

# Utjecaj fotoperioda na antioksidacijsku aktivnost industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*)

---

Vicić, Antonia

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:135434>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Odjel za kemiju  
Diplomski sveučilišni studij Kemija; smjer: nastavnički

Antonia Vicić

**UTJECAJ FOTOPERIODA NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST  
INDUSTRIJSKE KONOPLJE (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*)**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Odjel za kemiju  
Diplomski sveučilišni studij Kemija; smjer: nastavnički

Antonia Vicić

**UTJECAJ FOTOPERIODA NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST  
INDUSTRIJSKE KONOPLJE (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*)**

Diplomski rad

Mentorica: doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Komentorica: doc. dr. sc. Selma Mlinarić

Osijek, 2022.

**Ovaj diplomski rad izrađen je na Odjelu za kemiju i Odjelu za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku pod vodstvom doc. dr. sc. Martine Šrajer Gajdošik i doc. dr. sc. Selme Mlinarić. Rad je predan stručnom vijeću na ocjenu radi stjecanja diplome magistra edukacije iz područja kemije.**

## **Zahvale**

*Želim zahvaliti svojoj mentorici, budućoj profesorici Odjela za kemiju, Martini Šrajer Gajdošik što mi je na trećoj godini približila biokemiju i što je prihvatila biti moja mentorica. Hvala mojoj komentorici, doc. dr. sc. Selmi Mlinarić s Odjela za biologiju, koja je imala razumijevanja i strpljenja sa mnom u labosu. Hvala Vam objema na pruženoj prilici, zanimljivom iskustvu, vodstvu, savjetima, projektima i što ste mi dali priliku da rastem u svakom smislu. Hvala Vam što ste bile otvorene za komunikaciju i što ste imale razumijevanja za mene. Hvala pročelnici Elviri Kovač – Andrić što nas je vodila kroz školske klupe i trenirala da budemo najbolji nastavnici. Hvala što ste stvorili pozitivno okruženje i što ste bili otvoreni za naše prijedloge. Hvala mojim kolegicama i kolegama s faksa zbog kojih je na messengeru uvijek pisalo +100 poruka. Hvala vam što smo bili tu jedni za druge i što smo zajedno bdjeli noćima da budemo danas tu gdje jesmo. Hvala vam za nezaboravne trenutke u labosu i predavanjima jer to ne bi bilo pravo studiranje bez vas. Hvala mojoj najboljoj prijateljici Marini koja je bila tu za mene u teškim i lijepim trenucima, ali što je isto tako imala razumijevanja kada bi se izlazak propustio zbog ispita. Hvala joj što mi je uljepšala vrijeme u vožnji busom i čekanje busa na kolodvoru. Hvala mojoj sljedećoj najboljoj prijateljici Renati koja me ohrabivala i držala uvijek moju stranu. Hvala joj za sve glasovne poruke i jedva čekam njenu obranu. Najviše hvala mojoj obitelji... obitelji koja je uvijek bila uz mene i financijski i moralno, koja nikad nije imala ni gram sumnje da ja nešto ne mogu. Hvala im što su sve moje izbore dočekivali raširenih ruku i što ih nisu dovodili u pitanje. Hvala mojoj baki što se uvijek hvalila susjedima kako sam najbolji student iako to nije uvijek bilo tako. Hvala mojem budućem mužu Franu koji je uspješno tolerirao moja razna stanja tijekom faksa. Nadam se da će i dalje... Hvala mu što je svaki stres izbrisao samo svojom pojavom i najboljim humorom na svijetu. Hvala mu što smo zajedno prošli studentske dane i što smo bili tu jedno za drugo. Na kraju, hvala dragom Bogu, jer sada shvaćam zašto sam ovdje, a ne negdje drugdje.*

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**Diplomski rad**

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

**Odjel za kemiju**

**Diplomski sveučilišni studij Kemija; smjer: nastavnički**

**Znanstveno područje: Prirodne znanosti**

**Znanstveno polje: Kemija**

**UTJECAJ FOTOPERIODA NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST  
INDUSTRIJSKE KONOPLJE (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*)**

**Antonia Vicić**

**Rad je izrađen na:** Odjelu za kemiju i Odjelu za biologiju Sveučilišta Josip Jurja Strossmayer u Osijeku

**Mentorica:** doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

**Komentorica:** doc. dr. sc. Selma Mlinarić

**SAŽETAK**

Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*) je prilagodljiva biljka koja se iz Azije raširila po cijelom svijetu. Nutritivna svojstva duguje svom sastavu u koji ulaze ugljikohidrati, proteini, masti, minerali, vitamini i antioksidansi zbog čega se sve više koristi u ljudskoj prehrani. U ovom radu je ispitan utjecaj različitih fotoperioda na antioksidativnu aktivnost industrijske konoplje kultivara Finola. Veći sadržaj ukupnih topljivih polifenola, antioksidativne aktivnost i celuloze uočeni su u uzorcima uzgajanim na fotoperiodu 20/4 dok je veći sadržaj produkata lipidne peroksidacije, askorbinske kiselina i proteina izmjeren u uzorcima uzgajanim na fotoperiodu 24/0. Fotoperiod 16/8 se pokazao kao najpovoljniji omjer osvjetljenja i tame za učinkovite fotokemijske reakcije. Dobiveni rezultati upućuju kako duljina svjetlosti ima značajan utjecaj na antioksidacijski odgovor industrijske konoplje.

**Diplomski rad obuhvaća:** Stranica: 53; Slika: 26 ; Tablica: 1, Literaturnih navoda: 79

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** industrijska konoplja, antioksidativni odgovor, fotoperiod, antioksidativna aktivnost, polifenoli

**Rad prihvaćen:** 12.10.2022.

**Datum obrane:** 19.10.2022.

**Sastav povjerenstva za obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Elvira Kovač-Andrić, predsjednica
2. doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, mentorica i članica
3. doc. dr. sc. Selma Mlinarić, komentorica i članica
4. doc.dr.sc. Lidija Begović, zamjena člana

**Rad je pohranjen:** u knjižnici Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, 31 000 Osijek

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Master thesis**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**

**Department of Chemistry**

**Graduate University Study of Chemistry; educational programme**

**Scientific Area: Natural Sciences**

**Scientific Field: Chemistry**

**THE EFFECT OF PHOTOPERIOD ON THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF  
INDUSTRIAL HEMP (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*)**

**Antonia Vicić**

**Thesis completed at: Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**

**Supervisor: Martina Šrajer Gajdošik, Ph. D., assistant prof.; Selma Mlinarić, Ph. D., assistant prof.**

**ABSTRACT**

Industrial hemp (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*) is an adaptable plant that has spread throughout the world from Asia. It owes its nutritional properties to its composition, which includes carbohydrates, proteins, fats, minerals, vitamins and antioxidants, which is why it is used more and more in human nutrition. This study examined the effect of different photoperiods on the antioxidant activity of industrial hemp cultivar Finola. Higher content of total soluble polyphenols, antioxidant activity and cellulose were observed in samples grown on photoperiod 20/4, while higher content of lipid peroxidation products, ascorbic acid and protein was measured in samples grown on photoperiod 24/0. Photoperiod 16/8 was proven to be the most favorable light-dark ratio for efficient photochemical reactions. The obtained results indicate that the length light has significant influence on the antioxidant response of industrial hemp.

**Thesis includes:** pages: 53; pictures: 26; tables: 1, references: 79

**Original in:** Croatian

**Keywords:** industrial hemp, antioxidant response, photoperiod, antioxidant activity, polyphenols

**Thesis accepted:** 12.10.2022.

**Thesis defence:** 19.10.2022.

**Reviewers:**

1. Assoc. Prof. Elvira Kovač-Andrić, Ph. D., chair
2. Assist. Prof. Martina Šrajer Gajdošik, Ph. D., supervisor and member
3. Assist. Prof. Selma Mlinarić, Ph. D., co-supervisor and member
4. Assist. Prof. Lidija Begović, Ph. D., substitute member

**Thesis deposited in:** Department of Chemistry library, Franje Kuhača 20, 31 000 Osijek

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1 Industrijska konoplja</b> .....	<b>2</b>
<b>2.2 Antioksidansi</b> .....	<b>3</b>
<b>2.3. Antioksidativna aktivnost/kapacitet</b> .....	<b>6</b>
2.3.1. FRAP .....	6
2.3.2. Folin – Ciocalteu metoda .....	7
2.3.3. DPPH .....	8
<b>2.4. Fotosinteza</b> .....	<b>9</b>
<b>2.5. Fotoperiod</b> .....	<b>10</b>
<b>2.5. Tipovi svjetla za uzgoj</b> .....	<b>11</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1 Kemikalije</b> .....	<b>13</b>
<b>3.2. Biljni materijal i uzgoj</b> .....	<b>14</b>
<b>3.3. Mjerenje fotosintetske učinkovitosti klorofila a</b> .....	<b>16</b>
<b>3.4. Određivanje sadržaja askorbinske kiseline</b> .....	<b>17</b>
<b>3.5. Mjerenje koncentracije produkata lipidne peroksidacije</b> .....	<b>18</b>
<b>3.6. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata</b> .....	<b>18</b>
<b>3.7. Određivanje koncentracije proteina</b> .....	<b>18</b>
<b>3.8. Određivanje sadržaja ukupnih topljivih polifenola</b> .....	<b>19</b>
<b>3.9. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti</b> .....	<b>19</b>
3.9.1. DPPH metoda .....	19
3.9.2. FRAP metoda .....	20
<b>3.10. Određivanje udjela suhe tvari</b> .....	<b>20</b>
<b>3.11. Određivanje količine celuloze</b> .....	<b>20</b>
<b>3.12. Statistička obrada podataka</b> .....	<b>21</b>



<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>22</b>
4.1. Mjerenje koncentracije produkata lipidne peroksidacije.....	22
4.2. Ukupna antioksidativna aktivnost.....	22
4.2.1. Ukupna antioksidativna aktivnost određena DPPH metodom .....	22
4.2.2. Ukupna antioksidativna aktivnost određena FRAP metodom .....	23
4.3. Određivanje sadržaja ukupnih topljivih polifenola.....	24
4.4. Određivanje sadržaja askorbinske kiseline.....	24
4.5. Određivanje koncentracije karotenoida .....	25
4.6. Određivanje sadržaja celuloza.....	26
4.7. Određivanje koncentracije proteina .....	26
4.8. Udio suhe tvari .....	27
4.9. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata.....	27
4.10. Mjerenje fotosintetske učinkovitosti .....	28
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>32</b>
<b>6. METODIČKA OBRADA NASTAVNE JEDINICE</b> .....	<b>37</b>
6.1. Priprema za nastavni sat.....	37
6.2. Struktura nastavnog sata .....	38
6.3. Plan učeničkog zapisa .....	40
6.4. Radni listić .....	41
6.4.1. Radni listić 1. – Amidi.....	41
6.4.2. Kviz – Vitamini .....	41
6.4.3. Očekivani odgovori na listić 1. – Amidi.....	42
6.4.4. Očekivani odgovori na kviz – Vitamini.....	43
<b>7. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>46</b>
<b>8. LITERATURA</b> .....	<b>47</b>
<b>9. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>53</b>

## 1.UVOD

Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*) je drevna azijska biljka prepoznatljiva po svojim karakterističnim listovima, a od njenih usjeva mogu se dobiti različiti prehrambeni i građevinski proizvodi. Uzgaja se već stoljećima, a danas je pod povećalom brojnih znanstvenika i istraživanja. Konoplja predstavlja izvor ugljikohidrata, proteina, esencijalnih aminokiselina, vlakana, minerala, vitamina i masnih kiselina te antioksidansa poput polifenola. Antioksidansi imaju važnu ulogu u smanjenju ili prevenciji oksidativnog stresa. Oksidativni stres je posljedica nastanka slobodnih radikala, reaktivnih vrsta odgovornih za oštećenja stanica u organizmu uzrokujući starenje i pomažući u nastanku bolesti. Biljke se konstantno prilagođavaju količini svjetlosti, vode i hranjivim tvarima čije promjene mogu izazvati oksidacijski stres. Biološki procesi poput razvoja i cvjetanja su regulirani pomoću fotoperiode. Fotoperioda predstavlja količinu svjetlosti i tame tijekom 24-satnog ciklusa. Danas se biljke uglavnom uzgajaju u kontroliranim uvjetima i staklenicima upotrebom LED lampi koje emitiraju svjetlost različitog intenziteta i kvalitete važne za procese fotosinteze.

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti utjecaj tri različita fotoperioda na antioksidacijsku aktivnost industrijske konoplje kultivara Finola mjerenjem koncentracije fotosintetskih pigmentata, proteina, produkta lipidne peroksidacije, sadržaja polifenola, celuloze i udjela suhe tvari te određivanje fotosintetske učinkovitosti.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1 Industrijska konoplja

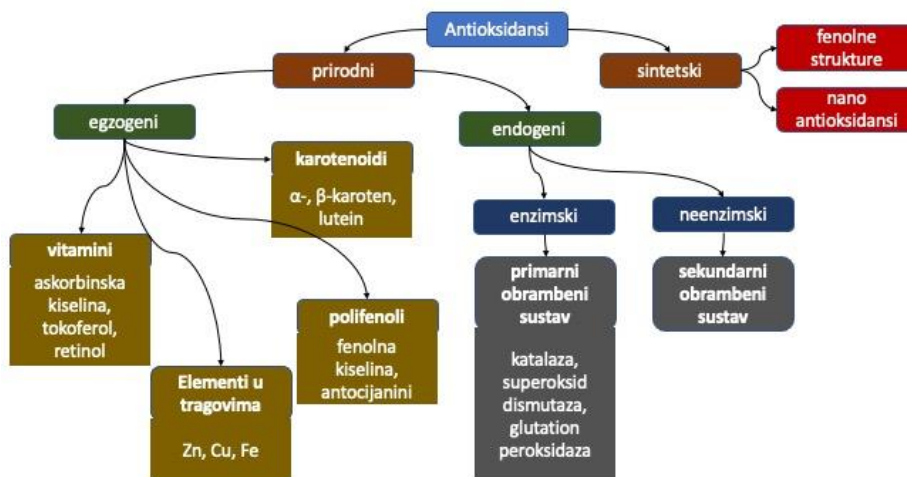
*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa* (slika 1) je dvodomna jednogodišnja kritosjemenjača koja se svrstava u porodicu konoplji (lat. *Cannabaceae*) [1], a porijeklom je iz Azije. Uspravna stabljika nosi listove složene od dugih i utanjenih liski koje su prstasto razdijeljene. Konoplja je dvodomna vrsta te se razlikuju muške i ženske biljke. Ženske biljke imaju brojnije i veće neugledne cvjetove koji su grupirani u klasove, dok muške biljke imaju cvat u obliku metlice te su manji, a plodovi su jednosjemeni, sitni oraščići. Žlijezde sa ekskretima se nalaze na dijelovima cvjetova te su bogate trijeslovinama, smolastim tvarima, alkaloidima, itd. [2]. Većina znanstvenika tvrdi kako postoji samo jedna vrsta konoplje, a to je *C. sativa*. Tijekom 1970.-tih ta vrsta dobiva dvije podvrste: subsp. *indica* i subsp. *sativa*. Ove dvije podvrste se razlikuju prema udjelu psihoaktivnog spoja delta-9-tetrahidrokanabinola (THC) kojeg sadrže. Podvrsta *sativa* sadrži vrlo niske količine THC-a u odnosu na podvrstu *indica*. Podvrste imaju nekoliko varijeteta: var. *sativa* i var. *spontanea* (subsp. *sativa*), var. *indica* i var. *kafiristanica* (subsp. *indica*). Međutim, danas su sve više zastupljeni hibridi konoplje [3]. Uzgoj konoplje započeo je u Kini 2700. godina prije Krista gdje se uzgajala zbog svojih ljekovitih svojstava, u proizvodnji odjeće, za duhovne obrede i hranu [3,4]. Ubrzo se njezin uzgoj proširio po cijeloj Aziji, a prije 2000 godina i u Europi. Smatra se jednom od najstarijih kultiviranih biljaka koja sadrži različite spojeve kao što su kanabinoidi, flavonoidi, terpenoidi, alkaloidi i dr. [3,5].



Slika 1. *Cannabis sativa* L. subsp. *sativa* [6].

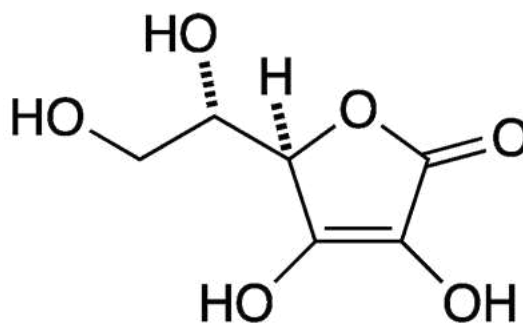
## 2.2 Antioksidansi

Antioksidansi su molekule koje štite organizam sprječavajući oksidaciju bioloških molekula. Reakcijom oksidacije dolazi do prijenosa elektrona s jedne molekule na drugu što dovodi do nastanka slobodnih radikala. Slobodni radikali sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u valentnoj ljusci što ih čini izrazito reaktivnima [7]. Najreaktivnija vrsta je hidroksilni radikal koji nastaje vezanjem tri elektrona na molekulu kisika. Postoje i ostale reaktivne vrste s kisikom (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*), dušikom (RNS, engl. *Reactive Nitrogen Species*) i kloridom RCS (engl. *Reactive Chlorine Species*). Postoje također i neradikalske vrste koje se lako mogu pretvoriti u formu radikala. RNS/ROS mogu nastati djelovanjem oksidacijskog metabolizma gdje su važni u regulaciji genske ekspresije, apoptoze, stanične proliferacije, itd. Mogu također nastati djelovanjem vanjskih utjecaja kao što je rendgensko zračenje, kemikalije, ozon, onečišćenje zraka, pušenje i slično. Zbog toga, u organizmu postoji ravnoteža između proizvodnje reaktivnih vrsta i obrambenog sustava čija neravnoteža može dovesti do nastajanja oksidativnog stresa. Takvo stanje dovodi do nestabilnosti u staničnim strukturama što može izazvati oštećenja proteina, DNA, ugljikohidrata i lipida. Slobodni radikali se mogu u organizmu nakupljati godinama te uzrokovati različita oboljenja: neurodegenerativne bolesti (ateroskleroza, mišićna distrofija, Alzheimerova i Parkinsonova bolest), tumore, hipertenziju i starenje. Oksidativni stres može biti posljedica nemogućnosti aktivacije enzima s antioksidativnom aktivnošću, nedostatkom antioksidansa i prevelikom proizvodnjom ROS. Zbog toga, obrambeni sustav u organizmu proizvodi ili unosi antioksidanse (hranom) koji reagiraju sa slobodnim radikalima. Oni mogu spriječiti nastanak novih radikala, suzbiti djelovanje nastalih radikala i smanjiti štetu uzrokovanu njihovim djelovanjem [8]. Životinje i biljke u svom organizmu sadrže različite antioksidanse kao što su vitamin E i C, ali i enzime katalazu, superoksid-dismutazu i ostale različite peroksidaze s antioksidacijskim djelovanjem. Antioksidansi se mogu podijeliti u dvije velike skupine: prirodne i sintetske (slika 2) [7,8].



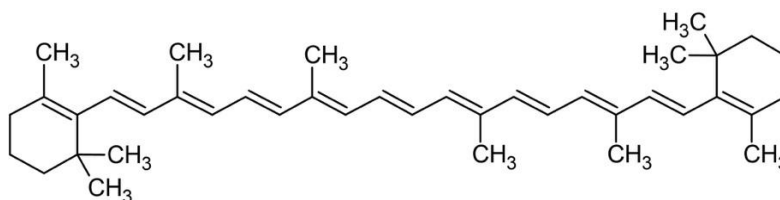
Slika 2. Klasifikacija antioksidansa. Preuzeto i prilagođeno iz [8].

Vitamin C je vitamin dobro topljiv u vodi i poznat još pod nazivom askorbinska kiselina. Nalazi se u povrću, citrusnom voću, ribi i sličnim namirnicama, a njegova struktura prikazana je slikom 3. Koristan je u obrani DNA od slobodnih radikala što doprinosi sprječavanju nastanka raka, artritisa i starenja [7]. Tokoferoksilni radikal vitamina E se obnavlja pomoću vitamina C i na taj način ponovno djeluje kao antioksidans. Također, vitamin C specifično donira elektrone enzimima koji sudjeluju u biosintezi karnitina, kolagena, noradrenalina, metabolizmu tirozina i amidaciji peptidnih hormona.



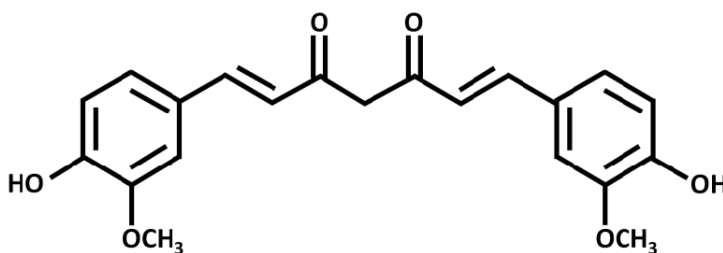
Slika 3. Struktura vitamina C [23].

Karotenoidi predstavljaju veliku skupinu prirodnih pigmenata u koje ubrajamo: zeaksantin, lutein, likopen, i  $\beta$ -karoten (slika 4). Nalaze se u povrću i voću te su dobro topivi u mastima. Zbog toga što su lipofilni, nakupljaju se u lipoproteinima i membranama. Karotenoidi hvataju peroksilne i kisikove radikale te na taj način štite biljke od posljedica oksidativnog stresa. Imaju veliku ulogu u zaštiti retine i prevenciji ateroskleroze što ih čini važnim antioksidansima [7,9].



Slika 4. Struktura  $\beta$ -karotena [24].

Polifenoli pripadaju skupini fitokemikalija čija antioksidativna aktivnost ovisi o njihovim fizikalnim i kemijskim svojstvima. U ovu skupinu se svrstavaju kurkumin (slika 5), gingerol, flavonoidi i fenolna kiselina [7]. Polifenoli su proučavani zbog njihove sposobnosti u borbi protiv oksidativnog stresa i sprječavanju nastanka raka, dijabetesa, neurodegenerativnih bolesti, kardiovaskularne bolesti, itd. Mogu prekinuti reakciju slobodnih radikala te suzbiti njihovo formiranje [10].



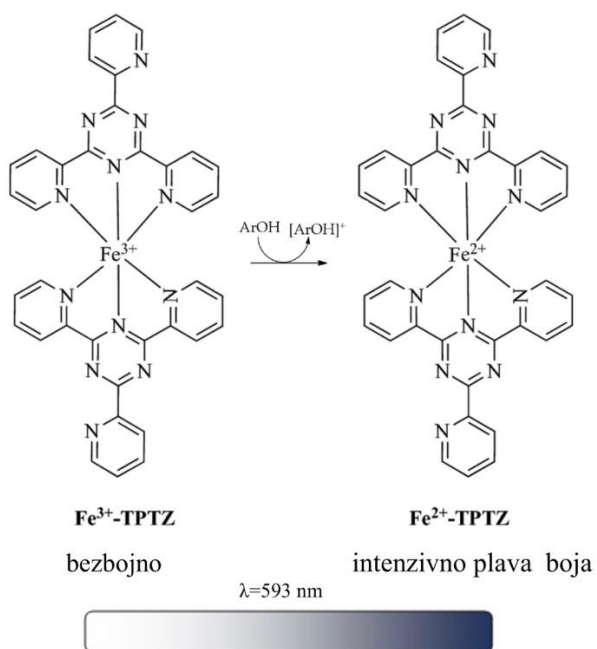
Slika 5. Struktura kurkumina [25].

### 2.3. Antioksidativna aktivnost/kapacitet

Antioksidativna aktivnost je sposobnost inhibiranja reakcija oksidacije. Ovaj pojam se povezuje s kinetikom antioksidativnog djelovanja pri uklanjanju slobodnih radikala [11]. Često se izražava kao postotak „hvatanja“ slobodnih radikala ili brzina reakcije u jedinici vremena. Antioksidativni kapacitet predstavlja termodinamičku učinkovitost kojom antioksidansi reagiraju sa slobodnim radikalima, npr. broj molova slobodnih radikala koje ukloni 1 mol antioksidansa u određenom vremenskom intervalu [12]. S obzirom na kojoj vrsti reakcija se temelje, kemijske analize za određivanje antioksidativne aktivnosti dijele se u dvije skupine: reakcije prijenosa jednog elektrona (SET, engl. *Single Electron Transfer*) i reakcije prijenosa atoma vodika (HAT, engl. *Hydrogen Atom Transfer*). Analize koje se temelje na prijenosu atoma vodika su ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorption Capacity*), HORAC (engl. *Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity*), TRAP (engl. *Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Parameter*), TOSC (engl. *Total Oxyradical Scavenging Capacity*) dok su CUPRAC (engl. *Cupric Reducing Antioxidant Power*), FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*), Folin - Ciocalteu metoda temeljene na prijenosu elektrona. Također postoje metode koje mogu koristiti oba tipa reakcija (prijenos atoma vodika i prijenos elektrona): ABTS (engl. *2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*) test i DPPH (engl. *2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl*) [13].

#### 2.3.1. FRAP

FRAP metoda se temelji na redukciji željezovog kompleksa iz  $Fe^{3+}$  u  $Fe^{2+}$  zbog čega nastaje intenzivno plavo obojenje (slika 6). 2,4,6-tris(2-piridil)-s-tirazin (TPTZ) predstavlja ligand koji je vezan na željezov ion. Reakcija se odvija u kiseloj sredini (pH = 3,6) kako bi željezo bilo topljivo. Antioksidativna aktivnost se određuje spektrofotometrijski promjenom apsorbancije pri 593 nm. Intenzitet plave boje također pokazuje reducirajuću moć antioksidansa. [13].

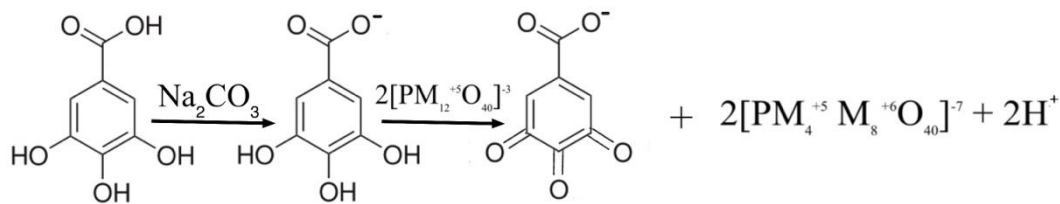


Slika 6. Kemijska struktura kompleksa i promjena boje tijekom reakcije. Prilagođeno i preuzeto iz [13].

### 2.3.2. Folin – Ciocalteu metoda

Određivanje ukupnog sadržaja fenola se može odrediti pomoću Folin – Ciocalteu (FC) metode. Ovom metodom u lužnatoj sredini dolazi do redukcije FC reagensa pomoću fenolnih spojeva. Fenolni spoj donira jedan elektron  $\text{Mo}^{6+}$  koji prelazi u  $\text{Mo}^{5+}$  unutar kompleksa. Reducirani kompleks je plave boje (slika 7) s maksimalnom apsorbancijom na 765 nm [13].





M= Mo ili W

$\lambda=765 \text{ nm}$



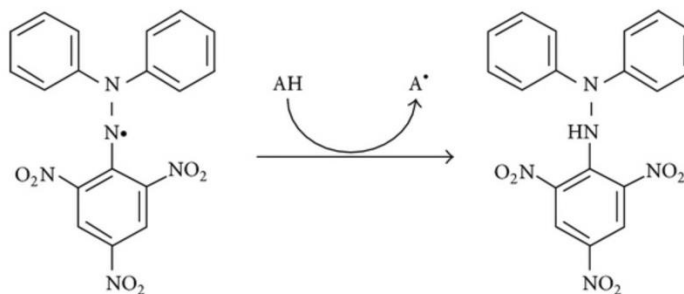
žuto

plavo

Promjena boje tijekom Folin-Ciocalteu analize. Prilagođeno i preuzeto iz [13].

### 2.3.3. DPPH

DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) je radikal koji u reakciji s antioksidansom prima elektron i prestaje biti reaktivan. Ovom reakcijom dolazi do promjene boje iz ljubičaste u blijedo žutu te se mjeri spektrofotometrijski na 517 nm (slika 8) [13].



ljubičasto

$\lambda=517 \text{ nm}$

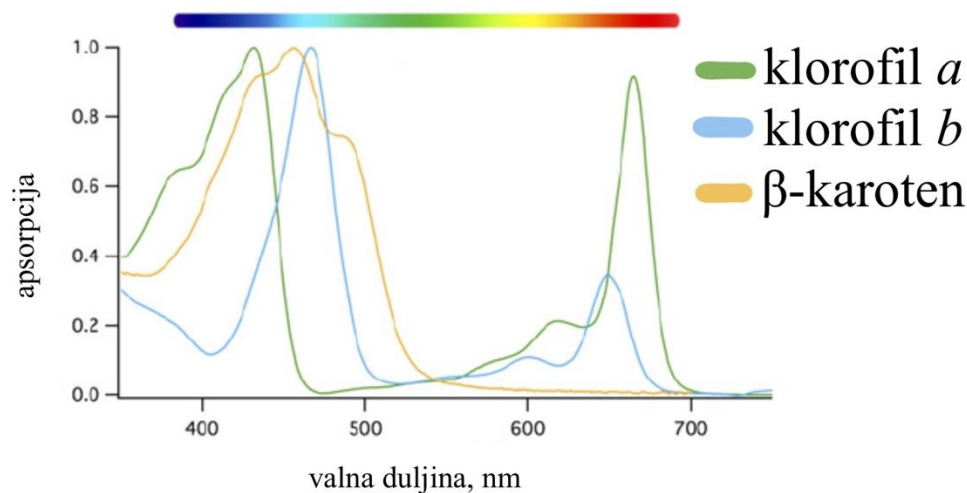
žuto



Slika 8. Mehanizam i promjena boje DPPH analizom. Prilagođeno i preuzeto iz [13].

## 2.4. Fotosinteza

Procesom fotosinteze dolazi do pretvorbe sunčeve energije u kemijsku pri čemu nastaju kisik i ugljikohidrati (škrob, saharoza). Fotosinteza se odvija u kloroplastima gdje molekule pigmenta klorofila apsorbiraju svjetlost. Tijekom fotosinteze, postoji podjela reakcija na reakcije ovisne o svjetlosti i reakcije neovisne o svjetlosti. Reakcije ovisne o svjetlosti se odvijaju na tilakoidnim membranama, dok se u stromi odvijaju reakcije neovisne o svjetlosti (Calvin – Benson ciklus) [14]. U reakcijama ovisnim o svjetlosti dolazi do razlaganja vode na kisik, elektrone i protone. Nastali elektroni i protoni prolaze tilakoidnim membranama te se stvara energija koja se pohranjuje u molekule nikotinamid-adenin dinukleotid fosfata (NADPH) i adenzin-trifosfata (ATP). U reakcijama neovisnim o svjetlosti, nastale molekule NADPH i ATP koriste enzimi u stromi kloroplasta koji prevode CO<sub>2</sub> do ugljikohidrata. Najznačajniji fotosintetski pigmenti su klorofil *a* i *b*, ali također i karotenoidi koji imaju zaštitnu ulogu. Ovi pigmenti u svojoj kemijskoj strukturi imaju dvostruke i jednostruke veze između ugljikovih atoma koje čine konjugirani sustav  $\pi$ -elektrona. Klorofili imaju sposobnost apsorpcije crvenog i plavog svjetla dok se zelena boja reflektira. Karotenoidi apsorbiraju plavo svjetlo te su crvene i žute boje. Ovi pigmenti se nalaze u fotosintetskim sustavima gdje su vezani za membranske proteine i zajedno čine komplekse za prikupljanje svjetlosti. Vanjski dijelovi ovih sustava čine antene koje prikupljaju svjetlosnu energiju i prenose je do posebnog para molekula klorofila u središtu kompleksa. Delokalizirani  $\pi$ -elektroni imaju sposobnost apsorbirati određene valne duljine u vidljivom spektru (400-725 nm) zbog čega prelaze iz osnovnog u pobuđeno stanje za što je potrebno 10-15 sekundi [15]. Dio apsorbirane energije se koristi za primarne reakcije fotosinteze dok se višak energije oslobađa u obliku fluorescencije i topline. Povećanje jednog od ova tri procesa (toplina, fluorescencija, fotosinteza) rezultira smanjenjem ostala dva procesa zbog čega se može pratiti učinkovitost fotosintetskog aparata. Fluorescencija klorofila predstavlja reemisiju svjetlosti koju je apsorbirala molekula klorofila [14]. Spektar fluorescencije klorofila se razlikuje od apsorbirane svjetlosti. Ukupna fluorescencija klorofila *a* je niske vrijednosti (1-2% apsorbirane svjetlosti), a mjerenje fluorescencije može ukazati na stanje fotosustava. Fluorescencija se može kvantificirati izlaganjem lista svjetlosti određene valne duljine i mjereći reemitiranu svjetlost duže valne duljine. Apsorpcijski spektar pigmenta prikazan je slikom 9 [16].



Slika 9. Apsorpcijski spektar  $\beta$ -karotena, klorofila *a* i *b* [15].

## 2.5. Fotoperiod

Biljke se cijelo vrijeme moraju prilagođavati okruženju i uvjetima u kojima se nalaze. Promjene koje nisu optimalne za biljku (količina vode, svjetlosti, hranjive tvari) mogu izazvati stres. Stres može biti uzrokovan abiotičkim i biotičkim faktorima. U biotičke faktore se ubrajaju patogeni čimbenici dok abiotički faktori mogu biti vjetar, voda, temperatura, ali također i omjer tame i svjetlosti [17]. Fotoperiod predstavlja količinu tame i svjetlosti tijekom 24-satnog ciklusa [18]. Fotoperiod regulira različite biološke procese važne za život biljke kao što su njen razvoj, indukcija cvjetanja, opadanje lišća, itd. [19]. Većina biljaka se može podijeliti u tri kategorije s obzirom na cvjetanje: biljke dugog dana, biljke kratkog dana i dnevno neutralne biljke. Fotoperiod koji je kraći od kritičnog dnevnog svjetla (ili kritične duljine dana) inducira cvjetanje biljaka kratkog dana dok biljke dugog dana reagiraju na fotoperiod duži od kritičnog dnevnog svjetla. Dnevno neutralne biljke ne reagiraju na fotoperiod [18]. Kako bi biljke mogle „mjeriti“ trajanje mraka i dana tijekom 24 sata, potreban im je sat koji mjeri vrijeme (cikardijski sat) i fotoreceptori. Fotoreceptori razlikuju svjetlo od tame i sadrže organsku neproteinsku komponentu kromofor. Kromofor je početno mjesto apsorpcije fotona. Fotoreceptori se mogu podijeliti u nekoliko kategorija: kriptokrom, fitokrom, ksantopsin, rodopsin, itd. [19]. Primjenom skraćivanja ili produljivanja fotoperioda, uzgajivači mogu potaknuti cvjetanje i na taj način ubrzati stvaranje sjemenki i plodova. Postoje granice koliko dugo može trajati duljina svjetlosti kako bi se stimulirao rast i cvjetanje. Iako neke biljke mogu tolerirati trajanje svjetlosti tijekom 20 sati, većina biljaka ulazi u fazu stresa pod konstantnim osvjetljenjem [27].

Općenito, duži fotoperiod može izazvati jaču patogenu obranu dok kraći fotoperiod može izazvati veću otpornost od smrzavanja [28]. Biljke kratkog dana zahtijevaju kraće vrijeme svjetlosti, a duži period tame. Produljenjem dana, kod biljaka kratkog dana, inducira se vegetativni rast. Duljina svjetlosti kraća od 12h potaknut će cvjetanje biljke kratkog dana, dok će svjetlost duža od 12h unutar 24-satnog ciklusa potaknuti vegetativni rast [29]. Optimalna duljina svjetlosti za cvjetanje industrijske konoplje je u prosjeku 14h, a tijekom dužih fotoperioda, cvjetanje je najčešće odgođeno [30]. Duži fotoperiod u biljkama kratkog dana može izazvati stresni odgovor popraćen primjerice lipidnom peroksidacijom i induciranjem odgovornih genskih markera [28].

## 2.5. Tipovi svjetla za uzgoj

Kako bi biljka imala optimalan rast i razvoj, važna je prisutnost kontroliranog svjetlosnog okruženja. Kako bi se ublažile posljedice nedostatka svjetlosti na biljku, koriste se učinkoviti izvori svjetla električnih lampi za unutarnji uzgoj. Danas su dostupni različiti konvencionalni izvori svjetla: metal – halogene žarulje, visokotlačne natrijeve žarulje, visokotlačne žarulje, fluorescentne žarulje i žarulje sa žarnom niti. Takvi izvori svjetla se koriste najčešće u objektima za uzgoj u kontroliranim uvjetima i staklenicima, no imaju nekoliko nedostataka: kratki životni vijek, emisiju topline te zahtijevaju veliku snagu električne energije. Veliki iskorak dogodio se uvođenjem svjetlećih dioda (LED, engl. *Light Emitting Diode*) jer imaju dug životni vijek, malu potrošnju energije, nisku emisiju topline i promjenjiv spektar. Kako bi biljke regulirale brojne procese i provodile fotosintezu, uglavnom koriste crveni, plavi i infracrveni dio upadnog spektra, a upravo LED lampe mogu emitirati i obojenu i bijelu svjetlost [20, 21]. Kao što je već spomenuto, klorofil apsorbira najviše u plavom (425-275 nm) i crvenom (625-675 nm) dijelu spektra, a pomoćni fotoreceptori, karotenoidi, apsorbiraju svjetlost također u plavom području. Fotoreceptori (fotropini, kriptokromi i fitokromi) reguliraju fotomorfogene odgovore: migraciju kloroplasta, stomatalni razvoj, cvjetanje, rast listova, fototropizam i klijanje [20]. Većina istraživanja se fokusira na istraživanje utjecaja crvenog i plavog spektra na biljke, a različite boje svjetlosti imaju različite učinke na razvoj i rast različitih biljaka [21]. Bez obzira što biljke najviše apsorbiraju crvenu i plavu svjetlost, samo plavo ili crveno svjetlo za uzgoj biljke nije pogodno. Zato se koriste kombinirani izvori crvene i plave svjetlosti. Određena istraživanja su pokazala kako plava svjetlost utječe na nagomilavanje

sekundarnih metabolita (antocijana, flavonoida, askorbata), a crvena svjetlost doprinosi samom rastu biljke [22].

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Kemikalije

Tekući dušik

Aceton,  $C_3H_6O$

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, DPPH

Etanol,  $C_2H_5OH$

Folin-Ciocalteuov reagens, FC

Natrijev karbonat,  $Na_2CO_3$

Galna kiselina,  $C_7H_6O_5$

Željezov 2,4,6-tripiridil-s-tirozin, FeIII TPTZ

Željezov klorid heksahidrat,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$

Trolox, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroamn-2-karbonska kiselina

Metanol,  $CH_3OH$

Destilirana voda

Trikloroctena kiselina (TCA),  $C_2HCl_3O_2$

DNPH (2,4-dinitrofenilhidrozin) reagens (2 g DNPH, 230 mg tiouree i 270 mg  $CuSO_4$  otopljeno u 100 mL 5 M  $H_2SO_4$ )

Sumporna kiselina,  $H_2SO_4$

Askorbinska kiselina,  $C_6H_8O_6$

Tiobarbituirna kiselina (TBA),  $C_4H_4N_2O_2S$

Magnezijev biikarbonat,  $Mg(HCO_3)_2$

Tris-HCl pufera pH 8,0

Boja Coomassie Brilliant Blue G-250,  $C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$

Albumin iz goveđeg seruma (BSA)

Octena kiselina,  $CH_3COOH$

Dušična kiselina,  $HNO_3$

Antron,  $C_{14}H_{10}O$

Antron reagens (2 mg antrona otopljeno u 1 mL sulfatne kiseline)

Glukoza,  $C_6H_{12}O_6$

### 3.2. Biljni materijal i uzgoj

U svrhu istraživanja, uzgajani su kultivari industrijske konoplje sorte Finola na ljubičastoj i bijeloj svjetlosti uz promjene fotoperioda. Sjemenke su naklijavane u vodi tijekom 48 sati. Proklijale sjemenke su zasijane u mješavinu komercijalnog supstrata i vermikulita (70:30) te uzgajane pod umjerenim LED osvjetljenjem intenziteta  $80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  i temperature  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  (fotoperiod 24/0) (slika 10). Nakon pojave prvih pravih listova, biljke su presađene u pojedinačne plastične posude u mješavinu komercijalnog supstrata i perlita (70:30) te raspoređene u uzgojne komore s bijelim (kombinacija halogenih i LED lampi) i ljubičastim (LED lampe) osvjetljenjem intenziteta  $250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , temperature  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  i fotoperiodima 16/8, 20/4 i 24/0. Biljke uzgajane na fotoperiodu 16/8 služile su kao kontrola. Trideset dana stare biljke su uzorkovane (slike 11 i 12), a listovi su nakon prikupljanja brzo smrznuti u tekućem dušiku i pohranjeni na  $-80^\circ\text{C}$  do daljnjih analiza. Prije uzorkovanja, na prvim potpuno razvijenim listovima od vrha (drugi list) izmjerena je fluorescencija klorofila *a*. Za potrebe biokemijskih analiza listovi su usitnjeni pomoću tekućeg dušika do finog praha te se tako pripremljeno tkivo koristilo za biokemijske analize.



Slika 10. Klijanci industrijske konoplje pod ljubičastim LED osvjetljenjem prije presađivanja.





### 3.3. Mjerenje fotosintetske učinkovitosti klorofila *a*

Fluorescencija klorofila *a* mjerena je fluorimetrom Handy PEA (engl. *Plant Efficiency Analyser*). Biljke su prije mjerenja prilagođene uvjetima tame tijekom 30 minuta. Na listove su postavljane kvačice na koji se pričvršćuje senzorna jedinica PEA fluorimetra (slika 13). Senzorna jedinica je pomoću pulsa crvene saturacijske svjetlosti visokog intenziteta (maksimum 650 nm, 3200  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) inducirala fluorescenciju te su promjene mjerene tijekom jedne sekunde. Izmjerene vrijednosti korištene su za izračun parametara fotosintetske učinkovitosti (Tablica 1) primjenom JIP testa [32].

Tablica 1. Podatci i parametri JIP-testa [26, 31, 32].

Parametar	Opis i jednadžbe
<b>Fv/Fm</b>	Maksimalni prinos fluorescencije
<b>PI<sub>total</sub></b>	Indeks fotosintetske učinkovitosti pretvorbe energije od ekscitona do redukcije krajnjeg akceptora elektrona na PSI;
<b>ABS/RC</b>	Apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu
<b>TR<sub>0</sub>/RC</b>	Hvatanje ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu
<b>ET<sub>0</sub>/RC</b>	Elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu
<b>DI<sub>0</sub>/RC</b>	Otpuštanje energije po aktivnom reakcijskom središtu
<b>RE<sub>0</sub>/RC</b>	Protok energije koji reducira krajnje akeptore elektrona na akceptorskoj strani fotosustava I



Slika 13. Postavljanje kvačica sa zatvorenim poklopcima kako bi se listovi prilagodili uvjetima tame za mjerenje fluorescencije klorofila *a*.

### 3.4. Određivanje sadržaja askorbinske kiseline

U tubice od 12 mL odvagano je približno 0,5 g biljnog tkiva te dodano 10 mL destilirane vode. Homogenati su centrifugirani 15 minuta (3000 g, 4°C). Supernatantu volumena 300  $\mu$ L je dodano 100  $\mu$ L 13,3% TCA, 25  $\mu$ L deionizirane vode i 75  $\mu$ L DNPH (2,4-dinitrofenilhidrozin) reagensa. Za pripremu DNPH reagensa korišteno je 2 g DNPH, 230 mg tiouree i 270 mg  $\text{CuSO}_4$  otopljenih u 100 mL 5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Paralelno su pripremljene slijepo probe bez dodavanja DNPH reagensa. Slijepo probe i uzorci inkubirani su sat vremena u vodenoj kupelji na 37 °C. Nakon inkubacije, slijepim probama je dodano 75  $\mu$ L DNPH reagensa, a potom je svim tubicama (slijepo probe i uzorci) dodano 500  $\mu$ L 65%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Za izradu baždarne krivulje korišteno je razrjeđenje askorbinske kiseline (0 – 10 mg/mL). Apsorbancija je mjerena pri 520 nm. Iz baždarne krivulje je određena koncentracija uzoraka te izražena u mg/g svježe tvari (FW, engl. *Fresh Weight*) [33].

### 3.5. Mjerenje koncentracije produkata lipidne peroksidacije

Metoda za mjerenje koncentracije produkata lipidne peroksidacije počiva na reakciji djelatne tvari s tiobarbiturnom kiselinom (TBA) pri čemu nastaju obojene reaktivne tvari tiobarbiturne kiseline (TBARS, engl. *Thiobarbituric acid reactive substances*). Odvagano je 0,2 g biljnog tkiva u tubice od 2 mL i dodano je 1 mL trikloroctene kiseline (0,1% TCA). Tako pripremljeni uzorci su centrifugirani 5 minuta (6000 g, 4°C). Izdvojeni supernatant (0,5 mL) prebačen je u tubice s čepom na navoj i dodano je 1 mL 0,5 % TBA (tiobarbituratna kiselina) u 20 % TCA. Tijekom sljedećih 30 minuta uzorci su inkubirani u termobloku na 95°C, zatim ohlađeni 10 – 15 minuta u ledu, a potom centrifugirani 15 minuta (18 000 g, 4°C). Apsorbancija supernatanta je mjerena spektrofotometrijski (Specord 40, Analytik Jena) [34].

### 3.6. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata

Odvagano je oko 0,1 g biljnog tkiva u tubice od 2 mL. Tkivu je dodano 1 mL 100 % acetona i magnezijevog bikarbonata (na vrh špatule). Ekstrakcija je provođena na -20 °C tijekom 24 sata. Zatim su uzorci centrifugirani 15 minuta (18 000 g, 4 °C). Apsorbancija uzoraka je mjerena u staklenim kivetama na tri različite valne duljine: 470 nm, 645 nm i 662 nm (Specord 40, Analytik Jena). Korištenjem koeficijenata prema Lichenthaleru izračunata je koncentracija ukupnih klorofila i karotenoida [35].

### 3.7. Određivanje koncentracije proteina

Odvagano je 0,5 g usitnjenog tkiva u tubice od 2 mL. Biljnom tkivu je dodano 1 mL 100 mM Tris-HCl pufera (pH=8). Uzorci su zatim stavljeni u led na inkubaciju 15 minuta te potom centrifugirani 15 minuta (18 000 g, 4°C). Supernatanti su otpipetirani, a ekstrakcija je ponovljena. Supernatanti druge ekstrakcije su spojeni sa supernatantima prve ekstrakcije. Bradfordovom metodom je određena koncentracija proteina pri čemu su se proteini nespecifično vezali za anionski oblik boje Coomassie Brilliant Blue G-250 u kiselom mediju. Volumen uzroka od 5 µL i 250 µL Bradfordovog reagensa dodano je u jažice mikrotitarske pločice. Na čitaču mikrotitarskih pločica (Tecan, Spark) mjerena je apsorbancija pri 595 nm. Albumin iz goveđeg seruma (BSA, engl. *bovine serum albumin*) različite koncentracije (0 – 1,4 mg/mL) korišten je za izradu baždarne krivulje iz koje je izračunata koncentracija proteina u nepoznatim uzorcima te izražena u mg/mL [36].

### 3.8. Određivanje sadržaja ukupnih topljivih polifenola

Odvagano je 0,5 g biljnog tkiva u tubice volumena 12 mL. Uzorcima je dodano 2,5 mL metanola (96%) te su tijekom 24 sata stavljeni na ekstrakciju na -20°C. Dobiveni ekstrakti su centrifugirani 10 minuta (10 000 g, 4°C) nakon čega su supernatanti odvojeni te korišteni za određivanje sadržaja ukupnih topljivih fenola i ukupne antioksidativne aktivnosti DPPH i FRAP metodama. U jažice mikrotitarske pločice dodano je 10 µL uzoraka, 190 µL i 25 µL FC reagensa te je smjesa promiješana. Uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta nakon čega je dodano 75 µL zasićene otopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Tijekom 60 minuta uzorci su inkubirani na temperaturi od 37 °C, a potom ohlađeni na sobnu temperaturu. Pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Tecan, Spark) mjerena je apsorbancija uzoraka pri valnoj duljini od 765 nm. Različite koncentracije galne kiseline (0 – 200 mg/L) korištene su za izradu baždarnе krivulje pomoću koje je određena ukupna koncentracija fenola u uzorcima, a izražena je u ekvivalentima galne kiseline (GAE) [37].

### 3.9. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti

Kako bi se odredila antioksidativna aktivnost nepoznatih uzoraka korištene su tri spektrofotometrijske metode: DPPH (eng. *2,2 – diphenyl -1 – picrylhydrazyl*), FRAP (eng. *ferric reducing antioxidant power*) i iRAC (eng. *Iron (III) reducing antioxidant capacity assay*).

#### 3.9.1. DPPH metoda

Antioksidativna aktivnost uzoraka određena je sposobnošću hvatanja DPPH radikala. Volumen uzorka od 20 µL je dodan u jažice mikrotitarskih pločica i 180 µL 0,004% DPPH reagensa (4 mg DPPH reagensa otopljeno je u 100 mL 100% metanola). Uzorci su zatim inkubirani u tami 30 minuta uz miješanje. Pri valnoj duljini od 517 nm izmjerena je apsorbancija na čitaču mikrotitarskih pločica (Tecan, Spark). Za izradu baždarnе krivulje korišteno je razrjeđenje Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) koncentracije 0 – 300 mg/L. Antioksidativna aktivnost određena je iz baždarnе krivulje i izražena u µmol/g FW kao ekvivalent Troloxa [38, 39].

### **3.9.2. FRAP metoda**

Kako bi se pripremila FRAP reakcijska smjesa, korišten je 0,3 M acetatni pufer (pH=3,6), 10 mM TPTZ otopina i 20 mM FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O (10:1:1). Reakcijska smjesa je grijana na 37°C u vodenoj kupelji. Uzorci volumena od 5 µL i 180 µL FRAP reakcijske smjese dodani su u jažice mikrotitarske pločice. Inkubacija uzoraka je provođena u mraku na 37°C tijekom 15 minuta. Čitačem mikrotitarskih pločica (Tecan, Spark) mjerena je apsorbancija uzoraka pri valnoj duljini od 593 nm. Razrjeđenja Troloxa (0 – 300 mg/L) korištena su za izradu baždarnе krivulje, a antioksidacijska aktivnost je izražena kao ekvivalent Troloxa u µmol/g FW [38, 40].

### **3.10. Određivanje udjela suhe tvari**

Odvagano je 0,5 g svježeg usitnjenog tkiva u tubice. U sušioniku su ostavljene otvorene tubice na 105 °C tijekom 24 sata. Nakon toga je izvagano suho tkivo te je izračunat udio suhe tvari kao razlika masa prije i nakon sušenja. Udio suhe tvari izražen je u postocima.

### **3.11. Određivanje količine celuloze**

U tubice od 2 mL odvagano je 30 mg tkiva te je dodana otopina octene, dušične kiseline i vode (8:1:2). Uzorci su zatim vorteksirani i grijani na 100°C tijekom 30 minuta (povremeno protreseni). Nakon toga su uzorci hlađeni na ledu i centrifugirani 15 minuta na 10 000 g. Ostavljeno je 150 µL supernatanta i pelet na koji je dodano 1,5 mL vode. Uzorci su protreseni, ponovno centrifugirani, a supernatant je bačen. Uzorci su isprani tri puta s 1,5 mL acetona, centrifugirani i ostavljeni tijekom noći na sušenje u digestoru. Sljedeći dan, uzorcima je dodano 175 µL 72% sulfatne kiseline te su inkubirani na sobnoj temperaturi 30 minuta, vorteksirani i ponovno inkubirani 15 minuta. Nakon toga je dodano 825 µL vode i uzorci su stavljeni na vorteks, a potom centrifugirani 5 minuta na 10 000 g. U jažice mikrotitarske pločice dodano je 10 µL supernatanta, 90 µL vode u 200 µL antron reagensa (2 mg antrona u 1 mL sulfatne kiseline). Mikrotitarske pločice su grijane 30 minuta na 80°C. Na čitaču mikrotitarskih pločica (Tecan, Spark) mjerena je apsorbancija uzoraka pri 625 nm. Kako bi se odredila baždarna krivulja, korištene su različite koncentracije otopine glukoze (0 – 10 µg) te je iz nje izračunata koncentracija celuloze nepoznatih uzoraka [41].

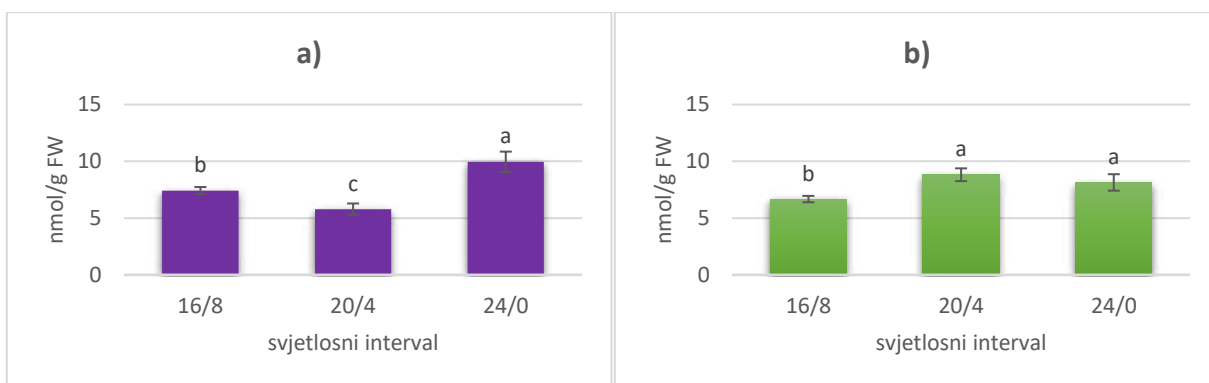
### **3.12. Statistička obrada podataka**

Utjecaj dužine osvjetljenja, odnosno, fotoperioda na indistrijsku konoplju uzgojenu na bijelom i ljubičastom svjetlu utvrđen je analizom varijance (ANOVA) nakon čega je primijenjen Fisher's LSD (engl. *Least Significant Difference*) *post-hoc* test na razini značajnosti  $p \leq 0,05$ . Za statističku analizu korišten je računalni program Statistica ver. 13.1. (Tibco Software Inc.). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti i standardne devijacije, a različita slova ukazuju na statistički značajnu razliku.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Mjerenje koncentracije produkata lipidne peroksidacije

Biljke uzgojene pod ljubičastom svjetlošću su na 20/4 fotoperiodu pokazale značajno nižu koncentraciju TBARS dok je tretman 24/0 uzrokovao značajan porast u odnosu na kontrolu. Biljke uzgojene pod bijelom svjetlošću su na fotoperiodima 20/4 i 24/0 pokazale značajan porast u odnosu na kontrolu, a vrijednosti se između fotoperioda 20/4 i 24/0 nisu statistički značajno razlikovale.

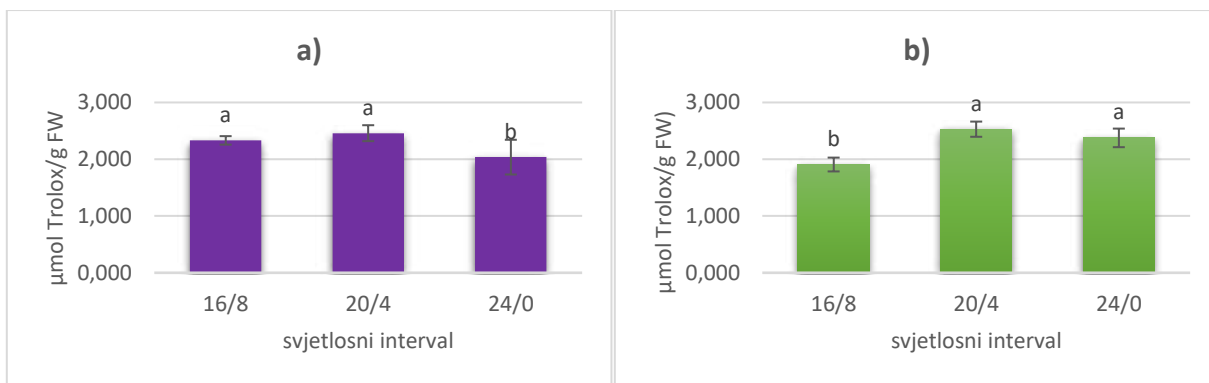


Slika 14. Sadržaj produkata lipidne peroksidacije (TBARS, nmol/g FW) izmjereno u listovima industrijske konoplje uzgojenih na fotoperiodima 16/8, 20/4 i 24/0 u komorama pod ljubičastom (a) i bijelom (b) svjetlošću. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (SD). Različita slova označavaju statistički značajne razlike između tretmana ( $p \leq 0,05$ , ANOVA, LSD).

### 4.2. Ukupna antioksidativna aktivnost

#### 4.2.1. Ukupna antioksidativna aktivnost određena DPPH metodom

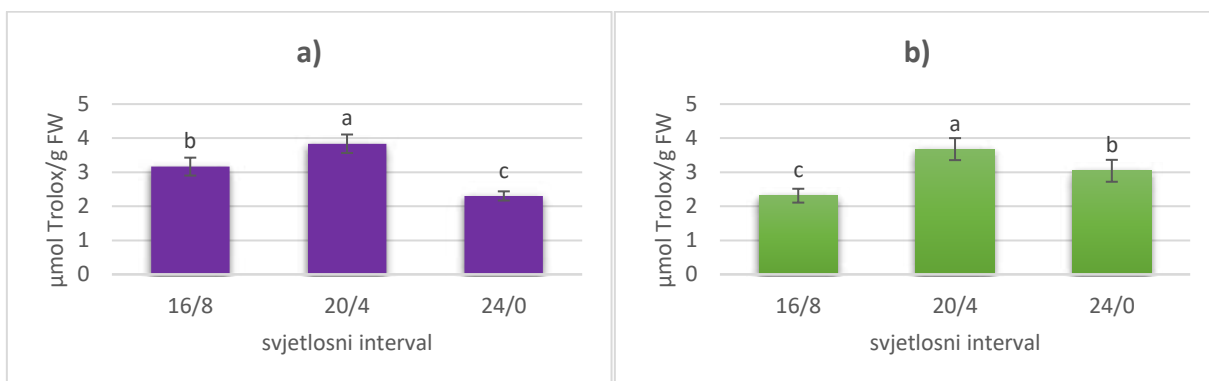
Biljke uzgojene pod ljubičastom svjetlošću na fotoperiodu 20/4 nisu pokazale značajnu razliku ukupne antioksidativne aktivnosti dok je tretman 24/0 uzrokovao smanjenje ukupne antioksidativne aktivnosti u odnosu na kontrolu. Biljke uzgojene pod bijelom svjetlošću su na fotoperiodima 20/4 i 24/0 pokazale značajno višu ukupnu antioksidativnu aktivnost u odnosu na kontrolni fotoperiod. Vrijednosti ukupne antioksidativne aktivnosti na fotoperiodima 20/4 i 24/0 ne pokazuju statistički značajnu razliku.



Slika 15. Antioksidativna aktivnost ( $\mu\text{mol Trolox/g FW}$ ), izražena kao sposobnost hvatanja DPPH radikala, izmjerena u listovima industrijske konoplje uzgojenih na fotoperiodima 16/8, 20/4 i 24/0 u komorama pod ljubičastom (a) i bijelom (b) svjetlošću. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (SD). Različita slova označavaju statistički značajne razlike između tretman ( $p \leq 0,05$ , ANOVA, LSD).

#### 4.2.2. Ukupna antioksidativna aktivnost određena FRAP metodom

Biljke uzgojene pod ljubičastom svjetlošću su na fotoperiodu 24/0 pokazale značajno nižu ukupnu antioksidativnu aktivnost dok je tretman 20/4 uzrokovao porast u odnosu na kontrolu. Uzgoj biljaka pod bijelom svjetlošću su na fotoperiodu 20/4 i 24/0 pokazale porast ukupne antioksidativne aktivnosti u odnosu na kontrolu, a najizraženiji porast je uočen na fotoperiodu 20/4.

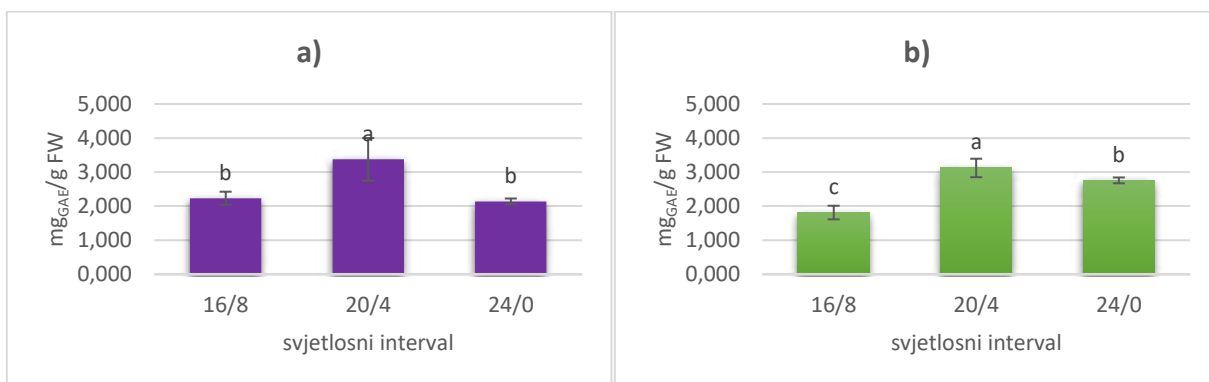


Slika 16. Antioksidativna aktivnost ( $\mu\text{mol Trolox/g FW}$ ) izmjerena u listovima industrijske konoplje uzgojenih na fotoperiodima 16/8, 20/4 i 24/0 u komorama pod ljubičastom (a) i bijelom (b) svjetlošću. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (SD). Različita slova označavaju statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ , ANOVA, LSD).



### 4.3. Određivanje sadržaja ukupnih topljivih polifenola

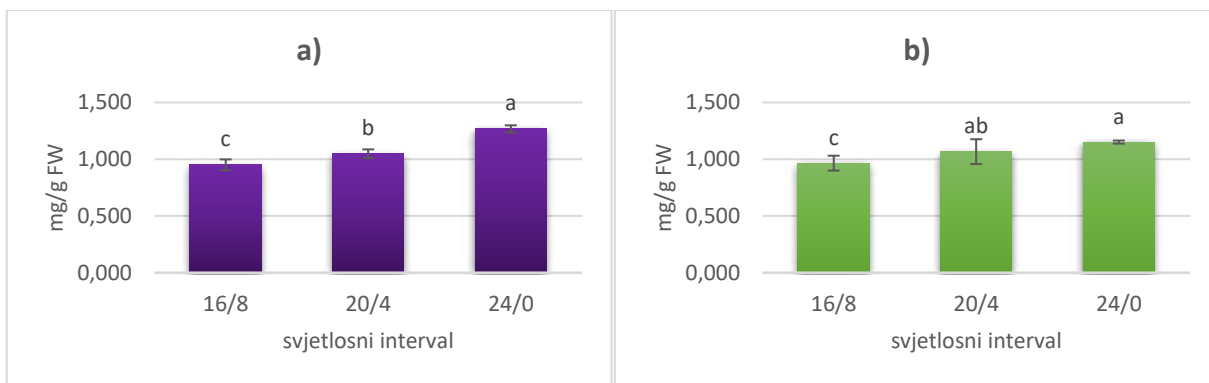
Biljke uzgojene pod ljubičastom svjetlošću su na fotoperiodu 20/4 pokazale viši sadržaj ukupnih topljivih polifenola dok tretman 24/0 nije uzrokovao značajne promjene u odnosu na kontrolu. Biljke uzgojene pod bijelom svjetlošću su na fotoperiodima 20/4 i 24/0 pokazale viši sadržaj ukupnih topljivih polifenola dok je najizraženiji porast uočen na fotoperiodu 20/4.



Slika 17. Sadržaj ukupnih topljivih polifenola (mg<sub>GAE</sub>/g FW) izmjereno u listovima industrijske konoplje uzgojenih na fotoperiodima 16/8, 20/4 i 24/0 u komorama pod ljubičastom (a) i bijelom (b) svjetlošću. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (SD). Različita slova označavaju statistički značajne razlike (p ≤ 0,05, ANOVA, LSD).

### 4.4. Određivanje sadržaja askorbinske kiseline

Biljke uzgojene pod ljubičastom svjetlošću su na fotoperiodima 20/4 i 24/0 pokazale viši sadržaj askorbinske kiseline u odnosu na kontrolu dok je najizraženiji porast na fotoperiodu 24/0. Biljke uzgojene pod bijelom svjetlošću su na fotoperiodu 20/4 i 24/0 pokazale viši sadržaj askorbinske kiseline u odnosu na kontrolu.

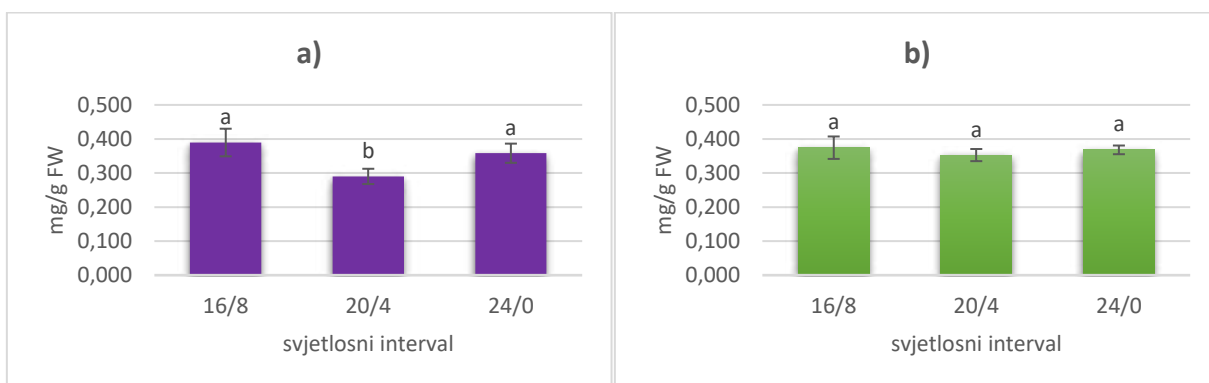


Slika 18. Sadržaj askorbinske kiseline (mg/g FW) izmjeren u listovima industrijske konoplje uzgojenih na fotoperiodima 16/8, 20/4 i 24/0 u komorama pod ljubičastom (a) i bijelom (b) svjetlošću. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (SD).

Različita slova označavaju statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ , ANOVA, LSD).

#### 4.5. Određivanje koncentracije karotenoida

Biljke uzgojene pod ljubičastom svjetlošću su na fotoperiodu 20/4 pokazale nižu koncentraciju karotenoida dok tretman 24/0 nije uzrokovao značajne promjene u odnosu na kontrolu. Biljke uzgojene pod bijelom svjetlošću na fotoperiodima 20/4 i 24/0 statistički se značajno ne razlikuju o odnosu na kontrolu.

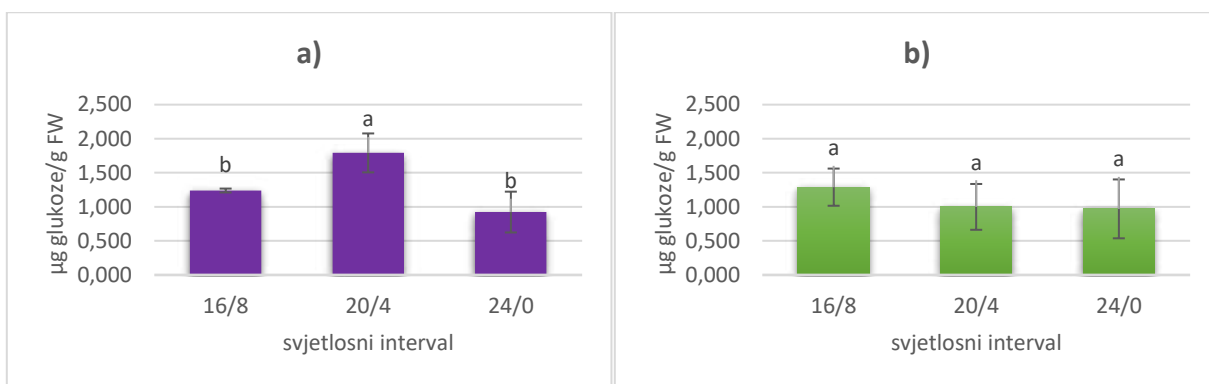


Slika 19. Koncentracija karotenoida (mg/g FW) izmjeren u listovima industrijske konoplje uzgojenih na fotoperiodima 16/8, 20/4 i 24/0 u komorama pod ljubičastom (a) i bijelom (b) svjetlošću. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (SD).

Različita slova označavaju statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ , ANOVA, LSD).

#### 4.6. Određivanje sadržaja celuloza

Biljke uzgojene pod ljubičastom svjetlošću su na fotoperiodu 20/4 pokazale značajno viši sadržaj celuloze dok se tretman 24/0 nije statistički značajno razlikovao u odnosu na kontrolu. Biljke uzgojene pod bijelom svjetlošću na fotoperiodima 20/4 i 24/0 nisu pokazale statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu.

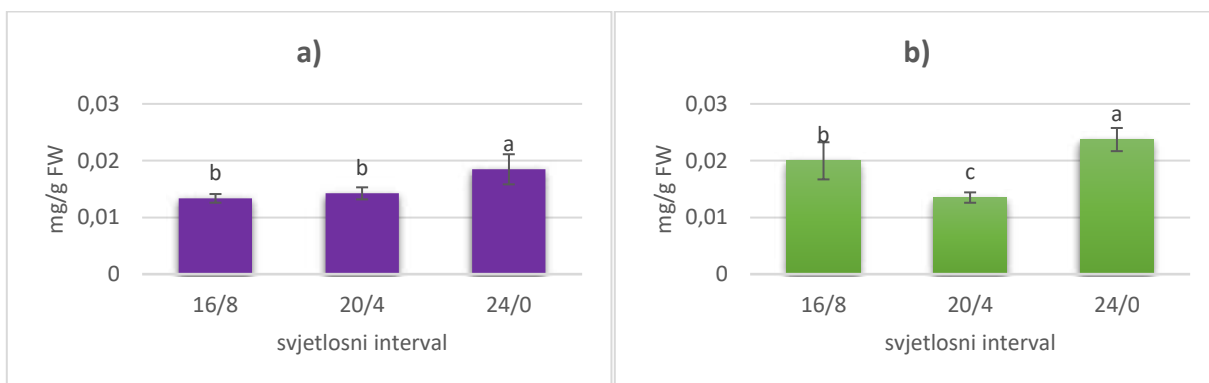


Slika 20. Sadržaj celuloze (µg glukoze/g FW) izmjereno u listovima industrijske konoplje uzgojenih na fotoperiodima 16/8, 20/4 i 24/0 u komorama pod ljubičastom (a) i bijelom (b) svjetlošću. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (SD).

Različita slova označavaju statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ , ANOVA, LSD).

#### 4.7. Određivanje koncentracije proteina

Biljke uzgojene pod ljubičastom svjetlošću su na fotoperiodu 24/0 pokazale značajno višu koncentraciju proteina dok tretman 20/4 nije uzrokovao značajan porast u odnosu na kontrolu. Biljke uzgojene pod bijelom svjetlošću su na fotoperiodu 24/0 pokazale višu koncentraciju proteina dok tretman 20/4 je uzrokovao niže vrijednosti u odnosu na kontrolu.

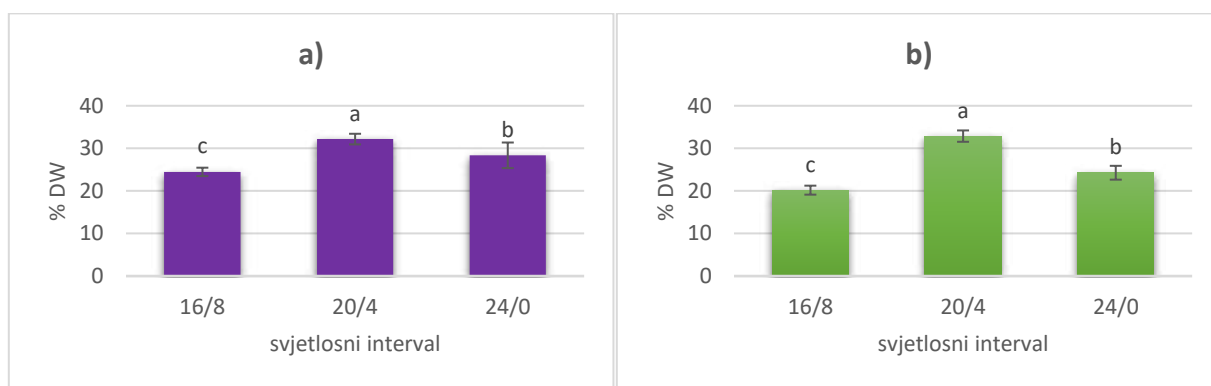


Slika 21. Koncentracija proteina (mg/g FW) izmjerena u listovima industrijske konoplje uzgojenih na fotoperiodima 16/8, 20/4 i 24/0 u komorama pod ljubičastom (a) i bijelom (b) svjetlošću. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (SD).

Različita slova označavaju statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ , ANOVA, LSD).

#### 4.8. Udio suhe tvari

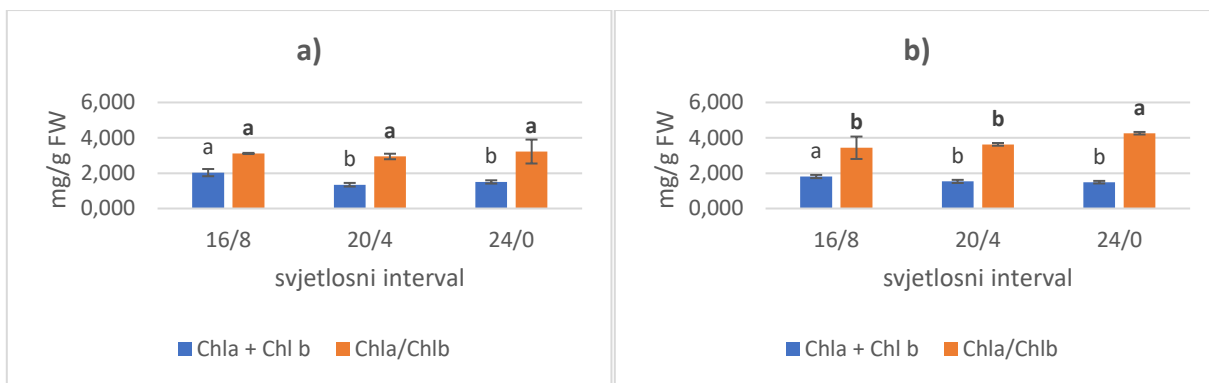
Biljke uzgojene pod ljubičastom svjetlošću su na fotoperiodima 20/4 i 24/0 pokazale viši udio suhe tvari dok je najizraženiji porast na fotoperiodu 20/4 u odnosu na kontrolu. Biljke uzgojene pod bijelom svjetlošću prate isti trend kao i biljke uzgojene pod ljubičastom svjetlošću.



Slika 22. Udio suhe tvari (%) izmjeren u listovima industrijske konoplje uzgojenih na fotoperiodima 16/8, 20/4 i 24/0 u komorama pod ljubičastom (a) i bijelom (b) svjetlošću. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (SD). Različita slova označavaju statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ , ANOVA, LSD).

#### 4.9. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenta

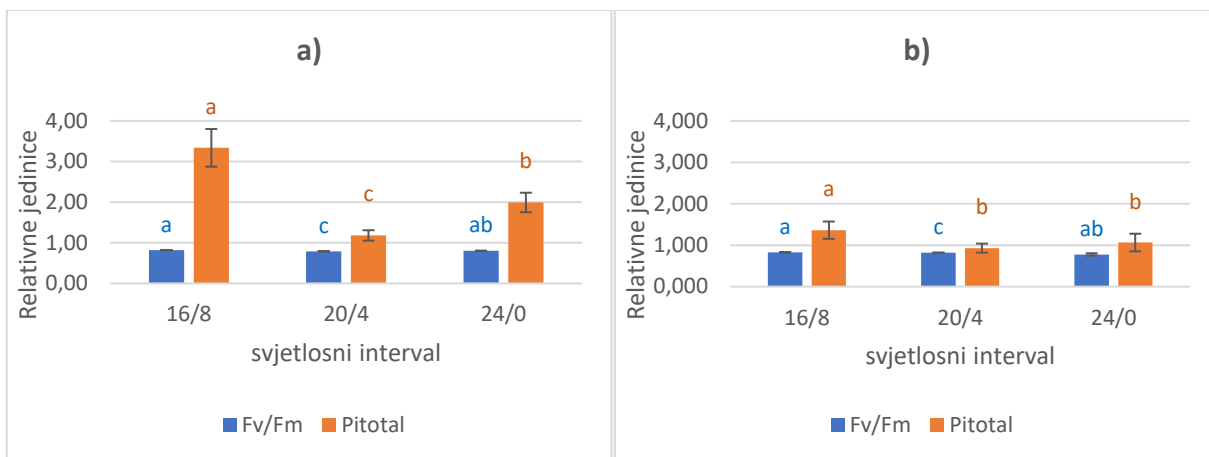
Biljke uzgojene pod ljubičastom svjetlošću su na fotoperiodima 20/4 i 24/0 pokazale značajno niže koncentracije ukupnih klorofila (Chl  $a + b$ ) u odnosu na kontrolu dok se omjer klorofila (Chl  $a/b$ ) pri fotoperiodama 20/4 i 24/0 nije značajno promijenio u odnosu na kontrolu. Biljke uzgojene pod bijelom svjetlošću su na fotoperiodima 20/4 i 24/0 pokazale značajno niže koncentracije Chl  $a + b$  u odnosu na kontrolu dok se omjer klorofila (Chl  $a/b$ ) pri fotoperiodu 24/0 povisio, a tretman 20/4 se nije statistički značajno razlikovao.



Slika 23. Sadržaj ukupnih klorofila (Chl  $a+b$ , mg/g FW) i omjer klorofila  $a$  i  $b$  (Chl  $a/b$  mg/g FW) izmjeren u listovima industrijske konoplje uzgojenih na fotoperiodima 16/8, 20/4 i 24/0 u komorama pod ljubičastom (a) i bijelom (b) svjetlošću. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (SD). Različita slova označavaju statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ , ANOVA, LSD).

#### 4.10. Mjerenje fotosintetske učinkovitosti

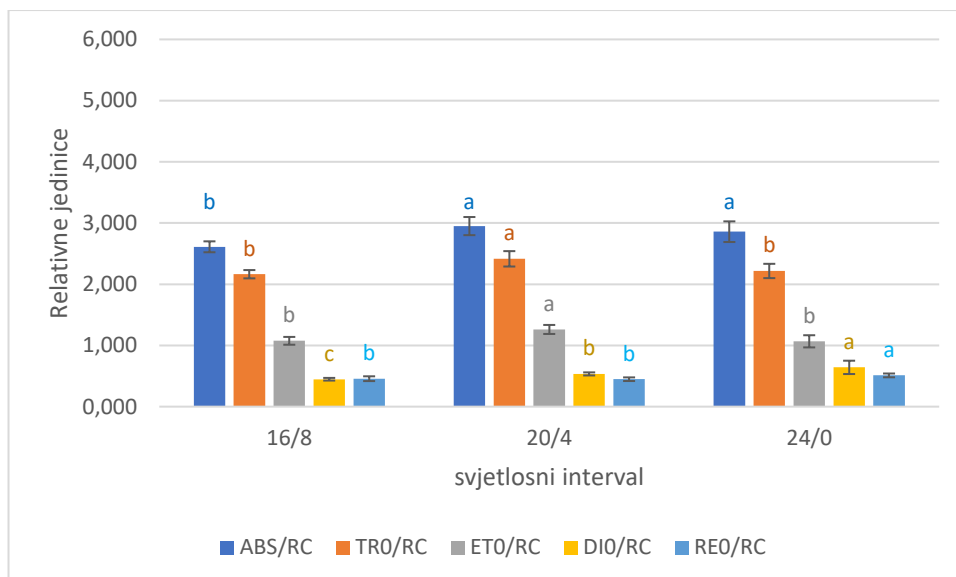
Biljke uzgojene pod ljubičastom svjetlošću su na fotoperiodu 20/4 pokazale značajno niže vrijednosti  $F_v/F_m$  dok tretman 24/0 nije uzrokovao značajnu promjenu u odnosu na kontrolu. Uzgoj na fotoperiodima 20/4 i 24/0 uzrokovali su niže vrijednosti  $PI_{total}$  dok je najizraženiji pad na fotoperiodu 20/4 u odnosu na kontrolu. Biljke uzgojene pod bijelom svjetlošću su na fotoperiodu 20/4 pokazale niže vrijednosti  $F_v/F_m$  dok se tretman 24/0 nije statistički značajno razlikovao u odnosu na kontrolu. Uzgoj na fotoperiodima 20/4 i 24/0 uzrokovali su niže vrijednosti  $PI_{total}$ .



Slika 24. Parametri maksimalnog prinosa fluorescencije (Fv/Fm, relativne jedinice) i indeks fotosintetske učinkovitosti pretvorbe energije od ekscitona do redukcije krajnjeg akceptora elektrona na PSI (PI<sub>total</sub>, relativne jedinice) izmjereni u listovima industrijske konoplje uzgojenih na fotoperiodima 16/8, 20/4 i 24/0 u komorama pod ljubičastom (a) i bijelom (b) svjetlošću. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (SD).

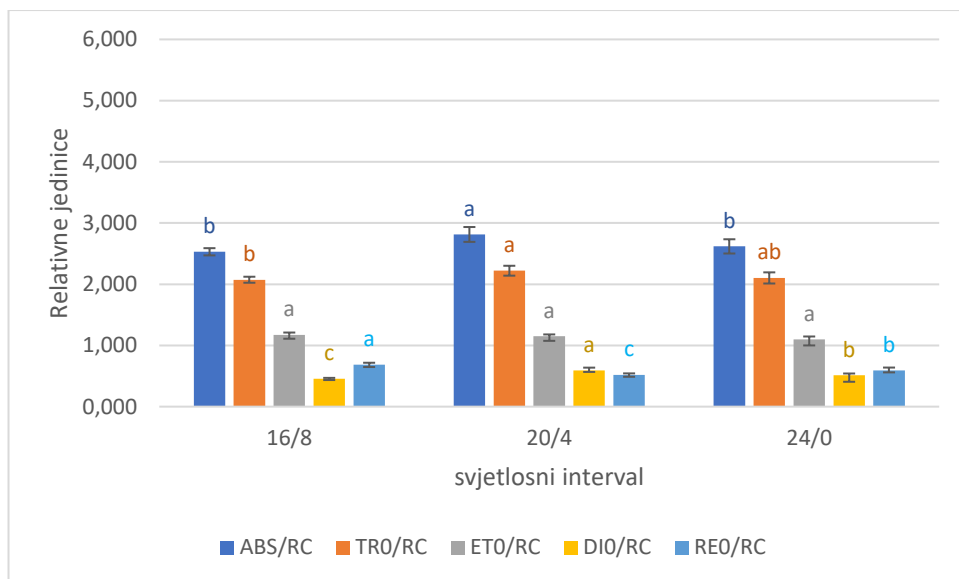
Različita slova označavaju statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ , ANOVA, LSD).

Uzgoj biljaka pod ljubičastom svjetlošću su na fotoperiodima 20/4 i 24/0 pokazale više vrijednosti ABS/RC. Najviše vrijednosti TR<sub>0</sub>/RC i ET<sub>0</sub>/RC izmjerene su pri fotoperiodu 20/4 dok se tretman 24/0 nije statistički značajno razlikovao u odnosu na kontrolu. Uočen je statistički značajan porast DI<sub>0</sub>/RC uzgojem na fotoperiodima 20/4 i 24/0 dok je najizraženiji porast na fotoperiodu 24/0 u odnosu na kontrolu. Uzgoj na fotoperiodu 24/0 rezultirao je višim vrijednostima RE<sub>0</sub>/RC dok se vrijednosti izmjerene na fotoperiodu 20/4 nisu značajno razlikovale.



Slika 25. Parametri protoka energije kroz aktivna reakcijska središta (ABS/RC, TR<sub>0</sub>/RC, ET<sub>0</sub>/RC, DI<sub>0</sub>/RC, RE<sub>0</sub>/RC) izmjereni u listovima industrijske konoplje uzgojenih na fotoperiodima 16/8, 20/4 i 24/0 u komorama pod ljubičastom svjetlošću. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (SD). Različita slova označavaju statistički značajne razlike (p≤0,05, ANOVA, LSD).

Biljke uzgojene pod bijelom svjetlošću su na fotoperiodu 20/4 pokazale višu vrijednost ABS/RC i TR<sub>0</sub>/RC dok tretman 24/0 nije uzrokovao značajnije promjene u odnosu na kontrolu. Vrijednosti ET<sub>0</sub>/RC nisu se značajno razlikovale uzgojem na fotoperiodima 20/4 i 24/0. Uzgoj na fotoperiodima 20/4 i 24/0 rezultirao je višim vrijednosti DI<sub>0</sub>/RC dok je najizraženiji porast na fotoperiodu 20/4 u odnosu na kontrolu. Uočen je značajan statistički pad RE<sub>0</sub>/RC uzgojem na fotoperiodima 20/4 i 24/0 dok je najizraženiji pad na fotoperiodu 20/4.



Slika 26. Parametri protoka energije kroz aktivna reakcijska središta (ABS/RC, TR<sub>0</sub>/RC, ET<sub>0</sub>/RC, DI<sub>0</sub>/RC, RE<sub>0</sub>/RC) izmjereni u listovima industrijske konoplje uzgojenih na fotoperiodima 16/8, 20/4 i 24/0 u komorama pod bijelom svjetlošću. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (SD). Različita slova označavaju statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ , ANOVA, LSD).



## 5. RASPRAVA

Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*) je azijska biljka bogata vitaminima, mineralima, ugljikohidratima, višestruko nezasićenim masnim kiselinama i proteinima što je čini kvalitetnom namirnicom u ljudskoj prehrani. Također je bogata prirodnim antioksidansima koji imaju važnu ulogu u smanjenju rizika od nastanka bolesti i starenja [42]. Lako se prilagođava raznim klimatskim, temperaturnim i svjetlosnim uvjetima [43], a produženo izlaganje svjetlosti može pokrenuti obrambeni mehanizam odnosno aktivirati gene odgovorne za borbu protiv oksidativnog stresa [28]. Slobodni radikali često napadaju višestruko nezasićene masne kiseline što rezultira lipidnom peroksidacijom, a jedna od zadaća antioksidansa je da takve reakcije spriječi. Prevelika učestalost lipidne peroksidacije može dovesti do smanjenja fluidnosti u biološkim membranama i oštećenja stanica pa su njeni produkti dobri pokazatelji oksidacijskog stresa [44, 45]. U ovom istraživanju, uzgoj biljaka pri fotoperiodima 24/0 pod bijelom svjetlošću te na fotoperiodima 20/4 i 24/0 pod ljubičastom svjetlošću su uzrokovali veću akumulaciju produkata lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu što može biti rezultat pojačane proizvodnje ROS. Stepiena i Klobusa [46] su proveli istraživanje na pšenici gdje su uočili porast lipidne peroksidacije kao posljedicu solnog stresa. Autori navode kako slobodni radikali uzrokuju razgradnju membranskih lipida što utječe na povećanje lipidne peroksidacije. Ističu kako se biljke s povećanom razinom antioksidansa mogu uspješno obraniti od nastanka povećane razine lipidne peroksidacije. Slične rezultate dobili su Vavilin i sur. [47] proučavajući akumulaciju produkata lipidne peroksidacije u stanicama vrste *Chlorella* tijekom svjetlosnog stresa.

U ovom istraživanju, uzgoj industrijske konoplje pri oba tipa svjetlosti na fotoperiodu 20/4 uzrokovao je povećanje antioksidativne aktivnosti. Međutim, došlo je do smanjivanja antioksidativne aktivnosti pri fotoperiodu 24/0 što može upućivati na to da se biljka više nije mogla prilagoditi stresnim uvjetima. Slične rezultate su dobili Faraloni i sur. [50] istraživanjem svjetlosnog stresa na antioksidativnu aktivnost mikroalgi. Povećanje intenziteta svjetlosti rezultiralo je povećanjem antioksidativne aktivnosti mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii*. Autori navode kako tijekom fotooksidativnog stresa dolazi do akumulacije viška energije i pokretanja fotoprotektivnih mehanizma i sinteze antioksidansa.

Kako bi se nosile sa stresnim čimbenicima, biljke između ostalog koriste antioksidanse poput polifenola i askorbinske kiseline [48, 49]. Na temelju dobivenih rezultata u ovom radu,

vidljivo je kako porast sadržaja polifenola prati porast antioksidativne aktivnosti. Može se pretpostaviti da je antioksidativna aktivnost međusobno povezana sa ukupnim sadržajem topljivih polifenola. Polifenoli imaju sposobnost neutralizacije ROS-a te doprinose antioksidativnom djelovanju [52]. Biljke industrijske konoplje uzgojene na fotoperiodu 20/4 pokazale su viši sadržaj ukupnih topljivih polifenola na ljubičastoj i bijeloj svjetlosti. S druge strane, uzgoj na ljubičastoj svjetlosti pri fotoperiodu 24/0 doveo je do smanjenja ukupnih topljivih polifenola, a isti tretman na bijeloj svjetlosti se nije značajno razlikovao u odnosu na kontrolu. Slične rezultate dobili su Radyukina i sur. [51] proučavajući djelovanje svjetlosnog stresa na akumulaciju fenola u bosiljku. U njihovom istraživanju, autori pretpostavljaju kako je svjetlosni stres potaknuo sintezu fenolnih spojeva te kako oni predstavljaju jedan od obrambenih mehanizama protiv ROS u samoj biljci.

Page i sur. [53] su proveli istraživanje kojom su ispitali akumulaciju askorbinske kiseline tijekom svjetlosnog stresa na listovima vrste *Arabidopsis thaliana*. Askorbinska kiselina svojom antioksidativnom aktivnošću sudjeluje u borbi protiv oksidativnog stresa i doprinosi stvaranju sekundarnih metabolita. Kvaliteta, intenzitet i dužina svjetlosti mogu utjecati na akumulaciju askorbinske kiseline u biljci [54]. Povećanjem stresnog utjecaja dolazi do povećanja razine askorbinske kiseline u biljnom tkivu koja djeluje kao enzimski kofaktor, regulira signalizaciju u stanicama i ostalim metaboličkim putevima, koordinira sintezu fitohormona, općenito sudjeluje u rastu biljke i odgovoru na stres kao prilagodbu na okolišne promjene [55, 56]. U ovom istraživanju, fotoperiod 24/0 uzrokovao je povećanu sintezu askorbinske kiseline. Naime, askorbinska kiselina pruža fotoprotektivnu ulogu, odnosno sudjeluje u mehanizmima za očuvanje fotosintetskih komponenti. Može se pretpostaviti kako je došlo do veće potrebe za sintezom askorbinske kiseline uslijed oksidacijskog stresa te se na taj način biljka prilagodila stresnim uvjetima [57].

Celuloza čini glavnu komponentu stanične stijenke biljaka i jedan je od najzastupljenijih biopolimera [61]. Biotički i abiotički stresori utječu na mikrotubule te utječu na sintezu celuloze. Akumulacija celuloze je jedan od antioksidacijskih odgovora na stresne uvjete u biljci [58, 62]. Rezultati dobiveni mjerenjem sadržaja celuloze u konoplji pokazuju različite rezultate. Biljke uzgojene pod bijelom svjetlošću nisu pokazale značajne promjene pri fotoperiodima 20/4 i 24/0 u odnosu na kontrolu dok su biljke uzgojene pod ljubičastom svjetlošću pri fotoperiodu 24/0 pokazale značajan porast što ukazuje da je ljubičasta svjetlost djelovala kao stresor na biljke.

Tijekom oksidativnog stresa dolazi do razaranja važnih bioloških molekula kao što su proteini [63]. Kada se oksidirani proteini ne mogu obnoviti i izgube svoju funkciju, može doći do njihove agregacije [64]. U našem istraživanju fotoperiod 24/0 uzrokovao je najveću akumulaciju proteina što može biti odgovor na povećanu akumulaciju ROS-a zbog čega dolazi do razgradnje proteina i samim time nastaje veća potreba za njihovom proizvodnjom [65]. Slične rezultate su dobili Rakszegi i sur. [66] ispitivanjem utjecaja oksidativnog stresa na pšenici što je rezultiralo porastom sadržaja proteina kao odgovor na povećanu količinu ROS-a. Istraživanje koje su proveli Jiao i sur. [67] na repi upućuje na razgradnju proteina nakon dugotrajnog izlaganja svjetlosti. Autori također tvrde kako proteini reakcijskih središta mogu biti meta fotooksidativnog stresa tijekom fotoinhibicije PSI.

U našem istraživanju, fotoperiod 20/4 je utjecao na povećanje udjela suhe tvari i na ljubičastoj i bijeloj svjetlosti dok se udio suhe tvari na fotoperiodu 24/0 smanjio. Uzrok tome može biti veća potreba za obranom organizma od ROS-a što je dovelo do usporenog rasta ili stopiranja rasta [68]. Povećanjem stope fotosinteze dolazi do povećanja količine ugljikohidrata što može na kraju rezultirati povećanim udjelom suhe tvari [69].

Karotenoidi štite fotosintetski aparat protiv okolišnih faktora kao što je neoptimalna količina svjetlosti. Tijekom fotooksidativnog stresa karotenoidi imaju sposobnost hvatati ROS [58]. Ramel i sur. [60] svojim istraživanjem pretpostavljaju kako svjetlosni stres dovodi do proizvodnje ROS-a zbog kojih dolazi do oksidacije  $\beta$ -karotena. S druge strane, istraživanje koje su proveli Faraloni i sur. [50] na vrsti *Chlamydomonas reinhardtii* ukazuje kako svjetlosni stres utječe na povećanu sintezu karotenoida odnosno aktivira fotoprotektivne mehanizme, promovirajući sintezu karotenoida te sprječava razgradnju klorofila. U ovom istraživanju, može se pretpostaviti da industrijska konoplja nije uspjela aktivirati fotoprotektivne mehanizme odnosno da se nije dovoljno prilagodila uvjetima uzgoja jer je povećanjem duljine izlaganja svjetlosti došlo do razgradnje klorofila, a koncentracija karotenoida se nije značajno mijenjala.

Niže koncentracije klorofila povezuju se sa smanjenjem učinkovitosti fotosustava u tilakoidnim membranama koje i dalje mogu ostati potpuno funkcionalne. U istraživanju koje su proveli Tzvetkova-Chevolleau i sur. [70] došlo je do povećane ekspresiju proteina i smanjenje prekursora klorofila te samog klorofila u vrsti *Arabidopsis thaliana*. Tijekom uzgoja konoplje na fotoperiodima 20/4 i 24/0 pri oba tipa svjetlosti došlo je do smanjenja koncentracije klorofila najvjerojatnije zbog njegove razgradnje. Koncentracija klorofila *a*, *b* i karotenoida u biljkama

može se smanjiti pod djelovanjem stresnih čimbenika kao što je prekomjerna količina svjetlosti. Povećana koncentracija karotenoida štiti kloroplaste i pomaže održavanju koncentracije klorofila [71]. Istraživanje koje su proveli Mohammadkhani i Heidari [72] izmjerili su niže vrijednosti klorofila *a*, *b* i ukupni sadržaj klorofila dok su vrijednosti karotenoida bile više u kultivarima kukuruza izloženih vodnom stresu. Mafakheri i sur. [73] su istraživanjem stresa na kultivarima slanutka uočili smanjenje klorofila *a* i *b* te ukupnih klorofila. Prekomjerna apsorpcija energije u fotosintetskom aparatu dovodi do povećanja ROS-a. Kako bi se smanjio ili spriječio takav ishod, dolazi do razgradnje apsorbirajućih pigmenata što može biti uzrok smanjenja koncentracije klorofila. U našem istraživanju, promjena fotoperioda u odnosu na kontrolu nije značajno utjecala na omjere klorofila *a* i *b* što može biti rezultat manje osjetljivosti klorofila *b* na promjene fotoperioda [74].

Svjetlost je važan čimbenik u rastu i razvoju biljke te utječe na fotosintezu [59]. Za postizanje optimalne fotosintetske učinkovitosti, svaki list se treba prilagoditi intenzitetu, dugotrajnosti i kvaliteti svjetlosti. Prevelika količina svjetlosti može uzrokovati oštećenja u fotosintetskom aparatu što utječe na fotokemijsku učinkovitost [75]. Ako se apsorbira prevelika količina energija u odnosu na potrebe odvijanja fotosinteze dolazi do akumulacije suviška energije u tilakoidnim membrana što izaziva oštećenja na PSII te u konačnici rezultira zatvaranjem reakcijskih središta PSII i fotoinhibicijom. Fotoinhibicija nastaje kao posljedica proizvodnje ROS-a koji su odgovorni za oštećenja reakcijskih središta PSII [73]. Molekula klorofila u antenama kompleksa fotosustava apsorbira foton (ABS). Zatim dolazi do prijenosa ekscitacijske energije s molekule na molekulu kroz kompleks antena. Dio energije se otpušta u obliku topline ( $DI_0$ ), dio je uhvaćen u reakcijskom središtu ( $TR_0$ ), a dio se iskorištava za redukciju  $Q_A$  (plastokinona) ( $ET_0$ ) te se energija prenosi kroz transportni lanac elektrona [31].

U ovom istraživanju maksimalni kvantni prinos PSII ( $F_v/F_m$ ) kretao se između 0,790 – 0,829, a prema Bolhar-Nordenkampfu i sur. [76] vrijednosti koje karakteriziraju funkcionalni fotosintetski aparat su upravo između 0,75 – 0,85. Parametar  $PI_{total}$  predstavlja indeks fotosintetske učinkovitosti koji opisuje koliko je energije potrebne od ekscitona do redukcije krajnjeg akceptora elektrona u PSI. Povećanjem duljine izlaganja svjetlosti smanjile su se vrijednosti parametra  $PI_{total}$  što su također uočili i Shamsabad i sur. [77] u svom istraživanju. Nadalje, dobiveni rezultati mjerenja konoplje su također pokazali da na fotoperiodu 20/4 pri bijeloj svjetlosti dolazi do povećanja ABS/RC,  $TR_0/RC$  i  $DI_0/RC$ . Sličan trend su također uočili

Shamsabad i sur. proučavajući fotosintetski aparat u listovima jagode te pretpostavljaju kako je došlo do inaktivacije dijelova reakcijskih središta ili do njihovog gašenja. Povećane vrijednosti  $DI_0/RC$  upućuju kako se suvišak apsorbirane energije rasipa u obliku topline [77]. Međutim, na fotoperiodu 20/4 (ljubičasta svjetlost) dolazi do povećanja  $ABS/RC$ ,  $TR_0/RC$ ,  $ET_0/RC$ ,  $DI_0/RC$ . Dulje izlaganje svjetlosti dovelo je do smanjenja vrijednosti parametra  $ET_0/RC$  što je primijećeno u istraživanju koje su provodili Mihaljević i sur. [78] u kultivarima crvenog hrušta tijekom stresa izazvanog sušom. To ukazuje na povećano otpuštanje apsorbirane energije ( $DI_0$ ) uz istovremeno smanjenje učinkovitog protoka elektrona u transportnom lancu ( $ET_0$ ) te se na taj način sprječava fotooštećenje sustava što je također pokazatelj određene prilagodbe fotosintetskog aparata na produženo izlaganje svjetlosti. Nepromijenjene vrijednosti  $ET_0/RC$  pri izlaganju bijeloj svjetlosti se mogu odnositi na bolju toleranciju biljke koja može zaštititi fotosintetski aparat bez toplinskog rasipanja apsorbirane energije [79].

## 6. METODIČKA OBRADA NASTAVNE JEDINICE

### 6.1. Priprema za nastavni sat

Datum: ...

Razred: 4.razred gimnazije

Ime i prezime učitelja/nastavnika kemije: Antonia Vicić

Tematska cjelina: Kemija odabranih biomolekula

Nastavna jedinica: Vitamini

Tip sata: Obrada novog gradiva i ponavljanje

Cilj: Objasniti važnost i ulogu vitamina

POSTIGNUĆA IZ PIP-A	ISHODI UČENJA I POUČAVANJA	RAZINA ISHODA (prema Crooksu 1988):	PLANIRANI ZADACI/AKTIVNOSTI ZA PROVJERU USVOJENOSTI ISHODA UČENJA I POUČAVANJA	OSTVARENOST PLANIRANIH ZADATAKA/AKTIVNOSTI ZA PROVJERU USVOJENOSTI ISHODA UČENJA I POUČAVANJA
<b>KEM SŠ A.4.12.</b> Istražuje svojstva, sastav i vrstu odabranih biomolekula primjenjujući kemijsko nazivlje i simboliku u okviru koncepta	Uspoređuje svojstva određenih vitamina  Uspoređuje strukture određenih vitamina	R1, R2	Po čemu se vitamini razlikuju od ostalih esencijalnih tvari koje unosimo hranom?  Koje strukturne formule vitamina u svom sastavu sadrže dušik?	
<b>KEM SŠ B.4.13.</b> Istražuje kemijske promjene odabranih biomolekula.	Objasniti topljivost vitamina	R2	Zašto nije preporučljivo iz prehrane potpuno izbaciti masti i ulja? Koje su posljedice?	
<b>KEM SŠ D.4.16.</b> Primjenjuje	Izračunati maseni udio	R2, R3		

matematička znanja i vještine.	vodika u molekuli $\beta$ -karotena			
-----------------------------------	--	--	--	--

**Potrebna predznanja i vještine:** znanje iz biologije i organske kemije (prepoznavanje ugljikovodičnih dijelova u molekulama)

**Ključni pojmovi:** vitamini, svojstva vitamina, prehrana, vitamin topljivi u mastima, vitamini topljivi u vodi

**Povezanost s nastavnim predmetima:**

-Biologija

**Razrada postignuća (ishoda) i zadaci/aktivnosti za provjeru njihove usvojenosti**

## 6.2. Struktura nastavnog sata

ETAPE NASTAVNOG SATA	AKTIVNOSTI UČITELJA/NASTAVNIKA	AKTIVNOSTI UČENIKA	SOCIOLOŠKI OBLICI RADA
UVODNI DIO (10 min)	Rješavanje radnog listića učenici će ponoviti gradivo prošlog sata, odnosno amidne spojeve i amidnu vezu.	Učenici rješavaju radni listić za ponavljanje, usmeno izlažu odgovore	Individualni rad
SREDIŠNJI DIO (25 min)	Napisati na ploču naslov Vitamini. Porazgovarati s učenicima o važnosti vitamina, koje vitamine znaju, u kojim namirnicama mogu pronaći određene vitamine.  Podijeliti učenike u grupe (3-4 učenika) i zadati im da pronađu uloge određenog vitamina i namirnice u kojima se nalaze. Za istraživanje mogu koristiti udžbenik i internetske	Aktivno sudjelovanje u razgovoru.	Frontalni rad -razgovor  Frontalni, individualni rad -razgovor -pisanje  Grupni rad -pretraživanje informacija

	<p>stranice poput portala IZZI i Edutorija.</p> <p>Nakon istraživanja, predstavnici pojedinačnih grupa izlaze na ploču i zapisuju ključne informacije o vitaminu kojim je bio dodijeljen. Nadopuniti informacijama koje su možda učenici izostavili. Ostali učenici zapisuju informacije drugih učenika.</p>	<p>Pisanje zapisa s ploče u bilježnicu.</p> <p>Aktivno slušati.</p> <p>Postavljati pitanja.</p>	<p>Individualni rad -pisanje, razgovor</p>
<p>ZAVRŠNI DIO (10 min)</p>	<p>Ponavljanje gradiva u paru pomoću Kahoot kviza.</p>	<p>Aktivno sudjelovati u rješavanju kviza</p>	<p>Rad u paru</p>



### 6.3. Plan učeničkog zapisa

#### Vitamini

- skupina organskih spojeva za rast, razvitak i reprodukciju
- provitamin: metaboličkim putem prelaze u aktivni oblik vitamina
- avitaminoza: potpuni nedostatak nekog vitamina
- hipovitaminoza: djelomični nedostatak
- hipervitaminoze: prevelika količina
- vitamini topljivi u vodi (skupina B, vitamin C)
- vitamini topljivi u mastima (D, E, K, A)

	Vitamin A	Vitamin C	Vitamin D	Vitamin E	Vitamin K	Skupina vitamina B
<b>Uloga u organizmu</b>	vid, rast, razvoj	antioksidans	razina kalcija i fosfora	antioksidans	zgrušavanje krvi	koža, kosa, nokti, energija
<b>Uzroci nedostatka vitamina</b>	noćno sljepilo	skorbut, umor, slabost	rahitis	gubitak mišićne mase, hemoliza crvenih krvnih stanica	hemoragijska bolest	slabost, anemija, umor
<b>Prisutnost u namirnicama</b>	ulje jetre ribe, voće i povrće	citrusno voće, brokula	izlaganje UV-svjetlosti, riblje ulje	orašasti plodovi, zeleno lisnato povrće	lisnato povrće i voće	kvasac, banane, orasi

## 6.4. Radni listić

### 6.4.1. Radni listić 1. – Amidi

1. Dopuni rečenicu s riječima koje nedostaju.

- Amidi su \_\_\_\_\_ karboksilnih kiselina.
- \_\_\_\_\_ skupina (C=O) veže se na amino skupinu (-NH<sub>2</sub>) i tvori \_\_\_\_\_ skupinu (\_\_\_\_\_).

2. Zaokruži slovo ispred točnog odgovora.

Trivijalni naziv etanamida je:

- formamid
- etilamid
- benzamid
- acetamid

3. Dopuni rečenicu s riječima koje nedostaju.

- Najjednostavniji amid je \_\_\_\_\_ ili \_\_\_\_\_ koji nastaje u jetri kao produkt razgradnje \_\_\_\_\_, a izlučuje se preko bubrega.
- Amidi su podložni reakcijama \_\_\_\_\_.

### 6.4.2. Kviz – Vitamini

1. Zaokruži slovo ispred točnog odgovora. Vitamini su:

- kofaktori u brojnim enzimskim reakcijama
- amini koji se mogu naći u biljkama
- skupina spojeva male molekulske mase
- izvori energije za životne funkcije

2. Zaokruži slovo T ako je tvrdnja točna, a slovo N ako je tvrdnja netočna.

- Vitamin A i E se mogu pohraniti u organizmu. T/N
- Dobar izvor vitamina topljivih u mastima su voće i povrće. T/N
- Vitamin B kompleksa se izlučuje mokraćom. T/N
- Dobar izvor vitamina topljivih u vodi je životinjska jetra. T/N

3. Zaokruži slovo ispred točnog odgovora.

Koji se vitamin svrstava u vitamine topljive u vodi?

- vitamin A

- b) vitamin C
- c) vitamin K
- d) vitamin D

Koji se vitamin svrstava u vitamine topljive u mastima?

- a) askorbinska kiselina
- b) riboflavin
- c) tokoferol
- d) niacin

U jetri se mogu sintetizirati:

- a) karotenoidi
- b) ništa navedeno
- c) vitamini topljivi u mastima
- d) vitamini topljivi u vodi

Za sintezu aktivnog koagulacijskog faktora potreban je:

- a) vitamin C
- b) vitamin K
- c) vitamin A
- d) vitamin E

4. Zaokruži slovo ispred netočne tvrdnje.

Neki vitamini:

- a) sudjeluju kao antioksidansi u kemijskim reakcijama
- b) se oksidiraju dajući energiju
- c) sudjeluju u sastavu važnih biomolekula
- d) održavaju normalan rast i razvoj organizma

5. Izračunaj maseni udio vodika u molekuli beta karotena. Molekulska formula beta karotena je

$M_f = C_{40}H_{56}$ . (zadaca)

### 6.4.3. Očekivani odgovori na listić 1. – Amidi

1. Dopuni rečenicu s riječima koje nedostaju.

- a) Amidi su derivati karboksilnih kiselina.

- b) Karbonilna skupina (C=O) veže se na amino skupinu (-NH<sub>2</sub>) i tvori amidnu skupinu (CONH<sub>2</sub>).

2. Zaokruži slovo ispred točnog odgovora.

Trivijalni naziv etanamida je:

- a) formamid
- b) etilamid
- c) benzamid
- d) **acetamid**

3. Dopuni rečenicu s riječima koje nedostaju.

- a) Najjednostavniji amid je **urea** ili **mokraćevina** koji nastaje u jetri kao produkt razgradnje **bjelančevina**, a izlučuje se preko bubrega.
- b) Amidi su podložni reakcijama **hidrolize**.

#### 6.4.4. Očekivani odgovori na kviz – Vitamini

1. Zaokruži slovo ispred točnog odgovora. Vitamini su:

- a) **kofaktori u brojnim enzimskim reakcijama**
- b) amini koji se mogu naći u biljkama
- c) skupina spojeva male molekulske mase
- d) izvori energije za životne funkcije

2. Zaokruži slovo T ako je tvrdnja točna, a slovo N ako je tvrdnja netočna.

- a) Vitamin A i E se mogu pohraniti u organizmu. **T/N**
- b) Dobar izvor vitamina topljivih u mastima su voće i povrće. **T/N**
- c) Vitamin B kompleksa se izlučuje mokraćom. **T/N**
- d) Dobar izvor vitamina topljivih u vodi je životinjska jetra. **T/N**

3. Zaokruži slovo ispred točnog odgovora.

Koji se vitamin svrstava u vitamine topljive u vodi?

- e) vitamin A
- f) **vitamin C**
- g) vitamin K
- h) vitamin D

Koji se vitamin svrstava u vitamine topljive u mastima?

- e) askorbinska kiselina
- f) riboflavin
- g) **tokoferol**
- h) niacin

U jetri se mogu sintetizirati:

- e) karotenoidi
- f) **ništa navedeno**
- g) vitamini topljivi u mastima
- h) vitamini topljivi u vodi

Za sintezu aktivnog koagulacijskog faktora potreban je:

- e) vitamin C
- f) **vitamin K**
- g) vitamin A
- h) vitamin E

4. Zaokruži slovo ispred netočne tvrdnje.

Neki vitamini:

- e) sudjeluju kao antioksidansi u kemijskim reakcijama
- f) **se oksidiraju dajući energiju**
- g) sudjeluju u sastavu važnih biomolekula
- h) održavaju normalan rast i razvoj organizma

5. Izračunaj maseni udio vodika u molekuli beta karotena. Molekulska formula beta karotena je  $M_f(C_{40}H_{56})$ .

**Račun:**

Zadano je:

$M_f(C_{40}H_{56})$

Račun:

$$M_f(C_{40}H_{56}) = 40 \times Ar(C) + 56 \times Ar(H) = 40 \times 12 + 56 \times 1,008 = 480 + 56,448 \\ = 536,448$$

$$w(H, C_{40}H_{56}) = \frac{56 \times Ar(H)}{Mr(C_{40}H_{56})} = \frac{56,448}{536,448} = 0,1052 \times 100 = 10,52\%$$

$$w(\text{H}, \text{C}_{40}\text{H}_{56}) = 10,5 \%$$

**Odgovor:**

Maseni udio vodika u molekuli beta karotena iznosi 10,5%.

## 7. ZAKLJUČAK

Promjena fotoperioda utjecala je na biokemijski sastav industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*) i fotosintetsku učinkovitost. Biljke uzgojene pod ljubičastom svjetlošću na fotoperiodu 24/0 pokazale su smanjenje ukupne antioksidacijske aktivnosti koja je rezultirala povećanjem koncentracije produkata lipidne peroksidacije nastalih zbog smanjenog odgovora biljke na povećani oksidativni stres uzrokovan produljenom izlaganju svjetlosti. Također, došlo je do povećanja koncentracije askorbinske kiseline koje može biti rezultat nastojanja biljke da pojača antioksidativno djelovanje. Nasuprot tomu, uzgoj na fotoperiodu 20/4, pod ljubičastom svjetlošću, rezultirao je porastom ukupne antioksidacijske aktivnosti, te smanjenjem koncentracije produkata lipidne peroksidacije. Moguće je da je povećanju ukupne antioksidacijske aktivnosti pridonijelo i povećanje koncentracije ukupnih polifenola i askorbinske kiseline zabilježeno pri fotoperiodu 20/4.

Pri uzgoju pod bijelom svjetlošću došlo je do značajnog povećanja antioksidacijske aktivnosti kao i koncentracije ukupnih polifenola te askorbinske kiseline na oba fotoperioda (20/4 i 24/0). Međutim, zabilježeno je i povećanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije, što upućuje na to da je pod bijelom svjetlošću biljka izložena većem oksidativnom stresu koji izaziva i veći antioksidacijski odgovor.

Fotoperiod 20/4 uzrokovao je značajno smanjenje fotosintetske učinkovitosti ( $F_v/F_m$  i  $PI_{total}$ ) u odnosu na kontrolu uslijed inaktivacije reakcijskih središta, neovisno o tipu osvjetljenja. Izlaganje kontinuiranom osvjetljenju (fotoperiod 24/0) dovelo je do povećanja elektronskog transporta u odnosu na kontrolu, uslijed čega se maksimalna fotosintetska učinkovitost nije promijenila ( $F_v/F_m$ ). Fotoperiod 16/8 se pokazao kao najpovoljniji omjer osvjetljenja i tame za učinkovite fotokemijske reakcije.

## 8. LITERATURA

- [1] I. Rapčan, M. Jurišić, I. Plaščak, A. Jakubek, D. Galić Subašić, *Agronomski glasnik* 83 (2021), 191-202.
- [2] A. Tomašić Paić, *Medicinski vjesnik* 44 (147-162).
- [3] H. P. Rupasinghe, A. Davis, S. K. Kumar, B. Murray, V. D. Zheljaskov, *Molecules* 25 (2020), 4078.
- [4] D. Duraković, *Jahr* 7 (2016), 331-342.
- [5] S. Farag i O. Kayser, *Handbook of Cannabis and Related Pathologies*, Academic Press, 2017.
- [6] D. W. Lachenmeier i S. G. Walch, *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem* 4 (2005), 812-826.
- [7] M. Pal, K. Misra, G. Dhillon, G. Brar, S.K. Verma, M. Verma, *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*, Springer, New York, 2014.
- [8] J. Flieger, W. Flieger, J. Baj, R. Maciejewski, *Mater.* 14 (2021), 4135.
- [9] W. Stahl i H. Sies, *Mol. Aspects Med.* 24 (2003), 345-351.
- [10] S. Vladimir-Knežević, B. Blažeković, M.B. Štefan, M. Babac, *Phytochemicals as nutraceuticals-Global approaches to their role in nutrition*, IntechOpen, London 2012.
- [11] G. Tirzitis i G. Bartosz, *Acta Biochim. Pol.* 57 (2010), 139-142.
- [12] R. Apak, M. Ozyurek, K. Guclu, E. Capanoglu, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016), 997-1027.
- [13] I.G. Munteanu i C. Apetrei, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021), 3380.



- [14] M.H.Kalaji, V.N. Goltsev, K. Žuk-Golaszewska, M. Zvicak, M. Brestic, Chlorophyll Fluorescence Understandin Crop Performance – Basics and Applications, CRC Press, Boca Raton, 2017.
- [15] M.P.Johnson, *Essays Biochem.* 60 (2016), 255-273.
- [16] K. Maxwell i G.N. Johnson, *J. Exp. Bot.* 51 (2000), 659-668.
- [17] C. Wasternack, B. Hause, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72 (2002), 165-221.
- [18] S.D. Jackson, *New Phytol.* 181 (2009), 517-531.
- [19] F. Wu i Y. Hanzawa, *Photoperiodic Control of Flowering in Plants, Handbook of Plant and Crop Physiology (Mohammad Pessarakli)*, CRC Press, Boca Raton, 2014, 121-189.
- [20] S.D. Gupta, A. Agarwal, *Artificial Lighting System for Plant Growth and Development Chronological Advancement, Working Principles, and Comparative Assessment, Light Emitting Diodes for Agriculture (S.D. Gupta)*, Springer, Singapore, 2017.
- [21] Y. Ma, A. Xu, Z. Cheng, *Hortic. Plant J.* 7 (2021), 552-564.
- [22] L. Zha, W. Liu, Q. Zhang, C. Zhou, M. Shao, *Front. Plant Sci.* 11 (2020), 704.
- [23] <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/a/ascorbic-acid.html> 20.7.2022.
- [24] <https://www.abcam.com/beta-carotene-antioxidant-ab142849.html> 20.7.2022.
- [25] [https://www.researchgate.net/publication/344808208\\_Curcumin%27s\\_Beneficial\\_Effects\\_on\\_Neuroblastoma\\_Mechanisms\\_Challenges\\_and\\_Potential\\_Solutions/figures?lo=1](https://www.researchgate.net/publication/344808208_Curcumin%27s_Beneficial_Effects_on_Neuroblastoma_Mechanisms_Challenges_and_Potential_Solutions/figures?lo=1) 20.7.2022.
- [26] M.A. Yusuf, D. Kumar, R. Rajwanshi, R.J. Strasser, M. Tsimilli-Michael, N.B. Sarin, *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2010), 1428-1438.

- [27] A.Velez-Ramirez, W. van Ieperen, D. Vreugdenhil, F.F. Millenaar, Trends Plant Sci. 16 (2011), 310-318.
- [28] W. Abuelsoud, A. Cortleven, T. Schmulling, J. Plant Physiol. 253 (2020), 153252.
- [29] B. Thomas i D. Vince-Prue, Photoperiodism in plants, Academic Press, San Diego, 1997.
- [30] M. Zhang, Front. Plant. Sci. 2 (2021), 1-14.
- [31] R.J. Strasser, A. Srivastava, M. Tsimilli-Michael, Probing photosynthesis: Mechanism, regulation and adaptation, Taylor and Francis, London, 2000.
- [32] R. J. Strasser, A. Srivastava, M. Tsimilli-Michael, Chlorophyll *a* fluorescence: A signature of photosynthesis, Springer, Nizozemska, 2004.
- [33] V. L. Singleton, J. A. Rossi, Am. J. Enol. Vitic. 16 (1965), 144-158.
- [34] S. Verma, R. S. Dubey, Plant Sci. 4 (2003), 645-655.
- [35] H. K. Lichtenthaler, Meth. Enzymol. 148 (1987), 350-382.
- [36] M. M. Bradford, Anal. Biochem. 72 (1976), 284-254.
- [37] V. L. Spingleton i J. A. Rossi, Am. J. Enol. Vitic. 16 (1965), 144-158.
- [38] N. Bibi Khatua, D. Montesano, S. Albrizio, G. Zengin, M.F. Mahomoodally, Antioxidants 9 (2020), 709.
- [39] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier i C. Berset, LWT – Food Science and Technology 28 (1995), 25-30.
- [40] F. Xiao, T. Xu, B. Lu, R. Liu, Food Front. 1 (2020), 60-69.
- [41] C.E. Foster, T.M. Pauly, M. Comprehensive, J. Visualized Exp. 37 (2010), 1745.
- [42] M. Irakli, E. Tsaliki, A. Kalivas, F. Kleisiaris, E. Sarrou, C. M. Cook, Antioxidants 8 (2019), 491.

- [43] M. Zhang, *Front. Plant Sci.* 12 (2021), 1-14.
- [44] G. Barrera, *Int. Sch. Res.* 2012 (2012), 1-13.
- [45] L. Štefan, T. Tepšić, T. Zavidčić, M. Urukalo, D. Tota, R. Domitrović, *Med. Flum.* 43 (2007), 84-93.
- [46] P. Stepień, G. Klobus, *Physiol. Plant.* 125 (2005), 31-40.
- [48] C. W. Daniels, F. Rautenbach, J.L. Marnewick, A.J. Valentine, O.J. Babajide, W.T. Mabusela, *S. Afr. J. Bot.* 96 (2015), 29-36.
- [49] D. Chakrabarty, J. Chatterjee, S.K. Datta, *Plant Growth Regul.* 53 (2007), 107-115.
- [50] C. Faraloni, T. Di Lorenzo, A. Bonetti, *Symmetry* 13 (2021),
- [51] N. L. Radyukina, V. I. M. Toaima, N. R. Zaripova, *Russ. J. Plant. Physiol.* 59 (2011).
- [52] P.V. Maslennikov, G.N. Chupakhina, L.N. Skrypnik, P.V. Feduraev, A.S. Melnik, *Russ. J. Ecol.* 49 (2018), 384-394.
- [53] F. Mohammad, *Int. J. Appl. Biol. Pharm.* 2 (2011), 468-479.
- [54] M. E. Reid, *Bull. Torrey Bot. Club.* 69 (1942), 204-220.
- [55] T. A. Khan, M. Mazid, F. Mohammad, *J. Agrobiol.* 28 (2011), 97-111.
- [56] M. Xiao, Z. Li, L. Zhu, J. Wnag, B. Zhang, F. Zheng, Z. Zhang, *Front. Plant Sci.* 12 (2021).
- [57] V. Locato, S. Cimini, L. De Gara, *Front. Plant Sci.* 4 (2013), 152.
- [58] K. Strzalka, A. Kostecka-Gugata, D. Latowski, *Russ. J. Plant Physiol.* 50 (2003), 168-173
- [59] N. Danziger, N. Bernstein, *Ind. Crops Prod.* 164 (2021), 113351.

- [60] F. Ramel, S. Birtic, C. Ginies, L. Soubigou-Taconnat, C. Triantaphylides, M. Havaux, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (2012), 5535-5540.
- [61] I. Kogel-Knaber, W. Amelung, *Treatise on Geochemistry*, Elsevier, SAD, 2014.
- [62] C. Kesten, A. Menna, C. Sanchez-Rodriguez, *Curr. Opin. Plant Biol.* 40 (2017), 106-113
- [63] T. Savchenko, K. Tikhonov, *Life (Basel)* 11 (2021), 304.
- [64] T. C. Squier, *Exp. Gerontol.* 36 (2001), 1539-1550.
- [65] K. J. Salih, O. Duncan, L. Li, B. O'Leary, R. Fenske, J. Trosch, A.H. Millar, *Plant Sci. J.* 103 (2020), 128-139.
- [66] M. Rakszegi, E. Darko, A. Lovegrove, I. Molnar, L. Lang, Z. Bedo, P. Shewry, *PLoS One* 14 (2019).
- [67] S. Jiao, H. Emmanuel, J. A. Guikema, *Plant Sci.* 167 (2004), 733-741.
- [68] H. AbdEglawad et al., *Front. Plant Sci.*, 7 (2016), 276.
- [69] I. Zelitch, *Bioscience* 32 (1982), 796-802.
- [70] T. Tzvetkova-Chevolleau et al., *Plant. Sci. J.* 50 (5), 795-809.
- [71] G. Sherin, K. P. Ray Aswathi, J. T. Puthur, *Plant Stress* 4 (2022), 1000079.
- [72] N. Mohammadkhani, R. Heidari, *J. Biol. Sci.* 10 (2007), 4022-4028.
- [73] A. Mafakheri, A. Siosemardeh, B. Bahramnejad, P.C. Stuijk, Y. Sohrabi, *Aust. J. Crop Sci.* 4 (2010), 508-584.
- [74] C. H. Foyer, *Environ. Exp. Bot.* 154 (2018), 134-142.
- [75] I. Muhammad, A. Shalmani, M. Ali, Q.H. Yang, H. Ahmad, F.B. Li, *Front. Plant. Sci.* 11 (2021).

[76] H. R. Bolhar-Nordenkamp, S.P. Long, N.R. Baker, G. Oquist, U.L.E.G. Schreiber, E.G. Lechner, *Funct. Ecol.* 4 (1989), 497-514.

[77] M. R. M. Shamsabad, M. Esmaeilizadeh, H.R. Roosta, M.R. Dehghani, P. Dabrowski, H.M. Kalaji, *Sci. Rep.* 12 (2022), 1-15.

[78] I. Mihaljević, M. Viljevac Vuletić, V. Tomaš, D. Horvat, Z. Zdunić, D. Vuković, *Photosynthetica* 59 (2021), 517-528.

[79] M. Šrajer Gajdošik, A. Vicić, V. Gvozdić, L. Begović, S. Mlinarić, *Int. J. Mol. Sci.*, 23 (2022), 1-19.

## 9. ŽIVOTOPIS

### *Osobni podaci*

<i>Ime i prezime</i>	Antonia Vicić
<i>Datum i mjesto rođenja</i>	21.8.1996., Osijek
<i>Adresa</i>	Stanka Vraza 9, Belišće 31551
<i>e-mail</i>	<a href="mailto:antoniavicic@gmail.com">antoniavicic@gmail.com</a>
<b><i>Obrazovanje</i></b>	
<i>2020. – 2022.</i>	<b>Diplomski sveučilišni studij kemije; nastavnički smjer</b>  Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju  Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek  Diplomski rad:  Mentorica: prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik
<i>2016. – 2020.</i>	<b>Preddiplomski sveučilišni studij kemije</b>  Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju,  Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek  Završni rad: Hidrotermalna sinteza složenih metalnih oksida  Mentor: prof. dr. sc. Igor Đerđ
<i>2011. – 2015.</i>	<b>Opća gimnazija Valpovo</b>
<b><i>Radno iskustvo</i></b>	
<i>2020</i>	Privatni tutor

11/2021	Zamjena u školi (Opća gimnazija Valpovo)
2/2022	Zamjena u školi (Druga srednja Beli Manastir)
9/2022	Zamjena u školi (druga srednja Beli Manastir)
<b>Objavljeni radovi, sudjelovanje na kongresima, dodatne edukacije</b>	<p>Ružičkini dani, 2020. – posterska sekcija</p> <p>Festival znanosti, 2021.</p> <p>Seminar „Primjena rekombinantne DNA tehnologije u biotehnologiji“, 2020.</p> <p>Green konferencija, 2022. – posterska sekcija</p> <p>Ružičkini dani, 2022. – posterska sekcija</p> <p>Hrvatski biološki kongres, 2022. – posterska sekcija</p> <p>Objavljen rad u International Journal of Molecular Sciences: Effect of Prolonged Photoperiod on Light – Dependent Photosynthetic Reactions in <i>Cannabis</i></p>
<i>Osobne vještine</i>	
<i>Materinski jezik</i>	Hrvatski
<i>Strani jezik</i>	Engleski – aktivno u govoru i pisanju
<i>Računalne vještine</i>	Odlično snalaženje pri radu na računalu, poznavanje i aktivno korištenje MS Office programskog paketa
<i>Vozačka dozvola</i>	B kategorija