Nutritivna vrijednost klijanaca pšenice (Triticum aestivum L.) obogaćenih selenom

Šunić, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:737003

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-21**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Katarina Šunić

Nutritivna vrijednost klijanaca pšenice (*Triticum aestivum* L.) obogaćenih selenom

Diplomski rad

Osijek, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Diplomski rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

NUTRITIVNA VRIJEDNOST KLIJANACA PŠENICE (*Triticum aestivum* L.) OBOGAĆENIH SELENOM

Katarina Šunić

Rad je izrađen na: Zavodu za biokemiju i ekofiziologiju biljaka, Odjel za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: dr. sc. Rosemary Vuković, docent
Komentor: dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, docent

Kratki sažetak diplomskog rada: Dnevni unos selena (Se) kroz prehranu najčešće je odraz njegove prisutnosti u tlu određenog područja. Zbog velike zastopljenosti područja siromašnih Se, sve je veći broj oboljelih od malnutricije, koja se može spriječiti biofortifikacijom usjeva i različitim dodacima prehrani. Danas su na tržištu dostupni različiti preparati pšenične trave (mladi izdanci pšenice stari 6-10 dana) koji se zbog svoje velike nutritivne vrijednosti koriste kao dodatak svakodnevnoj prehrani. Zbog velike važnosti Se za zdravlje čovjeka, i biljaka kao glavnog izvora ovog esencijalnog mikronutrijenta cilj je ovog istraživanja bio uzgojiti pšeničnu travu (*Triticum aestivum* L., sorta Kraljica) obogaćenu Se. Kako asimilacija Se može utjecati na različite metaboličke putove, cilj je također bio odrediti utjecaj različitih kemijskih oblika Se (selenata i selenita) u rastućim koncentracijama na nutritivnu vrijednost pšenične trave. Kao pokazatelji nutritivne vrijednosti mjereni su koncentracija vitamina C, koncentracije klorofila i karotenoida, sadržaj topljivih fenola, sadržaj proteina, ukupnih šećera i količina celuloze (vlakana), te ukupna antioksidacijska aktivnost. Tretmani selenatom i selenitom značajno su povećali količinu Se u izdancima pšenice ovisno o primijenjenoj koncentraciji, s tim da su količine Se bile znatno veće pri tretmanu selenatom. Selenat kao i selenit neznatno su ili uopće nisu utjecali na većinu mjerenih parametara nutritivne vrijednosti, osim u slučaju antioksidcijske aktivnosti gdje su oba tretmana uzrokovala njeno povećanje. Stoga, mladi izdanci pšenice obogaćeni Se zbog svoje velike nutritivne vrijednosti obećavajući su dodatak prehrani te bi mogli pridonijeti riješenju problema malnutricije.

Broj stranica: 48
Broj slika: 12
Broj tablica: 1
Broj literaturnih navoda:108
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: biofortifikacija, pšenična trava, nutritivna vrijednost, selenat, selenit

Datum obrane: 30. rujna 2019.

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. dr. sc. Lidija Begović, doc., predsjednik povjerenstva
2. dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, doc., komentor i član
3. dr. sc. Zorana Katanić, doc., član
4. dr. sc. Mirna Velki, doc., zamjena člana

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

BASIC DOCUMENTATION CARD **Master Thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Biology
Graduate university study programme in Biology

Scientific area: Natural science
Scientific field: Biology

NUTRITIONAL QUALITY OF WHEAT SEEDLINGS (*Triticum aestivum* L.) BIOFORTIFIED WITH SELENIUM

Katarina Šunić

Thesis performed at: Subdepartment of Biochemistry and Plant Ecophysiology, Department of Biology, J. J. Strossmayer University of Osijek
Supervisor: Rosemary Vuković, PhD, Assistant Professor
Cosupervisor: Ivna Štolfa Čamagajevac, PhD, Assistant Professor

Short abstract: Daily dietary intake of selenium (Se) is usually a reflection of its presence in the soil of a particular area. Due to the high prevalence of Se-poor areas, there is an increasing number of people suffering from malnutrition that can be prevented by crop biofortification and various nutritional supplements intake. Nowadays, there are different wheat grass (young wheat shoots 6-10 days old) preparations available on the market used as dietary supplements because of their high nutritional value. Due to the great importance of Se for humans, and plants as the main source of this essential micronutrient, the aim of this study was to grow wheat grass (*Triticum aestivum* L., cv. Kraljica) biofortified with Se. Since Se assimilation could affect different metabolic pathways, the aim was also to estimate the impact of different Se forms (selenate and selenite) in increasing concentrations on the nutritional value of wheat grass. As an indicators of nutritional value, contents of vitamin C, chlorophyll and carotenoids, soluble phenol content, protein content, total sugars and cellulose (fibers) and total antioxidant activity were measured. Treatments with selenate and selenite significantly increased the amount of Se in wheat shoots in concentration dependent manner, with Se levels much higher in selenate treatment. Selenate, as well as selenite, had little or no impact on most of the measured nutritional parameters, with exception of total antioxidant activity that was increased in both treatments. Due to their high nutritional value, young wheat shoots enriched with Se, could be promising nutritional supplement and could contribute in solving malnutrition problem.

Number of pages: 48
Number of figures: 12
Number of tables: 1
Number of references: 108
Original in: Croatian

Key words: biofortification, wheat grass, nutritional value, selenate, selenite

Date of the thesis defence: 30th September 2019

Reviewers:
1. Lidija Begović, Assistant Professor, PhD, chair
2. Ivna Štolfa Čamagajevac, Assistant Professor, PhD, co-supervisor and member
3. Zorana Katanić, Assistant Professor, PhD, member
4. Mirna Velki, Assistant Professor, PhD, member

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

Veliko hvala mentorici doc. dr. sc. Rosemary Vuković i komentorici doc. dr. sc. Ivni Štolfi Čamagajevac na strpljenju, razumijevanju, pomoći i stručnom vodstvu pri izvođenju eksperimentalnog dijela, ali i savjetima tijekom pisanja diplomskog rada.

Hvala i doc. dr.sc Lidiji Begović na savjetima i pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada.

Zahvaljujem se i Ani Vuković na pomoći prilikom eksperimentalnog rada.

Hvala svim prijateljima! Vrijeme studiranja učinili ste nezaboravnim, a svaka motivacija, ukazana pomoć i lijepa riječ olakšala je nastanak ovog rada. Posebno hvala Nikolini za pomoć ne samo pri eksperimentalnom radu, nego i za podršku od samih početaka studiranja.

Najveća zahvala pripada mojoj obitelji koja je bila uz mene i bez koje ništa ne bi bilo moguće. Hvala od srca na svim odricanjima, podršci i razumijevanju.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Selen – esencijalni mikronutrijent 1

1.2. Selen u tlu 2

1.3. Unos i metabolizam Se u biljkama 3

1.4. Biofortifikacija selenom 6

1.5. Nutritivna vrijednost pšenične trave (*Triticum aestivum* L.) 8

1.7. Cilj diplomskog rada 11

2. MATERIJALI I METODE 12

2.1. Biljni materijal 12

2.2. Postavljanje eksperimenta i uzgoj pšenice 12

2.3. Određivanje koncentracije Se 14

2.4. Određivanje koncentracije vitamina C 14

2.5. Određivanje koncentracije klorofila i karotenoida 14

2.6. Priprema ekstrakta tkiva za određivanje topljivih fenola i ukupne antioksidacijske aktivnosti 15

2.7. Određivanje topljivih fenola 15

2.8. Određivanje ukupne antioksidacijske aktivnosti 16

2.9. Priprema uzoraka za određivanje ukupnih šećera i celuloze 16

2.10. Određivanje ukupnih šećera 16

2.11. Određivanje celuloze 17

2.12. Određivanje koncentracije topljivih proteina 18

2.13. Statistička obrada podataka 18

3. REZULTATI 19

3.1. Koncentracija Se u izdancima pšenice tretirane selenatom i selenitom 19

3.2. Utjecaj selenata i selenita na koncentraciju vitamina C u izdancima pšenice 20

3.3. Utjecaj selenata i selenita na koncentraciju klorofila u izdancima pšenice 22

3.4. Utjecaj selenata i selenita na koncentraciju karotenoida u izdancima pšenice 23

3.5. Utjecaj selenata i selenita na sadržaj topljivih fenola u izdancima pšenice.....25

3.6. Utjecaj selenata i selenita na ukupnu antioksidacijsku aktivnost izdanaka pšenice..26

3.7. Utjecaj selenata i selenita na koncentraciju ukupnih šećera u izdancima pšenice 28

3.8. Utjecaj selenata i selenita na koncentraciju celuloze u izdancima pšenice 30

3.9. Utjecaj selenata i selenita na koncentraciju proteina u izdancima pšenice.....30

4. RASPRAVA..... 33

5. ZAKLJUČCI 38

6. LITERATURA 39

1. UVOD

1.1. Selen – esencijalni mikronutrijent

Selen je element u tragovima esencijalan za ljude i životinje (Birringer i sur. 2002). Otkrio ga je 1817. godine Jöns Jacob Berzelius u komorama koje su služile za proizvodnju sumporne kiseline (Duntas i Benvenga 2014). Kao metaloid, svojstvima je sličan metalima te pripada skupini halkogenih elemanata (VIA) periodnog sustava (Web 1). Po kemijskoj aktivnosti i fizikalnim svojstvima Se je sličan sumporu (S) i teluriju (Te), čime je omogućena njegova asimilacija i metabolizam putem transportera za S (Sors i sur. 2005).

Se je uključen u brojne metaboličke puteve, a brojna znanstvena istraživanja tijekom proteklog desetljeća otkrila su njegovu krucijalnu ulogu u održavanju imunološke, endokrine, metaboličke te stanične homeostaze (Rayman 2009; Brown i Arthur 2001). Svoje funkcije u organizmu ispoljava u obliku aminokiselina selenocisteina (SeCys) i selenometionina (SeMet), koje su sastavni dio proteina poznatih kao selenoproteini. Glavne obitelji selenoproteina su: glutation-peroksidaze (GPX) koje sadrže enzime ovisne o Se, kao i izoenzime neovisne o Se, zatim tioredoksin-reduktaze (TXNRD), jodotironin-dejodinaze (DIO) te selenoprotein P koji je od posebne važnosti, te čini više od 50% Se prisutnog u plazmi (Köhrle i sur. 2005; Bianco i sur. 2002; Berry i sur. 1991).

U ljudskoj prehrani najvažniji izvori Se su meso i mesni proizvodi (31%), riba i školjke (20%), tjestenina i riža (12%), kruh i žitarice (11%), a najveća količina Se nalazi se u brazilskim oraščićima i iznutricama (>1 mg kg^{-1}; Kobayashi i sur. 2002). Preporučeni dnevni unos Se za odrasle osobe iznosi 55 μg po danu (Znanstveni odbor za hranu Europske unije 1993), iako se u posljednje vrijeme sve više znanstvenika i različitih odbora zalaže za preinaku preporučenog dnevnog unosa prilagođenog dobnim skupinama (Duntas i Benvenga 2015). Optimalna količina Se može odgoditi starenje, neophodna je za pravilno funkcioniranje muškog spolnog sustava (Birringer i sur. 2002), a u posljednje vrijeme sve više pažnje pridaje se njegovom antikancerogenom djelovanju. Brojna istraživanja pokazala su značajno smanjenje raka pluća (Reid i sur. 2002), prostate (Rayman 2005) te debelog crijeva (Peters i Takata 2008), a kao jedan od najučinkovitijih antikancerogenih oblika Se pokazao se metilselenocisten (MeSeCys) kojeg nalazimo u nekim vrstama roda *Brassica* i *Allium* te određenim vrstama roda *Astragalus* (Ellis i Salt 2003). Nedovoljan dnevni unos Se može za posljedicu imati brojne bolesti kao što su razna kardiovaskularna oboljenja, hipotireoza, smanjenje plodnosti kod muškaraca, oslabljen imunološki sustav,

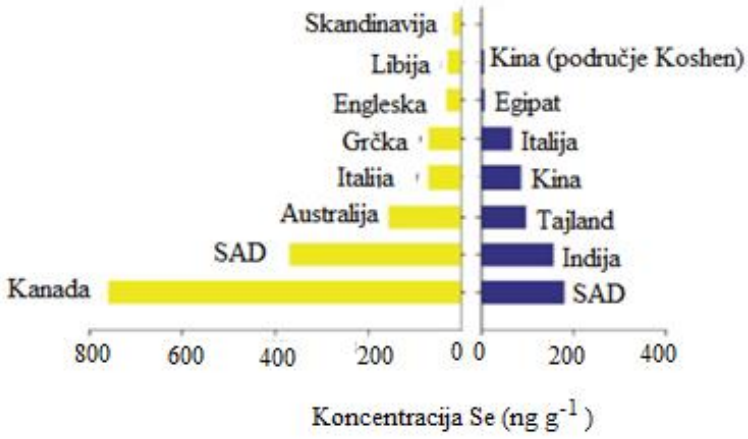
pojačana podložnost brojnim infekcijama, ali i raku. Pretpostavlja se da od bolesti uzrokovanih nedostatkom Se danas pati oko 800 milijuna ljudi diljem svijeta (Malagoli i sur. 2015). S druge strane, visoke koncentracije Se također su izrazito toksične za organizme, a uzrokovane su pretjeranim nakupljanjem u tkivima te biomagnifikacijom u hranidbenim lancima. Trovanje Se ili selenoza može biti akutna i kronična, a simptomi najčešće uključuju mučninu, povraćanje, abdominalnu bol, dijareju, ispadanje kose, lomljive nokte te perifernu neuropatiju (Helzslouer i sur. 1985). Na primjer, prehrana koja sadrži 1 mg Se po kg suhe tvari uzrokuje kronično trovanje, a jednokratni unos 1000 mg Se po kg suhe tvari putem prehrane akutno trovanje i smrt kod ljudi i životinja (Pilon-Smits i Quinn 2010; Hartikainen 2005).

Ukupni sadržaj Se u ljudskom organizmu ovisi o proučavanoj populaciji, geografskom području i prehrani, a dnevni unos Se najčešće je odraz količine Se koju nalazimo u tlu određenog područja (Slika 1) (Duntas i Benvenga 2014). Tako razlikujemo Se siromašna područja (u koje se ubraja i Hrvatska), područja s niskim razinama Se te područja bogata Se (Se toksična područja) (Gupta i Gupta 2017; Hartikainen 2005). Iako postoje brojni problemi povezani sa Se toksičnim područjima, u svijetu su puno zastupljenija Se siromašna područja (Gupta i Gupta 2017; Hartikainen 2005). Tako su u zadnje vrijeme razvijene brojne metode u svrhu riješavanja bolesti uzrokovanih nedostatkom Se kao što su različiti suplementi. Za najveći dio svjetskog stanovništva biljke predstavljaju najbitniji izvor Se pa je zbog toga obogaćivanje usjeva Se (biofortifikacija) iznimno učinkovit pristup riješavanju problema nedostatka Se u svijetu (Malagoli i sur. 2015).

1.2. Selen u tlu

Se u prirodi nalazimo u sedimentnim stijenama koje su formirane u razdoblju između karbona i kvartara. Različiti autori navode različitu prosječnu koncentraciju Se u tlima širom svijeta pa tako Gupta i Gupta (2017) navode koncentraciju 0,4 mg kg^{-1}, Hartikainen (2005) spominje raspon od 0,01 do 2 mg kg^{-1}, dok povišene koncentracije nalazimo samo u selenifernim tlima (2 – 5000 mg kg^{-1}) (Hartikainen 2005). Prisutnost Se u tlu ovisi o tipu tla, organskoj tvari te padalinama (Sors i sur. 2005). Se u tlu nalazimo u različitim organskim i anorganskim oblicima. Anorganski Se nalazimo u obliku selenida (Se^{2-}), selenita (SeO_3^{2-}), selenata (SeO_4^{2-}) te netopljivog elementarnog Se (Se^0) (Tan i sur. 2016). Topljivi selenat, koji je prevladavajući i ujedno najmobilniji anorganski oblik Se,

najčešće nalazimo u alkalnim tlima sušnih područja. U takvom je obliku Se izravno dostupan biljkama, a postupno se reducira do selenita. Selenit je uglavnom zastupljen u tlima čiji je pH kiseo do neutralan, u višim i kišovitim predjelima te močvarnim ekosustavima, dok je selenid dominantni oblik Se u izrazito kiselim tlima (Pilon-Smits i Quinn 2010; Zhu i sur. 2009; Ohlendorf 2003). Najzastupljeniji organski oblici Se su selenoaminokiseline (SeMet i SeCys) te hlapljivi metilselenidi (Pyrzyńska 2002).



Slika 1. Usporedba koncentracije Se u pšenici (žuto - lijevo) i riži (plavo - desno) u glavnim zemljama proizvođačima (preuzeto i prilagođeno prema Zhu i sur. 2009)

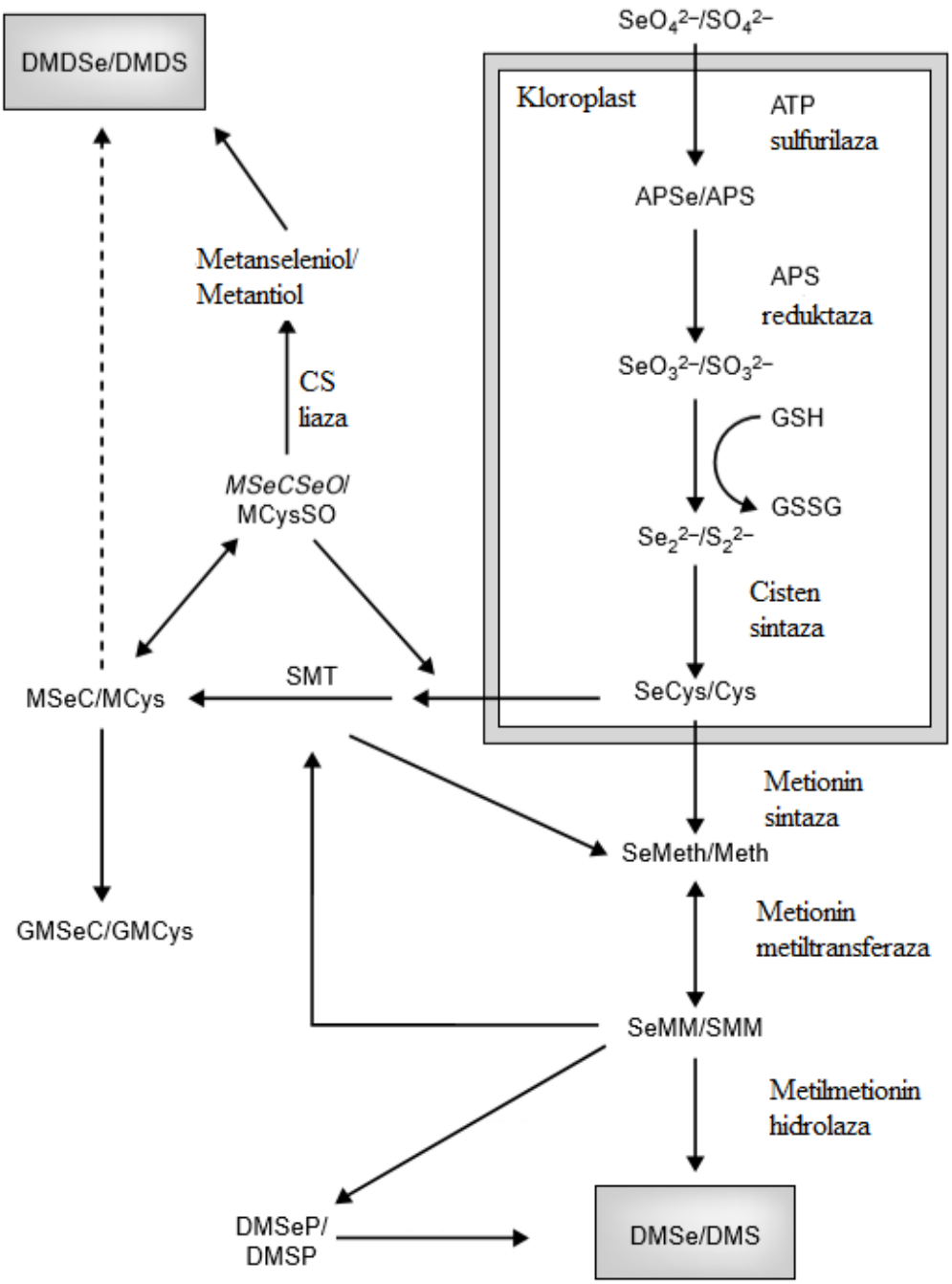
1.3. Unos i metabolizam Se u biljkama

Biljke koje akumuliraju Se poznate su znanstvenoj javnosti već dugi niz godina no interes za njihovo proučavanje pojavio se tek nedavno, a pitanje je li Se esencijalan za biljke još uvijek ostaje neodgovoreno (Ellis i Salt 2003). Biljke su klasificirane u tri skupine s obzirom na akumulaciju Se u stanicama. Tako se vrste koje akumuliraju Se u prilično visokim koncentracijama (100 - 1000 mg Se kg^{-1} suhe tvari) nazivaju sekundarnim akumulatorima. Drugu skupinu biljnih vrsta koje akumuliraju Se u koncentracijama koje su i do 100 puta veće od koncentracija koje akumulira okolna vegetacija na istom području (>1000 mg kg^{-1} suhe tvari), a koje nalazimo samo na selenifernim tlima, nazivamo hiperakumulatorima. U neakumulatorne biljke ubrajaju se one vrste koje akumuliraju manje od 100 mg Se kg^{-1} suhe stvari, a na tlima bogatima Se ne mogu preživjeti (Gupta i Gupta 2017; Pilon-Smits i Quinn 2010).

Biljke primarno unose Se iz tla u obliku selenata iako ga mogu unositi i u obliku selenita i organskog Se (White i sur. 2004). Intenzitet unosa i oblik Se koji se unosi ovisi o koncentraciji i kemijskom obliku Se u otopini tla, ali i o uvjetima u rizosferi kao što su pH te prisutnost sulfata i fosfata koji se sa Se natječu za unos u biljke (Sors i sur. 2005; Dhillon i Dhillon 2003; Blaylock i James 1994). I selenat i sulfat transportiraju se preko plazma membrane epidermalnih stanica korijena protivno njihovom elektrokemijskom gradijentu, kotransportom triju elektrona za svaki ion (Sors i sur. 2005). Sulfat se iz tla apsorbira putem niza transportera visokog i niskog afiniteta koji su smješteni u epidermalnim i kortikalnim stanicama korijena (Leustek 2002), a selektivnost ovih transportera za sulfat ili selenat ovisi o biljnoj vrsti i nutritivnom statusu (Zhu i sur. 2009). Istraživanja su pokazala kako su mutanti uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) rezistentni na selenat imali nepotpuni gen za sulfatni transporter visokog afiniteta (*Sultr1:2*), što ukazuje na važnost ovog transportera pri unosu selenata u biljke (Kassis i sur. 2007; Shibagaki i sur. 2002). Postoje značajne razlike u mehanizmima unosa i transporta selenata, selenita i organskog Se kao što je npr. SeMet. Apsorpcija selenata i organskog Se aktivan je proces dok se selenit akumulira pasivnom difuzijom koja može biti inhibirana fosfatom (Zhu i sur. 2009; Sors i sur. 2005). Translokacija Se od korijena do izdanka ovisi o kemijskom obliku Se kojim je biljka tretirana. Isto tako premještanje selenata od korijena do izdanka odvija se puno brže nego translokacija selenita ili organskog Se. Selenat se odmah transportira u izdanak, dok se selenit uglavnom zadržava u korijenu (Li i sur. 2008; Sors i sur. 2005; Terry i sur. 2000). Pickering i suradnici (2000) otkrili su kako su kemijski oblici Se i njihova različita distribucija uvjetovani i razvojnim stadijem, pa se tako selenat zadržava u starijim listovima, a organski Se (MeSeCys) u mlađim tkivima biljke *Astragalus bisulcatus*. Osim toga, u svojim su istraživanjima Pickering i suradnici (2003) ustanovili kako se tijekom razvoja organski Se premješta iz mladih tkiva izdanka u još mlađa tkiva.

U preglednom radu, Terry i suradnici (2000) navode kako više biljke asimiliraju Se preko asimilacijskog puta S (Slika 2). Taj put uključuje nespecifično ugrađivanje Se u selenoaminokiseline, ali i isparavanje koje se događa prilikom prekomjerne opskrbe biljaka Se. Nakon što se selenat apsorbirao u korijen, premješta se preko ksilema u listove. Tamo ulazi u kloroplaste u kojima se odvija prvi korak u redukciji selenata, aktivacija pomoću enzima ATP-sulfurilaze u aktivirani oblik adenozin-fosfoselenat (APSe). Anderson i suradnici (1983) te Dilworth i Bandurski (1977) navode kako APSe može biti reduciran i neenzimski do glutation (GSH) konjugiranog selenita (GS-selenit). GS-selenit je potom

reduciran pomoću GSH do selenodiglutationa (GS-Se-SG). Kada biljka umjesto selenata unosi selenit, u asimilacijskom putu nema aktivacije selenata nego se odmah odvija neenzimska redukcija pomoću GSH. GS-Se-SG se potom reducira pomoću NADPH do selenola (GS-SeH) i na koncu do GSH konjugiranog selenida ($GS\text{-}Se^-$) pomoću enzima glutation-reduktaze (GR). Slijedeći analogiju asimilacijskog puta S, APSe može biti reduciran do selenita i enzimski pomoću APS-reduktaze, a nakon toga do selenida pomoću sulfit-reduktaze. No unatoč istraživanjima, ne postoje čvrsti dokazi da su APS-reduktaza i sulfit-reduktaza uključene u redukciju selenata *in vivo* (Burnell 1981). Djelovanjem cistein-sintaze (CS) iz selenida i O-acetilserina nastaje SeCys. Ng i Anderson (1978) navode kako aktivnost CS-a ovisi o odnosu sulfida i selenida, pri čemu selenid inhibira sintezu Cys dok višak sulfida inhibira sintezu SeCys. Najizgledniji enzim pomoću kojeg nastaje SeMet je citosolni enzim metionin-sintaza (MS). Ugrađivanje u proteine odvija se nespecifičnom zamjenom SeCys i SeMet na mjesto Cys i Met (Terry i sur. 2000). Metilacija SeMet do Se-metilSeMet pomoću Met-metiltransferaze odvija se u citosolu. U izdanku, Se se pretvara u hlapljivi spoj djelovanjem enzima metilMet-hidrolaze koja proizvodi dimetilSe (DMSe). Još jedan metilirani oblik Se koji isparava je dimetilselenopropionat (DMSeP) koji nastaje djelovanjem enzima DMSeP-liaze (Dacey i sur. 1987).



Slika 2. Put asimilacije sulfata i predloženi put asimilacije selenata u višim biljkama (preuzeto i modificirano prema Ellis i Salt 2003)

1.4. Biofortifikacija selenom

S obzirom da ljudi kroz prehranu moraju unositi čak 22 esencijalna minerala, njihova nejednaka raspodjela u pojedinim dijelovima svijeta i popratne bolesti koje nastaju kao rezultat takve raspodjele predstavljaju veliki problem (Bouis 2003). Malnutricija, poznata i kao „skrivena glad“ (nedostatak esencijalnih mikronutrijenata ili vitamina;

Kennedy i sur. 2003), pogađa više od polovice sveukupnog svjetskog stanovništva, a u svrhu njenog smanjenja u posljednjih nekoliko godina provode se brojna istraživanja i poduzimaju razne mjere i strategije (Mayer i sur. 2008). Jedan od novijih pristupa rješavanju ovog problema je biofortifikacija. Ovaj pristup ima brojne prednosti, a jednom kad se uspostavi postaje izrazito održiv. Biofortifikacija povećava produktivnost poljoprivrednih gospodarstava u zemljama u razvoju na ekološki prihvatljiv i koristan način. Sjemenke žitarica obogaćene različitim mineralima i mikronutrijentima otpornije su na brojne bolesti i okolišne stresove pa su i konačni prinosi veći (Zhao i McGrath 2009; Nestel i sur. 2006). Biofortifikacija predstavlja povećanje dostupnih koncentracija esencijalnih mikronutrijenata u usjevima koristeći se pri tome tradicionalnim tehnikama uzgoja (agronomske strategije) i modernom biotehnologijom (genetičke strategije) (Mayer i sur. 2008; Nestel i sur. 2006).

Agronomske strategije biofortifikacije uglavnom podrazumijevaju primjenu mineralnih gnojiva te poboljšanje topljivosti i pokretljivosti mineralnih elemenata u tlu. Koncentracija Se u biljkama može se povećati aplikacijom gnojiva u tlo ili folijarnim tretmanom. Najčešća je upotreba anorganskih oblika Se kao što su Na_2SeO_4 ili K_2SeO_4, čime se osigurava Se koji je odmah dostupan biljkama na korištenje. No, u posljednje vrijeme sve više se povećava upotreba selenita ili manje topljivih oblika selenata kao što je $BaSeO_4$ koji osiguravaju dugotrajnije učinke i dostupnost Se (El-Ramady i sur. 2014; White i Broadley 2008). Aplikacija gnojiva u tlo preporučuje se u većini slučajeva, posebno kod biljaka koje su podložne utjecaju vlage na kraju sezone te toplinskom stresu (Lyons i sur. 2005).

Povećavanje koncentracija mineralnih elemenata u proizvodnji primjenom mineralnih gnojiva može se poboljšati i uzgojem kultura s povećanom sposobnošću akumuliranja ovih minerala u njihovim jestivim dijelovima (genetičke strategije). Genetički inženjering, za kojeg se pokazalo da povećava akumulaciju Se u biljkama te toleranciju i volatilizaciju, uglavnom se fokusira na enzime koje osim u metabolizmu Se nalazimo i u metaboličkim putevima S (Malagoli i sur. 2015). White i Broadley (2008) napominju da bez obzira na to koliko ovakve strategije bile uspješne, ipak treba imati na umu da se njima samo poboljšava akumulacija i korištenje onih mineralnih elemenata koji su dostupni usjevu. Isto tako, navode i da su prisutne značajne genske varijacije u koncentracijama mineralnih elemenata koji najčešće manjkaju u ljudskoj prehrani u jestivim dijelovima većine vrsta usjeva. Tako na primjer, različite koncentracije mineralnih

elemenata nalazimo u zrnima većine vrsta žitarica. Budući da se zrna žitarica najčešće konzumiraju nakon mljevenja i poliranja, postavlja se pitanje jesu li genetičke strategije biofortifikacije uopće korisne u tom slučaju. Naime, mineralni elementi nisu homogeno raspoređeni unutar zrna, a njihove koncentracije često su najveće upravo u ljusci ili aleuronskom sloju koji se u procesima mljevenja i poliranja većim dijelom uklanjaju pa se s njima gube i značajne koncentracije potrebnih elemenata.

Mikroorganizmi, prvenstveno bakterije, imaju vrlo važnu ulogu u agrikulturnim sustavima (kontrola bolesti, rast biljaka, prehrana). U novije vrijeme sve više istraživanja predlaže upotrebu bakterija koje potiču rast biljaka (PGPB od engl. *Plant growth - promoting bacteria*) kao alternativu koja pridonosi povećanom unosu mikronutrijenata u biljke. Postoji već nekoliko izvještaja koji govore o korištenju PGPB-a koje imaju sposobnost mobilizacije različitih mikronutrijenata kao što su Zn, Mn, Fe, Cu i Se kao strategiju biofortifikacije (Mora i sur. 2015). Bakterije imaju sposobnost reduciranja oksidiranih i metiliranih Se-oksianiona do nekih drugih oblika Se. U takvim procesima redukcije ovi mikroorganizmi imaju sposobnost pretvaranja Se^{6+} i Se^{4+} do Se^{0} i na kraju generacije metiliranih i organskih oblika Se (SeMet i SeMeSeCys) (Losi i Frankerberger 1998).

1.5. Nutritivna vrijednost pšenične trave (*Triticum aestivum* L.)

Mnogi lijekovi koji se danas široko primjenjuju biljnog su podrijetla. Neki su sintetizirani od biljnih ekstrakata, a drugi oponašaju određene biljne ljekovite komponente. Pšenična trava (*Triticum aestivum* L.) naziv je za mlade izdanke pšenice stare 6-10 dana. Široko je rasprostranjena zdrava namirnica i u zadnje vrijeme postaje sve važnija nadopuna prehrani, ali njene funkcionalne grupe i mehanizmi i dalje su nepoznanica. Tijekom klijanja se u klijancima sintetiziraju vitamini, minerali i brojne fenolne komponente, uključujući i flavonoide, stoga pšenična trava predstavlja bogat izvor brojnih nutrijenata uključujući Fe, Ca, Mg, aminokiseline, vitamine A, C i E, ali i znatne količine (70%) klorofila i tako doseže maksimalni antioksidacijski potencijal (Suriyavathana i Roopavathi 2016). Komercijalno je dostupna u obliku tekućine, praška ili koncentrata. Postoji vrlo malo znanstvenih i kliničkih istraživanja vezanih za ulogu pšenične trave u ljudskom zdravlju. Osim što se koristi se kao izvor nutrijenata, važna je i za povećanje razine hemoglobina i sprječavanje bakterijskih infekcija. Uklanja brojne toksine i kancerogene agense iz jetre i krvi pa se tako može koristiti za tretiranje niza različitih bolesti i upalnih

procesa kao što su obična prehlada, vrućica, kašalj, bronhitis, različiti kožni poremećaji, konstipacija i slično (Parit i sur. 2018). Neki zagovornici pšenične trave koriste ju i za liječenje raka (Alitheen i sur. 2011; Blumenthal 1998), ulcerativnog kolitisa (Ben-Arye i sur. 2002) i boli u zglobovima jer je moćan antioksidans (Das i sur. 2012), ali zasad još uvijek nema dovoljno znanstvenih dokaza koji potvrđuju učinkovitost za bilo koju od ovih upotreba.

Jedan od značajnih nutrijenata pšenične trave je vitamin C, koji je neenzimski antioksidans, a s obzirom da ga ljudi ne mogu sintetizirati potrebno ga je unositi putem prehrane. Donor je elektrona i stoga reducirajući agens pa reducira i na taj način neutralizira reaktivne kisikove tvari (ROS od engl. *Reactive Oxygen Species*; Padayatty i sur. 2003). No, njegova uloga nije samo antioksidacijska, vitamin C potreban je i za ispravan rad brojnih enzima u ljudskom tijelu. Neophodan je za enzime koji kataliziraju hidroksilaciju kolagena stabilizirajući na taj način njegovu strukturu (Prockop i Kivirikko 1995). Od iznimne je važnosti i za enzime koji sudjeluju u sintezi karnitina prijeko potrebnog za transport masnih kiselina u mitohondrije (Rebouche 1991). Sudjeluje i u sintezi noradrenalina (prekursora adrenalina) (Kaufman 1974), regulira metabolizam tirozina (Englardt i Seifter 1986), a važan je i za dodavanje amidnih grupa peptidnim hormonima povećavajući na taj način njihovu stabilnost (Eipper i sur. 1992).

Mladi izdanci pšenice posebno obiluju velikim sadržajem klorofila. Klorofil je zeleni pigment kojeg nalazimo u većini biljaka. Prisutan je u nekoliko oblika, ali najvažniji i najrašireniji od svih je klorofil *a*. U posljednje vrijeme sve češća je njegova primjena u alternativnoj medicini zbog brojnih blagotvornih učinaka na ljudsko zdravlje. Smanjuje upalu, oksidaciju, a pomaže i u zacijeljivanju rana. Važan je kao izvor brojnih antioksidansa, stimulira rad imunološkog sustava, pomaže u suzbijanju anemije, ima antikancerogeno djelovanje, a pomaže i u detoksikaciji jetre i cjelokupnog organizma (İnanç 2011).

Uz klorofil, pšenična je trava i izvor karotenoida. Karotenoidi su strukturno i funkcionalno vrlo raznolika skupina prirodnih pigmenata (Landrum 2010). Sastavni su dio fotosintetskih organela svih viših biljaka, mahovina, paprati i alga. Nalazimo ih i u fotosintetskim membranama fototropnih bakterija i cijanobakterija, a prisutni su i u ljudskom organizmu (Scheer 2003). Važni su prekursori retinola (vitamina A), ali njihova glavna uloga u nefotosintetskim organizmima ipak je (foto)zaštita (Cvetković i sur. 2013).

Bitna je i njihova zaština uloga u brojnim poremećajima uzrokovanim ROS-om kao što su kardiovaskularne bolesti, rak, neurološki i fotosenzitivni ili poremećaji vida (Fiedor i Burda 2014).

Biljni sekundarni metaboliti, kao što su fenolni spojevi također su važan pokazatelj nutritivne vrijednosti. Fenolni spojevi definirani su spojevi koji sadrže 1 ili više aromatskih prstenova s 1 ili više hidroksilnih skupina. Kategorizirani su kao fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni, kumarini i tanini (Liu 2004). Produkti su sekundarnog metabolizma u biljkama, a nastaju u pentoza-fosfatnom putu, fenilpropanoidnom putu te putu šikiminske kiseline. Sudjeluju u obrani biljke od patogena, parazita, predatora i UV zračenja (Liu 2013). Sukladno njihovoj ulozi u biljkama, fenoli u našoj prehrani mogu osigurati dodatne zdravstvene prednosti povezane sa smanjenim rizikom razvoja kroničnih bolesti kao što su kardiovaskularna oboljenja, smanjen rizik od srčanog udara, dijabetesa, raka, a imaju i protuupalno i antialergijsko djelovanje (Ozcan i sur. 2014).

Nadalje, brojna istraživanja govore o izrazitoj antioksidacijskoj aktivnosti koju posjeduju mladi izdanci pšenice. Različiti vitamini (na primjer vitamin A, B, C i E), fenolni spojevi, veliki sadržaj klorofila te karotenoida nalaze se u velikim količinama u pšeničnoj travi pa se iz toga da zaključiti kako su njezini ekstrakti vrlo moćni agensi pri gašenju slobodnih radikala (Fortunä i sur. 2018). Biljni ekstrakti bogati ovim spojevima koriste se u liječenju raka, želučanih oboljenja, anemije, ali i brojnih drugih krvnih bolesti (Parit i sur. 2018).

Ugljikohidrati čine jednu od četiriju glavnih vrsta biomolekula (uz nukleinske kiseline, lipide i proteine). Po kemijskoj strukturi su aldehidi ili ketoni s više hidroksilnih skupina. Služe kao pričuvna energija, gorivo i metabolički međuprodukti. Šećeri riboza i deoksiriboza dio su strukture molekula RNA i DNA. Ugljikohidrati mogu biti vezani na mnoge lipide i proteine, a kao takvi imaju ključnu ulogu u komunikaciji među stanicama. Određeni polisaharidi (kao što je celuloza) strukturni su elementi staničnih stijenki bakterija i biljaka. Celuloza i druga biljna vlakna također su važan dio ljudske prehrane. Vlakna iz prehrambenih namirnica izazivaju osjećaj sitosti. Netopljiva vlakna, kao što je celuloza, povećavaju brzinu kojom produkti prolaze kroz debelo crijevo. Ovo povećavanje brzine smanjuje izloženost toksinima u našoj prehrani (Berg i sur. 2013).

Parit i suradnici (2018) navode da je pšenična trava važna i zbog brojnih aminokiselina i proteina neizostavnih za ljudsko zdravlje. Sok pšenične trave sadrži čak 17

različitih aminokiselina (Singh 2012; Mujoriya i Bodla 2011). Proteini prisutni u izdancima probavljaju se, apsorbiraju i metabaliziraju normalnim fiziološkim procesima opet do aminokiselina koje su prijeko potrebne za sintezu novih proteina u ljudskom tijelu (Padalia i sur. 2010).

1.7. Cilj diplomskog rada

Danas su na tržištu dostupni različiti preparati pšenične trave (mladi izdanci pšenice stari 6-10 dana) koji se zbog svoje velike nutritivne vrijednosti koriste kao dodatak svakodnevnoj prehrani. Zbog velike važnosti Se za zdravlje čovjeka, i biljaka kao glavnog izvora ovog esencijalnog mikronutrijenta cilj je ovog istraživanja bio uzgojiti pšeničnu travu (*T. aestivum* L., sorta Kraljica) obogaćenu Se. U istraživanju su korištena dva različita oblika Se, selenat i selenit, u rastućim koncentracijama. Kako asimilacija Se može utjecati na različite metaboličke putove, cilj je također bio odrediti utjecaj različitih kemijskih oblika i koncentracija Se na nutritivnu vrijednost pšenične trave. Kao pokazatelji nutritivne vrijednosti mjereni su koncentracija vitamina C, koncentracije klorofila i karotenoida, sadržaj topljivih fenola, sadržaj proteina, ukupnih šećera i količina celuloze (vlakana), te ukupna antioksidacijska aktivnost.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Biljni materijal

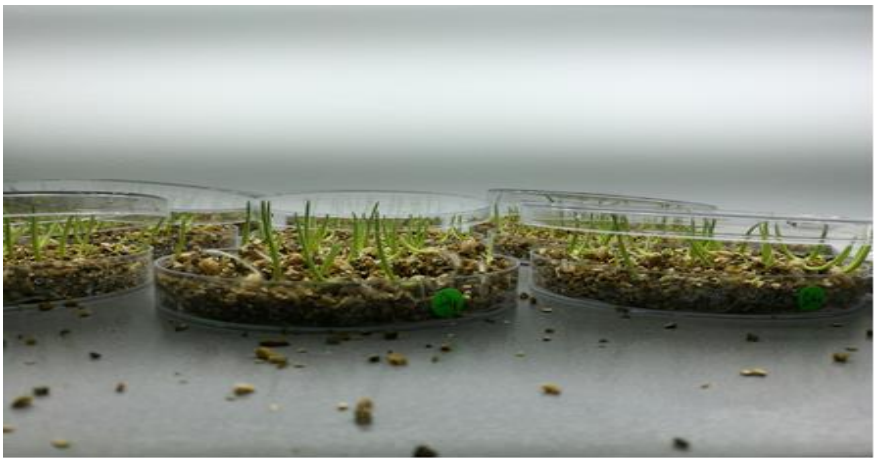
Istraživanje je provedeno na izdancima mlade pšenice stare tjedan dana, koji se nazivaju pšeničnom travom. Za potrebe istraživanja korišteno je sjeme ozime pšenice sorte Kraljica, visokorodne i najraširenije sorte u proizvodnji u Republici Hrvatskoj, dobivene na Poljoprivrednom institutu u Osijeku.

2.2. Postavljanje eksperimenta i uzgoj pšenice

Sjeme pšenice je prije naklijavanja isprano vodovodnom vodom od grubih nečistoća, pa zatim sterilizirano kratkim držanjem u 96%-tnom etanolu uz miješanje. Sjeme je potom dva puta isprano dH_2O, te dodatno sterilizirano 8 min u 1%-tnoj otopini Izosana uz dodatak deterdženta Tweena (u konačnoj koncentraciji od 0,001%) uz neprestano miješanje na magnetnoj mješalici. Nakon sterilizacije sjeme je dobro isprano u dH_2O, u kojoj je i ostavljeno preko noći u hladnjaku na +4 °C radi procesa bubrenja. Nabubreno sjeme je postavljeno u sterilne plastične Petrijeve zdjelice (Ø 90 mm, 50 sjemenki/Petrijevci), punjene sterilnim supstratom za klijanje – vermikulitom, koji je postavljen na filter papir i prethodno natopljen s 20 mL hranjive otopine po Hoaglandu (pH 6,00) (Tablica 1) (Hoagland i Arnon 1950) s dodatkom Se u obliku selenata ili selenita. Za potrebe eksperimenta korištene su stock otopine natrijevog selenata (Na_2SeO_4) i natrijevog selenita (Na_2SeO_3) koje su dodavane u hranjivu otopinu do konačnih koncentracija selenata od 0,1, 1, 5, 10 i 100 mg L^{-1}, ili selenita do konačnih koncentracija od 0,1, 1, 5, 10 i 50 mg L^{-1}. Kontrolne biljke rasle su na hranjivoj podlozi bez dodatka Se. Pšenica je uzgajana u kontroliranim uvjetima u klima-sobi na temperaturi od 25 °C te svjetlosnom režimu 16h dan/8h noć tijekom 7 dana uz redovito zalijevanje hranjivom otopinom po Hoaglandu (Slika 3). Nakon tjedan dana rasta, izdanci mlade pšenice su uzorkovani za potrebe nutritivne analize.

Tablica 1. Sastav hranjive otopine po Hoaglandu.

Makronutrijenti – stock otopine	**Mr (g mol^{-1})**	**c (M)**	**γ (g L^{-1})**	**Volumen za 1L (mL)**	**Element**	**Koncentracija elementa u 1 L otopine (mM)**
$NH_4H_2PO_4$	115,03	1	115,03	1	P	1
KNO_3	101,11	1	101,11	6	K	6
$Ca(NO_3)_2$	236,16	1	236,16	4	Ca	4
$MgSO_4 \times 7H_2O$	246,47	1	246,47	2	Mg	2
Mikronutrijenti – stock otopine	Mr (g mol^{-1})	c (mM)	γ (g L^{-1})	Volumen za 1L (mL)	Element	Koncentracija elementa u 1 L otopine (μM)
H_3BO_3	61,84	46,25	2,86	1	B	46,25
$MnCl_2 \times 4H_2O$	197,91	9,15	1,81		Mn, Cl	9,15
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	289,55	0,77	0,22		Zn	0,77
$CuSO_4 \times 5H_2O$	249,71	3,20	0,8		Cu	3,20
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	241,97	1,03	0,25		Mo	1,03
Fe-EDTA	346,08	20	6,92	0,25	Fe	5



Slika 3. Pšenica (*Triticum aestivum* L.) uzgajana u klima-sobi (fotografirala: Katarina Šunić).

2.3. Određivanje koncentracije Se

Za potrebe određivanja koncentracije Se, mladi izdanci pšenice su nakon uzorkovanja 24 h sušeni u sušioniku na 105 °C. Suhi izdanci pšenice samljeveni su u fini prah pomoću laboratorijskog metalnog ultracentrifugalnog mlina (Retsch ZM 200). Alikvotu usitnjenog praha dodano je 10 mL mješavine HNO_3 i H_2O_2 (u omjeru 5:1), a homogenati su potom zagrijavani u mikrovalnoj pećnici (CEM Mars 6) na 180 °C 60 min. Nakon hlađenja, u reakcijsku smjesu dodano je 5 mL koncentrirane HCl (90 °C, 60 min) u svrhu redukcije Se^{6+} do Se^{4+}. Koncentracije Se mjerene su hidridnom tehnikom koristeći ICP – OES (model PerkinElmer Optima 2100 DV). Kao referentni materijal korišteno je rižino brašno IRMM – 804.

2.4. Određivanje koncentracije vitamina C

Koncentracija vitamina C određena je spektrofotometrijski metodom koju su opisali Benderitter i sur. (1998). Vitamin C se određuje u svježe pripremljenim vodenim ekstraktima biljnog tkiva. Tkivo izdanka pšenice usitnjeno je u tekućem dušiku pomoću tarionika i tučka, te je alikvotu biljnog praha (0,15 g) dodan 1 mL dH_2O. Nakon homogeniziranja miješanjem na vibracijskoj mješalici, homogenati su centifugirani 5 min pri 6 000 *g* na temperaturi od +4 °C. Dobivenom supernatantu (300 µL) dodano je 100 µL 13%-tne otopine trikloroctene kiseline (TCA), 25 µL dH_2O i 75 µL reagensa 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH). Reakcijska smjesa potom je inkubirana 60 min u vodenoj kupelji na +37 °C. Uz svaku probu, na isti je način pripremljena i slijepa proba, osim što je u slijepe probe reagens DNPH dodan tek nakon inkubacije na kupelji, kako bi izostala reakcija. Nakon inkubacije u reakcijsku smjesu dodano je 500 µL 65%-tne H_2SO_4, koja je potom promiješana na vibracijskoj mješalici. U slijepu probu je, uz H_2SO_4, dodan i reagens DNPH. Apsorbancija dobivene otopine mjerena je pri valnoj duljini od 520 nm. Koncentracija vitamina C određena je pomoću jednadžbe pravca standardnog dijagrama u kojem su kao standardi korištene rastuće koncentracije vitamina C. Rezultati su izraženi u mg vitamina C po 100 grama svježe tvari (mg 100 $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$).

2.5. Određivanje koncentracije klorofila i karotenoida

U svrhu određivanja koncentracija klorofila i karotenoida tkivo izdanka pšenice usitnjeno je u tekućem dušiku pomoću tučka i tarionika, te je alikvotu (0,1 g) usitnjenog praha dodan 1 mL 80%-tnog acetona u svrhu ekstrakcije pigmenata. Homogenati dobiveni

miješanjem na vibracijskoj mješalici potom su centrifugirani 15 min pri 22 000 *g* i na temperaturi od +4 °C. Supernatant je dekantiran u epruvete, a postupak ekstrakcije je ponovljen još 3 puta do obezbojenja taloga, pri čemu su dobiveni ekstrakti pulirani. U puliranim razrijeđenim ekstraktima mjereni su pigmenti (klorofil i karotenoidi) spektrofotometrijski na tri valne duljine: 470 nm, 645 nm i 662 nm. Rezultati su izraženi u mg klorofila, odnosno karotenoida po 100 g svježe tvari (mg 100 $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$).

2.6. Priprema ekstrakta tkiva za određivanje topljivih fenola i ukupne antioksidacijske aktivnosti

Izdanci pšenice usitnjavani su u tekućem dušiku pomoću tarionika i tučka, te je alikvotu (0,15 g) dobivenog praha dodan 1,5 mL 80%-tnog etanola u svrhu ekstrakcije fenolnih spojeva. Nakon homogenizacije miješanjem na vibracijskoj mješalici, homogenati su inkubirani 30 min u vodenoj kupelji na +80 °C radi učinkovitije ekstrakcije. Nakon ekstrakcije, homogenati su centrifugirani 15 min pri 22 000 *g* i na temperaturi +4 °C. Supernatanti su potom odvojeni te pohranjeni na -80 °C do daljnjih analiza. Dobiveni supernatanti korišteni su za mjerenje sadržaja topljivih fenola te za određivanje ukupne antioksidacijske aktivnosti izdanaka pšenice.

2.7. Određivanje topljivih fenola

Topljivi fenoli određivani su metodom po Folin i Ciocalteuu (1927). Riječ je o spektrofotometrijskoj metodi za određivanje koncentracije ukupnih topljivih fenola u različitim uzorcima, a u kojoj se koristi Folin-Ciocalteu reagens koji se sastoji od fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline. Spomenute se kiseline, u reakciji s fenolnim komponentama, reduciraju u plavo obojene okside. Intenzitet plavog obojenja proporcionalan je koncentraciji topljivih fenola, a promjena boje prati se na valnoj duljini od 765 nm. Reakcijska smjesa za mjerenje ukupnih topljivih fenola koja se sastojala se od 20 µL ekstrakta, 1,58 mL dH_2O i 100 µL Folin-Ciocalteau reagensa, dobro je promješana na vibracijskoj mješalici, te joj je nakon 5 min dodano 300 µL zasićene otopine Na_2CO_3. Takva je reakcijska smjesa nakon miješanja inkubirana 60 min na +37 °C. Nakon inkubacije zbog moguće pojave pahuljičastog taloga reakcijsku smjesu je bilo potrebno centrifugirati 5 min pri 15 000 *g*. Apsorbancija smjese mjerena je spektrofotometrijski pri 765 nm. Koncentracija topljivih fenola određena je pomoću jednadžbe pravca standardnog dijagrama u kojem je kao standard korištena galna kiselina. Rezultati su izraženi u ekvivalentima galne kiseline po 100 g svježe tvari (mg GAE 100 $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$).

2.8. Određivanje ukupne antioksidacijske aktivnosti

Ukupna antioksidacijska aktivnost u etanolnim ekstraktima izdanaka pšenice određena je metodom FRAP (od engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*). Metoda se temelji na sposobnosti antioksidansa da doniranjem elektrona u kiselom mediju (pH 3,6) reduciraju žuti kompleks Fe^{3+} s 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazinom (TPTZ) u plavo obojeni kompleks Fe^{2+}-TPTZ, pri čemu se spektrofotometrijski mjeri intenzitet nastale plave boje pri 593 nm. Intenzitet boje je proporcionalan redukcijskoj sposobnosti antioksidansa. Reakcijska smjesa za FRAP analizu sastojala se od 0,5 mM TPTZ-a, 1 mM $FeCl_3 \times 6H_2O$ u acetatnom puferu (pH 3,6). U jažice mikrotitarskih pločica dodano je 10 μL etanolnog ekstrakta i 290 μL reakcijske smjese, sadržaj u pločicama je potom miješan 30 s, te je nakon 3,5 min inkubacije na sobnoj temperaturi mjerena apsorbancija pri 593 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Tecan). Ukupna antioksidacijska aktivnost određena je pomoću jednadžbe pravca standardnog dijagrama u kojem je kao standard korišten Trolox (sintetički vitamin E) u koncentracijama od 0,25 do 2 mM. Rezultati su izraženi u ekvivalentima Troloxa (nmolE (Trolox) 100 $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$).

2.9. Priprema uzoraka za određivanje ukupnih šećera i celuloze

Šećeri i celuloza (vlakna) u klijancima pšenice mjereni su kolorimetrijskom metodom pomoću Anthronova reagensa. Ova metoda temelji se na reakciji ugljikohidrata iz uzorka s Anthronovim reagensom čime nastaje kompleks zeleno-plavog obojenja kojemu se mjeri apsorbancija pri 625 nm. Za uspješnost ove metode i razvoj obojenja ključno je zagrijavanje u kiseloj sredini koje se odvija nakon dodatka koncentrirane H_2SO_4. U svrhu određivanja ukupnih šećera i celuloze tkivo izdanaka pšenice usitnjeno je tekućim dušikom pomoću tarionika i tučka, a zatim u Petrijevim zdjelicama postavljeno u sušionik na +60 °C tijekom 48 sati radi procesa sušenja. Nakon sušenja, tkivo je prebačeno u epruvete koje su zatim pohranjene u eksikator do analize.

2.10. Određivanje ukupnih šećera

Za određivanje ukupnih šećera 20 mg osušenog tkiva odvagano je u epruvete (3 tehničke replike po jednom biološkom uzorku). Dodatkom 4 mL acetona i miješanjem na vibracijskoj mješalici, iz suhog su tkiva preko noći u hladnjaku na +4 °C ekstrahirani pigmenti. Sljedeći su dan homogenati još jednom promiješani na vibracijskoj mješalici, te potom centrifugirani 5 min pri 4 400 *g*, i sobnoj temperaturi. Postupak ekstrakcije pigmenata iz taloga je potom ponovljen još 3 puta do potpunog uklanjanja pigmenata. Na

taloge tkiva je zatim dodano 4 mL 80%-tnog etanola radi ekstrakcije ukupnih šećera. Nakon homogeniziranja miješanjem na vibracijskoj mješalici, homogenati su inkubirani 30 min u vodenoj kupelji na +80 °C radi učinkovitije ekstrakcije. Po završetku inkubacije uzorci su promiješani, a zatim u centrifugirani 5 min pri 4 400 *g*, na sobnoj temperaturi. Postupak ekstrakcije šećera je potom ponovljen još 3 puta pri čemu je supernatant potreban za mjerenje šećera skupljan samo prva 2 puta. Nakon treće reekstrakcije taloga, epruvete s talogom ostavljene su preko noći u sušionik na +60 °C kako bi se talog dobro posušio za potrebe određivanja celuloze.

U svrhu određivanja ukupnih šećera, 200 µL dobivenog etanolnog ekstrakta je uparavano na vodenoj kupelji na +75 °C, radi uklanjanja etanola. Nakon uparavanja, sadržaj u tubicama je otopljen u 1 mL dH_2O. Nakon snažnog miješanja, uzorci su centrifugirani 5 min pri 20 000 *g*, na temperaturi od +4 °C kako bi se uklonile netopive tvari. Dobiveni uzorci (supernatanti) su korišteni za određivanje šećera. U mikrotitarsku pločicu pipetirano je 100 µL uzorka u triplikatu, a zatim je dodano 200 µL Anthronova reagensa. Reakcijska smjesa na pločici s poklopcem je zatim inkubirana 30 min na +80 °C, te prije mjerenja apsorbancije ohlađena na sobnu temperaturu. Nakon 40 s miješanja, na čitaču mirotitarskih pločica mjerena je apsorbancija pri 625 nm. Ukupni šećeri određeni su pomoću jednadžbe pravaca standardnog dijagrama u kojima je kao standard korištena glukoza. Rezultati su izraženi u mg šećera po g suhe tvari (mg $g^{-1}_{\text{suhe tvari}}$).

2.11. Određivanje celuloze

Za određivanje celuloze (vlakana) odvagano je 8 mg taloga, dobivenog nakon ekstrakcije šećera etanolom i nakon sušenja u sušioniku. Alikvotiranom je talogu dodan 1 mL Updegraffovog reagensa (octena kiselina:dušična kiselina:voda, 8:1:2), uz miješanje na vibracijskoj mješalici. Reakcijska je smjesa je potom inkubirana u 30 min u vodenoj kupelji na +95 °C. Nakon inkubacije, reakcijska je smjesa ohlađena na ledu i zatim centrifugirana 15 min pri 20 000 *g*, na temperaturi od +4 °C. Supernatant je potom uklonjen, a talog je ispran 1,5 mL dH_2O, pri čemu je sadržaj tubice lagano promiješan inverznim okretanjem. Nakon centrifugiranja 15 min pri 20 000 *g* i +4 °C, supernatant je ponovno uklonjen, dok je dobiveni talog još 3 puta ispiran acetonom. Isprani je talog ostavljen na sušenje preko noći na sobnoj temperaturi. Idući dan je na osušeni talog dodano 175 µL 72%-tne H_2SO_4, pri čemu su uzorci inkubirani 30 min na sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacije, uzorci su promiješani na vibracijskoj mješalici te ponovno postavljeni na

inkubaciju dodatnih 15 min. Nakon inkubacije u tubicu je dodano 825 µL dH_2O, te je sadržaj u tubici centrifugiran 5 min pri 14 000 *g* na +4 °C. Dobiveni je supernatant za potrebe mjerenja celuloze 20× razrijeđen. Tako je za mjerenje celuloze u mikrotitarsku pločicu pipetirano 100 µL uzorka u triplikatu, a zatim dodano 200 µL Anthronova reagensa. Reakcijska smjesa na pločici s poklopcem je zatim inkubirana 30 min na +80 °C, te prije mjerenja apsorbancije ohlađena na sobnu temperaturu. Nakon 40 s miješanja, na čitaču mirotitarskih pločica mjerena je apsorbancija pri 625 nm. Celuloza (vlakna) određena je pomoću jednadžbe pravaca standardnog dijagrama u kojima je kao standard korištena glukoza. Rezultati su izraženi u mg celuloze po g suhe tvari (mg $g^{-1}_{\text{suhe tvari}}$).

2.12. Određivanje koncentracije topljivih proteina

Proteinski ekstrakti za potrebe određivanja koncentracije topljivih proteina pripremljeni su usitnjavanjem izdanaka pšenice u tekućem dušiku pomoću tarionika i tučka. Na alikvot usitnjenog praha (0,3 g) dodan je 1,5 mL hladnog ekstrakcijskog pufera (100 mM kalij-fosfatni pufer, pH 7,0, 1 mM EDTA). Nakon homogenizacije snažnim miješanjem na vibracijskoj miješalici, proteini su ekstrahirani stajanjem 10 min na ledu te centrifugiranjem 15 min pri 20 000 *g* i na +4 °C. Dobiveni supernatanti korišteni su za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu (1976). Proteinski ekstrakti (10 µL) pipetirani su u mikrotitarsku pločicu (96 jažica) u triplikatu, nakon čega je dodano 200 µL Bradfordova reagensa. Nakon 5 min inkubacije pri sobnoj temperaturi, apsorbancija je mjerena pri 595 nm. Koncentracija topljivih proteina određena je pomoću jednadžbe pravca standardnog dijagrama koristeći albumin goveđeg seruma kao standard. Rezultati su izraženi u mg po g svježe tvari (mg $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$).

2.13. Statistička obrada podataka

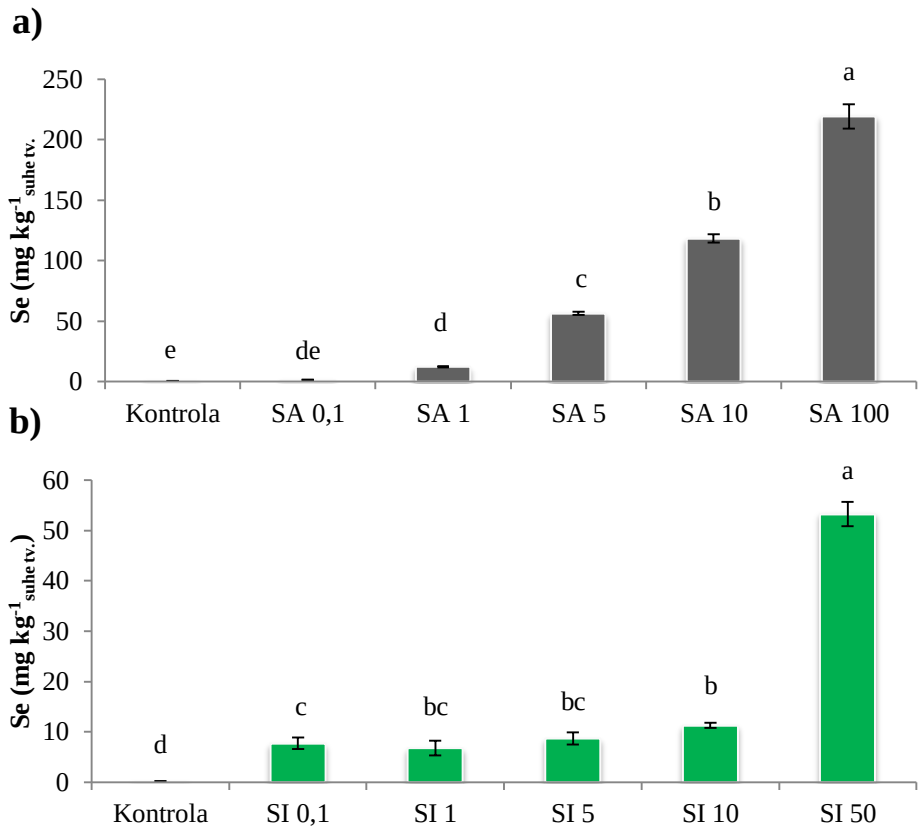
Dobiveni podaci obrađeni su u statističkom programu Statistica 13.3 (TIBCO Inc., SAD). Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Normalnost distribucije testirana je Shapiro-Wilksovim testom, a homogenost varijanci Levene testom. S obzirom na normalnu distribuciju i homogenost varijanci korištena je jednofaktorska analiza varijance (engl. *One-way* ANOVA), kako bi se utvrdilo postojanje razlika između pojedinih skupina pšenice tretiranih različitim koncentracijama selenata i selenita. Nakon što je utvrđeno postojanje razlika, proveden je *post hoc* test Tukey HSD (od engl. *Honestly Significant Difference*) kako bi se odredilo između kojih skupina postoji razlika. Svi testovi provedeni su na razini značajnosti od 5% ($p < 0,05$).

3. REZULTATI

3.1. Koncentracija Se u izdancima pšenice tretirane selenatom i selenitom

Tretmani rastućim koncentracijama selenata uzrokovali su porast sadržaja Se u mladim izdancima pšenice u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji (Slika 4). Koncentracija Se u izdancima pšenice povećavala se redom za 256 puta (5 mg L^{-1}), 537 puta (10 mg L^{-1}) te 997 puta (100 mg L^{-1}) u odnosu na kontrolu. Izmjerene koncentracije Se iznosile su 56,43 mg kg^{-1} suhe tvari (5 mg L^{-1}), 118,34 mg kg^{-1} suhe tvari (10 mg L^{-1}) te 219,48 mg kg^{-1} suhe tvari (100 mg L^{-1}). Jedino najmanja koncentracija selenata (0,1 mg L^{-1}) nije uzrokovala značajni porast koncentracije Se u izdancima pšenice u odnosu na kontrolnu skupinu.

Tretman svim primjenjenim koncentracijama selenita značajno je povisio koncentraciju Se u izdancima pšenice (Slika 4b). Koncentracija Se pri tretmanima manjim koncentracijama selenita bila je ujednačena i kretala se u rasponu od 6,76 mg kg^{-1} suhe tvari do 11,29 mg kg^{-1} suhe tvari. Najveće povećanje količine Se zabilježeno je pri tretmanu najvećom koncentracijom selenita (50 mg L^{-1}) gdje je koncentracija Se iznosila 53,23 mg kg^{-1} suhe tvari, a povisila za 240 puta u odnosu na kontrolnu skupinu.



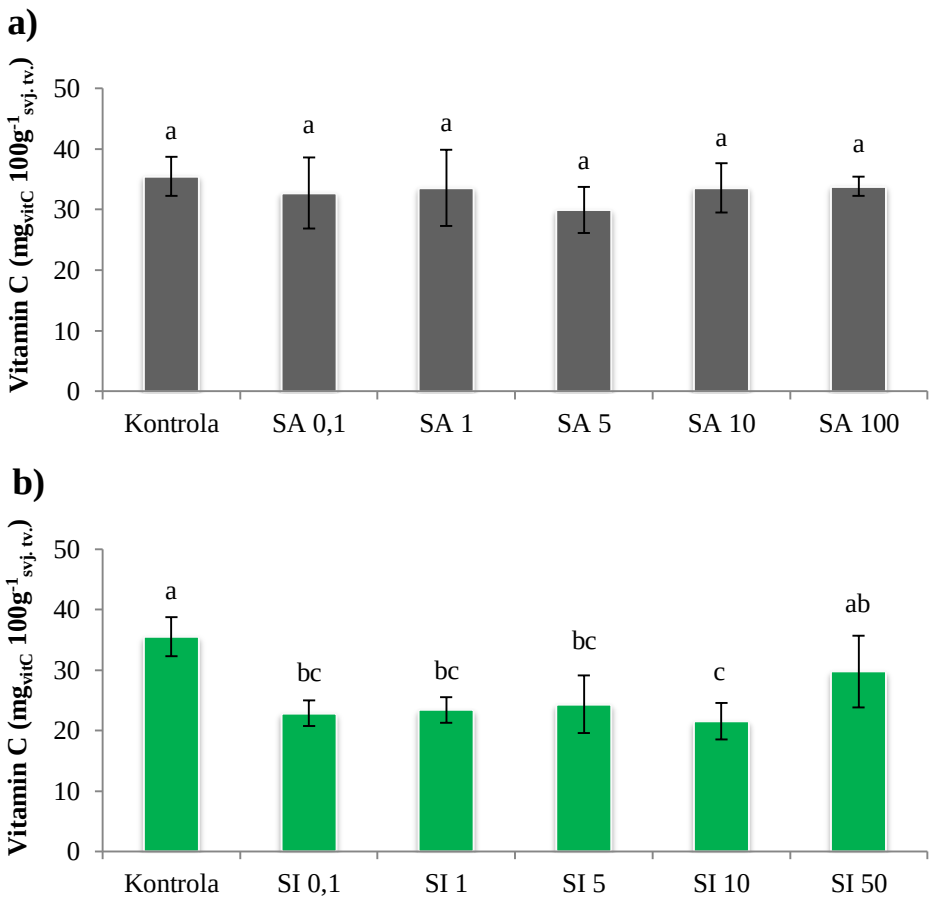
Slika 4. Koncentracija selena u izdanku pšenice tretirane različitim koncentracijama (a) selenata (SA 0,1: 0,1 mg L^{-1}; SA 1: 1 mg L^{-1}; SA 5: 5 mg L^{-1}; SA 10: 10 mg L^{-1}; SA 100: 100 mg L^{-1}) i (b) selenita (SI 0,1: 0,1 mg L^{-1}; SI 1: 1 mg L^{-1}; SI 5: 5 mg L^{-1}; SI 10: 10 mg L^{-1}; SI 50: 50 mg L^{-1}). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su post hoc testom Tukey HSD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

3.2. Utjecaj selenata i selenita na koncentraciju vitamina C u izdancima pšenice

Tretman svim primijenjenim koncentracijama selenata (0,1, 1, 5, 10, 100 mg L^{-1}) nije značajno utjecao na koncentraciju vitamina C u mladim izdancima pšenice u odnosu na kontrolu (Slika 5a). Koncentracije vitamina C u izdancima pšenice kretale su se u rasponu od 30 do 35,5 mg vitamina C (kontrola) po 100 g svježe tvari.

Za razliku od tretmana selenatom, tretman selenitom uzrokovao je značajno smanjenje koncentracije vitamina C u izdancima pšenice (Slika 5b). Značajno smanjenje koncentracije vitamina C, u rasponu od 31% do 39% u odnosu na kontrolu, izazvali su tretmani koncentracijama selenita 0,1, 1, 5 i 10 mg L^{-1}. Za razliku od manjih primijenjenih

koncentracija selenita, tretman najvećom koncentracijom selenita (100 mg L^{-1}) nije uzrokovao značajno smanjenje sadržaja vitamina C u izdancima pšenice, u odnosu na kontrolu. Izmjerene koncentracije vitamina C u izdancima pšenice bile su manje u odnosu na izdanke tretirane selenatom, a kretale su se u rasponu od 21,5 do 35,5 mg vitamina C (kontrola) po 100 g svježe tvari.

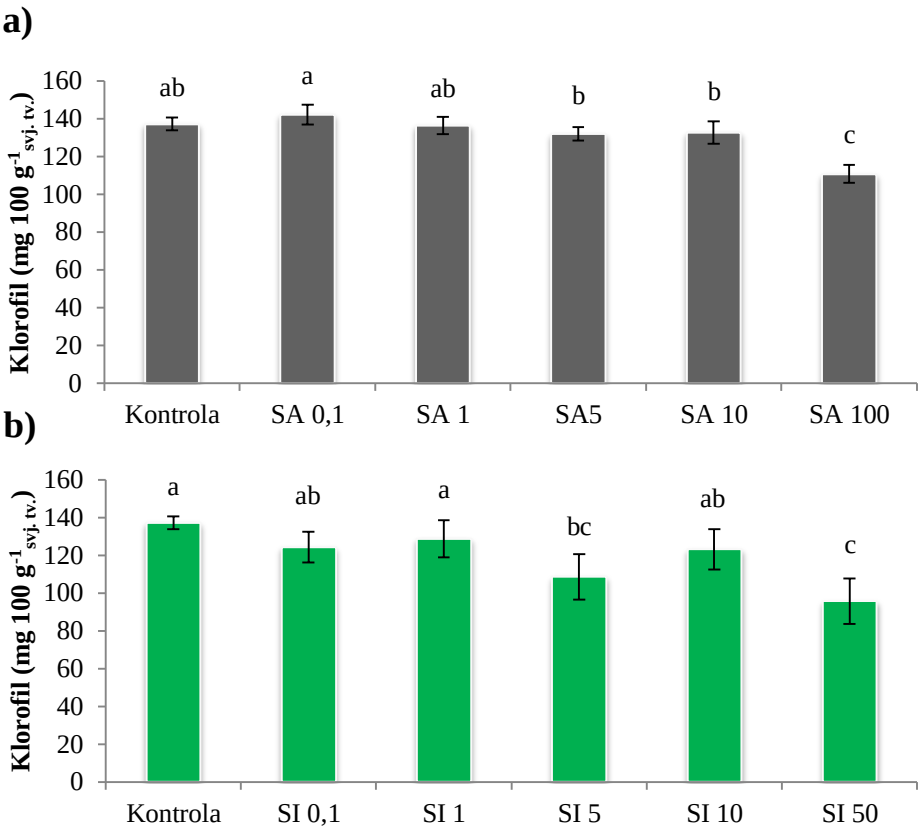


Slika 5. Koncentracija vitamina C u izdancima pšenice tretirane različitim koncentracijama (a) selenata (SA 0,1: 0,1 mg L^{-1}; SA 1: 1 mg L^{-1}; SA 5: 5 mg L^{-1}; SA 10: 10 mg L^{-1}; SA 100: 100 mg L^{-1}) i (b) selenita (SI 0,1: 0,1 mg L^{-1}; SI 1: 1 mg L^{-1}; SI 5: 5 mg L^{-1}; SI 10: 10 mg L^{-1}; SI 50: 50 mg L^{-1}). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su *post hoc* testom Tukey HSD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

3.3. Utjecaj selenata i selenita na koncentraciju klorofila u izdancima pšenice

Tretmani manjim koncentracijama selenata (0,1, 1, 5 i 10 mg L^{-1}) nisu uzrokovali značajne promjene sadržaja klorofila u izdancima mlade pšenice, dok je tretman najvećom koncentracijom selenata (100 mg L^{-1}) uzrokovao značajno smanjenje koncentracije klorofila za 19% u odnosu na kontrolne izdanke pšenice (Slika 6a). Izmjerene koncentracije klorofila u izdancima pšenice tretirane selenatom kretale su se u rasponu od 110,7 do 142,3 mg klorofila po 100 g svježe tvari.

U izdancima pšenice tretirane koncentracijama selenita 0,1, 1 i 10 mg L^{-1} nije došlo do promjene u sadržaju klorofila, dok su koncentracije od 5 i 50 mg L^{-1} uzrokovale značajno smanjenje koncentracije klorofila u izdancima pšenice, u odnosu na kontrolu (Slika 6b). Tako je koncentracija klorofila smanjena za 21% pri tretmanu s 5 mg L^{-1} selenita, dok je najveće smanjenje sadržaja klorofila, od 30% u odnosu na kontrolu, bilo pri tretmanu s najvećom koncentracijom selenita. Izmjerene koncentracije klorofila u izdancima pšenice tretirane selenitom kretale su se u rasponu od 95,7 do 137 mg (kontrola) klorofila po 100 g svježe tvari.



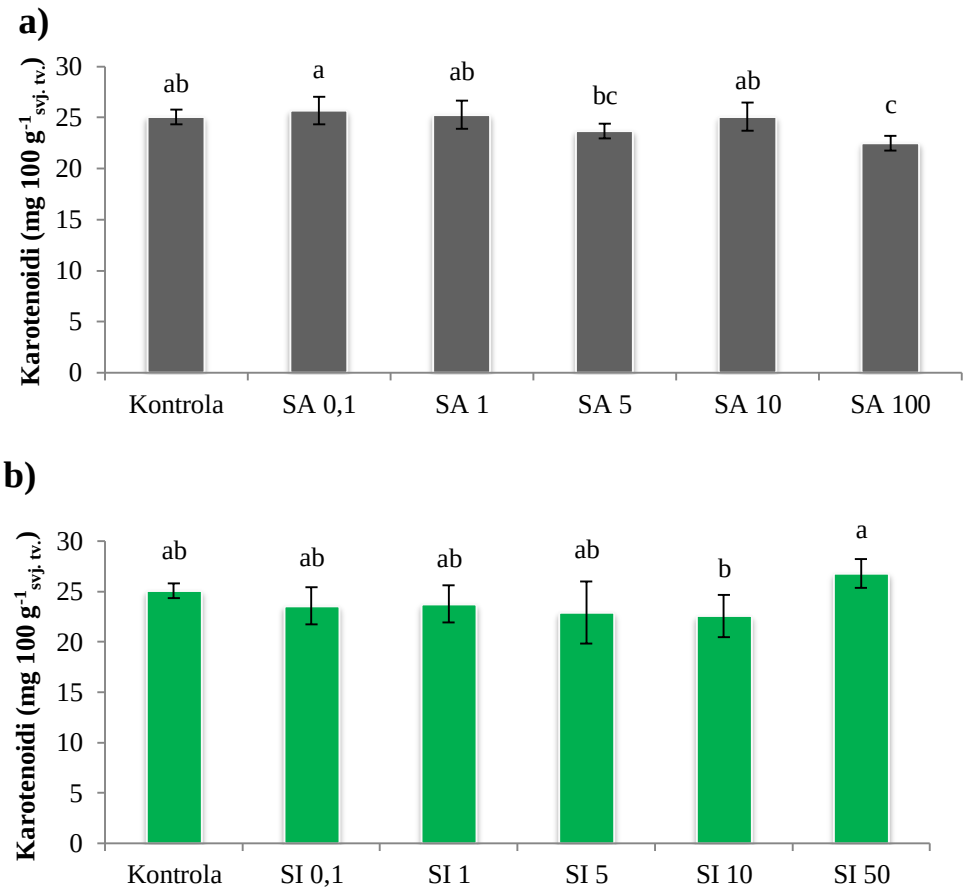
Slika 6. Koncentracija klorofila u izdancima pšenice tretirane različitim koncentracijama (a) selenata (SA 0,1: 0,1 mg L^{-1}; SA 1: 1 mg L^{-1}; SA 5: 5 mg L^{-1}; SA 10: 10 mg L^{-1}; SA 100: 100 mg L^{-1}) i (b) selenita (SI 0,1: 0,1 mg L^{-1}; SI 1: 1 mg L^{-1}; SI 5: 5 mg L^{-1}; SI 10: 10 mg L^{-1}; SI 50: 50 mg L^{-1}). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su *post hoc* testom Tukey HSD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

3.4. Utjecaj selenata i selenita na koncentraciju karotenoida u izdancima pšenice

Kao što je bio slučaj kod učinka selenata na sadržaj klorofila u izdancima pšenice, takav je učinak selenat imao i na sadržaj karotenoida. Tako, tretmani manjim koncentracijama selenata (0,1, 1, 5 i 10 mg L^{-1}) nisu uzrokovali značajne promjene u sadržaja karotenoida u izdancima mlade pšenice, dok je tretman najvećom koncentracijom selenata (100 mg L^{-1}) uzrokovao značajno smanjenje koncentracije karotenoida za 10% u odnosu na kontrolne izdanke pšenice (Slika 7a). Izmjerene koncentracije karotenoida u

izdancima pšenice tretirane selenatom kretale su se u rasponu od 22,5 do 25,7 mg karotenoida po 100 g svježe tvari.

Za razliku od selenata, selenit u svim primijenjenim koncentracijama (0,1, 1, 5, 10 i 50 mg L^{-1}) nije značajno utjecao na sadržaj karotenoida u mladim izdancima pšenice u odnosu na kontrolu (Slika 7b). Koncentracije karotenoida u izdancima pšenice kretale su se u rasponu od 22,6 do 26,8 mg karotenoida (pri najvećoj primijenjenoj koncentraciji) po 100 g svježe tvari.

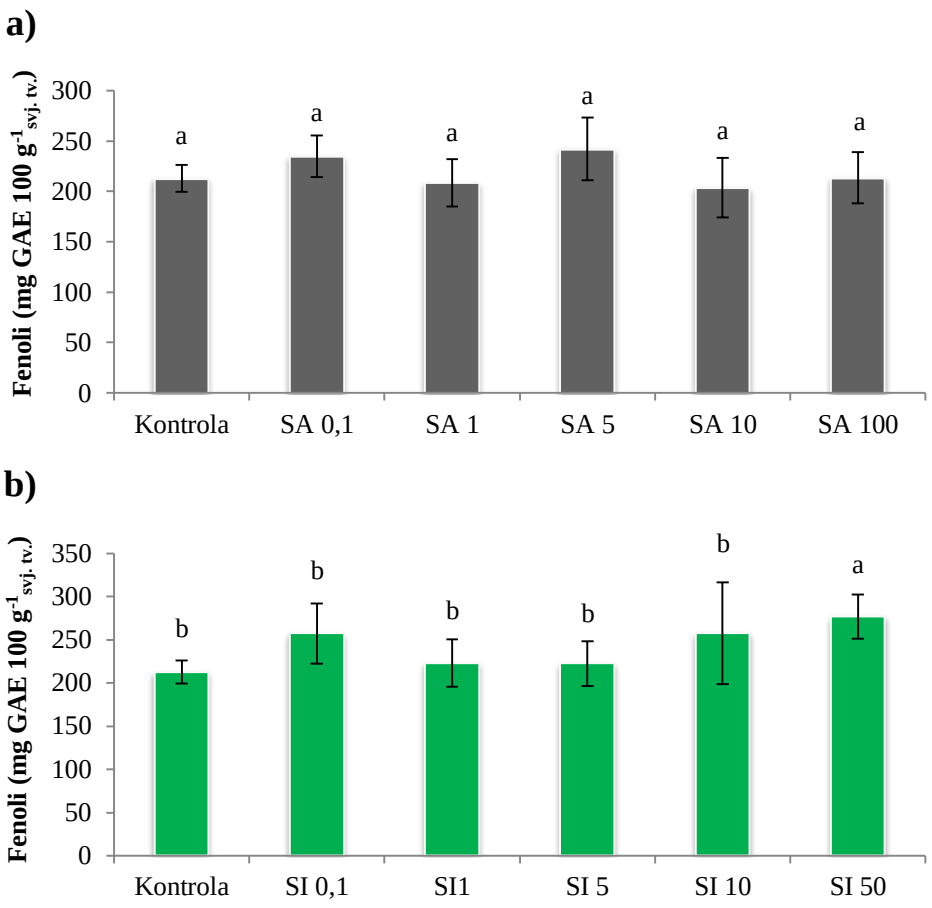


Slika 7. Koncentracija karotenoida u izdancima pšenice tretirane različitim koncentracijama (a) selenata (SA 0,1: 0,1 mg L^{-1}; SA 1: 1 mg L^{-1}; SA 5: 5 mg L^{-1}; SA 10: 10 mg L^{-1}; SA 100: 100 mg L^{-1}) i (b) selenita (SI 0,1: 0,1 mg L^{-1}; SI 1: 1 mg L^{-1}; SI 5: 5 mg L^{-1}; SI 10: 10 mg L^{-1}; SI 50: 50 mg L^{-1}). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su *post hoc* testom Tukey HSD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

3.5. Utjecaj selenata i selenita na sadržaj topljivih fenola u izdancima pšenice

Tretman svim primjenjenim koncentracijama selenata (0, 0,1, 1, 5, 10 i 100 mg L^{-1}) nije statistički značajno utjecao na koncentraciju ukupnih topljivih fenola u izdancima pšenice, u odnosu na kontrolu (Slika 8a). Koncentracije ukupnih fenola u mladim izdancima kretale su se u rasponu od 203,8 do 242 mg GAE po 100 g svježe tvari.

Tretman selenitom uzrokovao je povišenje sadržaja ukupnih fenola u mladim izdancima pšenice u odnosu na kontrolne izdanke, s tim da statistički značajno povišenje zabilježeno samo kod tretmana najvećom koncentracijom selenita (50 mg L^{-1}). Tako je tretman najvećom koncentracijom uzrokovao povišenje sadržaja ukupnih topljivih fenola za 30% u odnosu na kontrolu (Slika 8b). Izmjerene koncentracije ukupnih topljivih fenola u izdancima pšenice tretirane selenitom bile su veće u odnosu na izdanke tretirane selenatom, a kretale su se u rasponu od 212,7 (kontrola) do 276,9 mg (tretman najvećom koncentracijom selenita) mg GAE po 100 g svježe tvari.



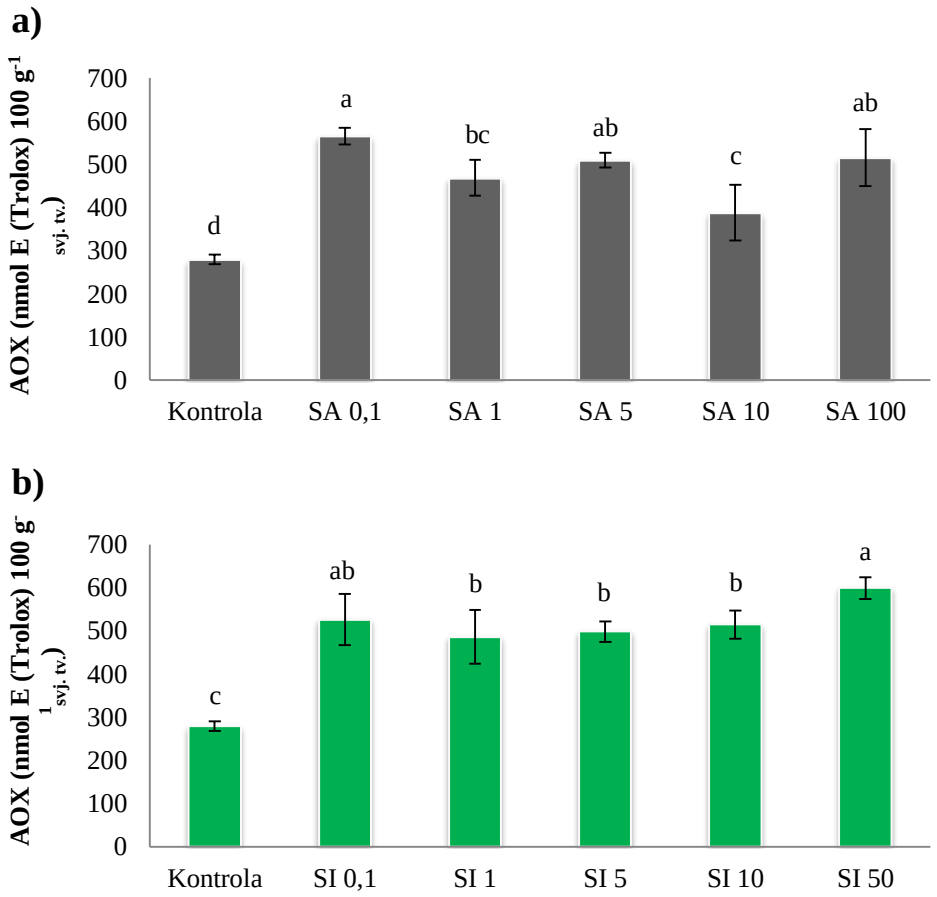
Slika 8. Koncentracija topljivih fenola u izdancima pšenice tretirane različitim koncentracijama (a) selenata (SA 0,1: 0,1 mg L^{-1}; SA 1: 1 mg L^{-1}; SA 5: 5 mg L^{-1}; SA 10: 10 mg L^{-1}; SA 100: 100 mg L^{-1}) i (b) selenita (SI 0,1: 0,1 mg L^{-1}; SI 1: 1 mg L^{-1}; SI 5: 5 mg L^{-1}; SI 10: 10 mg L^{-1}; SI 50: 50 mg L^{-1}). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su *post hoc* testom Tukey HSD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

3.6. Utjecaj selenata i selenita na ukupnu antioksidacijsku aktivnost izdanaka pšenice

Tretmani svim primjenjenim koncentracijama selenata (0,1, 1, 5, 10 i 100 mg L^{-1}) uzrokovali su statistički značajno povećanje ukupne antioksidacijske aktivnosti u izdancima mlade pšenice, u odnosu na kontrolu (Slika 9a). Povećanje antioksidacijske aktivnosti nije ovisilo o primijenjenoj koncentraciji, te je najveće povećanje od 102% zabilježeno kod tretmana s najmanjom koncentracijom selenata (0,1 mg L^{-1}), dok se kod ostalih tretmana antioksidacijska aktivnost povećala za 68% (1 mg L^{-1} selenata), 82% (5 mg L^{-1} selenata), 39% (10 mg L^{-1} selenata) i 85% pri tretmanu najvećom koncentracijom

selenata (100 mg L^{-1}), u odnosu na kontrolnu skupinu. Izmjerene vrijednosti ukupne antioksidacijske aktivnosti kretale su se u rasponu od 279 (kontrolni izdanci) do 565 nmol E (Trolox) po 100 g svježe tvari.

Jednako kao i selenat, selenit je također uzrokovao statistički značajno povećanje ukupne antioksidacijske aktivnost u izdancima mlade pšenice pri svim primijenjenim koncentracijama (0,1, 1, 5, 10 i 50 mg L^{-1}), u odnosu na kontrolne izdanke (Slika 9b). Povećanje antioksidacijske aktivnosti također nije ovisilo o primijenjenoj koncentraciji selenita, te je najveći porasti aktivnosti od 115% i 89%, u odnosu na kontrolu, zabilježen redom pri tretmanima najvećom koncentracijom (50 mg L^{-1}) i najmanjom koncentracijom selenita (0,1 mg L^{-1}). Kod ostalih tretmana antioksidacijska aktivnost povećala se za 74% (1 mg L^{-1} selenita), 79% (5 mg L^{-1} selenita) i 84% (10 mg L^{-1} selenita) u odnosu na kontrolu. Izmjerene vrijednosti ukupne antioksidacijske aktivnosti kretale su se u rasponu od 279 (kontrolni izdanci) do 599 nmol E (Trolox) po 100 g svježe tvari.

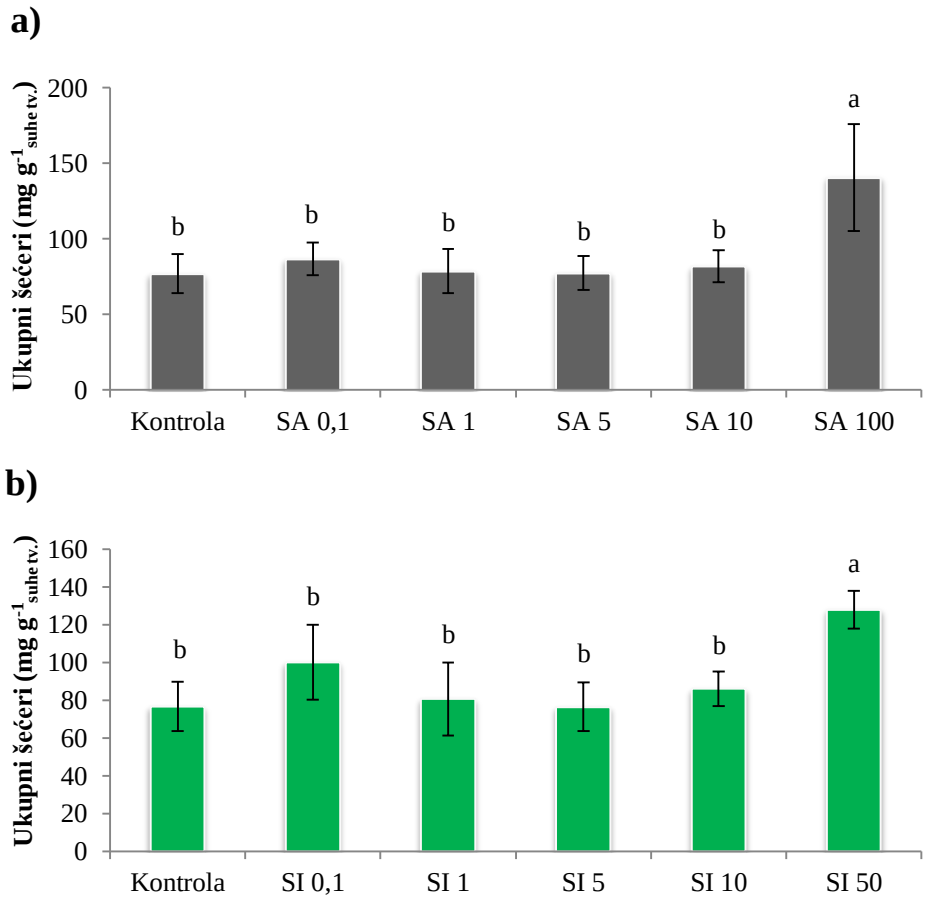


Slika 9. Ukupna antioksidacijska aktivnost (AOX) u izdancima pšenice tretirane različitim koncentracijama (a) selenata (SA 0,1: 0,1 mg L^{-1}; SA 1: 1 mg L^{-1}; SA 5: 5 mg L^{-1}; SA 10: 10 mg L^{-1}; SA 100: 100 mg L^{-1}) i (b) selenita (SI 0,1: 0,1 mg L^{-1}; SI 1: 1 mg L^{-1}; SI 5: 5 mg L^{-1}; SI 10: 10 mg L^{-1}; SI 50: 50 mg L^{-1}). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su *post hoc* testom Tukey HSD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

3.7. Utjecaj selenata i selenita na koncentraciju ukupnih šećera u izdancima pšenice

Tretmani manjim koncentracijama selenata (0,1, 1, 5 i 10 mg L^{-1}) nisu uzrokovali značajne promjene sadržaja ukupnih šećera u izdancima mlade pšenice, dok je tretman najvećom koncentracijom selenata (100 mg L^{-1}) uzrokovao značajno povećanje koncentracije ukupnih šećera za 83% u odnosu na kontrolne izdanke pšenice (Slika 10a). Izmjerene koncentracije ukupnih šećera u izdancima pšenice tretirane selenatom kretale su se u rasponu od 76,8 do 140,5 mg šećera po g suhe tvari.

Jednako kao i u slučaju tretmana selenatom, tretmani manjim koncentracijama selenita (0,1, 1, 5 i 10 mg L^{-1}) također nisu uzrokovali statistički značajne promjene u količini ukupnih šećera u mladim izdancima pšenice, u odnosu na kontrolne izdanke, dok je tretman najvećom koncentracijom selenita (50 mg L^{-1}) uzrokovao značajno povećanje koncentracije ukupnih šećera za 67% u odnosu na kontrolne izdanke pšenice (Slika 10b). Izmjerene koncentracije ukupnih šećera u izdancima pšenice tretirane selenitom kretale su se u rasponu od 76,6 do 127,9 mg šećera po g suhe tvari.



Slika 10. Koncentracija ukupnih šećera u izdancima pšenice tretirane različitim koncentracijama (a) selenata (SA 0,1: 0,1 mg L^{-1}; SA 1: 1 mg L^{-1}; SA 5: 5 mg L^{-1}; SA 10: 10 mg L^{-1}; SA 100: 100 mg L^{-1}) i (b) selenita (SI 0,1: 0,1 mg L^{-1}; SI 1: 1 mg L^{-1}; SI 5: 5 mg L^{-1}; SI 10: 10 mg L^{-1}; SI 50: 50 mg L^{-1}). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su *post hoc* testom Tukey HSD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

3.8. Utjecaj selenata i selenita na koncentraciju celuloze u izdancima pšenice

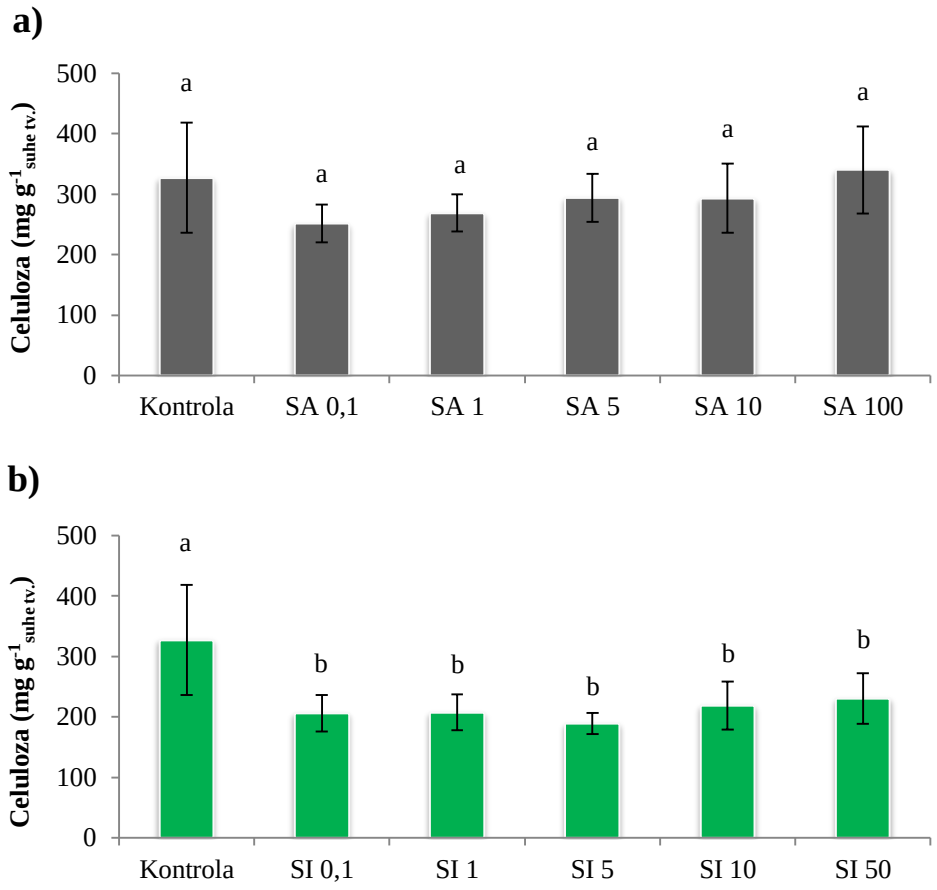
Tretman svim primijenjenim koncentracijama selenata (0,1, 1, 5, 10 i 100 mg L^{-1}) nije statistički značajno utjecao na količinu celuloze u izdancima mlade pšenice u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 11a). Količina celuloze u izdancima mlade pšenice tretirane selenatom kretala se u rasponu od 251 do 340 mg (tretman najvećom koncentracijim selenata) po g suhe tvari.

Za razliku od selenata, tretman svim primijenjenim koncentracijama selenita (0,1, 1, 5, 10 i 50 mg L^{-1}) uzrokovao je značajno smanjenje sadržaja celuloze u izdancima mlade pšenice, u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 11b). Smanjenje sadržaja celuloze nije ovisilo o primijenjenoj koncentraciji selenita, te se kretalo u rasponu od 30% (50 mg L^{-1} selenita) do 42% (5 mg L^{-1} selenita). Izmjerene vrijednosti celuloze u izdancima mlade pšenice tretirane selenitom kretale su se u rasponu od 188,8 do 326,9 mg (kontrola) po g suhe tvari.

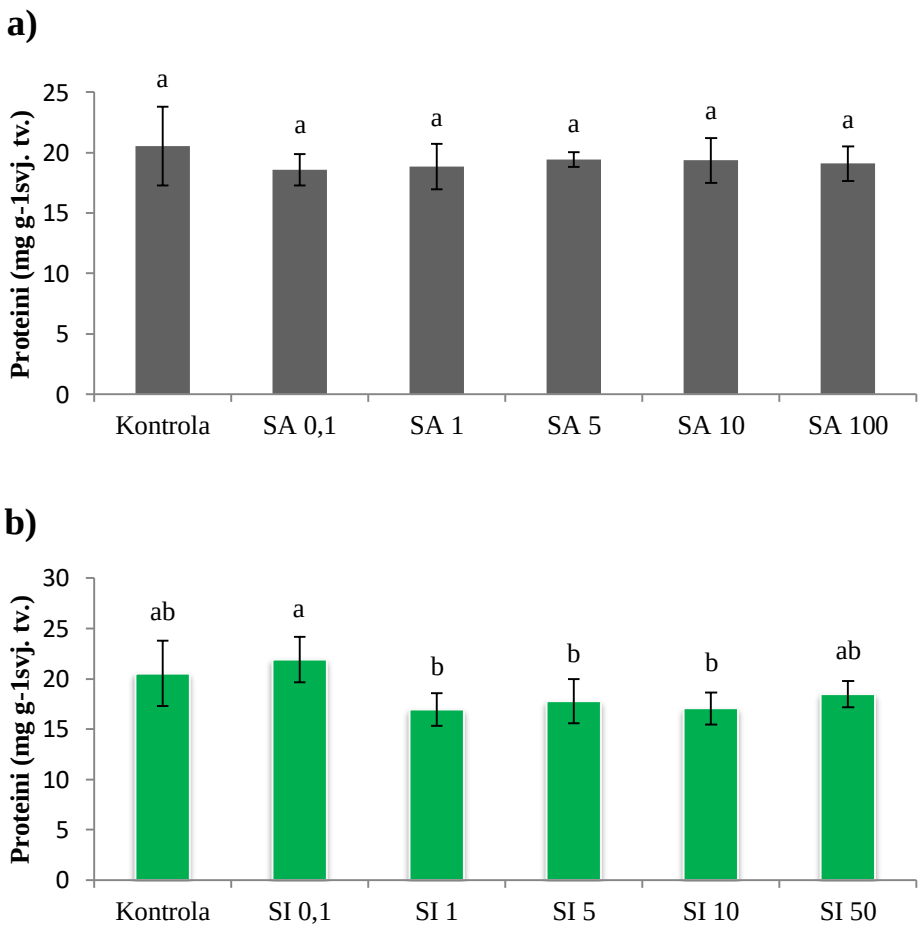
3.9. Utjecaj selenata i selenita na koncentraciju proteina u izdancima pšenice

Tretman svim primjenjenim koncentracijama selenata (0, 0,1, 1, 5, 10 i 100 mg L^{-1}) nije statistički značajno utjecao na koncentraciju ukupnih topljivih proteina u izdancima pšenice, u odnosu na kontrolu (Slika 12a). Koncentracije ukupnih proteina u mladim izdancima bile poprilično ujednačene, te su se kretale u rasponu od 18,6 do 19,4 mg po 100 g svježe tvari.

Kao i u slučaju selenata, niti tretman selenitom (0,1, 1, 5, 10 i 50 mg L^{-1}) nije uzrokovao značajnu promjenu u koncentraciji proteina u mladim izdancima pšenice, u odnosu na kontrolne biljke (Slika 12b). Koncentracije ukupnih proteina u mladim izdancima kretale su se u rasponu od 17 do 21,9 mg po 100 g svježe tvari.



Slika 11. Koncentracija celuloze u izdancima pšenice tretirane različitim koncentracijama (a) selenata (SA 0,1: 0,1 mg L^{-1}; SA 1: 1 mg L^{-1}; SA 5: 5 mg L^{-1}; SA 10: 10 mg L^{-1}; SA 100: 100 mg L^{-1}) i (b) selenita (SI 0,1: 0,1 mg L^{-1}; SI 1: 1 mg L^{-1}; SI 5: 5 mg L^{-1}; SI 10: 10 mg L^{-1}; SI 50: 50 mg L^{-1}). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su *post hoc* testom Tukey HSD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).



Slika 12. Koncentracija proteina u izdancima pšenice tretirane različitim koncentracijama (a) selenata (SA 0,1: 0,1 mg L^{-1}; SA 1: 1 mg L^{-1}; SA 5: 5 mg L^{-1}; SA 10: 10 mg L^{-1}; SA 100: 100 mg L^{-1}) i (b) selenita (SI 0,1: 0,1 mg L^{-1}; SI 1: 1 mg L^{-1}; SI 5: 5 mg L^{-1}; SI 10: 10 mg L^{-1}; SI 50: 50 mg L^{-1}). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su *post hoc* testom Tukey HSD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

4. RASPRAVA

Biljke su bogate raznovrsnim molekulama kao što su proteini, lipidi, ugljikohidrati, vitamini, ali i sekundarnim metabolitima kao što su terpeni, fenolne kiseline, lignini, tanini i flavonoidi koji posjeduju veliku nutritivnu vrijednost i antioksidacijsku aktivnost. U novije vrijeme sve više istraživanja pokazuje kako takvi metaboliti posjeduju protuupalno, antidijabetičko te antimikrobno djelovanje, a sve više biljaka i metabolita s do sad još neotkrivenim farmakološkim svojstvima intenzivno se proučava (Suriyavathana i sur. 2016). Se je esencijalni mikronutrijent za ljude, te predstavlja jedan od nutrijenata za kojeg je dokazano dvojno djelovanje. Pri optimalnim koncentracijama djeluje povoljno na organizam, ali njegovo djelovanje može biti i toksično pri koncentracijama višim od optimalnih. S obzirom na činjenicu da jedan od tri čovjeka pati od malnutricije te da ovaj problem pogađa i zemlje u razvoju, ali i razvijene zemlje (Thompson 2011; Genc i sur. 2005; Kennedy i sur. 2003), cilj je ovog istraživanja bio uzgojiti pšeničnu travu obogaćenu Se, pri čemu su za potrebe biofortifikacije korištena dva različita oblika Se, selenat i selenit, u rastućim koncentracijama. Tretmani selenatom i selenitom značajno su povećali količinu Se u izdancima pšenice ovisno o primijenjenoj koncentraciji, s tim da su količine Se bile znatno veće pri tretmanu selenatom. Ovakvi rezultati mogu se objasniti razlikama u mobilnosti ova dva oblika Se u biljkama. Naime, selenat je puno mobilniji u odnosu na selenit i lakše se transportira od korijena do izdanka, dok se selenit primarno nakuplja u korijenu (Zhu i sur. 2009; Sors i sur. 2005; Zayed i sur. 1998). Selenit koji se nakuplja u korijenu brzo prelazi u SeMet ili selenometionin Se-oksid hidrat (SeOMet), ali najvećim dijelom u neidentificirane ili u vodi netopljive oblike Se (Zhu i sur. 2009).

Kako asimilacija Se može utjecati na različite metaboličke putove, cilj je također bio odrediti utjecaj različitih kemijskih oblika i koncentracija Se na nutritivnu vrijednost pšenične trave. Glavni pokazatelji nutritivne vrijednosti pšenične trave određivani u okviru ovog istraživanja su vitamin C, klorofil i karotenoidi, topljivi fenoli, topljivi proteini, antioksidacijska aktivnost te sadržaj ukupnih šećera i celuloze. Tako su, selenat kao i selenit neznatno ili uopće nisu utjecali na većinu mjerenih parametara nutritivne vrijednosti, osim u slučaju antioksidacijske aktivnosti. Ukupna antioksidacijska aktivnost mladih izdanaka pšenice značajno se povećala uslijed tretmana s oba oblika Se i to kod svih primijenjenih koncentracija. Kako bi se obranili od izrazito reaktivnog i toksičnog ROS-a, organizmi su razvili antioksidacijski sustav kojeg čine enzimi i različite neenzimske molekule (glutation, vitamin C, vitamin E, koenzim Q10, karotenoidi, fenoli i

drugi (Mittler i sur. 2004). Povećani antioksidacijski kapacitet tkiva odnosno tkivnih ekstrakata može se povezati s visokim sadržajem neenzimskih antioksidansa, posebice fenola (Kulkarni i sur. 2006; Calzuola i sur. 2004), ali i brojnih drugih spojeva s izrazitim antioksidacijskim djelovanjem kao što su vitamin C, klorofil, karotenoidi i dr. Povećana antioksidacijska aktivnost izdanaka tretirane pšenice može se povezati i sa samim sadržajem Se u tkivu, budući da postoje brojni dokazi da je sam Se važan kao antioksidans (Burk 2002; Burk 1983). Ovakvi rezultati u skladu su i s drugim istraživanjima (Kulkarni i sur. 2006) koja su pokazala da obogaćivanje pšenice otopinom nutrijenata povećava njezinu ukupnu antioksidacijsku aktivnost. Također, Frias i sur. (2009) govore o povećanoj antioksidacijskoj aktivnosti uskolisne vučike (*Lupinus angustifolius*) uslijed tretmana otopinom selenata i selenita. Ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti mogu doprinijeti i različiti vitamini. U okviru ovog istraživanja mjeren je sadržaj vitamina C. Tretman selenatom nije uzrokovao značajniju promjenu koncentracije vitamina C, dok je tretman selenitom značajno smanjio koncentraciju ovog vitamina u odnosu na kontrolnu skupinu. Vitamini su skupina nutrijenata koji su zbog svojih raznovrsnih biokemijskih i fizioloških funkcija esencijalni za ljudski organizam. S obzirom da ljudsko tijelo nije u mogućnosti sintetizirati većinu, moraju se nadomjestiti putem prehrane u preporučenim količinama (Iqbal i sur. 2004). Inače su mladi izdanci pšenice bogat izvor vitamina C (Bar-Sela 2015), a koncentracija vitamina C u mladim izdancima pšenice obogaćene Se općenito je vrlo slabo istražena. Chomchan i suradnici (2016) uspoređivali su sok pšenične trave i riže te navode kako je u pšeničnoj travi uočena dvostruko veća količina u odnosu na sok riže iako u svom istraživanju biljke nisu obogaćivali Se. Nepromijenjena ili smanjena koncentracija vitamina C može se povezati s identičnom koncentracijom šećera koji su neophodni supstrat za njegovu sintezu.

Klorofil, kojeg se još naziva i „zelenom krvi“, primarni je nutrijent u svježim izdancima pšenične trave. Aktivna je komponenta ekstrakta mladih izdanaka pšenice i ima brojne blagotvorne učinke na organizam, a dokazano je i da djeluje inhibirajuće na metabolizam karcinogena (Bar-Sela 2015). U našem istraživanju razine klorofila i karotenoida nisu se značajno promijenile, osim pri tretmanu najvećom koncentracijom selenata i selenita, gdje su se količine neznatno smanjile. Özköse i suradnici (2016) također su imali slične rezultate, čak i smanjene vrijednosti klorofila i karotenoida. Naime, u svome istraživanju mjerili su fenole i antioksidacijsku aktivnost soka dviju vrsta pšenice (*T. aestivum* i *Triticum durum*), mješavinu sokova spomenutih dvaju vrsta (50:50), dvaju

kultivara engleskog (višegodišnjeg) ljulja (*Lolium perenne*) te trstikaste vlasulje (*Festuca arundinacea*). Biljke su uzgajane pod dva različita tretmana (jedne biofortificirane gnojivom sastava: N-NH_4=8%, N-NH_2=2%, P_2O_5=25%, K_2O=20%, SO_3=20%, Zn=4%, Cu=3%, Fe=5%, Fe=5%, Mn=3%, B=1.5% i Mo=0.5%, druge ne). Biofortifikacija gnojivom dovela je do smanjenih razina klorofila, kao i vitamina C. Neznatno povećane koncentracije klorofila i karotenoida pri nižim koncentracijama otopina selenata i selenita mogle bi se objasniti i činjenicom da Se pri niskim koncentracijama djeluje pozitivno na biosintezu klorofila jer promovira fluks elektrona prilikom respiracije te štiti enzime u kloroplastima (Dong i sur. 2013; Germ i sur. 2005). Smanjene koncentracije klorofila i karotenoida pri višim koncentracijama otopina selenata i selenita vjerojatno su posljedica inhibirajućeg efekta Se na porfobilinogen-sintazu, enzim koji je neophodan u biosintezi klorofila (Saffaryazdi i sur. 2012), te na enzim fitoen-sintazu koji je ključan u sintezi karotenoida (Sams i sur. 2011).

U posljednje vrijeme, sve veći broj istraživanja bavi se kontrolom redoks statusa u stanici pomoću hrane i različitih aktivnih komponenti prisutnih u hrani. Prirodni antioksidansi povećavaju otpornost organizma na različita oštećenja uzrokovana okidacijskim stresom i mogu imati značajan utjecaj na ljudsko zdravlje. Osim vitamina C, klorofila i karotenoida, fenolni spojevi također imaju bitnu ulogu kao prirodni antioksidansi (Dimitrios 2006). Tretman selenatom nije značajno utjecao na koncentraciju ukupnih topljivih fenola u izdancima pšenice, dok je do značajnog povećanja došlo samo kod tretmana otopinom selenita najveće koncentracije (50 mg L^{-1}). S obzirom da Se utječe na metabolizam dušika, može djelovati na sintezu proteina i aminokiselina, ali i sekundarnih metabolita s antioksidacijskim učinkom kao što su fenoli. Kako je fenilalanin (Phe) prekursor u biosintezi fenola, promjene u sintezi ove aminokiseline izravno utječu na njihovu koncentraciju (Malagoli 2015). Osim toga, na sadržaj ukupnih topljivih fenola mogu utjecati i drugi faktori kao što su svjetlo, temperatura i mineralna ishrana (Fortună i sur. 2018). S obzirom da u ovom slučaju promjene u razinama bioaktivnih komponenti promatramo kao karakteristiku mineralne ishrane, moguće je da razine fenola nisu značajno varirale upravo zbog dostupnosti različitih minerala. Ovakvi rezultati u skladu su s hipotezom koja kaže da će pri optimalnim razinama nutrijenata rast biti preferiran u odnosu na sekundarni metabolizam (Oliveira i sur. 2013). Robbins i suradnici (2005) također navode da se sadržaj ukupnih topljivih fenola u brokuli (*Brassica oleracea*) smanjio uslijed biofortifikacije Se. Postoje i određena istraživanja kojima je utvrđeno da

reducirajući šećeri, vitamin C, neke aminokiseline, organske kiseline te Fe (II) molekule mogu interferirati s Folin – Ciocalteu reagensom te na taj način značajno poremetiti procjenu ukupnih topljivih fenola prisutnih u određenom uzorku (Berker i sur. 2013). Zbog prisutnosti navedenih spojeva u pšeničnoj travi, razina ukupnih topljivih fenola možda ne izražava pravu razinu u uzorcima pa bi se procjena trebala obaviti koristeći neku drugu metodu kao što je na primjer HPLC (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti) (Chomchan i sur. 2016).

Osim vrlo bitne uloge kao pričuvna energija i gorivo, ugljikohidrati imaju i druge uloge. Određena istraživanja pokazala su da određeni ugljikohidrati izolirani iz pšenične trave stimuliraju ekspresiju upalnih citokina te aktiviraju monocite važne u imunološkom odgovoru (Bar-Sela 2015). Do značajnog povećanja šećera došlo je samo prilikom tretmana otopinom selenata i selenita najvećih koncentracija. Tretman otopinom selenata nižih koncentracija nije uzrokovao značajno povećanje celuloze, a tretman otopinom selenita svih primijenjenih koncentracija značajno je smanjio njezine razine. Ugljikohidrati predstavljaju zalihe hrane te su važan izvor energije za brojne metaboličke reakcije živih organizama. Biljke su puno važniji izvori ugljikohidrata od životinja (Suriyavathana i sur. 2016). Povećana razina šećera uslijed tretmana selenatom ide u prilog pretpostavci da biofortifikacija Se ne samo povećava razinu Se i na taj način pridonosi smanjenju malnutricije, nego i povećava nutritivnu vrijednost biofortificiranih biljaka. Frias i suradnici (2009) u svom istraživanju proučavali su utjecaj otopina Se (selenata i selenita različitih koncentracija) na klijanje i nutritivnu vrijednost uskolisne vučike (*Lupinus angustifolius*), a rezultati koje su dobili bili su vrlo slični. Naime, zaključili su da se razina topljivih ugljikohidrata promijenila samo prilikom tretmana selenatom i selenitom najvećih koncentracija. Rast i razvoj mladih biljaka je vrlo složen metabolički proces pri kojem se složeniji ugljikohidrati hidroliziraju do disaharida i monosaharida pa je moguće da su visoke koncentracije selenata i selenita dodatno potaknule njihovu hidrolizu i na taj način povećale koncentraciju jednostavnih šećera.

Proteine nalazimo u gotovo svim dijelovima stanice, a čine čak 50% stanične suhe tvari. Zastupljeni su u vrlo velikom broju, a ispoljuju niz specijaliziranih i esencijalnih funkcija u živim stanicama (Suriyavathana i sur. 2016). Oba oblika Se nisu značajno utjecala na sadržaj ukupnih topljivih proteina u mladim izdancima pšenice. Vrijednosti su bile ujednačene i nisu odstupale od vrijednosti kontrolne skupine. Rezultati našeg istraživanja u skladu su s istraživanjem Frias i suradnika (2009) koji navode kako nije

došlo do značajnije promjene u sadržaju ukupnih proteina (točnije neesencijalnih aminokiselina) bez obzira na oblik selena, koncentraciju ili temperaturu. Do sličnih zaključaka došli su i D'Amato i suradnici (2018). U istraživanju koje su provodili na riži (*Oryza sativa*) koncentracije proteina bile su nepromijenjene uslijed tretmana selenatom ili tek neznatno drugačije (niže) uslijed tretmana selenitom u odnosu na kontrolnu skupinu. Ovakvi rezultati mogli bi se objasniti i činjenicom da puno veća količina proteina prisutna u sjemenu pšenice prije klijanja. Nakon što je pšenica proklijala, količina proteina se smanjuje te ih većina služi kao spremište energije (Parit i sur. 2018). Neznatno smanjene količine ukupnih topljivih proteina u našem istraživanju mogle bi biti i rezultat uplitanja Se u asimilacijske putove S, a samim time i u sintezu aminokiselina i proteina (D'Amato i sur. 2018; Malagoli 2015). Ugradnja Se u aminokiseline te nastanak SeCys i SeMet jedan je od glavnih uzroka toksičnosti Se u biljkama koje nisu hiperakumulatori (Hawkesford i Zhao 2007), a moguće i jedan od razloga neznatno promijenjenje razine proteina u našem istraživanju.

5. ZAKLJUČCI

- Tretmani selenatom i selenitom značajno su povećali količinu Se u mladim izdancima pšenice, s tim da su količine Se bile znatno veće pri tretmanu selenatom, te su ovisile o primijenjenoj koncentraciji. Stoga, selenat možemo izdvojiti kao učinkovitiji oblik Se za biofortifikaciju pšenične trave.
- Sve primijenjene koncentracije selenata i selenita znatno su povećale ukupnu antioksidacijsku aktivnost izdanaka pšenice, što znatno doprinosi povećanoj nutritivnoj vrijednosti mladih izdanaka.
- Ostali pokazatelji nutritivne vrijednosti izdanaka pšenice samo su se djelomično promjenili uslijed tretmana selenatom i selenitom, što je ovisilo o koncentraciji i obliku primijenjenog Se. Tako, manje primijenjene koncentracije selenata (0,1 – 10 mg L^{-1}) nisu imale učinak na sadržaje vitamina C, klorofila, karotenoida, fenolnih spojeva, šećera, celuloze i proteina, dok je selenit u manjim koncentracijama utjecao na sniženje vitamina C i celuloze. Najveće primijenjene koncentracije uglavnom su utjecale na biosintetske puteve navedenih nutrijenata. Tako je selenat pri najvećoj koncentraciji (100 mg L^{-1}) povećao sadržaj šećera, a smanjio sadržaj klorofila i karotenoida, dok je selenit pri najvećoj koncentraciji (50 mg L^{-1}) povećao sadržaj vitamina C, fenola i šećera, a smanjio sadržaj klorofila i celuloze.
- Mladi izdanci pšenice obogaćeni Se zbog svoje velike nutritivne vrijednosti obećavajući su dodatak prehrani te bi mogli pridonijeti rješenju problema malnutricije.

6. LITERATURA

Alitheen, N.B., Oon, C.L., Keong, Y.S., Chuan, T.K., Li, H.K., Yong, H.W. (2011) Cytotoxic effects of commercial wheatgrass and fiber towards human acute promyelocytic leukemia cells (HL60). Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences 24:243-25.

Anderson, J.W., Scarf, A.R. (1983) Selenium and plant metabolism. U: Robb, D.A. (ur.) Metals and micronutrients: uptake and utilization by plants. Academic Press, London, str. 241-272.

Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., Çapanoğlu, E. (2016) Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. Journal of agricultural and food chemistry 64: 997-1027.

Bar-Sela, G., Cohen, M., Ben-Arye, E., Epelbaum, R. (2015) The medical use of wheatgrass: Review of the gap between basic and clinical applications. Mini reviews in medicinal chemistry 15:1002-1010.

Ben-Arye, E., Goldin, E., Wengrower, D., Stamper, A., Kohn, R., Berry, E. (2002) Wheat grass juice in the treatment of active distal ulcerative colitis. Arandomized double-blind placebo-controlled trial. Scandinavian Journal of Gastroenterology 37:444-449.

Benderitter, M., Maupoil, V., Vergely, C., Dalloz, F., Briot, F., Rochette, L. (1998) Studies by electron paramagnetic resonance of the importance of iron in the hydroxyl scavenging properties of ascorbic acid in plasma: effects of iron chelators. Fundamental & Clinical Pharmacology 12: 510-516.

Berg J.M.,Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2013) Biokemija. 6. Izdanje, Školska knjiga, Zagreb

Berker, K.I., Ozdemir Olgun, F.A., Ozyurt, D., Demirata, B., Apak, R. (2013) Modified Folin–Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61: 4783-4791.

Berry, M.J., Banu, L., Larsen, P.R. (1991) Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. Nature 349: 438–440.

Bianco, A.C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M.J., Larsen, P.R. (2002) Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. Endocrine Reviews 23: 38–89.

Birringer, M., Pilawa, S., Flohé, L. (2002) Trends in selenium biochemistry. Natural product reports 19: 693-718.

Blaylock, M.J., James, B.R. (1994) Redox transformations and plant uptake of selenium resulting from root-soil interactions. Plant and soil 158: 1-12.

Blumenthal, M. (ur.) (1998) The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines. American Botanical Council, Austin TX

Bouis, H.E. (2003) Micronutrient fortification of plants through plant breeding: can it improve nutrition in man at low cost?. Proceedings of the Nutrition Society 62: 403-411.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72: 248-254.

Brown, K.M., Arthur, R. (2001) Selenium, selenoproteins and human health: a review. Public Health Nutrition 4: 593–599.

Burk, R.F. (1983) Biological activity of selenium. Annual review of nutrition 3: 53-70.

Burk, R.F. (2002) Selenium, an antioxidant nutrient. Nutrition in clinical Care 5:75-79.

Burnell, J.N. (1981) Selenium metabolism in *Neptunia amplexicaulis*. Plant Physiology 67: 316-324.

Calzuola, I., Marsili, V., Gianfranceschi, G.L. (2004) Synthesis of antioxidants in wheat sprouts. Journal of agricultural and food chemistry 52:5201-5206.

Cartes, P., Gianfreda, L., Mora, M.L. (2005) Uptake of selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite forms. Plant and Soil 276: 359-367.

Commission of the European Communities, Nutrient and energy intakes for the European Community. Reports of the Scientific Committee for Food, thirty first series, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg (1993)

Cvetkovic, D., Fiedor, L., Fiedor, J., Wiśniewska-Becker, A., Markovic, D. (2013) Molecular Base for Carotenoids Antioxidant Activity in Model and Biological Systems: The Health-Related Effects. U: Yamaguchi, M., (ur.) Carotenoids: Food Sources,

Production and Health Benefits; Nova Science Publishers: Hauppauge, NY, USA; str. 93–126.

D'Amato, R., Fontanella, M.C., Falcinelli, B., Beone, G.M., Bravi, E., Marconi, O., Businelli, D. (2018) Selenium Biofortification in Rice (*Oryza sativa* L.) Sprouting: Effects on Se yield and nutritional traits with focus on phenolic acid profile. Journal of agricultural and food chemistry 66: 4082-4090.

Dacey, J.W., King, G.M., Wakeham, S.G. (1987) Factors controlling emission of dimethylsulphide from salt marshes. Nature 330: 643.

Dangour, A.D., Dodhia, S.K., Hayter, A., Allen, E., Lock, K., Uauy, R. (2009) Nutritional quality of organic foods: a systematic review. The American journal of clinical nutrition 90: 680-685.

Das, A., Raychaudhuri, U., Chakraborty, R. (2012) Effect of freeze drying and oven drying on antioxidant properties of fresh wheatgrass. International Journal of Food Sciences and Nutrition 63:718-721.

Dhillon, K.S., Dhillon, S.K. (2003) Distribution and management of seleniferous soils. Advances in agronomy 79: 119-184.

Dilworth, G.L., Bandurski, R.S. (1977) Activation of selenate by adenosine 5′-triphosphate sulphurylase from Saccharomyces cerevisiae. Biochemical Journal 163: 521-529.

Dimitrios, B. (2006) Sources of natural phenolic antioxidants. Trends in Food Science & Technology 17:505-512.

Dobson, C.M. (1999) Protein misfolding, evolution and disease. Trends in Biochemical Sciences 24: 329–332.

Dong, J.Z., Wang, Y., Wang, S.H., Yin, L.P., Xu, G.J., Zheng, C., Lei, C., Zhang, M.Z. (2013) Selenium increases chlorogenic acid, chlorophyll and carotenoids of Lycium chinense leaves. Journal of the Science of Food and Agriculture 93: 310–315.

Duntas, L.H., Benvenga, S. (2015) Selenium: an element for life. Endocrine 48: 756-775.

Eipper, B.A., Stoffers, D.A., Mains, R.E.(1992) The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation. Annual Review of Neuroscience 15:57–85.

El Kassis, E., Cathala, N., Rouached, H., Fourcroy, P., Berthomieu, P., Terry, N., Davidian, J.C. (2007) Characterization of a selenate-resistant Arabidopsis mutant. Root growth as a potential target for selenate toxicity. Plant Physiology 143:1231-1241.

Ellis, D.R., Salt, D.E. (2003) Plants, selenium and human health. Current opinion in plant biology 6: 273-279.

El-Ramady, H.R., Abdalla, N., Fári, M., Domokos-Szabolcsy, É. (2014) Selenium enriched vegetables as biofortification alternative for alleviating micronutrient malnutrition. International Journal of Horticultural Science 20:75-81.

Fiedor, J., Burda, K. (2014) Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. Nutrients 6: 466-488.

Finkel, T., Holbrook, N.J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature 408:239–247.

Folin, O., Ciocalteu, V. (1927) On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. Journal of biological chemistry 73: 627-650.

Fortună, M.E., Vasilache, V., Ignat, M., Silion, M., Vicol, T., Patraș, X., Lobiuc, A. (2018) Elemental and macromolecular modifications in *Triticum aestivum* L. plantlets under different cultivation conditions. PloS one 13(8), e0202441.

Frias, J., Gulewicz, P., Martinez-Villaluenga, C., Pilarski, R., Blazquez, E., Jimenez, B., Vidal-Valverde, C. (2009) Influence of germination with different selenium solutions on nutritional value and cytotoxicity of lupin seeds. Journal of agricultural and food chemistry 57: 1319-1325.

Genc, Y., Humphries J.M., Lyons, G.H., Graham, R.D. (2005) Exploiting genotypic variation in plant nutrient accumulation to alleviate micronutrient deficiency in populations. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 18:319-324.

Germ, M., Kreft, I., Osvald, J. (2005) Influence of UV-B exclusion and selenium treatment on photochemical efficiency of photosystem II, yield and respiratory potential in pumpkins (*Cucurbita pepo* L.). Plant Physiology and Biochemistry 43: 445–448.

Gupta, M., Gupta, S. (2017) An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. Frontiers in plant science 7: 2074.

Hartikainen, H., Xue, T., Piironen, V. (2000) Selenium as antioxidant and pro-oxidant in ryegrass. Plant Soil 225: 193–200.

Hartikainen, H. (2005) Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. Journal of Trace elements in Medicine and Biology 18: 309-318.

Hawkesford, M. J., Zhao, F. J. (2007) Strategies for increasing the selenium content of wheat. Journal of Cereal Science 46:282-292.

Helzslouer, K., Jacobs, R., Morris, S. (!985) Acute selenium intoxication in the United States. Federation Proceedings 44:1670.

Hoagland, D.R., Arnon, D.I. (1950) The water-culture method of growing plants without soil. California Agricultural Experiment station 347.

Huang, W.Y., Zhang, H.C., Liu, W.X., Li, C.Y. (2012) Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. Journal of Zhejiang University Science B 13: 94-102.

İnanç, A.L. (2011) Chlorophyll: Structural Properties, Health Benefits and Its Occurrence in Virgin Olive Oils. Academic Food Journal/Akademik GIDA.

Iqbal, K., Khan, A., Khattak, M.M.A.K. (2004) Biological significance of ascorbic acid (vitamin C) in human health-a review. Pakistan Journal of Nutrition 3: 5-13.

Kaufman, S. (1974) Dopamine-beta-hydroxylase. Journal of Psychiatric Research 11:303–316.

Kennedy, G., Nantel, G., Shetty, P. (2003) The scourge of “hidden hunger”: Global dimensions of micronutrient deficiencies. Journal of Food, Nutrition and Agriculture 32:8–16.

Kobayashi, Y., Ogra, Y., Ishiwata, K., Takayama, H., Aimi, N., Suzuki, K.T. (2002) Selenosugars are key and urinary metabolites for selenium excretion within the required to low-toxic range. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99:15932–15936.

Köhrle, J., Jakob, F., Contempre, B.,Dumont, J.E. (2005) Selenium, the thyroid and the endocrine system. Endocrine Reviews 26:944–984.

Kulkarni, S.D., Tilak, J.C., Acharya, R., Rajurkar, N.S., Devasagayam, T.P.A., Reddy, A.V.R. (2006) Evaluation of the antioxidant activity of wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) as a function of growth under different conditions. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives 20:218-227.

Lairon, D. (2010) Nutritional quality and safety of organic food. A review. Agronomy for sustainable development 30: 33-41.

Landrum, J.T. (2010) Carotenoids: Physical, Chemical, and Biological Functions and Properties; CRC Press: Boca Raton, FL, USA.

Leustek, T. (2002) Sulfate metabolism. The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists 1.

Li, H.F., McGrath, S.P., Zhao, F.J. (2008) Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. New Phytologist 178: 92-102.

Liu, R.H. (2004) Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. Journal of Nutrition 134:3479S-85S.

Liu, R.H. (2013) Dietary Bioactive Compounds and Their Health Implications. Journal of Food Science 78: A18–A25.

Losi, M.E., Frankenberger, W.T. (1998) Microbial oxidation and solubilization of precipitated elemental selenium in soil. Journal of Environmental Quality 27:836-843.

Lyons, G.H., Judson, G.J., Ortiz-Monasterio, I., Genc, Y., Stangoulis, J.C., Graham, R.D. (2005) Selenium in Australia: selenium status and biofortification of wheat for better health. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 19:75-82.

Malagoli, M., Schiavon, M., Pilon-Smits, E.A. (2015) Effects of selenium biofortification on crop nutritional quality. Frontiers in plant science 6: 280.

Mayer, J.E., Pfeiffer, W.H., Beyer, P. (2008) Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition. Current opinion in plant biology 11:166-170.

McCance, R.A., Widdowson, E.M. (2014) McCance and Widdowson's the composition of foods. 6th summary edition. Cambridge, United Kingdom. Royal Society of Chemistry.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. Trends in plant science 9:490-498.

Mora, M.L., Durán, P., Acuña, J., Cartes, P., Demanet, R., Gianfreda, L. (2015) Improving selenium status in plant nutrition and quality. Journal of soil science and plant nutrition 15:486-503.

Mujoriya, R., Bodla, R.B. (2011) A study on wheat grass and its Nutritional value. Food Science and Quality Management 2:1-8.

Nestel, P., Bouis, H.E., Meenakshi, J.V., Pfeiffer, W. (2006) Biofortification of staple food crops. The Journal of nutrition 136:1064-1067.

Ng, B.H., Anderson, J.W. (1978) Synthesis of selenocysteine by cysteine synthases from selenium accumulator and non-accumulator plants. Phytochemistry 17: 2069-2074.

Ohlendorf, H.M. (2003) Ecotoxicology of selenium. Handbook of ecotoxicology 2: 465-500.

Oliveira, A.B., Moura, C.F., Gomes-Filho, E., Marco, C.A., Urban, L., Miranda, M. R.A. (2013) The impact of organic farming on quality of tomatoes is associated to increased oxidative stress during fruit development. PLoS One 8, e56354.

Ozcan, T., Akpinar-Bayizit, A., Yilmaz-Ersan, L., Delikanli, B. (2014) Phenolics in human health. International Journal of chemical engineering and applications 5: 393.

Özköse, A., Arslan, D., Aysenur, A.C.A.R. (2016) The comparison of the chemical composition, sensory, phenolic and antioxidant properties of juices from different wheatgrass and turfgrass species. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 44: 499-507.

Padalia, S., Drabu, S., Raheja, I., Gupta, A., Dhamija, M. (2010) Multitude potential of wheatgrass juice (Green Blood): An overview. Chronicles of young scientists 1:23.

Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.-H.,Levine, M. (2003) Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. Journal of the American College of Nutrition 22: 18–35.

Parit, S.B., Dawkar, V.V., Tanpure, R.S., Pai, S.R., Chougale, A.D. (2018) Nutritional quality and antioxidant activity of wheatgrass (*Triticum aestivum*) unwrap by proteome profiling and DPPH and FRAP assays. Journal of food science 83: 2127-2139.

Pennanen, A., Xue, T., Hartikainen, H. (2002) Protective role of selenium in plant subjected to severe UV irradiation stress. Journal of Applied Botany and Food Quality 76: 66–76.

Peters, U., Takata, Y. (2008) Selenium and the prevention of prostate and colorectal cancer. Molecular nutrition & food research 52: 1261-1272.

Pickering, I.J., Prince, R.C., Salt, D.E., George, G.N. (2000) Quantitative, chemically specific imaging of selenium transformation in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences 97: 10717-10722.

Pickering, I.J., Wright, C., Bubner, B., Ellis, D., Persans, M.W., Eileen, Y.Y., Salt, D.E. (2003) Chemical form and distribution of selenium and sulfur in the selenium hyperaccumulator Astragalus bisulcatus. Plant physiology 131: 1460-1467.

Pilon-Smits, E.A., Quinn, C.F. (2010) Selenium metabolism in plants. In Cell biology of metals and nutrients. Springer, Berlin, Heidelberg.

Prockop, D.J., Kivirikko, K.I.(1995) Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. Annual Review of Biochemistry 64:403–434.

Pyrzyńska, K. (2002) Determination of selenium species in environmental samples. Microchimica Acta 140: 55-62.

Rayman, M.P. (2005) Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. Proceedings of the Nutrition Society 64:527-542.

Rayman, M.P. (2009) Selenoproteins and human health: insights from epidemiological data. Biochimica et Biophysica Acta 11:1533–1540.

Rebouche, C.J.(1991) Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. The American Journal of Clinical Nutrition 54:1147S–1152S.

Reid, M., Duffield-Lillico, A.J., Garland, L., Turnbull, B.W., Clark, L.C., Marshall, J.R.(2002) Selenium supplementation and lung cancer incidences: an update of the

nutritional prevention cancer trial. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 11:1285-1291.

Robbins, R.J., Keck, A.S., Banuelos, G., and Finley, J.W. (2005) Cultivation conditions and selenium fertilization alter the phenolic profile, glucosinolate, and sulforaphane content of broccoli. Journal of Medicinal Food 8:204–214.

Saffaryazdi, A., Lahouti, M., Ganjeali, A.. Bayat, H. (2012) Impact of selenium supplementation on growth and selenium accumulation on spinach (*Spinacia oleracea* L.) plants. Notulae Scientia Biologicae 4: 95–100.

Sams, C.E., Panthee, D.R., Charron, C.S., Kopsell, D.A., Yuan, J.S. (2011) Selenium regulates gene expression for glucosinolate and carotenoid biosynthesis in arabidopsis. Journal of the American Society for Horticultural Science 136: 23–34.

Scheer, H. (2003) The Pigments. U: Green, B.R., Parson, W.W. (ur.) Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, the Netherlands; str. 29–81.

Shibagaki, N., Rose, A., McDermott, J.P., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yoneyama, T., Davies, J.P. (2002) Selenate-resistant mutants of Arabidopsis thaliana identify Sultr1; 2, a sulfate transporter required for efficient transport of sulfate into roots. The Plant Journal 29: 475-486.

Singh, N., Verma, P., Pandey, B.R. (2012) Therapeutic potential of organic *Triticum aestivum* L.(wheat grass) in prevention and treatment of chronic diseases: An overview. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research 4:10-14.

Sors, T.G., Ellis, D.R., Na, G.N., Lahner, B., Lee, S., Leustek, T., Salt, D.E. (2005) Analysis of sulfur and selenium assimilation in Astragalus plants with varying capacities to accumulate selenium. The Plant Journal 42:785-797.

Suriyavathana, M., Roopavathi, I. (2016) Phytochemical Characterization of Triticum Aestivum (Wheat Grass). Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 5:283.

Tan, L.C., Nancharaiah, Y.V., Van Hullebusch, E.D., Lens, P.N. (2018) Selenium: environmental significance, pollution, and biological treatment technologies. In Anaerobic

Treatment of Mine Wastewater for the Removal of Selenate and its Co-Contaminants (pp. 9-71). CRC Press.

Terry, N., Zayed, A.M., De Souza, M.P., Tarun, A.S. (2000) Selenium in higher plants. Annual review of plant biology 51:401-432.

Thompson, B. (2011) Combating Fe deficiency: food based approaches, U: Thompson, B., Amoroso, L.. (ur.)) Combating micronutrient deficiencies: food-based approaches. CABI, Wallingford, U.K. str. 268-288.

Tuzen, M., Sarı, A. (2010) Biosorption of selenium from aqueous solution by green algae (*Cladophora hutchinsiae*) biomass: equilibrium, thermodynamic and kinetic studies. Chemical Engineering Journal 158: 200-206.

White, P.J., Bowen, H.C., Parmaguru, P., Fritz, M., Spracklen, W.P., Spiby, R.E., Smith, B.M. (2004) Interactions between selenium and sulphur nutrition in Arabidopsis thaliana. Journal of Experimental Botany 55:1927-1937.

Zayed, A., Lytle, C.M., Terry, N. (1998) Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. Planta 206:284-292.

Zhao, F.J., McGrath, S.P. (2009) Biofortification and phytoremediation. Current opinion in plant biology 12:373-380.

Zhu, Y.G., Pilon-Smits, E.A., Zhao, F.J., Williams, P.N., Meharg, A.A. (2009) Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. Trends in plant science 14:436-442.

Mrežne stranice

Web 1. https://www.lenntech.com/periodic/elements/se.htm (24.4.2019.)