Utjecaj monokromatske svjetlosti na sadržaj funkcionlanih komponenti timijana (Thymus vulgaris L.)

Parađiković, Lea

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:335854

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Lea Parađiković, apsolvent
Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

Utjecaj monokromatske svjetlosti na sadržaj funkcionalnih komponenti timijana (*Thymus vulgaris* L.)

Diplomski rad

Osijek, 2015.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Lea Parađiković, apsolvent
Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

Utjecaj monokromatske svjetlosti na sadržaj funkcionalnih komponenti timijana (*Thymus vulgaris* L.)

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:
1. doc.dr.sc. Miroslav Lisjak, predsjednik
2. doc.dr.sc. Tomislav Vinković, mentor
3. prof.dr.sc. Nada Parađiković, član

Osijek, 2015.

SADRŽAJ

1.		**Uvod**	1
	1.1.	Timijan (*Thymus vulgaris* L.)	1
	1.1.1.	Morfološka svojstva i uvjeti uzgoja	2
	1.1.2.	Ljekovita svojstva timijana	3
	1.1.3.	Kemijski sastav i aktivne tvari	4
	1.2.	Antioksidativna aktivnost i antioksidansi	5
	1.2.1.	Fenolni spojevi	6
	1.2.2.	Biljni pigmenti	6
	1.2.3.	Vitamin C	7
	1.3.	Ekstrakcija	8
	1.3.1.	Klasična ekstrakcija	8
	1.4.	Monokromatska LED svjetlost	9
	1.5.	Cilj istraživanja	10
2.		**Pregled literature**	11
3.		**Materijal i metode**	19
	3.1.	Postavljanje pokusa	19
	3.2.	Određivanje sadržaja klorofila i karotenoida	19
	3.3.	Određivanje vitamina C	19
	3.4.	Određivanje ukupnih fenola	20
	3.5.	Određivanje antioksidativnih svojstava	21
	3.6.	Određivanje sadržaja prolina	21
4.		**Rezultati**	22
5.		**Rasprava**	34
6.		**Zaključak**	40
7.		**Popis literature**	41
8.		**Sažetak**	45
9.		**Summary**	46
10.		**Popis tablica**	47
11.		**Popis slika**	49
12.		**Popis grafikona**	50
		Temeljna dokumentacijska kartica	51
		Basic documentation card	52

1. UVOD

Porodica *Lamiaceae* (usnače) koja obuhvaća 200 rodova i 3000 vrsta, predstavlja kozmopolite i porodicu biljaka bogatih eteričnim uljima i fenolnim spojevima. Ekonomski značaj se ogleda kroz upotrebu ovih vrsta kao ljekovitih, začinskih i ukrasnih biljaka, kao i kroz primjenu njihovih eteričnih ulja i ekstrakata u različitim granama industrije. Najpoznatiji predstavnici ove familije su vrste: *Rosmarinus officinalis* (ružmarin), *Lavandula angustifolia* (lavanda), *Salvia officinalis* (žalfija), *Melissa officinalis* (matičnjak), *Origanum vulgare* (vranilova trava), *Thymus vulgaris* (timijan), *Thymus serpyllum* (majčina dušica), *Ocimum basilicum* (bosiljak), *Menta x piperita* (paprena metvica), *Menta spicata* (divlja metvica) i *Menta pulegium* (barska metvica). *Thymus vulgaris* (timijan) predstavlja višegodišnju grmoliku biljku iz porodice usnjača. Odlikuje se razgranatim i jakim korijenovim sustavom sa mnoštvom žilica koje mu omogućuju da uspijeva na siromašnom i skeletnom tlu. Koristi se list ili zeljasti nadzemni dio biljke u cvatu te eterično ulje. Postoje brojni kemotipovi eteričnog ulja timijana, a neki od njih su: timol, karvakrol, geraniol/geranil-acetat, linalol, 1,8 cineol/limonen, trans-tujanol, gama-terpineol, alfa-terpineol. Timol i karvakrol prisutni u timijanu inhibiraju lipidnu peroksidaciju i djeluju antimikrobno. Timol, karvakrol kao i drugi fenolni spojevi iz biljaka se izdvajaju ekstrakcijom.

1.1. Timijan (*Thymus vulgaris* L.)

Timijan (*Thymus vulgaris* L.) potječe od grčkog *thymos* ili *thymon* – tamjan, zbog sličnosti mirisa. Također *thymos* prema grčkom znači hrabrost, snaga te ukazuje na stimulirajuće djelovanje biljke. Egipćani su ga koristili kod balzamiranja i za izradu parfema. Grci su timijanom začinjavali neke vrste sireva i dodavali ga pićima i dimljenom mesu. Nadzemni dio biljke se tijekom cijele godine može koristiti za pripremu čajeva i napitaka. Timijan je poznat i u biljnoj medicini kao ljekovita biljka i koristi se za pripremanje ljekovitih pripravaka. Zbog jakog mirisa koji odbija lisne uši sadi se pored ruža ili drugog bilja osjetljivog na uši.

Timijan je porijeklom sa Sredozemlja (Španjolska, Portugal, Grčka i Francuska) gdje raste u spontanoj flori na suhom, sunčanom, malo plodnom i kamenitom tlu. Izvan ovog područja se uzgaja plantažno kao dekorativna biljka ili za dobivanje droga u mnogim

zemljama u Europi, Aziji, Africi i Sjevernoj Americi. U Hrvatskoj je vrlo rasprostranjena. Često se pojavljuje u većim skupinama uzduž parcela, na suhim rubovima šuma, sunčanim mjestima bez stalne vlage i sjene. Odlična je pčelinja paša. Niske zimske temperature bez snježnog pokrivača na rastresitim tlima mogu nanijeti veće štete usjevu. Na hladnim, vlažnim tlima trune, na siromašnim ne daje prinos, a najbolje uspijeva na černozemu dobre strukture, uz dobru opskrbljenost hranjivim elementima.

1.1.1. Morfološka svojstva i uvjeti uzgoja

Thymus vulgaris L. (timijan) predstavlja višegodišnju grmoliku biljku iz porodice *Lamiaceae* (usnače). Odlikuje se razgranatim i jakim korijenovim sustavom sa mnoštvom žilica koje mu omogućava da uspijeva na siromašnom i skeletnom tlu. Iz korijena se razvijaju uglavnom uspravne stabljike visine 25-50 cm. Prošlogodišnje grane, u donjem dijelu biljke su drvenaste, a cvjetne grane su prekrivene maljama. Listovi su sitni i nasuprotno raspoređeni. Cvjetovi su bijeli do bijelo-ružičasti, sitni i razvijaju se u pazuhu listova, čineći rastresitu cvat. Cvati su izdužene, a čašicu i krunicu gusto pokrivaju svjetlucave žlijezde koje luče eterično ulje. Sjeme je vrlo sitno, od 0,5 do 1,0 mm. Cvjeta od svibnja do rujna (Čančarević i sur., 2013.)

Slika 1. Morfologija timijana (*Thymus vulgaris* L.)

Izvor: http://www.botanical.com/botanical/mgmh/t/thygar16.html

Timijan dobro podnosi sušu jer je termofilna i fotofilna biljka. Niske zimske temperature bez snježnog pokrivača na rastresitim tlima mogu nanijeti veće štete usjevu. Na hladnim, vlažnim tlima timijan trune, na siromašnim ne daje prinos, a najbolje uspijeva na černozemu dobre strukture, uz dobru opskrbljenost hranjivim elementima. Za sadnju je potrebno duboko zimsko oranje. Sa što manje operacija obrađuje se tlo u rano proljeće kako bi se očuvala vlaga nakupljena zimi. Tlo mora biti ravno, sitno, mrvičasto, vlažno i rahlo do dubine 12 cm. Za dobar prinos droge i eteričnog ulja treba pažljivo izbalansirati gnojidbu. Tako se u jesen prije dubokog oranja u tlo po hektaru unosi 40 kg dušika i 60-80 kg fosfora i kalija. U proljeće se prije sadnje dodaje druga trećina od 40 kg dušika i isto toliko poslije prve košnje. Idućih godina usjevi se gnoje u jesen ili rano u proljeće sa po 30-50 kg svih triju osnovnih elemenata po hektaru. Timijan nema dovoljno bujnu stabljiku koja bi zagušila korov, stoga je borba protiv korova osnovna njega. Ukoliko se pojave višegodišnji perzistentni korovi obavlja se i međuredna kultivacija, a obavezna je radi prozračivanja tla. Najbolje ju je obaviti u jesen poslije gnojidbe [1]. Nadzemni dijelovi biljke se pokose i ubire se timijan. Jedna košnja je u prvoj godini, a u drugoj dvije, u fazi cvjetanja kada biljke sadrže najviše aktivnih tvari. Košnja može biti ručna ili strojna, a visina reza je 7-10 cm iznad tla da bi se smanjila količina drvenastih dijelova u sirovini. Prve godine prinos nije veći od 6 t/ha, a u slijedećim godinama proizvodnje može se dobiti 8-10 t/ha svježe tvari. Kosi se neposredno prije nego što se posve rascvjeta. Nakon prvog rezanja u svibnju ili lipnju, cvate još jednom u rujnu pa je možemo ponovo kositi, ali je nakon druge košnje osjetljiviji na mraz [2].

1.1.2. Ljekovita svojstva timijana

Timijan je jedan od jeftinijih i svakome dostupnih lijekova. U njegovom su sastavu između ostalog borneol, karvakrol, timol, saponini, tanin, glikozidi, vitamini A, C, D, B-kompleks, magnezij, fosfor, kalij i cink. Tradicionalno se upotrebljava za liječenje anemije, groznice, probavnih smetnji i zadaha. Smatra se da je učinkovit protiv svih vrsta grčeva i da ublažava tegobe tijekom PMS-a. Timijan je blagotvoran po želudac zbog toga se često koristi u pripremi jela. Preporučljiv je za djecu koja imaju problem s parazitima, pogotovo glistama, a uz to jača dječji organizam. Timijan čisti pluća od sluzi. Djeluje protiv svih vrsta grčeva, kašlja, bronhitisa, astme i otežanog disanja. Umiruje živce, ali ne uspavljuje. Čaj od timijana pomaže kod kašlja i bronhitisa i djeluje antiseptički. Može se koristiti preventivno

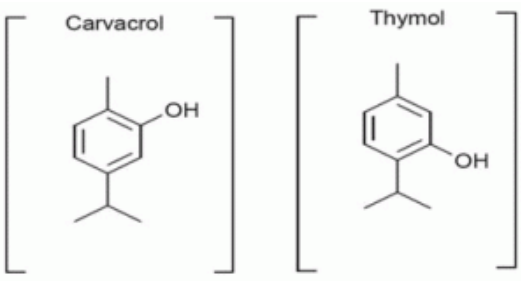
kod prehlada. Timijan djeluje kao: antireumatik, antiseptik, antikoagulans, baktericid, afrodizijak, tonik, stimulant, relaksant, antiparazitik, prirodni konzervans i insekticid.

Kao vanjsko sredstvo može se koristiti za dezinfekciju rana, čireva i opekotina, za liječenje uganuća, modrica, reume te zubobolje. Znanstvenici tvrde da je tinktura timijana vrlo djelotvorna za liječenje akni. Pokazala se učinkovitom i u uništavanju bakterija, a pritom ne izaziva neugodno peckanje i žarenje. Može se primjenjivati u obliku zavoja, obloga i losiona. Kupelji s timijanom preporučuju se za rahitičnu djecu, kod slabih živaca, reume, oteklina i iščašenja [3].

1.1.3. Kemijski sastav i aktivne tvari

Vrsta *Thymus vulgaris*, timijan, jedna je od najpoznatijih ljekovitih vrsta koja ovisno o mjestu rasta i manjim genetskim razlikama može stvoriti vrlo raznolike spojeve, drugim riječima postaje brojni kemotipovi. I dok te razlike i nemaju neko značenje kada sušenu biljku koristimo za pripravu čaja, one dolaze do punog izražaja kada tijekom destilacije vodenom parom izdvajamo eterično ulje [4].

List timijana sadrži do 3% eteričnog ulja. Glavni sastojci ulja su monoterpenski fenoli, timol i karvakrol. Pored njih, u ulju su zastupljeni i drugi monoterpeni, metileter timola, cineol i linalool. Pored eteričnog ulja, ova droga sadrži značajnu količinu heterozida flavonoida, fenolkarbonske kiseline i njihove derivate, kao i tanine. Kao droga se koriste: list (*Thymi folium*), zeljasti nadzemni dio biljke u cvijetu (*Thymi herba*) i eterično ulje (*Thymi aetheroleum*). Sastojci droge (eterično ulje i flavonoidni heterozidi) djeluju kao spazmolitici, opuštaju spazam glatke muskulature bronhija. List i eterično ulje timijana, kao i brojni fitopreparati, koriste se kod različitih vrsta produktivnog kašlja i infekcija gornjih dišnih puteva. List timijana se koristi i kao antiseptik kod infekcija urinarnog trakta; djelovanje fenolnih sastojaka upotpunjeno je diuretičkim djelovanjem flavonoida. Europska agencija za lijekove (EMA) klasificira herbu i eterično ulje timijana kao tradicionalni biljni lijek koji se koristi kao ekspektorans kod kašlja udruženog sa prehladom. U prometu se nalazi u obliku suhe droge (listovi i cvjetovi), tekućih preparata (glicerolni, etanolni i vodeni ekstrakti i tinkture) te svježih ili suhih ekstrakata. Farmaceutski oblici podrazumijevaju tekuće i čvrste oblike za oralnu upotrebu. Kontraindicirana je primjena kod hipersenzitivnosti na aktivne sastojke timijana i drugih članova iz porodice *Lamiaceae* [5].



Slika 2. Kemijska struktura karvakrola i timola

Izvor: http://www.baltikjunior.com/o-divljem-origanu/farmakokinetika-karvakrol-i-timol/

1.2. Antioksidativna aktivnost i antioksidansi

Najvažnije grupe prirodnih antioksidanata u voću i povrću su tokoferoli, flavonoidi, fenolne kiseline, terpenoidi i karotenoidi. Aktivne komponente začinskih biljaka s antioksidativnim učinkom su polifenoli i fenolne kiseline. Brojna istraživanja su pokazala da timijan i njegovo eterično ulje imaju snažno antioksidativno djelovanje. Zheng i Wang (2001.) su određivali antioksidativni kapacitet i ukupni sadržaj fenola u ekstraktima 27 kulinarskih i 12 ljekovitih biljaka. Utvrdili su da timijan spada u ljekovite biljke sa visokim antioksidativnim kapacitetom to jest visokim ORAC vrijednostima (eng. Oxygen Radical Absorbance Capacity), kao i da u biljke sa visokom koncentracijom antioksidanasa (>75 mmol/100g) spadaju: origano, kadulja, nana, timijan, karanfilčić, piment i cimet. Snažnu antioksidativnu aktivnost timijan duguje visokoj koncentraciji polifenolnih kiselina (kafeinska i ružmarinska kiselina) i flavonoidima (eriodiktiol, luteolin, apigenin). Eterično ulje timijana sadrži kao glavne komponente timol i karvakrol, koji su priznati kao spojevi sa snažnom antioksidativnom i antimikrobnom aktivnošću. Također, potvrđena je jaka antioksidativna aktivnost jednog bifenilnog spoja timijana – 3,4,3’,4’-tetrahidroksi-5,5’-diizopropil-2,2’-dimetilbifenil, kao i flavonoida – eridiktiola. Utvrđeno je da eterično ulje timijana ima bolje antioksidativno djelovanje od timola što govori da i druge komponente eteričnog ulja također doprinose antioksidativnoj aktivnosti [5].

Reaktivne kisikove čestice (*eng. Reactive Oxygen Species* ili ROS) kao što su superoksid-radikal ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil-radikal (OH•), peroksil-radikal (ROO•) te čestice radikala kao što je vodikov peroksid (H_2O_2), različiti su oblici aktiviranog kisika. Nastaju u tijelu tijekom normalnih fizioloških procesa i bitni su za opskrbu energijom, detoksikaciju, kemijsku signalizaciju i imunološke funkcije. Enzimi superoksid-dismutaza, glutation-peroksidaza, katalaza i ne-enzimske antioksidacijske rezerve sprječavaju potencijalne štetne učinke

ROS-a. Između stvaranja ROS-a i njihove inaktivacije pomoću antioksidacijskih sustava uspostavljena je ravnoteža u organizmu. U slučaju pretjerane proizvodnje ROS uzrokovane stresom, fizičkim oštećenjem, virusnim infekcijama, citotoksičnim i karcinogenim spojevima ili pak radi smanjenja imuniteta, može doći do oksidacijskog oštećenja molekula DNK, masti i proteina. Oksidativni stres povezuje se sa starenjem i bolestima, uključujući rak, multiplu sklerozu, Parkinsonovu i Alzheimerovu bolest kao i autoimune bolesti. Antioksidanti su sposobni stabilizirati ili inaktivirati slobodne radikale prije nego što napadnu i oštete stanice te su stoga neophodni za održavanje ukupnog zdravlja organizma [7].

1.2.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti prisutni u velikom broju biljnih vrsta u značajnim količinama, poznato ih je oko 8000 te čine jednu od najbrojnijih skupina spojeva u prirodi (Spanos i Wrolstad, 1992.). Međusobno se razlikuju po strukturi, ali njihovu osnovnu strukturu čini aromatski prsten na koji može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina (Bravo, 1998.). Fenolni spojevi djeluju kao antioksidansi na brojne načine, jedan od njih je zbog prisutnosti hidroksilnih skupina u molekuli fenola koje su dobri proton donori koji mogu reagirati s reaktivnim kisikom i dušikom te na taj način spriječiti nastanak novih radikala (Paya i sur. 1992.) Akumuliraju se u vakuolama. Dijele se po složenosti kemijske strukture i fiziološkom djelovanju u više grupa od kojih su najjednostavniji fenoli, a najrašireniji flavonoidi (oko 5 000 vrsta). Od složenih fenola su najrašireniji tanini, lignini i melanini. Veliki broj fenolnih spojeva se sintetizira iz šikiminske kiseline gdje je polazni spoj aminokiselina fenilalanin, a imaju više značajnih funkcija poput stimulacije rasta i razvoja biljaka, zaštite od patogena, boje cvjetova, arome plodova, djeluju kao signalne komponente pri simbiozi s bakterijama fiksatorima N (*Rhizobia*), štite biljku od UV zračenja i dr. Glavni sastojci su fenolni spojevi timijana timol (30-70 %) i karvakrol (3-15 %).

1.2.2.Biljni pigmenti

Kao pigmenti i antioksidansi imaju velik značaj u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Najvažnija funkcija fenolnih flavonoida a naročito antocijanina, zajedno s flavonima i flavonolima kao ko-pigmentima je u formiranju boje cvjetova i plodova biljaka.

Osnovna uloga kloroplastnih pigmenata, posebno klorofila, je apsorpcija svjetlosne energije koja se zatim procesima fotosinteze transformira u kemijsku energiju. Fotoreceptori su obično obojeni, kompleksni organski spojevi čije se optičke osobine zasnivaju na kemijskoj strukturi njihovih molekula. Apsorpcija vidljivog dijela spektra, a s tim u vezi i boja pigmenata, zavisi o prisustvu sistema konjugiranih dvostrukih veza u njihovim molekulama: -C=C- , -C=N- , -N=N- , -N=O- , -C=S-. U fotosintetskom aparatu viših biljaka najznačajniji su klorofili i karotenoidi. Dosada poznati klorofili su -a, -b, -c, -d i -e, a više biljke sadrže klorofil -a ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$) i klorofil -b ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$) koji se nalaze u tilakoidima kloroplasta. Klorofili su esteri dikarbonske kiseline klorofilina i alkohola fitola. Osnovna građevna jedinica je porfirinski prsten u čijem je središtu atom Mg vezan na N četiriju pirolovih prstena s dvije kovalentne i dvije koordinatne veze. Na porfirinsku jezgru vezan je fitolni rep bogat $–CH_3$ skupinama. Porfirinska jezgra je hidrofilna, a fitolni rep je hidrofoban i lipofilan. Modrozeleni klorofil a i žutozeleni klorofil b apsorbiraju vidljivi dio spektra i imaju maksimume apsorpcije u crvenom (600-700 nm) i plavom (400-500 nm) dijelu spektra. Karotenoidi (provitamini A) su narančasto-žuti pigmenti koji su po kemijskoj strukturi derivati izoprena (8 izoprenskih jedinica), a mogu biti aciklični, monociklični i biciklični. Dijele se na karotene i ksantofile. Karoteni su žuto-narančaste boje, a ksantofili imaju kisik u hidroksiketo- ili metoksi- grupi i žute su boje. Najpoznatiji karoteni su β-karoten i likopen. Poznati ksantofili su: lutein, neoksantin, astaksantin, violaksantin i zeaksantin. Uloga im je dvostruka; prijenos energije na klorofil čime se proširuje spektar apsorpcije svjetlosti te zaštita fotolabilnog fotosintetskog aparata od oksidativne destrukcije (Lisjak i sur., 2009).

1.2.3. Vitamin C

Vitamin C ili askorbinska kiselina je vitamin topljiv u vodi, a prisutan je u raznovrsnom voću i povrću. To je jedan od najatraktivnijih, najistraživanijih vitamina i ujedno prvi sintetski dobiveni vitamin. Sudjeluje kao reducens u brojnim biološkim procesima. Važan je za sintezu kolagena i karnitina te za metabolizam masnih kiselina. Najjači je antioksidans među vitaminima topljivim u vodi. Po svojoj strukturi, askorbinska kiselina je ketolakton sa šest ugljikovih atoma pa je kemijski gledano molekula jako slična glukozi. U organizmu reverzibilno oksidira do dehidroaskorbinske kiseline, koja posjeduje potpunu vitaminsku aktivnost. Na zraku je izuzetno nestabilna i lako gubi svojstva skladištenjem i prokuhavanjem. Podložna je oksidaciji, posebno na zraku i pod utjecajem lužina, željeza i

bakra. Vitamin C je visoko učinkovit antioksidans. Čak i male količine vitamina C mogu zaštititi proteine, lipide, ugljikohidrate te nukleinske kiseline (DNA i RNA) od oštećenja putem slobodnih radikala te reaktivnih kisikovih vrsta tijekom normalnog metabolizma, a također i tijekom izlaganja toksinima i zagađenju [8]. Vitamin C je također sposoban regenerirati ostale antioksidanse, kao što je vitamin E (Carr i sur., 1999.). Jedna studija provedena na pušačima pokazala je da vitamin C regenerira vitamin E iz njegove oksidirane forme (Bruno i sur., 2006.).

1.3. Ekstrakcija

Ekstrakcija je ravnotežno odvajanje jedne sastavnice ili više njih iz krute ili smjese u obliku kapljica (ishodišna smjesa), s pomoću drugoga otapala, koje se s otapalom ishodišne smjese ne miješa ili se ograničeno miješa, a ostale sastavnice nisu topljive ili su manje topljive u njemu. Za ekstrakciju se koriste različite konvencionalne metode kao što su destilacija (direktna destilacija eteričnih ulja, destilacija vodenom parom ili destilacija vodom i parom) ekstrakcija otapalima (ekstrakcija otapalom/ima, maceracija, ekstrakcija s uljima) i hladno prešanje. Nekonvencionalne tehnike su ekstrakcija superkritičnim fluidima, turbo – ekstrakcija, ekstrakcija s električnom energijom, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom. (Blekić i sur., 2011).

1.3.1. Klasična ekstrakcija

Fenoli su široko rasprostranjeni u biljnom carstvu i najbrojniji sekundarni biljni metaboliti. Pozornost su privukli zbog svojih snažnih antioksidativnih svojstava i efekata u prevenciji različitih bolesti povezanih s oksidativnim stresom. U zadnjih nekoliko godina njihova ekstrakcija postala je glavno područje zdravstvenih i medicinskih istraživanja. Ekstrakcija bioaktivnih spojeva je prvi korak u iskorištavanju fitokemikalija. Fenoli se mogu ekstrahirati iz svježih, smrznutih ili sušenih biljnih uzoraka. Prije ekstrakcije biljni se uzorci melju, usitnjavaju i homogeniziraju čemu može prethoditi sušenje na zraku ili zamrzavanje. Zamrzavanjem se zadržava veća količina fenola u biljnim uzorcima. Međutim, procesi sušenja, uključujući zamrzavanje, mogu imati neželjene posljedice na sastav biljnih uzoraka (Abascal i sur., 2005.).

Ekstrakcijska otapala su zbog svoje učinkovitosti, široke primjenjivosti i jednostavnosti korištenja najčešći postupci za pripremu biljnih ekstrakata. Općenito je poznato da količina

biljnog ekstrakta ovisi o vrsti otapala i njihovoj polarnosti, vremenu ekstrakcije i temperaturi, zatim odnosu uzorka i otapala, kemijskom sastavu i fizičkim karakteristikama uzorka. Biljni materijal, osim fenola, može sadržavati i druge biljne komponente stoga ne postoji univerzalna ekstrakcijska procedura pogodna za ekstrakciju fenola iz svih biljnih vrsta, a po potrebi se moraju ukloniti neželjene komponente. Kao otapala se najčešće koriste različite koncentracije metanola, etanola, acetona, etil-actetata. Odabir točno određenog otapala utječe na količinu ekstrahiranih fenola (Xu i sur.,2007.). Iako je puno mogućih ekstrakcijskih otapala, prema US Food and Drug Administration za proizvodnju biljnih ekstrakata preporuča se upotreba ekološki prihvatljivih i manje toksičnih organskih otapala kao što su etanol, n-butanol i izopropanol (Bartnick i sur., 2006). Fenolne komponente su također pod utjecajem temperature i vremena ekstrakcije, stoga duže vrijeme ekstrakcije i visoka temperatura povećavaju mogućnosti oksidacije fenola čime se smanjuje količina ekstrahiranih fenola. Od kritične je važnosti odabrati zadovoljavajuću metodu ekstrakcije i zadržati stabilnost fenolnih komponenti. Klasične metode ekstrakcije kao što su maceracija i soxhlet ekstrakcija pokazale su nisku učinkovitost, ali i potencijalno zagađenje okoliša zbog upotrebe velikih količina organskih otapala i dugog vremena ekstrakcije (Dai i sur.,2010.).

1.4. Monokromatska LED svjetlost

Svjetlost je najvažniji ekološki čimbenik u rastu i razvoju biljaka. Ima utjecaj na biljke kroz fotosintezu i svjetlosne odgovore biljaka. Mnogo je odgovora biljaka na svjetlost kao klijanje, deetiolacija, fototropizam i fotoperiodizam. Fotosinteza je kvantitativna reakcija koja se događa u klorofilu biljaka i ovisna je o količini svjetlosti. Nasuprot tome, svjetlosni odgovor biljaka je kvalitativna reakcija te ovisna od valnoj duljini u kojoj stimulacija fotoreceptora u i na citoplazmi djeluje kao okidač mnogih transdukcijskih signala iza kojih slijedi ekspresija karakteristika kao što su klijanje, širenje lista, elongacija internodija i cvjetanje. Na temelju našeg razumijevanja fotosinteze i svjetlosnih odgovora biljaka, kontrola rasta biljaka postala je jedna od glavnih problema poljoprivrede (Ieperen, 2012.). Općenito, postoje dva načina osvjetljavanja biljaka, SL-tip (sunčevo svjetlo) i FAL-tip (potpuno umjetno svjetlo). FAL- tip može precizno kontrolirati uvjete rasta biljaka zbog čega se može imati stabilna proizvodnja u bilo kojem sezonskom dobu i bilo kojoj klimatskoj zoni. U zadnje vrijeme se u FAL-tipu koriste svjetleće diode (LED) kao izvor

svjetlosti jer troše manje električne energije, a veće su izdržljivosti. Valne duljine crvene i plave svjetlosti dosljedne su maksimalnoj apsorpciji klorofila, a LED lampe mogu ih lako proizvesti. Crvene i plave LED lampe mogu se učinkovito koristiti za fotosintezu i svjetlosne odgovore biljaka kao i za brži rast visokoakumulativnih biljaka (Shimokawa i sur., 2014.).

1.5. Cilj istraživanja

1. Laboratorijskim analizama utvrditi sadržaj funkcionalnih komponenti timijana nakon dodatnog osvjetljavanja monokromatskim LED svjetlom.
2. Utvrditi jesu li varijante osvjetljenja značajno utjecale na sadržaj funkcionalnih komponenti.
3. Utvrditi da li trajanje osvjetljavanja značajno utječe na sadržaj funkcionalnih komponenti.
4. Utvrditi da li različite varijante osvjetljavanja utječu na broj i dužinu izboja.

Osnovna hipoteza je bila da dodatno osvjetljenje monokromatskim svjetlom značajno utječe na sadržaj i omjere pojedinih funkcionalnih komponenti u listu timijana. Analizama bi se trebalo utvrditi da li postoje razlike u navedenim parametrima s obzirom na korištene valne duljine u crvenom dijelu odnosu plavom dijelu spektra te njihovom kombinacijom.

2. PREGLED LITERATURE

Prema Badi i sur. (2004.) razmak između biljaka i vrijeme žetve su najvažniji agronomski faktori. Timijan su uzgajali u redovima razmaka 50 cm i razmakom unutar reda 15, 30 i 45 cm. Biljke su se brale u tri faze, odnosno, početkom cvatnje, tijekom pune cvatnje i tijekom plodonošenja. Kako bi se uočio efekta razmaka između biljaka i vremena žetve, određivala se visina biljaka, promjer, prinos suhe i svježe tvari te količina ulja, timola i karvakrola. Razmak između biljaka je imao značajan utjecaj na promjer biljaka (P<0,05) i vrlo je značajan utjecaj (P<0.01) na drugim izmjerenim parametrima, dok na sadržaja ulja nije uočen značajan utjecaj. Vrijeme žetve je imalo značajan utjecaj na prinos svježe tvari te sadržaj ulja i sadržaj karvakrola (P<0,05). Njegov utjecaj je bio vrlo značajan (P<0,01) i na druge parametre osim na prinos suhe tvari i ulja. Maksimalan prinos svježe i suhe tvari te sadržaj ulja i timola dobiveni su pri razmaku od 15 cm i početkom cvatnje. Maksimalan sadržaj timola uočen je pri razmaku od 45 cm i početkom cvatnje, međutim, u odnosu na prinos suhe tvari, sadržaj ulja i timola po jedinici površine, najboljim tretmanom se smatra razmak od 15 cm i vrijeme berbe početkom cvatnje.

Lee i sur. (2005.) određuju hlapljive komponente lišća bosiljka (*Ocimum basilicum* L.) i lišća timijana (*Thymus vulgaris* L.) te njihova antioksidativna svojstva. Aromatski spojevi su identificirani plinskom kromatografijom (GC) i plinskom kromatografijom/masenom spektometrijom (GC/MS). Glavni sastojci bosiljka su 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol (linalool, 3,94 mg/g), 1-metoksi-4- (2-propenil) benzen (estragole; 2,03 mg/g), metil cinamata (1,28 mg/g), 4-alil-2-metoksifenola (eugenol, 0,896 mg/g), i 1,8-cineol (0,288 mg/g). Glavni sastojci timijana su 2-izopropil-5-metilfenola (timol, 8,55 mg/g), 4-izopropil-2-metilfenola (karvakrol, 0,681 mg/g), linalol (0,471 mg/g), α-terpeniol (0,291 mg/g), i 1,8-cineol (0,245 mg/g). Antioksidativna aktivnost je ispitana na 12 aromatskih sastavnica pomoću aldehid-karboksilne kiseline. Eugenol, timol, karvakrol i 4-alilfenol pokazali jače antioksidativno djelovanje od ostalih ispitivanih komponenti, a njihova su se antioksidativna svojstva uspoređivala sa već poznatim antioksidansima kao α-tokoferol i butilirani hidroksi toluen (BHT).

Grigore i sur. (2010.) svoje su istraživanje proveli na hlapivim uljima timijana. Uspoređivali su kvalitetu ulja dobivenog destilacijom vodenom parom i ekstrakcijom

nepolarnim otapalima. Kvantitativna analiza provedena je plinskom kromatografijom (GC), a kvalitativna HPTLC. Određivali su antioksidativni potencijal. Rezultati su pokazali da timijan korišten u tom istraživanju pripada kemotipu timol. Nadalje, utvrđeno je da ulja dobivena destilacijom vodenom parom sadrži visoki udio timola i p-cimena. Plinskom kromatografijom uočeni su samo timol i p-cimen u uzorcima dobivenim nepolarnim ekstrakcijskim otapalima. Oba uzorka pokazala su antioksidativno djelovanje, no nešto malo višu aktivnost pokazali su uzroci dobiveni destilacijom vodenom parom. Istraživanje je dokazalo i da za sposobnost vezanja slobodnih radikala nisu u potpunosti odgovorne samo hlapive komponente već i druge liposolubilne tvari.

Bermejo i sur. (2014.) su ekstrahirali timol (2-izopropil 5-metilfenol) kao glavnu komponentu eteričnih ulja timijana. Uspoređivali su učinak različitih otapala: etanol, limonen i etil-laktata pri tome koristeći PLE i SFE metode ekstrakcije i različite varijetete timijana: *Thymus vulgaris, Thymus zygis* i *Thymus citriodorus*. Prikazani su novi podaci topivosti timola u limonenu i etanolu pri standardnom tlaku i temperaturi 30-43 ºC. Najveći udio timola zabilježen je kod *T. vulgaris* (7-11 mg/g) dok timol iz *T. citridorus* nije bilo moguće kvantificirati PLE metodom. Najviša koncentracija timola u ekstraktima postignuta je s limonenom kao otapalom. Sva tri otapala pokazala su dobru sposobnost ekstrakcije timola iz *Thymus vulgaris* i *Thymus zygis* PLE metodom. Iako se PLE metoda pokazala prikladnom za ekstrakciju timola iz timijana, najviša koncentracija timola ipak je zabilježena SFE metodom.

Vázquez i sur. (2014.) uspoređivali su metode ekstrakcije antrakinona iz *Heterophyllae pustulata* Hook (broćike). Metode koje su uspoređivali su klasična metoda, ultrazvučno potpomognuta i mikrovalno potpomognuta metoda. Antrakinone su izdvajali iz stabljike i lišća broćike. Klasična procedura ekstrakcije antrakinona je bila sukcesivnim Soxhletom s otapalima povećane polarnosti. Počelo se s heksanom kako si se eliminirao klorofil i masne komponente, zatim benzenom i na kraju etil-acetatom. Međutim, ova metoda je pokazala nizak učinak ekstrakcije ukupnih antrakinona pri čemu troši velike količine i otapala i vremena. Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija (UAE) i mikrovalno potpomognuta ekstrakcija (MAE) su istražene kao alternativne metode za izdvajanje ovih spojeva koristeći isti slijed otapala. Utvrđeno je da UAE povećava učinak ekstrakcije ukupnih antrakinona i smanjuje vrijeme i količinu upotrjebljenih otapala. Unatoč tome, najbolje

rezultate pokazuje kombinacija UAE s benzenom i MAE s etil acetatom pri konstantnoj snazi od 900 W. Veća količina ukupnih antrakinona dobivena je u kraćem vremenu i uz upotrebu jednake količine otapala. Optimalni uvjeti za tu drugu proceduru su UAE s benzenom na 50 °C tijekom 60 minuta, zatim MAE na 900 W tijekom 15 minuta, uz korištenje etil-acetata kao otapala.

Danlami i sur. (2014.) također su proveli komparativno istraživanje ekstrakcijskih metoda, ali su ekstrahirali ulja različitih biljaka. Istraživanje je pokazalo da suvremene tehnike ekstrakcije kao mikrovalna ekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija superkritičnim fluidima učinkovito smanjuje glavne nedostatke klasičnih metoda ekstrakcije kao Soxhlet ekstrakcija. To uključuje kraće vrijeme ekstrakcije, veću količinu ekstrahiranih komponenti, manju potrošnju otapala i bolju kvalitetu ekstrakta.

Yoo i sur. (2008.) proveli su istraživanje u kojem su uspoređivali antioksidativnu i citozaštitnu aktivnost. Ispitivali su udio ukupnih fenola, antiokisadtivnu aktivnost i citozaštitnu aktivnost na 17 uobičajenih komercijalnih biljaka. Iz istraživanja su dobili podatke o ukupnim fenolima, flavonoidima, antioksidativnoj aktivnosti i vezanju slobodnih kisikovih radikala. Za timijan (*Thymus vulgaris* L.) podaci o ukupnim fenolima iznosili su 678,6 ± 2,9c mg GAE/100 g Sv.T., za ukupne flavonoide 299,9 ± 0,5d mg CE/100 g Sv.T., za ukupnu antioksidativnu aktivnost 625,8 ± 0,5c mg VCE/100 g Sv.T. te za DPPH 74,5 ± 2,6b %.

Roby i sur. (2013.) istraživali su antioksidativna svojstva i ukupne fenole timijana, kadulje i mažurana. Antioksidativna aktivnost određivala se DPPH metodom, a ukupni fenoli prema Folin–Ciocalteu. Pri određivanju ukupnih fenola, kao otapala, su koristili metanol, etanol, dietil-eter i heksan. Rezultati pokazuju da je metanol najbolje otapalo pri ekstrakciji fenolnih komponenti. Međutim, oboje, metanol i etanol, su dobra otapala zbog njihove polarnosti i dobre topljivosti fenolnih komponenti. Dok su heksan i dietil-eter pokazali slabiju mogućnost ekstrakcije fenolnih komponenti zbog njihove niske polarnosti što znači da su više polarna otapala bolja u ekstrakciji fenolnih spojeva od niže polarnih otapala. Pošto postupkom po Folin-Ciocalteu nije dobiven potpuni uvid u količinu i kvalitetu fenola, potrebno je određivanje individualnih fenolnih sastavnica HPLC analizom (*Tablica 1*).

Tablica 1. Glavni fenolni spojevi (%) identificirani u timijanu, kadulji i mažuranu, ekstrahirani metanolom i određeni HPLC-om (Roby i sur.,2013.)

Fenolni spojevi	% ukupnih		
	timijan	kadulja	mažuran
galna kiselina	–	–	0,29
klorogenska kiseline	–	1,22	0,25
kafeinska kiseline	1,4	1,98	0,16
kininska kiseline	1,84	1,19	–
p-kumarinske kiseline	0,96	1,2	0,38
derivat caffeoylquinic acid	3,41	1,07	–
kvercetin-7-o glukozid	1,72	2,52	–
ferulska kiselina	3,66	18,79	0,12
karnozinska kiselina	7,57	3,77	–
cimetna kiselina	28,54	2,57	–
ružmarinska kiseline	7,32	17,85	15,15
methyl rosmarenate	6,65	–	31,58
apigenin	8,88	14,32	35,23
naringenin	4,14	–	–
luteolin-7-*o*-rutinose	7,65	8,61	9,38
derivat ferulske kiseline	5,21	–	–

Iz *tablice 2* se vidi da su prevladavajući fenolni spojevi: ferulska kiselina (18 %), ružmarinska kiselina (17 %) i apigenin (14 %) od ukupno ekstrahiranih fenola.

Tablica 2. Aktivnost vezanja slobodnih radikala izraženo u EC_{50} i antiradikalna snaga (ARP) pod utjecajem ekstrakcijskog otapala (Roby i sur.,2013.)

biljka	otapalo	EC_{50}	ARP
timijan	metanol	$0,0011 \pm 0,0001^{l}$	$1000 \pm 30,9^{a}$
	etanol	$0,0013 \pm 0,0001^{k}$	$769 \pm 80,4^{b}$
	dietil-eter	$0,0013 \pm 0,0002^{k}$	$669 \pm 80,7^{c}$
	heksan	$0,0022 \pm 0,0005^{f}$	$454 \pm 40,2^{e,f}$
kadulja	metanol	$0,0012 \pm 0,0001^{k}$	$833 \pm 87,0^{b}$
	etanol	$0,0019 \pm 0,0003^{k}$	$526 \pm 77,0^{d,e}$
	dietil-eter	$0,0017 \pm 0,0002^{i}$	$588 \pm 75,0^{c,d}$
	heksan	$0,0027 \pm 0,0011^{d}$	$370 \pm 39,3^{f,g}$
mažuran	metanol	$0,0013 \pm 0,0001^{k}$	$769 \pm 60,1^{b}$
	etanol	$0,0025 \pm 0,0005^{e}$	$400 \pm 72,3^{f,g}$
	dietil-eter	$0,0020 \pm 0,0003^{h}$	$500 \pm 67,9^{d,e}$
	heksan	$0,0035 \pm 0,0009^{k}$	285 ± 73^{h}

Količina biljnog ekstrakta potrebna za smanjenje početne DPPH koncentracija za 50 % (EC_{50}) je parametar koji se koristi za mjerenje antioksidativne aktivnosti. Što je niži EC_{50} to je viša antioksidativna aktivnost.

Drugi značajan parametar je antiradikalna aktivnost (ARP). Što je viša antiradikalna aktivost, jače je vezanje slobodnih radikala. U *tablici 2* prikazan je utjecaj ekstrakcijskog otapala na aktivnost vezanja slobodnih radikala kao i na antiradikalnu aktivnost.
Biljke i otapala značajno ($P \leq 0{,}001$) su utjecala na EC_{50} kao i na ARP. Što se tiče biljaka, timijan je imao najveću ARP vrijednost, dok je metanol kao otapalo imao najveću ARP vrijednost. Statistički, interakcija biljnih materijala i otapala značajno je utjecalo ($P \leq 0{,}001$) na EC_{50}, a time i na ARP vrijednosti. Antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata izražena kao antiradikalna aktivnost (ARP) je statistički značajna ($P \leq 0{,}001$) i pod utjecajem je otapala korištenih za ekstrakciju.

Chizzola i sur. (2008.) radili su istraživanje na varijetetima iz Francuske te na trgovačkom timijanu. Određivali su udio timola iz eteričnih ulja i antioksidativni potencijal. Testovi antioksidativne aktivnosti mjereni su iz ukupnih fenola metodom prema Folin-Ciocalteu, a za određivanje antioksidativne aktivnosti primijenjene su DPPH i FRAP metode. Korištene metode ekstrakcije su u vodenoj kupelji na 40 ºC i ultrazvučnoj kupelji na sobnoj temperaturi. Obje metode su se pokazale učinkovitima. Najbolji rezultati dobiveni su sa 60% -tnim etanolom kao otapalom. Ružmarinska kiselina činila je 22-55 % antioksidativne aktivnosti u etanolnim ekstraktima. Eterična ulja s visokim udjelima fenolnih komponenti timola i/ili karvakrola pokazala su najjaču antioksidativnu aktivnost. Etanolni ekstrakti iz ostataka nakon destilacije imali su znatno nižu antioksidativnu aktivnost od nego pojedini ekstrakti iz suhog lišća. Ekstrakti s CH_2Cl_2 u ultrazvučnoj kupelji sadržavale su hlapive tvari u omjeru sličnom kao i eterična ulja, ali su prikazali veoma nisku antioksidativnu aktivnost.

Martins i sur. (2014.) istraživali su utjecaj ekstrakcijskih metoda na ekstrakt nevena (*Calendula officinalis*). Cilj im je bio optimizirati ekstrakciju rutina iz nevena. Ekstrakcija rutina je izvedena pomoću ultrazvučne kupelji te klasičnom metodom ekstrakcije-maceracijom. Rezultati ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji (UEA) su pokazali raspon 0,218-2,28 % (w/w) rutina i 0,1-1,44 % maceracijom (MD). Optimalni uvjeti za ekstrakciju rutina iz nevena su: 19-22 min ekstrakcija, omjer etanola i vode 35-40 % i 0.05-0.056 mg sirovog materijala / mL otapala. U procesu ekstrakcije postoji više nezavisnih varijabli u interakciji sa odgovornim čimbenicima. Optimizacija ekstrakcije je važna zbog smanjenja

troškova, vremena, energije, materijala, ali i utjecaja na okoliš. Ultrazvučna ekstrakcija je učinkovita, međutim kroz dulji vremenski period može razgraditi rutin.

Sulaiman i sur. (2011.) su proveli klasičnu ekstrakciju primjenom 70 %-tne otopine metanola, acetona i etanola te destiliranom vodom u cijelom nizu svježih biljaka. Ekstrakti su ispitani na ukupni sadržaj fenola, flavonoida i na antioksidativnu aktivnost (koristeći DPPH i FRAP metodu). Rezultati su prikazali utjecaj različitim ekstrakcijskih otapala u mijenjanju kvantitativne analize svog povrća i 70 % aceton je identificiran kao najučinkovitije otapalo u ekstrakciji fenola. Najveći sadržaj ukupnih fenola i flavonoida dobiveni je iz ekstrakta sa 70 %-tnim acetonom iz *Portulaca oleracea* (138.2 ± 2.1 mg GAE/g sm) te iz ekstrakta sa 70 %-tnim metanolom iz *Cosmos caudatus* (27,7 ± 1,0 mg QE/g sm). Analiza koleracija 37 različitih ekstrakata sa svakim ekstrakcijskim otapalom pokazala je slab do umjeren odnos između svih ispitivanih parametara.

Yanagi i sur. (1996.) istraživali su efekt crvenog i plavog monokromatskog osvjetljenja uz pomoć crvenih i plavih dioda (LED) na rast i morfogenezu salate. Salatu su uzgajali hidroponski 20 dana pod 3 različite svjetlosti (crvena, plava i crvena/plava) i 2 različite PPF razine (85 i 170 μmol/m^2/s) te sa 16 sati dana i 8 sati noći s temperaturama 20 do 22 °C. Bez obzira na PPF razine, biljke pod crvenim svjetlom razvile su više listića od biljaka pod plavim svjetlom, ali manje od biljaka pod crveno/plavim svjetlom. Stopa zakrivljenosti lista bila je manja pod plavim svjetlom nego pod crvenim. Kut inklinacije sedmog lista bio je veći pri plavoj i crveno/plavoj svjetlosti te pri višoj PPF razini. Suha masa cijele biljke bila je veća pri većoj PPF razini (170 μmol/m^2/s).

Schuerger i sur. (1997.) promatrali su utjecaj crvene LED svjetlosti na papriku (*Capsicum annuum* L.). Pratili su utjecaj kvalitete MH lampi i LED lampi različitog svjetlosnog spektra na anatomiju lista i stabljike. Jedna LED lampa (660) daje 99 % crvene svjetlosti na 660 nm i 1 % daleko-crvene svjetlosti između 700 i 800 nm. Druga LED lampa (660/735) daje 83 % crvene svjetlosti na 660 nm i 17 % daleko-crvene na 735 nm. Treća LED lampa (660/plava) daje 98 % crvene svjetlosti na 660 nm, 1 % plave svjetlosti između 350 i 550 nm i 1% daleko-crvene svjetlosti između 700 i 800 nm. Kontrolne biljke rasle su pod širok spektrom HM lampe. Biljke su uzgajanje pri prosječnom protoku fotona (300-800 nm) 330 μmol/m^2/s i pri 12 sati dan/noć. Zapažene su značajne promjene u anatomiji

stabljike i lista kod biljaka uzgojenih pod LED lampama u odnosu na biljke uzgojene po širokim spektrom MH lampe. Poprečni presjek stabljike, debljina sekundarnog ksilema, broj provodnih snopića floema u perifernom dijelu tkiva stabljike, debljina lista, broj kloroplasta po palisadnim stanicama mezofila, debljina palisadnog i spužvastog sloja mezofila bila je najveća kod uzgoja paprike pod MH lampom, srednja pri uzgoju pod 660/plava LED lampom, najmanja pod 660 i 660/735 LED lampama. Efekt spektralne kvalitete na anatomske promjene tkiva lista i stabljike paprike u pravilu su povezane s količinom plave svjetlosti prisutne u primarnom izvoru svjetlosti.

Samuoliene i sur. (2010.) istraživanje su proveli na jagodama (*Fragaria x Ananassa* Duch.). U komore za naklijavanje stavili su reznice jagodna koje su izlagali tretmanima mjesec dana. Tretirali su samo crvenim svjetlom 200 μmol/m^2/s PPF i kombinacijom crvenog i plavog svjetla u trajanju od 16 sati i pri temperaturama 21 ºC dan i 16 ºC noć. Nakon mjesec dana izlaganja reznica svjetlosnim tretmanima, reznice su presađene u staklenike. Uočeni su pozitivni učinci izlaganja biljaka plavom i crvenom svjetlu. Njihovi rezultati pokazali su utjecaj spektralnog sastava na akumulaciju i odnos biljnih pigmenata, kao i na akumulaciju primarnih produkata fotosinteze (fruktoza, glukoza). U njihovim istraživanjima, jagode tretirane crvenim + plavim svjetlom akumulirale su manje klorofila a i klorofila b u odnosu na crveno svjetlo, ali je odnos klorofil a/b bio viši u usporedbi s tretmanom crvene svjetlosti. Uočeno je i značajno povećanje sadržaja glukoze i fruktoze u listu jagode pod plavim i crvenim svjetlom. Tretman crvenim svjetlom imao je najnižu akumulaciju glukoze i fruktoze. Također su uočene i morfološke promjene. Crveno LED svjetlo uzrokovalo je izduživanje cvjetne stapke kao i cijele biljke. Crveni i plavi tretman imao je pozitivan utjecaj na formiranje vriježa, cvati. Zaključili su da su za razvoj jagoda potrebne crvene i plave spektralne komponente.

Lin i sur. (2012.) proveli su istraživanje na salati (*Lactuca sativa* L.var.*capitata*) u kojima im je cilj bio pratiti biomasu biljke, akumulaciju klorofila, karotenoida, topivih proteina i šećera te nitrate. Uzgoj salate je bio hidroponski, a uvjeti uzgoja su bili 16 sati dana, dnevna temperatura 24 ºC, a noći 20 ºC, 75 % relativna vlaga, razina CO_2 900 μmol/ mol, protok fotona 210 μmol/m^2/s, pod cvrno-plavim (RB) LED osvjetljenjem, crveno-plavim-bijelim (RBW) LED osvjetljenjem i kontrola pod fluorescentnim lampama (FL). Masa suhe i svježe tvari nadzemnog dijela i korijena bila je najveća pri tretmanu RBW LED, a

najniže pri RB LED. Masa svježeg nadzemnog dijela pod RBW LED značajno se povećala za 10% u usporedbi s kontrolom pod FL osvjetljenjem. Odnos nadzemne mase i korijena značajno je veći pod RB LED. Sadržaj klorofila a u svim tretmanima je veći od sadržaja klorofila b, međutim nije bilo značajne razlike u sadržaju pigmenata unatoč različitim osvjetljenjima. Nije bilo značajne razlike u sadržaju topivih proteina unatoč različitim osvjetljenjima, međutim, sadržaj topivih šećera i nitrata je pod utjecajem osvjetljenja. Sadržaj šećera je najveći pod RBW osvjetljenjem, najniži pod RB, nasuprot tome, sadržaj nitrata najniži je pod RBW, a najviši pod RB tretmanom.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Postavljanje pokusa

Biljni materijal (*Thymus vulgaris* L.) komercijalne biljke bio je star dvije godine i visine 30 cm. Za potrebe pokusa upotrijebili smo 16 biljaka iz jednakih uvjeta uzgoja. Postavljene su na konstrukciju za izvođenje pokusa i ostavljene tjedan dana da se aklimatiziraju. Nakon tjedan dana provedene su kontrolne analize. Za praćenje morfoloških promjena timijana izloženog tretmanima, na svakoj biljci označeno je 9 stabljika, izmjerena je njihova dužina i broj izboja. Pokus je postavljen 27. svibnja i započet je tretman svjetlima. Pokus je postavljen u četiri ponavljanja. Biljke su podijeljene u četiri varijante tretmana: varijanta bez dodatne svjetlosti, varijanta crveno svjetlo, plavo svjetlo i crveno + plavo LED svjetlo u vremenu 7-10 i 16-19 h. LED lampama je izmjeren broj luxa i u prosjeku po lampi je izmjereno 3500-4000 luxa. Uzorci su analizirani dva i četiri tjedna nakon početka osvjetljavanja.

Na dan uzorkovanja, 5 g biljnog materijala je izmacerirano tekućim dušikom do finog praha i na vagi s četiri decimale odvagane su odgovarajuće mase za svaku analizu. Sve analize obuhvaćale su spektrofotometrijsko određivanje koncentracije određenih metabolita. Mjerenja su obavljena na aparatu Varian Cary 50 UV-VIS Spectrophotometer uz programsku podršku Cary WinUV software (Varian Inc.).

3.2. Određivanje sadržaja klorofila i karotenoida

Prema Holmu I Wetstteinu, odvaže se 0,1 g macerata u plastične epruvete od 15 ml, tome se doda $MgCO_3$ (na vrh noža) radi neutralizacije kiselosti te se prelije čistim acetonom. Uzorci se homogeniziraju na vorteksu, a zatim centrifugiraju 10 minuta pri 4000 G. Automatskom pipetom se pipetira supernatanti u kivetu te se na spektrofotometru mjeri na 662, 644 i 440 nm. Nula se podešava čistim acetonom, a dobivene apsorbance uzoraka preračunavaju u koncentracije klorofila a, blorofila b, ukupnih klorofila te karotenoida u mg/mL, uvrštavanjem apsorbanci u Holm-Wetstteinove formule.

3.3. Određivanje vitamina C

Koncentracija vitamina C je određena metodom prema Roe i Kuetheru (1943.) uz neke izmjene. Prvo su pripremljene otopine DNPH reagensa (2g DNPH, 230 mg tiouree, 270 g $CuSO_4$, 100 ml 5 M H_2SO_4), 13,3% TCA te stock otopina askorbinske kiseline (0,1

mg/mL). U plastične epruvete od 15 mL odvagano je 0,5 g macerata i homogenizarno s 10 mL destilirane vode i centrifugirano 15 minuta pri brzini 3000 RCF na 4ºC. Otpipetirano je 300 µl u 2 epruvete od 2 ml: jedna za *uzorak* druga za *slijepu probu*. U obje epruvete dodano je 100 µl 13,3 % TCA te 25 µl dH_2O. *Uzorku* je dodano 75 µl 2 % DNPH i svi uzorci su 3 sata inkubirani u vodenoj kupelji na 37ºC. Nakon inkubacije *slijepoj probi* dodano je 75 µl 2% DNPH. Svim uzorcima dodano je 500 µl 65 % H_2SO_4. Na spektrofotometru su određene apsorbance na 520 nm. Za stupnjevanje transmisije pripremljeni standardi točno poznatih koncentracija vitamina C. Za standarde je pripremljena stock otopina 10 mg askorbinske kiseline/100 mL dH_2O od koje su pripremljena razrjeđenja s koncentracijama 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 µl stock otopine. Kao nula je korištena reakcijska smjesa bez askorbinske kiseline. Mjerenja je obavljeno na 520 nm te je pomoću navedenih standarda izrađena baždarna krivulja iz koje je dobivena funkcija za izračun količine vitamina C prema podacima o apsorbanci *uzoraka* i *slijepe probe*. Koncentracija ukupnog vitamina C izražena je u mg vitamina C/100 g Sv.T.

3.5. Određivanje ukupnih fenola

Za određivanje fenola, prvo su pripremljene otopine galne kiseline gdje je 5 mg GA dodano 10 mL etanola te do oznake 100 mL nadopunjeno dH_2O. Zasićena otopina Na_2CO_3 pripremljena je u tikvici od 250 mL, dodano je 50 g bezvodnog Na_2CO_3 u 200 mL dH_2O te zagrijavano do točke vrenja. Nakon hlađenja, otopini je dodano još par kristalića Na_2CO_3. Nakon 24 sata otopina je profiltrirana i do oznake je dodana dH_2O.

Ukupni fenoli određeni su metodom po Folin-Ciocalteau-u. Odvagano je 0,5 g macerata u plastičnu epruvetu od 15 mL i dodano je 2,5 mL 70 % etanola. Uzorci su ostavljeni 48 sati, nakon toga centrifugirani 20 min pri 400 G. Odvojen je ekstrakt u epruvete od 2 mL te razrijeđen u omjeru 1:9. Otpipetirano je 100 µl ekstrakta, dodano 1,5 mL dH_2O i 100 µl Folin-Ciocalteau reagensa te vorteksirano. Nakon 5 minuta stajanja, dodano je 300 µl zasićene Na_2CO_3 otopine i ponovo vorteksirano. Reakcijska smjesa je zatim stavljena na inkubaciju 60 minuta na 37 ºC. Ekstrakti su rađeni u triplikatu. Nakon inkubacije, na spektrofotometru je mjerena apsorbanca pri 765 nm. Za izradu baždarne krivulje, kao standard se koristi galna kiselina. Pripremljena stock otopina galne kiseline koncentracije 5 mg/mL otpipetirana je u različitim volumenima, dodana je dH_2O do 100 µl te su ostale otopine dodane kao u uzorcima. Iz baždarne krivulje dobivena je jednadžba pomoću koje se izračunava koncentracija fenola izražena u mg GA/g Sv.T..

3.6. Određivanje antioksidativnog kapaciteta

Određivanje antioksidativne aktivnosti provedeno je DPPH metodom prema Brand-Williamsu. Prije određivanja pripremljen je DPPH reagens. Odvagano je 0,004 g DPPH i otopljeno u 100 mL etanola. Pripremljena je stock otopina askorbinske kiseline. 0,01 g askorbinske kiseline dodano je u 100 mL dH_2O. Pomoću askorbinske kiseline pripremljeni su standardi različitih koncentracija te su mjerene apsorbance pri 520 nm odmah nakon dodavanja DPPH reagensa (t_0) i 30 minuta nakon dodavanja reagensa (t_{30}). Napravljena je baždarna krivulja s točno poznatim koncentracijama otopine i određen je EC 50.

Iz fenolnog ekstrakta razrijeđenog u omjeru 1:9, otpipetirani su različiti volumeni ekstrakta (20, 30, 40, 50, 60, 70 µl) te je do volumena 100 µl dodan etanol, a zatim i DPPH reagens do volumena 2 mL. Nakon t_{30} mjerena je apsorbanca i rađena krivulja iz koje je dobivena jednadžba. Pomoću jednadžbe izračunava se EC 50 svakog uzorka koji je ekvivalent EC 50 poznate koncentracije stock otopine askorbinske kiseline.

3.7. Određivanje sadržaja prolina

Koncentracija prolina određena je metodom prema Bates i sur. (1973.) uz neke izmjene. Za određivanje njegova sadržaja, odvagano je po 0,25 g macerata u plastične epruvete od 15 mL. Uzorcima je dodano po 5 mL 3 %-tne sulfosalicilne kiseline nakon čega su uzorci dobro homogenizirani na vorteksu i 15 minuta pri brzini 4000 RCF. Otpipetirano po 1 mL supernatanta i otpipetiranom je dijelu uzorka dodano 1 mL kiselog ninhidrin reagensa i 1 mL ledene octene kiseline, te su nakon vorteksiranja uzorci 1 h inkubirani u vodenoj kupelji na 100 ˚C. Nakon inkubacije, reakcija je prekinuta prebacivanjem uzoraka na hladni blok, a zatim je iz uzoraka ekstrahiran prolin dodavanjem po 2 mL toluena i miješanjem 15-20 sekundi na vorteksu. Nakon zagrijavanja na sobnu temperaturu toluenski se sloj zajedno s ekstrahiranim prolinom izdvojio na površinu nakon čega je prebačen automatskom pipetom u kivetu za spektrofotometar. Nula je podešena čistim toluenom, dok su za stupnjevanje transmisije pripremljeni standardi točno poznatih koncentracija prolina. Za pripremu standarda pripremljen je osnovni standard koncentracije 20 µg PRO/mL od kojega su pripremljena razrjeđenja s koncentracijama 0, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 16, 20 µg/mL. Mjerenja su obavljena na 520 nm te je pomoću navedenih standarda izrađena standardna krivulja iz koje je dobivena funkcija za izračun količine prolina prema podacima o apsorbanci uzoraka. Konačan sadržaj slobodnog prolina u biljnom tkivu je izražen u µg/g Sv.T..

4. REZULTATI

U prosjeku za sve varijante dodatnog osvjetljenja, F testom je dokazan značajan utjecaj perioda osvjetljavanja na broj novih izboja, omjer klorofila A/B te omjer klorofila i karotenoida (*P*<0,0001) dok na dužinu izboja spomenuti tretmani nisu imali značajan utjecaj (*Tablica 3*).

Prema LSD testu, broj izboja nakon 4 tjedna dodatnog osvjetljenja (8) je bio značajno veći u usporedbi s brojem izboja utvrđenih nakon dva tjedna dodatnog osvjetljenja (3) te prije početka tretmana (1) kod koje je utvrđeno najmanje izboja. Omjeri klorofila A/B su se smanjivali proporcionalno s trajanjem dodatnog osvjetljenja te je tako najniža vrijednost omjera utvrđena u listovima analiziranim nakon četiri tjedna (0,44). Omjer ukupnih klorofila i karotenoida je bio značajno veći nakon četvrtog tjedna (12,69) dok se utvrđene vrijednosti omjera kod nultog tjedna (4,22) te nakon drugog tjedna (4,06) nisu međusobno značajno razlikovale.

Tablica 3. Značajnost utjecaja perioda osvjetljavanja (0 tjedana; 2 tjedna; 4 tjedna) i dodatnog monokromatskog svijetla (BDS-bez dodatnog svijetla; C-crveno LED; P-plavo LED; C+P-crveno + plavo LED) te njihova interakcija na dužinu izboja (cm), broj izboja, omjer klorofila A i klorofila B te omjer ukupnih klorofila i karotenoida.

FAKTOR	VARIJANTA	dužina izboja (cm)	broj izboja	kl A/B	kl/kar
Period	0 tjedana	10,8	1^{C}	$2,60^{A}$	$4,22^{B}$
	2 tjedna	11,1	3^{B}	$2,46^{B}$	$4,06^{B}$
	4 tjedna	11,2	8^{A}	$0,44^{C}$	$12,69^{A}$
	F test	0,42	88,62	9316,44	1109,72
	P	0,6574	**<0,0001**	**<0,0001**	**<0,0001**
Svjetlo	BDS	$10,5^{BC}$	4	$1,87^{A}$	$6,87^{B}$
	C	11.9^{A}	5	$1,86^{A}$	$6,94^{AB}$
	P	$11,8^{AB}$	4	$1,81^{AB}$	$7,55^{A}$
	C+P	$9,9^{C}$	3	$1,79^{B}$	6.60^{B}
	F test	7,13	1,28	5,74	5,53
	P	**0,0007**	0,2969	**0,0026**	**0,0032**
Period x Svjetlo	F test	0,18	0,17	2,33	4,57
	P	0,9813	0,9826	0,0527	**0,0015**

*Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (^{A,B,C}; *P*=0,05).

U prosjeku za sva tri perioda uzorkovanja dodatno osvjetljenje je značajno utjecalo na dužinu izboja (*P*=0,0007), omjere klorofila A/B (*P*=0,0026) te ukupnih klorofila i karotenoida (*P*=0,0032).

Prema LSD testu, biljke u varijanti crveno svjetlo su imale najduže izboje (11,9 cm) i značajno su se razlikovale od biljaka bez dodatnog osvjetljenja (10,5 cm) te biljaka pod crvenim + plavim svjetlom gdje je utvrđena najmanja dužina izboja (9,9 cm) koja se nadalje nije značajno razlikovala od dužine izboja utvrđenih kod biljaka pod plavim svjetlom (11,8 cm). Omjer klorofila A/B je bio najmanji pod crvenim + plavim svjetlom (1,79) i statistički se značajno razlikovao od vrijednosti omjera pod crvenim svjetlom (1,86) te bez dodatnog svjetla (1,87), a nije se statistički značajno razlikovao od vrijednosti utvrđene pod plavim svjetlom (1,81). Za razliku od omjera klorofila A/B, omjer ukupnih klorofila i karotenoida najvišu vrijednost je imao pod plavim svjetlom (7,55) te se značajno razlikovao od omjera utvrđenih kod biljaka u varijanti crveno + plavo svjetlo i bez dodatnog svjetla.

Interakcija period x svjetlo je značajno utjecala samo na omjer ukupnih klorofila i karotenoida (*P*=0,0015), dok na ostale ispitivane parametre nije imala značajan utjecaj.

Period osvjetljavanja, prema F testu, je značajno utjecao na sve ispitivane parametre prikazane u *Tablici 4.*, sadržaj klorofila A, klorofila B i karotenoida (*P*<0,0001), ukupni klorofila (*P*=0,0019).

Prema LSD testu, koncentracija klorofila A (0,04 mg/g Sv.T.) te karotenoida (0,01 mg/g Sv.T.) utvrđena u četvrtom tjednu je bila značajno niža u usporedbi s prethodna dva uzorkovanja, čije se vrijednosti nisu međusobno statistički značajno razlikovale. Nasuprot tome, sadržaj klorofila B (0,10 mg/g Sv.T.) te ukupnih klorofila (0,14 mg/g Sv.T.) je u četvrtom tjednu uzorkovanja bio značajno viši od sadržaja utvrđenih u prva dva uzorkovanja čije se vrijednosti također nisu međusobno značajno razlikovale.

Dodatno osvjetljenje je u prosjeku za sve periode uzorkovanja značajno utjecalo na sadržaj klorofila B (*P*=0,0294) te su se prema LSD testu varijante crveno (0,05 mg/g Sv.T.) i plavo svjetlo (0,06 mg/g Sv.T.), međusobno značajno razlikovale ali se vrijednosti u obje navedene varijante nisu značajno razlikovale od utvrđenih u tretmanu bez dodatnog svjetla (0,05 mg/g Sv.T.) i tretmanu crvenim + plavim svjetlom (0,05 mg/g Sv.T.).

Tablica 4. Značajnost utjecaja perioda osvjetljavanja (0 tjedana, 2 tjedna, 4 tjedna) i određene monokromatske svjetlost (BDS-bez dodatnog osvjetljavanja; C-crveno LED; P-plavo LED; C+P-crveno + plavo LED) te njihova interakcija na sadržaj klorofila A, B, klorofila A+B i karotenoide (mg/g Sv.T.).

FAKTOR	VARIJANTA	kl A (mg/g Sv.T.)	kl B (mg/g Sv.T.)	kl A+B (mg/g Sv.T.)	kar (mg/g Sv.T.)
Period	0 tjedana	$0{,}08^{A}$	$0{,}03^{B}$	$0{,}12^{B}$	$0{,}03^{A}$
	2 tjedna	$0{,}09^{A}$	$0{,}04^{B}$	$0{,}12^{B}$	$0{,}03^{A}$
	4 tjedna	$0{,}04^{B}$	$0{,}10^{A}$	$0{,}14^{A}$	$0{,}01^{B}$
	F test	52,78	438,8	7,49	93,71
	P	**<0,0001**	**<0,0001**	**0,0019**	**<0,0001**
Svjetlo	BDS	0,07	$0{,}05^{AB}$	0,13	0,02
	C	0,07	$0{,}05^{B}$	0,12	0,02
	P	0,08	$0{,}06^{A}$	0,14	0,02
	C+P	0,07	$0{,}05^{AB}$	0,13	0,02
	F test	1,27	3,35	1,97	1,41
	P	0,2976	**0,0294**	0,1361	0,2565
Period x Svjetlo	F test	0,6	1,49	0,71	0,7
	P	0,7285	0,2107	0,6411	0,6499

*Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (^{A,B,C}; *P*=0,05).

U prosjeku za sve varijante osvjetljenja, F testom je utvrđen značajan utjecaj perioda osvjetljavanja na sadržaj vitamina C (*P*<0,0001), ukupnih fenola (*P*=0,0057) i prolina (*P*=0,0283) te antioksidativni kapacitet (*P*=0,0005) (*Tablica 5*).

Vitamina C se proporcionalno smanjivao s trajanjem dodatnog osvjetljenja te je tako najniža vrijednost utvrđena nakon četiri tjedna (78,36 mg vit C/100g Sv.T.), a najveća prije dodatnog osvjetljenja, odnosno u nultom tjednu (127,78 mg vit C/100g Sv.T.). Sadržaj ukupnih fenola je bio značajno veći nakon četiri tjedna osvjetljavanja (13,20 mg PHE/g Sv.T.) i statistički se značajno razlikovao od sadržaja vitamina C nakon dva tjedna osvjetljavanja (11,13 mg PHE/g Sv.T.), ali se nije značajno razlikovao od nultog tjedna (11,98 mg PHE/g Sv.T.). Antioksidativni kapacitet je bio značajno najveći nakon četiri tjedna osvjetljavanja (1011,56 mg AA/100g). Također je i sadržaj prolina bio značajno veći nakon četvrtog tjedna (0,37 µmol P/g Sv.T.) u odnosu na nulti tjedan (0,17 µmol P/g Sv.T.), ali se nije značajno razlikovao od sadržaja nakon dva tjedna osvjetljavanja.

Tablica 5. Značajnost utjecaja perioda osvjetljavanja (0 tjedana, 2 tjedna, 4 tjedna) i određene monokromatske svjetlost (BDS-bez dodatnog osvjetljavanja; C-crveno LED; P-plavo LED; C+P-crveno + plavo LED) te njihova interakcija na sadržaj prolina (µmol P/g Sv.T.), vitamina C (mg vit.C/ 100g Sv.T.), sadržaj ukupnih fenola (mg PHE/g Sv.T.), antioksidacijsku aktivnost, odnosno mogućnost vezanja 50 % DPPH radikala (IC50) (mgAA/ml) i antioksidativni kapacitet izražen kao ekvivalent askorbinskoj kiselini (AEAC) (mg AA/100g).

FAKTOR	VARIJANTA	mg vit.C/ 100g Sv.T.	mg PHE/g Sv.T.	IC50 (mgAA/ml)	AEAC (mg AA/100g)	µmol P/g Sv.T.
Period	0 tjedana	127,78^{C}	11,98^{AB}	20,02	706,43^{B}	0,17^{B}
	2 tjedna	116,46^{B}	11,13^{B}	20,03	746,53^{B}	0,22^{AB}
	4 tjedna	78,36^{A}	13,20^{A}	20,01	1011,56^{A}	0,37^{A}
	F test	29,4	5,99	1,05	9,44	3,94
	P	**<0,0001**	**0,0057**	0,3612	**0,0005**	**0,0283**
Svjetlo	BDS	114,83	11,86	20,01	792,05	0,23
	C	109,46	12,07	20,02	811,88	0,21
	P	119,76	11,64	20,03	753,91	0,30
	C+P	111,27	12,84	20,03	928,19	0,28
	F test	1,91	1,15	1,1	1,45	0,49
	P	0,1459	0,3436	0,3616	0,2439	0,693
Period x Svjetlo	F test	2,64	0,89	0,79	0,91	0,75
	P	**0,0315**	0,5129	0,5843	0,5002	0,6115

*Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (^{A,B,C}; *P*=0,05).

U prosjeku za sva tri perioda uzorkovanja, varijanta osvjetljavanja nije imala značajan utjecaj na ispitivane parametre prikazane u *Tablici 5.*, dok je interakcija period x svjetlo značajno utjecala samo na ukupni sadržaj vitamina C (*P*=0,0315).

Prvo uzorkovanje je bilo početno, nulto uzorkovanje, odnosno prije početka tretmana monokromatskim svjetlom. Prema F testu u 0 tjednu, biljke su se međusobno značajno razlikovale u dužini izboja (*P*=0,0949), u omjeru klorofila A i klorofila B (*P*=0,0055) te u omjeru klorofila i karotenoida (*P*=0,0364) (*Tablica 6.*). Nakon dva tjedna varijante osvjetljenja nisu imali statistički značajan utjecaj na ispitivane parametre, a nakon četiri tjedna varijanta osvjetljenja je značajno utjecala na omjer klorofila i karotenoida (*P*=0,0184).

Tablica 6. Utjecaj pojedinih tretmana monokromatskim svjetlom (BDS-bez dodatnog svijetla; C-crveno LED; P-plavo LED; C+P-crveno + plavo LED) na dužinu izboja (cm), broj izboja, omjer klorofila A i klorofila B te omjer ukupnih klorofila i karotenoida u tri perioda uzorkovanja.

0 tjedana				
VARIJANTA	**dužina izboja (cm)**	**broj izboja**	**kl A/B**	**kl A+B/kar**
BDS	$9{,}9^{A}$	1	$2{,}68^{A}$	$4{,}25^{A}$
C	$11{,}5^{A}$	1	$2{,}63^{A}$	$4{,}25^{A}$
P	$11{,}5^{AB}$	1	$2{,}55^{B}$	$4{,}28^{A}$
C+P	$9{,}8^{B}$	0	$2{,}53^{B}$	$4{,}10^{B}$
F test	3,51	2,39	7,03	3,93
P	**0,0494**	0,1196	**0,0055**	**0,0364**
2 tjedna				
BDS	10,7	3	2,48	4,10
C	12,0	4	2,48	4,13
P	11,8	3	2,45	4,05
C+P	9,7	3	2,42	3,98
F test	2,45	0,37	0,89	1,37
P	0,1142	0,7788	0,4744	0,2983
4 tjedna				
BDS	10,8	8	0,44	$12{,}25^{B}$
C	12,3	9	0,44	$12{,}45^{B}$
P	11,7	7	0,44	$14{,}32^{A}$
C+P	10,0	7	0,44	$11{,}73^{B}$
F test	1,91	0,53	2,14	4,94
P	0,1811	0,6704	0,1482	**0,0184**

*Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (^{A,B,C}; P=0,05).

Prema LSD testu, nakon dva tjedna dodatnog osvjetljenja su utvrđene statistički značajne razlike u dužini izboja pri crvenoj i plavoj svjetlosti gdje su ujedno i vrijednosti bile najniže (9,8 cm) u odnosu na varijante bez dodatnog svjetla i crveno svjetlo, koje se nadalje nisu značajno razlikovale u usporedbi s varijantom plavo svjetlo (11,5 cm). Omjer klorofila A i klorofila B se statistički značajno razlikovao u varijantama plavo (2,55) i crveno + plavo svjetlo (2,53). Prethodno navedene vrijednosti su se značajno razlikovale od varijanata bez dodatnog svjetla (2,68) i crveno svjetlo (2,63) koje se nisu međusobno značajno razlikovale. Omjer klorofila i karotenoida (4,10) pri crvenom + plavom svjetlu je bio značajno niži od vrijednosti utvrđenih pri ostalim varijantama koje se nisu međusobno značajno razlikovale. Nakon četvrtog tjedna i dalje je omjer klorofila i karotenoida ostao

značajno najviši u varijanti crveno + plavo (14,32) osvjetljenje, dok se omjeri utvrđeni kod preostalih varijanti nisu međusobno značajno razlikovali.

F testom nije uočen značajan utjecaj dodatnog osvjetljenja na sadržaj klorofila A, klorofila B, klorofila A i B i karotenoida pri različitim periodima uzorkovanja (*Tablica 7*).

Tablica 7. Utjecaj pojedinih tretmana monokromatskim svjetlom (BDS-bez dodatnog svijetla; C-crveno LED; P-plavo LED; C+P-crveno + plavo LED) na sadržaj klorofila A, klorofila B, klorofila A+B i karotenoida (mg/g Sv.T.) u tri perioda uzorkovanja.

0 tjedana				
VARIJANTA	**mg kl A/ g Sv.T.**	**mg kl B/ g Sv.T.**	**mg kl A+B/ g Sv.T.**	**mg kar/ g Sv.T.**
BDS	0,09	0,03	0,12	0,03
C	0,07	0,02	0,10	0,02
P	0,09	0,04	0,13	0,03
C+P	0,08	0,03	0,12	0,03
F test	0,77	0,91	0,8	0,77
P	0,5326	0,4629	0,5166	0,535
2 tjedna				
BDS	0,08	0,03	0,12	0,03
C	0,09	0,04	0,12	0,03
P	0,09	0,04	0,12	0,03
C+P	0,09	0,04	0,13	0,03
F test	0,7	1,09	0,82	2,11
P	0,5696	0,3894	0,5096	0,1528
4 tjedna				
BDS	0,04	0,10	0,14	0,01
C	0,04	0,10	0,14	0,01
P	0,05	0,11	0,16	0,01
C+P	0,04	0,09	0,13	0,01
F test	3,33	3,44	3,41	0,07
P	0,0564	0,0517	0,0531	0,974

*Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (^{A,B,C}; *P*=0,05).

U nultom (*P*=0,0107) i drugom tjednu (*P*=0,0283), F testom je određen značajan utjecaj varijanti dodatnog osvjetljenja na sadržaj vitamina C u različitim periodima uzorkovanja (*Tablica 8*).

Tablica 8. Utjecaj pojedinih tretmana monokromatskim svjetlom (BDS-bez dodatnog svijetla; C-crveno LED; P-plavo LED; C+P-crveno + plavo LED) na sadržaj prolina (µmol P/g Sv.T.), vitamina C (mg vit C/ 100g Sv.T.), sadržaj ukupnih fenola (mg PHE/g Sv.T.), antioksidacijsku aktivnost, odnosno mogućnost vezanja 50 % DPPH radikala (IC50) (mg AA/ml) i antioksidativni kapacitet izražen kao ekvivalent askorbinskoj kiselini (AEAC) (mg AA/100g) u tri perioda uzorkovanja.

0 tjedana					
VARIJANTA	**mg vit.C/ 100g Sv.T.**	**mg PHE/g Sv.T.**	**IC50 (mgAA/ml)**	**AEAC (mg AA/100g)**	**µmol P/g Sv.T.**
BDS	104,53^{A}	12,32	20,03	693,76	0,12
C	93,01^{B}	11,89	20,01	648,96	0,13
P	92,81^{B}	11,51	20,03	686,57	0,16
C+P	98,63^{AB}	12,19	20,02	796,44	0,28
F test	5,84	0,14	0,25	2,25	2,41
P	**0,0107**	0,9335	0,8567	0,1349	0,1173
2 tjedna					
BDS	109,72^{BC}	10,91	19,99	781,10	0,25
C	108,33^{C}	11,74	20,03	806,60	0,21
P	125,96^{A}	10,72	20,05	678,30	0,20
C+P	121,84^{AB}	11,17	20,05	720,10	0,25
F test	4,29	0,34	1,57	0,66	0,28
P	**0,0283**	0,7967	0,2468	0,592	0,8422
4 tjedna					
BDS	130,26	12,34	20,00	901,30	0,31
C	127,02	12,57	20,02	980,10	0,30
P	140,50	12,71	20,01	896,93	0,55
C+P	113,35	15,19	20,01	1268,00	0,30
F test	1,7	2,73	0,34	1,09	0,56
P	0,2208	0,0903	0,7984	0,3891	0,6541

*Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (^{A,B,C}; *P*=0,05).

U nultom tjednu uočen je najveći sadržaj vitamina C kod biljaka odabranih za varijantu bez dodatnog osvjetljenja (104,53 mg vit C/100g Sv.T.) i značajno su se razlikovale od biljaka odabranih za varijante crveno + plavo svjetlom, ali se nisu značajno razlikovale od onih namijenjenih za tretman crveno + plavo svjetlo. U drugom tjednu najviši sadržaj C vitamina je uočen u listovima biljaka pod plavim svjetlom (125,96 mg vit C/100g Sv.T.) i statistički se značajno razlikovao od vrijednosti utvrđene pod crvenim svjetlom (108,33 mg vit C/100g Sv.T.) i bez dodatnog osvjetljenja (109,72 mg vit C/100g Sv.T.), ali se nije značajno razlikovao od vrijednosti utvrđene u varijanti crveno + plavo svjetlo.

Prema F testu vrijeme trajanja pojedine varijante dodatnog osvjetljenja je značajno utjecalo na broj izboja, omjer klorofila A/B i omjer klorofila i karotenoida. U varijantama bez dodatnog osvjetljenja (*P*=0,0006), crveno svjetlo (*P*=0,0005), plavo svjetlo (*P*=0,0002) te crveno + plavo (*P*=0,0001) trajanje osvjetljenja je značajno utjecalo na dužinu izboja. Statistički značajan utjecaj vremena trajanja dodatnog osvjetljenja na omjer klorofila A i klorofila B (*P*<0,0001) i omjer klorofila i karotenoida (*P*<0,0001) je vidljiv pri svim varijantama osvjetljenja (*Tablica 9*).

Tablica 9. Utjecaj perioda uzorkovanja, odnosno vremena trajanja dodatnog osvjetljenja na dužinu izboja (cm), broj izboja, omjer klorofila A i klorofila B te omjer ukupnih klorofila i karotenoida pri varijantama dodatnog osvjetljenja.

Bez dodatne svjetlosti				
VARIJANTA	**dužina izboja (cm)**	**broj izboja**	**kl A/B**	**kl A+B/kar**
0 tjedana	9,9	1^{C}	$2,8^{A}$	$4,3^{B}$
2 tjedna	10,7	3^{B}	$2,5^{B}$	$4,1^{B}$
4 tjedna	10,8	8^{A}	$0,4^{C}$	$12,3^{A}$
F test	0,28	19,13	2752,65	382,77
P	0,7596	**0,0006**	**<0,0001**	**<0,0001**
Crveno svjetlo				
0 tjedana	11,5	1^{B}	$2,6^{A}$	$4,2^{B}$
2 tjedna	12,0	4^{B}	$2,5^{B}$	$4,1^{B}$
4 tjedna	12,3	9^{A}	$0,4^{C}$	$12,5^{A}$
F test	0,91	20,37	1162,6	171,53
P	0,4375	**0,0005**	**<0,0001**	**<0,0001**
Plavo svjetlo				
0 tjedana	11,8	1^{B}	$2,5^{A}$	$4,3^{B}$
2 tjedna	11,8	3^{B}	$2,4^{B}$	$4,1^{B}$
4 tjedna	11,7	7^{A}	$0,4^{C}$	$14,3^{A}$
F test	0,01	25,82	5179,7	355,17
P	0,9923	**0,0002**	**<0,0001**	**<0,0001**
Crveno + plavo svjetlo				
0 tjedana	9,8	0^{C}	$2,5^{A}$	$4,1^{B}$
2 tjedna	9,7	3^{B}	$2,4^{B}$	$4,0^{B}$
4 tjedna	10,0	7^{A}	$0,4^{C}$	$11,7^{A}$
F test	0,1	27,36	3656,07	304,62
P	0,9056	**0,0001**	**<0,0001**	**<0,0001**

*Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (^{A,B,C}; *P*=0,05).

Prema LSD testu, broj izboja je kod svih tretmana bio najveći u četvrtom tjednu, odnosno, nakon četiri tjedna osvjetljavanja. U tretmanima crveno + plavo svjetlo te bez dodatne svjetlosti, broj izboja se povećavao proporcionalno s trajanjem dodatnog osvjetljenja dok je u varijantama crveno svjetlo (9) te plavo (7) najveći broj izboja utvrđen nakon četvrtog tjedna i statistički se značajno razlikovao od broja utvrđenih u nultom i nakon drugog tjedna. Omjer klorofila A i klorofila B se proporcionalno smanjivao s trajanjem dodatnog osvjetljenja, odnosno, omjer A/B je bio najmanji u četvrtom tjednu (0,4) i u svim se tretmanima statistički značajno razlikovao od nultog i drugog tjedna koji su se također međusobno značajno razlikovali. Kod svih varijanti, najveće vrijednosti omjera klorofila i karotenoida te broja izboja su zabilježene nakon četvrtog tjedna te su se statistički značajno razlikovale od vrijednosti dobivenih u nultom i nakon drugog tjedna (*Tablica 9*).

F testom je ustanovljen značajan utjecaj vremena trajanja dopunskog osvjetljenja na sadržaj klorofila A, klorofila B, klorofila A i B te karotenoida pri različitim varijantama osvjetljenja (*Tablica 10*). Kod biljaka koje nisu dodatno osvjetljavane, utvrđen je značajan utjecaj trajanja osvjetljenja na sadržaj klorofila A, klorofila B, karotenoida. U tretmanu crveno svjetlo, trajanje osvjetljenja je značajno utjecalo na sadržaj klorofila B (P<0,0001) te karotenoida (P=0,0255). U varijanti plavo svjetlo, trajanje osvjetljenja je značajno utjecalo na sadržaj klorofila A (P<0,0001), klorofila B (P<0,0001), ukupnih klorofila (P=0,0076) te karotenoida (P<0,0001). Kod varijante osvjetljenja plavo + crveno svjetlom, trajanje osvjetljenja značajno je utjecalo na sadržaj klorofila A, klorofila B te karotenoida (P<0,0001).

U listovima biljaka koje nisu dodatno osvjetljavane, LSD testom su utvrđene značajne razlike u sadržaju klorofila A te je nakon četiri tjedna, njegov sadržaj bio značajno najniži (0,04 kl A mg/g Sv.T.) u usporedbi s nultim te nakon drugog tjedna. Sadržaj klorofila B u četvrtom tjednu je bio značajno veći (0,10 kl B mg/g Sv.T.) u odnosu na nulti i drugi tjedan. Nasuprot tome, sadržaj karotenoida, kao i klorofila A, nakon četvrtog tjedna je bio statistički značajno niži (0,01 kar mg/g Sv.T.) u odnosu na nulti i drugi tjedan.

U varijanti gdje su biljke osvjetljavane crvenim svjetlom, trajanje dodatnog osvjetljenja je značajno utjecalo na sadržaj karotenoida koji je nakon četiri tjedna imao značajno najnižu vrijednost (0,01 kar mg/g Sv.T.) dok je sadržaj klorofila B značajno porastao (0,10 kl B mg/g Sv.T.) u odnosu na nulti i drugi tjedan.

Tablica 10. Utjecaj perioda uzorkovanja, odnosno vremena trajanja dodatnog osvjetljenja na sadržaj klorofila A, klorofila B, klorofila A+B i karotenoida (mg/g Sv.T.) pri varijantama dodatnog osvjetljenja.

Bez dodatne svjetlosti				
VARIJANTA	**kl A mg/g Sv.T.**	**kl B mg/g Sv.T.**	**kl A+B mg/g Sv.T.**	**kar mg/g Sv.T.**
0 tjedana	0,09^{A}	0,03^{B}	0,12	0,03^{A}
2 tjedna	0,08^{A}	0,03^{B}	0,12	0,03^{A}
4 tjedna	0,04^{B}	0,10^{A}	0,14	0,01^{B}
F test	47,42	110,66	3,17	107,45
P	**<0,0001**	**<0,0001**	0,0909	**<0,0001**
Crveno svjetlo				
0 tjedana	0,07	0,03^{B}	0,10	0,02^{AB}
2 tjedna	0,09	0,04^{B}	0,12	0,03^{A}
4 tjedna	0,04	0,10^{A}	0,14	0,01^{B}
F test	3,51	50,38	1,56	5,67
P	0,0747	**<0,0001**	0,2625	**0,0255**
Plavo svjetlo				
0 tjedana	0,09^{A}	0,04^{B}	0,13^{B}	0,03^{A}
2 tjedna	0,09^{A}	0,04^{B}	0,13^{B}	0,03^{A}
4 tjedna	0,05^{B}	0,10^{A}	0,16^{A}	0,01^{B}
F test	35,54	591,06	8,81	94,51
P	**<0,0001**	**<0,0001**	**0,0076**	**<0,0001**
Crveno + plavo svjetlo				
0 tjedana	0,08^{A}	0,03^{B}	0,12	0,03^{B}
2 tjedna	0,09^{A}	0,04^{B}	0,13	0,03^{A}
4 tjedna	0,04^{B}	0,09^{A}	0,13	0,01^{C}
F test	61,5	150,41	2,02	121,01
P	**<0,0001**	**<0,0001**	0,1849	**<0,0001**

*Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (^{A,B,C}; *P*=0,05).

Trajanje dodatnog osvjetljenja je u varijanti plavo svjetlo imalo značajan utjecaj na sve analizirane parametre. Nakon četvrtog tjedna uočen je značajno smanjenje sadržaja klorofila A (0,05 kl A mg/g Sv.T.) i karotenoida (0,01 kar mg/g Sv.T.) čije su se vrijednosti značajno razlikovale od utvrđenih u nultom i drugom tjednu. Nakon četvrtog tjedna sadržaj klorofila B (0,10 kl B mg/g Sv.T.) i ukupnih klorofila (0,16 kl A+B mg/g Sv.T.) je bio značajno viši od vrijednosti utvrđenih u nultom i nakon drugog tjedna. Pri navedenoj varijanti osvjetljenja, sadržaj klorofila i karotenoida utvrđen u nultom i nakon

drugog tjedna nije statistički značajno razlikovao te su značajno najniže vrijednosti oba parametra utvrđene nakon četvrtog tjedna.

U varijanti osvjetljenja crveno + plavo svjetlo, trajanje osvjetljenja statistički je značajno utjecalo na sadržaj klorofila A, koji je kao i u drugim tretmanima, nakon četvrtog tjedna postigao značajno najnižu vrijednost (0,04 kl A mg/g Sv.T.), dok je sadržaj klorofila B, kao i u prethodno opisanim varijantama, bio značajno viših vrijednosti (0,09 kl B mg/g Sv.T.) u odnosu na nulti i drugi tjedan.

Tablica 11. Utjecaj perioda uzorkovanja, odnosno vremena trajanja dodatnog osvjetljenja na sadržaj prolina (µmol P/g Sv.T.), vitamina C (mg vit C/100g Sv.T.), sadržaj ukupnih fenola (mg PHE/g Sv.T.), antioksidacijsku aktivnost, odnosno mogućnost vezanja 50 % DPPH radikala (IC50) (mg AA/ml) i antioksidativni kapacitet izražen kao ekvivalent askorbinskoj kiselini (AEAC) (mg AA/100g) pri varijantama dodatnog osvjetljenja.

Bez dodatnog osvjetljavanja					
VARIJANTA	**mg vit.C/ 100g Sv.T.**	**mg PHE/g Sv.T.**	**IC50 (mgAA/ml)**	**AEAC (mg AA/100g)**	**µmol P/g Sv.T.**
0 tjedana	104,53^{B}	12,32	20,03	693,76	0,12
2 tjedna	109,72^{B}	10,91	19,99	781,10	0,25
4 tjedna	130,26^{A}	12,34	20,00	901,30	0,31
F test	8,01	1,84	1,39	3,13	1,66
P	**<0,0001**	0,2142	0,2989	0,0929	0,2435
Crveno svjetlo					
0 tjedana	93,02^{C}	11,89	20,01	649,00	0,13
2 tjedna	108,33^{B}	11,74	20,03	806,60	0,21
4 tjedna	127,02^{A}	12,57	20,02	980,10	0,30
F test	16,98	0,24	0,20	1,82	2,11
P	**0,0009**	0,7946	0,8202	0,2173	0,1775
Plavo svjetlo					
0 tjedana	92,81^{B}	11,51	20,03	686,57	0,16
2 tjedna	125,96^{A}	10,72	20,05	678,31	0,20
4 tjedna	140,50^{A}	12,71	20,01	896,86	0,55
F test	11,35	1,95	1,37	3,46	1,64
P	**0,0035**	0,1980	0,3030	0,0768	0,2464
Crveno + plavo svjetlo					
0 tjedana	98,63	12,19	20,05	796,40	0,28
2 tjedna	121,84	11,17	20,02	720,10	0,25
4 tjedna	113,35	15,19	20,01	1268,00	0,30
F test	3,74	3,72	0,82	3,73	0,2
P	0,0657	0,0665	0,4715	0,0659	0,8237

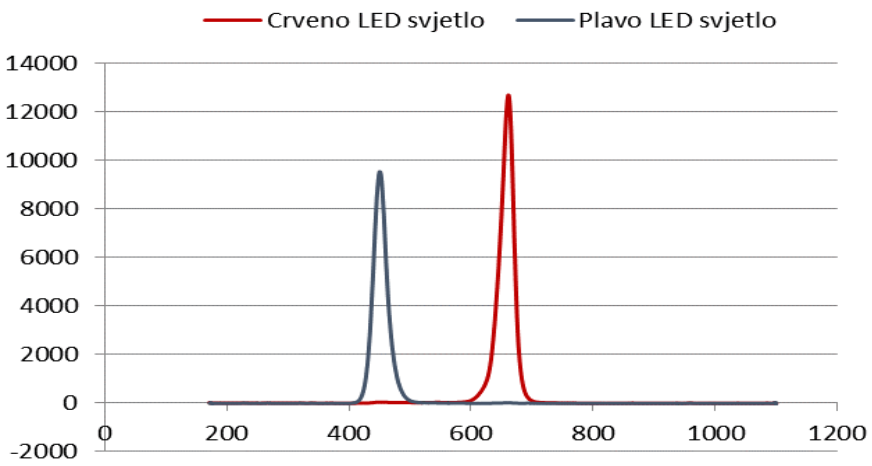
*Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (^{A,B,C}; P=0,05).

Prema F testu, trajanje osvjetljenja je značajno utjecalo na sadržaj vitamina C koji u varijanti bez dodatnog osvjetljenja (P<0,0001), pod crvenim svjetlom (P=0,0009) te u varijanti pod plavim svjetlom (P=0,0035) (*Tablica 11*).

Prema LSD testu, u varijanti bez dodatnog osvjetljenja, u četvrtom tjednu je utvrđen značajno veći sadržaj vitamina C (130,26 mg vit C/100g Sv.T.) u odnosu na nulti i drugi tjedan. U varijanti osvjetljenja s crvenim svjetlom sadržaj C vitamina je također bio veći u četvrtom tjednu (127,02 mg vit.C/100g Sv.T.) u odnosu na nulti (93,02 mg vit C/100g Sv.T.) te se utvrđena vrijednost se nije značajno razlikovala od one utvrđene nakon drugog tjedna (108,33 mg vit C/100g Sv.T.). U varijanti plavo osvjetljenje je i dalje u četvrtom tjednu sadržaj vitamina C bio najviši (140,50 mg vit.C/100g Sv.T.) te se nije značajno razlikovao od vrijednosti utvrđene nakon drugog tjedna (125,96 mg vit.C/100g Sv.T.). Pri spomenutoj varijanti osvjetljenja značajno najniža vrijednost navedenog pokazatelja (92,81 mg vit.C/100g Sv.T.) je utvrđena u nultom tjednu.

5. RASPRAVA

Svjetlo je jedan od najvažnijih faktora koji utječe na morfološke, ali i fiziološke promjene kod biljaka. Utjecaj intenziteta svjetlosti dobro je poznat dok je spektralni sastav manje poznat, a jednako važan. Iz tog razloga se u zadnjih nekoliko godina istražuje utjecaj LED svjetlosti točno određenih valnih duljina. Poznato je da crveni i plavi dio spektra ima najveći utjecaj na rast biljaka jer fotoni tih valnih duljina predstavljaju glavni izvor energije za asimilaciju CO_2 putem fotosinteze. Spektralni sastav svjetla može izazvati različite morfološke i fiziološke odgovore koji se mogu razlikovati među različitim biljnim vrstama. U našem istraživanju su biljke timijana (*Thymus vulgaris* L.) dodatno osvjetljavane monokromatskim svjetlom. Korištena su LED crvena, s pikom apsorpcije na 662 nm, LED plava, pik apsorpcije na 450 nm i kombinacija obje varijante, LED crvena + plava svjetla.

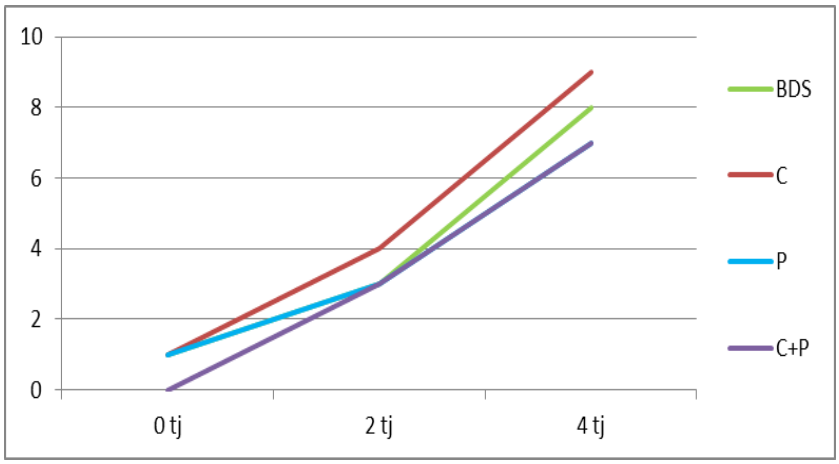


Graf 1. Prikaz pikova crvenog i plavog svjetla

Pretpostavljeno je da će korištene valne duljine monokromatske svjetlosti djelovati različito na neke morfološke pokazatelje te sadržaj funkcionalnih komponenata u listu. Između varijanti monokromatskog svijetla nije bilo statistički značajnih razlika, no dobiveni rezultati ipak ukazuju na neke morfološke i fiziološke razlike između varijanti osvjetljenja.

Morfološki gledano, LED crveno svjetlo je potaknulo razvoj većeg broja bočnih izboja u odnosu na druga dodatna osvjetljenja (*Graf 2*). Najmanji broj bočnih izboja zabilježen je na plavom i crvenom + plavom LED svjetlu. U nultom tjednu broj bočnih izboja je bio podjednak kod svih biljaka. Već nakon dva tjedna osvjetljavanja uočene su razlike u

tretmanima crvenim svjetlom i crvenim + plavim LED svjetlom u odnosu na biljke bez dodatnog osvjetljenja. Nakon četiri tjedna najveći broj bočnih izboja zabilježen je na crvenom LED svjetlu dok je na plavom i crvenom + plavom LED svjetlu zabilježen manji broj bočnih izboja u usporedbi s biljkama bez dodatnog osvjetljenja.



Graf 2. Utjecaj trajanja dodatnog osvjetljenja te varijante tretmana na broj izboja

Poznato je da svjetlost svojim spektralnim sastavom djeluje na auksine, biljne hormone koji reguliraju elongaciju stabljike i razvoj bočnih ogranaka. Liu i sur. (2011.) su istraživali utjecaj crvenog i plavog dijela spektra na mlade biljke rajčice i uročnjaka te su zaključili da se biljni hormon auksin (indol-3-octena kiselina) pojačano sintetizira pod crvenim svjetlom. Moguće je da je i u našem istraživanju crvena svjetlost utjecala na povećanu sintezu aktivnih oblika auksina što je za posljedicu imalo povećan broj bočnih ogranaka. Shinkle i sur. (1987.) istraživali su utjecaj plavog dijela spektra na elongaciju hipokotila krastavca. Simultano uz izlaganje klijanaca plavom svjetlu, autori su dodavali rastuće koncentracije IAA te zapazili smanjeno djelovanje IAA (*Slika 3*). Iz toga autori zaključuju da plavo svjetlo inhibitorno djeluje na fiziološku ulogu auksina.

Iz *grafa 3* uočavamo da u nultom tjednu, odnosno prije početka dodatnog osvjetljavanja, biljke nisu bile ujednačene i među njima su postojale značajne razlike u sadržaju klorofila, ali i ostalih funkcionalnih komponenti. Bez obzira na početne razlike, sadržaj klorofila A i klorofila B je u prva dva tjedna porastao u listovima biljaka osvjetljavanih crvenim LED svjetlom. Slično su dokazali i Samuoliene i sur. (2010.) koji su u svom istraživanju na jagodama koristili crveno i crveno + plavo LED svjetlo.

Međutim, nakon drugog tjedna sadržaj klorofila A pada, a klorofila B raste pri svim varijantama, što je suprotno istraživanju koje su proveli Lin i sur. (2013.) na listovima salate. U njihovom istraživanju sadržaj klorofila A je bio veći od sadržaja klorofila B. No,

kao i u ovom istraživanju, niti oni nisu uočili statistički značajne razlike u sadržaju klorofila u pojedinim varijantama tretmana.

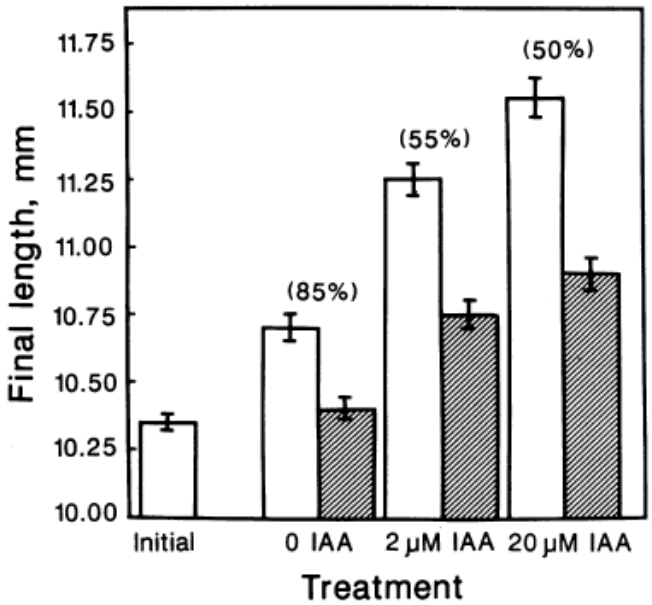
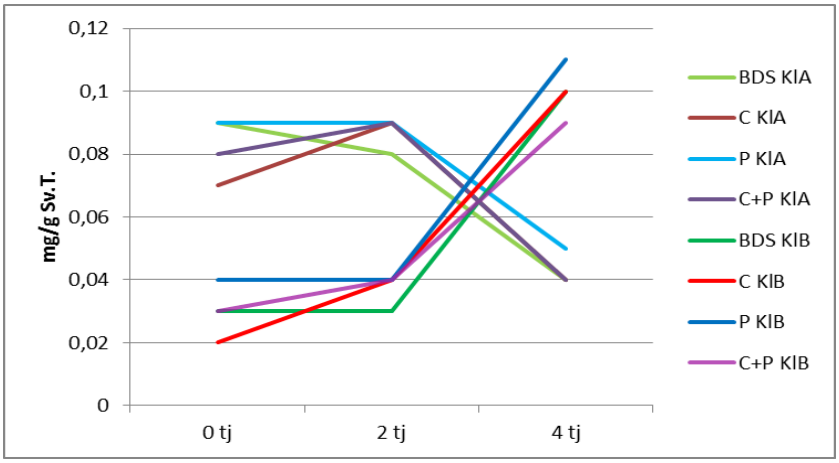


FIG. 2. Lengths of *Cucumis* hypocotyl segments cut from 4-d-old RL-grown seedlings. Final lengths are shown for segments incubated for 3.5 h in 5 mM K-phosphate (pH 6) with additions of auxin (IAA) as shown. Results for RL control (open bars) and BL-treated (hatched bars) segments are shown. Irradiations were as described in "Materials and Methods." Percentages indicate the percent inhibition of elongation caused by BL. Results shown are the average of three replicate experiments; error bars represent the average SE for the three replicates.

Slika 3. Utjecaj plavog svjetla na elongaciju hipokotila krastavca dodavanjem različitih koncentracija IAA (Shinkle i sur.)



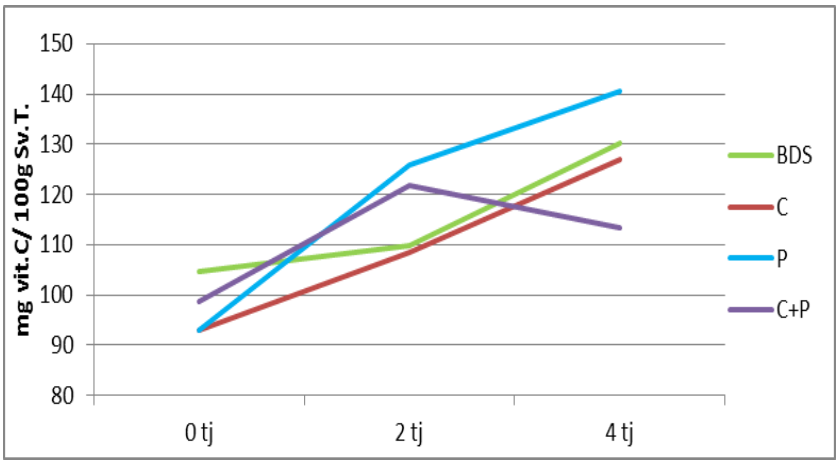
Graf 3. Utjecaj trajanja dodatnog osvjetljenja te varijante tretmana na sadržaj klorofila A i klorofila B (mg/g Sv.T.)

Pošto biljke nisu uzgajane u strogo kontroliranim uvjetima, te je uz svako dodatno osvjetljenje bila i neprestano prisutna bijela svjetlost, moguće je da su biljke jače reagirale

na promjenu intenziteta insolacije nego na dodatno osvjetljenje LED lampama. Naime, prva dva tjedna u početku postavljanja pokusa uslijed naoblake bila je značajno smanjena insolacija uz nepovoljne temperature. Nakon toga je uslijedio period s vedrim vremenom te pojačanom insolacijom te je uzrok promjene u ukupnom sadržaju te omjeru klorofila možda bio rezultat atmosferskih prilika tijekom razdoblja uzorkovanja.

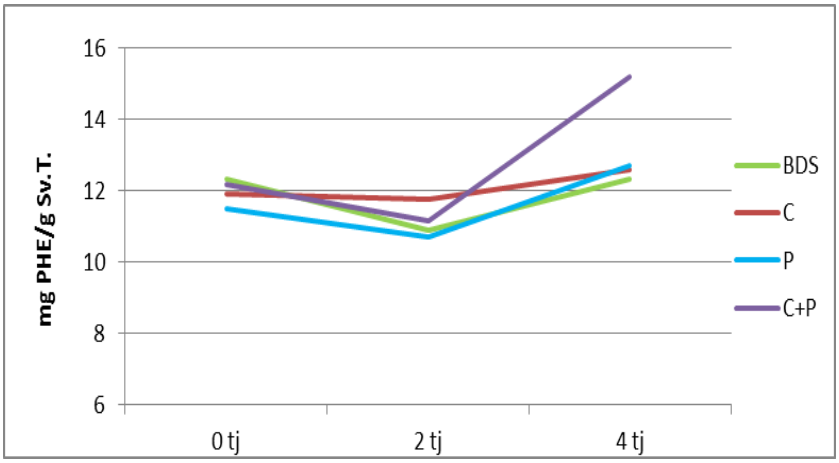
Buschmann i sur. (2008.) navode da je kod biljaka uzgajanih ispod plavog i crvenog svijetla razlika u sastavu tilakoida, fotosintetskoj aktivnosti i strukturi kloroplasta, slična razlici utvrđenoj u listovima izloženima suncu ili sjeni ili pak biljkama uzgajanim u uvjetima intenzivne ili slabe insolacije. U našem pokusu je došlo do značajne promjene u insolaciji nakon drugog tjedna osvjetljavanja te je moguće da dodatna LED rasvjeta, u ukupnoj insolaciji, više nije imala značajnog efekta. Također, je moguće da je efekt plavog svjetla u prva dva tjedna izostao zbog kratkog trajanja dodatnog osvjetljavanja biljaka.

Iz *grafa 4* je vidljivo da se na varijantama plavo i crveno + plavo LED svjetlo povećao sadržaj vitamina C nakon dva tjedna osvjetljavanja što potvrđuje i istraživanje Ohashi-Kaneko i sur. (2007.). Njihovo istraživanje provedeno je na tri biljne vrste, ali su povećanje L-askorbinske kiseline uočili na listu salate i komatsuna kod biljaka uzgajanih pod plavim svjetlom te kombinacijom crveno + plavo svjetlo.



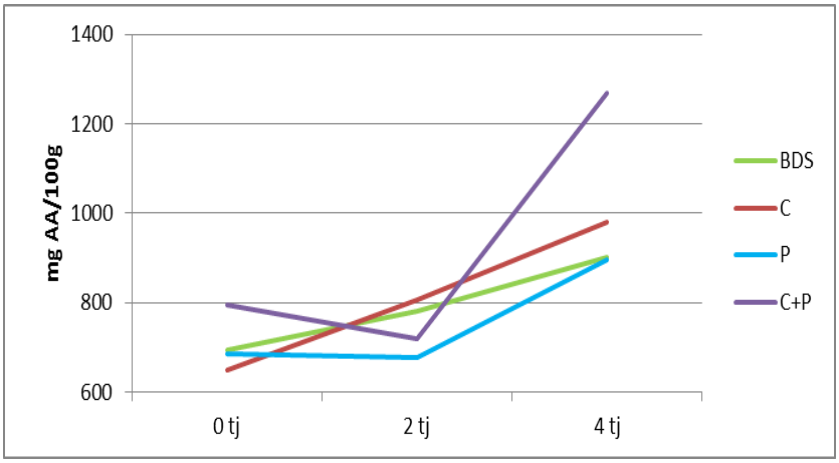
Graf 4. Utjecaj trajanja dodatnog osvjetljenja te varijante tretmana na sadržaj vitamina C (mg vit C/100 g Sv.T.)

Prema istraživanjima drugih autora (Qamaruddin and Tillberg, 1989.) crveno svjetlo bi moglo povećati sadržaj fenola zbog pretpostavke da crveno svjetlo povećava razinu citokinina čime se stimulira sinteza fenola. Li i Kubota (2009.) su provedenom istraživanju uočili razliku u koncentraciji fenola pod crvenim LED i plavim LED svjetlom.



Graf 5. Utjecaj trajanja dodatnog osvjetljenja te varijante tretmana na sadržaj ukupnih fenola (mg PHE/g Sv.T.)

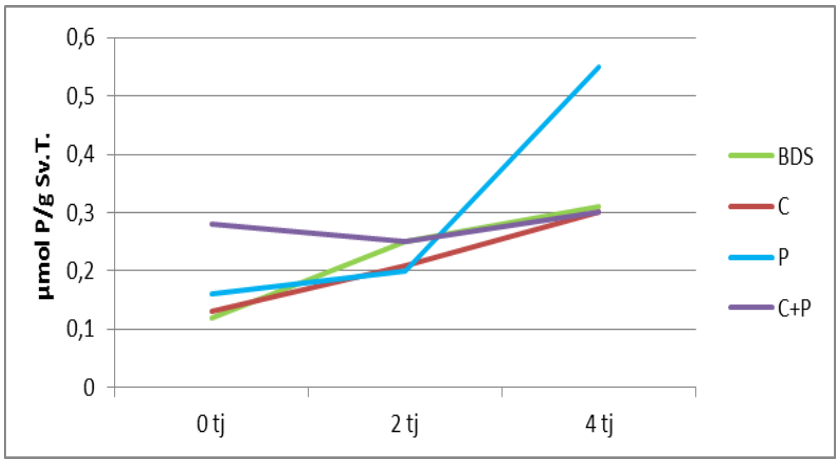
Razlika između varijanti osvjetljenja nije bila statistički značajna, ali su uočili 6 % veću koncentraciju fenola pri varijanti crvenim svjetlom u odnosu na plavo. Nakon dva tjedna dodatnog osvjetljenja, u našem istraživanju je također uočena veća koncentracija fenola u listovima biljaka uzgajanih ispod crvenog LED osvjetljenja (*Graf 5*). Nakon četiri tjedna osvjetljavanja najveću koncentraciju fenola sadržavali su listovi biljaka na varijanti crveno + plavo LED svjetlo što je u svom istraživanju uočio i Rodriguez (2012.). On je dodatno osvjetljavao salatu u zimskim mjesecima kada je slabije prirodno isijavanje. Uočio je da dodatnim osvjetljavanjem kombinacijom crvenog i plavog svjetla postiže istu količinu fenola kao u ljetnim mjesecima bez dodatno osvjetljavanja.



Graf 6. Utjecaj trajanja dodatnog osvjetljenja te varijante tretmana na antioksidativni kapacitet (AEAC) (mg AA/100g)

Iako je efekt intenziteta svjetlosti dobro proučen, nema dovoljno studija koje proučavaju utjecaj na povećanje antioksidativnog sastava u listu s obzirom na spektralni sastav (Bartoli i sur., 2009.). Iz *grafa 6* možemo uočiti da je pri varijanti osvjetljavanja crveno + plavo

svjetlo najveći antioksidativni kapacitet. Što je intenzivnije svjetlo, intenzivnija je fotosinteza i jači protok elektrona, a time je povećano generiranje slobodnih kisikovih radikala. Najintenzivnije osvjetljenje s najvećim brojem luxa je izmjereno pri varijanti osvjetljenja crveno + plavo svjetlo pa je to možda i razlog zašto je na toj kombinaciji blago povišena ukupna antioksidativna aktivnost. S druge strane, povećan je i sadržaj ukupnih fenola na toj varijanti dok je sadržaj vitamina C smanjen. Moguće je da fenoli, u uvjetima dodatnog osvjetljenja, predstavljaju za stanicu energetski ekonomičniju i efektivniju zaštitu od pojačanog bombardiranja fotonima, nego što bi to bila antioksidativna uloga vitamina C.



Graf 7. Utjecaj trajanja dodatnog osvjetljenja te varijante tretmana na sadržaj prolina (µmol P/g Sv.T.)

Prolin funkcionira kao molekularni pratitelj koji posjeduje sposobnost da zaštiti integritet nekih proteina te pojača učinak nekih enzima. Dokazano je da akumulacija slobodnog prolina regulira toleranciju na stres na više načina. Neka su istraživanja prolinu pripisala antioksidativnu ulogu sugerirajući ROS sakupljačku aktivnost te mogućnost stabilizacije singletnog kisika (Szabados i Savouré, 2010.). U grafu (*Graf 7*) možemo uočiti da je sadržaj prolina najviši nakon četiri tjedna osvjetljavanja pri varijanti plavo svjetlo. I sadržaj prolina i vitamina C, koji također djeluje kao antioksidans, je najveći pod plavim svjetlom.

Na kraju se nameću pitanja bi li duže dopunsko osvjetljenje dalo drukčije rezultate, bismo li vidjeli veće razlike između varijanti osvjetljenja da su biljke bile mlađe i koliki je mogući efekt dopunskog svjetla u trajanju od osam sati dnevno u usporedbi s ukupnim dnevnim svjetlom punog intenziteta.

6. ZAKLJUČAK

1. Timijan je termofilna i fotofilna biljka koja se zbog uvjeta rasta u svojem prirodnom staništu odlikuje visokim sadržajem vitamina C i fenola, a time i visokim antioksidativnim kapacitetom. Ukupna količina luksa kojom su biljke osvjetljavane za vrijeme pokusa (dnevno svjetlo uz varijante dodatnog osvjetljavanja), nije prelazila van optimuma za timijan te je najvjerojatnije zbog toga izostao efekat na značajno veću akumulaciju antioksidativnih komponenti a time i na ukupnu antioksidativnu aktivnost.

2. Kontrola spektralnog sastava svjetla, trajanja i intenziteta osvjetljenja, je korisna kako bi se postigla veća produktivnost i veća nutritivna vrijednost komercijalnih biljaka, iako učinkovitost spektralnog sastava te njegovo djelovanje ovisi o biljnoj vrsti, njezinim morfološko-fiziološkim svojstvima te fazi rasta i razvoja u kojoj se biljke dodatno osvjetljavaju. Biljke koje smo koristili bile su stare dvije godine te uzgajane u nepovoljnom sklopu pa su to možda razlozi zašto je reakcija na varijante korištenog LED osvjetljenja izostala.

3. U našem pokusu je nakon dvotjednog perioda slabije insolacije i niskih temperatura došlo do nagle promjene ekoloških uvjeta. Temperature i insolacija su naglo porasli, te je najvjerojatnije prirodno svjetlo značajno utjecalo na analizirane pokazatelje te maskiralo efekat primijenjenih varijanti tretmana dodatnim LED osvjetljenjem. Moguće je da bi efekt dodatnog LED osvjetljenja na ispitivane parametre bio značajno utjecajniji na biljke uzgajane u zatvorenim prostorima s manjom količinom ili pak bez bijele dnevne svjetlosti.

4. Na varijanti plavo svjetlo je utvrđen najveći sadržaj vitamina C i prolina dok je na varijanti crveno + plavo LED osvjetljenje utvrđen najveći sadržaj ukupnih fenola i najviši antioksidativni kapacitet što može biti rezultat intenzivnijeg bombardiranja stanica fotonima. Također je moguće da postoji balans fizioloških reakcija sinteze i razgradnje pojedinih antioksidativnih komponenti te njihovih omjera u stanici, koji je, osim intenzitetom svjetla, uvjetovan i samim spektralnim sastavom.

5. Varijanta crveno LED osvjetljenje je rezultirala najvećim brojem izboja, budući da crvena svjetlost dokazano potiče na pojačani lateralni prijenos auksina, a što je poželjno u komercijalnoj proizvodnji ove biljke gdje je cilj dobiti što više mladih izboja koji su bogati različitim funkcionalnim komponentama.

7. POPIS LITERATURE

1. Abascal, K., Ganora, L., Yarnell, E. (2005.): The effect of freeze-drying and its implications for botanical medicine: a review. Phytother. Res. 19, 655-660.
2. Badia, H.N.,, Yazdania, D., Alib, S.M., Nazarib, F. (2004.): Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, Thymus vulgaris L. Industrial Crops and Products. 19 (3) 231–236.
3. Bartnick, D.D., Mohlerm C.M., Houlihan, M. (2006.): Methods for the production of food grade extracts. United States Patent Application, 20060088627.
4. Bartoli, C.G., Tambussi, E.A., Diego, A., Foyer, C.H. (2009.): Control of ascorbic acid synthesis and accumulation and glutathione by the incident light red/far red ratio in Phaseolus vulgaris leaves. FEBS Letters. 583 (1) 118–122.
5. Blekić M., Režek Jambrak A., Chemat F. (2011.): Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. Croatian Journal of Food Science and Technology. 3 (1) 32-47.
6. Bravo, L. (1998.): Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutrition Review. 56 (11) 317-33.
7. Bruno R.S., Leonard S.W., Atkinson J. (2006.): Faster plasma vitamin E disappearance in smokers is normalized by vitamin C supplementation. Free Radical Biology and Medicine. 40 (4) 689-697.
8. Buschmann, C., Meier, D., Kleudgen, H. K., Lichtenthaler, H. K. (2008.): Regulation of chloroplast development by red and blue light. Photochemistry and Photobiology. 27 (2) 195–198.
9. Carr A.C., Frei B. (1999.): Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. American Journal of Clinical Nutrition. 69 (6) 1086-1107.
10. Chizzola, R., Michitsch, H., Franz, C. (2008.): Antioxidative Properties of Thymus vulgaris Leaves: Comparison of Different Extracts and Essential Oil Chemotypes. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56 (16) 6897–6904.
11. Čančarević, A., Bugarski, B., Šavikin, K., Zdunić, G. (2013.): Biološka aktivnost vrsta Thymus vulgaris i Thymus serpyllum i njihovo korišćenje u etnomedicini. Institut Za Proučavanje Lekovitog Bilja "Dr Josif Pančić". 33, 3-17.
12. Dai, J., Mumper, R.J. (2010.): Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant Anticancer Properties. Molecules. 15 (10) 7313-7352.

13. Danlami, J.M., Arsad, A., Zaini, M.A.A., Sulaiman, H. (2014.): A comparative study of various oil extraction techniques from plants. Reviews in Chemical Engineering. 30 (6) 605–626.
14. Ieperen, W. van (2012.): Plant morphological and developmental responses to light quality in a horticultural context. Acta Horticulturae. 956, 131-139.
15. Jakobović, Z. (2007.):Tehnički leksikon, Leksikografski zavod Miroslav Krleža. ISBN 978-953-268-004-1, 174.
16. Lee, S.J., Umano, K., Shibamoto, T., Lee, K.G. (2005.): Identification of volatile components in basil (Ocimum basilicum L.) and thyme leaves (Thymus vulgaris L.) and their antioxidant properties. Food Chemistry. 91 (1) 131–137.
17. Lia, Q. i Kubotab, C. (2009.): Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. Environmental and Experimental Botany. 67 (1) 59–64.
18. Lin, K.H., Huang, M.Y., Huang, W.D., Hsu, M.H., Yang, Z.W., Yang, C.M. (2013.): The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (Lactuca sativa L. var. capitata). Scientia Horticulturae. 150, 86-91.
19. Lisjak, M., Špoljarević, M., Agić, D., Andrić, L. (2009.): Praktikum iz fiziologije bilja. Poljoprivredni fakultet Osijek, Osijek.
20. Liu, X., Cohen, J.D., Gardner, G. (2011.): Low-Fluence Red Light Increases the Transport and Biosynthesis of Auxin. Plant Physiology. 157 (2) 891–904.
21. Martins, F.S., da Conceição, E.C., Bandeira, E.S., Silva, J.O. Junior, Costa, R.M. (2014.): The effects of extraction method on recovery rutin from Calendula officinalis L. (Asteraceae). Pharmacognosy Magazine. 10 (3) 569–573.
22. Ohashi-Kaneko, K., Takase, M., Kon, N., Fujiwara, K., Kurata K. (2007.): Effect of Light Quality on Growth and Vegetable Quality in Leaf Lettuce, Spinach and Komatsuna. Environmental Control in Biology. 45 (3) 189-198.
23. Payá, M., Halliwell, B., Hoult, J.R.S. (1992.): Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypoclorous acid and hydroxil radical. Biochemical Pharmacology. 44 (2) 205-14.
24. Qamaruddin, M. i Tillberg, E. (1989.): Rapid effects of red light on the isopentenyladenosine content in scots pine seeds. Plant Physiology. 91 (1) 5-8.

25. Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Selim, K.A.H., Khalel, K.I. (2013.): Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. Industrial Crops and Products. 43, 827–831.
26. Rodriguez, C. (2012.): Effect of light quality on growth and phytochemical content in lettuce. Norwegian University of Life Sciences. Master tehsis. Doi: http://www.nb.no/idtjeneste/URN:NBN:no-bibsys_brage_32786. 4.06.2015.
27. Samuolienė, G., Brazaitytė, A., Urbonavičiūtė, A., Šabajevienė, G., Duchovskis, P. (2010.): The effect of red and blue light component on the growth and development of frigo strawberries. Žemdirbystė (Agriculture). 97 (2) 99-104.
28. Schuerger, A.C., Brown, C.S., Stryjewski, E.C. (1997.): Anatomical Features of Pepper Plants (Capsicum annuum L.) Grown under Red Light-emitting Diodes Supplemented with Blue or Far-red Light. Annals of Botany. 79 (3) 273-82.
29. Shimokawa, A., Tonooka, Y., Matsumoto, M., Ara, H., Suzuki, H., Yamauchi, N., Shigyo, M. (2014.): Effect of alternating red and blue light irradiation generated by light emitting diodes on the growth of leaf lettuce. Doi: http://dx.doi.org/10.1101/003103. 4.06.2015
30. Shinkle, J. R. i Jones, R.L. (1988.): Inhibition of stem elongation in cucumis seedlings by blue light requires calcium. Plant Physiology. 86, 960-966.
31. Spanos, G.A., Wrolstad, R.E. (1992.): Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage-a review. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 40 (9) 1478–1487.
32. Sulaimana, S.F., Sajaka, A.A.B., Ooia, K.L., Supriatnoa, Seowa, E.M. (2011.): Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. Journal of Food Composition and Analysis. 24 (4-5) 506-515.
33. Szabados, L., Savoure´, A. (2010.): Proline: a multifunctional amino acid. Trends in plant science 15 (2) 89-98.
34. Teklić, T. (2012.) Fiziologija bilja u povrćarstvu i cvjećarstvu-interna skripta. Poljoprivredni fakultet Osijek, Osijek.
35. Vázquez, M.F., Comini, L.R., Martini, R.E., Núñez Montoya, S.C., Bottini, S., Cabrera J.L. (2014.): Comparisons between conventional, ultrasound-assisted and microwave-assisted methods for extraction of anthraquinones from Heterophyllaea pustulata Hook f. (Rubiaceae). Ultrasonics Sonochemistry. 21 (2) 478–484.

36. Villanueva Bermejo, D., Angelov, I., Vicente, G., Stateva, R.P., Rodriguez García-Risco, M., Reglero, G., Ibañez, E., Fornari, T. (2014.): Extraction of thymol from different varieties of thyme plants using green solvents. Journal of the Science of Food and Agriculture. doi: 10.1002/jsfa.7031.
37. Xu, B.J., Chang, S.K.A. (2007.): Comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. Journal of Food Science. 72 (2) 159–166.
38. Yanagi, T., Okamoto, K., Takita, S. (1996.): Effects of blue, red, and blue/red lights of two different ppf levels on growth and morphogenesis of lettuce plants. Acta Horticulturae. 440, 117-22.
39. Yoo, K.M., Lee, C.H., Lee, H., Moon, BK., Lee, C.Y. (2008.): Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. Food Chemistry. 106 (3) 929–936.
40. Zheng W., Wang, S.Y. (2001.): Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49 (11) 5165–5170.

Internet stranice:

41. [1] http://www.agroklub.com/sortna-lista/ljekovito-bilje/timijan-228/. 22.10.2014.
42. [2] Mihalović, I. Proizvodnja i prerada ljekovitog i aromatičnog bilja. Ustanova za cjeloživotno učenje Magistra, Pula. http://www.ras.hr/Media/Ljekovito_bilje.pdf. 22.10.2014.
43. [3] Dragica, I. Timijan - nezamjenjiva biljka u svakoj kućnoj ljekarni. http://alternativa-za-vas.com/index.php/clanak/article/timijan. 25.10.2014.
44. [4] Marković, S. Eterična ulja timijana – mnoga lica iste vrste. 7.04.2015. http://herbarom.hr/2013/04/07/etericna-ulja-timijana-mnoga-lica-iste-vrste/. 23.10.2014.
45. [5] Mićović, T. Antioksidativna svojstva timijana – *Thymus vulgaris* L., Lamiaceae http://www.medicalcg.me/izdanje-br-64/antioksidativna-svojstva-timijana-thymus-vulgaris-l-lamiaceae/. 4.11.2014.
46. [7]http://www.pbf.unizg.hr/content/download/23256/91108/version/1/file/Zacinsko+i+aromatsko+2013+5.pdf. 13.12.2014.
47. [8] http://www.plivitc.com.hr/spoznaje.html. 19.05.2015.

8. SAŽETAK

Timijan (*Thymus vulgaris* L.) je začinska i ljekovita biljka koja se koristi u medicinske svrhe zbog sadržaja fenola. Egipćani su ga koristili kod balzamiranja i za izradu parfema. Grci su timijanom začinjavali neke vrste sireva i dodavali ga pićima i dimljenom mesu. U njegovom su sastavu borneol, karvakrol, timol, saponini, tanin, glikozidi, vitamini A, C, D, B-kompleks, magnezij, fosfor, kalij i cink. Provedenim analiza utvrđen je visok sadržaj vitamina C i fenola, time i visok antioksidativni kapacitet. U ovom istraživanju biljke timijana stare dvije godine stavljene su pod tri različite varijante monokromatskog osvjetljenja u dijelu crvenog i plavog spektra i određivane su im funkcionalne komponente. Analize su provedene prije osvjetljavanja, nakon dva tjedna osvjetljavanja i nakon četiri tjedna osvjetljavanja LED lampama. Statistički značajne razlike uočene su ovisno o trajanju osvjetljavanja. Među varijantama tretmana nisu uočene statistički značajne razlike, ali je ipak uočeno da su biljke pod crvenim svjetlom razvile veći broj postranih izboja. Biljke pod plavim svjetlom su imale najveći sadržaj vitamina C i prolina, dok je pod kombinacijom crveno+plavo svjetlo uočen najveći sadržaj ukupnih fenola i antioksidativni kapacitet. Veliki broj dokaza potvrđuje da dopunsko osvjetljavanja monokromatskim svjetlom ima morfološki i fiziološki utjecaj na biljke. Kontrola spektralnog sastava svijetla je korisna kako bi se postigla veća produktivnost i veća nutritivna vrijednost komercijalnih biljaka, iako se učinkovitost spektralnog sastava razlikuje od biljne vrste te faze u kojoj se dodatno osvjetljava.

9. SUMMARY

Thyme (*Thymus vulgaris* L.) is seasoning and medicinal herb used in pharmaceutical purposes due to high phenol content. Egyptians used it for embalming and making perfumes. Greeks used thyme for peppering some sorts of cheeses and they were adding it to some drinks and smoke-dried meat. In its content are borneol, carvacrol, thymol, saponins, tannins, glycosides, vitamins A, C, D, B-complex, magnesium, phosphorus, potassium and zinc. Analysis showed high content of vitamin C and phenols, there by a high antioxidant capacity. In this research, two year old plants were placed under three different monochromatic lights of red and blue spectrum and were determined for their functional components. The analyses were carried before illumination, after two weeks, and after four weeks of illumination with LED lights. Statistically significant differences were observed depending on duration of illumination. Statistically significant difference weren't observed among the variants of treatments; however, it was observed that the plants under red light developed a larger number of lateral shoots. Plants under blue light had the highest vitamin C and proline content, while under a combination of red+blue light had the highest phenolic concentration and antioxidant capacity. A large body of evidence are confirming that additional lighting with monochromatic lights have morphological and physiological effects on plants. Controlling the light spectral composition is useful to achieve higher productivity or greater nutritional quality of the commercial crops, although the efficiency of the spectral composition differs depending on the plant species and phase with the additional illumination.

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Glavni fenolni spojevi (%) identificirani u timijanu, kadulji i mažuranu, ekstrahirani metanolom i određeni HPLC-om (Roby i sur.,2013.) (Stranica 14)

Tablica 2. Aktivnost vezanja slobodnih radikala izraženo u EC_{50} i antiradikalna snaga (ARP) pod utjecajem ekstrakcijskog otapala (Roby i sur.,2013.) (Stranica 15)

Tablica 3. Značajnost utjecaja perioda osvjetljavanja (0 tjedana; 2 tjedna; 4 tjedna) i dodatnog monokromatskog svijetla (BDS-bez dodatnog svijetla; C-crveno LED; P-plavo LED; C+P-crveno + plavo LED) te njihova interakcija na dužinu izboja (cm), broj izboja, omjer klorofila A i klorofila B te omjer ukupnih klorofila i karotenoida (Stranica 22)

Tablica 4. Značajnost utjecaja perioda osvjetljavanja (0 tjedana, 2 tjedna, 4 tjedna) i određene monokromatske svjetlost (BDS-bez dodatnog osvjetljavanja; C-crveno LED; P-plavo LED; C+P-crveno + plavo LED) te njihova interakcija na sadržaj klorofila A, B, klorofila A+B i karotenoide (mg/g Sv.T.) (Stranica 24)

Tablica 5. Značajnost utjecaja perioda osvjetljavanja (0 tjedana, 2 tjedna, 4 tjedna) i određene monokromatske svjetlost (BDS-bez dodatnog osvjetljavanja; C-crveno LED; P-plavo LED; C+P-crveno + plavo LED) te njihova interakcija na sadržaj prolina (µmol P/g Sv.T.), vitamina C (mg vit.C/ 100g Sv.T.), sadržaj ukupnih fenola (mg PHE/g Sv.T.), antioksidacijsku aktivnost, odnosno mogućnost vezanja 50 % DPPH radikala (IC50) (mgAA/ml) i antioksidativni kapacitet izražen kao ekvivalent askorbinskoj kiselini (AEAC) (mg AA/100g) (Stranica 25)

Tablica 6. Utjecaj pojedinih tretmana monokromatskim svjetlom (BDS-bez dodatnog svijetla; C-crveno LED; P-plavo LED; C+P-crveno + plavo LED) na dužinu izboja (cm), broj izboja, omjer klorofila A i klorofila B te omjer ukupnih klorofila i karotenoida u tri perioda uzorkovanja (Stranica 26)

Tablica 7. Utjecaj pojedinih tretmana monokromatskim svjetlom (BDS-bez dodatnog svijetla; C-crveno LED; P-plavo LED; C+P-crveno + plavo LED) na sadržaj klorofila A, klorofila B, klorofila A+B i karotenoida (mg/g Sv.T.) u tri perioda uzorkovanja (Stranica 27)

Tablica 8. Utjecaj pojedinih tretmana monokromatskim svjetlom (BDS-bez dodatnog svijetla; C-crveno LED; P-plavo LED; C+P-crveno + plavo LED) na sadržaj prolina (µmol P/g Sv.T.), vitamina C (mg vit C/ 100g Sv.T.), sadržaj ukupnih fenola (mg PHE/g Sv.T.), antioksidacijsku aktivnost, odnosno mogućnost vezanja 50 % DPPH radikala (IC50) (mg AA/ml) i antioksidativni kapacitet izražen kao ekvivalent askorbinskoj kiselini (AEAC) (mg AA/100g) u tri perioda uzorkovanja (Stranica 28)

Tablica 9. Utjecaj perioda uzorkovanja, odnosno vremena trajanja dodatnog osvjetljenja na dužinu izboja (cm), broj izboja, omjer klorofila A i klorofila B te omjer ukupnih klorofila i karotenoida pri varijantama dodatnog osvjetljenja (Stranica 29)

Tablica 10. Utjecaj perioda uzorkovanja, odnosno vremena trajanja dodatnog osvjetljenja na sadržaj klorofila A, klorofila B, klorofila A+B i karotenoida (mg/g Sv.T.) pri varijantama dodatnog osvjetljenja (Stranica 31)

Tablica 11. Utjecaj perioda uzorkovanja, odnosno vremena trajanja dodatnog osvjetljenja na sadržaj prolina (µmol P/g Sv.T.), vitamina C (mg vit C/100g Sv.T.), sadržaj ukupnih fenola (mg PHE/g Sv.T.), antioksidacijsku aktivnost, odnosno mogućnost vezanja 50 % DPPH radikala (IC50) (mg AA/ml) i antioksidativni kapacitet izražen kao ekvivalent askorbinskoj kiselini (AEAC) (mg AA/100g) pri varijantama dodatnog osvjetljenja (Stranica 32)

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Morfologija timijana (*Thymus vulgaris* L.) (Stranica 2)

Slika 2. Kemijska struktura karvakrola i timola (Stranica 5)

Slika 3. Utjecaj plavog svjetla na elongaciju hipokotila krastavca dodavanjem različitih koncentracija IAA (Shinkle i sur.) (Stranica 35)

12. POPIS GRAFIKONA

Graf 1. Prikaz pikova crvenog i plavog svjetla (Stranica 34)

Graf 2. Utjecaj trajanja dodatnog osvjetljenja te varijante tretmana na broj izboja (Stranica 35)

Graf 2. Utjecaj trajanja dodatnog osvjetljenja te varijante tretmana na sadržaj klorofila A i klorofila B (mg/g Sv.T.) (Stranica 36)

Graf 4. Utjecaj trajanja dodatnog osvjetljenja te varijante tretmana na sadržaj vitamina C (mg vit C/100 g Sv.T.) (Stranica 37)

Graf 5. Utjecaj trajanja dodatnog osvjetljenja te varijante tretmana na sadržaj ukupnih fenola (mg PHE/g Sv.T.) (Stranica 37)

Graf 6. Utjecaj trajanja dodatnog osvjetljenja te varijante tretmana na antioksidativni kapacitet (AEAC) (mg AA/100g) (Stranica 38)

Graf 7. Utjecaj trajanja dodatnog osvjetljenja te varijante tretmana na sadržaj prolina (µmol P/g Sv.T.) (Stranica 39)

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Diplomski rad**
Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Sveučilišni diplomski studij, Povrćarstvo i cvjećarstvo

Utjecaj monokromatske svjetlosti na sadržaj funkcionlanih komponenti timijana (*Thymus vulgaris* L.)

Lea Parađiković

Sažetak:
Timijan (Thymus vulgaris L.) je začinska i ljekovita biljka koja se koristi u medicinske svrhe zbog sadržaja fenola. Egipćani su ga koristili kod balzamiranja i za izradu parfema. Grci su timijanom začinjavali neke vrste sireva i dodavali ga pićima i dimljenom mesu. U njegovom su sastavu borneol, karvakrol, timol, saponini, tanin, glikozidi, vitamini A, C, D, B-kompleks, magnezij, fosfor, kalij i cink. Provedenim analiza utvrđen je visok sadržaj vitamina C i fenola, time i visok antioksidativni kapacitet. U ovom istraživanju biljke timijana stare dvije godine stavljene su pod tri različite varijante monokromatskog osvjetljenja u dijelu crvenog i plavog spektra i određivane su im funkcionalne komponente. Analize su provedene prije osvjetljavanja, nakon dva tjedna osvjetljavanja i nakon četiri tjedna osvjetljavanja LED lampama. Statistički značajne razlike uočene su ovisno o trajanju osvjetljavanja. Među varijantama tretmana nisu uočene statistički značajne razlike, ali je ipak uočeno da su biljke pod crvenim svjetlom razvile veći broj postranih izboja. Biljke pod plavim svjetlom su imale najveći sadržaj vitamina C i prolina, dok je pod kombinacijom crveno+plavo svjetlo uočen najveći sadržaj ukupnih fenola i antioksidativni kapacitet. Veliki broj dokaza potvrđuje da dopunsko osvjetljavanja monokromatskim svjetlom ima morfološki i fiziološki utjecaj na biljke. Kontrola spektralnog sastava svijetla je korisna kako bi se postigla veća produktivnost i veća nutritivna vrijednost komercijalnih biljaka, iako se učinkovitost spektralnog sastava razlikuje od biljne vrste te faze u kojoj se dodatno osvjetljava.

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Mentor: doc.dr.sc. Tomislav Vinković, mentor

Broj stranica: 52
Broj grafikona i slika: 10
Broj tablica: 11
Broj literaturnih navoda: 47
Broj priloga: 0
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: monokromatsko svjetlo, LED lampe, funkcionalne komponente, timijan

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. prof.dr.sc. Miroslav Lisjak, predsjednik
2. doc.dr.sc. Tomislav Vinković, mentor
3. prof.dr.sc. Nada Parađiković, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilište u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **Graduate thesis**
Faculty of Agriculture
University Graduate Studies, Vegetable and flower growing

Impact of monochromatic light on the content of functional components of Thyme (*Thymus vulgaris* L.)

Lea Parađiković

Abstract:
Thyme (Thymus vulgaris L.) is seasoning and medicinal herb used in pharmaceutical purposes due to high phenol content. Egyptians used it for embalming and making perfumes. Greeks used thyme for peppering some sorts of cheeses and they were adding it to some drinks and smoke-dried meat. In its content are borneol, carvacrol, thymol, saponins, tannins, glycosides, vitamins A, C, D, B-complex, magnesium, phosphorus, potassium and zinc. Analysis showed high content of vitamin C and phenols, there by a high antioxidant capacity. In this research, two year old plants were placed under three different monochromatic lights of red and blue spectrum and were determined for their functional components. The analyses were carried before illumination, after two weeks, and after four weeks of illumination with LED lights. Statistically significant differences were observed depending on duration of illumination. Statistically significant difference weren't observed among the variants of treatments; however, it was observed that the plants under red light developed a larger number of lateral shoots. Plants under blue light had the highest vitamin C and proline content, while under a combination of red+blue light had the highest phenolic concentration and antioxidant capacity. A large body of evidence are confirming that additional lighting with monochromatic lights have morphological and physiological effects on plants. Controlling the light spectral composition is useful to achieve higher productivity or greater nutritional quality of the commercial crops, although the efficiency of the spectral composition differs depending on the plant species and phase with the additional illumination.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek
Mentor: PhD, Tomislav Vinković, assistant professor

Number of pages: 52
Number of figures: 10
Number of tables: 11
Number of references: 47
Number of appendices: 0
Original in: Croatian

Key words: monochromatic light, LED lamps, functional components, thyme

Thesis defended on date:

Reviewers:
1. PhD Miroslav Lisjak, assistant professor
2. PhD, Tomislav Vinković, assistant professor
3. PhD Nada Parađiković, full professor

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agriculture in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Kralja Petra Svačića 1d.