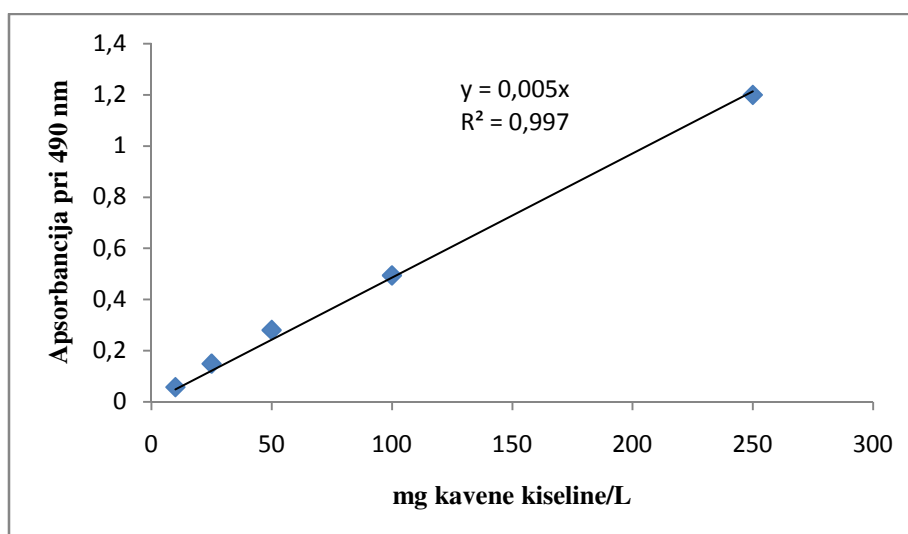
Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorcima raštike izražen je u mikrogramima katehin ekvivalenta po miligramu suhe mase uzorka ( $\mu\text{g CE/mg sm}$ ), a rezultati su prikazani na **Slici 11**. Stupci prikazuju srednju vrijednost šest bioloških replika iz određenog područja i njima odgovarajuću standardnu devijaciju. Sadržaj ukupnih flavonoida najniži je u uzorcima od proizvođača iz Pule ( $1,67 \pm 0,43 \mu\text{g CE/mg sm}$ ) i komercijalnog proizvođača *Bejo* ( $1,72 \pm 0,32 \mu\text{g CE/mg sm}$ ) dok je najviša vrijednost izmjerena u raštici uzgojenoj od proizvođača s Pelješca ( $2,51 \pm 0,33 \mu\text{g CE/mg sm}$ ). Srednja vrijednost za sadržaj ukupnih flavonoida za sve uzorke iznosila je  $1,98 \mu\text{g CE/mg sm}$ .



**Slika 11.** Sadržaj ukupnih flavonioda. CE – ekvivalent katehina, sm – suha masa

### 3.3.3. Ukupne fenolne kiseline

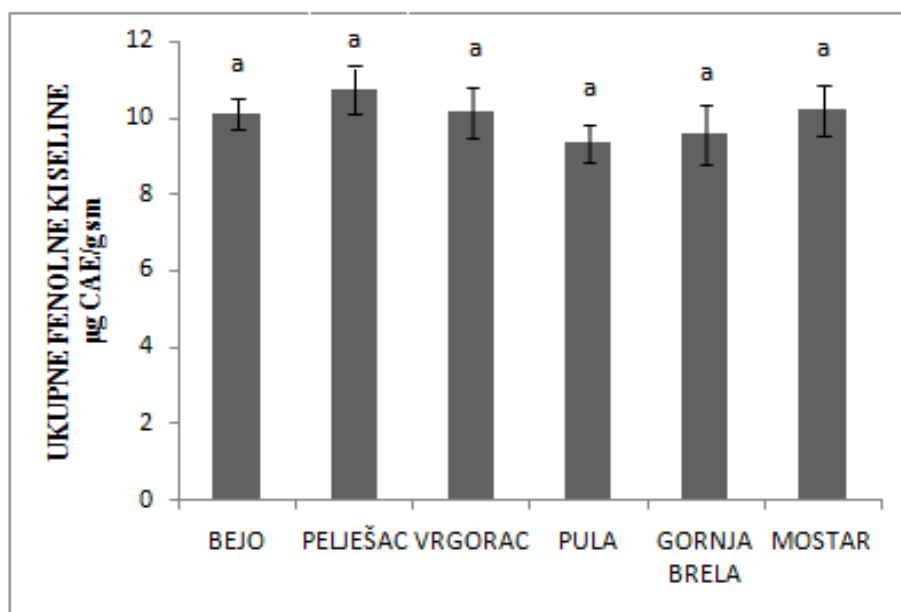
Otopina kavene kiseline (10 – 250 µg/mL) je korištena za određivanje ukupnih fenolnih kiselina, a baždarni pravac prikazan je na **Slici 13**.



**Slika 13.** Baždarni pravac kavene kiseline korišten za određivanje ukupnih fenolnih kiselina

Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u uzorcima raštike izražen je u mikrogramima ekvivalenta kavene kiseline po miligramu suhe mase uzorka (µg CAE/mg sm), a rezultati su prikazani na **Slici 14**. Jednako kao i sadržaj ukupnih polifenola, količina ukupnih fenolnih kiselina nije se značajno razlikovala u raštici uzgojenoj iz sjemena različitih proizvođača, a kretala se od  $9,34 \pm 0,47$  µg CAE/mg sm u uzorcima iz Pule do  $10,73 \pm 0,64$  µg CAE/mg sm u uzorcima s

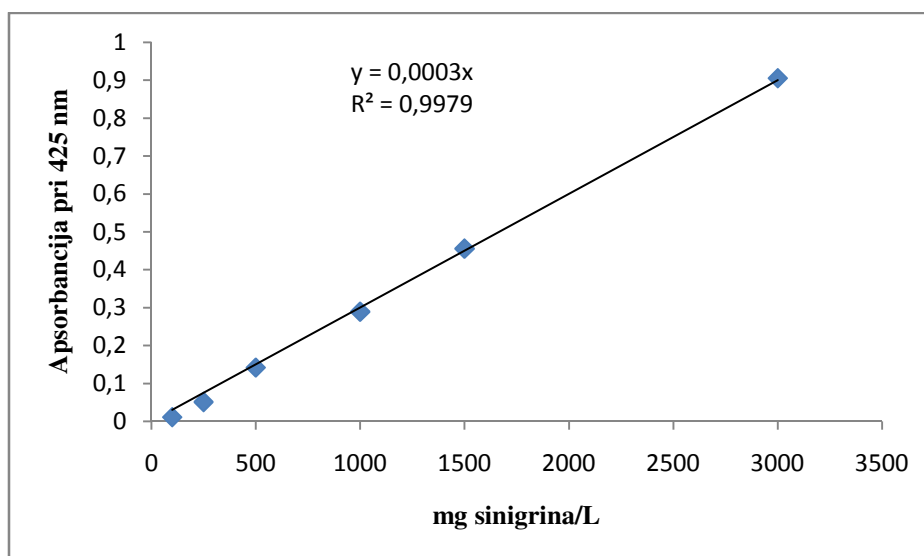
Pelješca. Srednja vrijednost za sadržaj ukupnih fenolnih kiselina za sve uzorke raštike iznosila je 10,02  $\mu\text{g CAE}/\text{mg sm}$ .



**Slika 14.** Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina. CAE – ekvivalent kavene kiseline, sm – suha masa

### 3.4. Glukozinolati

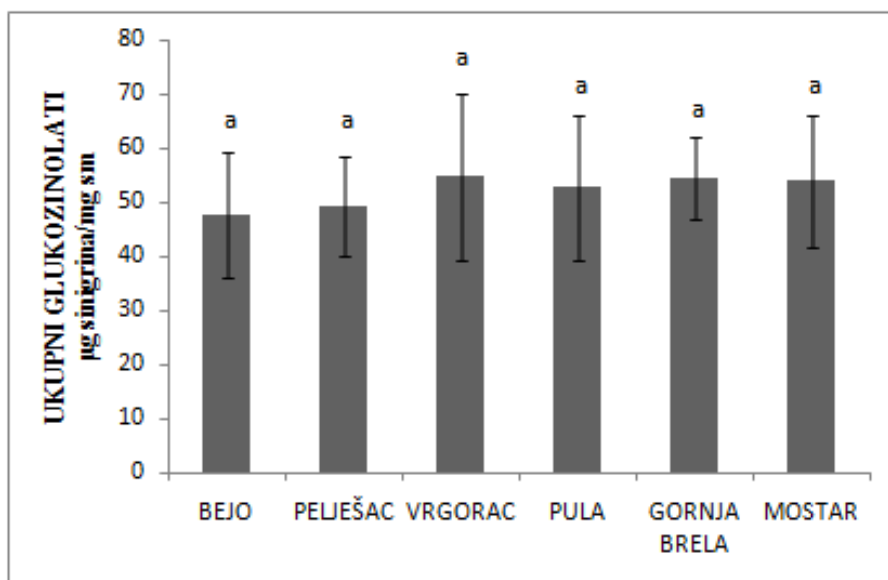
Za određivanje ukupnih glukozinolata korišten je sinigrin, a dobiveni baždarni pravac prikazan je na **Slici 15**.



**Slika 15.** Baždarni pravac sinigrina korišten za određivanje ukupnih glukozinolata



Ukupan sadržaj glukozinolata u uzorcima izražen je u mikrogramima sinigrina po miligramu suhe mase uzorka ( $\mu\text{g}$  sinigrina/mg sm), a rezultati se nalaze na **Slici 16**. Sadržaj ukupnih glukozinolata u raštici uzgojenoj iz sjemena različitog podrijetla nije se statistički značajno razlikovao te se kretao oko  $50 \mu\text{g}$  sinigrina/mg sm, točnije srednja vrijednost za sve uzorke iznosila je  $52,11 \mu\text{g}$  sinigrina/mg sm.



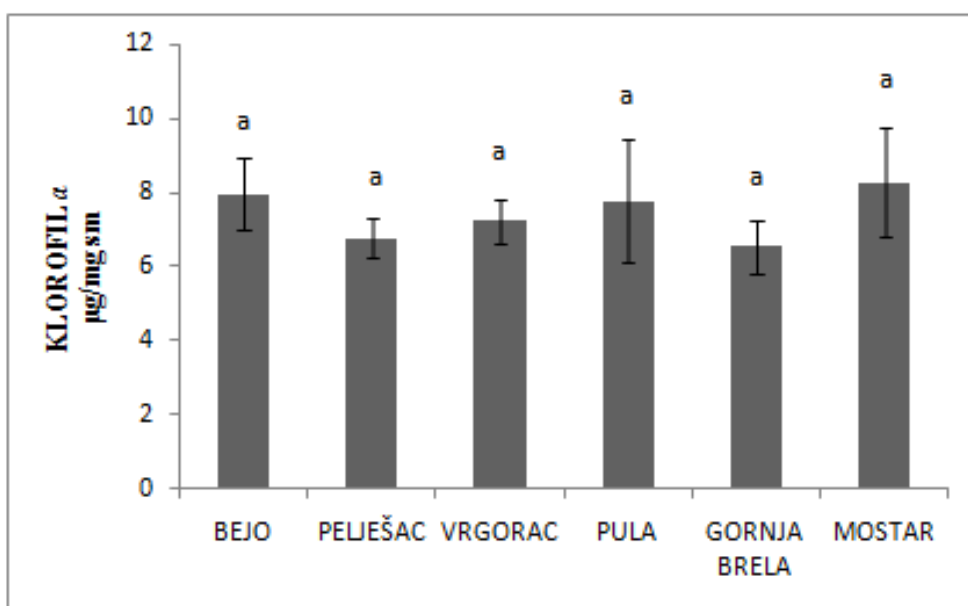
**Slika 16.** Sadržaj ukupnih glukozinolata. sm – suha masa

### 3.5. Pigmenti: klorofil *a* i *b*, ukupni klorofili i ukupni karotenoidi

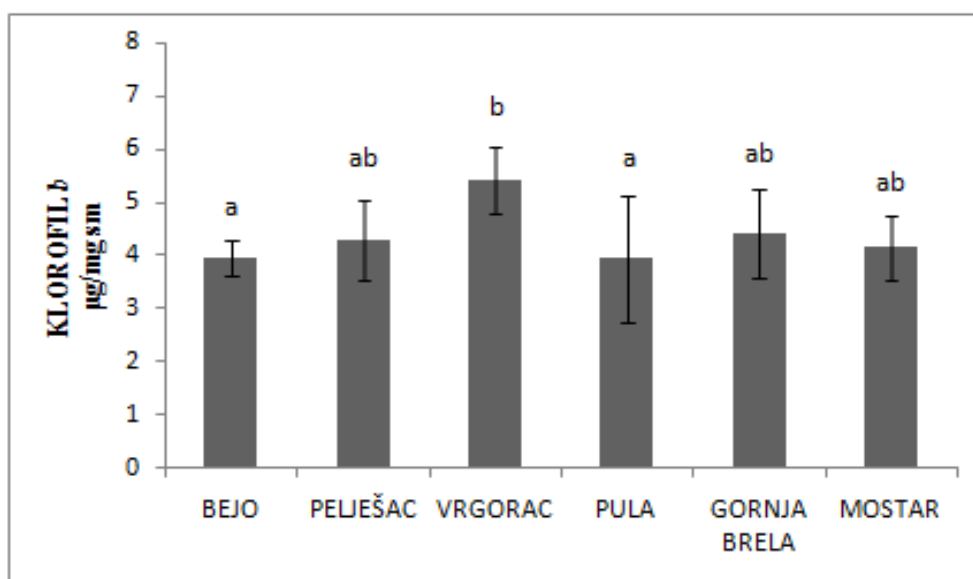
Količina fotosintetskih pigmenata (klorofila *a* i *b* ( $c_a$ ,  $c_b$ ), ukupnih klorofila ( $c_a+c_b$ ) i karotenoida ( $c_{(x+c)}$ ) u uzorcima raštike izračunata je prema metodi Lichtenthaler i Buschmann (2001). Rezultati za klorofil *a* prikazani su na **Slici 17.**, za klorofil *b* na **Slici 18.**, ukupni klorofil na **Slici 19.** i ukupne karotenoide na **Slici 20.** Stupci prikazuju srednju vrijednost šest bioloških replika iz određenog područja i njima odgovarajuću standardnu devijaciju.

Sadržaj klorofila *a* nije se značajno razlikovao u raštici različitog podrijetla sjemena te se kretao od  $6,54 \pm 0,7 \mu\text{g}/\text{mg}$  suhe mase u uzorcima iz Gornje Brele do  $8,28 \pm 1,45 \mu\text{g}/\text{mg}$  sm u uzorcima iz Mostara, a srednja vrijednost za sve uzorke je iznosila  $7,42 \mu\text{g}/\text{mg}$  sm. Za razliku od klorofila *a*, količina klorofila *b* bila je statistički različita u raštici uzgojenoj od drugih proizvođača sjemena te je bila najniža u uzorcima sjemena iz Pule ( $3,93 \pm 1,19 \mu\text{g}/\text{mg}$  sm), a najviša kod uzoraka uzgojenih iz sjemena iz Vrgorca ( $5,43 \pm 0,63 \mu\text{g}/\text{mg}$  sm). Iako su uočene razlike u sadržaju klorofila *b*, ne postoje statistički značajne razlike u sadržaju ukupnih

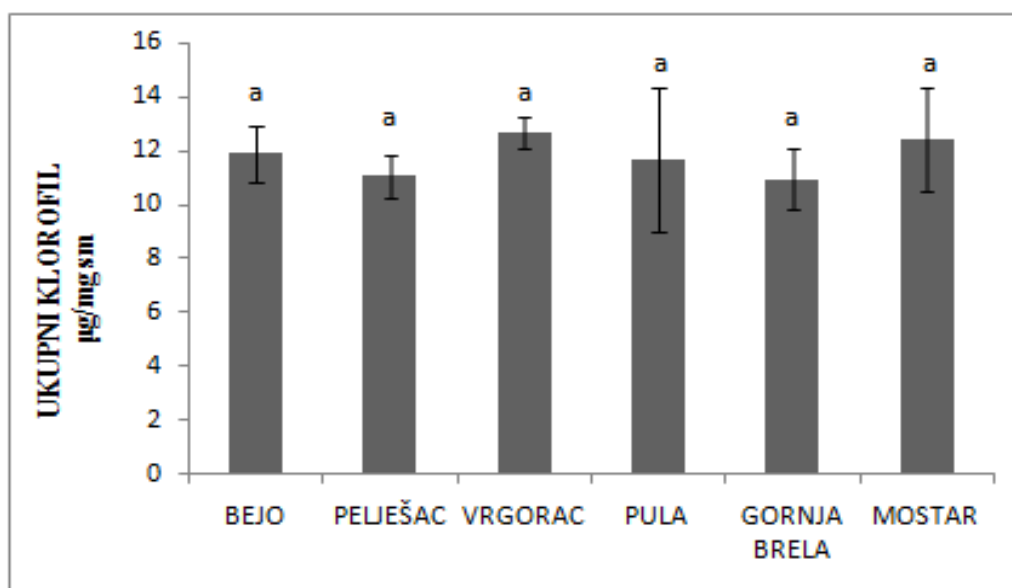
klorofila u uzorcima uzgojenim od različitih proizvođača sjemena. Srednja vrijednost ukupnih klorofila za sve uzroke raštike iznosila je 11,78  $\mu\text{g}/\text{mg}$  sm.



**Slika 17.** Sadržaj klorofila *a*. sm – suha masa

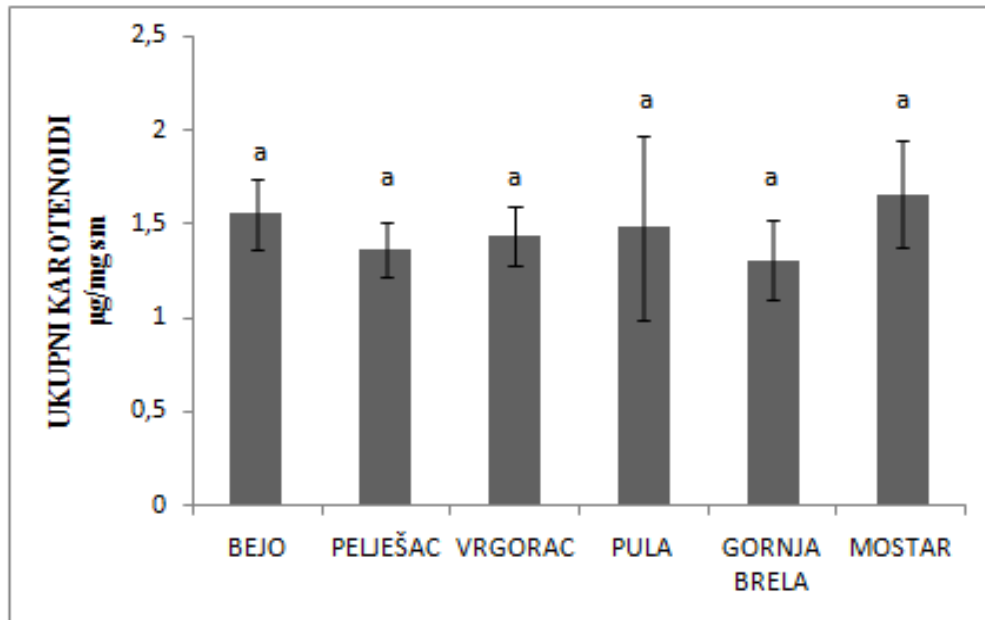


**Slika 18.** Sadržaj klorofila *b*. sm – suha masa



**Slika 19.** Sadržaj ukupnog klorofila. sm – suha masa

Slično kao i sadržaj ukupnih klorofila (**Slika 19.**), sadržaj ukupnih karotenoida (**Slika 20.**) koji se kretao oko 1,5 µg/mg sm, nije se statistički značajno razlikovao u raštici uzgojenoj iz sjemena različitih proizvođača.



**Slika 20.** Sadržaj ukupnih karotenoida. sm – suha masa

Također, izračunat je i omjer klorofila *a* i klorofila *b* te ukupnog klorofila i ukupnih karotenoida (**Tablica 5.**) kako bi se utvrdio njihov međusobni odnos u različitim uzorcima koji može upućivati na uvjete rasta biljke.

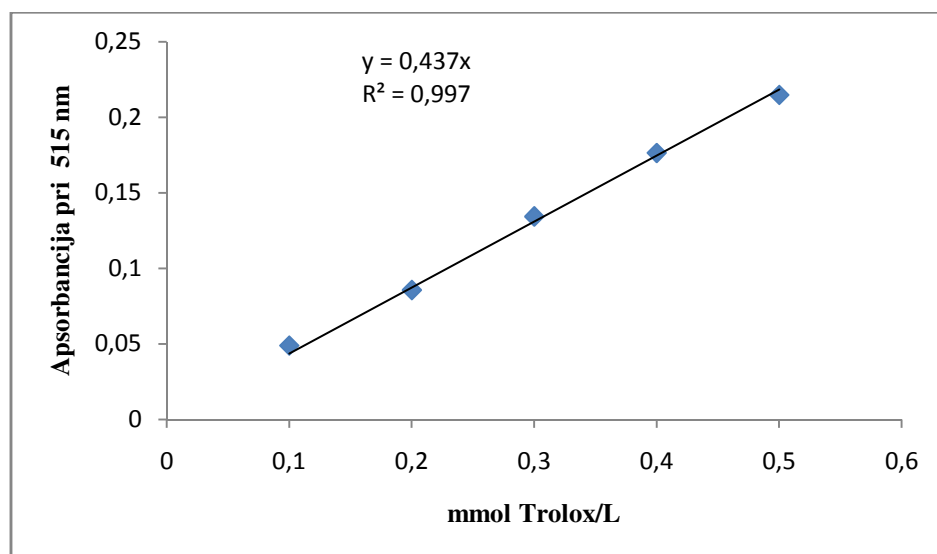
**Tablica 5.** Omjer klorofila *a* i klorofila *b* te ukupnog klorofila i karotenoida

	klorofil <i>a</i> / klorofil <i>b</i>	ukupni klorofili/ ukupni karotenoidi
<i>BEJO</i>	2,11±0,27 <sup>b</sup>	7,49±0,53 <sup>a</sup>
PELJEŠAC	1,65±0,34 <sup>ab</sup>	8,16±0,95 <sup>a</sup>
VRGORAC	1,43±0,21 <sup>a</sup>	8,49±1,27 <sup>a</sup>
PULA	1,95±0,40 <sup>b</sup>	7,69±1,89 <sup>a</sup>
GORNJA BRELA	1,60±0,38 <sup>ab</sup>	8,22±1,32 <sup>a</sup>
MOSTAR	2,01±0,25 <sup>b</sup>	7,41±0,49 <sup>a</sup>

Omjer između klorofila *a* i *b* kretao se od 1,43 do 2,11 te je bio statistički različit između raštike uzgojene iz sjemena podrijetlom iz Vrgorca i Mostara te Pule i proizvođača *Bejo*. Za razliku od omjera klorofila *a* i *b* koji je pokazivao razlike, omjer između ukupnih klorofila i karotenoida nije se statistički značajno razlikovao te se kretao od 7,41 do 8,49.

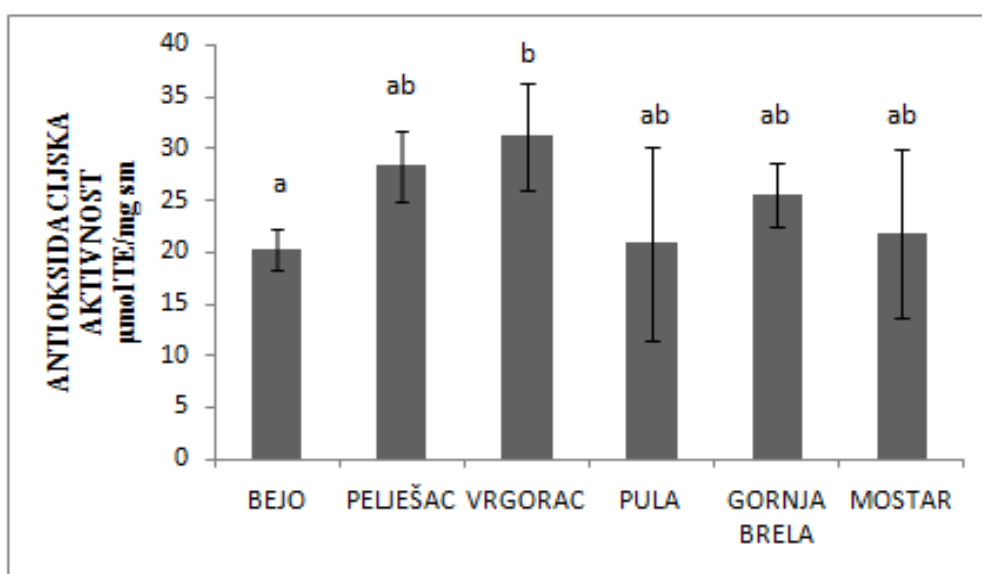
### 3.6. Antioksidacijska aktivnost

Za izradu baždarnе krivulje korištena je otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) u koncentraciji 0 – 0,5 mM, a dobiveni baždarni pravac prikazan je na **Slici 21**.



**Slika 21.** Baždarni pravac Troloxa korišten za određivanje antioksidacijske aktivnosti

Dobivena antioksidacijska aktivnost u uzorcima raštike izražena je u mikromolu ekvivalenta Troloxa po miligramu suhe mase uzorka ( $\mu\text{mol TE/mg sm}$ ), a rezultati su prikazani na **Slici 22**. Stupci prikazuju srednju vrijednost šest bioloških replika iz određenog područja i njima odgovarajuću standardnu devijaciju. Antioksidacijska aktivnost se statistički značajno razlikovala u raštici uzgojenoj iz sjemena proizvođača *Bejo* ( $20,22 \pm 1,97 \mu\text{mol TE/mg sm}$ ) i proizvođača iz Vrgorca ( $31,11 \pm 5,25 \mu\text{mol TE/mg sm}$ ). Dobivena srednja vrijednost antioksidacijske aktivnosti za sve uzorke raštike iznosila je  $24,63 \mu\text{mol TE/mg sm}$ . Najviša standardna devijacija primijećena je kod raštike uzgojene iz sjemena proizvođača iz Pule i Mostara.



**Slika 22.** Antioksidacijska aktivnost. TE – ekvivalent Troloxa, sm – suha masa

Određena je i korelacija između izmjerene antioksidacijske aktivnosti i sadržaja specijaliziranih metabolita u ekstraktima raštike te međusobna korelacija između specijaliziranih metabolita pa je izračunat koeficijent korelacije i pripadajuće *p* vrijednosti su prikazane u **Tablici 6**.

### 3.7. Pearsonov koeficijent korelacije

Kako bismo izrazili korelaciju između svih testiranih varijabli, izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije uzimajući u obzir vrijednosti za sve uzorke (svih šest bioloških replika). Matriks je prikazan u **Tablici 6**.

**Tablica 6.** Pearsonov koeficijent korelacije izmjerenih varijabli

	glukozinolati	fenolne kisljine	flavonoidi	DPPH	klorofil <i>b</i>	klorofil <i>a</i>	ukupni karotenoidi	ukupni polifenoli	ukupni klorofili
glukozinolati	<b>1</b>								
fenolne kisljine	-0,020	<b>1</b>							
flavonoidi	0,051	0,197	<b>1</b>						
DPPH	0,045	0,148	<b>0,564</b>	<b>1</b>					
klorofil <i>b</i>	-0,107	0,017	0,324	<b>0,537</b>	<b>1</b>				
klorofil <i>a</i>	-0,209	-0,137	-0,164	-0,119	0,145	<b>1</b>			
ukupni karotenoidi	-0,240	-0,070	-0,064	-0,018	0,138	<b>0,945</b>	<b>1</b>		
ukupni polifenoli	-0,125	0,026	0,338	<b>0,530</b>	<b>0,702</b>	<b>0,353</b>	<b>0,349</b>	<b>1</b>	
ukupni klorofili	-0,217	-0,093	0,061	0,216	<b>0,675</b>	<b>0,827</b>	<b>0,783</b>	<b>0,662</b>	<b>1</b>

Vrijednosti koje su podebljane pokazuju statistički značajnu korelaciju. Najviša pozitivna statistički značajna korelacija dobivena je između klorofila *a* i ukupnih karotenoida te je slijede ukupni klorofili i klorofil *a* te ukupni karotenoidi i ukupni klorofili što je i očekivano. Antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom pokazuje značajnu korelaciju s flavonoidima i ukupnim polifenolima što upućuje na činjenicu da su te komponente primarno odgovorne za antioksidacijsku aktivnost raštike istraživane u ovom radu.

## 4. Rasprava

### 4.1. Klijavost, morfološke karakteristike i masa biljaka

Klijavost je izražena kao postotak proklijalih biljaka nakon pet dana (dva dana na +4 °C i još tri dana na svjetlu na +21 °C) pri čemu je najviši postotak klijavosti pokazalo sjeme podrijetlom iz Mostara (iz 90% sjemena su niknuli klijanci raštike), a zatim su slijedili sjeme iz Vrgorca (85%), Pule (83%), Gornje Brele i proizvođača *Bejo* s jednakom klijavošću (65%). Najmanju klijavost (25%) je pokazalo sjeme s Pelješca. Na klijavost sjemena mogu utjecati različiti faktori kao što su okolišni i genetski, ali prije svega utječe način skladištenja sjemena i vrijeme prikupljanja sjemena kao i okolišni uvjeti tijekom prikupljanja. Kako su svi uzorci sjemena naklijavani u jednakim uvjetima u laboratoriju, razlika u klijavosti vjerojatno je posljedica različite starosti sjemena te neodgovarajućeg čuvanja sjemena od strane proizvođača prije same dopreme u laboratorij.

Nakon 28 dana uzgoja biljaka u hidroponu zabilježene su njihove morfološke karakteristike prema radu Batelja i sur. (2009). Karakteristike koje su određivane uključivale su boju lista, intenzitet kovrčavosti, mjehuravost na rubu plojke i oblik lista. Svi listovi biljaka uzgojenih iz različitog sjemena bili su u obliku lire, zelene boje bez obojenosti ili kovrčavosti lista (**Slika 8.**). Oblik lire je najčešći oblik lista populacija raštike s područja Hrvatske, a isti su oblik i Batelja i sur. (2009) pronašli u 13 od 15 promatranih populacija raštike. U istom radu, kovrčavost nije bila česta morfološka karakteristika populacija raštike što je primijećeno i kod mojih uzoraka. Iako je oblik lista bio jednak kod svih uzoraka u mom radu, primijećena je razlika u veličini listova koji su bili najveći kod uzoraka proizvođača sjemena iz Gornje Brele dok su najmanji bili oni iz sjemena s Pelješca (**Slika 8.**). Kod uzoraka s Pelješca primijećene su i dulje lisne peteljke u usporedbi s ostalim uzorcima. Manji listovi kod raštike iz sjemena s Pelješca rezultirali su i nižom masom same biljke koja je iznosila  $3,45 \pm 1,56$  g što je oko tri puta niže nego kod biljaka uzgojenih iz sjemena proizvođača iz Mostara ( $11,74 \pm 4,20$  g) (**Tablica 4.**). Uzrok značajno nižeg prinosa raštike s Pelješca može biti zbog niže kvalitete sjemena na što upućuje i niska klijavost sjemena s Pelješca.

## 4.2. Specijalizirani metaboliti u raštici

### 4.2.1. Polifenolni spojevi

*Ukupni polifenoli:* U ovom istraživanju najniži sadržaj ukupnih polifenola zabilježen je u uzorcima raštike podrijetla sjemena iz Pule ( $9,34 \pm 2,72$   $\mu\text{g GAE/mg sm}$ ), a najviši su imali uzorci uzgojeni iz sjemena iz Vrgorca ( $11,44 \pm 1,21$   $\mu\text{g GAE/mg sm}$ ). Srednja vrijednost sadržaja ukupnih polifenola u mojim uzorcima kretala se oko  $10$   $\mu\text{g GAE/mg sm}$  što je u skladu s literaturnim podacima autora Çömlekcioglu i Kutlu (2018) u čijim se uzorcima sadržaj ukupnih polifenola u raštici kretao od  $7,32$ - $11,63$   $\text{mg GAE/g}$ . Vrijednosti dobivene u mom istraživanju nešto su niže od vrijednosti ukupnih polifenola za raštiku u radu Hagen i sur. (2009) gdje su ispitivali utjecaj hladnog skladištenja i datuma berbe na razinu fitokemikalija i antioksidacijske aktivnosti. U tom radu sadržaj ukupnih polifenola kretao se oko  $16$   $\text{mg GAE/g}$ . U mojem radu, sadržaj ukupnih polifenola nije se statistički značajno razlikovao u raštici uzgojenoj od sjemena različitih proizvođača. To upućuje na činjenicu da na sadržaj ukupnih polifenola u raštici više utječu okolišni čimbenici nego podrijetlo sjemena jer u mojim uvjetima gdje su okolišni čimbenici bili konstantni nisu zabilježene razlike.

*Ukupni flavonoidi:* Najveću količinu flavonoida sadržavali su uzorci s Pelješca ( $2,51 \pm 0,33$   $\mu\text{g CE/mg sm}$ ), a zatim su slijedili uzorci iz Vrgorca ( $2,06 \pm 0,44$   $\mu\text{g CE/mg sm}$ ), Gornje Brele ( $2,05 \pm 0,51$   $\mu\text{g CE/mg sm}$ ), Mostara ( $1,87 \pm 0,40$   $\mu\text{g CE/mg sm}$ ), proizvođača *Bejo* ( $1,72 \pm 0,32$   $\mu\text{g CE/mg sm}$ ) i najmanju količinu sadržavali su uzorci iz Pule ( $1,67 \pm 0,43$   $\mu\text{g CE/mg sm}$ ). Srednja vrijednost za sve uzorke iznosila je  $1,92$   $\mu\text{g CE/mg sm}$  i ta je vrijednost nešto niža od vrijednosti ukupnih flavonoida u klicama raštike ( $3,67 \pm 0,19$   $\mu\text{g CE/mg sm}$ ) određivanih na isti način u radu Šamec i sur. (2018). Takav rezultat ne iznenađuje jer biljke u ranijim fazama rasta (klijanci) tijekom intenzivnog rasta i razvoja pokazuju više vrijednosti flavonoida dok njihova razina sa starenjem biljke opada (Šamec i sur., 2011). Za razliku od ukupnih polifenola, sadržaj ukupnih flavonoida statistički se značajno razlikovao između raštike uzgojene iz sjemena proizvođača *Bejo* i Pelješac te Pula i Pelješac što upućuje na činjenicu da je sadržaj flavonoida više pod utjecajem genetskih nego okolišnih čimbenika. Slični rezultati dobiveni su i u radu Šamec i sur. (2014) za bijelo zelje gdje je sadržaj ukupnih flavonoida bio različit u bijelom zelju uzgojenom iz sjemena različitih proizvođača iako su svi uzorci uzgajani u isto vrijeme, pod jednakim uvjetima.

*Fenolne kiseline:* Najveći sadržaj fenolnih kiselina zabilježen je u uzorcima s Pelješca ( $10,73 \pm 0,64$   $\mu\text{g CAE/mg sm}$ ), a zatim u uzorcima raštike podrijetlom sjemena iz Mostara



(10,22±0,66 µg CAE/mg sm), Vrgorca (10,15±0,64 µg CAE/mg sm), *Beje* (10,12±0,40 µg CAE/mg sm), Gornje Brele (9,56±0,77 µg CAE/mg sm) i najmanji sadržaj u uzorcima iz Pule (9,34±0,47 µg CAE/mg sm). Slično kao i za ukupne polifenole, sadržaj ukupnih fenolnih kiselina ne razlikuje se statistički značajno u raštici uzgojenoj iz sjemena različitog podrijetla. Sadržaj fenolnih kiselina, prema literaturnim podacima, je pod utjecajem okolišnih čimbenika pa je kod biljaka izloženih stresu primijećen viši sadržaj fenolnih kiselina (Neugart i sur., 2018) što je povezano s njihovom fiziološkom ulogom. Kako u mom eksperimentalnom postavu nije bilo stresnih uvjeta za biljke, sadržaj fenolnih kiselina kod svih je uzoraka jednak.

#### 4.2.2. Glukozinolati

Sadržaj glukozinolata kretao se od 47,63±11,69 µg sinigrina/mg sm u uzorcima od proizvođača sjemena *Bejo* pa preko 49,36±9,11 µg sinigrina/mg sm u uzorcima podrijetla sjemena s Pelješca, 52,80±13,35 µg sinigrina/mg sm iz Pule, 53,88±12,13 µg sinigrina/mg sm iz Mostara, 54,37±7,61 µg sinigrina/mg sm iz Gornje Brele i najveći sadržaj glukozinolata pokazali su uzorci iz Vrgorca s 54,64±15,57 µg sinigrina/mg sm. Iako postoje određene razlike u sadržaju glukozinolata, one nisu statistički značajne te mogu zaključiti da je raštika ispitivana u ovom radu, bez obzira na podrijetlo sjemena, dobar izvor glukozinolata koji se povezuju s raznim pozitivnim djelovanjima na ljudsko zdravlje. Vrijednosti ukupnih glukozinolata u mojim uzorcima su u skladu s količinama određenim u raštici u radu Velasco i sur. (2007) u kojem su određivali faktore koji utječu na razinu glukozinolata i odredili sadržaj ukupnih glukozinolata u neoštećenim listovima od 41 µmol po gramu suhe mase. U istom radu, autori su zaključili da na sadržaj glukozinolata u raštici utječu ponajprije okolišni čimbenici kao što su sastav tla i temperatura. Stoga ne čudi da među mojim uzorcima nema varijacija u sastavu glukozinolata jer su navedeni faktori bili konstantni za sve uzorke.

#### 4.2.3. Pigmenti: klorofil *a* i *b*, ukupni klorofili i ukupni karotenoidi

Sadržaj klorofila *a*, ukupnih klorofila te ukupnih karotenoida nije se značajno razlikovao u mojim uzorcima dok je klorofil *b* bio statistički značajno različit u raštici uzgojenoj iz sjemena *Bejo* i Vrgorac te Pula i Vrgorac. Najveći sadržaj ukupnih klorofila imali su uzorci iz Vrgorca (12,66±0,59 µg/mg sm), zatim uzorci iz Mostara (12,43±1,96 µg/mg sm), od proizvođača *Bejo* (11,91±1,05 µg/mg sm), iz Pule (11,70±2,67 µg/mg sm), s Pelješca (11,06±0,82 µg/mg sm) i iz Gornje Brele (10,94±1,13 µg/mg sm). Vrijednosti za ukupne

klorofile usporedive su s vrijednostima za četiri tjedna staro bijelo zelje u radu Šamec i sur. (2014) pri čemu su te vrijednosti u spomenutom radu više od ukupnih klorofila u klijancima raštike koji iznose  $3,46 \pm 0,09$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  sm.

Iako su kupusnjače zelene boje, one su poznate i kao značajan izvor karotenoida čija je prisutnost u kupusnjačama prekrivena zelenom bojom klorofila. U mojim uzorcima količina ukupnih karotenoida nije se značajno razlikovala te je iznosila  $1,31 \pm 0,21$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  sm za uzorke iz Gornje Brele,  $1,36 \pm 0,14$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  sm za Pelješac,  $1,43 \pm 0,16$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  sm za Vrgorac,  $1,48 \pm 0,49$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  sm (Pula),  $1,56 \pm 0,19$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  sm (*Bejo*) i  $1,65 \pm 0,29$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  sm (Mostar).

Omjer klorofila *a* i *b* je indikator prilagodbe fotosintetskog aparata biljaka na svjetlost te je niži kod biljaka koje ne rastu na izravnom svjetlu (Lichtenthaler i Buschmann, 2001). Omjer klorofila *a* i *b* u mojim uzorcima upravo upućuje na činjenicu da biljke nisu rasle izložene direktnom suncu što je i točno jer su biljke rasle u komori pod kontroliranim svjetlom. Nizak omjer ukupnih klorofila i karotenoida upućuje da su biljke rasle pod stresom što uzrokuje brže propadanje klorofila nego karotenoida (Lichtenthaler i Buschmann, 2001). S jačim stresom taj omjer opada te on može biti čak 2,5 – 3. U mojim uzorcima taj se omjer kretao 7,41 – 8,49 što upućuje na činjenicu da biljke nisu rasle pod stresom pa su zbog toga bile intenzivno zelene boje.

#### 4.3. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidacijska aktivnost izmjerena u različitim uzorcima pokazuje značajne varijacije, od  $20,22 \pm 1,97$   $\mu\text{mol TE}/\text{mg}$  sm u uzorcima od proizvođača *Bejo* do  $31,11 \pm 5,25$   $\mu\text{mol TE}/\text{mg}$  sm u uzorcima iz Vrgorca. Najviša izmjerena vrijednost u ovom radu usporediva je s antioksidacijskom aktivnošću izmjerenoj istom metodom u klijancima raštike gdje iznosi  $33,42$   $\mu\text{mol TE}/\text{mg}$  sm (Šamec i sur., 2018). Prema radu Sikora i Bodziarczyk (2012) u kojem je određen sastav i antioksidacijska aktivnost u svježoj (sirovoj) i prokuhanoj raštici, izmjerena antioksidacijska aktivnost razlikovala se u uzorcima sirove raštike, a iznosila je  $30,25 \pm 2,25$   $\mu\text{mol TE}/\text{g}$ ,  $22,02 \pm 0,13$   $\mu\text{mol TE}/\text{g}$  i  $47,38 \pm 1,49$   $\mu\text{mol TE}/\text{g}$  što je također usporedivo s vrijednostima dobivenim u ovom radu.

Kako bih odredila koji specijalizirani metaboliti doprinose antioksidacijskoj aktivnosti, izračunala sam koeficijente korelacije pri čemu sam najvišu vrijednost zabilježila za ukupne polifenole i flavonoide koji su komponente poznate po antioksidacijskoj aktivnosti. Slični rezultati dobiveni su i u literaturi za bijelo zelje gdje je najviša korelacija pronađena između

tih parametara te je zaključeno da su upravo polifenolne komponente primarno odgovorne za antioksidacijsku aktivnost kupusnjača (Šamec i sur., 2011).

## 5. Zaključak

U ovom radu odredila sam specijalizirane metabolite i antioksidacijsku aktivnost u uzorcima raštike različitog podrijetla sjemena. Svi uzorci uzgajani su pod identičnim uvjetima kako bi se ispitaio samo utjecaj sjemena na sadržaj specijaliziranih metabolita, a ne utjecaj okolišnih čimbenika. Sjeme se razlikovalo po klijavosti pri čemu su vrlo mali postotak klijavosti (samo 25%) pokazali uzorci podrijetlom s Pelješca, a najveći iz Mostara (90%) i Vrgorca (85%) što je vjerojatno posljedica različitog skladištenja sjemena od strane proizvođača ili nepovoljnih okolišnih uvjeta tijekom njihovog sakupljanja. Sve ispitivane populacije raštike imale su liraste listove, a najviši prinos zabilježen je kod raštike uzgojene iz sjemena iz Mostara. Također, sve ispitivane populacije pokazale su značajan sadržaj specijaliziranih metabolita povezanih s pozitivnim utjecajem na ljudsko zdravlje. Sadržaj ukupnih polifenola, fenolnih kiselina, glukozinolata i karotenoida nije se statistički značajno razlikovao u uzorcima uzgojenim od različitih proizvođača sjemena. Sadržaj ukupnih flavonoida bio je statistički najviši kod raštike od proizvođača sjemena s Pelješca dok je najvišu antioksidacijsku aktivnost pokazala raštika iz sjemena iz Vrgorca.

Iako je u ovom radu sjeme nabavljeno od proizvođača iz različitih dijelova Hrvatske i Bosne Hercegovine koji su karakterizirani različitim klimatsko-geografskim karakteristikama, kad su biljke uzgojene pod identičnim uvjetima kod njih nisu zabilježene razlike u sadržaju većine ispitivanih grupa specijaliziranih metabolita. To navodi na zaključak da je njihov sadržaj vjerojatno više pod utjecajem okolišnih čimbenika nego pod utjecajem genetskih faktora uzrokovanih intra- i interpopulacijskom varijabilnošću. Također, u ovom je radu pokazano da su hrvatske populacije raštike značajan izvor specijaliziranih metabolita povezanih s pozitivnim utjecajima na ljudsko zdravlje. Kako bi se preciznije odredili specijalizirani metaboliti u raštici povezani s njezinim pozitivnim učincima na zdravlje, potrebno je u budućnosti provesti detaljnija istraživanja koja uključuju upotrebu sofisticiranijih tehnika biljne metabolomike kao što su primjena visokodjelotvorne tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa i sl. te paralelno provoditi *in vitro* i *in vivo* biološke testove.

## 6. Literatura

Aghajanzadeh T., Hawkesford M. J., Kok L. J. (2014): The significance of glucosinolates for sulfur storage in Brassicaceae seedlings. *Frontiers in Plant Science* **5**: 704.

Al-Shehbaz I. A. (2011): Brassicaceae (mustard family). In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Wiley, Chichester. Dostupno na:  
<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0003690.pub2>.

Al-Shehbaz I. A., Beilstein M. A., Kellogg E. A. (2006): Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. *Plant Systematics Evolution* **259**: 89–120.

Azevedo C. H., Rodriguez-Amaya D. B. (2005): Carotenoid composition of kale as influenced by maturity, season and minimal processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**: 591–597.

Balkaya A., Yanmaz R. (2005): Promising kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) populations from Black Sea region, Turkey. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **33**: 1–7.

Bateljka K., Goreta Ban S., Žanić K., Miloš B., Dumičić G., Matotan Z. (2009): Svojstva autohtonih populacija raštike (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala*) hrvatskog priobalja. *Poljoprivreda* **15**: 8–14.

Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995): Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel - Wissenschaft und – Technologie* **28**: 25–30.

Cartea M. E., Picoaga A., Soengas P., Ordas A. (2002): Morphological characterization of kale populations from northwestern Spain. *Euphytica* **129**: 25–32.

Cartea M. E., Velasco P. (2008): Glucosinolates in *Brassica* foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochemistry Reviews* **7**: 213–229.

Chen S., Nelson M. N., Chèvre A.-M., Jenczewski E., Li Z., Mason A. S., Meng J., Plummer J. A., Pradhan A., Siddique K. H. M., Snowdon R. J., Yan G., Zhou W., Cowling W. A.

(2011): Trigenomic bridges for *Brassica* improvement. *Critical Reviews in Plant Sciences* **30**: 524–547.

Christensen S., Bothmer R., Poulsen G., Maggioni L., Phillip M., Andersen B. A., Jørgensen R. B. (2011): AFLP analysis of genetic diversity in leafy kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* (DC.) Alef.) landraces, cultivars and wild populations in Europe. *Genetic Resources and Crop Evolution* **58**: 657–666.

Çömlekcioglu N., Kutlu M. (2018): Phytochemical content of the kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) leaves and seasonal variation of antioxidant activity. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi Yıl* **55**: 119–127.

Elbarbry F., Elrody N. (2011): Potential health benefits of sulforaphane: A review of the experimental, clinical and epidemiological evidences and underlying mechanisms. *Journal of Medicinal Plants Research* **5**: 473–484.

European Pharmacopoeia (2004). 4th ed. Council of Europe, Strasbourg. str. 2377–2378.

Fahey J. W., Stephenson K. K., Wade K. L., Talalay P. (2013): Urease from *Helicobacter pylori* is inactivated by sulforaphane and other isothiocyanates. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **435**: 1–7.

FAOSTAT. Dostupno na: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>.

Franzke A., Lysak M. A., Al-Shehbaz I. A., Koch M. A., Mummenhoff K. (2011): Cabbage family affairs: the evolutionary history of Brassicaceae. *Trends in Plant Science* **16**: 108–116.

Gruz J., Novák O., Strnad M. (2008): Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC–MS/MS. *Food Chemistry* **111**: 789–794.

Hagen S. F., Borge G. I. A., Solhaug K. A., Bengtsson G. B. (2009): Effect of cold storage and harvest date on bioactive compounds in curly kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). *Postharvest Biology and Technology* **51**: 36–42.

Jeon J., Kim H. K., Kim H. R., Kim Y. J., Park Y. J., Kim S. J., Kim C., Park S. U. (2018): Transcriptome analysis and metabolic profiling of green and red kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) seedlings. *Food Chemistry* **241**: 7–13.

Kliebenstein D. J., Osbourn A. (2012): Making new molecules – evolution of pathways for novel metabolites in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 415–423.

Lefsrud M., Kopsell D., Wenzel A., Sheehan J. (2007): Changes in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) carotenoid and chlorophyll pigment concentrations during leaf ontogeny. *Scientia Horticulturae* **112**: 136–141.

Lemos M., Santin J. R., Júnior L. C. K., Niero R., Faloni de Andrade S. (2011): Gastroprotective activity of hydroalcoholic extract obtained from the leaves of *Brassica oleracea* var. *acephala* DC in different animal models. *Journal of Ethnopharmacology* **138**: 503–507.

Lichtenthaler H. K., Buschmann C. (2001): Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* **1**: F4.3.1-F4.3.8.

Lichtenthaler H. K. (1987): Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**: 350–382.

Manikandan R., Thiagarajan R., Goutham G., Arumugam M., Beulaja M., Rastrelli L., Skalicka-Woźniak K., Habtemariam S., Erdogan Orhan I., Nabavi S. F., et al. (2016): Zeaxanthin and ocular health, from bench to bedside. *Fitoterapia* **109**: 58–66.

Mazumder A., Dwivedi A., Plessis J. (2016): Sinigrin and its therapeutic benefits. *Molecules* **21**: 416.

Neugart S., Baldermann S., Hanschen F. S., Klopsch R., Wiesner-Reinhold M., Schreiner M. (2018): The intrinsic quality of brassicaceous vegetables: How secondary plant metabolites are affected by genetic, environmental, and agronomic factors. *Scientia Horticulturae* **233**: 460–478.

Nisar N., Li L., Lu S., Chi Khin N., Pogson Barry J. (2015): Carotenoid metabolism in plants **1**: 68–82.

Ozimec R., Karoglan Kontić J., Matotan Z., Strikić F.(2009): Poljoprivredna bioraznolikost Dalmacije; Tradicijsko poljoprivredno bilje i domaće životinje, str. 92–118.

Pandey K. B., Rizvi S. I. (2009): Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2**: 270–278.

Rakow G.(2004): Species origin and economic importance of *Brassica* in biotechnology. U: Pua E. C., Douglas C. J. (ur.) *Brassica*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Ribera A. E., Zuñiga G. (2012): Induced plant secondary metabolites for phytopatogenic fungi control: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* **12**: 893–911.

Sikora E., Bodziarczyk I. (2012): Composition and antioxidant activity of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) raw and cooked. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* **11**: 239–248.

Slinkard K., Singleton V. L. (1977): Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture* **28**: 49–55.

Šamec D., Bogović M., Vincek D., Martinčić J., Salopek-Sondi B. (2014): Assessing the authenticity of the white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*) cv. „Varaždinski“ by molecular and phytochemical markers. *Food Research International* **60**: 266–272.

Šamec D., Pavlović I., Radojčić Redovniković I., Salopek-Sondi B. (2018): Comparative analysis of phytochemicals and activity of endogenous enzymes associated with their stability, bioavailability and food quality in five Brassicaceae sprouts. *Food Chemistry* **269**: 96–102.

Šamec D., Pavlović I., Salopek-Sondi B. (2017): White cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*): botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochemistry reviews* **54**: 2622–2635.



Šamec D., Piljac-Žegarac J., Bogović M., Habjanić K., Gruz J. (2011): Antioxidant potency of white (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) and Chinese (*Brassica rapa* L. var. *pekinensis* (Lour.)) cabbage: The influence of development stage, cultivar choice and seed selection. *Scientia Horticulturae* **128**: 78–83.

Šamec D., Salopek-Sondi B. (2019): Cruciferous (Brassicaceae) Vegetables. U: Nabavi S. M., Sanches-Silva A. (ur.) *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*. Amstredam, Nizozemska. Academic Press, str. 195–202.

Šamec D., Urlić B., Salopek-Sondi B. (2018): Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) as a superfood: Review of the scientific evidence behind the statement. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **20**: 1–12.

USDA, National Agricultural Statistics Service. (2012): Census of agriculture, dostupno na: [https://www.agcensus.usda.gov/Publications/2012/Full\\_Report/Volume\\_1,\\_Chapter\\_1\\_US/st99\\_1\\_038\\_038.pdf](https://www.agcensus.usda.gov/Publications/2012/Full_Report/Volume_1,_Chapter_1_US/st99_1_038_038.pdf).

Vaughn S. F., Berhow M. A. (2005): Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation, and purification. *Industrial Crops and Products* **21**: 193–202.

Velasco P., Cartea M. E., Gonzalez C., Vilar M., Ooras A. (2007): Factors affecting the glucosinolate content of kale (*Brassica oleracea acephala* group). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **55**: 955–962.

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

## Životopis

Rođena sam 15. ožujka 1994. godine u Bjelovaru. Pohađala sam III. osnovnu školu koju sam završila 2008. godine, a zatim upisala opći smjer u Gimnaziji Bjelovar. Nakon završene srednje škole upisala sam integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. U sklopu fakulteta, tri godine zaredom sudjelovala sam u organizaciji Noći biologije na Biološkom odsjeku, a 2018. godine sudjelovala sam na manifestaciji Otvoreni dani Instituta Ruđer Bošković. Dio rezultata nastalih za vrijeme istraživanja na Institutu Ruđer Bošković u sklopu izrade diplomskog rada prezentirani su na dva međunarodna znanstvena skupa, a uz to sam i koautor na dva sažetka objavljena u knjigama sažetaka s međunarodnih skupova (*10th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries* i *Advances in Phytochemical Analysis – Trends in Natural Products Research*).