

Potencijalna zaštitna uloga fenolnih kiselina kod kupusnjača u solnom stresu

Dičak, 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:217:510091>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-21**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Petra Dičak

Potencijalna zaštitna uloga fenolnih kiselina kod kupusnjača u solnom stresu

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistra(e) kemije

Zagreb, 2020 godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za kemijsku biologiju, Zavodu za molekularnu biologiju, Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod mentorstvom dr.sc. Branke Salopek Sondi.

Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof.dr.sc. Iva Juranović Cindrić.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom Fitohormoni u abiotskom stresu kupusnjača: mehanizam tolerancije i primjena (PhytoBraCro, IP-2014-09-4359), voditeljice dr.sc. Branke Salopek Sondi.

Zahvale

*Zahvaljujem dragoj mentorici dr.sc. Branki Salopek Sondi
na ukazanoj prilici, strpljenju, podršci i savjetima koji su izradu
i pisanje ovog diplomskog rada učinili lakšim.*

*Hvala asistentici Idi Linić na izrazitom strpljenju i pomoći tijekom izrade diplomskog rada
kao i svim ostalim zaposlenicima Laboratorija za kemijsku biologiju
na prenesenom znanju, pomoći i ugodnoj atmosferi*

*Zahvaljujem prof.dr.sc. Ivi Juranović Cindrić
na svim savjetima, pomoći te uloženom vremenu i trudu.*

*Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima
koji su bili uz mene, usmjeravali me, motivirali me
i podržavali na putu do ove diplome*

Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Cilj i svrha rada.....	2
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Abiotski stres	3
2.2. Kupusnjače	4
2.3. Specijalizirani metaboliti.....	5
2.3.1. Polifenoli.....	7
2.3.2. Fenolne kiseline	8
2.3.3. Uloga fenolnih kiselina u odgovoru biljaka na solni stres.....	10
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. Materijali	11
3.1.1. Biljni materijal	11
3.1.2. Kemikalije	11
3.2. Metode.....	11
3.2.1. Priprema podloge za uzgoj i tretiranje klijanaca	11
3.2.2. Sterilizacija i naklijavanje sjemena	12
3.2.3. Testovi inhibicije korijena i mjerenje biomase klijanaca.....	12
3.2.4. Spektrofotometrijska mjerenja markera stresa i specijaliziranih metabolita	13
3.2.5. Ekstrakcije uzoraka.....	13
3.2.6. Određivanje koncentracije prolina	13
3.2.7. Određivanje koncentracije ukupnih fenolnih kiselina.....	14
3.2.8. Određivanje koncentracije ukupnih fenola	14
3.2.9. Određivanje koncentracije ukupnih flavonoida	15
3.2.10. Određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	15
3.2.11. Analiza specifičnih fenolnih kiselina metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti	16
3.2.12. Ekstrakcije ukupnih fenolnih kiselina.....	17
3.2.13. Analiza uzoraka metodom HPLC.....	18
§ 4. REZULTATI.....	19
4.1. Testovi inhibicije korijena i mjerenje biomase klijanaca uslijed primijenjenih tretmana .	19
4.2. Određivanje koncentracije prolina kao markera stresa	23

4.3. Spektrofotometrijska mjerenja specijaliziranih metabolita	25
4.3.1. <i>Ukupni polifenoli.....</i>	25
4.3.2. <i>Ukupne fenolne kiseline</i>	26
4.3.3. <i>Ukupni flavonoidi.....</i>	28
4.3.4. <i>Antioksidacijske aktivnosti.....</i>	29
4.4. Identifikacija i kvantifikacija specifičnih fenolnih kiselina metodom HPLC.....	32
§ 5. RASPRAVA	36
§ 6. ZAKLJUČAK	39
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	40
§ 8. ŽIVOTOPIS	XVI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Potencijalna zaštitna uloga fenolnih kiselina kod kupusnjača u solnom stresu

Petra Dičak

Povećani salinitet tla jedan je od čimbenika abiotskog stresa koji negativno utječe na rast i razvoj biljaka. Kineski kupus (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) je kultura kupusnjača prethodno okarakterizirana kao umjereno osjetljiva na povećani salinitet tla. Vrste koje su otpornije na solni stres sadrže veće koncentracije fenolnih kiselina od osjetljivijih vrsta. Cilj ovog rada bio je ispitati učinak tretmana fenolnim kiselinama na toleranciju klijanaca kineskog kupusa na solni stres. Klijanca su uzgajani 48 h na podlogama različitog sastava, uključujući NaCl kao stresor (100 mmol dm^{-3}) te fenolne kiseline, salicilnu i sinapinsku kiselinu ($1\text{--}50 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$). Testom inhibicije korijena i mjerenjem biomase dokazan je značajan inhibitorni učinak soli na klijanca. Spektrofotometrijski su izmjerene koncentracije prolina kao markera stresa i koncentracije specijaliziranih metabolita u uzorcima. Identifikacija i kvantifikacija specifičnih fenolnih kiselina analizirana je metodom HPLC. Rezultati upućuju na pozitivan učinak tretmana salicilnom kiselinom na klijanca kineskog kupusa u solnom stresu.

(41 stranice, 24 slike, 1 tablica, 39 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: *Brassica rapa*, fenolne kiseline, kineski kupus, kupusnjače, specijalizirani metaboliti, solni stres

Mentor: dr. sc. Branka Salopek Sondi, zn. savjetnik u trajnom zvanju
Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
 2. doc. dr. sc. Morana Dulić
 3. doc. dr. sc. Ivica Đilović
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Datum diplomskog ispita: 25. veljače 2020.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Potential protective role of phenolic acids in Brassicaceae under salinity stress

Petra Dičak

Increased soil salinity is one of the abiotic stresses that adversely affect plant growth. Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) is a crop characterized as moderately sensitive to salinity stress. More salt-tolerant species contain higher concentrations of phenolic acids than the more sensitive ones. This work aimed to examine the effect of phenolic acid treatment on the salt tolerance of Chinese cabbage seedlings. Seedlings were grown for 48 h on media of different composition, including NaCl as a stressor (100 mmol dm⁻³) and salicylic or sinapic acid (1-50 μmol dm⁻³). The root growth bioassay and biomass measurement demonstrated a significant inhibitory effect of salt on seedlings. The concentration of proline as a stress marker and specialized metabolites in samples were measured spectrophotometrically. The analysis of phenolic acids was done by HPLC method. The results indicate a positive effect of salicylic acid treatment on Chinese cabbage seedlings in salt stress.

(41 pages, 24 figures, 1 table, 39 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: *Brassica rapa*, phenolic acids, Chinese cabbage, Brassica vegetable, specialized metabolites, salinity stress

Mentor: Dr. Branka Salopek Sondi, Senior Scientist

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Iva Juranović Cindrić, Full Professor

Reviewers:

1. Full Professor Iva Juranović Cindrić
 2. Assistant Professor Morana Dulić
 3. Assistant Professor Ivica Đilović
- Substitute: Associate Professor Snežana Miljanić

Date of exam: 25th February 2020.

§ 1. UVOD

Globalne klimatske promjene glavni su uzročnici stresa za biljke poput povećanog saliniteta tla, suše, ekstremnih temperatura i sl. Takve vrste stresa nepovoljno djeluju na rast i razvitak biljaka, posebno onih osjetljivijih vrsta. Procjenjuje se da su značajni gubitci u poljoprivrednoj proizvodnji (preko 50%) uzrokovani nepovoljnim okolišnim prilikama ili čimbenicima abiotskog stresa (suša, povećani salinitet, ekstremne temperature) čime je ugrožena dostupnost i zdravstvena ispravnost hrane diljem svijeta. Preko 6% ukupne kopnene površine Zemlje „pati” od povećanog saliniteta, 64% od suše, 13% od poplava i oko 57% od ekstremnih temperature a buduće projekcije su još nepovoljnije, posebno u sušnim i polusušnim mediteranskim područjima.¹ Stoga je posljednjih desetak godina sve veća potreba za istraživanjem utjecaja nepovoljnih klimatskih uvjeta na rast i razvoj biljaka. U ovom radu istraživanja su usmjerena na učinak solnog stresa na rast klijanaca kineskog kupusa (*Brassica rapa ssp. pekinensis*). Solni stres kombinacija je osmotskog stresa soli tj. gubitka vode u stanicama i toksičnog djelovanja soli što nepovoljno utječe na fiziološke i biokemijske procese te rezultira smanjenjem rasta i razvoja biljke. Dugoročno ova vrste stresa može uzrokovati i smrt biljke. Sustavna istraživanja mehanizama tolerancije na povećani salinitet kod biljaka od presudne su važnosti za uspješan uzgoj biljaka i prehrambenu proizvodnju.² U poljoprivredne kulture čiji prinosi mogu biti ugroženi nepovoljnim klimatskim uvjetima ubrajaju se i kupusnjače (*Brassicaceae*).

Kupusnjače rastu uglavnom na polusušnim i sušnim područjima te su izravno pogođene povećanim salinitetom tla i sušama. Ta biljna porodica broji mnogobrojne komercijalno važne vrste (razne vrste kupusa, kelj, brokulu, cvjetaču itd.) koje se uzgajaju u prehrambene svrhe diljem svijeta. Često se smatraju funkcionalnom hranom jer sadrže spojeve tzv. specijalizirane metabolite koji imaju pozitivne učinke na ljudsko zdravlje kao što je protuupalno, antioksidativno i antikancerogeno djelovanje.³

Specijalizirani metaboliti, posebno polifenolni spojevi djeluju kao odgovori biljke na abiotski stres izazvan okolišnim uvjetima. Njihova uloga je povezana sa zaštitom biljke od reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, eng. *Reactive Oxygen Species*) koji se gomilaju u biljci pod utjecajem abiotskog stresa. Istraživanja na kupusnjačama pokazuju da vrste otpornije na solni stres (bijeli kupus i raštika) sadrže veće količine fenolnih kiselina (posebno kavene,

sinapinske i ferulinske kiseline) u odnosu na umjereno osjetljivije vrste (kineski kupus).⁴ Nadalje, uslijed solnog stresa tolerantnije vrste održavaju ili povećavaju koncentracije fenolnih kiselina dok je u osjetljivih vrsta uočeno njihovo smanjenje (npr. salicilne kiseline).⁵

Fenolne kiseline su vrsta polifenola s poznatim antioksidacijskim učinkom. U biljkama se najčešće nalaze konjugirane sa šećerima, organskim kiselinama ili tvore složnije komplekse kao što su tanini i lignini.⁶ Prethodna istraživanja pokazala su pozitivne učinke primjene nekih fenolnih kiselina na biljke izložene solnom stresu. Povećana tolerancija pšenice na solni stres dokazana je tretmanima sinapinskom, ferulinskom, *p*-kumarinskom i kavenom kiselinom.⁷ U nedavno objavljenom radu dokazano je da salicilna kiselina ima veliki potencijal u agronomiji u svrhu poboljšanja tolerancije biljaka na solni stres.⁸ Bitno je napomenuti da utjecaj salicilne kiseline ovisi o koncentraciji, načinu primjene, vrsti biljke i fazi rasta biljke. Unatoč velikom napretku u genetici, molekularnoj biologiji i biotehnologiji u posljednjih desetak godina, još su uvijek mnogi mehanizmi tolerancije na solni stres nepoznati i nedefinirani.⁵

1.1. Cilj i svrha rada

U ovom diplomskom radu bit će istraženi egzogeni učinci fenolnih kiselina (sinapinske i salicilne kiseline) na klijance kineskog kupusa s ciljem poboljšanja tolerancije na solni stres. Koristit će se različite koncentracije fenolnih kiselina kako bi se odredila optimalna koncentracija koja ima potencijalno zaštitni učinak na klijance tretirane povećanim koncentracijama soli. Klijanci će biti uzgajani *in vitro* uz dodatak soli, natrijevog klorida, kao stresora, a dio će biti tretiran odabranim fenolnim kiselinama. Bit će izmjereni učinci tretmana na rast korijena i biomasu. Spektrofotometrijskim metodama će biti izmjeren prolin (marker stresa), grupe polifenolnih spojeva (ukupni polifenoli, ukupne fenolne kiseline i ukupni flavonoidi) te antioksidacijska aktivnost u klijancima uslijed tretmana. Detaljnije će biti praćene koncentracije sinapinske, salicilne i ferulinske kiseline metodom HPLC na tretiranim uzorcima.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Abiotski stres

Stres kod biljaka je stanje u kojem biljka raste u nepovoljnim uvjetima, a posljedice stresa dovode do smanjenog rasta i razvoja biljke. U svojem prirodnom staništu, biljke su većinu vremena izložene različitim čimbenicima stresa koji se mogu podijeliti u dvije velike skupine: biotski i abiotski stres. Abiotski stres uključuje različite okolišne čimbenike kao što su visoki intenzitet svjetla, nedostatak vode kao i iznenadne poplave, povišeni salinitet tla, nepovoljne (preniske ili previsoke) temperature za određeni dio godine i sl. Biotski stres uzrokuju patogeni (virusi, bakterije, gljivice itd.) koji uzrokuju različita oboljenja.⁹

Povećani salinitet tla je jedan od gorućih problema koji se pojavljuju uslijed klimatskih promjena. Najviše se primjećuje na području Mediterana i na ostalim geografskih područjima uz obale mora. Preko 7% ukupne zemlje i oko 20% navodnjavanih zemljišta je pogođeno povećanim salinitetom. S obzirom na to da se globalne klimatske promjene ne smanjuju, naprotiv one su iz dana u dan sve vidljivije, očekuje se da će postotak povećanog saliniteta tla i suša biti još i veći u narednim godinama.² Povećani salinitet tla na kojem biljka raste dovodi do kompleksnog stanja koji rezultira dehidratacijom biljke (osmotski stres) i toksičnim efektom uslijed nakupljanja soli u biljnom tkivu. Sol s vanjske strane korijena otežava ulazak vode u stanice te isušuje biljno tkivo. Toksičnost se javlja kada je akumulacija soli unutar biljke iznad određene granice tolerancije.² Kemijski signali se šalju dalje od korijena prema ostalim dijelovima biljke gdje potom započinju razni molekularni i biokemijski procesi koji u konačnici daju morfološke odgovore biljke na okolišne uvjete. Stres utječe na promjene u rastu i razvoju biljaka zbog kumulativnog učinka na fiziološke i biokemijske procese kao što su prekomjerna proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), homeostaza iona, ravnoteža vode u biljci, nakupljanje osmolita, metabolizam antioksidansa, fotosintetski kapacitet biljke itd.³

Proces fotosinteze koji je ključan za asimilaciju ugljika i rast biljaka može biti značajno narušen solnim stresom ovisno o vrsti biljke i njejoj prirodnoj toleranciji, vremenskom trajanju stresa i koncentraciji soli. Niske koncentracije soli najčešće izazivaju prilagodbu fotosintetskog sustava, dakle nemaju znatnijeg utjecaja kod većine biljaka na

promjene u fotosintetskoj efikasnosti. Za razliku od niskih, visoke koncentracije soli uglavnom izazivaju smanjenje fotosintetske učinkovitosti jer dolazi do inhibicije prijenosa elektrona.⁴ Sve navedene promjene djeluju nepovoljno na biljku što dovodi do velikih ekonomskih gubitaka u poljoprivrednoj i prehrambenoj proizvodnji. Sustavno istraživanje solnog stresa, mehanizama tolerancije biljaka kao i selekciju i uzgoj otpornijih vrsta su od velike važnosti za uspješnu poljoprivrednu i prehrambenu proizvodnju u budućnosti.³

Reaktivne kisikove vrste (ROS) su toksični nusprodukti aerobnog metabolizma. To je skupina veoma reaktivnih molekula koje uključuju reaktivne kisikove vrste (ROS), superoksidi (O_2^{\bullet}), hidroksili (HO^{\bullet}), peroksidi (ROO^{\bullet}), vodikov peroksid (H_2O_2), slobodni kisik (O_2), dušikove okside (NO^{\bullet}), peroksinitrate ($ONOO^{\bullet}$) i hipokloride ($HOCl$).¹⁰ ROS posjeduju jaku sposobnost oksidacije uzrokujući oštećenja membrana, nepovratnu metaboličnu disfunkciju i u konačnici smrt stanica.¹¹ Iz stanica se uklanjaju pomoću antioksidansa i antioksidacijskih enzima koji sudjeluju u neutralizaciji reaktivnih kisikovih vrsta.¹²

Antioksidansi se načelno mogu podijeliti na enzimske i neenzimske antioksidanse. Enzimski antioksidacijski sustav podrazumijeva superoksid-dismutazu, askorbat-peroksidazu, katalazu i dr. Jedan od predstavnika neenzimskih antioksidansa su i fenolne kiseline. Općenito, antioksidativno djelovanje fenolnih kiselina raste s povećanjem broja hidroksilnih grupa, iako fenolne kiseline koje imaju na poziciji 3- i 5- metoksilne grupe imaju smanjenu aktivnost. Hidroksicimetne kiseline pokazuju jaču aktivnost u usporedbi s hidroksibenzojevim kiselinama jer posjeduju $CH=CH-COOH$ grupu koja lakše donira H atome nego $-COOH$ skupina prisutna u hidroksibenzojevim kiselinama.¹³

2.2. Kupusnjače

Kupusnjače su široko rasprostranjene biljne vrste koje pripadaju porodici Brassicaceae, a obuhvaćaju mnoge ekonomski važne kulture koje se uzgajaju u poljoprivredi i koriste u prehrani ljudi i životinja. Poznate komercijalne poljoprivredne kulture pripadaju rodu *Brassica* kao što su razne vrste kupusa, kelj, brokula, cvjetača, raštika i dr. Oko 70 milijuna tona kupusa se godišnje proizvede u svijetu od čega se 90% od ukupnog svjetskog kupusa proizvodi u Europi i Aziji.¹⁴ Kupusnjače su nutritivno vrlo vrijedno povrće jer obiluju vitaminima, vlaknima, mineralima.¹⁵ Pored toga kupusnjače obiluju specijaliziranim metabolitima ili fitokemikalijama kao što su polifenoli, glukozinolati, karotenoidi za koje je

dokazano da imaju pozitivni učinak na ljudsko zdravlje, zbog protuupalnog, antioksidativnog, i antikancerogenog djelovanja. Zbog toga se kupusnjače često smatraju funkcionalnom hranom, a često se zbog marketinških razloga nazivaju i „superhrana“.^{16,17,18}

Proizvodnja kupusa kao i ostalih kultura uvelike ovisi o okolišnim uvjetima. Komercijalni uzgoj kupusnjača najviše je zastupljen na Mediteranu u polusušnim i sušnim područjima gdje je redovito i povećan salinitet tla. Nevjerojatna morfološka raznolikost kupusnjača, njihova ubrzana fenotipska evolucija i status „superhrane“ doveli su do potrebe za proširivanjem znanja i novim istraživanjima u tom području.¹⁵ Najkorišteniji model u istraživanju odgovora biljke na abiotski stres u rodu *Brassica* je kineski kupus (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) jer su dostupne informacije o genomu koje uvelike olakšavaju genetska i molekularno-biološka istraživanja. Nedavna istraživanja su pokazala da su biljni hormoni izuzetno važni u odgovoru biljaka na stres.^{4,14} U usporednoj analizi triju vrsta kupusnjača: bijeli kupus (*B. oleracea* var. *capitata*), raštika (*B. oleracea* var. *acephala*) i kineski kupus (*B. rapa* ssp. *pekinensis*) dokazano je da je raštika najtolerantnija na solni stres, zatim bijeli kupus, a kineski kupus se pokazao najosjetljivijim.⁴

2.3. Specijalizirani metaboliti

Rast i razvoj biljke, kao i njezin opstanak te komunikacija s okolinom regulirani su velikim brojem molekula sintetiziranih u biljci, poznatih pod nazivom biljni metaboliti. Biljni metaboliti dijele se u dvije skupine: na primarne i sekundarne metabolite. Primarni metaboliti omogućuju osnovne funkcije u biljci i prisutni su u svim biljkama. To su šećeri, masne kiseline, aminokiseline i nukleinske kiseline. Sekundarni biljni metaboliti su spojevi sintetizirani u biljkama koji sudjeluju u interakciji biljke s okolinom, a produkt su sekundarnog metabolizma. Dugo se smatralo da oni nisu neophodni za rast i razvoj biljaka, no novija istraživanja sve više potvrđuju njihovu esencijalnu ulogu u razvoju biljaka, a posebno u prilagodbi i preživljavanju u nepovoljnim uvjetima. Oni su odgovorni za atraktivne boje cvjetova i plodova, sudjeluju u obrani biljaka od patogena i herbivora, sudjeluju u odgovoru biljaka na nepovoljne okolišne uvjete itd. Stoga se naziv sekundarni metaboliti koji je tradicionalno uvriježen sve više zamjenjuje terminom specijalizirani metaboliti koji je prihvaćen i u ovom radu. Biosintetski putevi i detekcija specijaliziranih metabolita nije u potpunosti istražena jer su pojedine količine tih metabolita u biljci ispod granica detekcije postojećih modernih instrumenata. Određeni specijalizirani biljni metaboliti su osim

specijaliziranih uloga u biljnom rastu i razvitku, odgovorni i za blagotvoran i pozitivan učinak biljaka na zdravlje ljudi stoga ih se naziva i fitokemikalijama. Do danas je otkriveno preko 100 000 takvih spojeva, ali ta se brojka svakodnevno povećava. Mogu se podijeliti u tri velike skupine: fenole, terpene te spojeve s dušikom (alkaloide, glukozinolate i cijanohidrate). U tablici 1 prikazana je podjela specijaliziranih metabolita.

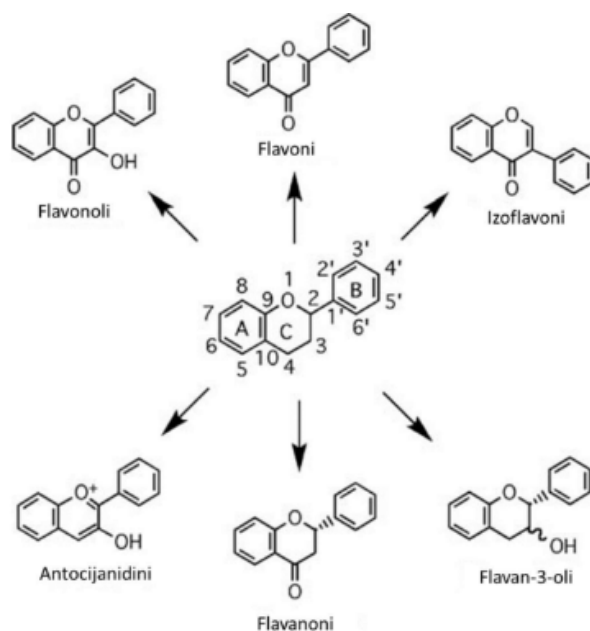
Polifenoli se pojavljuju u svim biljkama i imaju ulogu u biosintezi lignina, a poznati su i kao jaki antioksidansi koji sudjeluju u obrani biljaka od stresa. Alkaloidi, koji imaju puno specifičnije uloge, sintetiziraju se u specifičnim uvjetima i samo u pojedinim vrstama ili kultivarima.¹⁹ Mjesto sinteze nije ujedno i mjesto nakupljanja specijaliziranih metabolita u biljci. Hidrofilni spojevi najčešće se pohranjuju u vakuolama dok su lipofilni spojevi pretežno prisutni u smolnim kanalima, uljnim stanicama, trihomama te kutikuli.²⁰ Iako detaljni procesi biosinteze specijaliziranih metabolita u biljkama još uvijek nisu razjašnjeni, poznato je da biosinteza većine metabolita proizlazi iz putova šikiminske kiseline, acetil-koenzima A, mevalonske kiseline te deoksisiluloze 5-P.²¹

Tablica 1. Podjela specijaliziranih biljnih metabolita na skupine i podskupine.²²

polifenoli		spojevi sa sumporom	terpeni	alkaloidi
flavanoidi	neflavanoidi			
flavonoli	fenolne kiseline	glukozinolati	monoterpeni	benzilizokvinolini
flavoni	hidroksicinamati	izotiocijanati	diterpeni	tropan alkaloidi
flavan-3-oli	stilibeni		seskviterpeni	nikotin
antocijani			triterpeni	terpenoid indol alkaloidi
flavanoni			karotenoidi	purinski alkaloidi
izoflavoni				pirolizidinski alkaloidi
				kvinolizidinski alkaloidi
				steroidal glikoalkaloidi
				konini
				betalaini

2.3.1. Polifenoli

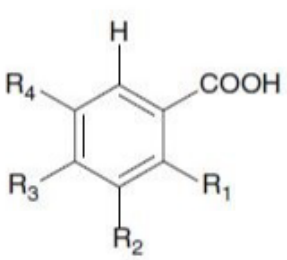
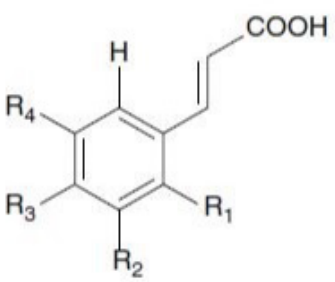
Polifenoli čine najveću skupinu specijaliziranih metabolita. Sastoje se od jednog ili više aromatskih prstena koji posjeduju jednu ili više hidroksilnih skupina.²³ Zbog svoje velike raznolikosti, mogu se podijeliti na različite načine; prema strukturi, na temelju broja ugljikovih atoma u molekuli, biosintetskom putu, biološkoj aktivnosti i sl. U prirodi se najčešće pojavljuju u obliku konjugata sa šećerima ili organskim kiselinama. Polifenoli štite biljku od ultraljubičastog zračenja i djeluju kao signalne molekule u interakciji biljke s okolinom. Generalno se mogu podijeliti u dvije skupine: flavonoide i neflavonoide.²² Podvrste flavonoida: flavoni, flavanoli, izoflavoni, antocijanidini, flavanoni i flavan-3-oli su prikazani na slici 1. Najveća koncentracija flavonoida nalazi se u listovima biljaka i kori voća. Glavni predstavnici neflavonoida su fenolne kiseline, hidroksicinamati i stilibeni.



Slika 1. Predstavnicu flavonoida.²²

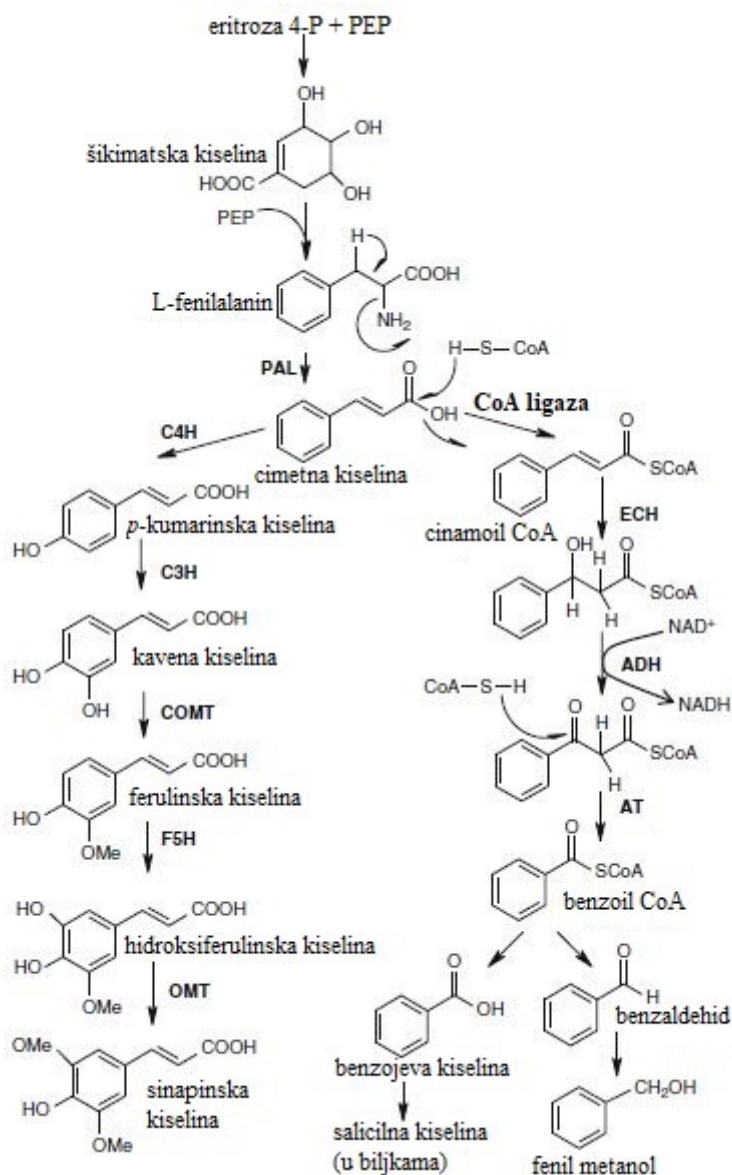
2.3.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline (fenolkarboksilne kiseline) su vrsta fenola koje sadrže fenolni prsten i barem jednu karboksilnu kiselinu. Ovisno o broju ugljikovih jedinica vezanih za fenolni prsten, fenolne kiseline se mogu podijeliti na C6-C3 (potječu od hidroksicimetne kiseline), C6-C2 i C6-C1 (potječu od hidroksibenzojeve kiseline) spojeve. Iako je kostur lanca jednak, fenolne kiseline se međusobno razlikuju prema broju i poziciji hidroksilnih skupina koje se nalaze na aromatskom prstenu (slika 2.).⁶

Hidroksibenzojeve kiseline					
	Ime kiseline	R1	R2	R3	R4
	Benzojeva kiselina	H	H	H	H
	<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	H	H	OH	H
	Vanilinska kiselina	H	OCH ₃	OH	H
	Galna kiselina	H	OH	OH	OH
	Protokatehinska kiselina	H	OH	OH	H
	Siringična kiselina	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
	Gentistična kiselina	OH	H	H	OH
	Veratrična kiselina	H	OCH ₃	OCH ₃	H
	Salicilna kiselina	OH	H	H	H
Hidroksicimetne kiseline					
	Cimetna kiselina	H	H	H	H
	<i>o</i> -kumarinska kiselina	OH	H	H	H
	<i>m</i> -kumarinska kiselina	H	OH	H	H
	<i>p</i> -kumarinska kiselina	H	H	OH	H
	Ferulinska kiselina	H	OCH ₃	OH	H
	Sinapinska kiselina	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
	Kavena kiselina	H	OH	OH	H

Slika 2. Podjela hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina prema supstituentima na aromatskom prstenu.⁶

U literaturi postoji mnogo različitih mehanizama biosinteze fenolnih kiselina. Premda je struktura fenolnih kiselina relativno jednostavna, zanimljivo je da su u njihovu biosintezu uključeni različiti biosintetski putevi. Jedan od mehanizama biosinteze fenolnih kiselina vodi preko puta šikimatske kiseline prikazanog na slici 3.



Slika 3. Jedan od pretpostavljenih mehanizama biosinteze fenolnih kiselina.⁶

Iako se u posljednjih nekoliko godina intenzivno istražuju, detaljni koraci biosintetskih putova nisu još uvijek potpuno razjašnjeni te se u literaturi često nailazi na oprečne rezultate. Većina fenolnih kiselina su derivati trans-cimetne kiseline formirane deaminacijom L-fenilalanina uz pomoć L-fenilalanin amonij-liaze (PAL). Enzim PAL povezuje primarni (biosintetski put šikiminske kiseline) sa sekundarnim metabolizmom (fenil propanoidni biosintetski put) te ima ključnu ulogu u regulaciji sinteze fenolnih specijaliziranih metabolita zbog čega je godinama upravo PAL bio najviše istraživani biljni enzim.²⁴ Prekursor ferulinske i sinapinske kiseline je *p*-kumarinska kiselina dok se salicilna kiselina sintetizira preko benzojeve kiseline. Biotski i

abiotički stres ili kombinacija ta dva stresa često dovode do porasta koncentracije fenolnih kiselina u biljkama. Salicilna kiselina (SA) ima ulogu u regulaciji rasta biljke, njenom razvoju, zrenju i odgovorima biljke na abiotičke stresove i ujedno predstavlja i jedan od biljnih hormona.⁸ Ferulinska kiselina (FA) uzrokuje inhibiciju klijanja sjemena i rast korijena.⁶ Sinapinska kiselina (SiA) povećava sposobnost uklanjanja radikala iz stanica koje su pod solnim stresom i održava koncentraciju elektrolita u stanici.⁷

2.3.3. Uloga fenolnih kiselina u odgovoru biljaka na solni stres

Neka od dosadašnjih istraživanja upućuju na koristan učinak egzogene primjene nekih fenolnih kiselina na biljke koje su osjetljive na solni stres. Miura i Tada izvijestili su da salicilna kiselina (SA) ima veliki agronomski potencijal za poboljšanje tolerancije nekih poljoprivredno važnih kultura na stres.⁸ Međutim, primjenjivost SA ovisi o korištenoj koncentraciji, načinu primjene, biljnoj vrsti i fazi rasta.

SA je fenolna kiselina koja djeluje kao hormon stresa, posreduje reakcije biljaka na biotske i abiotičke stresove. Uz SA, povećana tolerancija na salinitet kod pšenice dobivena je i nakon tretiranja sa sinapinskom, kavenom, ferulinskom i *p*-kumarinskom kiselinom.⁷ Nadalje, pretpostavlja se da su endogena ferulinska i *p*-kumarinska kiselina uključene u mehanizam tolerancije na solni stres u riži.²⁵ Dosadašnja istraživanja na kupusnjačama su pokazala da tolerantnije vrste na solni stres kao što su raštika sadrže veće količine ukupnih fenolnih kiselina, posebno hidroksicimetne kiseline, u usporedbi s osjetljivijim vrstama kao što je kineski kupus.² Uslijed solnog stresa uočeno je smanjenje kavene kiseline, salicilne i 4-kumarinske kiseline u kineskom kupusu dok je količina ferulinske kiseline povećana u raštiki.³ Fenolne kiseline su specifične za različite vrste kupusnjača, a neke mogu sudjelovati u toleranciji na stres. Tolerantne vrste na solni stres imaju višu razinu nekih fenolnih kiselina i manje pate od poremećaja fenolnog metabolizma u uvjetima stresa.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Biljni materijal

U ovom radu korišteno je sjeme kineskog kupusa (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt cv. Cantonner Witkrop) nabavljeno u ISP International Seed Processing GmbH, Quedlinburg, Njemačka.

3.1.2. Kemikalije

- Standardi: prolin, kavena kiselina, galna kiselina, katehin, željezo(II) sulfat-heptahidrat, salicilna kiselina, sinapinska kiselina, ferulinska kiselina, antracen-9-karboksilna kiselina
- Otopala: etanol, metanol, etil-acetat, acetonitril, klorovodična kiselina
- Ostale kemikalije: izosan, agar, natrijev klorid, ninhidrin, octena kiselina, natrijev karbonat, Folin-Ciocalteuov reagens, natrijev nitrit, natrijev molibdat dihidrat, natrijev hidroksid, aluminijev(III) klorid heksahidrat, 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazin, željezov(III) klorid heksahidrat, mravlja kiselina

3.2. Metode

3.2.1. Priprema podloge za uzgoj i tretiranje klijanaca

Korištene su sljedeće podloge za uzgoj i tretman klijanaca kineskog kupusa:

- Podloga za uzgoj klijanaca: 1% agar u destiliranoj vodi
- Podloga za tretiranje klijanaca solnim stresom: 1% agar, 100 mmol dm⁻³ NaCl, u destiliranoj vodi
- Podloge za praćenje učinka fenolnih kiselina na rast klijanaca: 1% agar, odabrana fenolna kiselina u rasponu konc. 1-50 μmol dm⁻³ u destiliranoj vodi

- Podloge za praćenje učinka fenolnih kiselina na klijance u solnom stresu: 1% agar, 100 mmol dm⁻³ NaCl, odabrana fenolna kiselina u rasponu konc. 1-50 μmol dm⁻³ u destiliranoj vodi

Pripremljene otopine 1% agara i 1% agara uz dodatak 100 mmol dm⁻³ NaCl sterilizirane su autoklaviranjem pri temperaturi 120°C i tlaku 1,5 atm u trajanju od 20 minuta. Ohlađene otopine (oko 60°C) razdijeljene su u sterilne Petrijeve zdjelice (oko 20 mL otopine po zdjelici). Za podloge koje sadrže fenolne kiseline potrebno je u ohlađene sterilizirane otopine pipetom dodati različite volumene prethodno pripremljenih standardnih otopina fenolnih kiselina (10 mmol dm⁻³) kako bi se dobile 1, 10 ili 50 μmol dm⁻³ otopine koje se također razdijele u sterilne Petrijeve zdjelice. Za praćenje učinka fenolnih kiselina na rast klijanaca korištene su salicilna i sinapinska kiselina. Nakon što se agar polimerizira, podloge se pohrane na 4 °C do upotrebe.

3.2.2. Sterilizacija i naklijavanje sjemena

Sjemenke kineskog kupusa sterilizirane su inkubiranjem u otopini 3% izosana neposredno prije nasađivanja na podloge. Nakon inkubacije u trajanju od 10 minuta sjemenke su isprane sterilnom mqH₂O (5 puta) te su nasađene u Petrijeve zdjelice za uzgoj klijanaca (1% agar).⁴ Nasađivanje sjemena je obavljeno u laminaru (Klimaoprema), komori s horizontalnim strujanjem sterilnog zraka. Pincete koje su korištene za polaganje sjemena na podloge sterilizirane su uranjanjem u 96%-tni etanol i spaljivanjem na plamenu plinskog plamenika. Zdjelice sa sjemenjem inkubirane su preko noći na 4 °C da bi sjemenke ravnomjerno nabubrile. Sljedećeg dana posudice sa sjemenom su premještene na klijanje u vertikalni položaj kako bi korjenčići prilikom klijanja ostali na površini podloge, u komoru za uzgoj biljaka pri temperaturi 22 °C, fotoperiodu dugog dana (svjetlo 16 h/tama 8 h), intenzitetu svjetla 115 μmol m⁻² s⁻¹, u trajanju od 24 sata.

3.2.3. Testovi inhibicije korijena i mjerenje biomase klijanaca

Sljedećeg dana klijanci (veličine oko 1 cm) presađeni su u laminaru na podloge za tretiranje solnim stresom i podloge za praćenje učinaka fenolnih kiselina u rasponu koncentracija 1-50 μmol dm⁻³. Jedan dio klijanaca presađen je na podlogu za uzgoj klijanaca tj. 1% agar što je poslužilo kao kontrola uz aplicirane tretmane solnog stresa i fenolnih kiselina. Klijanci su položeni u jedan red u gornju polovicu Petrijeve zdjelice kako bi se mogao pratiti rast.

Zdjelice s klijancima vraćene su u komoru za uzgoj biljaka te položene u vertikalni položaj s korijenom klijanaca prema dolje. Nakon 24 i 48 sati tretmana klijanci su analizirani tj. korjenčići su izmjereni i klijanci su izvagani da bi im se odredila svježa masa. Za određivanje suhe mase, klijanci su premješteni u tubice (15 mL) potom smrznuti u tekućem dušiku i liofilizirani u liofilizatoru (Lyovac GT2, Steris), uređaju u kojem se uzorak suši u vakuumu sublimacijom smrznute vode ili otapala. Tako pripremljeni uzorci korišteni su za određivanje različitih biokemijskih parametara opisanih u sljedećim poglavljima.

3.2.4. Spektrofotometrijska mjerenja markera stresa i specijaliziranih metabolita

U uzorcima klijanaca kineskog kupusa koristeći spektrofotometar (Shimadzu) izmjerena je koncentracija prolina, koji se smatra pouzdanim markerom stresa. Određena je i koncentracija polifenolnih grupa specijaliziranih metabolita (ukupni fenoli, ukupne fenolne kiseline, ukupni flavonoidi) te antioksidacijske aktivnosti uzoraka.

3.2.5. Ekstrakcije uzoraka

Za ekstrakciju uzoraka korišteno je prethodno liofilizirano biljno tkivo. Odvagana je određena količina prethodno usitnjenog uzorka i pohranjena u tubicu od 2 mL u koju je potom dodan 1 mL otapala (70% etanol ili 80% metanol ovisno o tome koji su spojevi mjereni) i sadržaj je snažno izmiješan na vorteksu (Tehtnica) nekoliko sekundi. Nakon toga uzorci su homogenizirani u homogenizatoru (Retsch MM 400) u trajanju od 5 minuta pri frekvenciji 30Hz. Potom su tubice s uzorcima uronjene u destiliranu vodu u sonikatoru (SilverCrest) na 20 minuta kako bi se uklonili svi plinovi iz uzorka. Nakon toga su tubice inkubirane na rotacijskom homogenizatoru (Biosan) sat vremena na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja (Eppendorf centrifuga 5415R) u trajanju od 10 minuta na 15 000 rpm, supernatant je pažljivo otpipetiran u čiste tubice i pohranjen na -20 °C za daljnja mjerenja.

3.2.6. Određivanje koncentracije prolina

Koncentracija prolina u biljnim ekstraktima određena je spektrofotometrijski pri 520 nm valne duljine pomoću ninhidrina.²⁶ Potrebna je svježe pripremljena reakcijska otopina 1% ninhidrina u 60% octenoj kiselini i 20% etanola. Takva otopina čuva se u tamnoj boci zbog osjetljivosti na svjetlost. U tubicu od 1,5 mL otpipetiran je 1 mL reakcijske otopine i 100 µL prethodno pripremljenog ekstrakta u 70% etanolu kao što je opisano u odjeljku 1.2.5. Uzorci

su dobro promiješani na vorteksu (Tehtnica) nekoliko sekundi. Uzorci su potom zagrijani u termobloku (Stuart) na 95 °C u trajanju od 20 minuta. Slijepa proba je pripremljena na isti način osim što je umjesto ekstrakta dodano 100 µL otapala (70% etanol). Ako u tubici ima taloga, uzorci se centrifugiraju dvije minute na 10 000 rpm. Supernatant je prebačen u kivete za mjerenje te je mjerena apsorbancija pri valnoj duljini $\lambda = 520$ nm koristeći spektrofotometar (Shimadzu). Koncentracije prolina u uzorcima izračunate su iz baždarnе krivulje konstruirane mjerenjem apsorbancije otopina prolina poznatih koncentracija (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1 i 1,5 mmol dm⁻³). Razrjeđenja prolina napravljena su iz početne otopine standarda prolina koncentracije 10 mmol dm⁻³ u 70% etanolu. Na osnovu dobivenih vrijednosti apsorbancija konstruiran je pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji iz kojeg se dobije jednadžba pravca koja se koristi za izračun koncentracije prolina u uzorcima. Koncentracija se izrazi u jedinici µmol dm⁻³ mg⁻¹ suhe tvari.

3.2.7. *Određivanje koncentracije ukupnih fenolnih kiselina*

Koncentracija ukupnih fenolnih kiselina u biljnim ekstraktima određena je spektrofotometrijski koristeći Arnog reagens prema protokolu European Pharmacopoeia.²⁷ Pripremljena je svježa otopina Arnog reagensa (10% NaNO₂ i 10% NaMoO₄·2H₂O u 10 mL mqH₂O). U kivetu je dodano: 500 µL mq H₂O, 100 µL ekstrakta (za slijepu probu 80% metanol umjesto ekstrakta), 100 µL otopine HCl (0,5 mol dm⁻³) i 100 µL otopine Arnog reagensa. Važno je dobro promiješati sadržaj u kiveti pomoću pipete. Dodano je još po 100 µL otopine NaOH (1 mol dm⁻³) i 100 µL mqH₂O, sadržaj u kiveti je resuspendiran pipetom i izmjerene su apsorbancije na valnoj duljini $\lambda = 490$ nm. Za izradu baždarnе krivulje korištena je standardna otopina kavene kiseline (1 mg mL⁻¹ u 80% metanolu) za pripremu razrjeđenja od 10-500 mg L⁻¹. Na osnovu izmjerenih apsorbancija i poznatih koncentracija kavene kiseline konstruiran je baždarni pravac na osnovu kojeg su određene koncentracije ukupnih fenolnih kiselina u uzorcima i izražene kao ekvivalent miligrama kavene kiseline po gramu suhe tvari (mg CAE g⁻¹).

3.2.8. *Određivanje koncentracije ukupnih fenola*

Za određivanje koncentracije ukupnih fenola u biljnim ekstraktima korištena je metoda koja se temelji na reakciji Folin-Ciocalteuova (FC) reagensa (kompleks fosfomolibdene/fosfovolframne kiseline) s reducirajućim agensom (fenolnim

spojem/antioksidansom) pri čemu dolazi do promjene boje otopine iz žute u plavu.²⁸ U kivetu od 2 mL otpipetirano je 1500 μL mqH_2O , 100 μL uzorka (za slijepu probu umjesto uzorka dodano je 80% metanol), 100 μL FC reagensa i 300 μL zasićene 20% otopine Na_2CO_3 . Sadržaj u kiveti je dobro resuspendiran pomoću pipete i uzorci su inkubirani 2 sata pri sobnoj temperaturi u mraku. Izmjerena je apsorbanacija uzoraka pri valnoj duljini $\lambda = 765 \text{ nm}$. Za izradu baždarne krivulje korištena je početna otopina standarda galne kiseline (GAE) 2500 mg L^{-1} u 80% metanolu. Napravljena je serija razrjeđenja standarda od 100-1400 mg L^{-1} i izmjerene su apsorbanacije. Na osnovu tih podataka konstruiran je baždarni pravac pomoću kojeg su izračunate koncentracije ukupnih fenola u uzorcima koje su izražene kao ekvivalent galne kiseline po gramu suhe tvari (mg GAE g^{-1}).

3.2.9. Određivanje koncentracije ukupnih flavonoida

Određivanje flavonoida temelji se na svojstvu flavonoida da s aluminijevim kloridom (AlCl_3) (1:10 w/v) tvore kompleks, a intenzitet obojenja proporcionalan je količini prisutnih flavonoida.²⁹ U kivetu se dodaje: 800 μL mqH_2O , 200 μL uzorka (za slijepu probu umjesto uzorka otapalo), 60 μL otopine NaNO_2 u kojoj je omjer mase i volumena 1:20, 60 μL otopine $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ u kojoj je omjer mase i volumena 1:10, 400 μL otopine NaOH (1 mol dm^{-3}) te 480 μL mqH_2O . Dobivena otopina je crveno obojena. Sve se dobro promiješa i mjeri se apsorbanacija pri valnoj duljini $\lambda = 510 \text{ nm}$. Za izradu baždarne krivulje potrebno je napraviti razrjeđenja standardne otopine katehina (1 mg mL^{-1}) u vodi od 50, 100, 150, 200 te 250 mg L^{-1} za mjerenje apsorbanacije pri 510 nm valne duljine. Koncentracije flavonoida izražene su u miligramu ekvivalenata katehina po gramu suhe tvari (mg CE g^{-1}).

3.2.10. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Antioksidacijska aktivnost uzoraka mjerena je metodom FRAP.³⁰ Mehanizam FRAP (eng. *Ferric Reducing/Antioxidant Power*) metode temelji se na prijenosu elektrona, a kompleks željeza s 2,4,6-tripiridil-s-triazinom, $\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$, koristi se kao oksidans. Redukcijom žuto obojenog kompleksa Fe(III)-TPTZ u Fe(II) u prisutnosti antioksidansa i pri niskom pH reakcijska smjesa mijenja boju u plavo čiji je maksimum apsorbanacije na valnoj duljini 593 nm. Koristi se svježe pripremljeni reagens FRAP koji se dobije miješanjem acetatnog pufera (300 mmol dm^{-3} , $\text{pH}=3,6$), otopine 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) (10 mmol dm^{-3} u 40 mmol dm^{-3} klorovodičnoj kiselinu) te 20 mmol dm^{-3} vodene otopine $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ u

volumnom omjeru 10:1:1 (25 mL: 2,5 mL: 2,5 mL). U kiveti se pomiješa 10 μL uzorka (u slijepu probu umjesto uzorka se doda 80 % MeOH), 40 μL 80 % MeOH i 950 μL reagensa FRAP, dobro se promiješa i nakon točno 4 minute se izmjeri apsorbancija pri $\lambda = 593 \text{ nm}$. Za izradu baždarne krivulje pripremi se osnovna vodena otopina željezo(II) sulfat-heptahidrata ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) koncentracije 1 mmol dm^{-3} . Iz tako pripremljene otopine naprave se razrjeđenja koncentracija 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 te 1 mmol dm^{-3} . U kiveti se pomiješa 50 μL prethodno pripremljenih razrjeđenja s 950 μL reagensa FRAP te se izmjeri apsorbancija pri 593 nm nakon točno 4 minute, ponovno u odnosu na slijepu probu. Na temelju baždarnog pravca odredi se antioksidacijska aktivnost uzoraka izražena u $\mu\text{mol dm}^{-3} \text{ FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ po gramu suhe tvari.

3.2.11. Analiza specifičnih fenolnih kiselina metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti

Kromatografija je metoda odvajanja koja se zasniva na različitoj raspodjeli komponenti uzorka između dvije faze od kojih je jedna nepokretna (stacionarna) a druga pokretna (mobilna). Stacionarna faza može biti čvrsta ili tekuća, a mobilna tekuća (tekućinska kromatografija) ili plinovita (plinska kromatografija). Komponente se pod utjecajem mobilne faze kreću kroz stacionarnu fazu različitom brzinom i tako se razdvajaju.³¹ Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC) se koristi za razdvajanje sastojaka na temelju kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze u koloni. Metoda HPLC omogućuje kvantitativnu i kvalitativnu analizu različitih uzoraka. Komponente se razdvajaju na temelju različite raspodjele između dvije faze: mobilne koja nosi smjesu analita kroz porozni materijal (stacionarnu fazu), pri čemu uslijed različitih vrsta interakcija analita sa stacionarnom fazom, dolazi do razlike u vremenima prolaska komponenti analiziranog uzorka. Vrijeme koje je potrebno komponenti da prijeđe put od ulaska na kolonu do detektora pod određenim uvjetima temperature i tlaka naziva se vrijeme zadržavanja te je karakteristično za pojedine analite. Grafički prikaz rezultata naziva se kromatogram. HPLC se dijeli na kromatografiju normalnih faza i kromatografiju obrnutih faza. Kromatografiju obrnutih faza, koja je korištena u ovome radu, karakterizira nepolarna nepokretna faza, koja je najčešće silikagel s kemijski vezanim aktivnim slojem i polarna pokretna faza, koja se sastoji od jednog ili više organskih otapala te vode, odnosno pufera. Redosljed izlaska analita iz kolone je od hidrofilnijih prema hidrofobnijim spojevima. Kromatografsko eluiranje pri

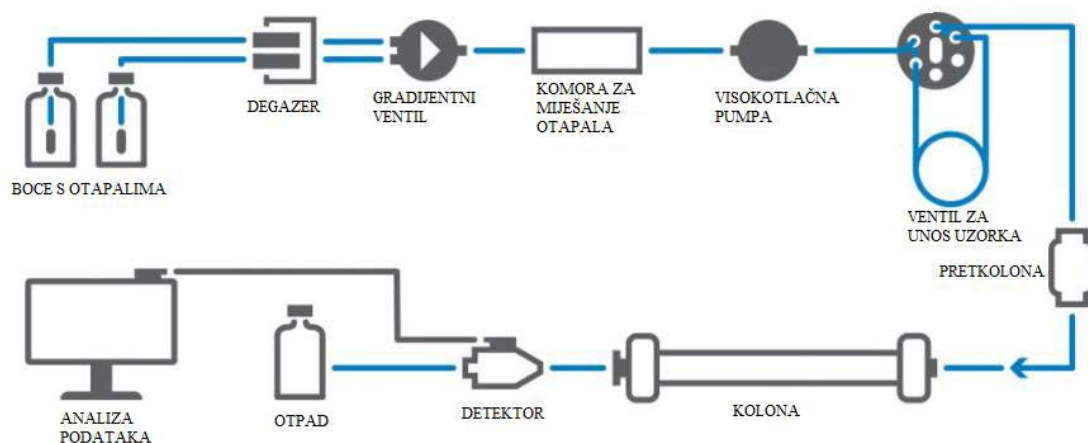
kojem sastav otapala ostaje nepromijenjen tijekom analize naziva se izokratno eluiranje. U svrhu identifikacije i kvantifikacije specifičnih fenolnih kiselina korišteno je gradijentno eluiranje pri kojem se sastav otapala mijenja tijekom analize.³²

3.2.12. Ekstrakcije ukupnih fenolnih kiselina

Protokol za ekstrakciju uzoraka koji se analiziraju HPLC metodom gotovo je jednak protokolu za ekstrakciju uzoraka opisanom u poglavlju 1.2.5.³³ Liofilizirano biljno tkivo (40 do 50 mg) ekstrahirano je u 1,5 mL 80% metanola u kojem se nalazi i 20 µg mL⁻¹ antracen-9-karbonsilna kiselina (An-9-CA) koji služi kao unutarnji standard. Dobiveni supernatant u tubici je uparen do suha u struji dušika na temperaturi od 40 °C. Potom slijedi alkalna hidroliza uzoraka kako bi se konjugirane fenolne kiseline oslobodile i bile dostupne za analizu. U tu svrhu talog je otopljen u 500 µL vodene otopine NaOH (2 mol dm⁻³), te su uzorci inkubirani u termobloku (Stuart) na 95 °C u trajanju od sat vremena. Uzorci su potom ohlađeni na ledu i dodano im se oko 500 µL vodene otopine HCl (2 mol dm⁻³) pazeći da pH u uzorku bude 2. pH je provjeren i podešen pomoću pH papirića. Slijedi višekratna ekstrakcija uzorka pomoću etil acetata, 3 puta po 500 µL etil acetata, gornji sloj u tubici je otpipetiran i odvojen od donjeg, vodenog sloja. Dobiveni ekstrakt je uparen do suha u struji dušika pri sobnoj temperaturi i u tubicu je dodano 200 µL acetonitrila. Prije injektiranja uzoraka u kolonu HPLC potrebno je uzorke profiltrirati kroz filter (0,45 µm). U tubice za HPLC, u koje je umetnut i insert (zbog malog volumena u tubici taj umetak povećava visinu tekućine u tubici) otpipetira se 100 µL uzorka i tubice se polože na predviđena mjesta u automatski uređaj za injektiranje uzoraka. Potrebno je pripremiti i otopine poznatih koncentracija standarda fenolnih kiselina. Pripremljene su otopine salicilne, sinapinske i ferulinske kiseline u acetonitrilu koncentracije 1 mg mL⁻¹. Napravljene su smjese standarda u rasponu koncentracija 40-100 mg mL⁻¹ kako bi se odredilo retencijsko vrijeme i spektri pojedinih fenolnih kiselina od interesa.

3.2.13. Analiza uzoraka metodom HPLC

Na slici 4. Prikazana je shema uređaja HPLC.



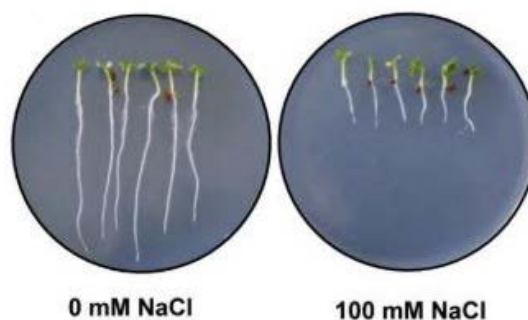
Slika 4. Shema uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (HPLC).³⁴

Na samom početku uređaja HPLC, nalaze se dvije boce s otapalima, miješanjem otapala dobije se pokretna faza. Otplinjač (*degaser*) uklanja plinove koji su ostali otopljeni u otapalima. Miješanje otapala odvija se u komori za miješanje. Mobilna faza prolazi kroz visokotlačne pumpe (Knauer) čiji je maksimalni tlak podešen na 40 Pa. Uzorci se unose pomoću automatskog instrumenta za nanošenje uzoraka (*autoinjector* Triathlon). Prije kolone, nalazi se pretkolona koja štiti glavnu kromatografsku kolonu. Nakon prolaska kroz kolonu, analiti se detektiraju na detektoru (K-2800, Knauer). Korištena je kolona C18 (Kinetex Gemini, $2.6 \times 100 \times 50$). Temperature kolone je podešena na 40 °C. Vodena faza 0,1% mravlje kiseline u mqH_2O čini otapalo A, dok otapalo B čini organska faza 0,1% mravlje kiseline u acetonitrilu. U uređaj HPLC je injektirano 50 μL uzorka ili standarda, a brzina protoka je postavljena na 1 mL po minuti. Gradijent razdvajanja (separacije) je programiran na sljedeći način: 0–10 min 2% B, 10–25 min 5% B, 25–30 min 10% B, 30–40 min 13% B, 40–45 min 15% B, 45–50 min 22% B, 50–60 min 30% B, 60–65 min 40% B, 65–70 min 60% B, 70–92 min 98% B, 92–105 min 2% B. Kromatogrami su analizirani korištenjem programa Chrom-Gate 2.8 (Knauer). Fenolne kiseline u uzorcima određene su uspoređivanjem retencijskih vremena i spektara signala s odgovarajućim standardima na četiri valne duljine $\lambda=230, 280, 300$ i 330 nm.

§ 4. REZULTATI

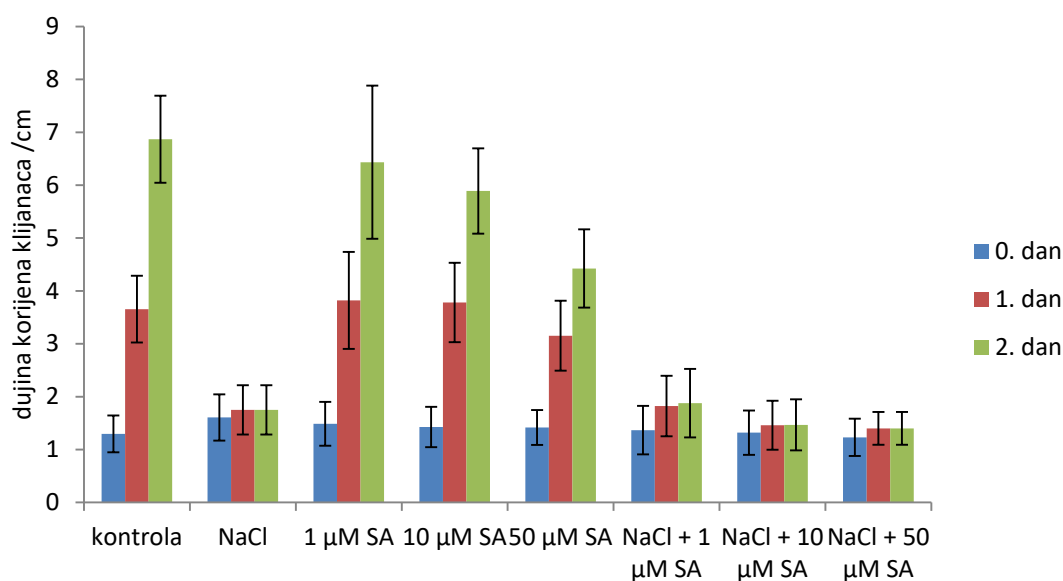
4.1. Testovi inhibicije korijena i mjerenje biomase klijanaca uslijed primijenjenih tretmana

Utjecaj solnog stresa i učinak fenolnih kiselina na rast korijena klijanaca kineskog kupusa ispitan je biotestom inhibicije korijena. Klijanci veličine korijena oko 1 cm podvrgnuti su tretmanima opisanim u materijalu i metodama u ukupnom trajanju od 48 h te je očitani prirast korijena nakon 24 i 48 h. Usporedba veličine kontrolnih uzoraka klijanaca i klijanaca na solnom stresu nakon 24 sata prikazana je na slici 5.

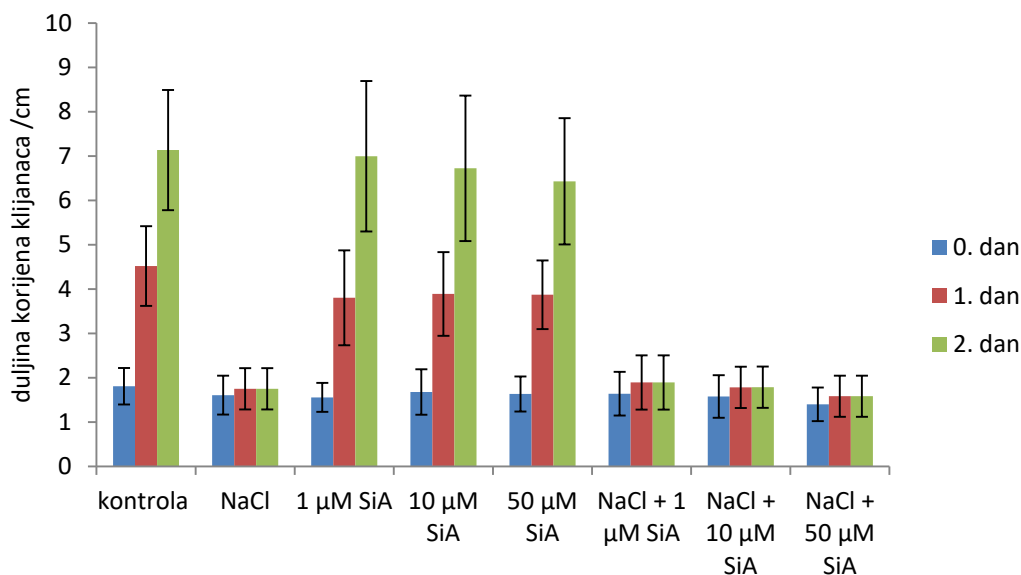


Slika 5. Klijanci koji su rasli na podlozi za uzgoj klijanaca (lijevo) i klijanci koji su rasli na podlozi za tretiranje klijanaca solnim stresom (desno) nakon 24 h.⁵

Vidljiva je značajna inhibicija rasta korijena i cijelih klijanaca uslijed tretmana solnim stresom. Na slikama 6. i 7. prikazani su rezultati duljine korijena klijanaca u trajanju 24 i 48 h na različito tretiranim uzorcima u usporedbi s netretiranom kontrolom. Rađene su 3 biološke replike uzoraka po tretmanu te su prikazane srednje vrijednosti duljina korijena klijanaca \pm standardna devijacija (SD).



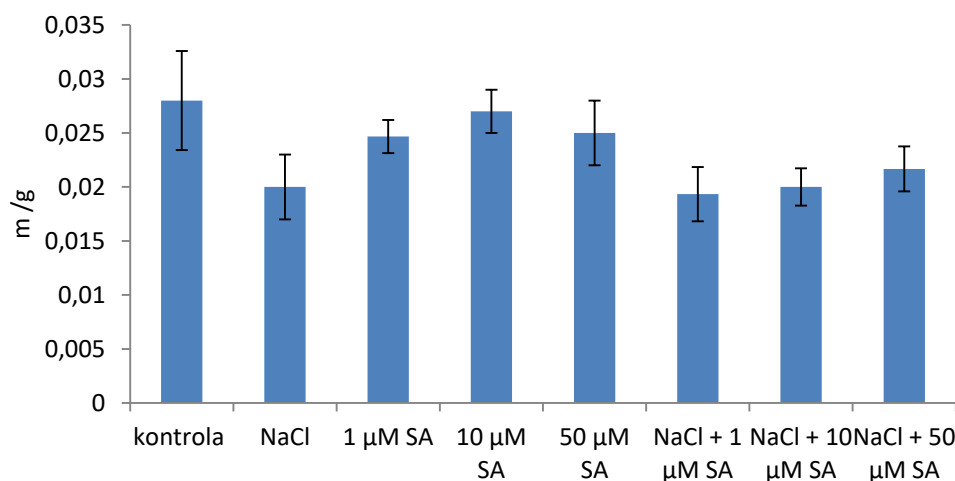
Slika 6. Duljina korijena klijanaca uzgajanih na podlozi za uzgoj klijanaca (kontrola), podlozi za tretiranje klijanaca solnim stresom tj. 100 mmol dm^{-3} NaCl (NaCl), podlogama za praćenje učinka salicilne kiseline na rast klijanaca (1, 10 i 50 µmol dm^{-3} SA) i podlogama za praćenje učinka salicilne kiseline na klijance u solnom stresu (NaCl+SA). Rezultati su srednja vrijednost 30 klijanaca \pm SD.



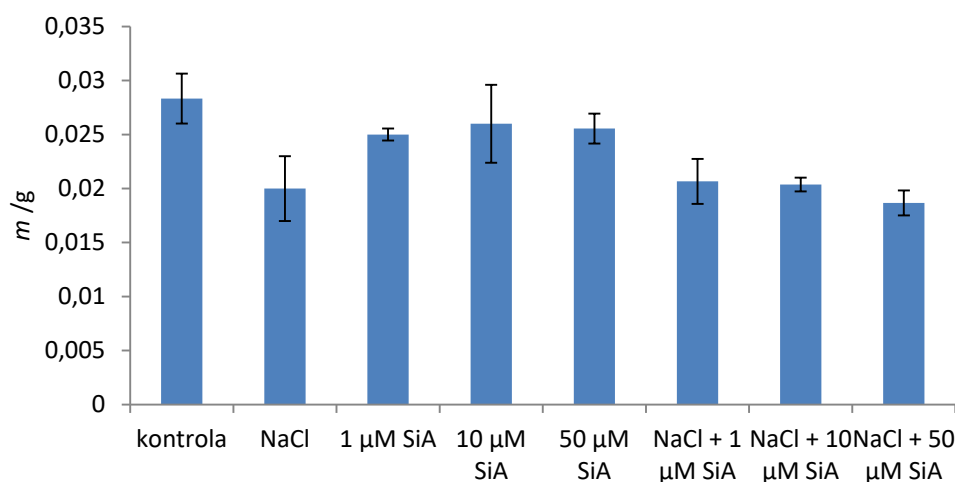
Slika 7. Duljina korijena klijanaca uzgajanih na podlozi za uzgoj klijanaca (kontrola), podlozi za tretiranje klijanaca solnim stresom tj. 100 mmol dm^{-3} NaCl (NaCl), podlogama za praćenje učinka sinapinske kiseline na rast klijanaca (1, 10 i 50 µmol dm^{-3} SiA) i podlogama za praćenje učinka sinapinske kiseline na klijance u solnom stresu (NaCl+SiA). Rezultati su srednja vrijednost 30 klijanaca \pm SD.

Na podlogama za uzgoj klijanaca (kontrola) vidljiv je pozitivan rast korijena kroz 48 h. Najduže izmjereni korijen klijanca iznosi 9 cm. Klijanci koji su bili izloženi solnom stresu značajno su inhibirani u rastu. Nakon prvih 24 h narasli su tek par milimetara, dok je kod većine duljina korijena ostala nepromijenjena u sljedećih 24 h. Na podlogama koje su sadržavale fenolnu (salicilnu, odnosno sinapinsku) kiselinu, najveći prirast vidljiv je na podlozi koja je sadržavala $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ fenolne kiseline u odnosu na podloge s 10, odnosno $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ fenolne kiseline. Duljina korijena klijanaca tretiranih fenolnom kiselinom nakon 48 h nešto je manja naspram kontrolnih uzoraka. Na podlogama za praćenje učinka fenolne kiseline na klijance u solnom stresu pokazalo se da je relativno najveći prirast na podlozi s $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ fenolne kiseline, iako klijanci na toj podlozi nisu značajno više narasli u odnosu na one koji su bili na podlogama koje su sadržavale 10, odnosno $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ fenolne kiseline. Uspoređujući duljine korijena klijanaca na solnom stresu, s tretmanom fenolne kiseline i one bez tretmana, relativno je veći prirast kod uzoraka koji su bili tretirani fenolnom kiselinom iako je ta razlika veoma malena da bi se moglo govoriti o značajnoj razlici. Nešto je pozitivniji učinak primijećen na klijancima koji su tretirani salicilnom u odnosu na sinapinsku kiselinu.

Nakon 48 h rasta, klijanci, sa svih vrsta podloga, su izvagani i izračunata je srednja vrijednost svježe biomase pojedinog klijanca (slike 8. i 9.).



Slika 8. Svježa biomasa pojedinog klijanca uzgajanog na podlozi za uzgoj klijanaca (kontrola), podlozi za tretiranje klijanaca solnim stresom tj. 100 mmol dm^{-3} NaCl (NaCl), podlogama za praćenje učinka salicilne kiseline na rast klijanaca (1 , 10 i $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ SA) i podlogama za praćenje učinka salicilne kiseline na klijance u solnom stresu (NaCl+SA). Rezultati predstavljaju srednju vrijednost 30 klijanaca \pm SD.

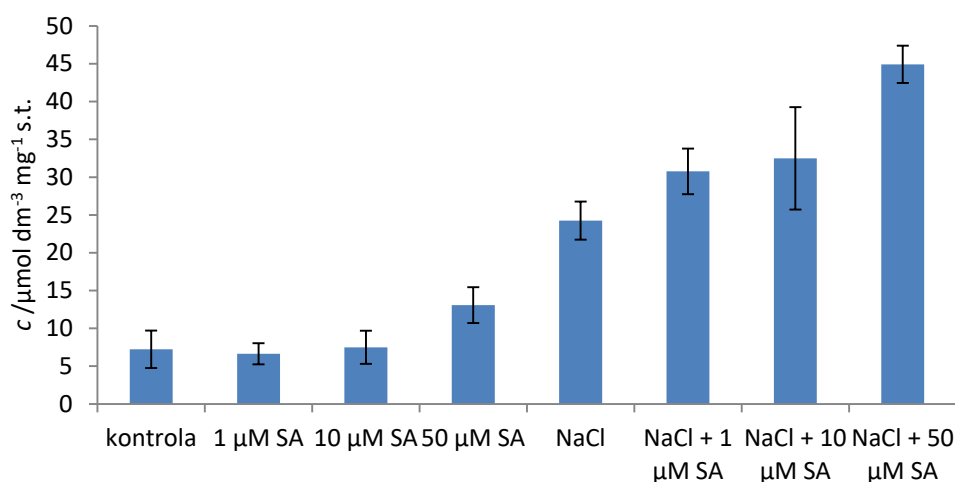


Slika 9. Svježa biomasa pojedinog klijanca uzgajanog na podlozi za uzgoj klijanaca (kontrola), podlozi za tretiranje klijanaca solnim stresom tj. 100 mmol dm^{-3} NaCl (NaCl), podlogama za praćenje učinka sinapinske kiseline na rast klijanaca (1 , 10 i 50 μmol dm^{-3} SiA) i podlogama za praćenje učinka sinapinske kiseline na klijance u solnom stresu (NaCl+SA). Rezultati predstavljaju srednju vrijednost 30 klijanaca \pm SD.

Rezultati su u skladu s rezultatima rasta korijena te pokazuju značajnu razliku u svježim biomasama kontrole i uzoraka na solnom stresu. U prisutnosti stresora klijanci postižu 70-80% biomase s obzirom na kontrolu. S obzirom na to da klijanci koji nisu bili na solnom stresu pokazuju najveći prirast očekivano je i njihova biomasa najveća. Svježa biomasa klijanca na podlozi tretiranom 10 μmol dm^{-3} salicilnom odnosno sinapinskom kiselinom veća je od one na 1 , odnosno 50 μmol dm^{-3} . Rezultati se međusobno najviše razlikuju po vrijednostima biomase klijanca na podlogama za praćenje učinka fenolne kiseline na klijance u solnom stresu. Na slici 8. vidljivo je da. porastom koncentracije salicilne kiseline raste i vrijednost biomase, dok se na slici 9. vidi da porast koncentracije sinapinske kiseline negativno utječe na vrijednost svježe biomase klijanca. Nakon liofilizacije uzorcima je izmjerena suha biomasa koja je uglavnom iznosila oko 10% svježe biomase.

4.2. Određivanje koncentracije prolina kao markera stresa

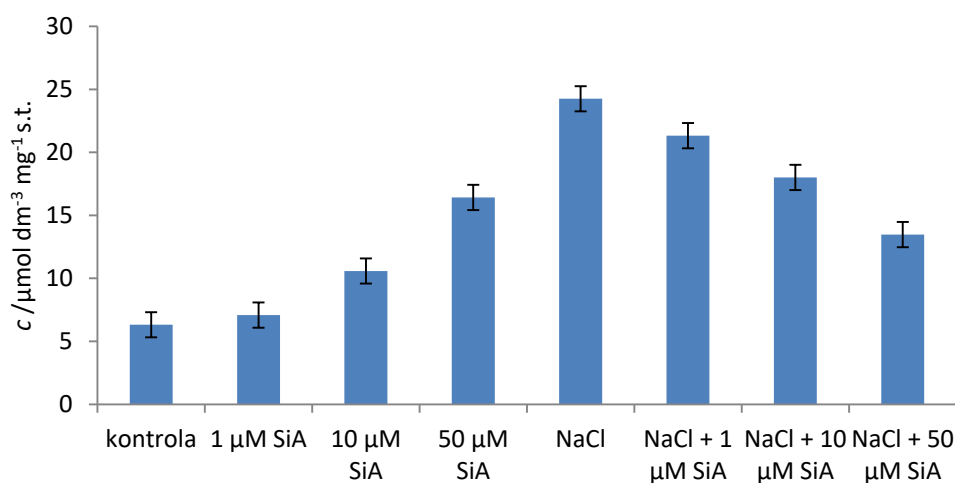
Koncentracija prolina u biljnim ekstraktima određena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini 520 nm pomoću ninhidrina.²⁶ Koncentracije prolina u uzorcima biljnih ekstrakata (slike 10. i 11.) izračunate su koristeći baždarnu krivulju koja je konstruirana mjerenjem apsorpcije otopina prolina poznate koncentracije (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1 i 1,5 mmol dm⁻³) prema sljedećoj formuli: $y = 0,0015x$, $R^2 = 0,9994$.



Slika 10. Koncentracija prolina u klijancima kineskog kupusa uzgajanih na podlozi za uzgoj klijanaca (kontrola), podlogama za praćenje učinka salicilne kiseline na rast klijanaca (1, 10 i 50 μmol dm⁻³ SA), podlozi za tretiranje klijanaca solnim stresom tj. 100 mmol dm⁻³ NaCl (NaCl) i podlogama za praćenje učinka salicilne kiseline na klijance u solnom stresu (NaCl+SA). Rezultati su srednja vrijednost 3 biološke replike ± SD. Jedna biološka replika predstavlja klijance tretirane u jednoj Petrijevoj zdjelici.

Na slici 10. može se vidjeti velika razlika u koncentraciji između uzoraka kontrole i uzoraka koji su bili izloženi solnom stresu. Uslijed solnog stresa koncentracija prolina se povećala oko 5 puta s obzirom na kontrole. Uspoređujući uzorke kontrole i uzorke koji su bili tretirani salicilnom kiselinom u koncentracijama 1 i 10 μmol dm⁻³ nije vidljiva značajna razlika u koncentracijama prolina, dok je uzorak s koncentracijom 50 μmol dm⁻³ SA uzrokovao povećanje prolina, oko dva puta u odnosu na kontrolu. Veće razlike u koncentraciji mogu se primijetiti usporede li se uzorci koji su bili pod solnim stresom i oni koji su bili tretirani salicilnom kiselinom pod solnim stresom. Povećanjem koncentracije salicilne kiseline u uzorcima na solnom stresu, povećava se i koncentracija prolina koja najveću vrijednost

postiže u uzorcima na solnom stresu tretiranim salicilnom kiselinom koncentracije $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$.



Slika 11. Koncentracija prolina u klijancima kineskog kupusa uzgajanih na podlozi za uzgoj klijanaca (kontrola), podlogama za praćenje učinka sinapinske kiseline na rast klijanaca (1, 10 i $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ SiA), podlozi za tretiranje klijanaca solnim stresom tj. 100 mmol dm^{-3} NaCl (NaCl) i podlogama za praćenje učinka sinapinske kiseline na klijance u solnom stresu (NaCl+SiA). Rezultati su srednja vrijednost 3 biološke replike \pm SD. Jedna biološka replika predstavlja klijance tretirane u jednoj Petrijevoj zdjelici.

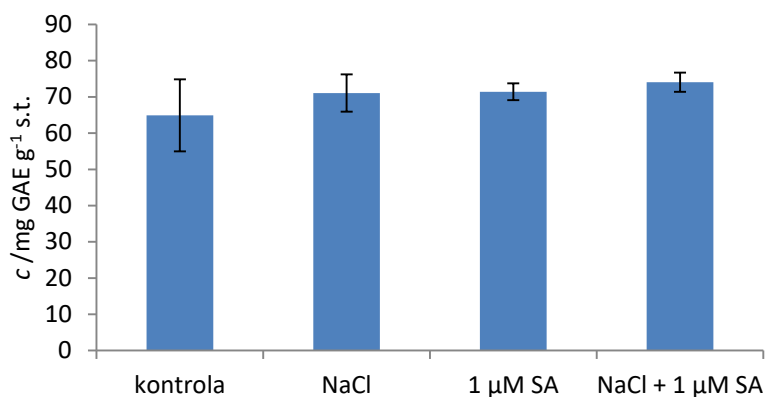
Na slici 11. prikazani su rezultati tretmana sa sinapinskom kiselinom. Koncentracija prolina u uzorcima tretiranim sinapinskom kiselinom raste u skladu s povećanjem koncentracije sinapinske kiseline ($1-50 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Razlika koncentracije prolina tretiranih uzoraka sinapinskom kiselinom u odnosu na koncentraciju prolina u kontrolnim uzorcima značajnija je u usporedbi s tretmanima salicilnom kiselinom (slika 10.). Najveću koncentraciju prolina pokazuju uzorci koji su pod solnim stresom (oko $5 \times$ više od kontrole). Zanimljivo je da se koncentracija prolina smanjuje u uzorcima pod solnim stresom koji su tretirani sinapinskom kiselinom u rasponu koncentracija ($1-50 \mu\text{mol dm}^{-3}$).

4.3. Spektrofotometrijska mjerenja specijaliziranih metabolita

S obzirom na prethodne rezultate, za određivanje specijaliziranih metabolita izabrani su tretmani s fenolnim kiselinama, salicilnom i sinapinskom koncentracije $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$.

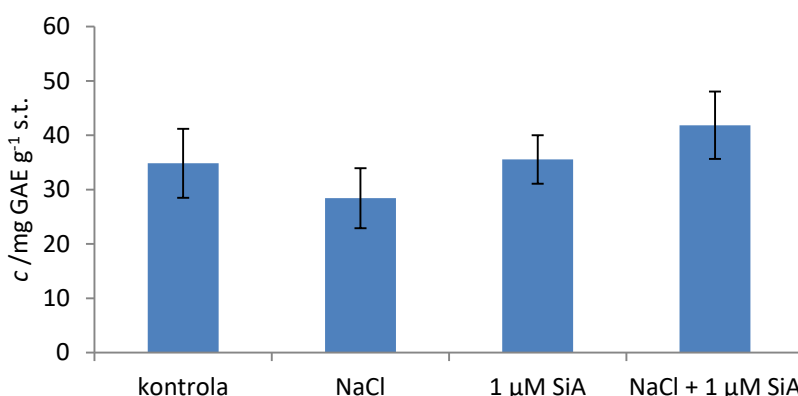
4.3.1. Ukupni polifenoli

Za određivanje koncentracije ukupnih fenola u biljnim ekstraktima korištena je metoda koja se bazira na reakciji Folin-Ciocalteuova (FC) reagensa (kompleks fosfomolibdene/fosfovolframne kiseline) s reducirajućim agensom (fenolnim spojem/antioksidansom).²⁸ Konstruiran je baždarni pravac pomoću kojeg su izračunate koncentracije ukupnih fenola (slika 12. i 13.) u uzorcima klijanaca koje su izražene kao ekvivalent galne kiseline po gramu suhe tvari ($\text{mg GAE g}^{-1} \text{ s.t.}$), prema formuli iz baždarnog pravca: $y = 0,0012x$, $R^2 = 0,9982$



Slika 12. Koncentracije ukupnih polifenola u klijanacima kineskog kupusa uzgajanih na podlozi za uzgoj klijanaca (kontrola), podlozi za tretiranje klijanaca solnim stresom tj. 100 mmol dm^{-3} NaCl (NaCl), podlozi za praćenje učinka salicilne kiseline (koncentracije $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$) na rast klijanaca ($1 \mu\text{M SA}$) i podlozi za praćenje učinka salicilne kiseline (koncentracije $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$) na klijanice u solnom stresu (NaCl + $1 \mu\text{M SA}$). Rezultati su srednja vrijednost 3 biološke replike \pm SD, jedna biološka replika predstavlja klijanice tretirane u jednoj Petrijevoj zdjelici.

Prema dobivenim rezultatima ukupnih polifenola na slici 12. može se reći da su vrijednosti koncentracija približno jednake te da nema značajne razlike u sva četiri tretmana uzorka. Koncentracija ukupnih polifenola stoga ne ovisi o tome je li biljka pod solnim stresom ili ne te je li tretirana prethodno salicilnom kiselinom ili nije.

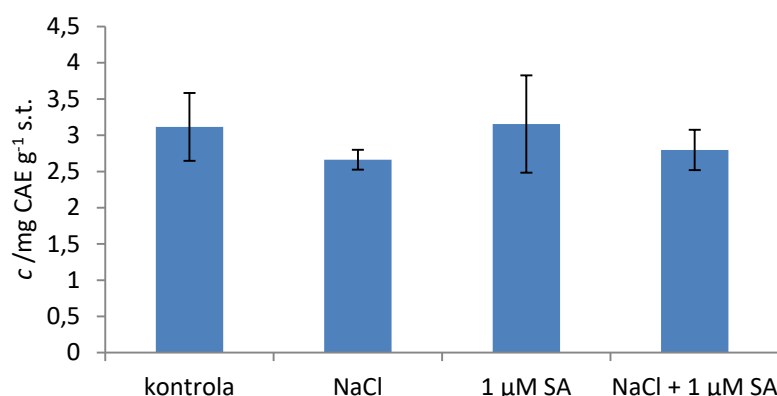


Slika 13. Koncentracije ukupnih polifenola u klijancima kineskog kupusa uzgajanih na podlozi za uzgoj klijanaca (kontrola), podlozi za tretiranje klijanaca solnim stresom (NaCl), podlozi za praćenje učinka sinapinske kiseline (koncentracije $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$) na rast klijanaca ($1 \mu\text{M SiA}$) i podlozi za praćenje učinka sinapinske kiseline (koncentracije $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$) na klijance u solnom stresu (NaCl + $1 \mu\text{M SiA}$). Rezultati su srednja vrijednost 3 biološke replike \pm SD, jedna biološka replika predstavlja klijance tretirane u jednoj Petrijevoj zdjelici.

Za razliku rezultata na slici 12. gdje nisu uočene bitnije razlike među koncentracijama u 4 različito tretirana uzorka, na slici 13. te su razlike vidljivije. Koncentracija ukupnih fenola je veća kod kontrolnih uzoraka od koncentracije ukupnih fenola u uzorcima pod solnim stresom. Tretman sinapinskom kiselinom u solnom stresu povećava sintezu ukupnih fenola s obzirom na uzorke u solnom stresu.

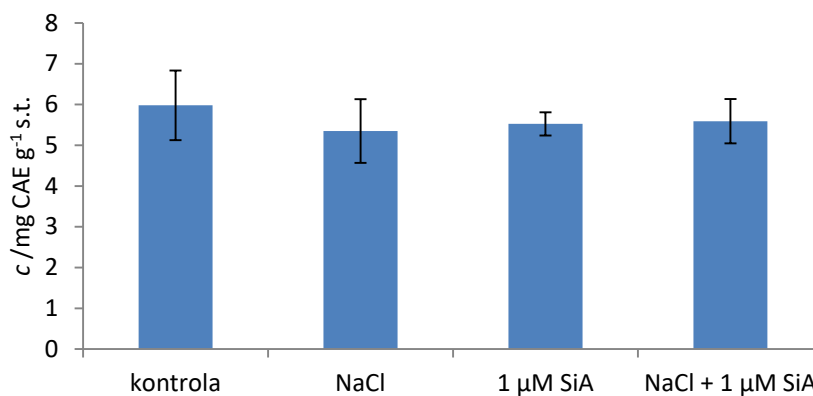
4.3.2. Ukupne fenolne kiseline

Na osnovu izmjerenih apsorbancija i poznatih koncentracija kavene kiseline konstruiran je baždarni pravac na osnovu kojeg su određene koncentracije ukupnih fenolnih kiselina u uzorcima prema formuli: $y = 0,0041x$, $R^2 = 0,9973$ i izražene kao ekvivalent mg kavene kiseline po gramu suhe tvari (mg CAE g^{-1} s.t.).²⁷ Rezultati su prikazani na slikama 14. i 15.



Slika 14. Koncentracije ukupnih fenolnih kiselina u klijancima kineskog kupusa tretiranih na podlozi za uzgoj klijanaca (kontrola), podlozi za tretiranje klijanaca solnim stresom (NaCl), podlozi za praćenje učinka salicilne kiseline (koncentracije $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$) na rast klijanaca ($1 \mu\text{M SA}$) i podlozi za praćenje učinka salicilne kiseline (koncentracije $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$) na klijance u solnom stresu (NaCl + $1 \mu\text{M SA}$). Rezultati su srednja vrijednost 3 biološke replike \pm SD, jedna biološka replika predstavlja klijance tretirane u jednoj Petrijevoj zdjelici.

Prema podacima sa slike 14. primjećuje se da uzorci pod solnim stresom imaju manje koncentracije ukupnih fenolnih kiselina u odnosu na kontrolne. Tretman salicilnom kiselinom ne povećava značajno koncentraciju ukupnih fenolnih kiselina.

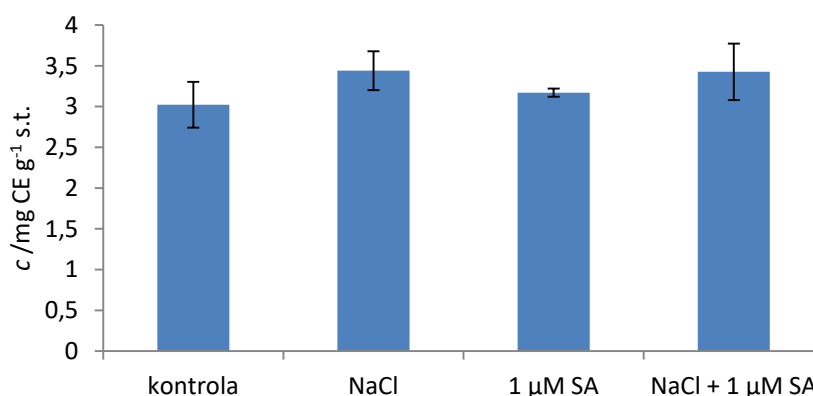


Slika 15. Koncentracije ukupnih fenolnih kiselina u klijancima kineskog kupusa tretiranih na podlozi za uzgoj klijanaca (kontrola), podlozi za tretiranje klijanaca solnim stresom (NaCl), podlozi za praćenje učinka sinapinske kiseline (koncentracije $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$) na rast klijanaca ($1 \mu\text{M SiA}$) i podlozi za praćenje učinka sinapinske kiseline (koncentracije $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$) na klijance u solnom stresu (NaCl + $1 \mu\text{M SiA}$). Rezultati su srednja vrijednost 3 biološke replike \pm SD, jedna biološka replika predstavlja klijance tretirane u jednoj Petrijevoj zdjelici.

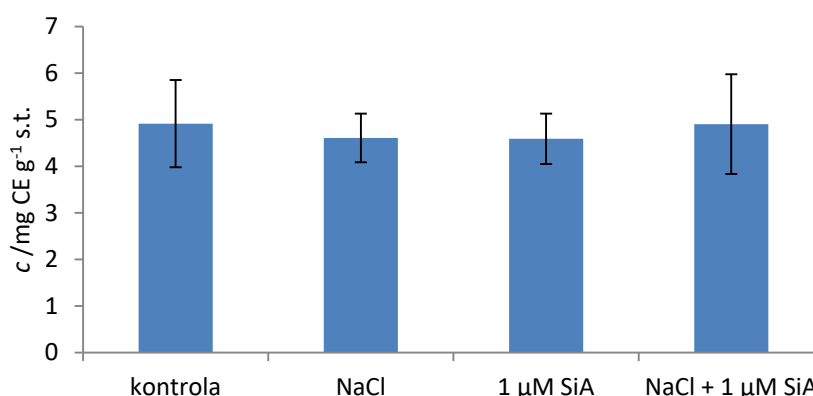
Kao i u slučaju tretmana sa salicilnom kiselinom (slika 14.), tretman sa sinapinskom kiselinom (slika 15.) ne utječe značajno na ukupne fenolne kiseline.

4.3.3. Ukupni flavonoidi

Određivanje flavonoida temelji se na svojstvu flavonoida da s aluminijevim kloridom (AlCl_3) (1:10) tvore kompleks, a intenzitet obojenja proporcionalan je količini prisutnih flavonoida.²⁹ Dobivene koncentracije ukupnih flavonoida u biljnim ekstraktima određene su na osnovu standardne krivulje s katehinom prema formuli: $y = 0,0031x$, $R^2 = 0,9971$ i izražene su u mg ekvivalenata katehina po gramu suhe tvari (mg CE g^{-1} s.t.). Rezultati su prikazani na slikama 16. i 17. U sva 4 različita uzorka na slici 16. prosječne koncentracije ukupnih flavonoida se kreću u rasponu od 3 - 4 mg ekvivalenata katehina po gramu suhe tvari. Može se zaključiti da ne dolazi do očitih razlika u vrijednostima koncentracija te da koncentracija ukupnih flavonoida u uzorcima ne ovisi o vrsti podloge na kojoj su uzorci uzgajani.



Slika 16. Koncentracije ukupnih flavonoida u klijancima kineskog kupusa tretiranih na podlozi za uzgoj klijanaca (kontrola), podlozi za tretiranje klijanaca solnim stresom (NaCl), podlozi za praćenje učinka salicilne kiseline (koncentracije $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$) na rast klijanaca ($1 \mu\text{M SA}$) i podlozi za praćenje učinka salicilne kiseline (koncentracije $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$) na klijance u solnom stresu (NaCl + $1 \mu\text{M SA}$). Rezultati su srednja vrijednost 3 biološke replike \pm SD, jedna biološka replika predstavlja klijance tretirane u jednoj Petrijevoj zdjelici.

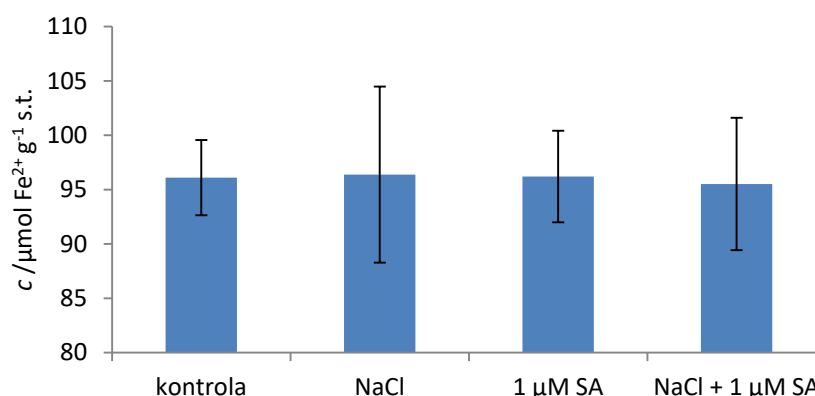


Slika 17. Koncentracije ukupnih flavonoida u klijancima kineskog kupusa tretiranih na podlozi za uzgoj klijanaca (kontrola), podlozi za tretiranje klijanaca solnim stresom (NaCl), podlozi za praćenje učinka sinapinske kiseline (koncentracije $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$) na rast klijanaca ($1 \mu\text{M SiA}$) i podlozi za praćenje učinka sinapinske kiseline (koncentracije $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$) na klijance u solnom stresu (NaCl + $1 \mu\text{M SiA}$). Rezultati su srednja vrijednost 3 biološke replike \pm SD, jedna biološka replika predstavlja klijance tretirane u jednoj Petrijevoj zdjelici.

Na slici 17. vrijednosti koncentracija ukupnih flavonoida se kreću od 4 – 5 mg ekvivalenata katehina po gramu suhe tvari. Prema dobivenim vrijednostima koncentracija ukupnih flavonoida može se reći da tretmani salicilnom i sinapinskom kiselinom ne dovode do značajnijih promjena vrijednosti koncentracije u odnosu na kontrolne uzorke i uzorke pod solnim stresom.

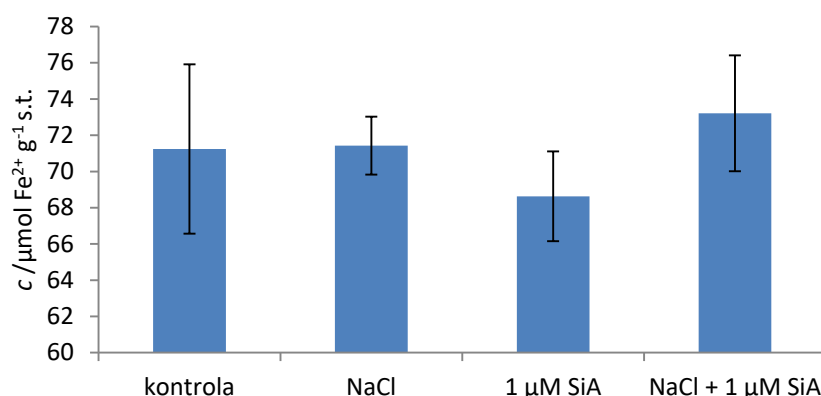
4.3.4. Antioksidacijske aktivnosti

Antioksidacijska aktivnost uzoraka mjerena je metodom FRAP i izražena je u $\mu\text{mol dm}^{-3}$ $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ po gramu suhe tvari (slike 18. i 19.).³⁰ Dobivene koncentracije ukupnih flavonoida u klijancima kineskog kupusa određene su na osnovu standardne krivulje s $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ prema formuli: $y = 0,0013x$, $R^2 = 0,9986$.



Slika 18. Antioksidacijska aktivnost izražena kao koncentracija $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ u klijancima kineskog kupusa tretiranih na podlozi za uzgoj klijanaca (kontrola), podlozi za tretiranje klijanaca solnim stresom (NaCl), podlozi za praćenje učinka salicilne kiseline (koncentracije $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$) na rast klijanaca ($1 \mu\text{M SA}$) i podlozi za praćenje učinka salicilne kiseline (koncentracije $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$) na klijance u solnom stresu (NaCl + $1 \mu\text{M SA}$). Rezultati su srednja vrijednost 3 biološke replike \pm SD, jedna biološka replika predstavlja klijance tretirane u jednoj Petrijevoj zdjelici.

Antioksidacijska aktivnost u različito tretiranim uzorcima je veoma slična (slika 18.) i može se zaključiti na temelju takvih podataka da antioksidacijska aktivnost ne ovisi o vrsti podloge na kojoj su uzgajani klijanci.

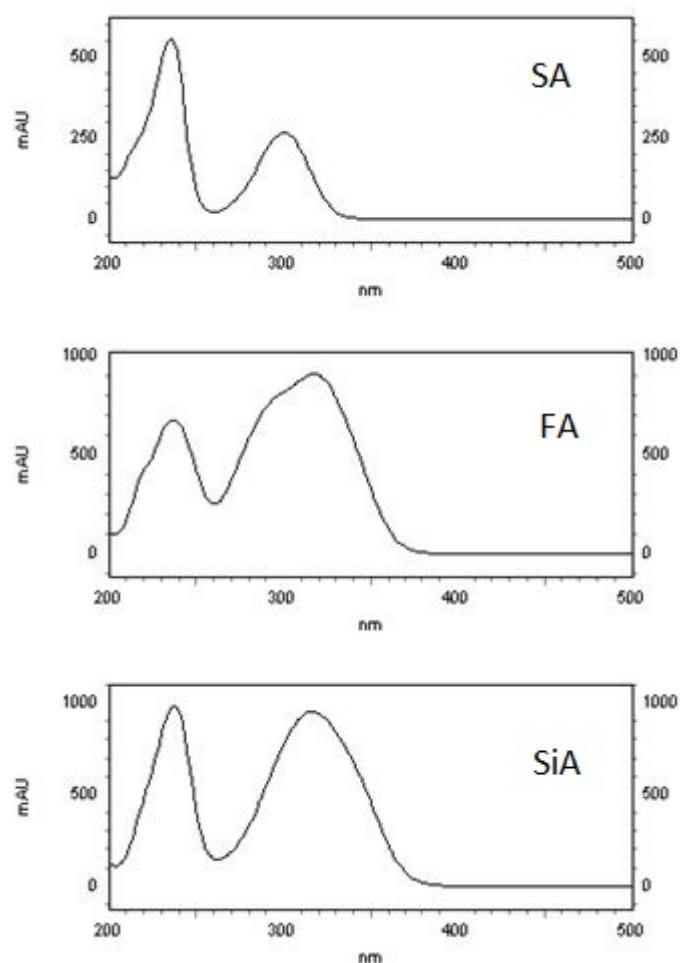


Slika 19. Antioksidacijska aktivnost izražena kao koncentracija $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ u klijancima kineskog kupusa tretiranih na podlozi za uzgoj klijanaca (kontrola), podlozi za tretiranje klijanaca solnim stresom (NaCl), podlozi za praćenje učinka sinapinske kiseline (koncentracije $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$) na rast klijanaca ($1 \mu\text{M SiA}$) i podlozi za praćenje učinka sinapinske kiseline (koncentracije $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$) na klijance u solnom stresu (NaCl + $1 \mu\text{M SiA}$). Rezultati su srednja vrijednost 3 biološke replike \pm SD, jedna biološka replika predstavlja klijance tretirane u jednoj Petrijevoj zdjelici.

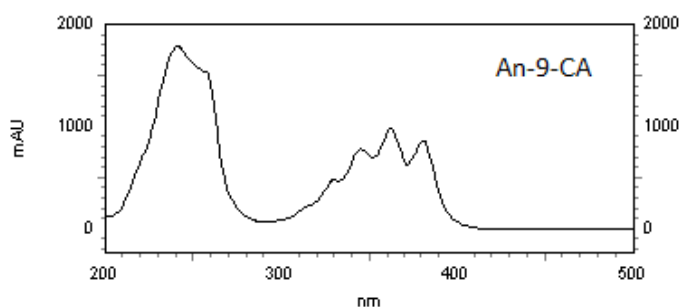
Rezultati na slici 19. pokazuju nešto niže vrijednosti antioksidacijske aktivnosti naspram vrijednosti rezultata na slici 18. Antioksidacijska aktivnost u uzorcima tretiranim sinapinskom kiselinom pokazuje nižu vrijednost od onih vrijednosti za uzorke na solnom stresu (tretiranim sinapinskom kiselinom i onima koji nisu tretirani).

4.4. Identifikacija i kvantifikacija specifičnih fenolnih kiselina metodom HPLC

U ovom radu praćene su 3 vrste specifičnih fenolnih kiselina: salicilna, ferulinska i sinapinska kiselina. Pripremljeni su standardi poznatih koncentracija specifičnih fenolnih kiselina u svrhu određivanja retencijskog vremena i karakterističnih spektara pojedine fenolne kiseline. Na slici 20. prikazani su spektri praćenih fenolnih kiselina. Spektar unutarnjeg standarda, antracen-9-karboksilne kiseline (An-9-CA), koji služi kako bi se pratio gubitak analita tijekom pripreme i analize uzorka, prikazan je na slici 21.

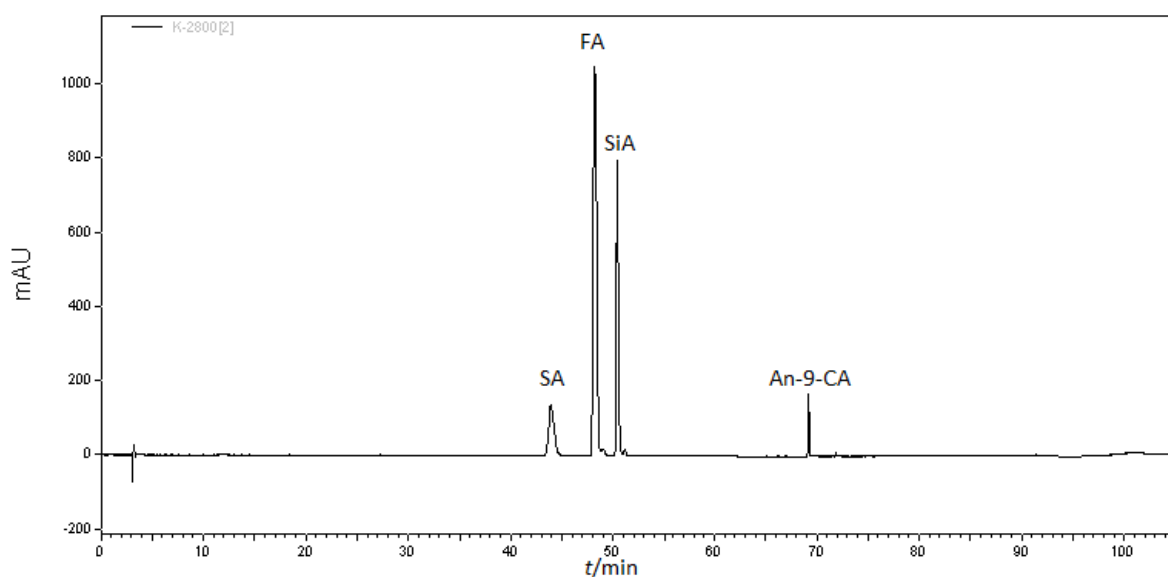


Slika 20. Spektri salicilne (SA), ferulinske (FA) i sinapinske kiseline (SiA).



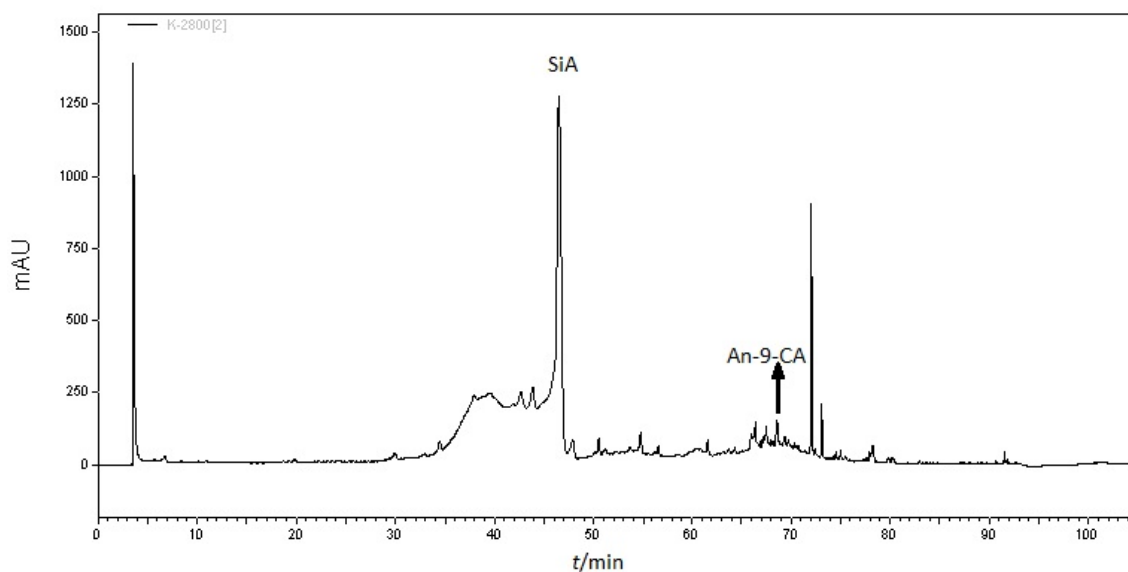
Slika 21. Spektar unutarnjeg standarda antracen-9-karboksilne kiseline (An-9-CA).

Snimljen je kromatogram (slika 22.) smjese standarda (salicilna, ferulinska i sinapinska kiselina) i unutarnjeg standarda (An-9-CA). Retencijska vremena fenolnih kiselina su 43,917 (SA), 48,200 (FA) i 50,400 (SiA) minuta dok je retencijsko vrijeme unutarnjeg standarda 69,200 min.



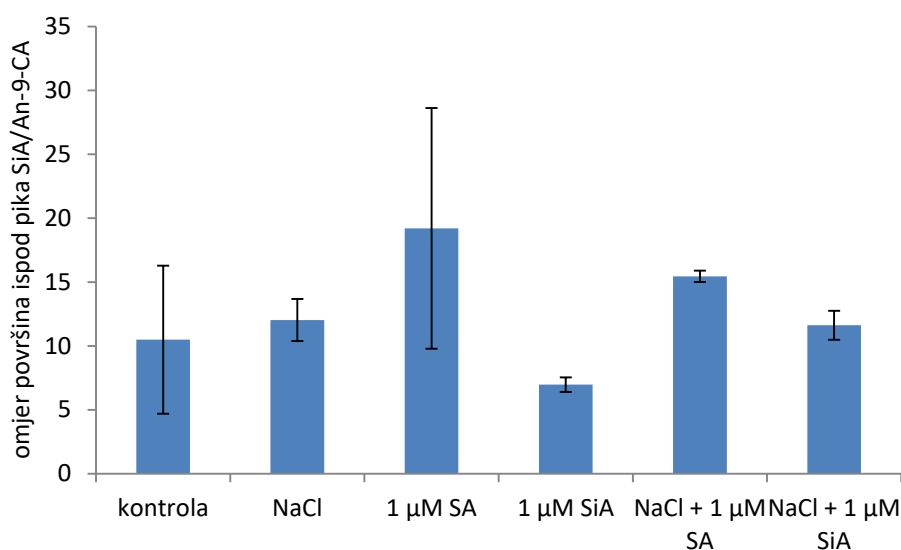
Slika 22. Kromatogram smjese standarda (salicilne, ferulinske i sinapinske kiseline) i unutarnjeg standarda An-9-CA koncentracije $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Analizom svih uzoraka snimljeni su kromatogrami te analizirani programom Chrom-Gate. Provjeren je spektar svakog pika te određena površina ispod svakog pika. Reprezentativni kromatogram uzorka prikazan je na slici 23.



Slika 23. Reprezentativni kromatogram uzorka klijanaca kineskog kupusa tretiranog solnim stresom (NaCl). Uvjeti kromatografije navedeni su u poglavlju Materijal i metode. Označeni su pikovi koji na osnovu retencijskih vremena i karakterističnih spektara pripadaju sinapinskoj kiselini (SiA) i unutarnjem standardu (An-9-CA).

Uspoređivanjem retencijskih vremena pikova i spektara fenolnih kiselina s pikovima na kromatogramu može se utvrditi da pikovi između 40. i 50. minute odgovaraju sinapinskoj kiselini. Retencijsko vrijeme unutarnjeg standarda u uzorcima je kod svih uzoraka oko 69,5 minuta te spektar odgovara tom standardu. Pošto se ovom metodom nisu uspješno razdvojile praćene fenolne kiseline, te njihovi pikovi nisu jednostruki jasno odvojeni ne mogu se odrediti koncentracije istih. Sa sigurnošću je moguće identificirati samo sinapinsku kiselinu. Da bi se dobio koristan rezultat iz ovog mjerenja izračunati su omjeri površina ispod najintenzivnijeg pika, kojemu je retencijsko vrijeme 46,530 minuta te koji spektrom odgovara sinapinskoj kiselini i pika unutarnjeg standarda. Rezultat takvih omjera daje informaciju o promjenama u koncentraciji sinapinske kiseline uslijed tretmana (slika 24.).



Slika 24. Omjeri površina ispod pika sinapinske kiseline (SiA) i unutarnjeg standarda (Ac-9-CA) kao relativna mjera promjena u količini sinapinske kiseline uslijed opisanih tretmana.

Prema rezultatima sa slike 24. količina sinapinske kiseline u uzorcima kontrole i uzorcima tretiranim solnim stresom je približno jednaka. Do veće razlike dolazi u uzorcima koji su tretirani salicilnom odnosno sinapinskom kiselinom. Najveća količina sinapinske kiseline, oko 2 x veća u odnosu na kontrolu, izmjerena je u uzorcima tretiranim salicilnom kiselinom dok je najmanja količina sinapinske kiseline očitana kod uzoraka tretiranih sinapinskom kiselinom. (oko 2 x manja u odnosu na kontrolu). Na uzorcima koji su pod solnim stresom tretirani fenolnim kiselinama, uzorci tretirani salicilnom kiselinom sadrže više sinapinske kiseline od kontrolnih uzoraka i uzoraka u solnom stresu. Tretman sinapinskom kiselinom ne mijenja značajno količinu endogene sinapinske kiseline u klijancima koji su podvrgnuti solnom stresu.

§ 5. RASPRAVA

Povišeni salinitet tla jedna je od vrsta abiotskog stresa koji stvara tri nepovoljna uvjeta za rast i razvoj biljke: ionski stres koji nastaje kao posljedica toksične koncentracije iona (ponajviše Na^+), do osmotskog stresa dolazi zbog smanjenog unosa vode u biljku te oksidacijski stres kojeg ponajviše uzrokuje povišena razina reaktivnih kisikovih vrsta u stanicama.³⁶ Rezultati testa inhibicije korijena i mjerenje biomase tretiranih uzoraka pokazuju negativni efekt solnog stresa na rast korijena i biomasu klijanaca. U uvjetima solnog stresa ($100 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaCl}$) duljina korijena je iznosila samo 25%, a biomasa 71% u odnosu na netretirane kontrole. Takvi rezultati su u skladu s objavljenim istraživanjem koje je potvrdilo negativni utjecaj solnog stresa na različite vrste kupusnjača, a kineski kupus se pokazao kao jedna od najosjetljivijih vrsta na solni stres.⁴

Rezultati nekih istraživanja ukazuju da fenolne kiseline mogu sudjelovati u mehanizmima odgovora biljaka na solni stres. Tako je dokazano da tolerantnije vrste kupusnjača imaju veće količine fenolnih kiselina u usporedbi s osjetljivijim vrstama.³ Salicilna kiselina ima veliki agronomski potencijal za poboljšanje tolerancije nekih poljoprivredno važnih kultura na stres. Međutim, primjenjivost SA ovisi ponajprije o korištenoj koncentraciji.⁸ Sinapinska kiselina je poznata kao jaki antioksidans tj. povećava sposobnost uklanjanja radikala iz stanica koje su pod solnim stresom.⁷ U ovom radu korištene su salicilna i sinapinska kiselina u koncentracijskom rasponu od $1\text{-}50 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ kako bi se istražilo koja koncentracija utječe najpovoljnije na rast i razvitak klijanaca posebno u uvjetima solnog stresa. Rezultati biotesta rasta korijena i mjerenja biomase ukazali su da SA ima pozitivan potencijal u zaštiti klijanaca kineskog kupusa uvjetima solnog stresa. Uzorci koji su bili tretirani s $1 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ fenolne kiseline dali su najbolje rezultate i upravo se ta koncentracija koristila za daljnja spektrofotometrijska mjerenja specijaliziranih metabolita.

Jedan od markera stresa u biljkama je prolin koji se akumulira u visokim koncentracijama kod biljaka koje su izložene abiotskom stresu. Ima obrambenu ulogu u stanicama kao jedan od regulatora osmoze i utječe na uklanjanje radikala iz stanica. Nakupljeni prolin se razgrađuje u biljnim stanicama koje su izložene stresu kako bi se

osigurala energija za rast. Također ima ulogu u reproduktivnom tkivu da stabilizira biljku tijekom prijelaza iz vegetativne u reproduktivnu fazu i tijekom razvoja sjemena.³⁵

Razumijevanjem mehanizama kojima prolin pojačava abiotski i biotski odgovor na stres olakšat će se istraživanje poljoprivrednih kultura i bit će jasnija regulatorna i signalna mreža reakcija stanica na stres.³⁷ Rezultati pokazuju veliki porast koncentracije prolina uslijed solnog stresa (oko 5 puta u odnosu na kontrole). Takvi rezultati u skladu su s dosadašnjim rezultatima koji potvrđuju prolin kao pouzdan marker stresa.³⁵ Tretmani klijanaca fenolnim kiselinama SA i SiA, posebno višim koncentracijama, također potiču sintezu prolina. Nadalje, rezultati uzoraka tretiranih fenolnim kiselinama u uvjetima solnog stresa upućuju da SA povećava koncentraciju prolina dok SiA ima suprotan efekt u klijanacima kineskog kupusa. Veza između prolina i fenolnih kiselina nije u potpunosti razjašnjena. Poznato je da SA stimulira sintezu prolina u leći u solnom stresu što se slaže s dobivenim rezultatima u ovom radu. Autori Misra i Saxena sugeriraju da je tijekom egzogene primjene SA u uvjetima solnog stresa, metabolizam prolina znatno izmijenjen što dovodi do održavanja turgora stanica nakupljanjem većih količina slobodnog prolina u leći, podržavajući njegovu zaštitnu ulogu od solnog stresa.³⁸ Osim sinteze prolina postoje podaci da SA pozitivno djeluje na ostale procese u biljaka povećavajući toleranciju na solni stres ali i ostale vrste abiotskog stresa.³⁹

Nadalje, izmjerene su neke od grupa polifenolnih spojeva uslijed solnog stresa i tretmana fenolnim kiselinama. U istraživanju provedenom na pet vrsta kupusnjača, pokazalo se da su koncentracije specijaliziranih metabolita najniže kod uzoraka kineskog kupusa.¹⁸ Koncentracija ukupnih fenolnih kiselina iznosila je 3.21 ± 0.21 mg CAE g⁻¹ suhe tvari što je u skladu s rezultatima izmjerenim u ovom radu na kontrolnim klijanacima. Uslijed solnog stresa primijećeno je da se koncentracija fenolnih kiselina smanjila u odnosu na kontrolu. Kontrolni uzorci naspram uzoraka pod solnim stresom sadrže veću koncentraciju ukupnih polifenola. Mjerenje koncentracije ukupnih flavonoida dalo je rezultate približne onima koje se susreću u prethodnim radovima. Niti dodatak salicilne niti dodatak sinapinske kiseline nije bitnije utjecao na promjene u koncentraciji kontrolnih uzoraka i uzoraka pod solnim stresom. Antioksidacijska aktivnost mjerena je FRAP metodom. Uzorci tretirani salicilnom kiselinom pokazuju slične vrijednosti antioksidacijske aktivnosti kao i uzorci koji nisu tretirani salicilnom kiselinom. Tretman sinapinskom kiselinom povećao je antioksidacijsku aktivnost uzoraka pod solnim stresom. Ta činjenica može se objasniti podatkom da je sinapinska kiselina poznata kao jaki antioksidans.⁷ Detaljniji uvid u status nekih fenolnih kiselina u

klijancima pokušao se analizirati metodom HPLC.³³ Za uspješnu identifikaciju i kvantifikaciju specifičnih fenolnih kiselina potrebno je dobiti pregledan kromatogram u kojemu su pikovi razlučeni, uski i oštri. Dobiveni kromatogrami u ovom istraživanju nisu u potpunosti zadovoljili ove kriterije stoga se nije mogla dobiti koncentracija specifičnih fenolnih kiselina u uzorcima. Vidljiva su preklapanja pikova i pikovi su dosta širi te nisu idealni za analizu. Kromatogrami smjese standarda su zadovoljavajući u odnosu na kromatogram uzoraka. Spektri specifičnih fenolnih kiselina odgovaraju pikovima na kromatogramu smjese standarda i prema njima su određene fenolne kiseline u uzorcima. Prvo iz kromatografske kolone izlazi salicilna kiselina potom ferulinska te na kraju sinapinska kiselina. Usporedbom spektara standarda sa spektrima na kromatogramu uzoraka identificirana je samo sinapinska kiselina dok se salicilna i ferulinska kiselina ne mogu jasno odrediti. Omjer površina ispod pikova sinapinske kiseline i unutarnjeg standarda daje relativnu mjeru promjena u količini sinapinske kiseline uslijed opisanih tretmana. Zanimljivo je da uzorci koji su tretirani salicilnom kiselinom pokazuju veću količinu sinapinske kiseline od uzoraka koji su tretirani sinapinskom kiselinom. Može se pretpostaviti da salicilna kiselina koja je ujedno i hormon stresa stimulativno djeluje na sintezu sinapinske kiseline. Sinapinska kiselina jedna je od fenolnih kiselina koja je dokazana u znatno većim količinama u otpornijim vrstama kupusnjača na solni stres kao što su raštika i bijeli kupus.³ Tretman sinapinskom kiselinom vjerojatno inhibira vlastitu sintezu mehanizmom povratne sprege što je česti mehanizam u regulaciji raznih metaboličkih puteva. Svakako je potrebno napraviti dodatna istraživanja da bi se dobili jednoznačni i jasni zaključci.

§ 6. ZAKLJUČAK

U ovom je radu ispitana potencijalna zaštitna uloga fenolnih kiselina, točnije salicilne i sinapinske kiseline na klijance kineskog kupusa u uvjetima solnog stresa.

Na osnovu rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- 1) Rezultati biotesta rasta korijena i mjerenja biomase uzoraka potvrdili su značajni inhibitorni utjecaj soli na rast i razvoj klijanaca kineskog kupusa.
- 2) Stresni utjecaj soli na klijance dokazan je i mjerenjem koncentracije prolina koji je znatno porastao uslijed tretmana NaCl (oko 5 puta u odnosu na kontrolu).
- 3) Solni stres nije značajno promijenio sadržaj polifenolnih spojeva (ukupnih polifenola, ukupnih fenolnih kiselina i ukupnih flavonoida) u klijancima kineskog kupusa
- 4) Tretman salicilnom kiselinom pokazuje potencijalne pozitivne učinke na klijance u solnom stresu tj. pokazuje pozitivan iako ne pretjerano značajan učinak na rast klijanaca, potiče značajno sintezu prolina te utječe na povećanje količine sinapinske kiseline u klijancima uslijed stresa.
- 5) Tretman sinapinskom kiselinom povećao je antioksidacijsku aktivnost u uzorcima u uvjetima solnog stresa, ali nije imao učinke koji su zapaženi kod tretmana salicilnom kiselinom.
- 6) Na osnovu ovih preliminarnih rezultata svakako je potrebno nastaviti istraživanja da bi se došlo do saznanja o ulozi fenolnih kiselina u odgovoru biljaka na solni stres.

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. I. N. Daliakopoulos, I. S. Panagea, I. K. Tsanis, M. G. Grillakis, A. G. Koutroulis, R. Hessel, A. G. Mayor, C. J. Ritsema, *L. Degrad. Dev.* **28** (2017) 1962–1972.
2. X. Zhang, G. Lu, W. Long, X. Zou, F. Li, T. Nishio, *Breed. Sci.* **64** (2014) 60–73.
3. I. Linić, D. Šamec, J. Grúz, V. Vujčić Bok, M. Strnad, B. Salopek-Sondi, *Plants* **8** (2019) 155–173.
4. I. Pavlović, S. Mlinarić, D. Tarkovská, J. Oklestkova, O. Novák, H. Lepeduš, V. V. Bok, S. R. Brkanac, M. Strnad, B. Salopek-Sondi, *Front. Plant Sci.* **10** (2019) 1–16.
5. I. Pavlović, A. Pěňčík, O. Novák, V. Vujčić, S. Radić Brkanac, H. Lepeduš, M. Strnad, B. Salopek-Sondi, *Plant Physiol. Biochem.* **125** (2018) 74–84.
6. K. G. Ramawat, J. M. Mérillon, *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, Natural Products, Berlin, 2013, str. 1952–1968.
7. H. Kaur, R. D. Bhardwaj, S. K. Grewal, *Acta Physiol. Plant.* **39** (2017) 1–15.
8. K. Miura, Y. Tada, *Front. Plant Sci.* **5** (2014) 1–13.
9. K. A. Mosa, A. Ismail, M. Helmy, *Plant stress tolerance: an integrated omics approach*, Springer Nature, Cairo, 2017, str. 1–19.
10. N. Hermien, T. Mulyadi, S. A. Nanik, S. J. S. Ami, *Int. J. Appl. Sci.* **12** (2012) 85–89.
11. R. S. Dhindsa, P. L. Plumb-Dhindsa, D. M. Reid, *Physiol. Plant.* **56** (1982) 453–457.
12. J. Bailey-Serres, R. Mittler, *Plant Physiol.* **141** (2006) 310–311.
13. C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganga, *Free Radic. Biol. Med.* **20** (1996) 933–956.
14. I. Pavlović, I. Petřík, D. Tarkovská, H. Lepeduš, V. Vujčić Bok, S. Radić Brkanac, O. Novák, B. Salopek-Sondi, *Int. J. Mol. Sci.* **19** (2018) 1–23.
15. J. Sadowski, C. Kole, *Genetics, Genomics and Breeding of Vegetable Brassicas*, Science Publishers, SAD, 2011, str. 4–20.
16. D. Šamec, B. Urlič, B. Salopek-Sondi, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **59** (2019) 2411–2422.
17. D. Šamec, I. Pavlović, B. Salopek-Sondi, *Phytochem. Rev.* **16** (2017) 117–135.
18. D. Šamec, I. Pavlović, I. Radojčić Redovniković, B. Salopek-Sondi, *Food Chem.* **269** (2018) 96–102.
19. F. Bourgaud, A. Gravot, S. Milesi, E. Gontier, *Plant Sci.* **161** (2001) 839–851.

20. D. Engelmeier, F. Hadacek, *Adv. Phytomedicine* **3** (2006) 423–467.
21. P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach: Third Edition Med. Nat. Prod. A Biosynthetic Approach Third Ed. 5*, John Wiley & sons, Nottingham, 2009, str. 122–129.
22. A. Crozier, M. N. Clifford, *Plant Secondary Metabolites Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, Blackwell, 2006, str. 1–41.
23. J. Dai, R. J. Mumper, *Molecules* **15** (2010) 7313–7352.
24. A. M. Boudet, *Phytochemistry* **68** (2007) 2722–2735.
25. L. T. Minh, D. T. Khang, P. T. Thu Ha, P. T. Tuyen, T. N. Minh, N. Van Quan, T. D. Xuan, *Int. Lett. Nat. Sci.* **57** (2016) 1–10.
26. P. Carillo, Y. Gibon, *Extr. Determ. proline* (2016) 1–4.
27. Council of Europe, *Eur. Pharmacopoeia* **4** (2002) 2377–2378.
28. V. L. Singleton, J. A. Rossi, J. Jr, *Am. J. Enol. Vitic.* **16** (1965) 144–158.
29. J. Zhishen, T. Mengcheng, W. Jianming, *Food Chem.* **64** (1999) 555–559.
30. F. F. Benzie, J. J. Strain, *Anal. Biochem.* **239** (1996) 70–76.
31. <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=kromatografija> (datum pristupa 13.prosinca 2019.)
32. Y. Kazakevich, R. LoBrutto, *HPLC for pharmaceutical scientists*, John Wiley & sons, New Jersey, 2006, str. 10–11.
33. D. Šamec, V. Kruk, P. Ivanišević, *Agronomy* **9** (2019) 3–4.
34. <https://www.idex-hs.com/literature-tools/educational-materials/hplc-center/> (datum pristupa i obrade 13.prosinca 2019.)
35. P. B. Kavi Kishor, N. Sreenivasulu, *Plant, Cell Environ.* **37** (2014) 300–311.
36. W. Liang, X. Ma, P. Wan, L. Liu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **495** (2018) 286–291.
37. X. Liang, L. Zhang, S. K. Natarajan, D. F. Becker, *Antioxidants Redox Signal.* **19** (2013) 998–1011.
38. N. Misra, P. Saxena, *Plant Sci.* **177** (2009) 181–189.
39. M. I. R. Khan, M. Fatma, T. S. Per, N. A. Anjum, N. A. Khan, *Front. Plant Sci.* **6** (2015) 1–17.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Petra Dičak

Datum rođenja: 11. kolovoza 1995.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2002.–2010. Osnovna škola [OŠ Ivan Gundulić, Dubrovnik]

2010.–2014. Srednja škola [Gimnazija Dubrovnik, Dubrovnik]

2014.–2017. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2017.–2020. Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Smjer: istraživački

Grane: analitička kemija i biokemija

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2016. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2017. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2018. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2019. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu