Utjecaj biljnih ekstrakata i fenolnih spojeva na fenolni profil u klijancima pekinškog kupusa (Brassica rapa L. subsp. pekinensis (Lour.) Hanelt)

Migić, Irena

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:413506

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Irena Migić

Utjecaj biljnih ekstrakata i fenolnih spojeva na fenolni profil u klijancima pekinškog kupusa (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt)

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

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

Zahvala

Hvala mentorici doc. dr. sc. Ivani Šola na stručnoj i nesebičnoj pomoći, savjetima i velikom trudu uloženom tijekom izrade diplomskog rada.

Od srca zahvaljujem svojoj obitelji na pruženoj potpori tijekom života, pa tako i studija. Posebice se zahvaljujem mami, osobi kroz koju sam najviše osjetila bezuvjetnu ljubav i bezgraničnu podršku.

I na kraju, veliko hvala svim prijateljima koji su na svoj način učinili moj život ljepšim.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Utjecaj biljnih ekstrakata i fenolnih spojeva na fenolni profil u klijancima pekinškog kupusa (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt)

Irena Migić
Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

U sklopu ovog rada metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja istražen je utjecaj vodenih ekstrakata gospine trave, koprive i kadulje, te flavonoida kempferola i izoramnetina, odnosno kiselina ferulične i *p*-kumarinske na sadržaj flavonoida i hidroksicimetnih kiselina u klijancima pekinškog kupusa (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt). Rezultati su pokazali da je vodeni ekstrakt gospine trave znatno povećao količinu kvercetina, što ukazuje na mogućnost korištenja ovog vodenog ekstrakta za obogaćivanje klijanaca pekinškog kupusa kvercetinom. S obzirom da su za kvercetin zabilježeni brojni pozitivni biološki učinci, obogaćivanje biljaka ovim flavonoidom moglo bi imati potencijal u proizvodnji biljnog materijala vrijednog za industrijsku primjenu (npr. poljoprivrednu, prehrambenu i farmaceutsku). Rezultati su također pokazali da je vodeni ekstrakt kadulje znatno povećao količinu kempferola, kavene, ferulične i sinapinske kiseline, ali ujedno je i negativno utjecao na rast i razvoj klijanaca pekinškog kupusa. Od fenolnih spojeva jedino je tretman *p*-kumarinskom kiselinom znatno povećao koncentraciju kavene kiseline u klijancima pekinškog kupusa. Pekinški kupus vrlo je zastupljena prehrambena vrsta iz porodice krstašica (*Brassicaceae*) zahvaljujući visokom sadržaju vitamina i minerala, a obogaćivanjem njenog fenolnog profila dodatno se doprinosi njenoj prehrambenoj vrijednosti.

(50 stranica, 22 slike, 2 tablice, 81 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.
Ključne riječi: flavonoidi, hidroksicimetne kiseline, tekućinska kromatografija visoke moći razlučivanja, vodeni ekstrakti gospine trave, koprive i kadulje.
Voditelj: Dr. sc. Ivana Šola, doc.
Ocjenitelji: Dr. sc. Sofia Ana Blažević, doc.
Dr. sc. Tomislav Ivanković, doc.
izv. prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek
Rad prihvaćen: 16.02.2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Effect of plant extracts and phenolic compounds on the phenolic profile of Chinese cabagge (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt) seedlings

Irena Migić
Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

In this work, using high performance liquid chromatography method, the influence of St. John's wort, nettle and sage aqueous extracts, and flavonoids kaempferol and isorhamnetin, or ferulic and *p*-coumaric acid on the content of flavonoids and hydroxycinnamic acids in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt) seedlings was investigated. The results showed that St. John's wort extract significantly increased the amount of quercetin, indicating the possibility of using this extract to enrich Chinese cabbage seedlings with quercetin. Given that quercetin exerts numerous positive biological effects, enrichment of plants with this flavonoid may have potential in the production of plant material valuable for industrial applications (e.g. agricultural, food and pharmaceutical). The results also showed that the water extract of sage significantly increased the amount of kaempferol, caffeic, ferulic and sinapic acid, however this extract also negatively affected the growth and development of Chinese cabbage seedlings. Among phenolic compounds, only treatment with *p*-coumaric acid significantly increased the concentration of caffeic acid in Chinese cabbage seedlings. Chinese cabbage is a very often used vegetable from the family *Brassicaceae* thanks to the high content of vitamins and minerals, and the enrichment of its phenolic profile further contributes to its nutritional value.

(50 pages, 22 figures, 2 tables, 81 references, original in: croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.
Key words: flavonoids, hydroxycinnamic acids, high-performance liquid chromatography, water extracts of St John's-wort, stinging nettle and sage.
Supervisor: Dr. Ivana Šola, Asst. Prof.
Reviewers: Dr. Sofia Ana Blažević, Asst. Prof.
Dr. Tomislav Ivanković, Asst. Prof.
Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.
Thesis accepted: 16.02.2017.

Sadržaj:

1. UVOD 1

1.1. *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt - pekinški kupus..... 2

1.2. Sekundarni metaboliti..... 3

1.3. Fenolni spojevi 4

1.3.1. Flavonoidi 4

1.3.1.1. Flavonoidi u obrani biljaka od oksidativnog stresa 5

1.3.1.2. Flavonoidi kao regulatori rasta biljaka..... 6

1.3.2. Fenolne kiseline..... 7

1.3.2.1. Hidroksicimetne kiseline.....7

1.4. Flavonoidi i hidroksicimetne kiseline unutar roda *Brassica*.....8

1.4.1. Flavonoidi i hidroksicimetne kiseline u vrsti *Brassica rapa*.....9

1.4.2. Biosintetski putevi hidroksicimetnih kiselina i flavonoida.....9

1.5. Fenolni spojevi u gospinoj travi, koprivi i kadulji.....10

1.6. Ciljevi ovog diplomskog rada bili su:.....11

2. MATERIJALI I METODE 12

2.1. Biljni materijal..... 13

2.2. Priprema vodenih biljnih ekstrakata i otopina fenolnih spojeva za inkubaciju klijanaca.....16

2.3. Ekstrakcija fenolnih spojeva.....16

2.4. Razdvajanje i identifikacija fenolnih spojeva metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja 17

2.5. Popis korištenih kemikalija abecednim redom.....18

3. REZULTATI 19

3.1. Fenolni profil klijanaca pekinškog kupusa analiziran metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja.....20

3.2. Fenolni spojevi biljnih ekstrakata razdvojeni i analizirani metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja 22

3.3. Stabilnost fenolnih spojeva u biljnim ekstraktima.....24

3.4. Utjecaj biljnih ekstrakata i fenolnih spojeva na sadržaj flavonoida u klijancima vrste *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*.....25

3.5. Utjecaj biljnih ekstrakata i fenolnih spojeva na sadržaj hidroksicimetnih kiselina u klijancima vrste *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*.....28

4. RASPRAVA 34

5. ZAKLJUČAK..... 38

6. LITERATURA 40

7. ŽIVOTOPIS ……..…….**48**

1. UVOD

1.1. *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt - pekinški kupus

Pekinški kupus (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt) je lisnato povrće koje spada u porodicu Brassicaceae (krstašice). Ova porodica je kozmopolitski rasprostranjena i uključuje 338 rodova te 3709 vrsta (Warwick i sur. 2006). Među tim vrstama neke su od velikog znanstvenog značaja, kao npr. one iz rodova *Arabidopsis* i *Brassica* (Hall i sur. 2002; Koch 2003; Koch i Mummenhoff 2006), a mnoge od gospodarskog i agronomskog značaja npr. *Brassica oleracea* L. (kupus), *Brassica oleracea* L. var. *italica* (brokula), *Brassica oleracea* L. var. *gemmifera* (prokulica), *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* (cvjetača), *Brassica rapa* L. ssp. *rapa* (repa), *Armoracia rusticana* P. Gaertn., B. Mey. & Scherb. (hren), *Nasturtium officinale* R. Br. (potočarka), *Raphanus sativus* L. (rotkvica).

Pekinški kupus sadrži karotenoide i tokoferole i prirodni je izvor antioksidanasa. Unutrašnje žuto lišće pekinškog kupusa odražava sadržaj luteina i karotena, a potrošači preferiraju žute sorte, jer upravo one imaju visoku hranjivu vrijednost (Jung i sur. 2014). Antioksidansi kao što su karotenoidi i tokoferoli su povezani sa smanjenim rizikom od kardiovaskularnih bolesti i nekoliko vrsta raka (Byers i Perry 1992). Pekinški kupus je važan izvor i glukozinolata, koji mogu smanjiti rizik od raka debelog crijeva, mokraćnog mjehura, pluća, raka dojke i prostate (Björkman i sur. 2011; Das i sur. 2000).



Slika 1. Biljna vrsta *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt (pekinški kupus)

1.2. Sekundarni metaboliti

Primarni metaboliti (ugljikohidrati, aminokiseline, masne kiseline, nukleinske kiseline) važni su za sintezu strukturnih elemenata te za rast i razvoj biljaka. Uz primarne, biljka proizvodi i niz sekundarnih metabolita, tj. tvari koje su sintetizirane sekundarnim reakcijama, iz primarnih metabolita. Sekundarni metaboliti nisu neophodni za rast i razvoj biljaka, ali su vrlo važni za njihovu prilagodbu na nove okolišne uvjete. Sekundarni metaboliti štite biljku od biljojeda i raznih štetnika, djelujući negativno na njihove stanične i metaboličke procese, privlače oprašivače i životinje koje raznose sjemenke, sastavni su dijelovi nekih enzimskih kompleksa (koenzimi), posjeduju hormonsku aktivnost i imaju ulogu pri skladištenju štetnih produkata (Bourgaud i sur. 2001). Osim važnih uloga u biljci, mnogi sekundarni metaboliti odgovorni su za pozitivan učinak biljaka na zdravlje ljudi, stoga ih se naziva i bioaktivnim tvarima. U posljednjih nekoliko godina veliki je napredak postignut u razvoju novih metoda visoke razlučivosti i osjetljivosti za analizu sekundarnih metabolita. Međutim, u biljkama postoji velik broj sekundarnih metabolita prisutnih u količinama koje su još uvijek ispod granice detekcije postojećih modernih uređaja što otežava istraživanja njihovih biosintetskih puteva (Bednarek i Osbourn 2009). Utvrđeno je da sekundarni metaboliti u biljci djeluju antivirusno, antibakterijski i antifungalno (Wink 1988). Pored toga, dokazano je da isti sudjeluju i u interakciji biljaka s drugim, konkurentskim biljkama (alelopatsko djelovanje) (Bourgaud i sur. 2001).

Sekundarni metaboliti se uobičajeno klasificiraju prema svom biosintetskom putu i to u tri velike skupine spojeva – fenolne tvari, terpene i alkaloide (Harborn 1999). Među navedenim, fenolne tvari su do sada najistraživaniji spojevi; riječ je o skupini spojeva koji se sastoje od jedne ili više hidroksilnih skupina (-OH) vezanih izravno na najmanje jedan aromatski prsten (C6). Predstavnici iz skupine fenolnih spojeva prisutni su u svim biljkama dok su npr. alkaloidi puno specifičniji za pojedinu vrstu ili kultivar (Bourgaud i sur. 2001) što ponajprije ovisi o njihovoj ulozi u samoj biljci. Fenolni spojevi su npr. uključeni u sintezu lignina, koji je prisutan u svim biljnim vrstama, dok se alkaloidi, koji imaju puno specifičnije uloge sintetiziraju u specifičnim uvjetima i samo u pojedinim vrstama ili kultivarima. Još nije u potpunosti razjašnjeno zašto samo u nekim biljkama dolazi do sinteze specifičnih sekundarnih metabolita. Novija istraživanja upućuju na to da su odgovorni određeni geni čija je regulacija ekspresije još nedovoljno istražena (Kliebenstein i Osbourn 2012).

Postoje mnoge klasifikacijske sheme fenolnih tvari, a na temelju broja fenolnih jedinica u molekuli dijelimo ih na jednostavne fenole i polifenole.

1.3. Fenolni spojevi

Voće, povrće, cjelovite žitarice i druge vrste hrane i pića, kao što su čaj, čokolada i vina bogat su izvor fenolnih spojeva. Raznolikost i široka distribucija fenolnih spojeva u biljkama doveli su do različitih načina kategorizacije ovih spojeva. Klasificiraju se prema izvorima podrijetla, biološkim funkcijama i kemijskoj strukturi. Prema kemijskoj strukturi aglikona, fenolne spojeve dijelimo na: fenolne kiseline, flavonoide, polifenolne amide i ostale polifenole (Tsao 2010). Najrasprostranjenija i najraznolikija skupina fenolnih spojeva u vrstama roda *Brassica* su flavonoidi (uglavnom flavonoli, ali i antocijani) i hidroksicimetne kiseline (Cartea i sur. 2011).

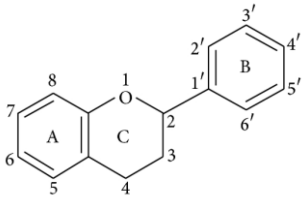
U biljkama fenolni spojevi se pojavljuju u topivom obliku, kao i u kombinaciji s komponentama stanične stijenke - vezani polifenoli.

1.3.1. Flavonoidi

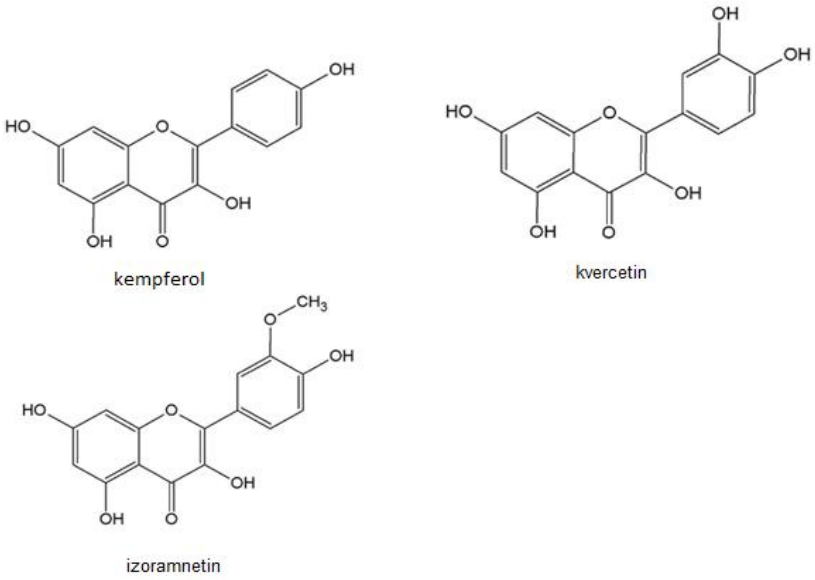
S više od 10 000 izoliranih i identificiranih spojeva (Williams i Grayer 2004; Agati i sur. 2012) flavonoidi čine jednu od najbrojnijih skupina polifenolnih spojeva. Često su odgovorni za plavu, ljubičastu, žutu, narančastu i crvenu boju biljaka. Flavonoidi imaju višestruko djelovanje poput sposobnosti sparivanja elektrona slobodnog radikala, vezivanja iona prijelaznih metala (Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}) (Ferrali i sur. 1997), aktiviranja antioksidacijskih enzima (Elliott i sur. 1992) i inhibiranja oksidaza (Cos i sur. 1998). Povezanost između pojedinih flavonoida i svojstva hvatanja radikala, stvaranja kompleksa i antioksidacijske aktivnosti omogućuje razumijevanje antioksidacijskog i prooksidacijskog djelovanja flavonoida (Kazazić 2004.). Osnovna kemijska struktura flavonoida je kostur od petnaest ugljikovih atoma raspoređenih u dva aromatska prstena (A i B prsten) povezana heterocikličnim piranskim prstenom (C prsten) (sl. 2 A). Flavonoidi se mogu podijeliti u različite kategorije kao što su flavoni, flavonoli, flavanoli, izoflavoni, antocijanidi. Strukturna raznolikost flavonoida rezultat je brojnih modifikacija osnovne skeletne strukture, koje uvjetuju reakcije hidrogenacije, hidroksilacije, *O*-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezanja neorganskog sulfata i glikozilacija hidroksilnih grupa (*O*-glikozidi) ili flavonoidne jezgre (*C*-glikozidi). Flavonoidi se pojavljuju kao glikozidi, aglikoni i metilirani derivati. Oko 90% flavonoida biljaka nalazi se u obliku glikozida (Swain i sur. 1979). Glikozilacija kod flavonoida događa se najčešće u položaju 3-, a manje u položaju 7-. Šećer koji se najčešće javlja jest glukoza, no javljaju se i galaktoza, ramnoza i ksiloza (Kazazić 2004). Osim što

djeluju antibakterijski, protuupalno, antialergijski, antivirusno i antikancerogeno, flavonoidi doprinose boji i okusu hrane (Kazazić 2004).

A)



B)



Slika 2. A) Osnovna kemijska struktura flavonoida (preuzeto iz rada: Kumar i Pandey 2013). B) Kemijske strukture najzastupljenijih flavonoidnih aglikona u vrstama roda *Brassica* (preuzeto i prilagođeno iz rada: Cartea i sur. 2011).

1.3.1.1. Flavonoidi u obrani biljaka od oksidativnog stresa

Razni biotički i abiotički čimbenici dovode do stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva (reactive oxygen species, ROS) koji uzrokuju oksidativni stres u biljaka. Flavonoidi imaju sposobnost apsorpcije štetnih valnih duljina zračenja (UV-A i UV-B), inhibiraju stvaranje i mogu inaktivirati već stvorene ROS-ove (Agati i sur. 2012.). Oksidativni stres pojačava biosintezu flavonoida u biljkama (Kumar i Pandey 2013.). Jačina antioksidacijskog kapaciteta i sposobnost apsorpcije UV valnih duljina ovisi o prirodi supstitucije na različitim prstenima

flavonoida. Tako dihidroksi B prsten supstituirani flavonoidi imaju veći antioksidacijski kapacitet, dok monohidroksi B prsten supstituirani flavonoidi imaju veću sposobnost apsorpcije UV valnih duljina (Agati i sur. 2012). Redukcijske funkcije flavonoida su od ključnog značaja za biljke pod teškim stresnim uvjetima. Te funkcije su popraćene veoma visokom koncentracijom dihidroksi B prsten supstituiranih flavonoida (Tattini i sur. 2004). Smatra se da flavonoidi predstavljaju sekundarni antioksidativni obrambeni sustav u biljnom tkivu izloženom različitom stresu (Agati i sur. 2012). Lipidna peroksidacija je česta posljedica okidacijskog stresa čime se narušava integritet stanične membrane (Kumar i Pandey 2013). Kvercetin-3-*O*-rutinozid (rutin) može doći u interakciju s polarnom glavom fosfolipida, povećati krutost membrane i time zaštititi membranu od oksidativnog stresa (Erlejman i sur. 2004).

Novija istraživanja pokazuju da se antioksidativni flavonoidi nalaze u jezgri mezofilnih stanica i unutar centara stvaranja ROS-ova, tj. kloroplasta. Tu mogu lako inaktivirati vodikov-peroksid, hidroksil radikale i singletni kisik (Agati i sur. 2012; Pérez-Gregorio i sur. 2011).

1.3.1.2. Flavonoidi kao regulatori rasta biljaka

Flavonoidi (u nanomolarnim koncentracijama) mogu regulirati prijenos i katabolizam auksina (Kumar i Pandey 2013). Sposobnost flavonoida da stvore gradijent auksina rezultira fenotipovima različitih morfološko-anatomskih značajki (Taylor i Grotewold 2005). Sposobnost flavonoida da kontroliraju prijenos auksina može imati veliku vrijednost u stresom izazvanim morfogenim odgovorima biljaka, što je poznato kao strategija sesilnih organizama izloženih nepovoljnom okolišu (Jansen 2002). Vrste bogate dihidroksi-flavonoidima pokazuju fenotipove s izrazito različitim morfološkim svojstvima u odnosu na one bogate monohidroksi-flavonoidima (Kuhn i sur. 2011).

Flavonoidi su učinkoviti inhibitori proteinaza (proteinase inhibitor, PIN) i MDR (multidrug resistance) glikoproteina koji su uključeni u kretanje auksina iz stanice u stanicu (Kumar i Pandey 2013). Sposobnost flavonoida da inhibiraju aktivnost PIN i MDR proteina ovisi o prisutnosti katehol skupine u B prstenu flavonoidnog skeleta (Kumar i Pandey 2013). Osim toga, flavonoidi reguliraju aktivnost IAA-oksidaze (indole-3-acetic acid, IAA) s izrazito različitim učincima na temelju njihove kemijske strukture (Mathesius 2001). Dokazi o položaju flavonoida (kao i enzima u biosintezi flavonoida) u jezgri podupiru mišljenja da flavonoidi mogu djelovati kao transkripcijski regulatori te tako modulirati aktivnost proteina koji su uključeni u rast stanica (Saslowsky i sur, 2005; Naoumkina i Dixon 2008).

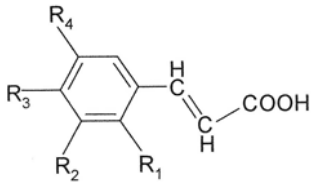
1.3.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su druga važna skupina polifenolnih tvari u biljnom carstvu, a javljaju se u obliku estera, glikozida ili amida, rjeđe u slobodnom obliku. Slobodne fenolne kiseline najćešće se nalaze u voću i povrću, a fenolne kiseline u vezanom obliku najčešće su u žitaricama i sjemenkama (Tsao 2010). Varijacije unutar fenolnih kiselina rezultat su broja i lokacije hidroksilnih skupina na aromatskom prstenu. Razlikujemo dvije glavne skupine fenolnih kiselina: derivate hidroksibenzojeve i derivate hidroksicimetne kiseline (sl. 3 A). Derivati hidroksibenzojeve kiseline su galna, vanilinska, siringična i protokatehinska kiselina, a derivati hidroksicimetne kiseline su ferulična, kavena, *p*-kumarinska, sinapinska i klorogenska kiselina. Ove kiseline pripadaju različitim biosintetskim putevima; hidroksibenzojeve pripadaju aminobenzoatnom putu, a hidroksicimetne kiseline fenilpropanoidnom putu biosinteze zbog čega imaju sličnosti s flavonoidima.

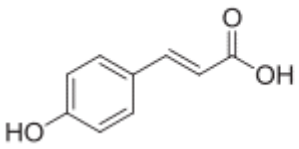
1.3.2.1. Hidroksicimetne kiseline

Hidroksicimetne kiseline s osnovnom strukturnom jedinicom C6-C3 su hidroksilirani derivati cimetne kiseline (Dewick 2007). Početni spoj u biosintezi hidroksicimetnih kiselina je aromatska aminokiselina *L*-fenilalanin koja nastaje iz korizmata kao konačnog produkta biosintetskog puta šikiminske kiseline (sl. 4). Dodatnim reakcijama dekarboksilacije, transaminacije i deaminacije nastaju cimetna (3-fenil propenska) kiselina i hidroksicimetne kiseline. Naknadnim reakcijama hidroksilacije, metoksilacije i dr., nastaju derivati cimetne kiseline: *p*-kumarinska kiselina (*p*-hidroksicimetna kiselina), kavena kiselina (2,3-dihidroksicimetna kiselina), ferulična kiselina (2-metoksi-3-hidroksicimetna kiselina), sinapinska kiselina (2,4-dimetoksi-3-hidroksicimetna kiselina) (Dixon i sur. 2005). Sevgi i sur. (2015) ispitali su antioksidativni učinak hidroksicimetnih kiselina te njihov potencijal u zaštiti DNA od oštećenja. Ferulična kiselina pokazala se kao najaktivnija fitokemikalija, čak i pri najnižim koncentracijskim vrijednostima (0,002 mg/ml), štitila je plazmidnu DNA u prisutnosti H_2O_2 i UV.

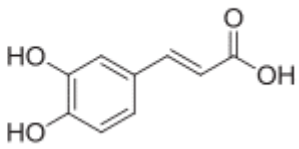
A)



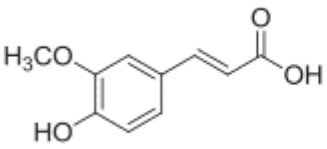
B)



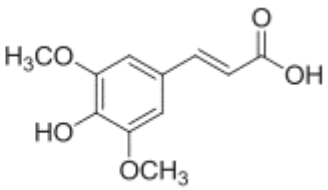
p-kumarinska



kavena



ferulična



sinapinska

Slika 3. A) Osnovna kemijska struktura hidroksicimetnih kiselina (preuzeto i prilagođeno iz rada: Robards i sur. 1999). B) Usporedba kemijskih struktura hidroksicimetnih kiselina zastupljenih u vrsti *Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt.

1.4. Flavonoidi i hidroksicimetne kiseline unutar roda *Brassica*

U novije vrijeme brojna istraživanja pokazuju da su krstašice dobar izvor prirodnih antioksidanasa, karotenoida, tokoferola i askorbinske kiseline, spojeva koji mogu pomoći u zaštiti ljudskog organizma od oštećenja reaktivnim kisikovim spojevima. Uz navedene, prisutnost fenolnih spojeva u krstašica odgovorna je za većinu antioksidativnog djelovanja. Iz ovih razloga potrošnja povrća iz roda *Brassica* raste. Dokazana je pozitivna korelacija između konzumacije krstašica i prevencije degenerativnih kardiovaskularnih bolesti te različitih vrsta raka (Cartea i Velasco 2008; Traka i Mithen 2009). Sadržaj fenola nalazi se u rasponu od 15,3 mg / 100 g svježe mase u bijelom kupusu do 337,0 mg / 100 g u brokuli (Podsedek 2007).

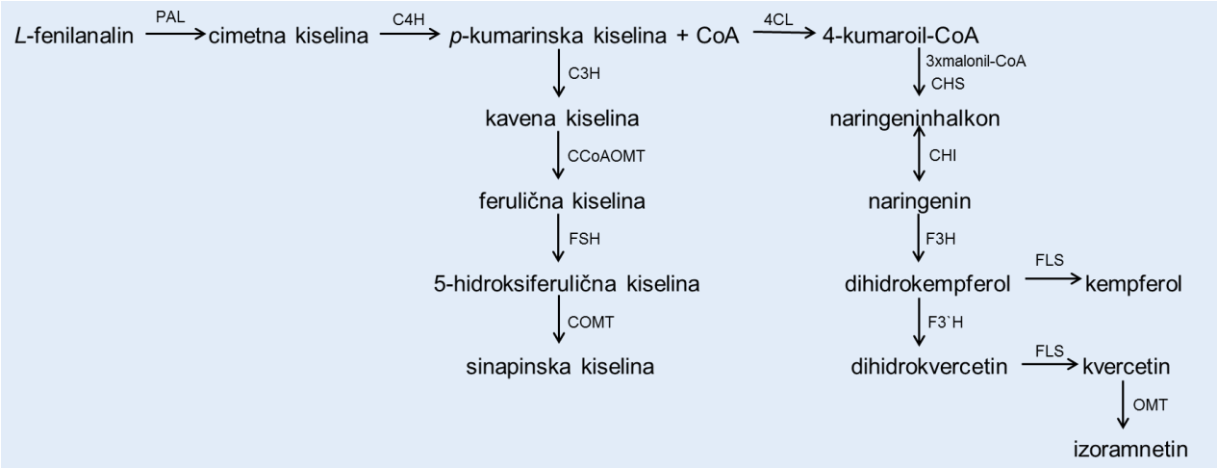
Danas je dobro poznato da su krstašice bogate flavonoidima, posebno flavonolima. Nađen je veliki broj flavonoidnih glikozida, među njima glikozidi kempferola i kvercetina, njihovih derivata u kombinaciji s hidroksicimetnom kiselinom, kao i derivati sinapinske kiseline koji su najvažniji fenolni spojevi u vrstama roda *Brassica* (Vallejo i sur. 2002; Martinez-Sanchez i sur. 2008; Nielsen i sur. 1998).

1.4.1. Flavonoidi i hidroksicimetne kiseline u vrsti *Brassica rapa*

Glavni polifenolni spojevi identificirani u vrsti *B. rapa* su acilirani mono-, di-, tri- i tetraglukozidi kvercetina, kempferola i izoramnetina, kao i esteri hidroksicimetne s jabučnom kiselinom, glikozidima i kininskom kiselinom (Harbaum i sur. 2007; Harbaum i sur. 2008). Glavna razlika između *B. oleracea* i *B. rapa* vrsta je prisutnost derivata izoramnetina u *B. rapa* vrsti, koji nikad nisu prisutni u vrsti *B. oleracea* (Romani i sur. 2006). Ferreres i sur. (2008) te Francisco i sur. (2009) identificirali su više od 20 aciliranih i neaciliranih flavonol glikozida, feruličnu i sinapinsku kiselinu u *B. rapa* var. *rapa*. Sadržaj polifenolnih spojeva ispitan je u jestivim dijelovima ove vrste uključujući listove, stabljiku, cvjetne pupoljke i korijen (Fernandes i sur. 2007; Francisco i sur. 2009). Korijen repe manje je zanimljiv jestivi dio u odnosu na listove ili cvatove kupusa zbog vrlo male količine polifenolnih spojeva i malog antioksidativnog kapaciteta tih spojeva u ovom organu (Fernandes i sur. 2007; Francisco i sur. 2009). U radu Fernandes i sur. (2007) samo ferulična i sinapinska kiselina te njihovi derivati detektirani su u značajnim količinama u korijenu vrste *B. rapa* var. *rapa*.

1.4.2. Biosintetski putevi hidroksicimetnih kiselina i flavonoida

Hidroksicimetne kiseline i flavonidi u biljkama se sintetiziraju iz aminokiseline *L*-fenilalanina (Kutchan i sur. 2015.). *L*-fenilalanin se djelovanjem enzima fenilalaninamonij-lijaze (PAL) pretvara u cimetnu kiselinu koja se dalje djelovanjem enzima cinamat-4-hidroksilaze (C4H) prevodi u *p*-kumarinsku kiselinu. Ova kiselina je mjesto račvanja - djelovanjem enzima 4-kumaroil-CoA-liaze (4CL) sintetizirat će se 4-kumaroil-koenzimA i dalje iz njega (uz ulaganje malonil-koenzima A) flavonoidi, a djelovanjem enzima *p*-kumaroil-šikimat/kvinat-3-hidroksilaze (C3H) kavena kiselina i nizvodno ostale hidroksicimetne kiseline (sl. 4).



Slika 4. Biosintetski putevi od fenilalanina do hidroksicimetnih kiselina i flavonoida (preuzeto i prilagođeno iz udžbenika „Biochemistry and molecular biology of plants“ autora Kutchan i sur.: PAL = fenilalanin amonij-liaza, C4H = cinamat-4-hidroksilaza, C3H = *p*-kumaroil-šikimat/kvinat-3-hidroksilaza, CCoAOMT = kafeoil-CoA 3-O-metil transferaza, F5H = ferulična (koniferil aldehid/alkohol) 5-hidroksilaza, COMT = O-metiltransferaza kavene kiseline, 4CL = 4-kumaroil-CoA-liaza, CHS = halkon-sintaza, CHI = halkon-izomeraza, F3H = flavanon-3-hidroksilaza, F3`H = flavonoid-3'-hidrokilasa, FLS = flavonol-sintaza, OMT = O-metiltransferaza.

1.5. Fenolni spojevi u gospinoj travi, koprivi i kadulji

Ekstrakti gospine trave sadrže puno komponenti s dokumentiranom biološkom aktivnošću, uključujući fenolne kiseline i širok raspon flavonoida. Sadržaj flavonoida iznosi 11,7% u cvjetovima i 7,4% u listovima i stabljici (Ma i Xiao 1990). Glavni flavonoidi u ekstraktu gospine trave su rutin, hiperozid, izokvercitrin, avikularin, kvercitrin i kvercetin (Zou i sur. 2004). Glavne aktivne komponente u ekstraktu gospine trave su flavonoli (npr. kempferol, kvercetin), flavoni (npr. luteolin) i glikozidi (npr. hiperozid, izokvercitrin, kvercitrin, rutin), biflavonoidi uključujući biapigenin (flavon) i amentoflavoni (derivati biapigenin) (Berghofer i Hölzl 1987; Berghofer i Hölzl 1989), te katehini (flavonoidi često povezani s kondenziranim taninima) (Ollivier i sur. 1985; Hoelzl i Ostrowski 1987). Koncentracije rutina, hiperozida i izokvercitina iznose 1.6%, 0.9% i 0.3% (Dorossiev 1985). Od ostalih polifenolnih spojeva u ekstraktu gospine trave prisutne su kavena, klorogenska, *p*-kumarinska, ferulična, *p*-hidroksibenzojeva i vanilinska kiselina (Barnes i sur. 2001).

Pinelli i sur. (2008) su istraživali fenolne spojeve u listovima, stabljici i tekstilnim vlaknima kultivirane i divlje koprive. Njihova su istraživanja pokazala da listovi kultivirane i divlje koprive sadrže velike količine klorogenske te estera kavene s jabučnom kiselinom (derivati hidroksicimetne kiseline), naime 71,5 i 76,5% od ukupnih fenolnih spojeva. Pokazalo se da su flavonoidi glavne komponente stabljike: 54,4% ukupnih fenolnih spojeva u kultiviranoj koprivi i 31,2% u divljem tipu. Od fenolnih spojeva kopriva sadrži klorogensku, kavenu, kumarinsku, kviničnu, vanilinsku, homovanilinsku, 2-hidroksicimetnu, 4-hidroksicimetnu, feruličnu, siringičnu i galnu kiselinu, te kempferol, kvercetin, kempferol-3-*O*-glikozid, kvercetin-3-*O*-glikozid, izoramnetin-3-*O*-glikozid, kvercetin-3-*O*-rutinozid, izoramnetin-3-*O*-rutinozid, kempferol-3-*O*-rutinozid i izoramnetin-3-*O*-neohesperidozid (Otles i Yalcin 2012).

Kadulja je prirodni izvor flavonoida i fenolnih kiselina (npr. ružmarinske i kavene kiseline). Najveći dio fenolnih kiselina u kadulji su derivati kavene kiseline koja je temeljna komponenta velikog broja biljnih metabolita (Kamatou i sur. 2010). Kadulja obiluje i spojevima poput karnozola i karnozinske kiseline, rozmadiala, rozmanola, epirozmanola, metil karnozata i luteolin-7-*O*-β-glukopiranozida za koje je dokazano da imaju snažnu antioksidativnu aktivnost (Aleksovski i Savova 2007).

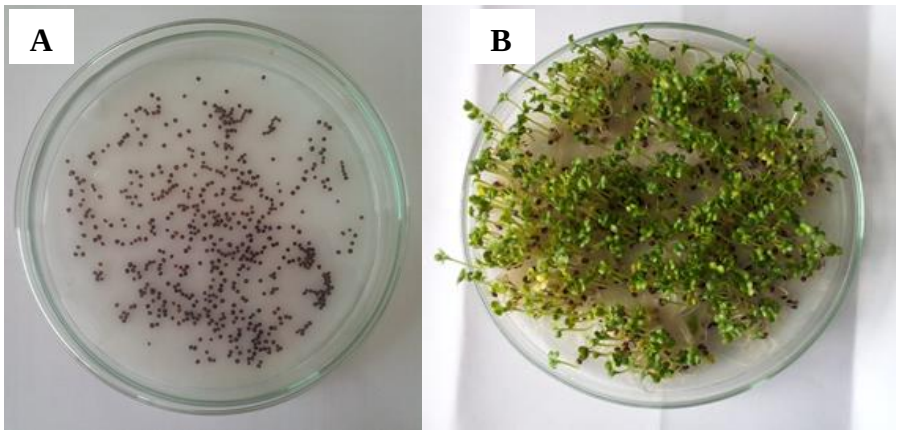
1.6. Ciljevi ovog diplomskog rada bili su:

a) metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja identificirati i kvantificirati dominantne flavonoide i hidroksicimetne kiseline u klijancima pekinškog kupusa,
b) odrediti utjecaj vodenih ekstrakata gospine trave, koprive i kadulje na sadržaj flavonoida i hidroksicimetnih kiselina u klijancima pekinškog kupusa,
c) odrediti utjecaj odabranih fenolnih spojeva, kempferola, izoramnetina, ferulične i *p*-kumarinske kiseline, na sadržaj flavonoida i hidroksicimetnih kiselina u klijancima pekinškog kupusa te
d) između testiranih tretmana klijanaca pekinškog kupusa odabrati najoptimalniji na razini sadržaja flavonoida i hidroksicimetnih kiselina za potencijalnu upotrebu u uzgoju pekinškog kupusa obogaćenog fenolnim bioaktivnim tvarima.

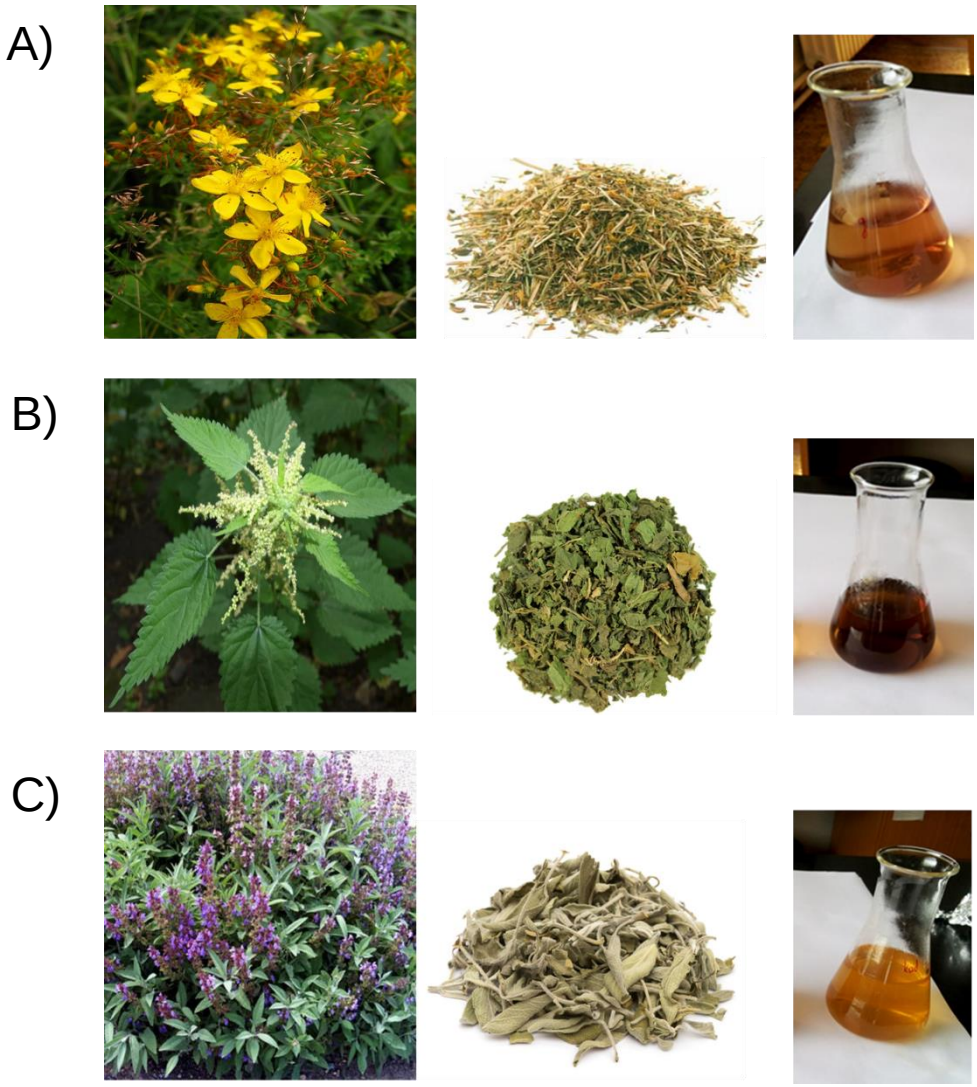
2. MATERIJALI I METODE

2.1. Biljni materijal

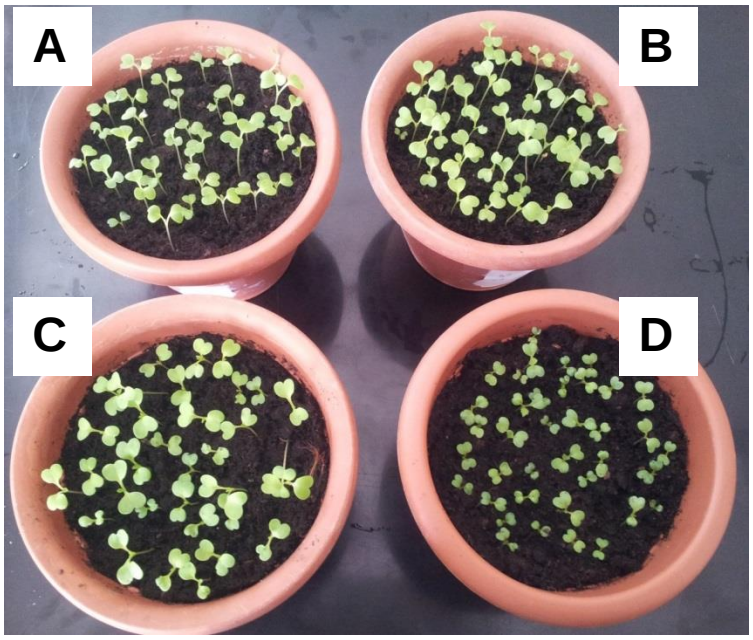
Za potrebe ovog istraživanja kao modelni organizam korišteni su klijanci vrste *Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt (pekinški kupus). Sjemenke ove vrste dobivene su od prof. dr. sc. Jutte Ludwig-Müller iz laboratorija za fiziologiju biljaka Instituta za botaniku Tehničkog Sveučilišta u Dresdenu, Njemačka. Sjemenke su klijale pet dana na vlažnom filter-papiru pri sobnoj temperaturi (sl. 5 A), zatim su klijanci (sl. 5 B) stavljeni u petrijevke i inkubirani 24h u otopinama odabranih fenolnih spojeva ili biljnim ekstraktima (sl. 6, tab.1). Nakon inkubacije klijanci su presađeni u univerzalni supstrat za sobno bilje (sl. 7 i 8) i sljedećih 5 dana uzgajani u stakleniku pri stalnim uvjetima (temperatura 23±1°C, 16h svjetla i 8h mraka). Nakon toga klijanci su izvađeni iz supstrata, nadzemni dio je odvojen, temeljito ispran vodom, smrznut pod tekućim N_2 i pohranjen na -80°C do ekstrakcije biljnog materijala.



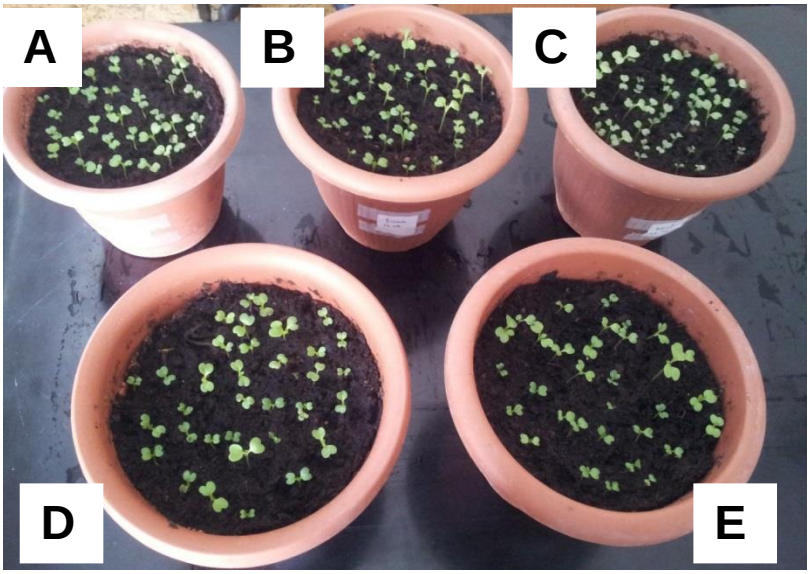
Slika 5. A) Sjemenke vrste *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* pri naklijavanju na vlažnom filter papiru. B) Klijanci vrste *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* stari pet dana (stadij u kojemu su tretirani biljnim ekstraktima ili fenolnim spojevima).



Slika 6. Habitus, suhi biljni materijal i vodeni ekstrakt vrsta: A) *Hypericum perforatum* L. (gospina trava), B) *Urtica dioica* L. (kopriva), C) *Salvia officinalis* L. (kadulja).



Slika 7. Klijanci vrste *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* stari deset dana prethodno tretirani vodenim ekstraktima: A) gospine trave, C) koprive, D) kadulje. B) Klijanci tretirani vodom (kontrola).



Slika 8. Klijanci vrste *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* stari deset dana prethodno tretirani fenolnim spojevima: A) feruličnom kiselinom, B) *p*-kumarinskom kiselinom, C) kempferolom, D) izoramnetinom. E) Klijanci tretirani puferom (kontrola).

Tablica 1. Tretmani klijanaca fenolnim spojevima ili biljnim ekstraktima.

fenolni spojevi	**biljni ekstrakti**
kontrola 0 (MES*)	kontrola H_2O (deionizirana voda)
MES + kempferol	vodeni ekstrakt gospine trave
MES + ferulična kiselina	vodeni ekstrakt kadulje
MES + *p*-kumarinska kiselina	vodeni ekstrakt koprive
MES + izoramnetin	

***** MES = 2-*N*-morfolino-etansulfonska kiselina

2.2. Priprema vodenih biljnih ekstrakata i otopina fenolnih spojeva za inkubaciju klijanaca

Masa od 0,25 g suhog biljnog materijala ekstrahirana je sa 100 mL vode pri 100 °C 30 min. Nakon toga su ekstrakti filtrirani kroz filter-papir i dobiveni filtrati (sl. 7) korišteni su za inkubaciju klijanaca; otprilike 50 klijanaca inkubirano je u 40 mL biljnog ekstrakta. Otopine odabranih fenolnih spojeva pripremljene su otapanjem etanolnih otopina njihovih standarda u određenom volumenu deionizirane vode da bi se postigla konačna koncentracija od 10μM i klijanci su također inkubirani u volumenu od 40 ml ovih otopina, što znači da su tretirani s 114,5 μg kempferola, 126,5 μg izoramnetina, 77,7 μg ferulične kiseline ili 65,7 μg *p*-kumarinske kiseline.

2.3. Ekstrakcija fenolnih spojeva

Pripremljeno tkivo homogenizirano je tučkom u tarioniku uz dodatak tekućeg dušika. Ekstrakcija je provedena 80% metanolom (MeOH) kao otapalom za fenolne komponente. Odvojeno je 300 mg svježeg tkiva i homogenizirano s 1,5 ml 80% MeOH. Homogenati su miješani 1 min, nakon toga stavljeni 15 minuta u ultrazvučnu kupelju, a potom dva sata u rotacionu miješalicu na 23°C pri 150 rpm. Nakon provedene ekstrakcije svi uzorci pročišćeni su centrifugiranjem tri puta po 10 minuta pri 11 000 rpm i 4°C. Supernatant se svaki put pažljivo odvoji od taloga i prebaci u novu epruvetu. Nakon trećeg centrifugiranja, slijedi hidroliza ekstrakata prema sljedećem protokolu: na 300 μl biljnog ekstrakta dodano je 34 μl koncentrirane HCl. U svakom uzorku konačna koncentracija HCl iznosila je 1,2 M. Uzorci su

potom inkubirani dva sata na 80°C pri 300 rpm. Nakon završetka hidrolize uzorci su pohranjeni na -20°C na 15 minuta te je potom svaki uzorak prebačen u bočice za HPLC.

2.4. Razdvajanje i identifikacija fenolnih spojeva metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja

Nakon ekstrakcije i hidrolize fenolnih spojeva iz klijanaca kineskog kupusa, dobiveni ekstrakti se podvrgnu analizi metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja (*high performance liquid chromatography*, HPLC). Kvalitativna i kvantitativna HPLC analiza fenolnih spojeva provedena je na uređaju za HPLC, Agilent 1100 Series System. Korištena su dva polarna otapala – otapalo A = 0,2% octena kiselina (v/v) i otapalo B = 80% metanol i 0,2% octena kiselina. Metoda korištena za razdvajanje i analizu fenolnih spojeva prethodno je razvijena u Laboratoriju za fitokemiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prilikom HPLC analize svaki je uzorak nanešen na kolonu u volumenu od 50 μL, brzina toka bila je konstantna i iznosila 1,0 mL/min, a temperatura kolone namještena na 30°C. Apsorbancija je očitana na valnim duljinama od 310 nm za određivanje fenolnih kiselina i 360 nm za određivanje flavonoida. Kako bi bilo moguće napraviti kvalitativnu analizu, na uređaju za HPLC očitani su standardi za flavonoide te za hidroksicimetne kiseline. Fenolni spojevi karakterizirani su uspoređujući njihova retencijska vremena sa onima komercijalnih standarda. Retencijsko vrijeme je vrijeme proteklo od unosa uzorka u sustav za kromatografiju do bilježenja najvećeg pika određene tvari.

Rezultat provedene HPLC analize predstavlja kromatogram, niz simetričnih eluacijskih krivulja odnosno pikova koji nastaju nakon prolaska analita kroz kolonu i detektor. Površina pika ovisi o koncentraciji tvari u uzorku i odazivu detektora spram toga analita. Kromatogram omogućava kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Položaj pika na vremenskoj osi (retencijsko vrijeme) identificira određenu komponentu, a iz površine (ili visine) pika se može izračunati količina identificirane supstance. Identifikacija flavonoida i hidroksicimetnih kiselina u uzorcima provedena je usporedbom retencijskih vremena s očitanim standardima. Kvantifikacija spomenutih spojeva provedena je upotrebom kalibracijskih krivulja njihovih standarda (tab. 2).

Analiza razlika u količini fenolnih spojeva netretiranih klijanaca provedena je u programu Statistica 13.1 upotrebom one-way ANOVA + Duncanov test. Statistička analiza

razlika između tretiranih i kontrolne skupine biljaka provedena je u programu Microsoft Excel 2010 upotrebom *t*-testa.

Tablica 2. Jednadžbe kalibracijskih pravaca i R^2 vrijednosti standarda odabranih fenolnih spojeva

fenolni spoj	*jednadžba kalib. pravca*	R^2
kavena kiselina	y = 2423.6x + 11.203	0.999
p-kumarinska kiselina	y = 3502.6x + 40.25	0.999
sinapinska kiselina	y = 1842.1x + 25.56	0.999
ferulična kiselina	y = 2815.8x – 36.454	0.999
kvercetin	y = 944.51x - 39.118	0.997
kempferol	y = 1076.9x - 36.287	0.998
izoramnetin	y = 1241.9x - 39.743	0.999

Podaci predstavljaju srednju vrijednost triju tehničkih replika ± standardna pogreška.

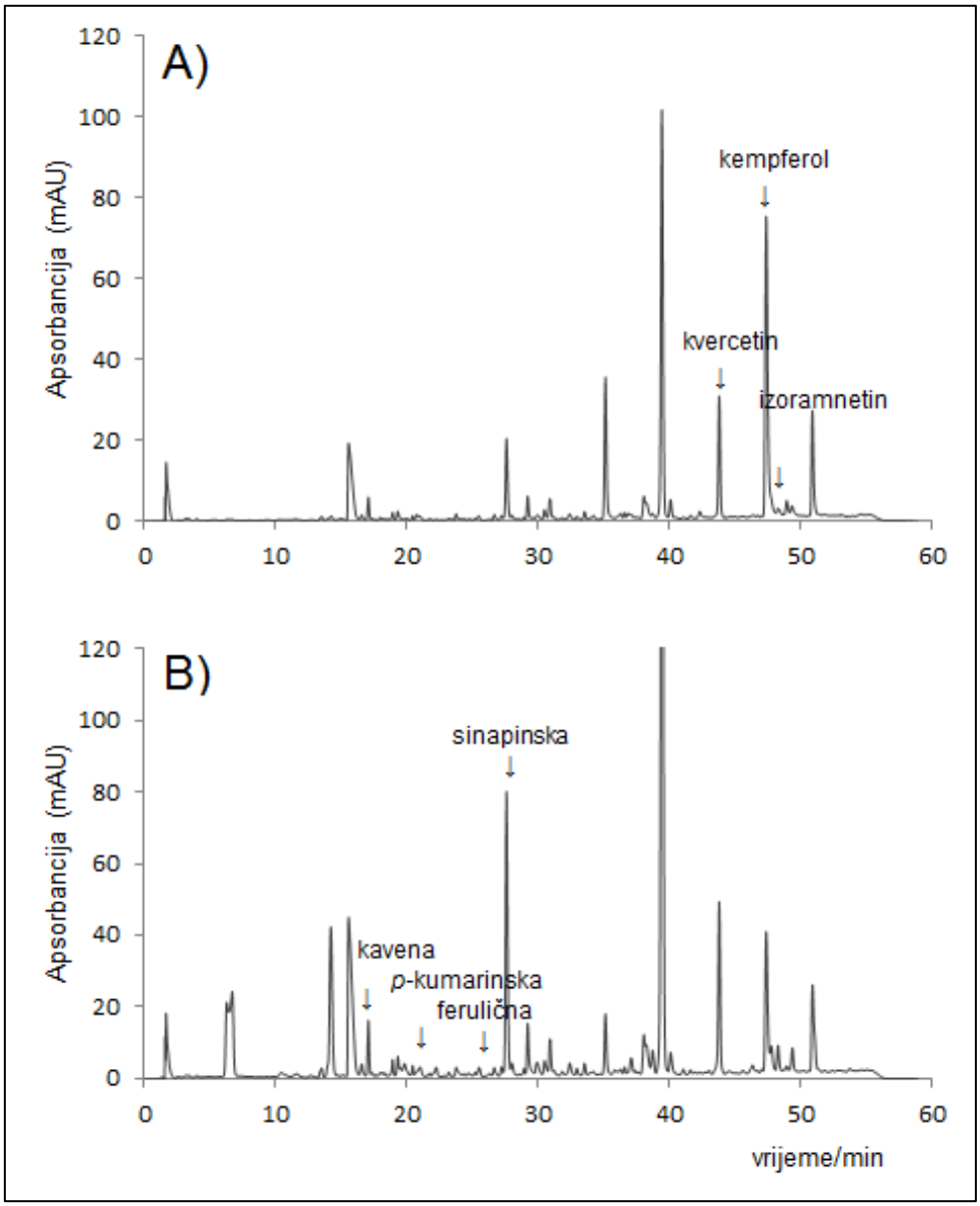
2.5. Popis korištenih kemikalija abecednim redom

Kemikalija	*Proizvođač*
2-(*N*-morfolino)etansulfonska kiselina	Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka
Kempferol	Sigma-AldrichGmbH, Taufkirchen, Njemačka
ferulična kiselina	Extrasynthese, Genay, Francuska
p-kumarinska kiselina	Extrasynthese, Genay, Francuska
Izoramnetin	Sigma-AldrichGmbH, Taufkirchen, Njemačka
Metanol	J. T. Baker, Avantos Performance Materials, Poljska
kavena kiselina	Extrasynthese, Genay, Francuska
klorovodična kiselina	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Kvercetin	Sigma-AldrichGmbH, Taufkirchen, Njemačka
octena kiselina	J. T. Baker, Avantos Performance Materials, Poljska
sinapinska kiselina	Extrasynthese, Genay, Francuska

3. REZULTATI

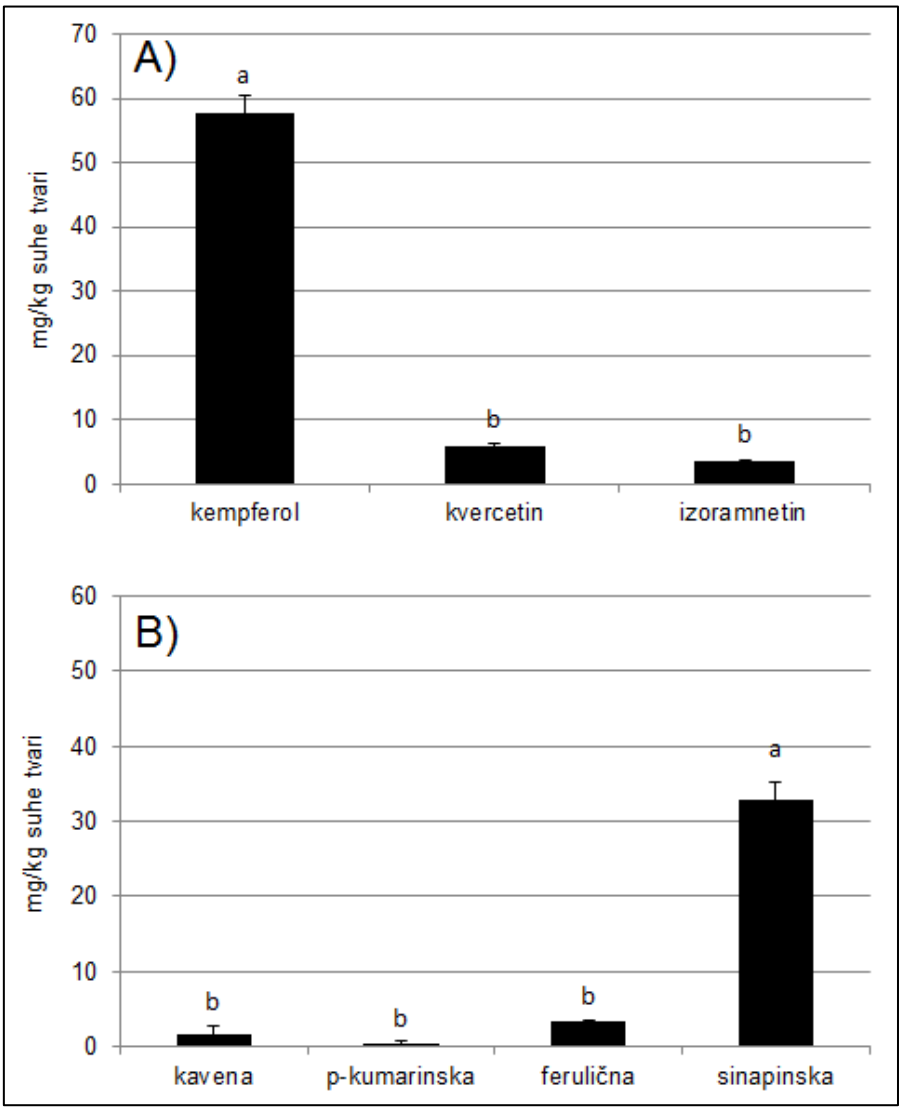
3.1. Fenolni profil klijanaca pekinškog kupusa analiziran metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja

Metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja razdvojeni su i identificirani dominantni flavonoidi (sl. 9 A) i hidroksicimetne kiseline (sl. 9 B) klijanaca pekinškog kupusa. Od flavonoida identificirani su kvercetin, kempferol i izoramnetin (sl. 9 A), a od hidroksicimetnih kiselina kavena, *p*-kumarinska, ferulična i sinapinska kiselina (sl. 9 B).



Slika 9. A) Flavonoidi i B) hidroksicimetne kiseline klijanaca pekinškog kupusa razdvojeni metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja. Flavonoidi su snimljeni pri valnoj duljini od 360 nm, a kiseline pri 310 nm.

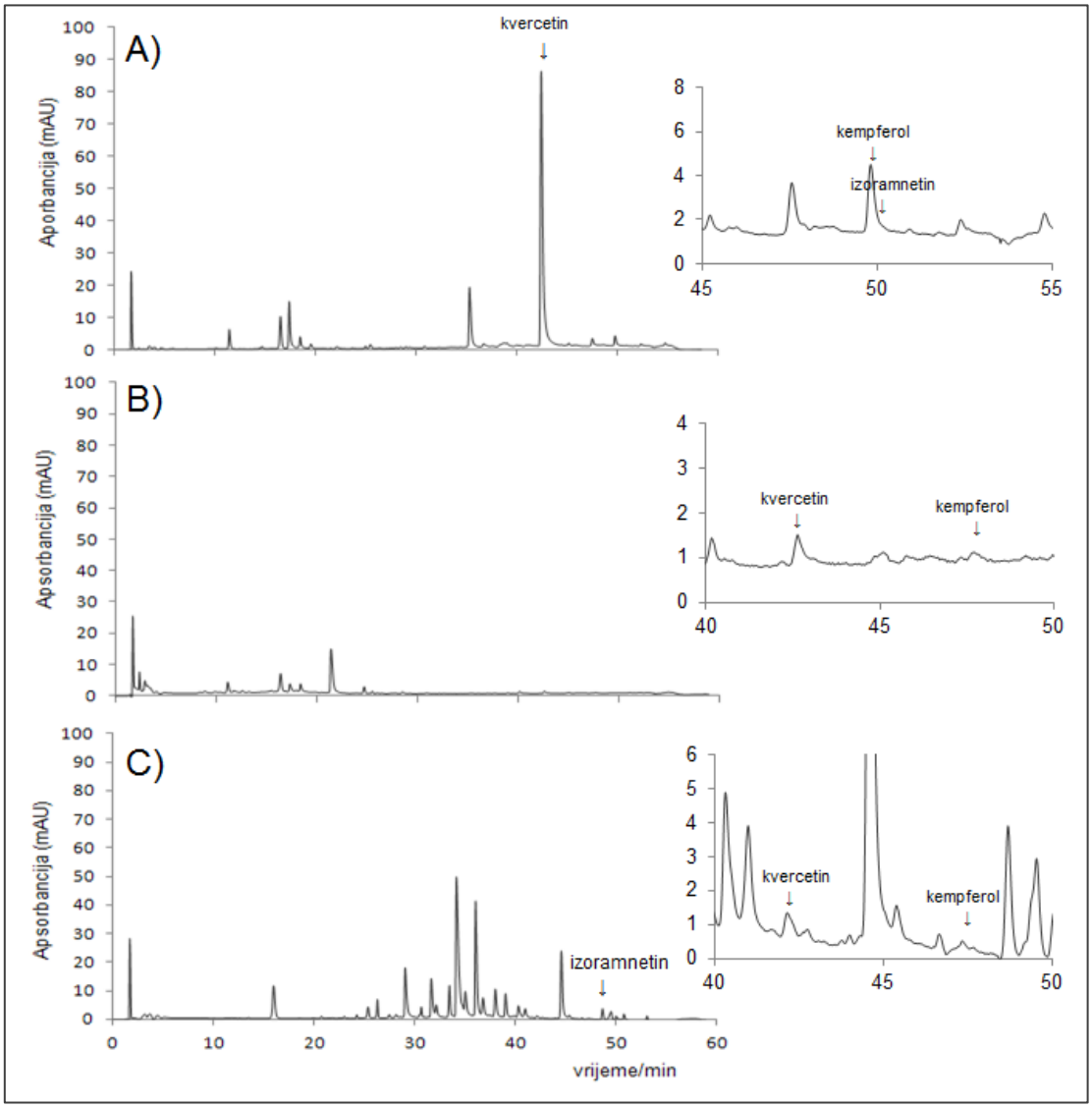
Upotrebom jednadžbi kalibracijskih pravaca za standarde (tab. 2) određene su mase identificiranih spojeva u klijancima. Među identificiranima, značajno najzastupljeniji je flavonoid kempferol s udjelom od 58 mg/kg sm, nakon njega slijede kvercetin sa 6 mg/kg sm, te izoramnetin sa 4 mg/kg sm (sl. 10 A). Od identificiranih hidroksicimetnih kiselina značajno najzastupljenija je sinapinska kiselina s udjelom 33 mg/kg sm, nakon čega slijede ferulična s 3 mg/kg sm, kavena s 2 mg/kg sm i *p*-kumarinska sa svega 0,4 mg/kg sm klijanaca (sl. 10 B).



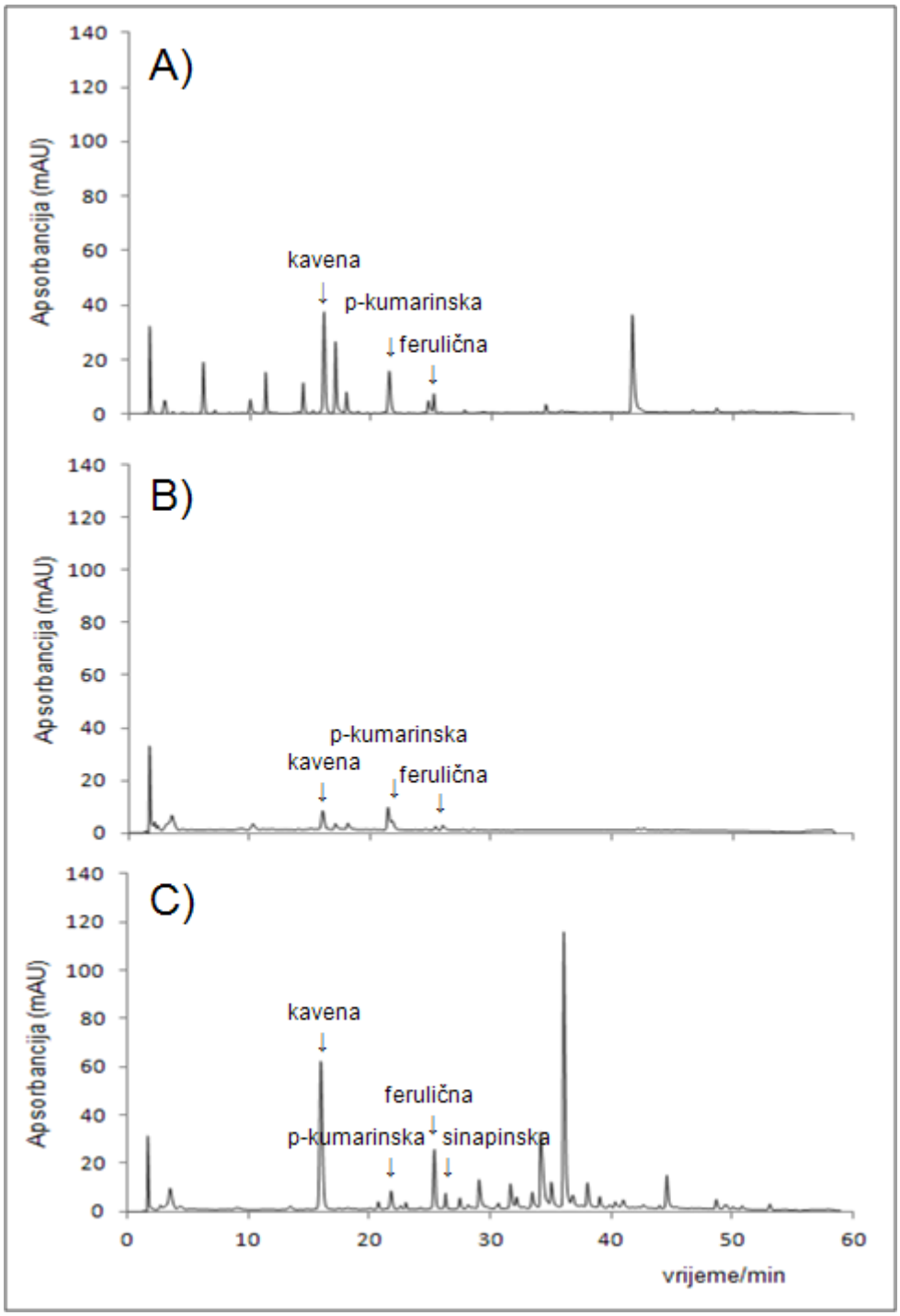
Slika 10. Količina identificiranih A) flavonoida i B) hidroksicimetnih kiselina u klijancima pekinškog kupusa. Podaci predstavljaju prosjek triju bioloških replika ± standardna devijacija. Vrijednosti označene različitim slovima su statistički različite (one-way ANOVA + Duncanov test) pri P≤0,05.

3.2. Fenolni spojevi biljnih ekstrakata razdvojeni i analizirani metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja

Metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja razdvojeni su i identificirani dominantni flavonoidi i hidroksicimetne kiseline vodenih ekstrakata gospine trave (sl. 11 A i 12 A), koprive (sl. 11 B i 12 B) i kadulje (sl. 11 C i 12 C). U ekstraktu gospine trave dominantni flavonoid je kvercetin (sl. 11 A), a od hidroksicimetnih kiselina kavena, *p*-kumarinska i ferulična (sl. 12 A). U ekstraktu koprive identificirani su flavonoidi kvercetin i kempferol (sl. 11 B), a od kiselina kavena, *p*-kumarinska i ferulična (sl. 12 B). U ekstraktu kadulje zabilježeni su flavonoidi kvercetin, kempferol i izoramnetin (sl. 11 C), dok su od kiselina identificirane kavena, *p*-kumarinska, ferulična i sinapinska (sl. 12 C).



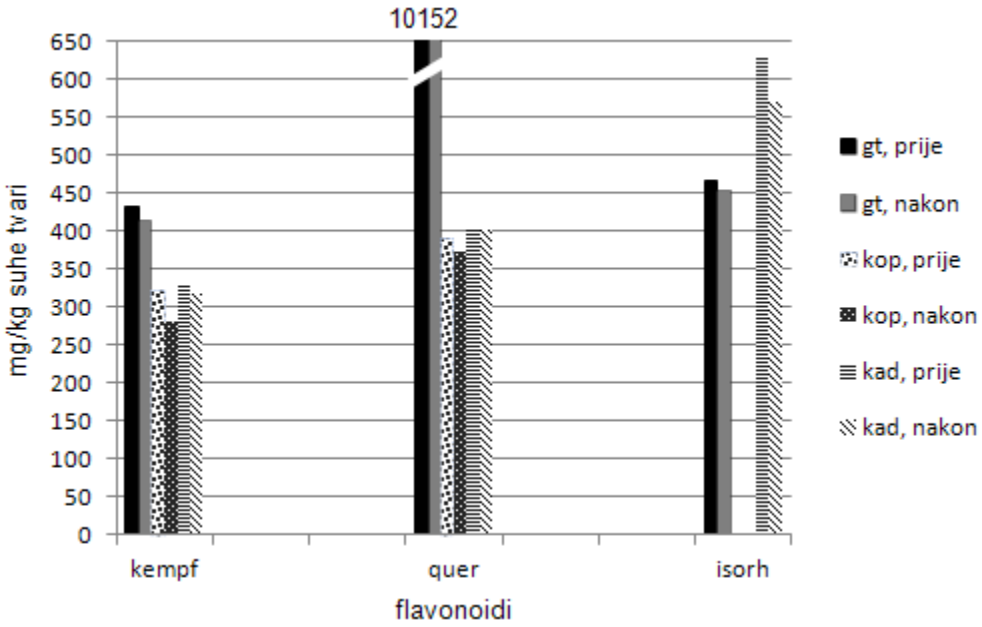
Slika 11. Flavonoidi ekstrakata A) gospine trave, B) koprive i C) kadulje razdvojeni metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja i snimljeni pri valnoj duljini od 360 nm.



Slika 12. Hidroksicimetne kiseline ekstrakata A) gospine trave, B) koprive i C) kadulje razdvojeni metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja i snimljeni pri valnoj duljini od 310 nm.

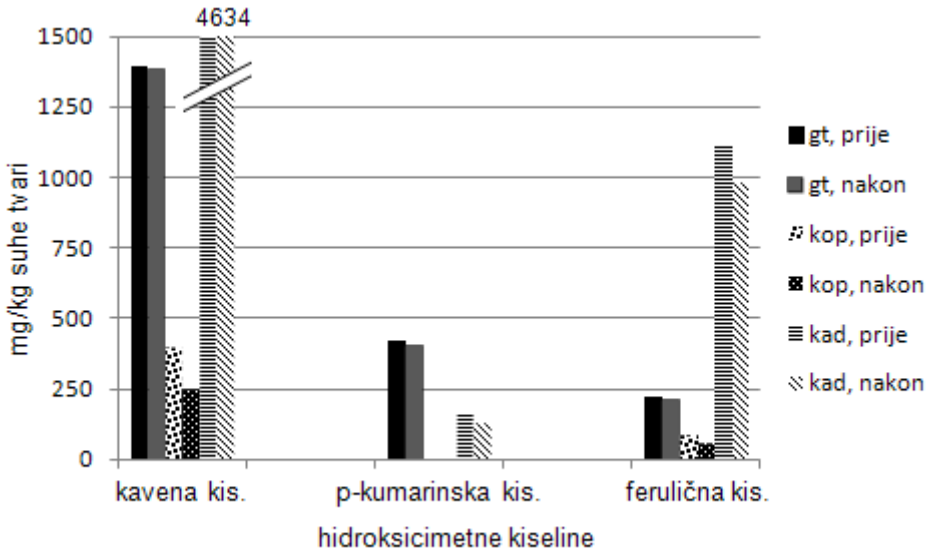
3.3. Stabilnost fenolnih spojeva u biljnim ekstraktima

Analiza količine dominantnih flavonoida u trenutku pripreme ekstrakta i 24 h nakon pripreme pokazala je da nije došlo do značajnog smanjenja količine kempferola, kvercetina i izoramnetina niti u jednom od testiranih ekstrakata (sl. 13).



Slika 13. Stabilnost flavonoida u vodenim ekstraktima gospine trave (gt), koprive (kop) i kadulje (kad) unutar 24h. kempf = kempferol, querc = kvercetin, isorh = izoramnetin. Prije = svježi vodeni ekstrakt pohranjen na -20°C, nakon = vodeni ekstrakt pohranjen na -20°C nakon 24h inkubacije pri sobnoj temperaturi.

Analizom stabilnosti dominantnih hidroksicimetnih kiselina 24 h nakon pripreme utvrđeno je da nije došlo do značajnog smanjenja količine niti jedne od identificiranih kiselina niti u jednom od ekstrakata (sl. 14).

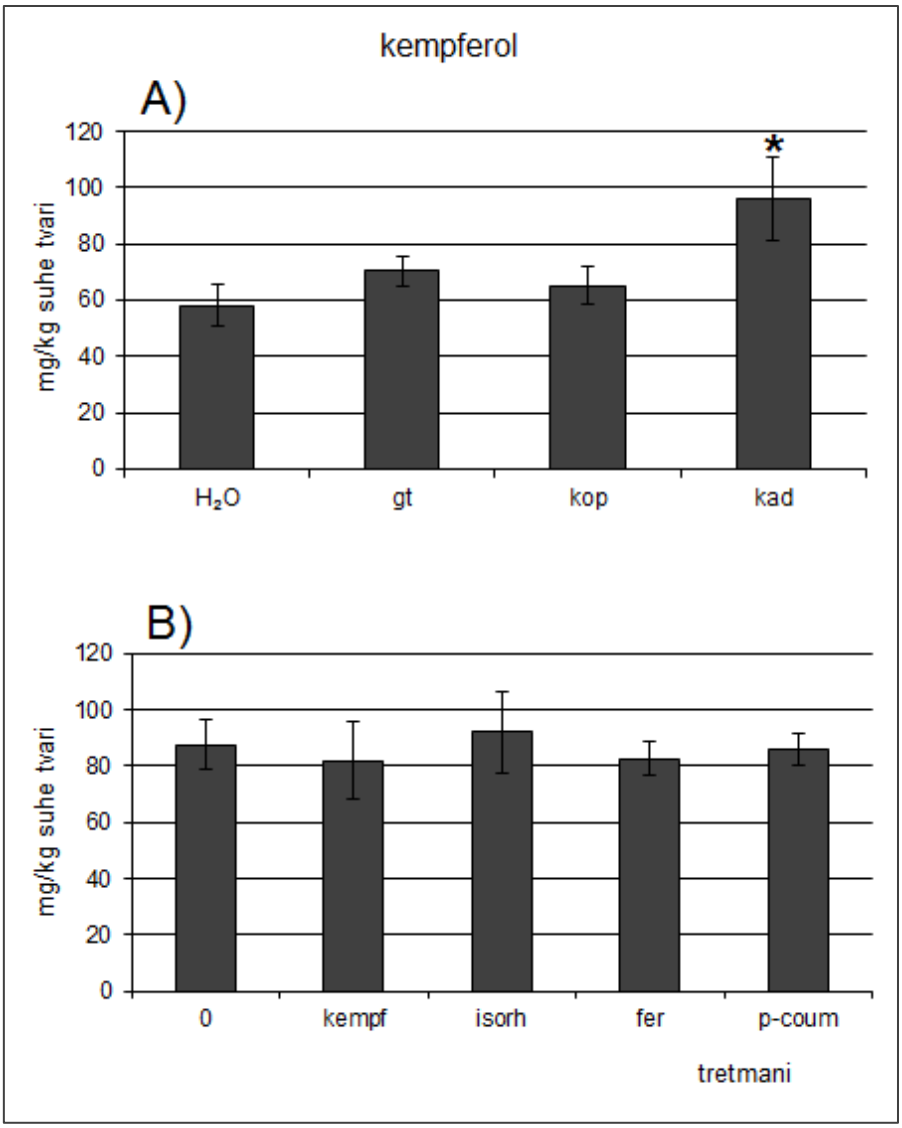


Slika 14. Stabilnost hidroksicimetnih kiselina u vodenim ekstraktima gospine trave (gt), koprive (kop) i kadulje (kad) unutar 24h. Prije = svježi vodeni ekstrakt pohranjen na -20°C, nakon = vodeni ekstrakt spremljen na -20°C nakon 24h inkubacije pri sobnoj temperaturi.

3.4. Utjecaj biljnih ekstrakata i fenolnih spojeva na sadržaj flavonoida u klijancima vrste *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*

Tretman klijanaca pekinškog kupusa vodenim ekstraktom kadulje značajno je u klijancima povećao količinu flavonoida kempferola (sl. 15 A). Konkretno, udio kempferola od 58 mg po kg suhe tvari klijanaca nakon tretmana ekstraktom kadulje porastao je na 96 mg po kg suhe tvari, što je povećanje od 1,65 puta. Ostali testirani ekstrakti (gospina trava i kopriva) nisu uzrokovali značajno povećanje količine kempferola u klijancima pekinškog kupusa (sl. 15 A).

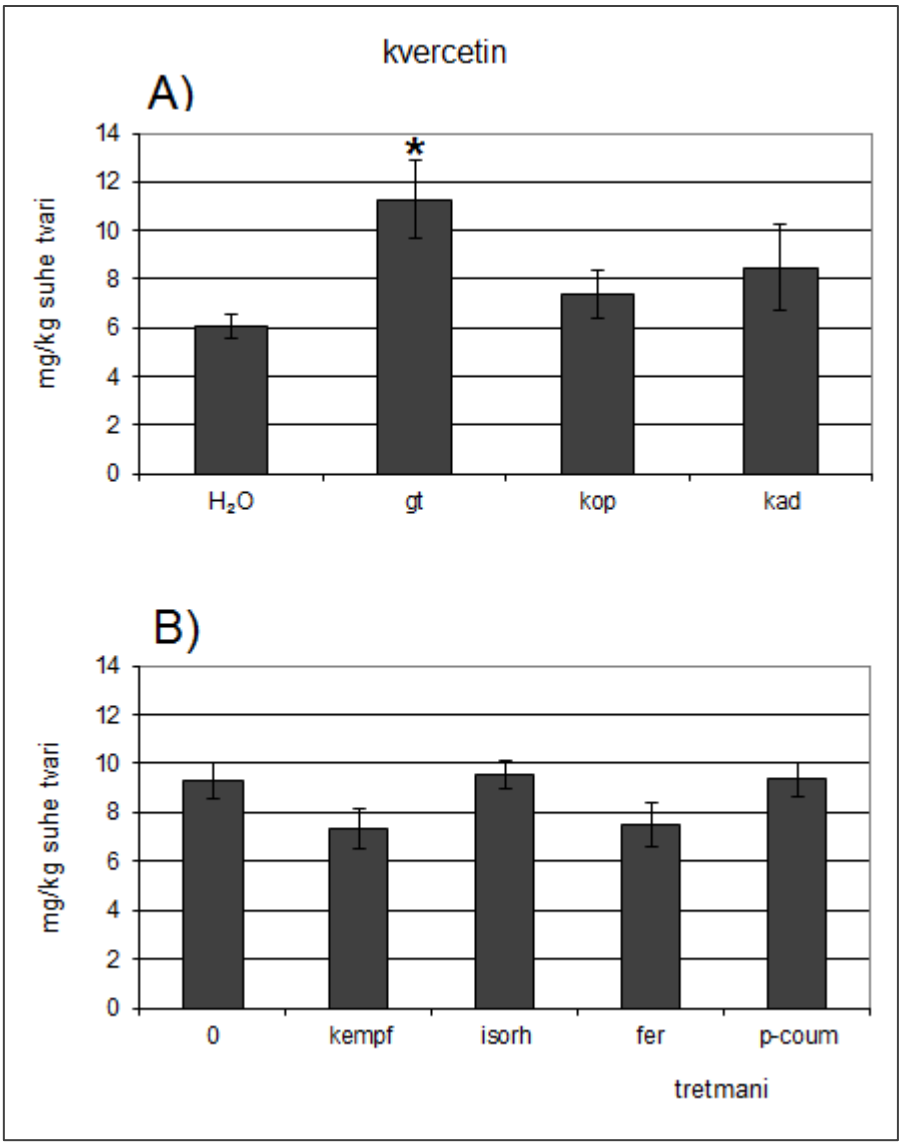
Obrada klijanaca pekinškog kupusa vodenim otopinama odabranih flavonoida i fenolnih kiselina nije rezultirala značajnim promjenama količine flavonoida kempferola u klijancima pekinškog kupusa (sl. 15 B).



Slika 15. Utjecaj A) vodenih ekstrakata biljaka i B) fenolnih spojeva na količinu kempferola u klijancima vrste *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*. H_2O = kontrolne biljke tretirane vodom, gt = vodeni ekstrakt gospine trave, kop = vodeni ekstrakt koprive, kad = vodeni ekstrakt kadulje. 0 = kontrolne biljke tretirane puferom, kempf = kempferol, isorh = izoramnetin, fer = ferulična kiselina, *p*-coum = *p*-kumarinska kiselina. *označava statistički značajnu vrijednost (*t*-test) pri P≤0,1 naspram kontrole (A = voda, B = pufer).

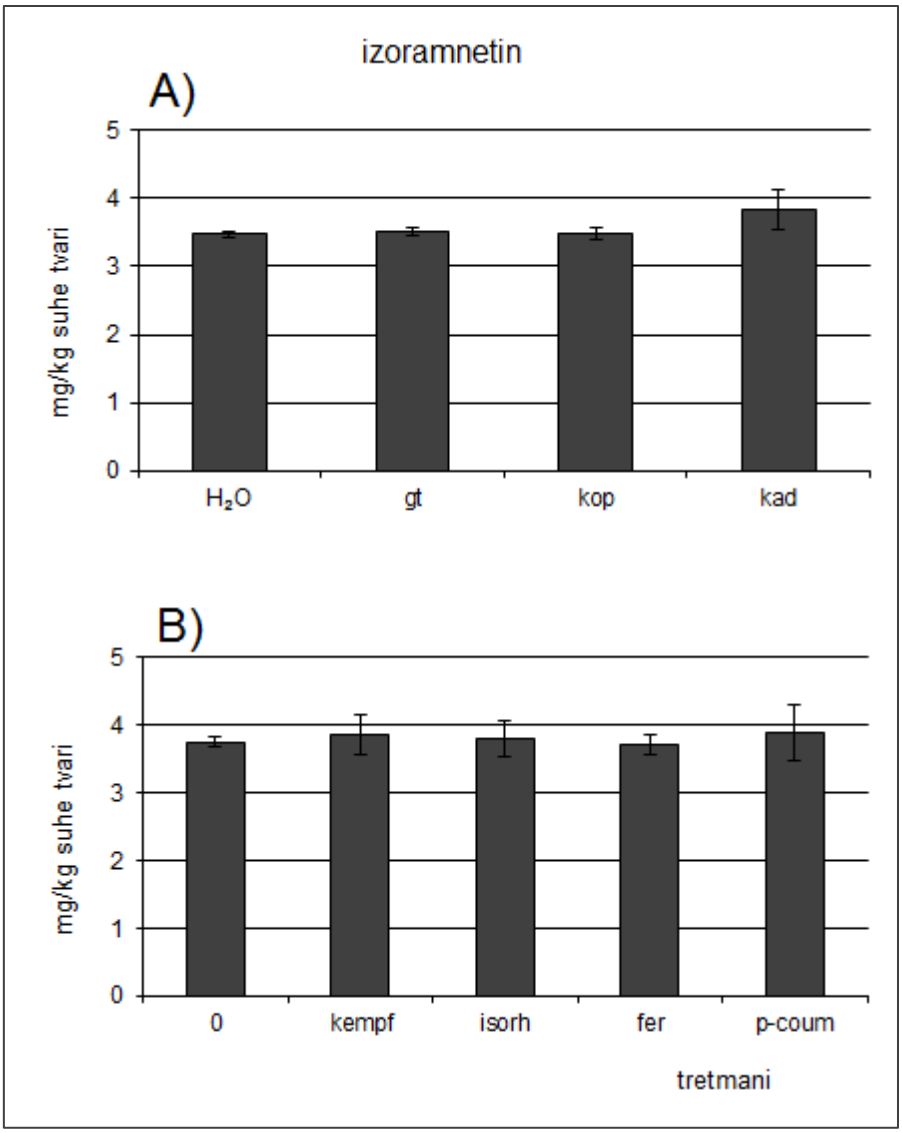
Obrada klijanaca pekinškog kupusa ekstraktom gospine trave uzrokovala je značajan porast količine kvercetina u klijancima (sl. 16 A). Ekstrakti koprive i kadulje također pokazuju tendeciju povećanja količine kvercetina u klijancima pekinškog kupusa, međutim na razini značajnosti P≤0,1 to nisu značajni učinci (sl. 16 A).

Tretmani klijanaca otopinama fenolnih spojeva nisu uzrokovali značajne promjene količine kvercetina u klijancima pekinškog kupusa (sl. 16 B).



Slika 16. Utjecaj A) vodenih ekstrakata biljaka i B) fenolnih spojeva na količinu kvercetina u klijancima vrste *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*. H_2O = kontrolne biljke tretirane vodom, gt = vodeni ekstrakt gospine trave, kop = vodeni ekstrakt koprive, kad = vodeni ekstrakt kadulje. 0 = kontrolne biljke tretirane puferom, kempf = kempferol, isorh = izoramnetin, fer = ferulična kiselina, *p*-coum = *p*-kumarinska kiselina. *označava statistički značajnu vrijednost (*t*-test) pri $P \leq 0,05$ naspram kontrole (A = voda, B = pufer).

Niti jedan od tretmana, bilo da se radi o biljnim ekstraktima ili otopinama standarda fenolnih spojeva, nije značajno promijenio količinu izoramnetina u klijancima pekinškog kupusa (sl. 17 A i B).



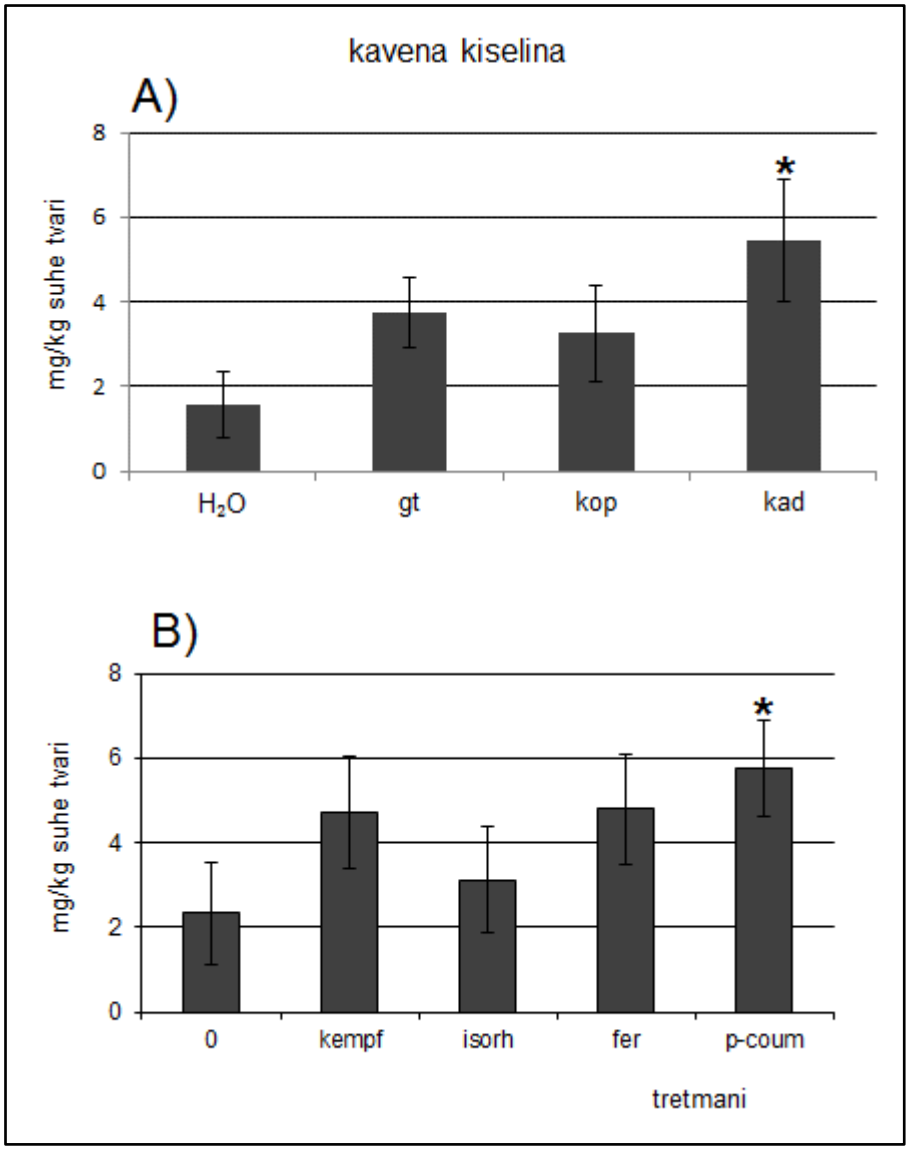
Slika 17. Utjecaj A) vodenih ekstrakata biljaka i B) fenolnih spojeva na količinu izoramnetina u klijancima vrste *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*. H_2O = kontrolne biljke tretirane vodom, gt = vodeni ekstrakt gospine trave, kop = vodeni ekstrakt koprive, kad = vodeni ekstrakt kadulje. 0 = kontrolne biljke tretirane puferom, kempf = kempferol, isorh = izoramnetin, fer = ferulična kiselina, *p*-coum = *p*-kumarinska kiselina.

3.5. Utjecaj biljnih ekstrakata i fenolnih spojeva na sadržaj hidroksicimetnih kiselina u klijancima vrste *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*

Tretman klijanaca pekinškog kupusa vodenim ekstraktom kadulje značajno je u klijancima povećao količinu kavene kiseline (sl. 18 A). Konkretno, udio kavene kiseline od 1,5 mg po kg suhe tvari klijanaca nakon tretmana ekstraktom kadulje porastao je na 5,4 mg po

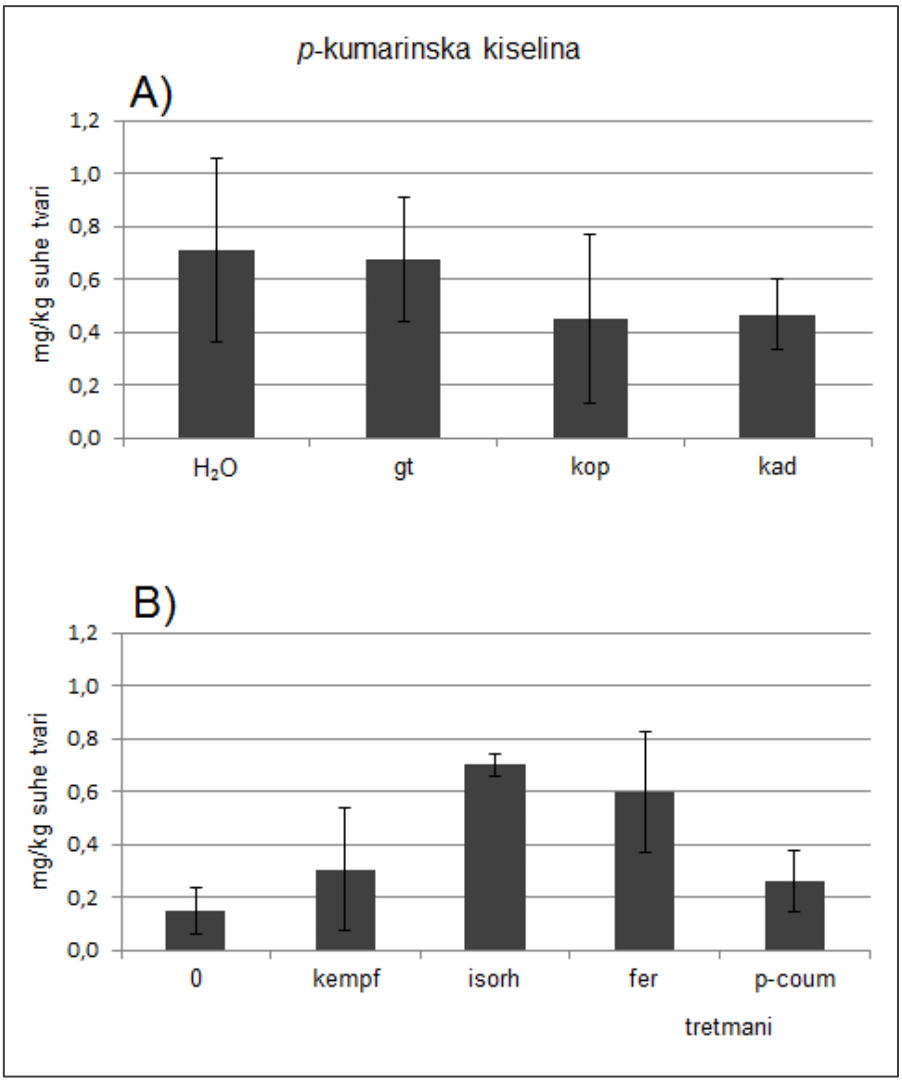
kg suhe tvari, što je povećanje od 3,6 puta. Ekstrakti gospine trave i koprive nisu uzrokovali značajno povećanje količine kempferola u klijancima pekinškog kupusa (sl. 18 A).

Među tretmanima fenolnim spojevima, samo onaj *p*-kumarinskom kiselinom rezultirao je značajnim porastom količine kavene kiseline u klijancima pekinškog kupusa (sl. 18 B)



Slika 18. Utjecaj A) vodenih ekstrakata biljaka i B) fenolnih spojeva na količinu kavene kiseline u klijancima vrste *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*. H_2O = kontrolne biljke tretirane vodom, gt = vodeni ekstrakt gospine trave, kop=vodeni ekstrakt koprive, kad = vodeni ekstrakt kadulje. 0 = kontrolne biljke tretirane puferom, kempf = kempferol, isorh = izoramnetin, fer = ferulična kiselina, *p*-coum = *p*-kumarinska kiselina. *označava statistički značajnu vrijednost (*t*-test) pri P≤0,1 naspram kontrole (A = voda, B = pufer).

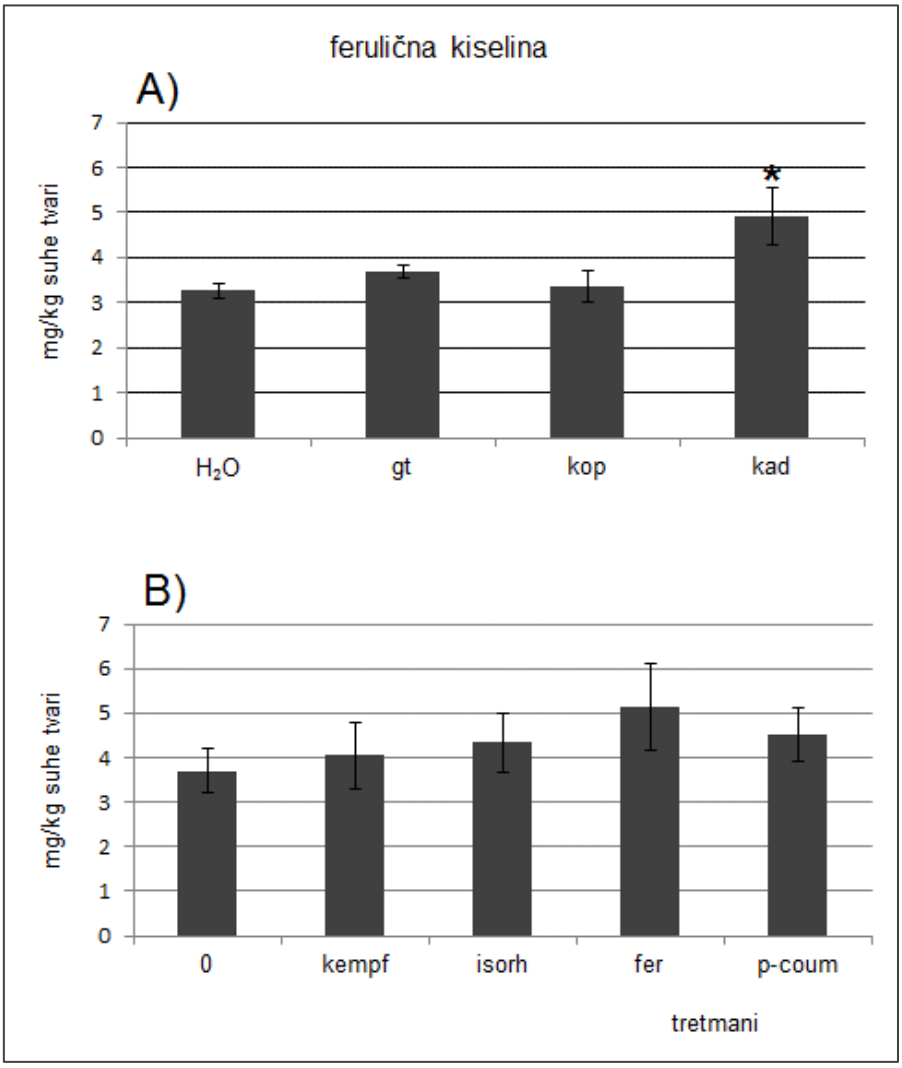
Niti jedan od tretmana, bilo da se radi o biljnim ekstraktima ili otopinama standarda fenolnih spojeva, nije značajno promijenio količinu *p*-kumarinske kiseline u klijancima pekinškog kupusa (sl. 19 A i B).



Slika 19. Utjecaj A) vodenih ekstrakata biljaka i B) fenolnih spojeva na količinu *p*-kumarinske kiseline u klijancima vrste *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*. H_2O = kontrolne biljke tretirane vodom, gt = vodeni ekstrakt gospine trave, kop = vodeni ekstrakt koprive, kad = vodeni ekstrakt kadulje. 0 = kontrolne biljke tretirane puferom, kempf = kempferol, isorh = izoramnetin, fer = ferulična kiselina, *p*-coum = *p*-kumarinska kiselina. Testiranje začajnosti provedeno ja na razini $P \leq 0,1$.

Tretman klijanaca pekinškog kupusa vodenim ekstraktom kadulje značajno je u klijancima povećao količinu ferulične kiseline (sl. 20 A). Nakon tretmana ekstraktom kadulje udio ferulične kiseline od 3,3 mg po kg suhe tvari klijanaca porastao je na 4,9 mg po kg suhe tvari, što je povećanje od 1,48 puta. Ekstrakti gospine trave i koprive nisu uzrokovali značajno povećanje količine kempferola u klijancima pekinškog kupusa (sl. 20 A).

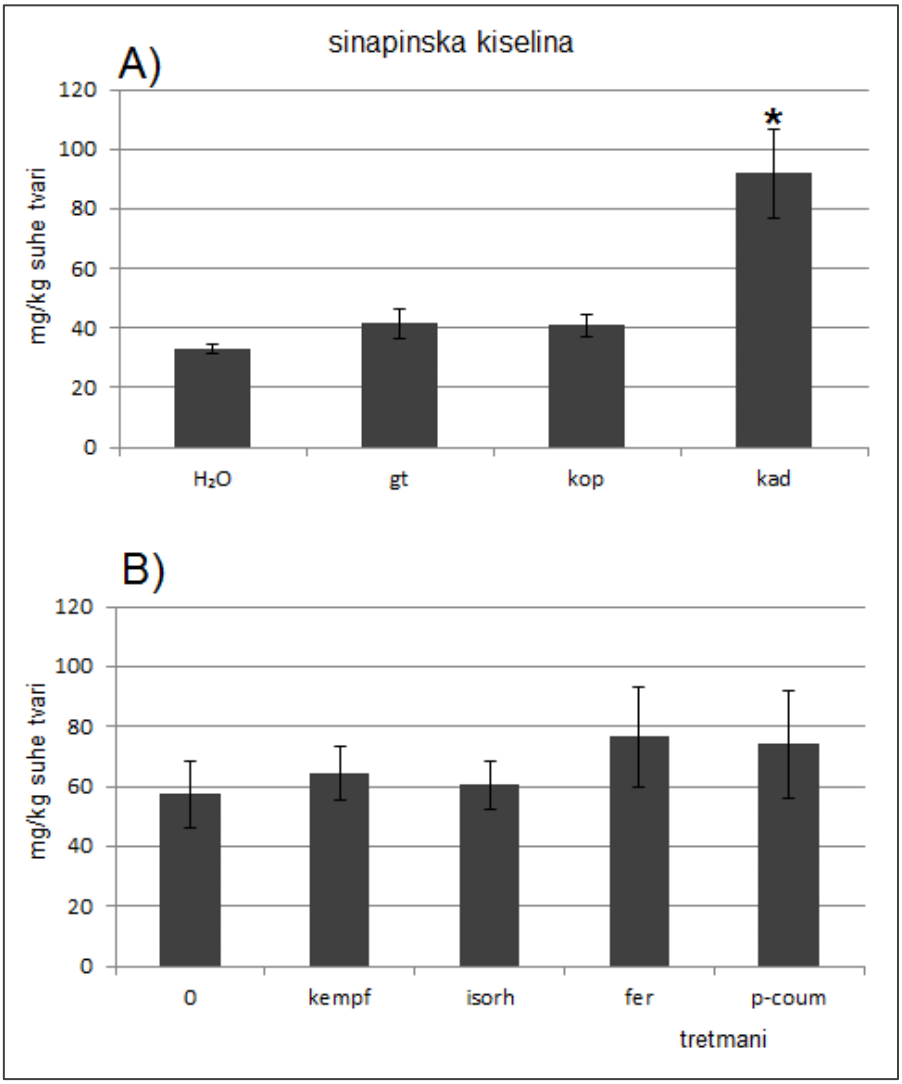
Obrada klijanaca pekinškog kupusa vodenim otopinama odabranih flavonoida i fenolnih kiselina nije rezultirala značajnim promjenama količine ferulične kiseline u klijancima pekinškog kupusa (sl. 20 B).



Slika 20. Utjecaj A) vodenih ekstrakata biljaka i B) fenolnih spojeva na količinu kavene kiseline u klijancima vrste *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*. H_2O = kontrolne biljke tretirane vodom, gt = vodeni ekstrakt gospine trave, kop = vodeni ekstrakt koprive, kad = vodeni ekstrakt kadulje. 0 = kontrolne biljke tretirane puferom, kempf = kempferol, isorh = izoramnetin, fer = ferulična kiselina, *p*-coum = *p*-kumarinska kiselina. *označava statistički značajnu vrijednost (*t*-test) pri P≤0,1 naspram kontrole (A = voda, B = pufer).

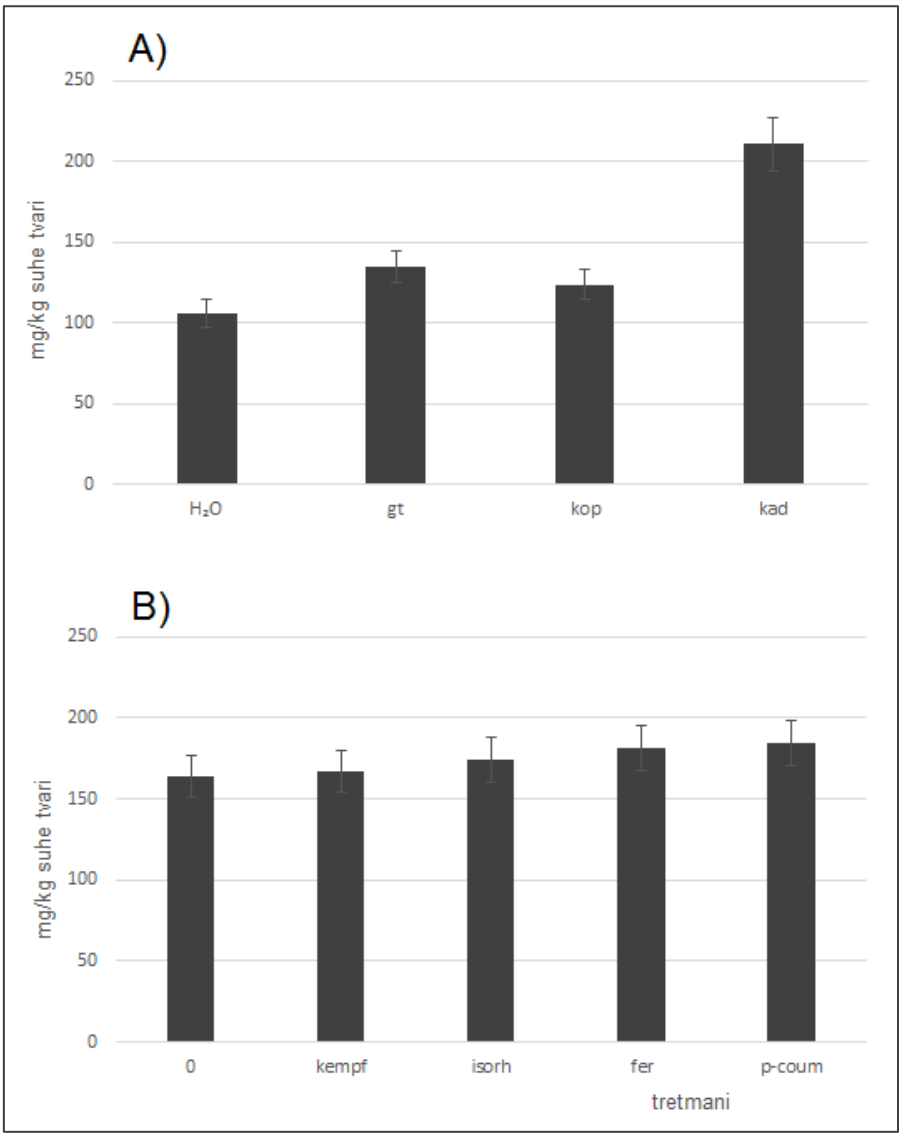
Tretman klijanaca pekinškog kupusa vodenim ekstraktom kadulje značajno je u klijancima povećao količinu sinapinske kiseline (sl. 21 A). Nakon tretmana ekstraktom kadulje došlo je do povećanja od 2,8 puta, naime udio sinapinske kiseline od 32,7 mg po kg suhe tvari klijanaca porastao je na 91,8 mg po kg suhe tvari. Ekstrakti gospine trave i koprive nisu uzrokovali značajno povećanje količine kempferola u klijancima pekinškog kupusa (sl. 21 A).

Tretmani klijanaca otopinama fenolnih spojeva nisu uzrokovali značajne promjene u količini sinapinske kiseline (sl. 21 B).



Slika 21. Utjecaj A) vodenih ekstrakata biljaka i B) fenolnih spojeva na količinu kavene kiseline u klijancima vrste *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*. H_2O = kontrolne biljke tretirane vodom, gt = vodeni ekstrakt gospine trave, kop = vodeni ekstrakt koprive, kad = vodeni ekstrakt kadulje. 0 = kontrolne biljke tretirane puferom, kempf = kempferol, isorh = izoramnetin, fer = ferulična kiselina, *p*-coum = *p*-kumarinska kiselina. *označava statistički značajnu vrijednost (*t*-test) pri P≤0,05 naspram kontrole (A = voda, B = pufer).

Iako postoji tendencija porasta količine svih identificiranih fenolnih spojeva u klijancima vrste *Brasica rapa* ssp. *pekinensis* nakon tretmana vodenim ekstraktima gospine trave, kadulje i koprive, taj porast kao i u slučaju tretmana fenolnim spojevima kempferolom, izoramnetinom, feruličnom i *p*-kumarinskom kiselinom statistički nije značajan (sl. 22 A i B).



Slika 22. Količina svih identificiranih fenolnih spojeva u klijancima vrste *Brasica rapa* ssp. *pekinensis* nakon tretmana: A) H_2O = kontrolne biljke tretirane vodom, gt = vodeni ekstrakt gospine trave, kop = vodeni ekstrakt koprive, kad = vodeni ekstrakt kadulje; B) 0 = kontrolne biljke tretirane puferom, kempf = kempferol, isorh = izoramnetin, fer = ferulična kiselina, *p*-coum = *p*-kumarinska kiselina. Testiranje statističke značajnosti provedeno je uz $P \leq 0,1$.

4. RASPRAVA

Šezdesetih godina prošlog stoljeća uspostavljena je tehnologija kulture biljnih stanica kao potencijalni „alat“ za istraživanje i proizvodnju biljnih sekundarnih metabolita (Bourgaud i sur. 2001). Danas je proučavanje ovih spojeva vrlo intenzivno zbog otkrića niza pozitivnih bioloških učinaka ovih spojeva u biljkama, kao i zbog činjenice da su važan izvor mnogih za čovjeka važnih farmaceutika (Bourgaud i sur. 2001.). Uz linije nediferenciranih staničnih kultura, istražuju se i kulture čupavog korijenja („*hairy roots*“) te ostalih tkiva kao potencijalne „tvornice“ biljnih sekundarnih metabolita. Osim na razini stanica i tkiva, povećanu razinu sekundarnih metabolita moguće je ostvariti i na razini organa, odnosno organizma i to se uglavnom postiže tretmanom biljaka nekim patogenom (Treutter 2005), antibiotikom (Hassan 2007), simbiotskim bakterijama (Mishra i sur. 2006) ili primjerice salicilnom kiselinom, signalnom molekulom stresa u biljaka (War i sur. 2011). Svrha ovog diplomskog rada bila je istražiti mogućnost primjene prirodnih biljnih ekstrakata ili pojedinačnih spojeva za povećanje količine fenolnih metabolita (glavne skupine antioksidanasa među biljnim sekundarnim metabolitima) u klijancima pekinškog kupusa. U tom smislu istražen je učinak biljnih ekstrakata gospine trave, koprive i kadulje, te flavonoida kempferola i izoramnetina, odnosno kiselina ferulične i *p*-kumarinske na sadržaj fenolnih spojeva u klijancima pekinškog kupusa, vrste vrlo zastupljene u čovjekovoj prehrani.

Rezultati su pokazali da, iako ekstrakt gospine trave sadrži veću količinu kempferola od ekstrakta kadulje, ipak je ekstrakt kadulje uzrokovao značajan porast količine ovog flavonoida u klijancima pekinškog kupusa, dok ekstrakt gospine trave nije (sl. 15 A). Pretpostavljam da je do ovakvog rezultata došlo zato što je ekstrakt kadulje, u odnosu na ekstrakt gospine trave, uzrokovao veći stres za klijance; klijanci su nakon tretmana kaduljom bili deformirani i manji nego nakon tretmana gospinom travom (sl. 7) pa je vjerojatno pojačana sinteza kempferola kao jedne od obrambenih molekula biljnog organizma. Uloga kempferola u obrani biljaka od stresa već je prije dokumentirana. Dokazano ja da kempferol ima antioksidativna svojstva (Yamasaki i sur. 1997; Shimoji i Yamasaki 2005), antifungalnu ulogu (Padmavati i sur. 1997), te ulogu u interakciji biljka-insekt (Burghardt i sur. 1997; Burghardt i sur. 2000; Burghardt i sur. 2001). Kempferol također ima funkciju u zaštiti biljaka od štetnih UV zraka koje uzrokuju stanična oštećenja. Primjerice, kumaroil derivati kempferola pokazali su daleko veću sposobnost apsorpcije UV-B valnih duljina od glikozida kvercetina (Strack i sur. 1988; Tattini i sur. 2007). Analogno mom rezultatu, Bajalan i sur. (2013) su objavili rezultate koji ukazuju na alelopatski učinak vodenog ekstrakta kadulje na klijanje sjemenki ječma (*Hordeum vulgare* L.) i prkosa (*Portulaca oleracea* L.).

U skladu s mojim očekivanjem ekstrakt gospine trave, koji inače kao dominantan flavonoid sadrži kvercetin (sl. 11 A), uzrokovao je značajan porast količine kvercetina u klijancima pekinškog kupusa (sl. 16 A). Pretpostavljam da su dva moguća razloga ovakvog učinka: prijenos i akumulacija kvercetina iz ekstrakta gospine trave u klijance i/ili stimulacija ekspresije gena *FLS* (flavonol-sintaza) za sintezu kvercetina u klijancima pekinškog kupusa.

Izoramnetin je u klijancima pekinškog kupusa zastupljen u znatno manjoj količini nego kempferol (sl. 10). Koncentracija izoramnetina nije bila promijenjena ni nakon jednog od primijenjenih tretmana; pretpostavljam da je to zato što je aktivnost enzima OMT (*O*-metil-transferaza) u klijancima pekinškog kupusa minimalna u odnosu na primjerice aktivnost FLS (sl. 4) i dodavanjem supstrata (kvercetina) njegova aktivnost i dalje nije bila povećana.

Među identificiranima, jedini spoj čija je koncentracija porasla i nakon tretmana jednim biljnim ekstraktom (konkretno kaduljom) i nakon tretmana jednim fenolnim spojem (*p*-kumarinskom kiselinom) je kavena kiselina. S obzirom da je u ekstraktu kadulje kavena kiselina dosta zastupljena (4.6 g/kg suhe mase), kao što se vidi na sl. 14, vjerojatno je došlo do apsorpcije ove kiseline iz ekstrakta u klijance. *p*-kumarinska kiselina je prekursor za sintezu kavene kiseline (sl. 4) i očito je njen dodatak potaknuo sintezu značajne količine kavene kiseline u klijancima.

Količina *p*-kumarinske kiseline nije značajno promijenjena nakon niti jednog od primijenjenih tretmana. Ovakav rezultat objašnjavam činjenicom da je *p*-kumarinska kiselina jedan od glavnih prekursora u sintezi flavonola i hidroksicimetnih kiselina (sl. 4) i u klijancima se vjerojatno vrlo brzo kemijski pretvara u fenilpropanoidne produkte.

Količina ferulične kiseline značajno je porasla samo nakon tretmana ekstraktom kadulje. S obzirom da ovaj ekstrakt u odnosu na one gospine trave i koprive sadrži znatno veću količinu ferulične kiseline i njenog neposrednog prekursora, kavene kiseline (sl. 4), ovakav rezultat je očekivan i u skladu s mojom pretpostavkom o mogućnosti transporta fenolnih tvari iz ekstrakta u klijance pekinškog kupusa. Također, s obzirom da tretman ekstraktom kadulje uzrokuje stres za klijance pekinškog kupusa, a ferulična kiselina među hidroksicimetnim kiselinama ima najbolji antioksidativni učinak (Sevgi i sur. 2015), pretpostavljam da je porast njene koncentracije ujedno i odgovor klijanaca spram stresa. Suprotno mojemu očekivanju, nakon tretmana feruličnom kiselinom nije zabilježena statistički značajno veća količina ove kiseline u klijancima. Pretpostavljam da učinkovitijem transportu ove kiseline iz ekstrakta doprinose određeni spojevi ekstrakta koji „olabavljuju“ stanične stijenke klijanaca i tako olakšavaju transport.

Tretman ekstraktom kadulje je značajno povećao i količinu sinapinske kiseline u klijancima. Najvjerojatniji razlog jest taj što ekstrakt kadulje sadrži znatno veću količinu ferulične kiseline od ostalih ekstrakata, a ona je prekursor hidroksiferulične kiseline iz koje se sintetizira sinapinska.

Sadržaj fenolnih spojeva u biljkama ovisi o mnogo faktora, primjerice stadiju razvoja biljke i okolišnim čimbenicima kao što su tip tla, izloženost sunčevim zrakama, količina padalina (Pandey i Rizvi 2009). Trenutno su aktualna istraživanja kojima se nastoji pronaći način kako povećati sadržaj fenolnih spojeva u biljkama (Karlund i sur. 2014; Antognani i sur. 2007; Lancaster i sur. 2000). Rezultati ovog rada ukazuju na mogućnost korištenja vodenih ekstrakata gospine trave za obogaćivanje klijanaca pekinškog kupusa flavonoidom kvercetinom. S obzirom da su za kvercetin zabilježeni brojni pozitivni biološki učinci (Alía i sur. 2006; Báidez i sur. 2006; Jullian i sur. 2007; Li i Xu 2008) obogaćivanje biljaka ovim flavonoidom moglo bi imati potencijal u proizvodnji biljnog materijala vrijednog za industrijsku primjenu (pr. poljoprivrednu, prehrambenu i farmaceutsku). Dodatna važnost ovog rezultata leži u činjenici da je ostvaren jednostavnom metodom koja ne predstavlja rizik za okoliš, kao što su to npr. metode genetskog inženjeringa kojima se stvaraju transgenične biljke, a koje su do sada obično korištene u kontekstu obogaćivanja biljaka određenim metabolitom (Connor 2015).

Također, rezultati ovog rada upućuju na daljnje istraživanje učinka ekstrakta gospine trave na fenolni profil pekinškog kupusa, prije svega u odraslim biljkama, te na istraživanje potencijalnog učinka ekstrakta gospine trave u zaštiti pekinškog kupusa od patogena.

5. ZAKLJUČAK

Glavni zaključci ovog diplomskog rada:

1.) Količina dominantnih flavonoida i fenolnih kiselina u vodenim ekstraktima gospine trave, koprive i kadulje nije se znatno promijenila 24 h nakon njihove pripreme.
2.) Među korištenim biljnim ekstraktima, onaj gospine trave sadrži značajno najveću koncentraciju kvercetina, dok onaj kadulje sadrži najveću koncentraciju kavene kiseline.
3.) Vodeni ekstrakt kadulje koncentracije 2.5g/dm^3 negativno je utjecao na rast i razvoj klijanaca pekinškog kupusa – klijanci su manji i deformirani u odnosu na kontrolnu skupinu.
4.) Dominantni flavonoid u klijancima pekinškog kupusa je kempferol. Zabilježene su i manje koncentracije kvercetina i izoramnetina.
5.) Vodeni ekstrakt gospine trave koncentracije 2.5g/dm^3 znatno je povećao količinu kvercetina u klijancima pekinškog kupusa.
6.) Vodeni ekstrakt kadulje koncentracije 2.5g/dm^3 znatno je povećao količinu kempferola, kavene, ferulične i sinapinske kiseline u klijancima pekinškog kupusa.
7.) Tretman *p*-kumarinskom kiselinom koncentracije 10μM (2.3g/dm^3) znatno je povećao koncentraciju kavene kiseline u klijancima pekinškog kupusa.
8.) Količina svih identificiranih fenolnih spojeva u klijancima pekinškog kupusa nije se značajno promijenila nakon niti jednog od ispitanih tretmana.

6. LITERATURA

Agati G., Azzarello E., Pollastri S., Tattini M. (2012): Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. Plant Science **196**: 67–76.

Aleksovski A., Savova H. (2007): Supercritical CO_2 exstraction of *Salvia officinalis* L. Journal of Supercritical Fluids **40**: 239-245.

Alía M., Mateos R., Ramos S., Lecumberii E., Bravo L., Goya L. (2006): Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). European Journal of Nutrition **45**: 19-28.

Báidez A. G., Gómez P., Del Río J. A., Ortuno A. (2006): Antifungal capacity of major phenolic compounds of *Olea europaea* L. against *Phytophthora megasperm*a Drechsler and *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten. Physiological and Molecular Plant Pathology **69**: 224-229.

Bajalan I., Zand M., Rezaee S. (2013): Allelopathic effects of aqueous extract from *Salvia officinalis* L. on seed germination of barley and purslane. International Journal of Agriculture and Crop Sciences **5**: 802-805.

Barnes J., Anderson L. A., Phillipson J. D. (2001): St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. Journal of Pharmacy and Pharmacology **53**: 583-600.

Bednarek P., Osbourn A. (2009): Plant-microbe interactions: Chemical diversity in plant defense. Science **324**: 746-748.

Berghöfer R., Hölzl J. (1987): Biflavonoids in *Hypericum perforatum*; Part 1. Isolation of I3, II8-biapigenin. *Planta Medica* **53**:216-217.

Berghöfer R., Hölzl J. (1989): Isolation of I3', II8-biapigenin (amentoflavone) from *Hypericum perforatum.* Planta Medica **55**:91.

Björkman M., Klingen I., Birch A. N. E., Bones A. M., Bruce T. J. A., Johansen T. J., Meadow R., Mølmann J., Seljåsen R., Smart L. E., Stewart D. (2011): Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health – Influences of climate, environment and agronomic practice. Phytochemistry **72**: 538-556.

Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. (2001): Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science **161**: 839-851.

Burghardt F., Fiedler K., Proksch, P. (1997): Uptake of flavonoids from *Vicia villosa* (*Fabaceae*) by the Lycaenid Butterfly, *Polyommatus icarus* (*Lepidoptera*: *Lycaenidae*). Biochemical Systematics and Ecology **25**: 527-531.

Burghardt F., Knüttel H., Becker M., Fiedler K., (2000): Flavonoid wing pigments increase attractiveness of female common blue (*Polyommatus icarus*) butterflies to mate-searching males. Naturwissenschaften **87**: 304-307.

Burghardt F., Proksch P., Fielder K. (2001): Flavonoid sequestration by the common blue butterfly *Polyommatus icarus*: quantitative intraspecific variation in relation to larval hostplant, sex and body size. Biochemical Systematics and Ecology **29**: 875.889.

Byers T., Perry G. (1992): Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. Annual Review of Nutrition **12**: 139-159.

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

Cartea M. E., Francisco M., Soengas P., Velasco P. (2011): Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. Molecules **16**: 251-280.

Connor S. E. (2015): Engineering of secondary metabolism. Annual Review of Genetics **49**: 71-94.

Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J. P., Cimanga K., Van Poel B., Pieters L., Vlietinck A. J., Vanden Berghe D. (1998): Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. Journal of Natural Products **61**: 71-76.

Das S., Tyagi A. K., Kaur H. (2000): Cancer modulation by glucosinolates: a review. Current Science **79**: 1665-1671.

Dewick P. M. (2007): Medicinal natural products: A biosynthetic approach. 2. izd, John Wuley & Sons Ltd., West Sussex, Engleska.

Dixon R. A., Xie D. Y., Sharma S. B. (2005): Proanthocyanidins—a final frontier in flavonoid research? New Phytologist **165**:9–28.

Dorossiev I. (1985): Determination of flavonoids in *Hypericum perforatum*. Pharmazie **40**: 585-586.

Elliott A. J., Scheiber S. A., Thomas C., Pardini R. S. (1992): Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. Biochemical Pharmacology **44**: 1603-8.

Erlejman A. G., Verstraeten S. V., Fraga C. G., Oteiza P. I. (2004): The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects. Free Radical Research **38**: 1311–1320.

Fernandes F., Valentao P., Sousa C., Pereira J. A., Seabra R. M., Andrade P. B. (2007): Chemical and antioxidative assessment of dietary turnip (*Brassica rapa* var. *rapa* L.). Food Chemistry **105**: 1003-1010.

Ferrali M., Signorini C., Caciotti B., Sugherini L., Ciccoli L., Giachetti D., Comporti M. (1997): Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. Federation of European Biochemical Societies **416**: 123-129.

Ferreres F., Valentao P., Pereira J. A., Bento A., Noites A., Seabra R. M., Andrade P. B. (2008): HPLC-DAD-MS/MS-ESI screening of phenolic compounds in *Pieris brassicae* L. reared on *Brassica rapa* var. *rapa* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**: 844-853.

Francisco M., Moreno D. A., Cartea M. E., Ferreres F., Garcia-Viguera C., Velasco P. (2009): Simultaneous identification of glucosinolates and phenolic compounds in a representative collection of vegetable *Brassica rapa*. Journal of Chromatography **1216**: 6611-6619.

Hall A. E., Fiebig A., Preuss D. (2002): Beyond the Arabidopsis genome: opportunities for comparative genomics. Plant Physiology **129**: 1439-47.

Harbaum B., Hubbermann E. M., Wolff C., Herges R., Zhu Z., Schwarz K. (2007): Identification of flavonolds and hydroxycinnamic acids in pak choi varieties (*Brassica campestris* L. ssp *chinensis* var. *communis*) by HPLC-ESI-MSn and NMR and their quantification by HPLC DAD. Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**: 8251-8260.

Harbaum B., Hubbermann E. M., Zhu Z. J., Schwarz K. (2008): Free and bound phenolic compounds in leaves of pak choi (*Brassica campestris* L. ssp *chinensis* var. *communis*) and Chinese leaf mustard (*Brassica juncea* Coss). Food Chemistry **110**: 838-846.

Harborne J. B. (1999): Classes and functions of secondary products. U: Walton N. J., Brown D. E. (ur.) Chemicals from Plants, Perspectives on Secondary Plant Products. Imperial College Press, str. 1-25.

Hassan A. M. A. (2007): Induction of phenolic compounds in wheat (*Triticum aestivum* L.) tissue Cultures by streptomycin. Zeitschrift für Naturforschung **62**: 50-54.

Hoelzl J., Ostrowski E. (1987): St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) HPLC analysis of the main components and their variability in a population. Deutsche Apotheker Zeitung **127**: 1227-1230.

Jansen M. A. K. (2002); Ultraviolet-B radiation effects on plants: induction of morphogenic responses. Physiologia Plantarum **116**: 423–429.

Jullian C., Moyano L., Yanez C., Olea-Azar C. (2007): Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: an antioxidant study. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy **67**: 230-234

Jung H. J., Manoharan R. K., Park J. I., Chung M. Y., Lee J., Lim Y. P., Hur Y. K. Nou, I. S. (2014): Identification of yellow pigmentation genes in *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* using Br300 microarray. International Journal of Genomics **2014**: 1-11.

Kamatou P., Viljoe A., Steenkamp P. (2010): Antioxidant, anti-inflammatory activities ad HPLC analysis of South African *Salvia* species. Food Chemistry **119**: 684-688.

Karlund A., Salminen J. P., Koskinen P., Ahern J. R., Karonen M., Tiilikkala K., Karjalainen R. O. (2014): Polyphenols in strawberry (Fragaria × ananassa) leaves induced by plant activators. Journal of Agricultural and Food Chemistry **62** :4592-600.

Kazazić S. P. (2004): Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju **55**: 279-290.

Kliebenstein D. J., Osbourn A. (2012): Making new molecules – evolution of pathways for Novel metabolites in plants. Current Opinionin Plant Biology **15**: 415-23.

Koch M. (2003): Molecular phylogenetics, evolution and population biology in Brassicaceae. U: Sharma A.K., Sharma A., (ur.) Plant genome: biodiversity and evolution. Volume 1. Phanerograms. Enfield, NH: Science Publishers, str. 1-35.

Koch M., Mummenhoff K. (2006): Evolution and phylogeny of the Brassicaceae. Plant Systematics and Evolution **259**: 81-83.

Kuhn B. H., Geisler M., Bigler L, Ringli C. (2011): Flavonols accumulate asymmetrically and affect auxin transport in *Arabidopsis*. Plant Physiology **156**: 585–595.

Kumar S., Pandey A. K. (2013): Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. The Scientific World Journal **2013**: 1-16.

Kutchan T. M., Gershenzon J., Lindberg Møller B., Gang D. R. (2015): Phenolic compounds. U: Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L. (ur.) Biochemistry & molecular biology of plants. John Wiley and Sons Ltd., str. 1178-1206.

Li M., Xu Z. (2008): Quercetin in a lotus leaves extract may be responsible for antibacterial activity. Archives of Pharmacal Research **31**: 640-644.

Ma X. J., Xiao P. G. (1990): Advance on the research of *Hypericum perforatum*. World Phytomedicines **5**: 150-154.

Martinez-Sanchez A., Gil-Izquierdo A., Gil M. I., Ferreres F. (2008): A comparative study of flavonoid compounds, vitamin C, and antioxidant properties of baby leaf *Brassicaceae* species. Journal of the Science of Food and Agriculture **56**: 2330-2340.

Mathesius U. (2001): Flavonoids induced in cells undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidase. Journal of Experimental Botany **52**: 419–426.

Mishra R. P., Singh R. K., Jaiswal H. K., Kumar V., Maurya S. (2006): Rhizobium-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). Current Microbiology **52**: 383-389.

Naoumkina M., Dixon R. A. (2008): Subcellular localization of flavonoid natural products. Plant Signaling and Behavior **3**: 573–575.

Nielsen J. K., Norbaek R., Olsen C. E. (1998): Kaempferol tetraglucosides from cabbage leaves. Phytochemistry **49**: 2171-2176.

Ollivier B., Balansard G., Maillard O., Vidal E. (1985): Separation et identification des acides phenols per chromatographie liquide haute performance et spectroscopie ultra-violette. Application à la Pariétaire (*Parietaria officinalis* L.) et au Millepertuis (*Hypericum perforatum* L.). Journal de pharmacie de Belgique **40**: 173–177.

Otles S., Yalcin B. (2012): Phenolic compounds analysis of root, stalk, and leaves of nettle. Scientific World Journal **2012**: 564367.

Padmavati M., Sakyhivel N., Thara K. V., Reddy A. R. (1997): Differential sensitivity of rice pathogens to growth-inhibition by flavonoids. Phytochemistry **46** : 499-502.

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

Pérez-Gregorio M. R., Regueiro J., Barreiro C. G., Otero R. R., Gándara J. S. (2011): Changes in antioxidant flavonoids during freeze-drying of red onions and subsequent storage. Food Control **22**: 1108–1113.

Pinelli P., Ieri F., Vignolini P., Bacci L., Baronti S., Romani A. (2008): Extraction and HPLC analysis of phenolic compounds in leaves, stalks, and textile fibers of *Urtica dioica* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**: 9127–9132.

Podsedek A. (2007): Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables. Food Science and Technology **40**: 1–11.

Robards K., Prenzler P. D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. (1999): Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chemistry **66**: 401-436.

Romani A., Vignolini P., Isolani L., Ieri F., Heimler D. (2006): HPLC-DAD/MS characterization of flavonoids and hydroxycinnamic derivatives in turnip tops (*Brassica rapa* L. subsp *sylvestris* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**: 1342-1346.

Saslowsky D. E., Warek U., Winkel B. S. J. (2005): Nuclear localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis*. Journal of Biological Chemistry **280**: 23735–23740.

Sevgi K., Tepe B., Sarikurkcu C. (2015): Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. Food and Chemical Toxicology **77**: 12-21.

Shimoji H., Yamasaki H. (2005): Inhibitory effects of flavonoids on alternative respiration of plant mitochondria. Biologia Plantarum **49**: 117-119.

Strack D., Heilemann J., Momken M., Wray V. (1988): Cell-wall conjugated phenolics from coniferae leaves. Phytochemistry **27**: 3517– 3521.

Swain T., Harborne J. B., Sumere C. F. (1979): Biochemistry of plant phenolics: recent advances in phytochemistry. Plenum Press, New York.

Taylor L. P., Grotewold E.(2005): Flavonoids as developmental regulators. Current Opinion in Plant Biology **8**: 317–323.

Tattini M., Galardi C., Pinelli P., Massai R., Remorini D., Agati G. (2004): Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. The New Phytologist **163**: 547–561.

Tattini M., Matteini P., Saracini E., Traversi M. L., Giordano C., Agati G. (2007): Morphology and biochemistry of non-glandular trichomes in *Cistus salvifolius* L. leaves growing in extreme habitats of the Mediterranean basin. Plant Biology **9**: 411– 419.

Traka M., Mithen R. (2009): Glucosinolates, isothiocyanates and human health. Phytochemistry **8**: 269–282.

Treutter D. (2005): Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. Plant Biology **7**: 581-591.

Tsao R. (2010): Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, **2**: 1231-1246.

Vallejo F., Tomas-Barberan F. A., Garcia-Viguera C. (2002): Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain. Journal of the Science of Food and Agriculture **82**: 1293-1297.

War A. R., Paulraj M. G., War M. Y., Ignacimuthu S. (2011): Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Signaling & Behavior **6**: 1787–1792.

Warwick S. I., Ardath F., Al-Shehbaz I. A. (2006): Brassicaceae: species checklist and database on CD-Rom. Plant Systematics and Evolution **259**: 249–258.

Wink M. (1988): Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. Theoretical and Applied Genetics **75**: 225-233.

William C. A., Grayer R. J. (2004): Anthocyanins and other flavonoids. Natural Products Report **21**: 539-573.

Yamasaki H., Sakihama Y., lkehara N. (1997): Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H_2O_2. Plant Physiology **115**: 1405-1412.

Zou Y., Lu Y., Wei D. (2004): Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**: 5032−5039.

7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 15. veljače 1989. godine u Sarajevu. Svoje obrazovanje započela sam 1995. godine u Osnovnoj školi Domovinske zahvalnosti u Kninu. Nakon što sam 2003. godine završila osnovnu školu, upisala sam jezičnu gimnaziju Lovre Montija u Kninu.

Nakon završene srednje škole, 2008. godine upisujem Studienkolleg, a zatim i prvu godinu biologije na Ludwig-Maximilians-Universität u Münchenu. Godine 2011. se prebacujem na Preddiplomski sveučilišni studij biologije; smjer znanstveni na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, kojeg 2014. godine završavam. Nakon završenog preddiplomskog studija, iste godine upisala sam Diplomski sveučilišni studij Eksperimentalna biologija modul Botanika na istom fakultetu.