

# Utjecaj fenotipske faze i različitih lokaliteta uzgoja na akumulaciju bioaktivnih spojeva u listu i stabljici komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.)

---

Jurić, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:580384>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2020.

Sara Jurić,  
1295/USH

**UTJECAJ FENOTIPSKE FAZE I  
RAZLIČITIH LOKALITETA  
UZGOJA NA AKUMULACIJU  
BIOAKTIVNIH SPOJEVA U LISTU  
I STABLJICI KOMORAČA  
(*Foeniculum vulgare* Mill.)**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća te Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević te uz pomoć Valentine Kruk, mag. ing. techn. aliment.

Ovaj diplomski rad izrađen je u okviru projekta "Izolacija i enkapsulacija bioaktivnih molekula samonikle i kultivirane koprive i komorača i učinci na fiziologiju organizma" (PlantBioPower, IP-01-2018-4924) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem mojoj dragoj mentorici izv. prof. dr. sc. Danijeli Bursać Kovačević na izdvojenom vremenu, strpljenju, podršci i profesionalnosti od samog početka do kraja izrade ovog rada. Hvala na toplim i iskrenim savjetima koji su mi pisanje ovog rada učinili tako jednostavnim i opuštenim. Također zahvaljujem mag. ing. techn. aliment. Valentini Kruk na nesebičnoj pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela rada i vrlo ugodnoj atmosferi tijekom rada u laboratoriju.*

*Hvala svim mojim prijateljima i kolegama koji su prolazili samnom kroz ovaj period studiranja i učinili ga mnogo zabavnijim, lakšim i nezaboravnim.*

*Veliko hvala svakom članu moje velike obitelji na bezuvjetnoj potpori i vjeri u mene svih ovih godina. Posebno hvala mojoj mami, baki i didi bez kojih sve ovo ne bi bilo moguće i bez kojih ne bih bila tu gdje jesam.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za kemiju i tehnologiju voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### UTJECAJ FENOTIPSKE FAZE I RAZLIČITIH LOKALITETA UZGOJA NA AKUMULACIJU BIOAKTIVNIH SPOJEVA U LISTU I STABLJICI KOMORAČA

(*Foeniculum vulgare* Mill.)

Sara Jurić, 1295/USH

**Sažetak:** Cilj ovog rada je bio odrediti utjecaje fenotipske faze i različitih lokacija uzgoja na prinos bioaktivnih spojeva u listu i stabljici samoniklog komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.). Uzorci komorača ubrani su u periodima prije i poslije cvatnje na pet različitih lokacija u Istri (Poreč, Raša, Plomin, Vodnjan, Valmade). Ekstrakcija bioaktivnih spojeva provedena je primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE), a u dobivenim ekstraktima spektrofotometrijski su određivani ukupni fenoli, karotenoidi i klorofili. U uzorcima lista je veći udio fenola određen u 2. fenotipskoj fazi, dok su udjeli karotenoida i klorofila bili viši u 1. fenotipskoj fazi. U uzorcima stabljike je utvrđeno da su udjeli svih određivanih bioaktivnih spojeva bili viši u 2. fenotipskoj fazi u odnosu na 1. fenotipsku fazu. Ukoliko se razmotri utjecaj lokacije uzgoja, vidljivo je da se lokacija Plomin izdvojila kao lokacija s najvećim udjelom ukupnih fenola u uzorcima lista, a s najvećim udjelima klorofila i karotenoida u listu izdvojila se lokacija Poreč. Najveći udio ukupnih fenola u uzorcima stabljike komorača određen je također na lokaciji Plomin, dok je najveći udio klorofila i karotenoida određen za lokaciju Raša. U zaključku, rezultati ovog istraživanja pokazuju da fenotipska faza, jednako kao i lokacija uzgoja komorača utječu na akumulaciju bioaktivnih spojeva lista i stabljike biljke.

**Ključne riječi:** komorač, fenotipska faza, lokalitet, ukupni fenoli, karotenoidi, klorofili, ASE ekstrakcija

**Rad sadrži:** 41 stranica, 13 slika, 5 tablica, 52 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević

**Pomoć pri izradi:** Valentina Kruk, mag. ing. techn. aliment.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac
2. Izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević
3. Doc. dr. sc. Maja Repajić
4. Doc. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino (zamjena)

**Datum obrane:**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Food Engineering

Laboratory for Chemistry and Technology of Fruits and Vegetables

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### INFLUENCE OF PHENOTYPIC PHASE AND DIFFERENT GROWING LOCATIONS ON ACCUMULATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN FENNEL LEAVES AND STEMS (*Foeniculum vulgare* Mill.)

Sara Jurić, 1925/USH

**Abstract:** *The aim of this study was to determine the influences of the phenotypic phase and different growing locations on the yield of bioactive compounds in the leaf and stem of wild fennel (Foeniculum vulgare Mill.). Fennel samples were collected in the periods before and after flowering at five different locations in Istria (Poreč, Raša, Plomin, Vodnjan, Valmade). Extraction of bioactive compounds was performed using Accelerated Solvent Extraction (ASE), whereas in the obtained extracts total phenols, carotenoids and chlorophylls were determined spectrophotometrically. In leaf samples, a higher proportion of total phenols was determined in the 2<sup>nd</sup> phenotypic phase, while the contents of carotenoids and chlorophylls were higher in the 1<sup>st</sup> phenotypic phase. In stem samples, it was found that the proportions of all determined bioactive compounds were higher in the 2<sup>nd</sup> phenotypic phase as compared to the 1<sup>st</sup> phenotypic phase. Considering the influence of the growing location, it can be seen that the Plomin was found as the location with the highest amount of total phenols, and the location Poreč with the highest amounts of chlorophylls and carotenoids in the leaf samples. The highest content of total phenols in stem samples was also determined at the Plomin, while the highest content of chlorophylls and carotenoids was determined for the Raša location. In conclusion, the results of this study has demonstrated that the phenotypic phase, as well as the growing location of the fennel affect the accumulation of bioactive compounds of leaves and stems of the plant.*

**Keywords:** *fennel, phenotypic phase, growing location, total phenols, carotenoids, chlorophylls, ASE extraction*

**Thesis contains:** 41 pages, 13 figures, 5 tables, 52 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** *PhD Danijela Bursać Kovačević, Associate professor*

**Technical support and assistance:** *Valentina Kruk, mag. ing. techn. aliment.*

#### Reviewers:

1. PhD *Verica Dragović-Uzelac*, Full professor
2. PhD *Danijela Bursać Kovačević*, Associate professor
3. PhD *Maja Repajić*, Assistant professor
4. PhD *Antonela Ninčević Grassino*, Assistant professor

**Thesis defended:**



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. KOMORAČ ( <i>Foeniculum vulgare</i> Mill.) .....	2
2.2. LJEKOVITA SVOJSTVA KOMORAČA .....	3
2.3. KEMIJSKI SASTAV KOMORAČA .....	6
2.4. BIOAKTIVNI SPOJEVI KOMORAČA .....	8
2.4.1. Kemijska struktura i svojstva fenolnih spojeva komorača .....	9
2.4.2. Kemijska struktura i svojstva klorofila i karotenoida komorača .....	11
2.5. UTJECAJ UVJETA UZGOJA NA KVALITETU KOMORAČA .....	13
2.6. PRIMJENA INOVATIVNIH EKSTRAKCIJSKIH TEHNOLOGIJA U VREDNOVANJU KOMORAČA – UBRZANA EKSTRAKCIJA OTAPALIMA .....	15
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	18
3.1. MATERIJALI.....	18
3.1.1. Uzorak komorača .....	18
3.1.2. Priprema uzorka komorača .....	19
3.2. METODE RADA .....	20
3.2.1. Aparatura i pribor .....	20
3.2.2. Otapala i reagensi .....	20
3.2.3. Izolacija bioaktivnih spojeva iz uzoraka komorača primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak (ASE ekstrakcija).....	21
3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola .....	22
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	26
4.1. UTJECAJ FENOTIPSKIH FAZA NA UDJELE UKUPNIH FENOLA, UKUPNIH KAROTENOIDA TE UKUPNIH Klorofila U LISTU SAMONIKLOG KOMORAČA S RAZLIČITIH LOKALITETA .....	26
4.1.1. Utjecaj fenotipskih faza na udjele ukupnih fenola u listu samoniklog komorača s različitih lokaliteta .....	26
4.1.2. Utjecaj fenotipskih faza na udjele ukupnih karotenoida u listu samoniklog komorača s različitih lokaliteta .....	28
4.1.3. Utjecaj fenotipskih faza na udjele ukupnih klorofila u listu samoniklog komorača s različitih lokaliteta .....	29
4.2. UTJECAJ FENOTIPSKIH FAZA NA UDJELE UKUPNIH FENOLA, UKUPNIH KAROTENOIDA TE UKUPNIH Klorofila U STABLJICI SAMONIKLOG KOMORAČA S RAZLIČITIH LOKALITETA .....	30
4.2.1. Utjecaj fenotipskih faza na udjele ukupnih fenola u listu samoniklog komorača s različitih lokaliteta .....	30
4.2.2. Utjecaj fenotipskih faza na udjele ukupnih karotenoida u stabljici samoniklog komorača s različitih lokaliteta .....	32
4.2.3. Utjecaj fenotipskih faza na udjele ukupnih klorofila u stabljici samoniklog komorača s različitih lokaliteta .....	33
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	35
<b>6. LITERATURA</b> .....	36

## 1. UVOD

Komorač (*Foeniculum vulgare* Mill.) je samonikla biljka porijeklom iz južnog dijela Mediteranske regije koja se u vremenu procesom naturalizacije proširila i na druge kontinente. Komorač pripada porodici štitarki (*Apiaceae, Umbelliferae*), a može se podijeliti u varijetete *vulgare, piperitum* i *dulce*. Svi dijelovi biljke (korijen, stabljika, list, plod) su nutritivno i biološki vrlo vrijedni zbog prisutnosti različitih bioaktivnih spojeva, pa se komorač zahvaljujući svojim ljekovitim svojstvima danas vrlo često uzgaja i koristi u fitoterapiji i kulinarstvu.

Komorač je visokovrijedna namirnica koja sadrži veliki udio ugljikohidrata, masnih kiselina, vitamina i minerala, a u raznim istraživanjima iz različitih dijelova biljke izolirani su sekundarni metaboliti poput fenolnih spojeva, masnih kiselina i hlapivih spojeva. Fenolni spojevi, jedna od najčešće zastupljenih skupina bioaktivnih spojeva s antioksidacijskim djelovanjem, identificirani su u ekstraktima komorača, od kojih najveći udio pokazuju fenolne kiseline i flavonoidi. Pigmenti klorofili i karotenoidi, također od velikog biološkog značaja, identificirani su u različitim dijelovima biljke komorača, posebice u listu. Udio i sastav bioaktivnih spojeva u ekstraktima uvelike ovise o zemljopisnom podrijetlu, sortimentu, poljoprivrednoj praksi, ali i o terminu berbe odnosno zrelosti biljke, dijelu biljke i postupku ekstrakcije. Jedna od inovativnih tehnologija koja se koristi u izolaciji bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala jest ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (eng. *Accelerated Solvent Extraction, ASE* ekstrakcija). ASE ekstrakcija je potpuno automatizirana tehnika ekstrakcije koja koristi uobičajena tekuća otapala na povišenim temperaturama i tlakovima. Neke od prednosti ASE tehnologije naspram konvencionalne ekstrakcije jest širok spektar primjene uz manji utrošak vremena, otapala i energije te bolja učinkovitost i efikasnost procesa.

Nastavno na sve navedeno, cilj ovog rada je istražiti utjecaj fenotipske faze (prije i poslije cvatnje) te različitih lokaliteta uzgoja na akumulaciju bioaktivnih spojeva iz liofiliziranog lista i stabljike komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.). Izolacija bioaktivnih spojeva je provedena primjenom ASE ekstrakcije, a u dobivenim ekstraktima spektrofotometrijski su određivani ukupni fenoli, ukupni karotenoidi i klorofili. Za istraživanje su korišteni uzorci samoniklog komorača ubrani na pet različitih lokacija u Istri (Poreč, Raša, Plomin, Vodnjan, Valmade).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KOMORAČ (*Foeniculum vulgare* Mill.)

Komorač (*F. vulgare*) je biljka porijeklom iz južnog dijela Mediteranske regije, a danas prirodno raste širom sjeverne, zapadne i istočne hemisfere (Napoli i sur., 2000). Komorač primarno raste u južnoj Europi (Francuska, Portugal, Španjolska, Albanija, Bugarska, Grčka, Italija, Hrvatska), Azorskim otocima, Kanarskim otocima, sjevernoj Africi i zapadnoj Aziji, te je široko rasprostranjen u Australiji. Također, komorač je prošao kroz proces naturalizacije u Ujedinjenom Kraljevstvu, južnoj Africi, SAD-u, Meksiku, te Srednjoj i Sjevernoj Americi (Grover i sur., 2013). U Indiji, komorač se najčešće uzgaja u državi Gujarat koja je i vodeći proizvođač komorača te izvozi proizvode u obliku sjemenki, praha i eteričnog ulja u SAD, Ujedinjene Arapske Emirate, Singapur, Ujedinjeno Kraljevstvo, Šri Lanku, Maleziju, Saudijsku Arabiju i Japan.

Komorač pripada porodici štitarki (*Apiaceae, Umbelliferae*), a ovisno o upotrebi i prisutnim kemijskim spojevima može se podijeliti u različite varijetete. Dva najvažnija varijeteta *F. vulgare* su *vulgare* i *piperitum*, gdje *piperitum* ima gorko sjeme, dok *vulgare* ima slatke sjemenke, a sadrži spojeve estragol, *trans*-anetol, limonen i fenkon, na temelju kojih se dijele različiti kemotipovi komorača. Suprotno tome, prema nekim drugim botaničarima, *F. vulgare* čine dva varijeteta. Jedan je slatki (*F. vulgare* var. *dulce*), koji je jednogodišnji ili dvogodišnji s malim plodovima slatkog okusa, a drugi je gorki varijetet (*F. vulgare* var. *vulgare*), koji je višegodišnji s plodovima koji imaju gorak okus (Grover i sur., 2013).

Komorač je razgranata biljka uspravnog rasta (slika 1) koja može narasti i do 2 m u visinu, a izgledom podsjeća na kopar. Stabljika je cilindrična, fino izbrazdana, u bazi donekle odrvenjela, a u gornjoj polovici razgranjena. Grane nose velike sastavljene štitaste žutozelene cvatove, koji se pojavljuju usporedno s rastom biljke. Svaki je sastavljeni štitac građen od 10 do 25 zrakastih jednostavnih štitaca i ima ovojni list. Jednostavni štitac također ima svoj ovojni listić i sastoji se od 15 do 30 cvjetića, građenih od po 5 latica i prašnika te podrasle plodnice s dva plodnička lista. Plod je kalavac s dva merikarpa (jednosjemena plodića = „sjemenka“) i ima karakteristična uzdužna rebra između kojih su udubine sa žlijezdama koje luče eterično ulje. Listovi su višestruko perasto razdijeljeni, nitastih liski vrlo nježne teksture, a lisni su rukavci produženi i obuhvaćaju stabljiku. Listovi mogu narasti do 40 cm dužine (Žutić, 2007).



**Slika 1.** Komorač (*Foeniculum vulgare* Mill.) (Anonymous 1)

## 2.2. LJEKOVITA SVOJSTVA KOMORAČA

Gotovo svi dijelovi komorača (stabljika, list, plod i sjemenke) koriste se u različitim oblicima u medicinske svrhe za prevenciju i/ili liječenje različitih oboljenja i poremećaja u organizmu (He i Huang, 2011). Hlapljivo ulje komorača ima svojstva analgetika, diuretika, djeluje protupalno, pomaže u pročišćavanju organizma te služi kao lijek za iskašljavanje. Sjemenke komorača se zbog svojih protuupalnih i antimikrobnih svojstava koriste kod anemije, bolova u želucu, kašlja, grlobolje, lošeg zadaha, kožnih bolesti, infekcija oka, infekcija desni, prekomjerne težine i mučnina (Bukhari i sur., 2014).

Eterično ulje sjemenki *F. vulgare* posjeduje snažan hepatoprotektivni učinak protiv akutne hepatotoksičnosti izazvane tetraklor-ugljikom u štakora, smanjujući razine aspartatne aminotransferaze u serumu (AST), alanin aminotransferaze (ALT), alkalne fosfataze (ALP) i bilirubina u usporedbi s kontrolnom skupinom za što su zaslužni spojevi D-limonen i  $\beta$ -mircen (Badgular i sur., 2014). Ulje sjemenki komorača također potiče lučenje hormona estrogena te se zbog toga koristi u liječenju menoragije, bolnih menstruacija i fibroma, ublažava simptome klimaksa kod žena te povećava libido.

Istraživanje provedeno na ženskim štakorima pokazalo je ukupno povećanje koncentracije nukleinskih kiselina i proteina u tkivima mliječne žlijezde i jajovoda te povećanje težine organa uslijed oralne primjene ekstrakta sjemenki komorača (50, 150 i 250  $\mu\text{g}$  100  $\text{g}^{-1}$  tjelesne težine) u vremenskom periodu od 10 dana (Badgular i sur., 2014).

U istraživanju provedenom na albino miševima ispitan je kemopreventivni učinak sjemenki komorača u nekoliko različitih doza na kožnu papilomagenezu izazvanu 7,12 dimetilbenz(a)antracenom-(DMBA) i papilomagenezu na želucu izazvanu spojem benz(a)piren-[B(a)P]-om. Sjemenke komorača su pokazale značajno smanjenje učestalosti tumora kože i tumora želuca u usporedbi s kontrolnom skupinom miševa čime je to prvo izvješće koje pokazuje kemopreventivni potencijal sjemenki komorača protiv kancerogeneze (Badgular i sur., 2014).

Plod komorača također pokazuje brojne zdravstvene benefite. Metanolni ekstrakt ploda komorača pokazao je značajni inhibitorni učinak na 2,4-dinitrofluorobenzenom (DNFB) izazvanu preosjetljivost odgođenog tipa nakon oralne primjene 200  $\text{mg kg}^{-1}$  težine jednom dnevno u vremenskom periodu od 7 dana, što sugerira imunosupresivna i antialergijska svojstva komorača.

Oralna primjena metanolnog ekstrakta ploda *F. vulgare* u štakora i miševa pokazala je inhibitorne učinke protiv akutnih i subakutnih upalnih bolesti. Za akutnu upalu, metanolni ekstrakt (200  $\text{mg kg}^{-1}$ ) pokazao je značajnu inhibiciju edema šape (69 %) induciranu ubrizgavanjem karagenana i edema uha u miševa (70 %) induciranu arahidonskom kiselinom, u usporedbi s kontrolnom skupinom (Badgular i sur., 2014).

Etanolni ekstrakt ploda komorača može se koristiti i u liječenju anksioznosti. Istraživanja su pokazala da doza od 100-200  $\text{mg}$  ekstrakta po kilogramu tjelesne težine životinja ima značajnu aktivnost u usporedbi s referentnim anksiolitičkim lijekom zvanim diazepam (1  $\text{mg kg}^{-1}$ ) (Badgular i sur., 2014). Etanolni ekstrakt ploda *F. vulgare* pokazao je izvrsnu diuretičku aktivnost i time dokazao raniju narodnu tvrdnju o komoraču kao izvrsnom diuretik. Diureza u miševa izazvana ekstraktom komorača (doza od 500  $\text{mg kg}^{-1}$ ) bila je usporediva s onom referentnog diuretičkog sredstva (doza 960  $\text{mg kg}^{-1}$ ) s količinom urina koja je bila gotovo dvostruka u odnosu na kontrolnu skupinu (Badgular i sur., 2014).

Komorač je vrlo vrijedna biljka za normalni rad probavnog sustava koja pomaže u ublažavanju gastritisa, grčeva, nadutosti i kiselosti organizma (Grover i sur., 2013). Vodeni ekstrakt *F. vulgare* pokazao je izvanredan antiulcerogeni učinak protiv želučanih lezija u štakora induciranih etanolom. Utvrđeno je da je uslijed tretmana ekstraktom ploda komorača

značajno smanjeno oštećenje želuca te je došlo do povećanja razine nitrita, nitrata, askorbinske kiseline, retinola i beta-karotena (Badgubar i sur., 2014).

Istraživanja su također pokazala da ekstrakt cijele biljke komorača pokazuje antistresni učinak, te da ima svojstvo povećavanja memorije. Primjenom doze ekstrakta od 50, 100 i 200 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne težine, razine vanilimandelične kiseline (VMA) i askorbinske kiseline u urinu štakora, koje su ključni parametri za procjenu antistresne aktivnosti, povećale su se u odnosu na iste u kontrolnim skupinama životinja, dok su iste doze ekstrakta pokazale učinak povećanja pamćenja kod štakora s amnezijom uzrokovanom skopolaminom (Badgubar i sur., 2014).

Vodeni ekstrakt *F. vulgare* pokazao je i značajan hipolipidemijski i antiaterogeni učinak protiv hipolipidemije izazvane Triton WR-1339 kod miševa smanjujući razine lipida u plazmi - kolesterola, triglicerida, LDL-kolesterola i apolipoproteina-B za 40 %, 23 %, 61 % i 61 %, te povećavajući HDL-kolesterol i apolipoprotein A1 za 85 %, odnosno 58 % (Badgubar i sur., 2014). Osim eteričnog ulja i ekstrakata plodova, vodeni ekstrakt lista komorača također ima medicinsku primjenu. Intravenozna primjena liofiliziranog ekstrakta listova, gdje je otapalo korišteno za ekstrakciju bila prokuhana voda, rezultirala je značajnim smanjenjem arterijskog krvnog tlaka, bez utjecaja na rad srca ili respiratornu frekvenciju, dok ekstrakti lista dobiveni vodom kao otapalom nisu pokazali značajno hipotenzivno djelovanje (Badgubar i sur., 2014).

Obzirom na to da je komorač vrlo aromatična biljka, osim u medicinske svrhe često se koristi i u kulinarstvu. Sjemenke komorača imaju slatkastu aromu sličnu anisu te se koriste u pripremi pekarskih proizvoda, mesnih i ribljih jela, alkoholnih pića te u mješavinama začina, a najbolje ih je koristiti dok su zelene. Pored sjemenki, gomolj komorača se također često koristi u Mediteranskoj kuhinji u obliku praha, kuhan, pirjan, pečen ili pak sirov u salatama, tjesteninama i jelima od povrća, te se također koristi i u Indiji te na području Bliskog istoka (Rather i sur., 2016).

U mnogim dijelovima Indije i Pakistana, pečene sjemenke komorača prekrivene šećerom koriste se u pripremi napitka "Mukhwass" koji se upotrebljava kao osvježivač usta, ili kao sredstvo za poticanje probave. Osim toga, prirodna svijetlo zelena boja dobivena od listova koristi se u kozmetici, za bojanje tekstila i drvenih materijala te kao prehrambena boja, dok se žute i smeđe boje dobivaju kombiniranjem cvjetova i lišća komorača (Badgubar i sur., 2014).

Komorač se osim u terapijske i kulinarske svrhe može koristiti i za rješavanje problema komaraca, insekticida, nematoda i vektora malarije; istraživanja su pokazala da ekstrakti *F. vulgare* imaju insekticidno, repelentno, akaricidno, larvicidno i nematocidno djelovanje (Badgubar i sur., 2014).

### 2.3. KEMIJSKI SASTAV KOMORAČA

Komorač se opisuje kao vrijedna dijetetska namirnica s niskim udjelom vlakana, bogata ugljikohidratima, šećerima, masnim kiselinama, vitaminima A, C, kompleksom vitamina B, te bogatim mineralnim sastavom među kojima se najviše ističu kalij i kalcij. Tablice 1, 2 i 3 prikazuju kemijski sastav, te najzastupljenije vitamine i minerale u komoraču.

**Tablica 1.** Kemijski sastav komorača (Lešić i sur., 2002)

<b>Tvar</b>	<b>Udio (%)</b>
Voda	81,9 – 90,0
Sirove bjelančevine	1,9 – 2,8
Sirove masti	0,2 – 0,4
Ugljikohidrati	5,11 – 11,2
Vlakna	0,5
Minerali	1,7

**Tablica 2.** Najznačajniji minerali komorača (Lešić i sur., 2002)

<b>Mineral</b>	<b>Vrijednost (mg 100 g<sup>-1</sup> svježe tvari)</b>
Kalij	339 – 612
Magnezij	0 - 49
Kalcij	100 – 117
Željezo	0 - 2,7
Fosfor	0 - 61

**Tablica 3.** Najzastupljeniji vitamini u komoraču (Lešić i sur., 2002)

<b>Vitamin</b>	<b>Vrijednost (mg 100 g<sup>-1</sup> svježe tvari)</b>
Beta karoten	1,05 – 7,8
Vitamin B1	0,10 – 0,35
Vitamin B2	0,02 – 0,20
Vitamin B3	0 - 0,20
Vitamin B6	0 - 0,10
Folna kiselina	0,09 – 0,10
Vitamin C	60 - 120
Vitamin E	6,0
Vitamin K	3,2

U tablici 4 su prikazane razlike u sastavu makronutrijenata između lista i stabljike svježeg komorača koje nisu značajno velike. Najveći udio pepela utvrđen je u listu (3,43 g 100 g<sup>-1</sup> svježe tvari), dok je najmanja vrijednost utvrđena u stabljici (1,62 g 100 g<sup>-1</sup> svježe tvari), što potvrđuje ranija istraživanja znanstvenika o većim razinama minerala u listu nego u plodu komorača.

**Tablica 4.** Sastav makronutrijenata te energetska vrijednost lista i stabljike svježeg komorača (Barros i sur., 2010)

<b>Makronutrijenti (g 100 g<sup>-1</sup> svježe tvari)</b>	<b>List</b>	<b>Stabljika</b>
Voda	76,36	77,46
Pepeo	3,43	1,62
Masti	0,61	0,45
Proteini	1,16	1,08
Ugljikohidrati	18,44	19,39
Reducirajući šećeri	0,72	1,49
<b>Energetska vrijednost (kcal 100 g<sup>-1</sup> svježe tvari)</b>	83,90	85,91



## 2.4. BIOAKTIVNI SPOJEVI KOMORAČA

Fitokemijskim istraživanjima provedenim na komoraču iz različitih dijelova biljke izolirani su sekundarni metaboliti poput fenolnih spojeva, hlapljivih spojeva, masnih kiselina i ugljikovodika, a većina ovih spojeva pronađena je u eteričnom ulju. Sastav eteričnog ulja ovisi o unutarnjim, vanjskim, tj. okolišnim uvjetima i poljoprivrednoj praksi, kao i o ostalim faktorima koji utječu na biljku, poput genetike i ekoloških uvjeta. Faze sazrijevanja su također vrlo važan čimbenik koji utječe na sastav eteričnog ulja, dok prikladna poljoprivredna praksa pomaže u poboljšanju prinosa i kvalitete (Shahat i sur., 2011).

U eteričnom ulju komorača pronađeno je više od 87 hlapljivih spojeva, od kojih su najzastupljeniji *trans*-anetol (50-80 %), estragol (4-15 %), limonen (3-8 %) i fenkon (1-8 %). Razlike u udjelu i sastavu eteričnog ulja komorača mogu se pripisati različitom zemljopisnom podrijetlu biljke, sortimentu, zrelosti ploda, kao i načinu ekstrakcije i uvjetima analize eteričnog ulja komorača (Diao i sur., 2014). Plod komorača prosječno sadrži od 10 do 12 % ulja, koje je skladišteno u kotiledonu sjemenki. Ulje dobiveno iz sjemenki ploda komorača sadrži 4 % palmitinske kiseline, 22 % oleinske kiseline, 14 % linolne kiseline i 6 % petrozelske kiseline (Kooti i sur., 2015).

Fenolni spojevi prisutni u komoraču su flavonoidi, fenolne kiseline (hidroksicimetne kiseline; ružmarinska), kumarini i tanini, a udio ukupnih fenola u komoraču iznosi 0,68 mg GAE g<sup>-1</sup> svježe mase (Zheng i sur., 2001). Pronađeni su i različiti derivati fenolnih kiselina poput 3-*O*-, 4-*O*- i 5-*O*-kafeoil kininske kiseline, te 1,3-*O*, 1,4-*O* i 1,5-*O*-di-kafeoil kininske kiseline. Među najzastupljenijim flavonoidima izdvajaju se eriocitrin i rutin (kvercetin-3-rutinozid).

Vodeni ekstrakt ploda komorača također sadrži i kvercetin-3-galaktozid, kvercetin-3-glukuronid, kamferol-3-rutinozid, kamferol-3-glukozid, kamferol-3-glukuronid, izokvercetin, i izorhamnetin-3-glukozid (Kooti i sur., 2015).

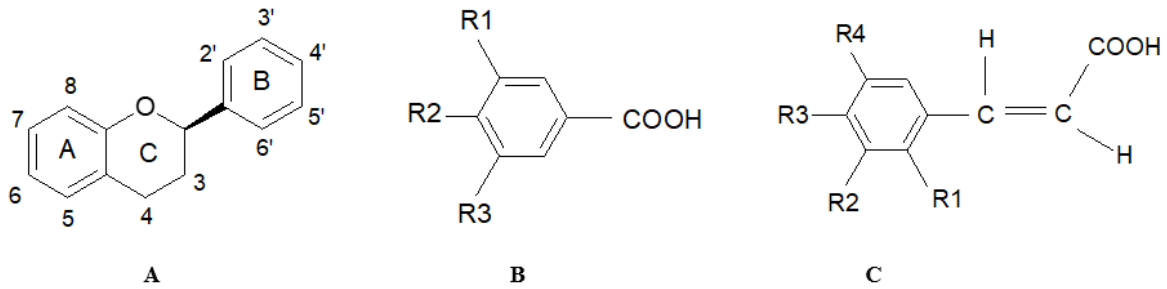
Teimoori-Boghsani i sur. (2018) u svome su radu istraživali fitokemijska i antioksidacijska svojstva metanolnih ekstrakata različitih dijelova biljke komorača. Ukupni antocijani, karotenoidi, ukupni fenoli i flavonoidi određeni su spektrofotometrijski, dok je sadržaj kafeinske kiseline, klorogenske kiseline i kvercitina određen HPLC-om. Ukupan sadržaj fenola bio je najveći u fazi cvatnje. Nadalje, u cvjetovima (53,55 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t.) i lišću (30,37 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t.) bio je veći u usporedbi sa stabljikom (6,04 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t.) i korijenom (5,91 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t.), a sadržaj fenola u plodu iznosio je 24,18 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t. Najveće količine flavonoida određene su u cvjetovima u fazi cvatnje (7,71 mg QE g<sup>-1</sup> s.t.) i lišću (5,55 mg QE g<sup>-1</sup> s.t.) u vegetativnoj fazi. Ukupni sadržaj antocijana pokazao je dinamičnu promjenu

u različitim fazama rasta i razvoja biljke. Najveća količina antocijana zabilježena je u lišću u fazi cvatnje ( $7,56 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ ), dok je najmanja količina zabilježena u stabljici ( $1,52 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ ), i korijenu ( $1,49 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ ) u vegetativnoj fazi, a najveći udio karotenoida je zabilježen u lišću komorača ( $5,15 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ ) u vegetativnoj fazi. Rezultati istraživanja su pokazali da je kafeinska kiselina bila najviše zastupljena u cvjetovima ( $0,05 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ ), zatim u lišću u fazi cvatnje ( $0,02 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ ). Klorogenska kiselina bila je najzastupljenija u lišću u vegetativnoj fazi ( $5,98 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ ) i cvjetovima ( $2,85 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ ). Sadržaj kvercetina u uzorcima bio je vrlo nizak i zanemariv (Teimoori-Boghsani i sur., 2018).

#### 2.4.1. Kemijska struktura i svojstva fenolnih spojeva komorača

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti te jedna od najčešće zastupljenih skupina fitokemikalija koji doprinose biološkoj vrijednosti i senzorskim karakteristikama biljaka. Osnovu strukture čini aromatski prsten koji nosi jednu ili više hidroksilnih skupina, a njihove strukture mogu se kretati od jednostavne fenolne molekule do strukture složenog polimera visoke molekulske mase. Fenolni spojevi sadrže široki raspon molekula koje imaju polifenolnu strukturu (tj. nekoliko hidroksilnih skupina na aromatskim prstenovima), ali i molekule s jednim fenolnim prstenom, poput fenolnih kiselina i fenolnih alkohola (Ignat i sur., 2011).

Polifenoli se obzirom na kemijsku strukturu dijele na flavonoide, fenolne kiseline, tanine (hidrolizirajući i kondenzirani), stilbene i lignane. Flavonoidi nastaju u biljkama od aromatskih aminokiselina fenilalanina i tirozina te malonata. Osnovnu strukture flavonoida čini jezgra flavana koja se sastoji od 15 atoma ugljika raspoređenih u tri prstena (C6-C3-C6), koji su označeni kao A, B i C (Pietta, 2000) (slika 2 A). Flavonoidi se mogu podijeliti u različite podskupine ovisno o tome na koji atom ugljika prstena C je vezan prsten B, te o stupnju zasićenja i oksidacije prstena C (Panche i sur., 2016). Flavonoidi se prema tome klasificiraju na antocijane, flavone, izoflavone, flavanone, flavonole i flavanole, a fenolne kiseline se sastoje od dvije podskupine, hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina (slika 2B i 2C).



**Slika 2.** Kemijska struktura flavonoida (A), hidroksibenzojevih (B) i hidroksicimetnih kiselina (C) (De la Rosa i sur., 2019)

Hidroksicimetne kiseline su aromatski spojevi s bočnim lancem od tri ugljika (C6-C3), a najčešći predstavnici su kafeinska, ferulinska, *p*-kumarinska i sinapinska kiselina, dok hidroksibenzojeve kiseline uključuju galnu, *p*-hidroksibenzojevu, protokatehinsku, vanilinsku i siriginsku kiselinu, koje posjeduju strukturu C6-C1.

U listu komorača je identificiran veliki broj različitih fenolnih spojeva, čija koncentracija uvelike ovisi o terminu berbe biljke. Pacifico i sur. (2015) su proveli kvalitativnu i kvantitativnu analizu LC/MS/MS metodom na hidroalkoholnim ekstraktima liofiliziranog lišća komorača iz Italije, sakupljenim kroz sva četiri godišnja doba. Zimski uzorak bio je najbogatiji fenolnim spojevima, sadržavao je nekoliko derivata hidroksicinamoil-kininskih kiselina i flavonol-glikozida te dva derivata kromona (benzo- $\gamma$ -pirona), dok je u ljetnom uzorku bio prisutan najmanji sadržaj metabolita, a dominantni sastojci su bili flavonoli heksuronidi. Derivati kromona bili su prisutni u najvećim udjelima, od 20,49 i 37,10 mg GAE 100 g<sup>-1</sup>, zatim kvercetin-3-*O*-heksuronid 27,13 mg GAE 100 g<sup>-1</sup>, te naposljetku 3-*O*-kafeoil kininska kiselina i kamferol-3-*O*-heksuronid u koncentraciji 8,60 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> (Pacifico i sur., 2015).

Salami i sur. (2016) su istraživali kemijski sastav i antioksidacijsko djelovanje četiri populacije komorača (Engleska, Poljska, Španjolska i Iran) tijekom šest razvojnih faza, uključujući dvije vegetativne i četiri reproduktivne faze. Udio ukupnih fenola lišća u prvoj vegetativnoj fazi iznosio je 98, 87, 11 i 38,8 mg TAE (ekvivalenta taninske kiseline) g<sup>-1</sup>, dok je u drugoj vegetativnoj fazi iznosio 90,2, 83,2, 10,2 i 44,4 mg TAE g<sup>-1</sup>. Udio ukupnih flavonoida lišća u prvoj vegetativnoj fazi iznosio je 5, 4, 3 i 7,2 mg QE g<sup>-1</sup>, dok je u drugoj vegetativnoj fazi iznosio 5,5, 4,3, 3,2, 7,5 mg QE g<sup>-1</sup> (Salami i sur., 2016). Iz ovih podataka vidljivo je da u drugoj vegetativnoj fazi pada koncentracija ukupnih fenola, dok se koncentracija ukupnih flavonoida povećava. Tijekom prve vegetativne faze sekundarna stanična stijenka nije

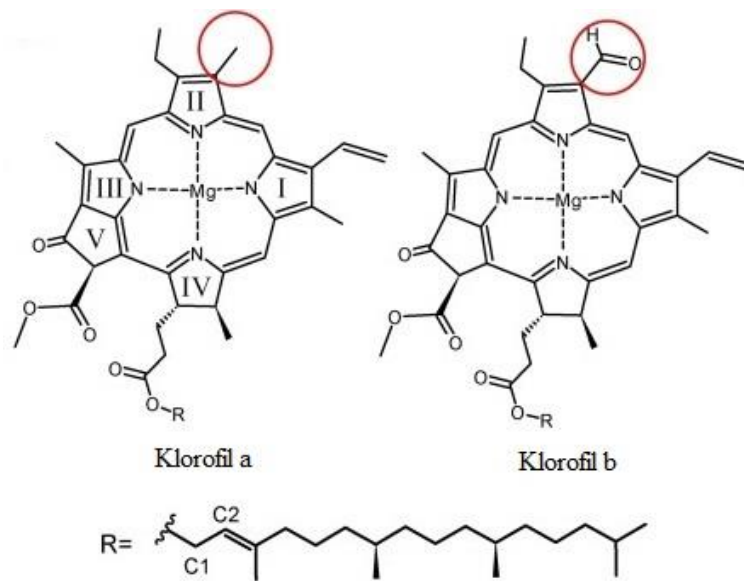
u potpunosti razvijena, stoga biljke u ovoj fazi akumuliraju više fenolnih spojeva da bi razvile svoju sekundarnu staničnu stijenku, čime se može objasniti veća koncentracija ukupnih fenola u prvoj vegetativnoj fazi. Uzevši u obzir različite zemljopisne lokacije s kojih su uzorci sakupljeni, može se također pretpostaviti da područja vruće i suhe klime, kao što je Iran, pogoduju proizvodnji većeg udjela fenola i flavonoida, no potrebna su daljnja istraživanja za potvrdu ove hipoteze (Salami i sur., 2016.)

Ferioli i sur. (2017) kvalitativno i kvantitativno su određivali fenolni sastav samoniklog komorača s područja Italije u tri termina bebe, a u listu je identificirano i kvantificirano sedam fenolnih spojeva pomoću HPLC-a. Udio ukupnih fenola u listu iznosio je 4234, 4309 i 4159 mg kg<sup>-1</sup> s.t., a flavonoli su predstavljali glavnu fenolnu komponentu u svim biljnim dijelovima, pa tako i u listu. Udio flavonola u listu iznosio je 0,389, 0,427 i 0,351 mg mg<sup>-1</sup>, udio hidroksicimetnih kiselina 0,354, 0,337, 0,371 mg mg<sup>-1</sup>, a udio dikafeoilkininske kiseline 0,257, 0,237, 0,278 mg mg<sup>-1</sup>. Nadalje, identificirane su i kvantificirane četiri hidroksicimetne kiseline: klorogenska kiselina (0,214 mg mg<sup>-1</sup>), kriptoklorogenska kiselina (0,06 mg mg<sup>-1</sup>), 5-feruloilkininska kiselina (0,123 mg mg<sup>-1</sup>) i derivat feruloilkininske kiseline (0,011 mg mg<sup>-1</sup>); jedna dikafeoilkininska kiselina: 1,4-*O*-dikafeoilkininska (0,257 mg mg<sup>-1</sup>); i dva flavonola: kvercetin-3-*O*-glukuronid (0,138 mg mg<sup>-1</sup>) i kamferol-3-*O*-glukuronid (0,251 mg mg<sup>-1</sup>) (Ferioli i sur., 2017).

Madhu i sur. (2016) su proveli ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz stabljike samoniklog komorača podrijetlom iz Indije primjenom četiri različita otapala - voda, aceton, petroleter i kloroform. Od sva četiri korištena otapala, u vodenom ekstratu stabljike komorača pronađeni su flavonodi u koncentraciji 115,33 µg mg<sup>-1</sup> ekstrakta, a u petroleter ekstraktu u koncentraciji 156,40 µg mg<sup>-1</sup> ekstrakta, dok u ekstraktima dobivenim drugim otapalima flavonoidi nisu identificirani.

#### 2.4.2. Kemijska struktura i svojstva klorofila i karotenoida komorača

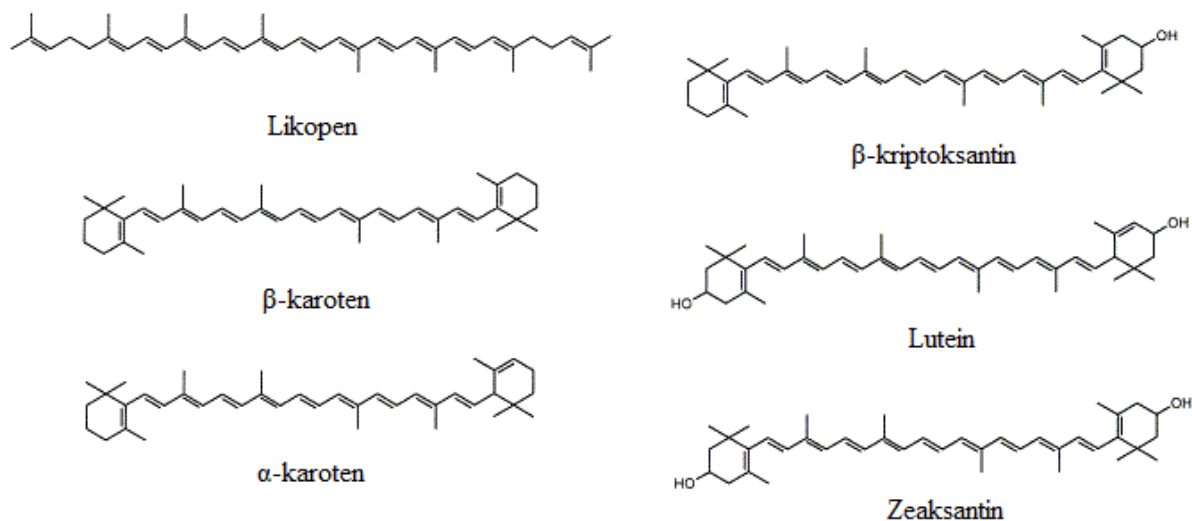
Klorofil je najrasprostranjeniji prirodni pigment zastupljen u lišću i ostalim dijelovima gotovo svih biljaka, osim u najjednostavnijim i najprimitivnijim oblicima. Osnovu strukture klorofila čini prstenasta struktura porfirina koji se sastoji od četiri pirolska prstena i jednog izocikličkog prstena, s atomom magnezija u središtu i različitim kemijskim skupinama vezanim na prsten (slika 3). Klorofili *a* i *b* u biljkama koegzistiraju zajedno u omjeru 3:1 s dominantnim klorofilom *a*, a razlikuju se u skupini supstituenta na prstenu B. Klorofil *a* ima metilnu skupinu na prstenu B, plavo-zeleniju boju i manju stabilnost od klorofila *b* s aldehidnom skupinom na prstenu B (Humphrey, 2006).



**Slika 3.** Kemijska struktura klorofila *a* i klorofila *b* (Saito i sur., 2018)

Karotenoidni spojevi, zvani još i tetraterpenoidi, organski su pigmenti topljivi u mastima koji biljkama daju karakterističnu boju od svijetlo žute preko narančaste do jarko crvene, a ugrađeni su u membrane kloroplasta i kromoplasta. Karotenoidi su prisutni u biljnim fotosintetskim tkivima, gdje imaju bitne uloge u apsorpciji svjetlosti i fotozaštiti biljke, kao i u nefotosintetičkim tkivima, gdje djeluju kao antioksidansi, bojila, prekursori izoprenoidnih hlapivih tvari, signalnih molekula i vitamina A (Giuliano, 2014). Osnovna kemijska struktura karotenoida je bazirana na osam izoprenskih jedinica, s konjugiranim dvostrukim vezama u ugljikovodičnom lancu koje služe u zaštiti fotosintetskih organizama od potencijalno štetnih fotooksidativnih procesa (slika 4).

Postoji više od 750 poznatih karotenoida koji se, obzirom na razlike u kemijskoj strukturi, mogu klasificirati u dvije grupe; karoteni, koji sadrže samo ugljikovodični lanac bez funkcijske skupine, a glavni predstavnici su likopen i  $\beta$ -karoten, te ksantofili, koji sadrže kisik kao dio funkcijske skupine, a glavni su predstavnici zeaksantin, astaksantin i lutein (Popović, 2018).



**Slika 4.** Kemijska struktura nekih važnijih karotenoida (Oliver i Paulo, 2000)

Obzirom na biološki značaj klorofila i karotenoida, prema navodima nekoliko znanstvenih istraživanja vidljivo je da su ovi pigmenti određivani i u komoraču. Ukupni klorofili, klorofil *a*, klorofil *b* i karotenoidi određivani su u ekstraktima lista komorača u istraživanju Parmoon i sur. (2018). Udio ukupnih klorofila iznosio je  $2,23 \text{ mg g}^{-1}$ , klorofila *a*  $1,7 \text{ mg g}^{-1}$ , klorofila *b*  $0,53 \text{ mg g}^{-1}$  i karotenoida  $0,55 \text{ mg g}^{-1}$  svježe mase, dok je u istraživanju Zali i sur. (2018) udio ukupnih klorofila u listu komorača iznosio  $1,1 \text{ mg g}^{-1}$ , a udio karotenoida  $0,18 \text{ mg g}^{-1}$  svježe mase. Askari i Ehsanzadeh (2015) u svom su istraživanju također određivali ukupne klorofile, klorofil *a*, klorofil *b* i karotenoide u listu šest različitih genotipa komorača iz Irana, a zabilježene su sljedeće koncentracije: ukupni klorofili  $0,73\text{-}0,93 \text{ mg g}^{-1}$ , klorofil *a*  $0,55\text{-}0,67 \text{ mg g}^{-1}$ , klorofil *b*  $0,18\text{-}0,5 \text{ mg g}^{-1}$  i karotenoidi  $0,25\text{-}0,30 \text{ mg g}^{-1}$  svježe mase.

## 2.5. UTJECAJ UVJETA UZGOJA NA KVALITETU KOMORAČA

Važni čimbenici od iznimnog utjecaja na kvalitetu same biljke su okolišne i ekološke karakteristike regije u kojoj biljka raste koje aromatičnim biljkama daju određenu specifičnost, a koja se očituje u nutritivnim i/ili organoleptičkim svojstvima upravo zbog svojstvenog kemijskog sastava biljke (Pateiro i sur., 2020). Sastav eteričnog ulja biljke određuje vrsta, sorta, agronomski uvjeti rasta, vrijeme berbe i naposljetku način obrade biljke (Shahat i sur., 2012).

Shahat i sur. (2012) u svom su radu izvijestili o razlikama u kemijskom sastavu eteričnog ulja nadzemnih dijelova kultiviranog i samoniklog komorača uzgojenih u Egiptu. GC-MS analizom eteričnih ulja utvrđeno je da kultivirani komorač sadrži puno veće udjele svih

komponentata eteričnog ulja, posebice *trans*-anetola (14,84 %), estragola (15,33 %), fenkona (5,91 %),  $\alpha$ -pinena (32,82 %) i  $\beta$ -pinena (2,09 %), dok samonikli komorač sadrži puno veće količine limonena (84,49 %).

Abdellaoui i sur. (2020) su proučavali utjecaj domestikacije na prinos, fitokemijski profil i antiradikalno djelovanje eteričnog ulja dobivenog iz sjemenki samoniklog i kultiviranog komorača iz Maroka. Prva razlika uočena je kod prinosa sjemenki biljke, gdje je kod samoniklog komorača prinos iznosio 10,98 g, a kod kultiviranog 9,14 g po biljci. Udio eteričnog ulja sjemenki kod samoniklog komorača bio je također veći, a iznosio je 3,67 %, dok je kod kultiviranog iznosio 2,13 %. U istraživanju je određivan i udio ukupnih fenola koji je kod samoniklog komorača iznosio 222,24 mg GAE mL<sup>-1</sup>, a kod kultiviranog komorača 139,68 mg GAE mL<sup>-1</sup>, gdje je opet primjećena veća biološka vrijednost samoniklog komorača naspram kultiviranog. Razlika u sadržaju fenolnih spojeva između eteričnog ulja sjemenki samoniklog i kultiviranog komorača može se objasniti činjenicom da biljke proizvode sekundarne metabolite (uključujući fenolne spojeve) kako bi se obranile od različitih prirodnih stresora, uključujući abiotske čimbenike, koji su mnogo više prisutni kod rasta samoniklog u odnosu na kultivirani komorač (Abdellaoui i sur., 2020). Nadalje, GC-MS metodom provedena je kvantitativna i kvalitativna analiza uzoraka, te je identificiran ukupno 21 spoj u eteričnim uljima, a kao najzastupljeniji su izdvojeni estragol (60,01 - 35,33 %), anetol (22,15 - 52,27 %) i fenkon (6,50 - 4,32 %). Kvalitativne razlike u identificiranim spojevima i njihovom ukupnom broju nisu zabilježene između kultivirane i samonikle biljke, no uvjeti uzgoja utjecali su na udio pojedinih identificiranih spojeva. Prema Abdellaoui i sur. (2020), kultivirani komorač sadrži najveći udio estragola (60,01 %), zatim anetola (22,15 %), fenkona (6,5 %) i  $\alpha$ -pinena (3,85 %), dok je kod samoniklog komorača zabilježen najveći udio anetola (52,27 %), a slijede estragol (35,33 %), fenkon (4,32 %) i  $\alpha$ -pinen (2,01 %).

Conforti i sur. (2006) su određivali kemijski sastav i antioksidacijsku aktivnost sjemenki samoniklog i kultiviranog komorača te utvrdili određene razlike. Udio ukupnih fenola metanolnog ekstrakta sjemenki samoniklog komorača iznosio je 151 mg g<sup>-1</sup> ekstrakta, dok je udio ukupnih fenola sjemenki kultiviranog komorača iznosio 100 mg g<sup>-1</sup> ekstrakta.

Tijekom uzgoja komorača, postoji niz endogenih i egzogenih faktora koji mogu pozitivno ili negativno utjecati na samu kvalitetu biljke. Korištenjem komposta pri gnojidbi, udio anetola u eteričnom ulju može se povećati za 10-36 % ovisno o varijetetu (Senatore i sur., 2013), dok dodatak NaCl u vodu pri navodnjavanju utječe na povećanje udjela eteričnog ulja u komoraču, no istovremeno se smanjuje broj sjemenki u biljci te udio klorofila (Rahimi i sur., 2012). Nedostatak vode u tlu uvelike utječe na kvalitetu komorača na način da smanjuje udio

klorofila i sjemenki u biljci, no istovremeno povećava udio topljivih ugljikohidrata, karotenoida i eteričnog ulja iz sjemenki komorača (Askari i Eshanzadeh 2015). Osim toga, deficit vode dovodi do značajnog povećanja polifenola u listu, prolina i ukupnih topljivih ugljikohidrata (Zali i Ehsanzadeh, 2018). Dodatak prolina, aminokiseline koja se akumulira u biljnim stanicama i učinkovito sudjeluje u toleranciji biljke na stres, rezultira značajnim porastom udjela karotenoida, polifenola, klorofila, ukupnih topljivih ugljikohidrata i eteričnog ulja komorača (Zali i Ehsanzadeh, 2018).

## 2.6. PRIMJENA INOVATIVNIH EKSTRAKCIJSKIH TEHNOLOGIJA U VREDNOVANJU KOMORAČA – UBRZANA EKSTRAKCIJA OTAPALIMA

Inovativne tehnologije ekstrakcije, kakve se danas sve više primjenjuju i ispituju, odlikuju se brojnim prednostima pred dosad korištenim konvencionalnim tehnologijama (Dimić i sur., 2020, Putnik i sur., 2018). Ubrzana ekstrakcija otapalima (eng. *Accelerated Solvent Extraction*, ASE) predstavljena je 1995. godine od kompanije Dionex (Mottaleb i Sarker, 2012). Riječ je o potpuno automatiziranoj tehnici ekstrakcije koja koristi uobičajena otapala na povišenoj temperaturi i tlaku, čime se značajno pospješuje učinkovitost i efikasnost procesa. Pri temperaturama iznad normalnog vrelišta većine otapala uz povišeni tlak (cca 10 MPa) omogućava se prisustvo otapala u tekućem obliku, koje u ovakvim uvjetima ekstrakcije ima poboljšanu ekstrakcijsku učinkovitost naspram istog otapala pri klasičnim konvencionalnim toplinskim postupcima (Bursać Kovačević i sur., 2018). Povećana temperatura ubrzava kinetiku ekstrakcije, a povišeni tlak drži otapalo ispod svoje točka vrenja, omogućivši brzu, sigurnu i učinkovitu ekstrakciju ciljanih analita (Mottaleb i Sarker, 2012).

Korištenjem povišene temperature povećava se kapacitet otapala za otapanje analita, povećava se brzina difuzije, smanjuje se viskoznost otapala pa ono lakše prodire kroz pore matriksa te dolazi do slabljenja van der Waalsovih sila, vodikovih veza i dipolnog privlačenja između otopljene tvari i matrice uzorka, što rezultira lakšim izdvajanjem analita iz matrice. Međutim, samo povišenje temperature ne može biti dovoljno za povećanje učinkovitosti ekstrakcije jer mnoga organska otapala koja se koriste u ekstrakciji vriju na relativno niskim temperaturama, te je jedan od načina za prevladavanje ovog problema vršenje dovoljnog pritiska na otapalo tijekom ekstrakcije čime se sve prednosti rada na povišenoj temperaturi mogu ostvariti čak i s otapalom relativno niskog vrelišta. Osim toga, prolaz otapala kroz matriks lakši je pri povišenom tlaku, stoga se cijeli proces odvija brže (Putnik i sur., 2017).

Neke od prednosti ASE ekstrakcije uključuju ekstrakciju uzorka veličine 1–100 g u kratkom vremenskom periodu (15-25 minuta), smanjenje volumena korištenog otapala, širok



spektar primjena i rukovanje kiselim i lužnatim matricama uzorka. Tijekom posljednjih pet godina, ova inovativna tehnika uspješno se koristi za ekstrakciju različitih klasa prirodnih proizvoda, npr. alkaloida, fenola, steroida i terpenoida (Repajić i sur., 2020, Mottaleb i Sarker, 2012).

Rodriguez-Solana i sur. (2014) u svom su istraživanju primijenili dvije tehnike ekstrakcije eteričnog ulja iz sjemenki komorača, ASE ekstrakciju i Soxhlet ekstrakciju, a dobiveni ekstrakti su okarakterizirani GC-MS analizom. Pri Soxhlet ekstrakciji korišteno je pet različitih otapala: heksan, dietil-eter, etil-acetat, metanol i etanol te dva različita vremena ekstrakcije: 4 i 8 h. Pri ASE ekstrakciji korišteni su različiti uvjeti temperature: 75 °C, 100 °C i 125 °C, zatim broj ciklusa: 1, 2 i 3 ciklusa, te vrijeme ekstrakcije: 3, 5 i 7 minuta, a kao otapalo je korišten metanol. Optimalni uvjeti za ASE ekstrakciju bili su 125 °C, 7 min i 3 ciklusa, dok su kod Soxhlet ekstrakcije metanol kao otapalo i četiri sata ekstrakcije pokazali najbolje kvalitativne i kvantitativne rezultate. ASE ekstrakcija kvantitativno se pokazala kao najprikladnija, budući da se koristilo kraće vremensko razdoblje (približno 30 minuta) uz manji utrošak organskog otapala (15 mL), a dobivena je slična koncentracija ciljanih komponenata u usporedbi sa Soxhlet ekstrakcijom. Ipak, Soxhlet ekstrakcija kvalitativno je prikladnija jer je određen veći broj spojeva u eteričnom ulju sjemenki komorača u usporedbi s ASE ekstrakcijom, a razlog tome može biti razgradnja termolabilnih spojeva pod utjecajem visoke temperature pri ASE ekstrakciji (Wang i Weller, 2006).

Hammouda i sur. (2013) su u svom radu GC-MS metodom analizirali eterično ulje ploda gorkog komorača dobivenog primjenjujući tri različite metode ekstrakcije; ekstrakcija superkričnim CO<sub>2</sub>, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) i hidrodestilacija. Rezultati su pokazali da je prinos eteričnog ulja najveći primjenom ekstrakcije potpomognutom mikrovalovima, zatim ekstrakcije superkričnim CO<sub>2</sub>, i naposljetku primjenom klasične hidrodestilacije. Neovisno o vrsti ekstrakcije, u svim je ekstraktima kao najzastupljenija komponenta određen anetol. MAE je pokazala najveći prinos eteričnog ulja i udio fenkona (28 %), dok je relativna koncentracija anetola bila najniža (55 %) u usporedbi s konvencionalnom metodom hidrodestilacije (65 %) i ekstrakcijom superkričnim CO<sub>2</sub> (72 %).

Abbasian i Hatamzadeh (2014) su istraživali učinak ultrazvuka na kvalitativne i kvantitativne značajke eteričnog ulja sjemenki komorača. Samljevene sjemenke pomješane s destiliranom vodom bile su izložene ultrazvuku 10, 20 i 45 minuta, a eterično ulje dobiveno ekstrakcijom destilacijom vodenom parom i njegove komponente identificirane su GC-MS analizom. Rezultati su pokazali da je primjena ultrazvuka povećala količinu ekstrahiranog ulja, no udio komponenata kao što su anetol, fenkon i  $\alpha$ -pinen bio je manji nego kod kontrolnih

uzoraka. Količina ulja ekstrahirana iz kontrolnih uzoraka iznosila je 2,17 %, a količina ulja ekstrahiranog tijekom 45 minuta tretmana ultrazvukom iznosila je 3,20 %. Najveći udio anetola utvrđen je u kontrolnim uzorcima (67,2 %), a najmanji u uzorcima koji su 45 minuta bili izloženi ultrazvuku (64,97 %). Udio fenkona u kontrolnim uzorcima iznosio je 19,4 %, dok je u uzorcima izloženim ultrazvuku u trajanju od 10, 20 i 45 minuta iznosio 19,2 %, 19,1 %, i 18,7 % gdje je vidljivo da se sadržaj fenkona u eteričnom ulju smanjuje s povećanjem vremena izloženosti ultrazvuku. Smanjenje udjela anetola, fenkona i  $\alpha$ -pinena može se pripisati učinku visoko energetske valova ultrazvuka pod čijim je utjecajem došlo do razgradnje tih komponenata (Abbasian i Hatamzadeh, 2014). Udio  $\alpha$ -pinena također se smanjio s dužim djelovanjem ultrazvuka na uzorke sjemenki, dok na udio estragola, kamfena, limonena,  $\gamma$ -terpinena i  $\alpha$ -felandrena u eteričnom ulju nije utjecao tretman ultrazvukom.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Uzorak komorača

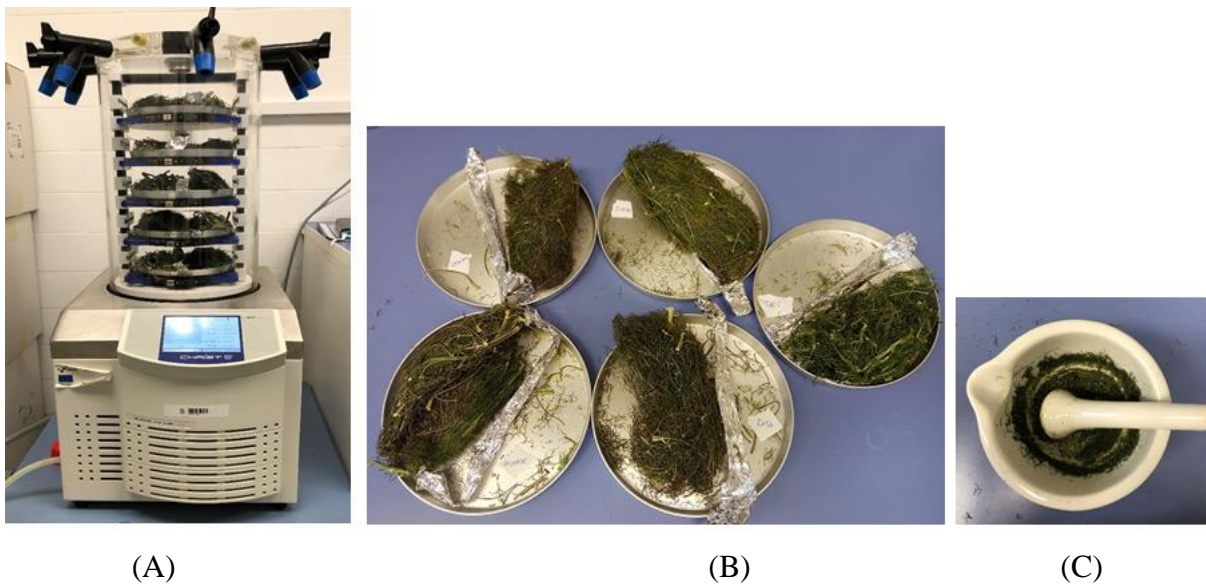
U ovom radu za eksperimentalni dio korišteni su liofilizirani uzorci samoniklog komorača (*Foeniculum vulgare*) (odvojeno nadzemni dio – list i stabljika) ubrani na 5 različitim lokacija Istre (Republika Hrvatska) u dva različita termina berbe: (i) prvi termin berbe 08.08.2020. i (ii) drugi termin berbe 25.11.2020 (tablica 5). Prvi termin berbe podrazumijevao je fenotipsku fazu prije cvatnje, dok se drugi termin berbe odnosio na fenotipsku fazu nakon cvatnje. Neposredno nakon berbe uzorci su u svježem stanju dopremljeni u Laboratorij gdje su skladišteni u polipropilenskim vrećicama pri temperaturi -18 °C do provedbe postupka liofilizacije.

**Tablica 5.** Prikaz analiziranih uzoraka komorača

Šifra uzorka	Lokacija	Termin berbe	Dio biljke
1	Poreč	1	list
2	Poreč	1	stabljika
3	Raša	1	list
4	Raša	1	stabljika
5	Plomin	1	list
6	Plomin	1	stabljika
7	Vodnjan	1	list
8	Vodnjan	1	stabljika
9	Valmade	1	list
10	Valmade	1	stabljika
11	Poreč	2	list
12	Poreč	2	stabljika
13	Raša	2	list
14	Raša	2	stabljika
15	Plomin	2	list
16	Plomin	2	stabljika
17	Vodnjan	2	list
18	Vodnjan	2	stabljika
19	Valmade	2	list
20	Valmade	2	stabljika

### 3.1.2. Priprema uzorka komorača

Uzorci stabljike i/ili lista komorača iz istog termina berbe, prethodno skladišteni pri -18 °C, raspoređeni su na metalne plitice i označeni prema lokacijama i/ili dijelovima biljke te su zatim zamrznuti pri -80 °C do početka provedbe postupka liofilizacije. Liofilizacija je provodena na liofilizatoru modela Martin Christ Alpha 1-4 LSC Plus (slika 5A). Plitice sa zamrznutim uzorkom stavljene su na postupak liofilizacije pri temperaturi -55 °C u vremenskom trajanju od 24 h (slika 5B). Nakon provedenog postupka liofilizacije, liofilizirani uzorci lista i stabljike komorača najprije se ručno usitnjavaju, a potom dodatno u tarioniku kako bi se dobio suhi biljni materijal odgovarajuće konzistencije praha (slika 5C). Dio tako dobivenog praha korišten je za ASE ekstrakciju, dok je preostali dio upakiran u polipropilenske vrećice, hermetički zatvoren i skladišten pri temperaturi -20 °C do provedbe analiza.



**Slika 5.** (A) Liofilizator modela Martin Christ Alpha 1-4 LSC Plus (vlastita fotografija, 2019); (B) Uzorci komorača zamrznuti pri -55 °C (vlastita fotografija, 2019); (C) usitnjavanje uzoraka liofiliziranog lista komorača u tarioniku (vlastita fotografija, 2019)

### 3.2. METODE RADA

Izolacija bioaktivnih spojeva iz prethodno liofiliziranih uzoraka komorača provedena je primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak (ASE ekstrakcija) uz upotrebu 96 %-tog etanola kao ekstrakcijskog otapala. U dobivenim ekstraktima spektrofotometrijski su potom određeni ukupni fenoli i pigmenti (klorofili *a* i *b* te karotenoidi).

#### 3.2.1. Aparatura i pribor

##### *Aparatura*

- ASE ekstraktor, Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 (Thermo Fisher Scientific, California, SAD)
- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, VWR International, SAD) i staklene kivete
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj 40 kHz (Bandelin Sonorex, Njemačka)
- Kupelj rotavapora (BÜCHI Heating Bath B-490, Švicarska)
- Vortex miješalica (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Njemačka)

##### *Pribor*

- Ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika (Thermo Scientific, 34 mL)
- Glass fiber filteri (Thermo Scientific, Dionex™ 350/150 Extraction Cell Filters)
- Staklene boce za prihvata ekstrakata (Thermo Scientific, 250 mL)
- Plastične čašice za vaganje
- Odmjerne tikvice, volumena 100, 50 i 10 mL
- Stakleni lijevci
- Plastične kivete, volumena 50 mL
- Mikropipete Eppendorf (100 µL i 1000 µL)
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Staklene čaše, volumena 50 mL

#### 3.2.2. Otapala i reagensi

- Dijatomejska zemlja, 6/60 mesh, 26033 (Restek Corporation, SAD)
- Destilirana voda
- 96 %-tni etanol (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
- Destilirana voda
- Zasićena 20 % -tna otopina natrijeva karbonata

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode te se ohladi na sobnu temperaturu. Otopini se doda nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni se u odmjerne tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.

- Standard galne kiseline ( $5 \text{ g L}^{-1}$ )

Priprema: Odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu. Odmjerna tikvica se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

### 3.2.3. Izolacija bioaktivnih spojeva iz uzoraka komorača primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak (ASE ekstrakcija)

Neposredno prije provedbe ASE ekstrakcije, odvaži se u plastičnoj čašici približno 1 g ( $\pm 0,0001$ ) uzorka komorača na analitičkoj vagi. U čašicu se zatim dodaje dijatomejska zemlja (približno 2,0 g) i promiješa se zajedno s uzorkom. Uzorak s dijatomejskom zemljom pažljivo se prenosi u ekstrakcijsku ćeliju u koju je prethodno postavljen filter papir, te se nadoda još jedan sloj dijatomejske zemlje do približno 50 mm ispod ruba ekstrakcijske ćelije. Nakon toga ćelija se obriše od mogućih zaostataka dijatomejske zemlje, čvrsto zatvori i postavi u ekstraktor.

Prije postupka same ekstrakcije potrebno je odzračiti ekstrakcijsko otapalo (96 %-tni etanol) u trajanju od 30 do 45 minuta na ultrazvučnoj kupelji. U uređaj se najprije na poziciju 1 postavlja jedna ekstrakcijska ćelija u kojoj se nalazi samo dijatomejska zemlja, a zatim i preostale ćelije s pripremljenim uzorcima. Na zaslonu uređaja unose se zadani parametri ekstrakcije: temperatura, vrijeme ekstrakcije i broj ciklusa koji se razlikuju ovisno o dijelu biljke koji se ekstrahira, a preuzeti su iz prethodno provedenih preliminarnih istraživanja.

Za uzorke lista komorača parametri ASE ekstrakcije su sljedeći - temperatura 110 °C, statičko vrijeme ekstrakcije 10 minuta, 4 ekstrakcijska ciklusa, a za uzorke stabljike - temperatura 80 °C, statičko vrijeme ekstrakcije 5 minuta, 4 ekstrakcijska ciklusa. Ekstrakcija se provodi u sekvenci što znači da se četiri pripremljene ekstrakcijske ćelije s uzorkom redom postavljaju na brojevima označena mjesta, a staklene bočice za prikupljanje ekstrakta se stavljaju na pozicije označene istim brojevima u donjem dijelu uređaja. Po završetku ekstrakcije, ekstrakti prikupljeni u staklene bočice se kvantitativno prenose u odmjerne tikvice

i ovisno o dobivenom volumenu ekstrakta nadopunjavaju do 50, 55 ili 60 mL. Ekstrakti se zatim prenose u plastične kivete volumena 50 mL i čuvaju pri 4 °C do provedbe analiza (slika 6).



**Slika 6.** Ekstrakti čuvani u plastičnim kivetama (vlastita fotografija, 2019)

### 3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

#### Princip određivanja:

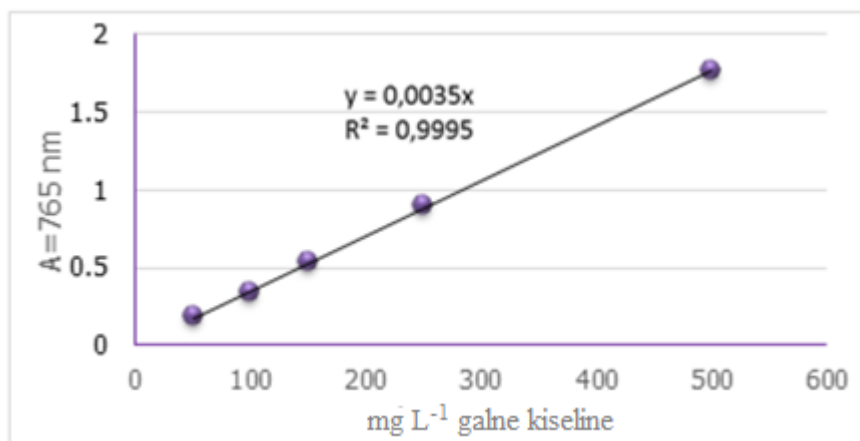
Određivanje ukupnih fenola provodi se primjenom spektrofotometrijske metode u etanolnom ekstraktu uzorka. Metoda se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom u lužnatoj sredini te mjerenjem nastalog intenziteta plavog obojenja pri 765 nm (Shortle i sur., 2014).

#### Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100  $\mu$ L ekstrakta, 200  $\mu$ L Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon nekoliko minuta dodaje se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se kratko promiješa pomoću Vortex uređaja, a potom se uzorci termostatiraju 25 min pri temperaturi 50 °C (u kupelji rotavapora). Slijepa proba se pripremi na isti način kao i uzorak, ali se umjesto ekstrakta uzima ekstrakcijsko otapalo. Nakon termostatiranja uzorcima se mjeri apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini od 765 nm. Sva mjerenja provedena su u paralelnim određivanjima.

### Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca odvažuje se 0,5 g galne kiseline te se odvaga otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernej tikvici volumena 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od pripremljene otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama volumena 100 mL. U tikvice se redom pipetira 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline i nadopunjuju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg L<sup>-1</sup>. Iz svake tikvice otpipetira se 100 μL otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodaje 200 μL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL otopine natrijeva karbonata te se sve skupa promiješa pomoću Vortexa i zatim se uzorci u kupelji rotavapora termostatiraju 25 minuta pri temperaturi 50 °C. Na isti način priprema se i slijepa proba, samo se umjesto otopine standarda dodaje 100 μL destilirane vode. Nakon termostatiranja mjeri se apsorbanacija pri valnoj duljini 765 nm te se iz izmjerenih vrijednosti apsorbanacija nacrtava baždarni pravac pomoću Excel-a (slika 7). Na apscisi su nanese vrijednosti koncentracija galne kiseline (mg L<sup>-1</sup>), a na ordinati vrijednosti apsorbanacije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca. Dobivene koncentracije ukupnih fenola (mg GAE L<sup>-1</sup>) preračunate su u masene udjele (mg GAE 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog uzorka). Rezultat se izražava kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja ± standardna devijacija.



**Slika 7.** Baždarni pravac za određivanje ukupnih fenola

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba glasi:

$$Y = 0,0035 \times X$$



gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm

X – koncentracija galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ )

$R^2$  – koeficijent determinacije

### 3.2.5. Spektrofotometrijsko određivanje klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida

#### Princip metode:

Svaki fotosintetski pigment ima svoj jedinstveni apsorpcijski spektar s apsorpcijskim maksimumima pri određenim valnim duljinama te se upravo na tome temelji spektrofotometrijsko određivanje pigmenta (klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida). Spektrofotometrijsko mjerenje se provodi u metanolnom ekstraktu uzorka uz korištenje ekstrakcijskog otapala te mjerenjem pri valnim duljinama 649, 664, 652.4, 665.2, 646.8 i 663.2 nm (Lichtenthaler i sur., 2001). Klorofili najbolje apsorbiraju svjetlost u plavom i crvenom dijelu vidljivog spektra. Apsorpcijski maksimum za klorofil *a* (Ch-*a*) je u plavom dijelu spektra (~430 nm) te u crvenom dijelu spektra (~660 nm), a apsorpcijski maksimumi za klorofil *b* (Ch-*b*) nalaze između dvaju maksimuma klorofila *a* (Ch-*a*) - oko 450 i 640 nm. Apsorpcijski spektar svih fotosintetskih aktivnih karotenoida pokazuje tri karakteristična apsorpcijska maksimuma u plavom dijelu spektra.

#### Postupak određivanja:

Dobivene ekstrakte za kvantitativno određivanje klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida prethodno je potrebno razrijediti s 96 %-tnim etanolom te se potom mjeri apsorbancija pri 470 nm, 649 nm i 664 nm. Uzorci ekstrakata lista komorača razrijeđeni su 10x tako da je na 300  $\mu\text{L}$  ekstrakta dodano 2700  $\mu\text{L}$  96 %-tnog etanola, a uzorci ekstrakata stabljike komorača razrijeđeni su 5x tako da je u 600  $\mu\text{L}$  ekstrakta dodano 2400  $\mu\text{L}$  96 %-tnog etanola. Slijepu probu čini 96 %-tni etanol, a svako mjerenje provodi se u paraleli. Udjeli klorofila *a* i *b* te karotenoida računaju se prema sljedećim jednadžbama (Lichtenthaler i Buschmann, 2001):

Etanol:

$$C_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 13.36 A_{664} - 5.19 A_{649} \quad [1]$$

$$C_b (\mu\text{g mL}^{-1}) = 27.43 A_{649} - 8.12 A_{664} \quad [2]$$

$$C(x+c) (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1000 A_{470} - 2.13 C_a - 97.63 C_b) / 209 \quad [3]$$

gdje su:

$A$  = apsorbancija

$Ca$  = klorofil *a*

$Cb$  = klorofil *b*

$C(x+c)$  = karotenoidi (ksantofili + karoteni)

Dobivene vrijednosti masenih koncentracija ( $\text{mg L}^{-1}$ ) potom su preračunate i izražene kao  $\text{mg g}^{-1}$  suhe tvari  $\pm$  standardna devijacija.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju provedena je ekstrakcija ukupnih fenola i pigmenata (karotenoida, klorofila *a* i *b*) u liofiliziranom listu i stabljici komorača primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE ekstrakcija). Za istraživanje su korišteni uzorci samoniklog komorača ubrani na pet različitih lokacija u Istri (Poreč, Raša, Plomin, Vodnjan, Valmade) u dva različita termina berbe: 8. kolovoza, prije cvatnje i 25. studenog, poslije cvatnje, što predstavlja varijaciju u fenotipskim fazama uzgoja pri čemu se prvi termin berbe odnosi na fazu prije cvatnje, a drugi termin berbe na fazu poslije cvatnje.

ASE ekstrakcija bioaktivnih spojeva lista i stabljika provedena je uporabom 96 %-tnog etanola kao ekstrakcijskog otapala, te su provedena 4 ciklusa ekstrakcije. Različito statičko vrijeme i temperatura su korišteni kod ekstrakcije lista i stabljike; pri ekstrakciji bioaktivnih spojeva iz lista korištena je temperatura od 110 °C i statičko vrijeme 10 minuta, dok je pri ekstrakciji spojeva iz stabljike korištena temperatura od 80 °C i statičko vrijeme 5 minuta.

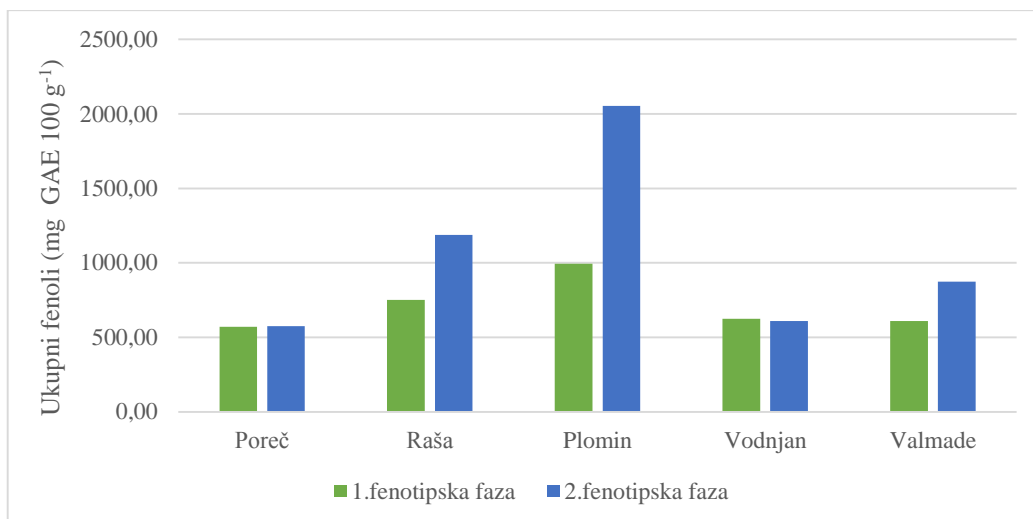
U dobivenim ekstraktima provedeno je spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i pigmenata karotenoida i klorofila, a svi dobiveni rezultati obrađeni su u MS Excel programu te prikazani grafički kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja  $\pm$  STDEV.

### 4.1. UTJECAJ FENOTIPSKIH FAZA NA UDJELE UKUPNIH FENOLA, UKUPNIH KAROTENOIDA TE UKUPNIH KLOOROFILA U LISTU SAMONIKLOG KOMORAČA S RAZLIČITIH LOKALITETA

#### 4.1.1. Utjecaj fenotipskih faza na udjele ukupnih fenola u listu samoniklog komorača s različitih lokaliteta

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola (UF) lista samoniklog komorača ubranih na pet različitih lokacija u dva različita termina berbe prikazani su na slici 8

Maseni udjeli ukupnih fenola u listu komorača određeni su u rasponu od 570,46 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista (Poreč) do 995,33 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista (Plomin) u 1. fenotipskoj fazi, te od 575,74 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista (Poreč) do 2054,23 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista (Plomin) u 2. fenotipskoj fazi.



**Slika 8.** Prosječni maseni udjeli ukupnih fenola (mg GAE 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista) izoliranih iz liofiliziranih listova komorača ubranih na pet različitih lokacija

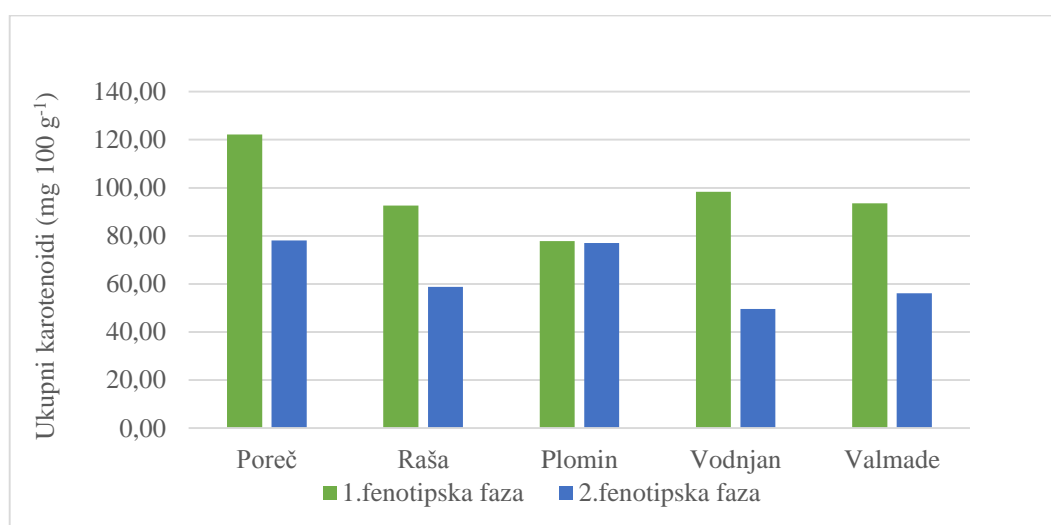
Iz ovog grafičkog prikaza vidljiv je trend povećanja masenih udjela ukupnih fenola u listu sazrijevanjem biljke, odnosno prelaskom iz 1. u 2. fenotipsku fazu, osim kod uzoraka samoniklog komorača ubranih na lokaciji Vodnjan gdje je maseni udio fenola u 1. fenotipskoj fazi (625,51 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista) bio nešto niži od onoga u 2. fenotipskoj fazi (610,46 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista). Neovisno o fenotipskoj fazi biljke, najveći udio ukupnih fenola određen je u uzorcima s lokacije Plomin, dok je najmanji udio određen u uzorcima s lokacije Poreč u obje fenotipske faze.

Pacifico i sur. (2015) su određivali ukupne fenole izolirane iz liofiliziranih listova komorača primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i odredili udio ukupnih fenola u listu 2940 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista u 1. fenotipskoj fazi te 4050 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista u 2. fenotipskoj fazi, što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju.

Nadalje, rezultati dobiveni ovim istraživanjem u skladu su i s istraživanjem Xu i sur. (2011), koji su istraživali utjecaj sazrijevanja biljke na sintezu fenolnih spojeva u pet sorti grožđa, pri čemu su utvrdili da su udjeli fenolnih spojeva sjemenki grožđa iz kasnije fenotipske faze (60,68 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t., 41,36 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t., 79,78 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t., 99,18 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t., 89,28 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t.) bili znatno veći od onih u ranijim fenotipskim fazama (50,11 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t., 38,93 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t., 68,71 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t., 88,70 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t., 72,03 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t.) za sve istražene sorte.

#### 4.1.2. Utjecaj fenotipskih faza na udjele ukupnih karotenoida u listu samoniklog komorača s različitih lokaliteta

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih karotenoida lista samoniklog komorača ubranih na pet različitih lokacija u dva različita termina berbe prikazani su na slici 9. Maseni udjeli ukupnih karotenoida u listu komorača određeni su u rasponima od 77,89 mg 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista (Plomin) do 122,24 mg 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista (Poreč) u 1.fenotipskoj fazi, te od 49,56 mg 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista (Vodnjan) do 78,06 mg 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista (Raša) u 2. fenotipskoj fazi.



**Slika 9.** Prosječni maseni udjeli ukupnih karotenoida (mg 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista) izoliranih iz liofiliziranih listova komorača ubranih na pet različitih lokacija

Iz ovog grafičkog prikaza vidljiv je trend smanjenja masenog udjela karotenoida sazrijevanjem biljke, odnosno prelaskom iz 1. u 2. fenotipsku fazu, neovisno o varijaciji uzgojnog lokaliteta. Nadalje, u uzorcima s lokaliteta Poreč određen je najveći udio karotenoida neovisno o fenotipskoj fazi, što je u potpunoj suprotnosti od rezultata određivanja ukupnih fenola u listu, gdje je u uzorcima s lokaliteta Poreč određen najmanji udio ukupnih fenola u obje fenotipske faze. Interesantno je za primjetiti, da se u slučaju udjela karotenoida, lokacija Plomin nije izdvojila kao lokacija s najvećim razlikama među uzorcima obzirom na fenotipske faze biljke, kao što je to bio slučaj s ukupnim fenolima.

Yoo i sur. (2003) u svome su istraživanju poučavali promjene u fotosintetskom kapacitetu i učinkovitosti te u sastavu karotenoida lista bijele djeteline *Trifolium repens* L.

tijekom razvoja biljke. Zaključili su da se sadržaj karotenoida smanjuje sazrijevanjem i starenjem biljke, što je sukladno rezultatima iz ovoga rada.

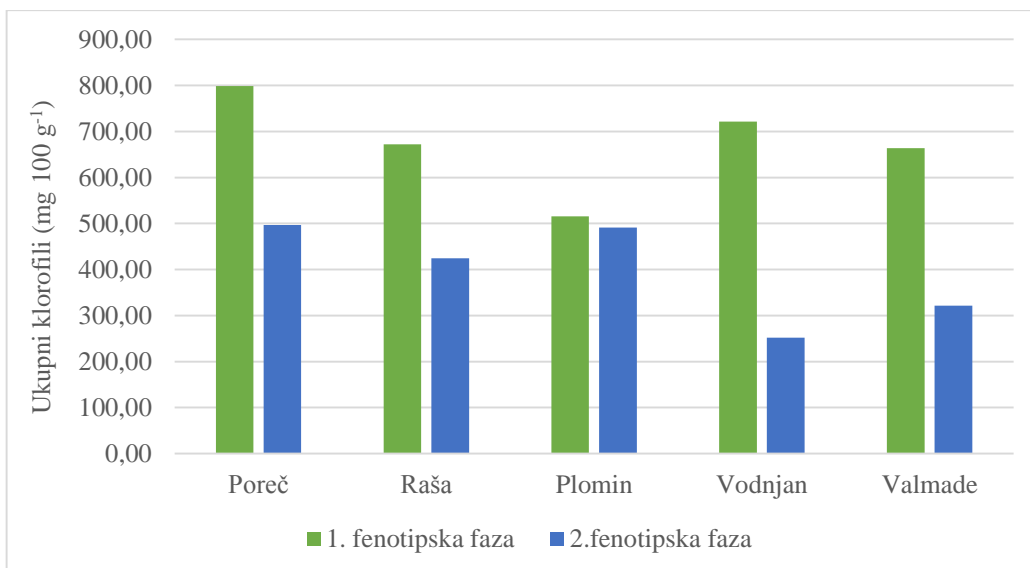
Lefsrud i sur. (2007) u svom su radu izvijestili o promjenama u koncentraciji karotenoida tijekom 5 razvojnih faza lista kelja. Kelj je uzgajan u kontroliranim uvjetima, a pigmenti lutein i  $\beta$ -karoten su mjereni u mladim (<1 tjedan), nezrelim (1-2 tjedna), zrelih (2-3 tjedna), potpuno razvijenim (3-4 tjedna) i starijim (> 4 tjedna) listovima te određeni pomoću HPLC analize. Rezultati su pokazali da je na koncentraciju luteina i  $\beta$ -karotena utjecala starost lista. Maksimalni maseni udio luteina izmjeren je u nezrelom listu starom 1-2 tjedna (15,1 mg 100 g<sup>-1</sup> svježe mase), dok je minimalna koncentracija izmjerena u listu starom više od 4 tjedna (6,9 mg 100 g<sup>-1</sup> svježe mase). Slična situacija bila je i kod  $\beta$ -karotena; maksimalna koncentracija izmjerena je u zreom listu (11,6 mg 100 g<sup>-1</sup> svježe mase), a minimalna u listu starom više od 4 tjedna (6,1 mg 100 g<sup>-1</sup> svježe mase).

#### 4.1.3. Utjecaj fenotipskih faza na udjele klorofila u listu samoniklog komorača s različitih lokaliteta

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih klorofila lista samoniklog komorača ubranih na pet različitih lokacija u dva različita termina berbe prikazani su na slici 10.

Prosječni udjeli ukupnih klorofila u listu komorača određeni su u rasponu od 515,91 mg 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista (Plomin) do 798,54 mg 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista (Poreč) u 1. fenotipskoj fazi, te od 252,14 mg 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista (Vodnjan) do 496,92 mg 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista (Poreč) u 2. fenotipskoj fazi. U uzorcima s lokaliteta Poreč određen je najveći udio klorofila u listu u obje fenotipske faze, kao što je bio slučaj i kod određivanja karotenoida. Nadalje, lokacija Vodnjan se izdvojila prema najvećoj razlici sadržaja ukupnih karotenoida između dvije fenotipske faze.

Iz ovog grafičkog prikaza vidljiv je trend smanjenja masenog udjela klorofila sazrijevanjem biljke, odnosno prelaskom iz 1. u 2. fenotipsku fazu kod uzoraka sa svih uzgojnih lokacija. Smanjenje koncentracije klorofila u listu tijekom zrenja može biti posljedica promjena u omjeru lipidnih proteina u pigment-protein kompleksima, povećane aktivnosti klorofilaze i razgradnje klorofila te inhibicije sinteze fotosintetskih pigmenta (Askari i Ehsanzadeh, 2015).



**Slika 10.** Prosječni maseni udjeli ukupnih klorofila ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  liofiliziranog lista) izoliranih iz liofiliziranih listova komorača ubranih na pet različitih lokacija

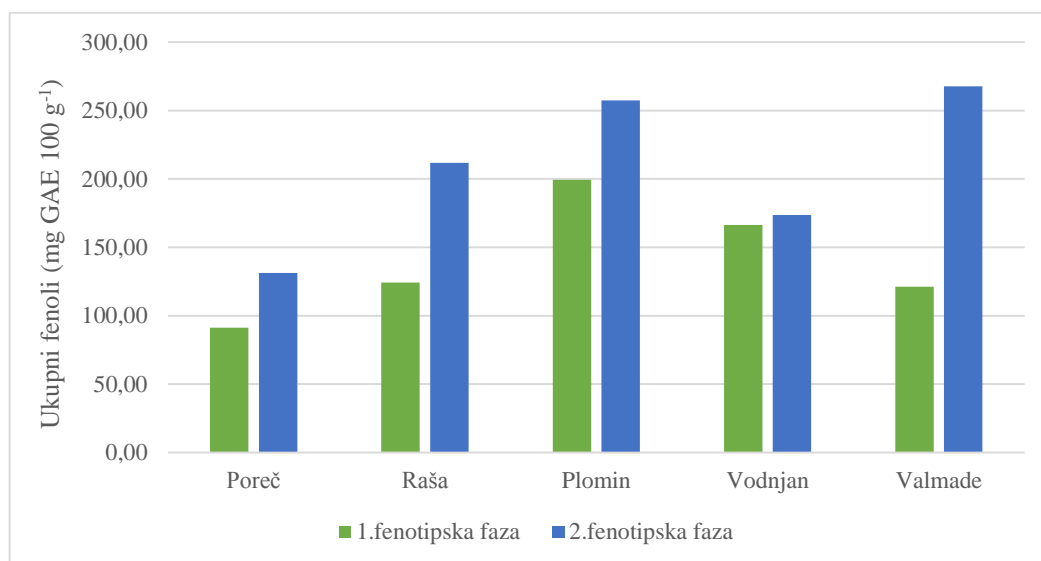
Lefsrud i sur. (2007) u svom su radu izvijestili o promjenama u koncentraciji klorofila tijekom 5 razvojnih faza lista kelja. Kelj je uzgajan u kontroliranim uvjetima, a pigmenti klorofil *a* i klorofil *b* su mjereni u mladim (<1 tjedan), nezrelim (1-2 tjedna), zrelih (2-3 tjedna), potpuno razvijenim (3-4 tjedna) i starijim (> 4 tjedna) listovima te određeni pomoću HPLC analize. Najveći udio ukupnog klorofila izmjereno je u zreлом listu starom 2-3 tjedna ( $308,3 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  svježe mase), dok je minimalna koncentracija izmjerena u listu starom više od 4 tjedna ( $150,5 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  svježe mase). Ovi rezultati pokazuju da udio klorofila u listu najprije raste sazrijevanjem biljke, a zatim se tijekom starenja biljke smanjuje.

Može se primijetiti da se tijekom cvatnje i razvoja sjemena biljke povećava broj listova koji stare, što je u korelaciji s hipotezom da starenje lišća služi kao izvor hranjivih sastojaka tijekom razmnožavanja biljke (Zimmerman i Zentgraf, 2005).

#### 4.2. UTJECAJ FENOTIPSKIH FAZA NA UDJELE UKUPNIH FENOLA, UKUPNIH KAROTENOIDA TE UKUPNIH KLOOROFILA U STABLJICI SAMONIKLOG KOMORAČA S RAZLIČITIH LOKALITETA

##### 4.2.1. Utjecaj fenotipskih faza na udjele ukupnih fenola u stabljici samoniklog komorača s različitih lokaliteta

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola stabljike samoniklog komorača ubranih na pet različitim lokacija u dva različita termina berbe prikazani su na slici 11.



**Slika 11.** Prosječni maseni udjeli ukupnih fenola (mg GAE 100 g<sup>-1</sup> liofilizirane stabljike) izoliranih iz liofiliziranih stabljika komorača ubranih na pet različitim lokacija

Maseni udjeli ukupnih fenola u stabljici određeni su u rasponu od 91,25 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> liofilizirane stabljike (Poreč) do 199,40 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> liofilizirane stabljike (Plomin) u 1. fenotipskoj fazi, te od 131,20 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> liofilizirane stabljike (Poreč) do 267,68 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> liofilizirane stabljike (Valmade) u 2. fenotipskoj fazi. Ove vrijednosti su značajno niže u usporedbi s udjelima ukupnih fenola određenim u listovima komorača s istih uzgojnih lokaliteta.

Nadalje, dobiveni rezultati evidentiraju trend povećanja udjela ukupnih fenola stabljike sa sazrijevanjem biljke kod svih uzoraka, kao što je to bio slučaj i u uzorcima lista komorača. Osim toga, rezultati pokazuju da je najmanji udio ukupnih fenola u stabljici određen u uzorcima s lokacije Poreč, što je također bio slučaj i u uzorcima lista komorača. Najveća razlika u udjelu ukupnih fenola obzirom na fenotipsku fazu utvrđena jest za lokaciju Valmade, gdje je porast udjela ukupnih fenola u drugoj fenotipskoj fazi bio gotovo dvostruk u odnosu na prvu fenotipsku fazu.

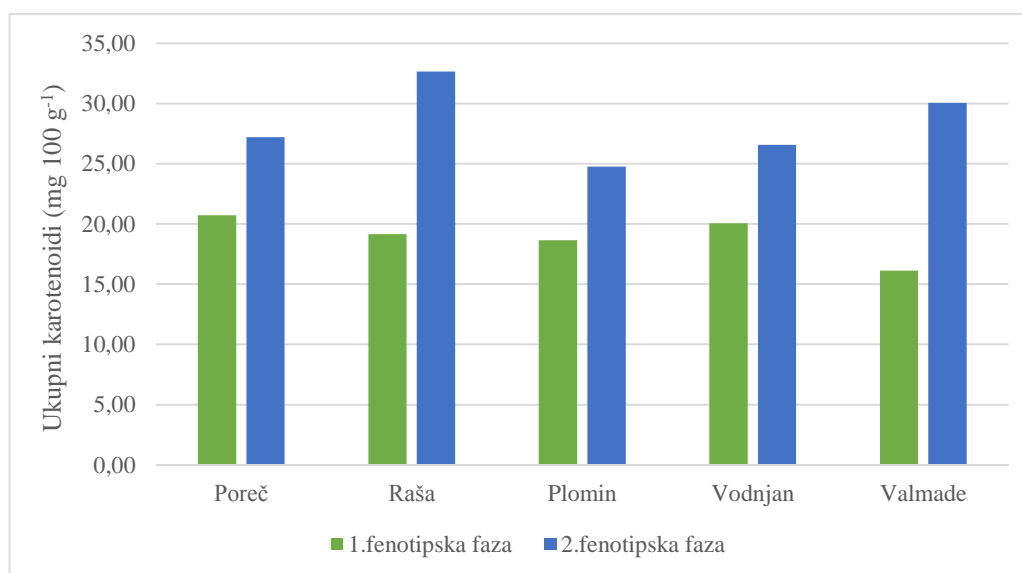
Bujor i sur. (2018) su pomoću UPLC-DAD/MS analize kvalitativno i kvantitativno određivali fenolne spojeve liofilizirane stabljike brusnice. Ekstrakti su dobiveni ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima, a uzorci brusnice su sakupljeni u 3 različita termina berbe



(svibanj, srpanj, rujan). Rezultati istraživanja navode da je udio ukupnih fenola u uzorcima iz 1. termina berbe (svibanj) iznosio 72,3 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t., u uzorcima iz 2. termina berbe (srpanj) udio je bio nešto manji, 70,5 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t., a najveći udio ukupnih fenola određen je u uzorcima iz 3.termina berbe (rujan) u vrijednosti 77,6 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t. Ovakve vrijednosti sukladne su trendu porasta udjela ukupnih fenola s razvojem biljke, što je zabilježeno i u ovom istraživanju.

#### 4.2.2. Utjecaj fenotipskih faza na udjele ukupnih karotenoida u stabljici samoniklog komorača s različitih lokaliteta

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih karotenoida stabljike samoniklog komorača ubranih na pet različitih lokacija u dva različita termina berbe prikazani su na slici 12.



**Slika 12.** Prosječni maseni udjeli ukupnih karotenoida (mg 100 g<sup>-1</sup> liofilizirane stabljike) izoliranih iz liofiliziranih stabljika komorača ubranih na pet različitih lokacija

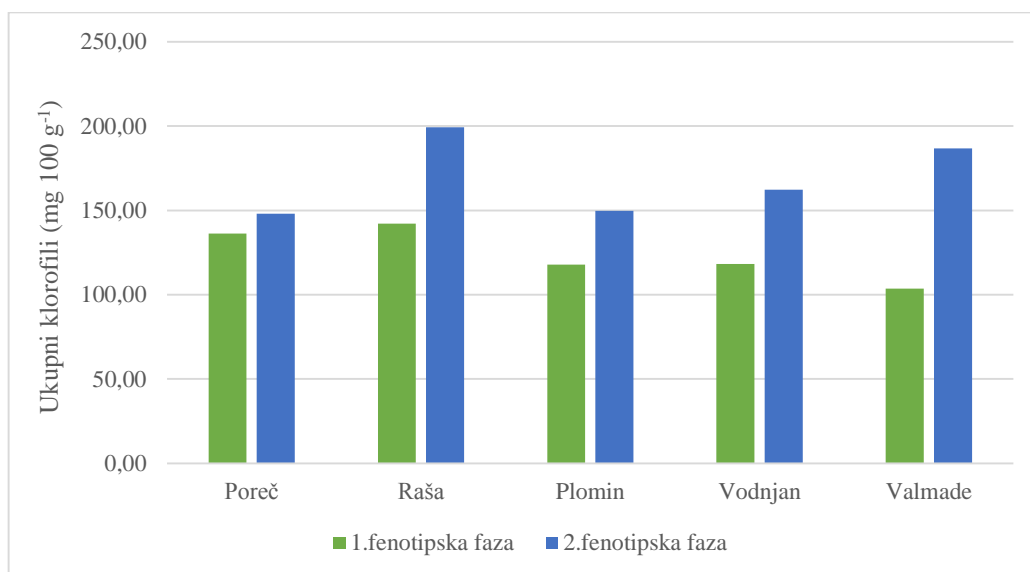
Maseni udjeli ukupnih karotenoida u stabljici određeni su u rasponu od 16,2 mg 100 g<sup>-1</sup> liofilizirane stabljike (Valmade) do 20,73 mg 100 g<sup>-1</sup> liofilizirane stabljike (Poreč) u 1. fenotipskoj fazi, te od 24,77 mg 100 g<sup>-1</sup> liofilizirane stabljike (Plomin) do 32,66 mg 100 g<sup>-1</sup> liofilizirane stabljike (Raša) u 2. fenotipskoj fazi. Za razliku od uzoraka lista komorača, gdje je zabilježen trend smanjenja masenih udjela karotenoida tijekom rasta biljke, u uzorcima stabljike komorača, rezultati

upućuju na obrnut trend, gdje su neovisno o lokalitetu uzgoja udjeli ukupnih karotenoida bili veći u uzorcima stabljika ubranih u 2. fenotipskoj fazi, tj. nakon cvatnje.

Nadalje, evidentirani rezultati pokazuju niže vrijednosti u usporedbi s udjelima karotenoida određenim u listovima komorača s istog uzgojnog lokaliteta, te značajno manje razlike u udjelima u ovisnosti o varijaciji uzgojnog lokaliteta uzoraka. Ipak, najveći udio karotenoida određen je u uzorcima s lokaliteta Raša u 2. fenotipskoj fazi, a najmanji udio u uzorcima s lokaliteta Valmade u 1. fenotipskoj fazi.

#### 4.2.3. Utjecaj fenotipskih faza na udjele ukupnih klorofila u stabljici samoniklog komorača s različitih lokaliteta

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih klorofila stabljike samoniklog komorača ubranih na pet različitih lokacija u dva različita termina berbe prikazani su na slici 13.



**Slika 13.** Prosječni maseni udjeli ukupnih klorofila ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  liofilizirane stabljike) izoliranih iz liofiliziranih stabljika komorača ubranih na pet različitih lokacija

Maseni udjeli ukupnih klorofila u stabljici komorača određeni su u rasponu od  $103,56 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  liofilizirane stabljike (Valmade) do  $142,21 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  liofilizirane stabljike (Raša) u 1. fenotipskoj fazi, te od  $148,03 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  liofilizirane stabljike (Poreč) do  $199,34 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  liofilizirane stabljike (Raša) u 2. fenotipskoj fazi. Iako su se u listu komorača udjeli klorofila u 2. fenotipskoj fazi smanjili

u usporedbi s 1. fenotipskom fazom, u stabljici komorača, posve je obrnut trend te je udio ukupnih klorofila u pravilu bio veći u 2. fenotipskoj fazi u uzorcima svih uzgojnih područja.

Osim toga, sličan utjecaj lokacije uzgoja utvrđen za udjele ukupnih karotenoida, također se može primjetiti i kod rezultata za ukupne klorofile, pa su tako najveći udjeli klorofila određeni u uzorcima s lokacije Raša u 2. fenotipskoj fazi, a najmanji udjeli u uzorcima s lokacije Valmade u 1. fenotipskoj fazi.

Lisiewska i sur. (2006) su u uzorcima kopra (*Anethum graveolens* L.) određivali udio bioaktivnih spojeva zasebno u različitim dijelovima biljke. Kopar je sakupljan u pet različitih termina berbe i to 50, 54, 59, 63, i 69 dana nakon sjetve, a zatim su određivani ukupni fenoli i pigmenti u svim ispitivanim uzorcima. Udio ukupnih klorofila u stabljici kopra iznosio je 8,5, 8,6 8,9, 9,1 i 9,8 mg 100 g<sup>-1</sup> svježe mase, gdje je vidljivo povećanje udjela klorofila u stabljici sazrijevanjem biljke, što je sukladno rezultatima iz ovoga rada. Također, Karele (2001) je potvrdio da je koncentracija klorofila dosegla svoj maksimum u fazi cvatnje za uzorak stabljike ozime pšenice, u kojoj je utvrđen i veći udio klorofila u usporedbi s listom, što potvrđuju i rezultati ovog istraživanja.

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata provedenog istraživanja i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. U ovom istraživanju, primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima (ASE ekstrakcija) iz lista i stabljike komorača izolirani su bioaktivni spojevi fenoli, karotenoidi i klorofili te su određeni njihovi maseni udjeli čija vrijednost ovisi o fenotipskoj fazi biljke, odnosno terminu berbe.
2. Najveći udio ukupnih fenola u listu određen je u 2. fenotipskoj fazi (2054,23 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista), a najmanji u 1. fenotipskoj fazi (570,46 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista), dok je najveći udio karotenoida i klorofila u listu određen u 1. fenotipskoj fazi (122,24 mg 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista; 798,54 mg 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista), a najmanji u 2. fenotipskoj fazi (49,56 mg 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista; 252,14 mg 100 g<sup>-1</sup> liofiliziranog lista).
3. Najveći udio ukupnih fenola, karotenoida i klorofila u stabljici određen je u 2. fenotipskoj fazi (267,68 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> liofilizirane stabljike; 32,66 mg 100 g<sup>-1</sup> liofilizirane stabljike; 199,34 mg 100 g<sup>-1</sup> liofilizirane stabljike), a najmanji udio ukupnih fenola, karotenoida i klorofila određen je u 1. fenotipskoj fazi (91,25 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> liofilizirane stabljike; 16,2 mg 100 g<sup>-1</sup> liofilizirane stabljike; 103,56 mg 100 g<sup>-1</sup> liofilizirane stabljike).
4. Neovisno o lokaciji uzgoja, u uzorcima lista komorača, veća akumulacija fenolnih spojeva utvrđena je u 2. fenotipskoj fazi, dok je udio karotenoida i klorofila bio veći u 1. fenotipskoj fazi. U uzorcima stabljike komorača, bez utjecaja lokacije uzgoja, veća akumulacija svih određivanih bioaktivnih spojeva određena je u 2. fenotipskoj fazi.
5. Neovisno o fenotipskoj fazi, u uzorcima lista komorača s najvećim udjelom ukupnih fenola izdvojila se lokacija Plomin, a s najvećim udjelima klorofila i karotenoida lokacija Poreč. Najveći udio ukupnih fenola u uzorcima stabljike komorača utvrđen je također na lokaciji Plomin, dok je najveći udio klorofila i karotenoida utvrđen za lokaciju Raša.
6. Na sadržaj bioaktivnih spojeva u listu i stabljici komorača posebice utječu i fenotipska faza, kao i lokacija uzgoja.

## 6. LITERATURA

Abbasian, J., Hatamzadeh, A., Dadar, A. (2014) Quantitative and qualitative survey of essential oil extraction from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) by ultrasound assisted distillation. *Ecol. Environ. Conserv.*, **20(2)**, 657-660.

Abdellaoui, M., Derouich, M., El-Rhaffari, L. (2020) Essential oil and chemical composition of wild and cultivated fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.): A comparative study. *S. Afr. J. Bot.*, **135**, 93-100.

Anonymous 1 < <https://en.wikipedia.org/wiki/Fennel> > Pristupljeno 03. studenog 2020.

Askari, E., Ehsanzadeh, P. (2015) Drought stress mitigation by foliar application of salicylic acid and their interactive effects on physiological characteristics of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) genotypes. *Acta Physiol. Plant.*, **37(2)**, 4.

Badgujar, S. B., Patel, V. V., Bandivdekar, A. H. (2014) *Foeniculum vulgare* Mill: A review of its botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology. *BioMed Res. Int.*, **2014**, 1-32.

Barros, L., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C. (2010) The nutritional composition of fennel (*Foeniculum vulgare*): Shoots, leaves, stems and inflorescences. *LWT*, **43(5)**, 814-818.

Bartley, G. E., Scolnik, P. A. (1995) Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell*, **7(7)**, 1027.

Bujor, O. C., Ginies, C., Popa, V. I., Dufour, C. (2018) Phenolic compounds and antioxidant activity of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) leaf, stem and fruit at different harvest periods. *Food Chem.*, **252**, 356-365.

Bursać Kovačević, D., Barba, F.J., Granato, D., Galanakis, C.M., Herceg, Z., Dragović-Uzelac, Putnik, P. (2018) Pressurized Hot Water Extraction (PHWE) for the green recovery of bioactive compounds and steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni Leaves. *Food Chem.*, **254**, 150-157.

Conforti, F., Statti, G., Uzunov, D., Menichini, F. (2006) Comparative chemical composition and antioxidant activities of wild and cultivated *Laurus nobilis* L. leaves and

*Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* (Ucria) coutinho seeds. *Biol. Pharm. Bull.*, **29(10)**, 2056-2064.

De la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., Alvarez-Parrilla, E. (2019) Phenolic compounds. U: *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables* (Yahia, E. M., ured.), Woodhead Publishing, Duxford, str. 253–271.

Diao, W. R., Hu, Q. P., Zhang, H., Xu, J. G. (2014) Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food control*, **35(1)**, 109-116.

Dimić, I., Teslić, N., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Zeković, Z., Šojić, B., Mrkonjić, Ž., Čolović, D., Montesano, D., Pavlić, B. (2020) Innovative and conventional valorizations of grape seeds from winery by-products as sustainable source of lipophilic antioxidants. *Antioxidants*, **9**, 568.

Feroli, F., Giambanelli, E., D'Antuono, L. F. (2017) Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. subsp. *piperitum*) florets, a traditional culinary spice in Italy: evaluation of phenolics and volatiles in local populations, and comparison with the composition of other plant parts. *J. Sci. Food Agric.*, **97(15)**, 5369-5380.

Giuliano, G. (2014) Plant carotenoids: genomics meets multi-gene engineering. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **19**, 111-117.

Grover, S., Malik, C. P., Hora, A., Kushwaha, H. B. (2013) Botany, cultivation, chemical constituents and genetic diversity in fennel (*Foeniculum vulgare* Mill): a review. *Int. J. Life Sci.*, **2(2)**, 128-139.

Hammouda, F. M., Saleh, M. A., Abdel-Azim, N. S., Shams, K. A., Ismail, S. I., Shahat, A. A., Saleh, I. A. (2014) Evaluation of the essential oil of *Foeniculum vulgare* Mill (fennel) fruits extracted by three different extraction methods by GC/MS. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, **11(2)**, 277-279.

Humphrey, A. M. (2004) Chlorophyll as a color and functional ingredient. *J. Food Sci.*, **69(5)**, 422-425.

- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.*, **126(4)**, 1821-1835.
- Karele, I. (2001) Chlorophyll content distribution in leaves, stems, and ears in winter wheat. U: Plant Nutrition (Horst, W. J., Schenk, M. K. ... Wittenmayer, L., ured.). Springer, Dordrecht, str. 720-721.
- Kiokias, S., Proestos, C., Varzakas, T. (2015) A review of the structure, biosynthesis, absorption of carotenoids-analysis and properties of their common natural extracts. *Curr. Res. Nutr. Food Sci.* **4**, 25-37.
- Kooti, W., Moradi, M., Ali-Akbari, S., Sharafi-Ahvazi, N., Asadi-Samani, M., Ashtary-Larky, D. (2015) Therapeutic and pharmacological potential of *Foeniculum vulgare* Mill: a review. *J. HerbMed Pharmacol.*, **4(1)**, 1-9.
- Lefsrud, M., Kopsell, D., Wenzel, A., Sheehan, J. (2007) Changes in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) carotenoid and chlorophyll pigment concentrations during leaf ontogeny. *Sci. Hortic.*, **112(2)**, 136-141.
- Lešić, R., Borošić, J., Butorac, I., Ćustić, M., Poljak, M., Romić, D. (2002): Povrćarstvo. Zrinski d.d., Čakovec
- Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and carotenoids– measurement and characterisation by UV-VIS. – Current Protocols in Food Analytical Chemistry (CPFA), (Supplement1), F4.3.1 – F4.3.8. John Wiley, New York.
- Lisiewska, Z., Kmiecik, W., Korus, A. (2006) Content of vitamin C, carotenoids, chlorophylls and polyphenols in green parts of dill (*Anethum graveolens* L.) depending on plant height. *J. Food Compost. Anal.*, **19(2-3)**, 134-140.
- Madhu, M., Sailaja, V., Satyadev, T. N. V. S. S., Satyanarayana, M. V. (2016) Quantitative phytochemical analysis of selected medicinal plant species by using various organic solvents. *J. Pharmacogn. Phytochem.*, **5(2)**, 25-29.
- Mottaleb, M.A., Sarker, S.D. (2012) Accelerated solvent extraction for natural products isolation, U: Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology 3.izd., (Sarker, S. D., Nahar, L., ured.). Springer, New York/ Dordrecht/ Heidelberg/ London, str. 75-87.

Napoli ME, Curcuruto G, Ruberto G. (2000) Screening the essential oil composition of wild Sicilian fennel. *Biochem. Syst. Ecol.*, **38**, 213–23.

Pacifico, S., Galasso, S., Piccolella, S., Kretschmer, N., Pan, S. P., Nocera, P., ... Monaco, P. (2018) Winter wild fennel leaves as a source of anti-inflammatory and antioxidant polyphenols. *Arab. J. Chem.*, **11(4)**, 513-524.

Pateiro, M., Domínguez, R., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Barba, F.J., Munekata, P.S.E., Fierro, E.M., Lorenzo, J.M. (2020) Herbal Product Development and Characteristics. U: Herbal product development - Formulation and Applications. Izdavač: CRC Press, Boca Raton, FL, USA. Urednici: Sharma, A.K., Keservani, R.K., Gautam, S.P. str. 205-240.

Pietta, P. G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, **63(7)**, 1035-1042.

Popović, R. Izolacija karotenoida iz biootpada kore sušene rajčice uporabom različitih otapala.

Putnik, P., Barba, F.J., Španić, I., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V, Bursać Kovačević, D. (2017) Green extraction approach for the recovery of polyphenols from Croatian olive leaves (*Olea europea*), *Food and Bioproducts Processing*, **106**, 19-28.

Putnik, P., Lorenzo, J.M., Barba, F.J., Roohinejad, S., Režek Jambrak, A., Granato, D., Montesano, D., Bursać Kovačević, D. (2018) Novel Food Processing and Extraction Technologies of High-Added Value Compounds from Plant Materials. *Foods*, **7(7)**, 106.

Rahimi, R., Mohammolkhani, A., Roohi, V., Armand, N. (2012) Effects of salt stress on the yield components, essential oil content and chlorophyll concentration of three fennel populations. *Int. J. Agron. Plant Prod.*, **3**, 716e20.

Rather, M. A., Dar, B. A., Sofi, S. N., Bhat, B. A., Qurishi, M. A. (2016) *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arab. J. Chem.*, **9**, 1574-1583.

Repajić, M., Cegledi, E., Kruk, V., Pedisić, S., Çınar, F., Bursać Kovačević, D., Žutić, I., Dragović-Uzelac, V. (2020) Accelerated Solvent Extraction as a green tool for the recovery of polyphenols and pigments from wild nettle leaves. *Processes*, **8(7)**, 803.



- Rodríguez-Solana, R., Salgado, J. M., Domínguez, J. M., Cortés-Diéguez, S. (2014) Characterization of fennel extracts and quantification of estragole: Optimization and comparison of accelerated solvent extraction and Soxhlet techniques. *Ind. Crops Prod.*, **52**, 528-536.
- Saito, K., Suzuki, T., Ishikita, H. (2018) Absorption-energy calculations of chlorophyll a and b with an explicit solvent model. *J. Photochem. Photobiol.* **358**, 422-431.
- Salami, M., Rahimmalek, M., Ehtemam, M. H. (2017) Comprehensive research on essential oil and phenolic variation in different *Foeniculum vulgare* populations during transition from vegetative to reproductive stage. *Chem. Biodiver.*, **14(2)**, e1600246.
- Senatore, F., Oliviero, F., Scandolera, E., Tagliatalata-Scafati, O., Roscigno, G., Zaccardelli, M., De Falco, E. (2013) Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of anethole-rich oil from leaves of selected varieties of fennel [*Foeniculum vulgare* Mill. ssp. *vulgare* var. *azoricum* (Mill.) Thell]. *Fitoterapia*, **90**, 214-219.
- Shahat, A. A., Hammouda, F. M., Shams, K. A., Saleh, M. A. (2012) Comparative chemical analysis of the essential oil of wild and cultivated fennel (*Foeniculum vulgare* Mill). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **15(2)**, 314-319.
- Shahat, A. A., Ibrahim, A. Y., Hendawy, S. F., Omer, E. A., Hammouda, F. M., Abdel-Rahman, F. H., Saleh, M. A. (2011) Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. *Mol.*, **16(2)**, 1366-1377.
- Shortle, E., O'Grady, M.N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J.P., (2014). Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Science* **98** (4), 828-834.
- Teimoori-Boghsani, Y., Bagherieh-Najjar, M. B., Mianabadi, M. (2018) Investigation of Phytochemical and Antioxidant Capacity of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) Against Gout. *Journal of Medicinal plants and By-product*, **7(1)**, 59-65.
- Wang, L., Weller, C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Techn.*, **17(6)**, 300-312.

Xu, Y., Simon, J. E., Welch, C., Wightman, J. D., Ferruzzi, M. G., Ho, L., Wu, Q. (2011) Survey of polyphenol constituents in grapes and grape-derived products. *J. Agric. Food Chem.*, **59(19)**, 10586-10593.

Yoo, S. D., Greer, D. H., Laing, W. A., McManus, M. T. (2003) Changes in photosynthetic efficiency and carotenoid composition in leaves of white clover at different developmental stages. *Plant Physiol. Biochem.*, **41(10)**, 887-893.

Zali, A. G., Ehsanzadeh, P. (2018) Exogenous proline improves osmoregulation, physiological functions, essential oil, and seed yield of fennel. *Ind. Crops Prod.*, **111**, 133-140.

Zheng, W., Wang, S. Y. (2001) Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.*, **49(11)**, 5165-5170.

Zimmermann, P., Zentgraf, U. (2005) The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, **10(3)**, 515.

Žutić, I. (2016): Osnove uzgoja aromatičnog i ljekovitog bilja-interna skripta. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

## IZJAVA O IZVORNOSTI

*Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

Sara Jurić

Ime i prezime studenta