

ORIGINALNI ZNANSTVENI RAD / ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER

Utjecaj folijarnog mineralnog gnojiva na sadržaj fenolnih spojeva u listu batata (*Ipomoea batatas* L.)

Effect of foliar fertilizer on the phenolic content in sweet potato leaves (*Ipomoea batatas* L.)

Mara Bogović¹, Dubravko Belko², Đurđica Božić², Sanja Fabek³, Nina Toth³,
Bruno Novak³, Ivana Radojčić Redovniković^{2*}

¹ Poljoprivredna savjetodavna služba, Trakošćanska 24, 42000 Varaždin, Hrvatska

² Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

³ Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Svetošimunska cesta 25, 10 000 Zagreb, Croatia

Summary

Increased consumers knowledge of beneficial phytochemicals present in plant food stimulates producers to, in addition to good market yield, grow vegetables with increased content of health benefit compounds. Mineral fertilization, among other agronomic practices, may influence the content of secondary metabolites. Therefore, we found interesting to study the influence of foliar fertilizer Fitolife (major component CaCO_3) on the content of phenolic compounds and antioxidant activity in two different sweet potato cultivars Bat1 and Boniato. Mineral fertilization used in this study altered the content of phenolic compounds in two cultivars differently. After application of fertilizer Fitolife in Bat1 cultivar we found decreased of total phenolic acids while total flavonoid content was increased due to increase of kampferol, apigenin and quercetin. In Boniato no significant change in the content of total phenolic acids was observed while applied fertilizer Fitolife negatively affected the content of identified flavonoids myricetin and quercetin. These results may be useful for sweet potato producers to make informed decisions about Fitolife's application. Sweet potato is relatively a new vegetable in our market, and especially leaves of sweet potato are not popular as vegetables at all. Information concerning the contents of phenolic compounds, and the antioxidant activity of sweet potato leaves, may increase the awareness of the food industry and consumers to use sweet potato greens as a functional food. Furthermore, for many private growers, this crop could provide a two-in-one cash crop, with economic benefits from the sale of both the leaves and the tubers.

Key words: flavonoids, ORAC method, phenolic acids, sweet potato

Sažetak

Suvremena istraživanja u povrćarstvu, osim ostvarenja visokog prinosa, nastoje osigurati i rješenja za uzgoj kultivara koji sadrže povećani udio biološki aktivnih spojeva. Ciljana primjena mineralnih gnojiva može utjecati na nutritivnu vrijednost, ali i na sadržaj i sastav sekundarnih metabolita u biljci. Međutim, vrlo je malo podataka koji se odnose na utjecaj mineralnih gnojiva na sadržaj sekundarnih metabolita u listu batata. Stoga je u ovom radu istražen utjecaj folijarne prihrane gnojivom Fitolife (glavna komponenta CaCO_3) na sadržaj i sastav fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost u listovima batata sorte Bat1 i Boniato. Na temelju dobivenih podataka vidljivo je da se istražene sorte različito ponašaju nakon primjene folijarne ishrane gnojivom Fitolife. U Bat1 sorti gnojivo Fitolife utjecalo je na smanjenje sadržaja ukupnih fenolnih kiselina, uz istovremeno povećanje sadržaja ukupnih flavonoida zbog povećanja kampferola, apigenina i kvercetina. Kod sorte Boniato nisu utvrđene statistički značajne promjene u sadržaju ukupnih fenolnih kiselina, a folijarna aplikacija gnojiva Fitolife negativno je utjecala na sadržaj identificiranih flavonoida, miricetina i kvercetina. Značajne razlike u sadržaju fenolnih kiselina i flavonoida između uzoraka batata ukazuju da je potencijalno moguće manipulirati konvencionalnim uzgojem. Budući da je batat relativno nova kultura na našem tržištu, a posebice o listu batata se vrlo malo zna, nadamo se da će rezultati ovog rada pobuditi veći interes kod uzgajivača, ali i krajnjih potrošača za list batata kao namirnice visoke nutritivne vrijednosti te da će uzgajivačima, zajedno s agronomskim pokazateljima, pomoći pri procjeni svrhovitosti folijarne primjene Fitolife.

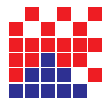
Ključne riječi: batat, flavonoidi, ORAC metoda, polifenolni spojevi

Uvod

Batat (*Ipomoea batatas* (L.) Lam), poznatiji kao slatki krumpir, višegodišnja je tropska kultura koja se ubraja među najvažnije poljoprivredne kulture u svijetu. U novije vrijeme povećan je interes za komercijalnom proizvodnjom ove kulture i u Hrvatskoj (Radojčić Redovniković i sur., 2012; Bogović i sur., 2009). Korištenje batata najčešće se rabi kao hrana te

kao materijal za proizvodnju pića, tjestenina i prirodnih bojila, za razliku od listova koji se samo povremeno rabe kao stočna hrana. Iako su u nekim dijelovima svijeta listovi batata sastavni dio svakodnevne prehrane, što znači da su prihvatljivi kao jestivo povrće, oni su još uvijek u velikoj mjeri zanemareni i nisu prepoznati kao hrana (Steed i Truong, 2008; Islam, 2006). Godišnji prinos listova batata mnogo je veći od godišnjeg prinosa ostalog zelenog povrća budući da se ono može ubirati i do

*Corresponding author: iradojci@pbf.hr



nekoliko puta godišnje. Osim većeg prinosa, značaju listova batata pridonose i novija istraživanja koja ukazuju na visoku nutritivnu vrijednost u odnosu na ostalo lisnato povrće. Naime, listovi batata obiluju spojevima koji su vrlo važni za ljudsko zdravlje. Tu se redom ubrajaju proteini, dijetalna vlakna, vitamini C, E i K, minerali bakar, kalcij, mangan i željezo te različiti antioksidansi poput fenola (Yoshimoto i sur., 2007; Islam, 2006; Ishida i sur., 2000).

Fenolini spojevi su velika skupina sekundarnih biljnih metabolita koji doprinose organoleptičkim i nutritivnim svojstvima voća i povrća. U posljednje vrijeme pridodaje im se posebna pozornost kao najvažnijoj skupini prirodnih antioksidansa, kao i činjenici da imaju zaštitnu ulogu od oksidativnog stresa u ljudskom organizmu, koji može uzrokovati mnoge bolesti, uključujući karcinome i kardiovaskularne bolesti (Art i Hollman, 2005; Soobrattee i sur., 2005). Posljednjih je godina u nekoliko studija dokazano da fenolni spojevi ekstrahirani iz listova i korijenja batata pokazuju antioksidativnu aktivnost te antimutagena i antidijabetička svojstva (Islam, 2006). List batata sadrži znatno više fenola i sukladno tome ima i znatno veći antioksidacijski kapacitet od korijena. U usporedbi s komercijalnim lisnatim povrćem poput kupusnjača i salata, listovi batata imaju veći sadržaj fenolnih spojeva i to uglavnom fenolnih kiselina i flavonoida (Isabell i sur., 2010; Kaur i Kapoor, 2001). Prisutne fenolne kiseline su derivati kava i kafeoilkina kiselina, a identificirane su klorogenska kiselina (CGA), 3,4-dikafeoilkina kiselina (3,4-diCQA), 3,5-dikafeoilkina kiselina (3,5-diCQA), 4,5-dikafeoilkina kiselina (4,5-diCQA), i 3,4,5-trikafeoilkina kiselina (3,4,5-triCQA) (Trunog i sur., 2007; Islam i sur., 2003). Sastav i sadržaj flavonoida u batatu manje je istražen, a do danas je identificirano pet flavonoida: apigenin, kamferol, kvercetin, luteolin i miricetin. Sadržaj flavonoida sukladan je sadržaju ukupnih fenola što znači da listovi batata imaju znatno veći sadržaj flavonoida od korijena (Radojčić Redovniković i sur., 2012; Ojong i sur., 2008). Pozitivno djelovanje fitokemikalija prisutnih u biljnoj hrani na ljudski organizam, potaknulo je proizvođače na povećanu proizvodnju onih kultivara koji će uz optimalne prinose sadržavati i povećanu koncentraciju antocijana, karotena, fenola i sl. Sastav i sadržaj sekundarnih metabolita te antioksidacijski kapacitet biljaka ovisi o genetskim odrednicama, uvjetima uzgoja (temperatura, svjetlo, dostupnost vode i hranjivih tvari), poljoprivrednoj praksi (datum berbe i sl.) te uvjetima nakon berbe (Radojčić Redovniković i sur., 2012; Ojong i sur., 2008; Padma i Picha, 2008; Teow i sur., 2007; Truong i sur., 2007; George i sur., 2002).

Biljke za normalno održavanje svojih fizioloških i biokemijskih procesa zahtijevaju određene kemijske elemente. Količina tih elemenata u tlu često je nedovoljna pa se isti unose u tlo dodatkom različitih gnojiva. Primjena mineralnih gnojiva u modernoj poljoprivredi je zajednička značajka biljne proizvodnje diljem svijeta, no njihova relativno niska učinkovitost predstavlja ozbiljan problem (George i sur., 2002). Najvažnija istraživanja pri intenzivnom uzgoju povrća usmjerena su prema izbalansiranoj gnojivima. Alternativni pristup za primjenu hranjiva je folijarna gnojivima putem listova i stabljike. Upotreba folijarnih gnojiva u poljoprivredi sve je više rasprostranjena budući da su ta gnojiva ekološki prihvatljivija i ciljano usmjerena te se, u usporedbi s gnojivima preko tla, izravno usvajaju u organizam u ograničenim količinama (Fernandez i Eichert,

2009). Ciljana primjena mineralnih gnojiva može utjecati na nutritivnu vrijednost, ali i na sadržaj i sastav sekundarnih metabolita u biljci. Međutim, vrlo je malo podataka koji se odnose na utjecaj mineralnih gnojiva na sadržaj sekundarnih metabolita u batatu (Radojčić Redovniković i sur., 2012; Ukom i sur., 2009; George i sur., 2002). Štoviše, konkretni podatci o utjecaju folijarnog mineralnog gnojiva na sadržaj fenolnih spojeva u listovima batata do danas nisu zabilježeni. Iz tog razloga zanimljivim smo smatrali istražiti utjecaj folijarne prihrane gnojivom Fitolife (glavna komponenta CaCO_3) na sadržaj i sastav fenolnih spojeva te antioksidacijsku aktivnost u listovima batata sorte Bat1 i Boniato. Fitolife predstavlja prirodno mineralno gnojivo dobiveno nanotehnološkom aktivacijom kalcita. Osnovno djelovanje gnojiva Fitolife temelji se na posebno učinkovitoj fizikalnoj formi kalcijeva karbonata visoke bioraspoloživosti.

Materijali i metode rada

Poljski pokus

Pokus je proveden na pokusnom polju u Varaždinu 2008. i 2009. godine na aluvijalnom tlu siromašnom humusom, pH 7,2, srednje opskrbljenosti N i P i siromašne opskrbljenosti K, postavljen je po slučajnom blokom rasporedu u četiri ponavljanja uz osnovnu gnojivbu (NPK: 15-10-15 kg ha^{-1}). Uzgajane su dvije sorte batata, Bat 1 (žuta kora, narančasto meso) i Boniato (crvena kora, bijelo meso). Sadnja je obavljena 13. svibnja 2008. godine i 12. svibnja 2009. godine po principu dvije sadnice na metar kvadratni, na izdignutim gredicama prekrivenim polietilenskim filmom. Batat je u tri navrata folijarno tretiran gnojivom Fitolife, u pravilnim razmacima od mjesec dana, gnojivo Fitolife je registrirano kao poboljšivač tla, prirodno mineralno sredstvo za poboljšanje rasta biljaka te kao ekološki proizvod. Po kemijskom sastavu gnojiva Fitolife je 94,4 % CaCO_3 , 2,56 % MgCO_3 , 1,75 % SiO_2 , 0,43 % Al_2O_3 , 0,23 % Na_2O , 0,19 % Fe_2O_3 i 0,10 % K_2O . Također sadrži i mikroelement Zn (45 mg kg^{-1}), Mn (40 mg kg^{-1}), Cu (13,2 mg kg^{-1}) i Mo (0,04 mg kg^{-1}). Meterološki podatci su tijekom perioda uzgoja prikazani u Tablici 1. Prosječna količina padalina tijekom vegetacije bila je manja od potrebnih 500 mm, no navodnjavanje nije provedeno (osim 0,5 L po biljci dodanih prilikom sadnje) te nisu primijenjeni pesticidi. Nakon obavljene žetve, uzorci su poslani u laboratorij gdje su potom smrznuti i liofilizirani te pohranjeni do daljnje analize.

Određivanje fenolnih kiselina

Uzorci liofiliziranih listova batata (400 mg) homogenizirani su i ekstrahirani dvaput s 5 mL 70 %-tnog metanola (v/v) pri 70 °C kroz 15 minuta. Supernatanti su spojeni i dopunjeni do 10 ml sa 70 %-tnim metanolom te su tako čuvani u hladnjaku na -18 °C. Pripremljeni ekstrakti korišteni su za analizu fenolnih kiselina pomoću PerkinElmer Series 200 HPLC prema metodi opisanoj u Truong i sur. (2007), uz manje modifikacije. Fenolne kiseline razdvojene su na ZORBAX C18 (Agilent, 250 × 4,6 mm, id 5 μm) kromatografskoj koloni uz uvjete: volumen injektiranja, 20 μL ; protok 1 mL min^{-1} i λ 320 nm. Razdvajanje fenolnih kiselina provedeno je izokratnim eliranjem s 40% metanola i 60% 0,1%-tne mravlje kiseline u

Tablica 1. Meteorološki podaci za područje Varaždina (46°17'39"N 16°23'00"E) tijekom perioda vegetacije
Table 1. Meteorological data for the region where experiment were conducted Varaždin (46°17'39"N 16°23'00"E) during the period of vegetation

Specifikacija perioda uzgoja <i>Specification for growth period an years</i>	Godina <i>Year</i>	Srednja temperatura zraka (°C) <i>Average air temperature (°C)</i>	Oborine (mm) <i>Rainfall (mm)</i>	Sunčani sati (h) <i>Sunshine (h)</i>
Svibanj <i>May</i>	2008.	18,66	122,8	291,0
	2009.	18,22	74,9	272,3
Lipanj <i>June</i>	2008.	21,15	89,5	246,2
	2009.	18,81	89,0	231,2
Srpanj <i>July</i>	2008.	21,40	98,9	277,9
	2009.	22,29	22,2	325,4
Kolovoz <i>August</i>	2008.	20,79	90,2	324,5
	2009.	19,82	59,9	288,7
Rujan <i>September</i>	2008.	11,39	42,8	148,9
	2009.	15,72	14,8	201,0
Srednja vrijednost za period uzgoja <i>Mean for growing period</i>	2008.	18,68	88,84	257,7
	2009.	18,96	52,16	263,72
Zbroj za period uzgoja <i>Sum for growing period</i>	2008.	-	444,2	1288,5
	2009.	-	260,8	1318,6

vodi (v/v) tijekom 30 min. Identifikacija fenolnih spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih pikova u ekstraktu i vremena zadržavanja standarda (kava kiselina i klorogenska kiselina) na kromatografskoj koloni, a potvrđena je usporedbom UV-spektara. Identifikacija ostalih fenolnih kiselina (4,5-dikafeoilkina kiselina, 3,5-dikafeoilkina kiselina, 3,4-dikafeoilkina kiselina), provedena je usporedbom s UV spektrima dostupnim u literaturi i usporedbom vremena zadržavanja na kromatografskoj koloni prema Truong i sur. (2007). Kvantifikacija svih identificiranih fenolnih spojeva provedena je prema klorogenskoj kiselini kao standardu (kalibracije krivulja od šest točaka od 0,05 -1,0 mg mL⁻¹ klorogenske kiseline, Sigma, St. Louis, SAD) i izražena je kao mg ekvivalent klorogenske kiseline po gramu suhe tvari uzorka (mg CGA g⁻¹ s.t.). Ukupan sadržaj fenolnih kiselina dobivena je zbrajanjem sadržaja identificiranih fenolnih kiselina.

Određivanje flavonoida

Uzorci liofiliziranih listova batata (500 mg) homogenizirani su i provedena je hidroliza flavonoida s 50%-tnim metanolom (v/v) i 1,6 M HCl. Ekstrakcija je provedena pri 90 °C kroz 2 h uz refluks, nakon čega su ekstrakti ohlađeni i dopunjeni do 100 mL s 50 %-tnim metanolom (v/v). Tako pripremljeni uzorci čuvani su u hladnjaku na -18 °C do daljnje analize. Sastav i sadržaj aglikona flavonoida određen je pomoću PerkinElmer Series 200 HPLC prema metodi opisanoj u Schmidt i sur. (2010), uz manje modifikacije. Flavonoidi su razdvojeni na ZORBAX C18 (Agilent, 250 × 4,6 mm, id 5µm) kromatografskoj koloni uz uvjete: volumen injektiranja, 20 µL, protok 1 mL min⁻¹ i λ 370 nm. Razdvajanje je provedeno linearnim gradijentom s 0,5 %-tnom octenom kiselinom u vodi (v/v) (otapalo A) i acetonitrilom (otapalo B). Upotrijebljen je sljedeći gradijent: 30-35 % B (5 min), 35-39 % B (12 min), 39-90 % B (5 min), 90 % B izokratno (5 min), 90-30 % B (5 min), i 30 % B izokratno (5 min). Identifikacija flavonoida provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih pikova u ekstraktu i vremena zadržavanja standarda (miricetin, kvercetin, apigenin

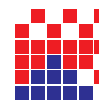
i kamferol, Sigma, St. Louis, SAD) na kromatografskoj koloni, a potvrđena je usporedbom UV-spektara. Kvantitativno određivanje provedeno je pomoću kalibracijske krivulje standarda u rasponu od 0,05-1,0 mg mL⁻¹ i vrijednosti su izražene kao mg po gramu suhe tvari (mg g⁻¹ s.t.). Ukupni sadržaj flavonoida dobiven je zbrajanjem sadržaja identificiranih flavonoida.

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

Antioksidacijski kapacitet metanolnih ekstrakata određen je ORAC metodom (Ninfali i sur., 2005). Mjerenje se provodi spektrofotometrijski pri temperaturi od 37 °C uz λ_{eks.} 485 nm i λ_{em.} 520 nm. U kivetu se doda 2,250 mL 0,04 µmol L⁻¹ fluoresceina (Sigma, St. Louis, SAD) i 0,375 mL uzorka (uzorke metanolnih ekstrakata lista potrebno je razrijediti 500 puta) ili 25 µmol L⁻¹ Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-ugljična kiselina, Sigma, St. Louis, SAD) kao standarda. Otopine se termostatiraju 30 min na 37 °C. Nakon 30 min dodaje se 0,375 mL 152 mmol L⁻¹ AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamid)-dihidroklorid, Sigma, St. Louis, SAD) te se promjena intenziteta fluorescencije mjeri svaku minutu. Na isti način pripravi se i slijepa proba, za čije se mjerenje umjesto uzorka koristi 0,075 mol L⁻¹ fosfatni pufer. Rezultati se izražavaju u ekvivalentima Trolox-a, tj. kao µmol TE g⁻¹ s.t., a izračunati su prema sljedećoj formuli:

$$\text{Relativna ORAC vrijednost} = \left(\frac{A_u - A_{SP}}{A_{TRX} - A_{SP}} \right) \times k \times a \times h \quad /1/$$

gdje je: A_u je površina ispod krivulje (AUC) fluoresceina uz dodatak uzorka, A_{sp} je AUC slijepa probe, A_{trx} je AUC standarda Trolox-a, k faktor razrjeđenja, a je koncentracija Trolox-a u µmol L⁻¹, and h je omjer između volumena ekstrakta (L) i mase suhe tvari uzorka (g).



Tablica 2. Utjecaj folijarne primjene gnojiva Fitolife na sastav i sadržaj fenolnih kiselina u listovima dviju sorata batata tijekom dvije godine uzgoja 2008. i 2009. godine^{*,**}

Table 2. Influence of foliar application of Fitolife on phenolic acid content in leaves of two sweet potato cultivars grown in 2008 and 2009^{*,**}

Kultivar Cultivar	Godina Year	Uzorak Sample	CA	ChA	4,5diCQA	3,5diCQA	3,4diCQA	TPA
Bat1	2008.	Kontrola Control	0,20 ^b ±0,01	3,55 ^b ±0,18	5,18 ^b ±0,25	8,20 ^b ±0,14	2,21 ^c ±0,15	19,39 ^c ±0,64
		Fitolife	0,19 ^b ±0,02	3,54 ^b ±0,17	3,61 ^c ±0,11	6,15 ^c ±0,21	2,51 ^{bc} ±0,18	16,00 ^d ±0,37
	2009.	Kontrola Control	0,30 ^a ±0,01	6,65 ^a ±0,10	8,36 ^a ±0,22	12,00 ^a ±0,49	3,62 ^a ±0,30	30,93 ^a ±1,11
		Fitolife	0,36 ^a ±0,05	5,52 ^a ±0,51	6,70 ^b ±0,59	9,59 ^b ±0,96	3,33 ^{ab} ±0,30	25,49 ^b ±1,40
Boniato	2008.	Kontrola Control	0,22 ^b ±0,01	3,84 ^{ab} ±0,17	4,28 ^b ±0,26	7,29 ^b ±0,34	1,87 ^b ±0,16	17,49 ^b ±0,82
		Fitolife	0,14 ^b ±0,01	3,12 ^b ±0,12	4,22 ^b ±0,13	6,82 ^b ±0,18	1,52 ^b ±0,29	15,82 ^b ±0,54
	2009.	Kontrola Control	0,39 ^a ±0,01	4,15 ^a ±0,33	7,67 ^a ±0,35	11,84 ^a ±0,65	3,84 ^a ±0,45	27,89 ^a ±1,58
		Fitolife	0,32 ^a ±0,01	3,85 ^{ab} ±0,12	7,44 ^a ±0,15	10,45 ^a ±0,47	3,72 ^a ±0,16	25,77 ^a ±0,81

* Rezultati su izraženi kao mg po gramu suhe tvari uzorka (mg g⁻¹ s.t.); srednja vrijednost ± S.D. (n=3), vrijednosti s istim slovom (a-d) statistički se ne razlikuju (P< 0,05) kako je određeno post hoc Tukey's HSD test.

* Results are expressed as mg per gram of dry weight of sample (mg g⁻¹ dw), means ± S.D. (n=3) and values of the same column followed by the same letter (a-c) are not statistically different (P<0,05) as measured by Tukey's HSD test.

** CA=kava kiselina; ChA=klorogenske kiseline; 4,5diCQA=4,5-dikafeoilkina kiselina; 3,5diCQA=3,5-dikafeoilkina kiselina; 3,4-dikafeoilkina kiselina (3,4-diCQA); TPA= ukupni sadržaj fenolnih kiselina.

** CA=caffeic acid; ChA=chlorogenic acid; 4,5diCQA=4,5-dicaffeoylquinic acid; 3,5diCQA=3,5-dicaffeoylquinic acid; 3,4diCQA=3,4-dicaffeoylquinic acid, TPA= total phenolic acid content.

Statistička obrada podataka

Sva mjerenja su provedena u triplicatima, tako da su rezultati prosječne vrijednosti triju mjerenja te su iskazana zajedno sa standardnom devijacijom. Statistička analiza provedena je uporabom programa Statistica 7.1. Razlike između uzoraka su analizirane ANOVA testom te Tukey HSD testom. Značajna razlika je razmatrana na razini p<0,05.

Rezultati i rasprava

U radu je ispitan utjecaj folijarne primjene gnojiva Fitolife na sadržaj fenolnih spojeva u listu dvaju kultivara batata: Bat1 (žuta koža s narančastim mesom) i Boniato (crvena koža bijelo meso). Rezultati istraživanja prikazani u Tablici 2. U metanolnim ekstraktima fenolnih kiselina pomoću HPLC-a identificirano je pet kiselina i to kava kiselina (CA), klorogenske kiseline (ChA), 4,5-dikafeoilkina kiselina (4,5-diCQA), 3,5-dikafeoilkina kiselina (3,5-diCQA) i 3,4-dikafeoilkina kiselina (3,4-diCQA). Nije bilo značajne razlike u sadržaju ukupnih fenolnih kiselina između kultivara (p = 0,4079), a njihov sadržaj je bio u sljedećem nizu 3,5-diCQA, 4,5-diCQA, 3,4-diCQA, ChA i CA. Ukupni sadržaj fenolnih kiselina za Bat1 kultivara bio je u rasponu od 16,00 do 30,93 mg ChA g⁻¹ s.t. dok je za Boniato sorte bio u rasponu od 15,82 do 27,89 mg ChA g⁻¹ s.t. (Tablica 2). Podatci dobiveni u ovoj studiji u skladu su s prethodno objavljenim podacima (Islam et al. 2002; Truong et al. 2007). U usporedbi s fenolnim kiselinama utvrđena je veća varijabilnost u sastavu i sadržaju flavonoida između sorata. U Bat1 sorti identificirani su flavonoidi

apigenin, kampferol, kvercetin i miricetin, dok je kod Boniato sorte identificiran samo miricetin i kvercetin. Ukupni sadržaj flavonoida također su statistički značajno različiti (p = 0,0001) zbog visokog sadržaja flavonoida u Boniato sorti (Tablica 3). Razlike u sastavu i sadržaju flavonoida također su utvrđeni u prijašnjim istraživanjima (Carvalho i sur., 2010; Ojong i sur., 2008). Nedavno, Ojong i sur. (2008) utvrdili su velike razlike u sastavu i sadržaju flavonoida. U ovom radu kvercetin je kvantificiran u najvećem udjelu u svim ispitanim kultivarima, dok je u radu Carvalho i sur. (2010) kampferol kvantificiran u najvećem udjelu. Izostanak kampferola u sorti Boniato, obično prisutnog u listovima batata, može se objasniti visokim sadržajem miricetina i kvercetina budući da je dihirokampferol identificiran kao prekursor u njihovoj biosintezi (Jaakola i sur., 2004).

Sadržaj fenolnih spojeva statistički se značajno razlikuju između dvije godine uzgoja (vrijednosti u 2009. godini bile su za oko 50 % veće od 2008. godine). Velika razlika u sadržaju fenolnih spojeva može se djelomično objasniti razlikama u klimatskim uvjetima između dviju sezona uzgoja (Tablica 1). Prosječna temperatura i trajanje sijanja sunca bili su slični za oba perioda uzgoja, iako su u rujnu 2009. mjesec dana prije berbe zabilježene više temperature i trajanje sijanja sunca. Osim toga, količina oborina bila je niža u 2009. a posebice u rujnu, kada je zabilježeno samo 25,6 mm padalina. Poznato je da fenoloni spojevi imaju zaštitnu ulogu u biljci te da je i njihova biosinteza često u korelaciji s vanjskim čimbenicima, kao što su suša, niske ili visoke temperature, ranjavanje ili intenzitet svjetlosti (Carvalho i sur. 2010; Winkel-Shirley 2002). Nadalje, poznato je da je svjetlost jedan od najvažnijih čimbenika

u kontroli biosinteze flavonoida u biljkama. Također, drastično povećanje u sadržaju antocijana, katehina, flavonola, hidroksicimetnih kiselina i hidroksibenzojevih kiselina zabilježeno je i tijekom uzgoja batata pri uvjetima dugog dana (fotoperioda od 16 h) (Carvalho i sur. 2010). Neovisno o razlikama između dvije sezone uzgoja, utvrđen je sličan utjecaj folijarne primjene Fitolife na sadržaj fenolnih spojeva u pojedinim sortama. Osim toga, istražene sorte različito se ponašaju uz dodatak gnojiva Fitolife. U Bat1 sorti gnojivo Fitolife u usporedbi s kontrolom utjecalo je na smanjene sadržaja 4,5-di-CQA i 3,5-di-CQA što je rezultiralo statistički značajnim smanjenjem sadržaja ukupnih fenolnih kiselina (Tablica 2). U suprotnosti s fenolnim kiselinama utvrđeno je povećanje ukupnih flavonoida zbog povećanja kampferola, apigenina i kvercetina. Kod sorte Boniato nisu utvrđene statistički značajne promjene u sadržaju ukupnih fenolnih kiselina, iako je sadržaj CA bio značajno manji te je također uočen trend smanjenja sadržaja drugih identificiranih fenolnih kiselina. Nadalje, folijarna aplikacija gnojiva Fitolife negativno je utjecala na sadržaj identificiranih flavonoida, miricetina i kvercetina (Tablica 3).

Fitolife tijekom resorpcije na površini lista djeluje kao učinkovit dodatni izvor CO₂ (povećanje koncentracije bikarbonatnih iona u listu) koji potpomaže rast, dozrijevanje i lakše podnošenje stresnih stanja biljke. Dodatni kalcij također ima ulogu u tom procesu budući da potiče enzimsku aktivnost što rezultira ubrzanom dozrijevanjem, povećanim prinosom, kvalitetom i otpornošću biljke (Horvat, 2010). Pregledom literature, utjecaj folijarne primjene CaCO₃ ili drugih karbonatnih soli na fenolne spojeve nije ispitan. Međutim, rezultati ovog istraživanja mogu se djelomično usporediti s radovima o utjecaju koncentracije CO₂ u atmosferi na sadržaj sekundarnih metabolita (Save i sur, 2007; Lavola i sur, 2000; Bezemer i sur, 2000). U

sadnicama breza utvrđeno je da povećana koncentracije CO₂ u atmosferi različito utječe na pojedine klase fenolnih spojeva (Lavola i sur., 2000). Na primjer, u listovima sadnica pri povećanoj koncentraciji CO₂ utvrđen je manji sadržaj fenolnih kiselina koji dolazi radi učinka razrjeđivanja budući da je došlo do povećanja lisne biomase. Ovi podatci u skladu su s našim podatcima budući da je utvrđeno povećanje lisne biomase kod Bat1 i smanjenje sadržaja fenolnih kiselina, nakon tretmana s gnojivom Fitolife, dok Fitolife nije utjecao niti na lisnu masu niti na fenolne kiseline Boniato sorte (Bogović i sur., 2009). Biljke uzgajane pri većoj koncentraciji CO₂ imale su veći sadržaj flavonoida, iako je utjecaj na pojedine flavonoide bio različit. Na primjer, sadržaj derivata apigenina je porastao, dok je sadržaj miricetina bio nepromijenjen kod uzgoja s povećanom koncentracijom CO₂ (Lavola i sur., 2000). Nadalje, egzogena primjena kalcija također izravno utječe na metabolizam fenola (Ruiz i sur., 2003; Castañeda i Pérez, 1996). Metabolizam fenola uključuje niz enzima kao što su fenilalanin amonijak-liaze (PAL), ključni korak u biosintezi fenola te peroksidaza (POD) i polifenol oksidaze (PPO) koji sudjeluju u oksidaciji tih spojeva (Cohen i Kennedy, 2010). Castañeda i Pérez (1996) utvrdili su da primjena kalcija utječe na povećanu aktivnost PAL enzima. Slično su utvrdili i Ruiz i sur. (2003) koji su uz povećanu aktivnost PAL utvrdili povećanje aktivnosti PPO i POD te su sugerirali da visoka koncentracija kalcija potiče više oksidaciju nego biosintezu fenolnih spojeva (Ruiz i sur., 2003).

Budući da fenolni spojevi pridonose antioksidacijskom djelovanju povrća u velikom broju studija istovremeno su određeni sadržaji fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet (Radojčić Redonviković i sur, 2012; Teow i sur, 2007, Islam, 2006). Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta prirodnih spojeva u hrani i biološkim sustavima danas postoji niz stan-

Tablica 3. Utjecaj folijarne primjene gnojiva Fitolife na sastav i sadržaj flavonoida u listovima dviju sorata batata tijekom dvije godine uzgoja 2008. i 2009. godine***

Table 3. Influence of foliar application of Fitolife on flavonoid content in leaves of two sweet potato cultivars grown in 2008 and 2009***

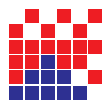
Kultivar Cultivar	Godina Year	Uzorak Sample	Mircetin Myricetin	Kvercetin Quercetin	Apigenin Apigenin	Kamferol Kaempferol	TF
Bat1	2008	Kontrola Control	0,42 ^b ±0,01	0,64 ^b ±0,01	2,03 ^c ±0,09	1,48 ^c ±0,08	4,58 ^c ±0,25
		Fitolife	0,39 ^b ±0,09	0,83 ^{ab} ±0,02	3,44 ^b ±0,21	3,17 ^b ±0,26	7,53 ^b ±0,46
	2009	Kontrola Control	1,22 ^a ±0,09	0,74 ^b ±0,10	3,03 ^b ±0,03	2,59 ^b ±0,09	7,58 ^b ±0,31
		Fitolife	1,00 ^a ±0,12	1,14 ^a ±0,29	4,54 ^a ±0,35	4,40 ^a ±0,43	11,08 ^d ±1,19
Boniato	2008	Kontrola Control	4,17 ^c ±0,27	2,80 ^c ±0,12	nd	nd	6,97 ^c ±0,19
		Fitolife	3,09 ^d ±0,10	1,86 ^d ±0,10	nd	nd	5,38 ^d ±0,20
	2009	Kontrola Control	9,45 ^a ±0,32	6,89 ^a ±0,23	nd	nd	16,34 ^a ±0,08
		Fitolife	6,23 ^b ±0,13	4,79 ^b ±0,16	nd	nd	11,03 ^b ±0,29

* Rezultati su izraženi kao mg po gramu suhe tvari uzorka (mg g⁻¹ s.t.); srednja vrijednost ± S.D. (n=3), vrijednosti sa istim slovom (a-d) statistički se ne razlikuju (P< 0,05) kako je određeno post hoc Tukey's HSD test.

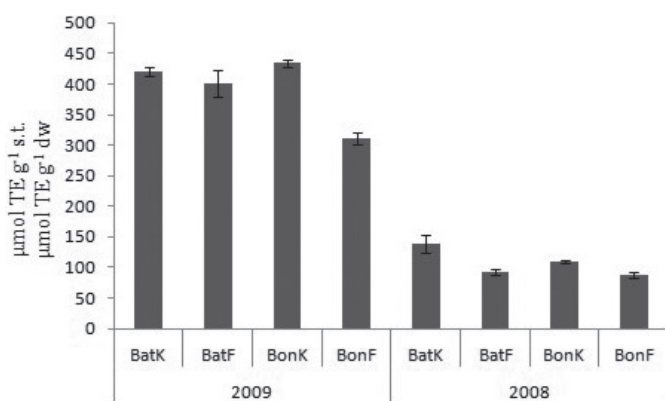
* Results are expressed as mg per gram of dry weight of sample (mg g⁻¹ dw), means ± S.D. (n=3) and values of the same column followed by the same letter (a-c) are not statistically different (P<0,05) as measured by Tukey's HSD test.

** TF= ukupni sadržaj flavonoida; nd- nije identificirano.

** TF= total flavonoid content; nd- not detected.



dardiziranih metoda koje se temelje na različitim mehanizmima djelovanja antioksidansa, poput uklanjanja ili inhibicije slobodnih radikala ili keliranja metalnih iona, koji bi u suprotnom doveli do nastajanja slobodnih radikala (Gülçin, 2012). U ovom radu antioksidacijski kapacitet metanolnih ekstrakata analiziran je ORAC metodom koja uključuje *in vitro* mjerenja s biološki relevantnim slobodnim radikalom (AAPH). Spoj AAPH u smjesi s fluoresceinom se oksidacijski razgrađuje pri čemu nastaje peroksil-radikal koji reagira s fluoresceinom. Kada se u smjesu slobodnog radikala i fluoresceina dodaju antioksidansi, inhibira se djelovanje peroksil-radikala, budući da antioksidansi stupaju u reakciju s radikalima te tako onemogućuju reakciju s fluoresceinom. Posljedica je sporiji pad fluorescencije fluoresceina (Ninfali i sur., 2005). Rezultati analize uzoraka ORAC metodom prikazani su na Slici 1. Iz dobivenih se podataka može zaključiti da ispitivani uzorci imaju široki raspon ORAC vrijednosti (434,07 – 87,75 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ s.t.) te da su 2009. godine ORAC vrijednosti bile veće nego u 2008. godini što je u koleraciji sa sadržajem fenolnih spojeva. Na primjer, najveći antioksidacijski kapacitet (434,96 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ s.t.) utvrđen je u Boniato sorti 2009. godine u kontrolnom uzgoju u kojem je utvrđen i najveći sadržaj ukupnih fenolnih spojeva (zbroj ukupnih fenolnih kiselina i flavonoida). Podatci u ovom radu u skladu su s prijašnjim radovima koji ukazuju da listovi batata imaju znatno veću antioksidativnu aktivnost u usporedbi s drugim zelenim povrćem (Isabelle i sur., 2010; Kaur i Kapoor, 2001). U nedavnom istraživanju Isabell i sur. (2010) u kojem je testirano 66 vrsta povrća, listovi batata izdvojeni su kao povrće s najvišim ORAC vrijednostima. Osim toga, utvrđena je i dobra korelacija između ORAC vrijednosti i ukupnih fenolnih spojeva (R^2 0,9684), kao i između ORAC vrijednosti i ukupnih fenolnih kiselina (R^2 0,9067), dok je korelacija s ukupnim sadržajem flavonoida bila znatno manja (R^2 0,5802). Naši podaci, kao i prijašnje studije, ukazuju da fenolni spojevi značajno doprinose antioksidativnom kapacitetu povrća (Radović Redovniković i sur., 2012; Isabelle i sur., 2010; Islam, 2006; Teow sur., 2007).



Slika 1. Utjecaj folijarne primjene gnojiva Fitolife na antioksidacijski kapacitet u listovima dviju sorata batata uzgojene tijekom dvije godine uzgoja 2008 i 2009. Rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. ($n=3$) Bat- Bat1 sorta; Bon- Boniato sorta; K- kontrola; F- FitoLife.

Figure 1. Influence of foliar application of FitoLife on antioxidant capacity in leaves of two sweet potato cultivars grown in 2008 and 2009. Results are means \pm S.D. ($n=3$); Bat- Bat1 cultivar; Bon- Boniato cultivar; K- control; F- FitoLife.

Zaključak

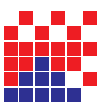
Podatci iz ove studije doprinose znanju o fenolnim spojevima i antioksidacijskom kapacitetu batata. Na temelju dobivenih podataka vidljivo je da se istražene sorte različito ponašaju pri primjeni folijarne ishrane gnojivom Fitolife. Značajne razlike u sadržaju fenolnih kiselina i flavonoida između uzoraka batata ukazuju da je potencijalno moguće manipulirati konvencionalnim uzgojem. Budući da je batat relativno nova kultura na našem tržištu, a posebice o listu batata se vrlo malo zna, smatramo da će rezultati ovog rada pobuditi veći interes kod uzgajivača ali i krajnjih potrošača za list kao namirnicu visoke nutritivne vrijednosti, te da će uzgajivačima zajedno s agronomskim pokazateljima pomoći pri procjeni svrhovitosti folijarne primjene Fitolifa.

Zahvale

Autori se zahvaljuju na financijskoj pomoći Ministarstvu znanosti, obrazovanja i športa RH (broj projekata 0582261-2256 i 178-1782133-2132).

Literatura

- Arts I.C.W., Hollman P.C.H. (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 317S–325S.
- Bezemer M.T., Jones T.H., Newington J.E. (2000) Effects of carbon dioxide and nitrogen fertilization on phenolic content in *Poa annua* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28, 839-846.
- Bogović M., Novak B., Toth N. (2009) Primjena Fitolife i Zeolita u uzgoju batata. U Zbornik sažetaka 44. hrvatskog i 4. međunarodnog simpozija agronoma. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
- Castañeda P., Pérez, L.M. (1996) Calcium ions promote the response of citrus lemon against fungal elicitors or wounding. *Phytochemistry* 42, 595–598.
- Carvalho I.S., Cavaco T., Carvalho L.M., Duque P. (2010) Effect of photoperiod on flavanoid pathway activity on sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) leaves. *Food Chemistry* 118, 384-390.
- Cohen S.D., Kennedy J.A. (2010) Plant Metabolism and the Environment: Implications For Managing Phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 620-643.
- Fernandez V., Eichert T. (2009) Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves: Current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization. *Critical Reviews in Plant Science*, 28, 36-68.
- George M.S., Lu G., Zhou W. (2002) Genotypic variation for potassium uptake and utilization efficiency in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Field Crops Research*, 77, 7-15.
- Gülçin İ. (2012) Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86, 3345-391.
- Horvat T. (2010) Utjecaj folijarnih gnojiva na intenzitet fotosinteze, prinos i kvalitetu gomolja krumpira (*Solanum tuberosum* L.). Disertacija, Sveučilište u Zagrebu.
- Isabelle M., Lee B.L., Lim M.T., Koh W.-P., Huang D., Ong C.N. (2010) Antioxidant activity and profiles of common vegetables in Singapore. *Food Chemistry*, 120, 993-1003.



- Ishida H., Suzuno H., Sugiyama N., Innami S., Tadokoro T., Maekawa A. (2000) Nutritive evaluation on chemical components of leaves, stalks and stems of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* Poir). *Food Chemistry*, 68, 359-367.
- Islam M.S., Yoshimoto M., Yamakawa O. (2003) Distribution and physiological functions of caffeoylquinic acid derivatives in leaves of sweetpotato genotypes. *Journal of Food Science*, 68, 111-116.
- Islam S. (2006) Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaf: its potential effect on human health and nutrition. *Journal of Food Science*, 71, 13-21.
- Jaakola L., Määttä-Riihinen K., Kärenlampi S., Hohtola A. (2004) Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta*, 218, 721-728.
- Kaur C., Kapoor H.C. (2001) Antioxidants in fruits and vegetables – The millennium's health. *Journal of Food Science and Technology*, 36, 703-725.
- Lavola A., Julkunen-Tiitto R., de la Rosa T., Lehto T., Aphalo P.J. (2000) Allocation of carbon to growth and secondary metabolites in birch seedlings under UV-B radiation and CO₂ exposure. *Plant Physiology*, 109, 260-267.
- Ninfali P., Mea G., Giorgini S., Rocchi M., Bacchiocca M. (2005) Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. *British Journal of Nutrition*, 93, 257-266.
- Ojong P., Njiti V., Guo Z., Gao M., Besong S., Barnes S.L. (2008) Variation of flavonoid content among sweetpotato accessions. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133, 819-824.
- Padda M.S., Picha D.H. (2008) Effect of low temperature storage on phenolic composition and antioxidant activity of sweetpotatoes. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 176-180.
- Radojčić Redovniković I., Bogović M., Belko D., De-longa K., Fabek S., Novak B., Toth N. (2012) Influence of potassium fertilisation on the leaf phenolic compounds in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 87, 45-51.
- Ruiz J.M., Rivero R.M., López-Cantarero I., Romero L. (2003) Role of Ca in the metabolism of phenolic compounds in tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Growth Regulation*, 41, 173-177.
- Savé R., de Herralde F., Codina C., Sánchez X., Biel C. (2007) Effects of atmospheric carbon dioxide fertilization on biomass and secondary metabolites of some plant species with pharmacological interest under greenhouse conditions. *Affinity*, 64, 237-241.
- Schmidt S., Zietz M., Schreiner M., Rohn S., Kroh L.W., Krumbein A. (2010) Genotypic and climatic influences on the concentration and composition of flavanoids in kale (*Brassica Oleracea* var. *sabellica*). *Food Chemistry*, 119, 1293-1299.
- Soobrattee M.A., Neergheen V.S., Luximon-Ramma A., Aruoma O.I., Bahorun T. (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, 579, 200-213.
- Steed L.E., Truong V.D. (2008) Anthocyanin content, antioxidant activity, and selected physical properties of flowable purple-fleshed sweetpotato purees. *Journal of Food Science*, 73, 215-221.
- Teow C.C., Truong V.D., McFeeters R.F., Thompson R.L., Pecota K.V., Yencho G.C. (2007) Antioxidant activities, phenolic and β -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chemistry*, 103, 829-838.
- Truong V.D., McFeeters R.F., Thompson R.T., Dean L.L., Shofran B. (2007) Phenolic acid content and composition in leaves and roots of common commercial sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cultivars in the United States. *Journal of Food Science*, 72, 343-349.
- Yoshimoto M., Kurata R., Okuno S., Ishiguro K., Yamakawa O., Tsubata M., Mori S., Takagaki K. (2006) Nutritional value and physiological functions of sweetpotato leaves. *Acta Horticulturae*, 703, 107-116.
- Ukom A.N., Ojmelukwe P.C., Okpara D.A. (2009) Nutrient composition of selected sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] varieties as influenced by different levels of nitrogen fertilizer application. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8, 1791-1795.
- Winkel-Shirley B. (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 218-223.