

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za kemijo in kemijsko tehnologijo*



Gimnazija in ekonomska
srednja šola Trbovlje



RAZISKOVALNA NALOGA

Poliamini – molekule, ki podaljšujejo življenje

Biološka naloga

Avtorici:

Ilhana SMAJLOVIĆ
Elma SALIHOVIĆ

Mentorji:

Aleksander MEDVEŠ, prof. kem.
izr. prof. dr. Irena KRALJ CIGIĆ
prof. dr. Blaž CIGIĆ

Trbovlje 2021

KAZALO

KAZALO	2
KAZALO SLIK.....	3
KAZALO TABEL.....	3
KAZALO GRAFOV	3
POVZETEK	5
ABSTRACT	5
1. UVOD IN HIPOTEZE	7
2. TEORETIČNI DEL.....	8
2.1 Kaj so poliamini?	8
2.2 Struktura nekaterih poliaminov	8
2.3 Nastanek naravnih poliaminov	8
2.4 Funkcije poliaminov v človeškem telesu	9
2.4.1 Funkcije v celicah.....	9
2.4.2 Funkcije pri staranju.....	9
2.4.3 Poliamini in rak	10
2.5 Funkcije poliaminov v rastlinah	10
2.5.1 Vsebnost in aktivnost poliaminov skozi različne faze rasti	10
2.5.2 Vpliv abiotnega stresa na poliamine v rastlinah	10
2.6 Viri poliaminov	11
2.6.1 Poliamini v živilih	11
2.7 Načini določanja poliaminov	12
2.7.1 Priprava vzorcev z derivatizacijo	12
2.7.2 Potek kvantitativnega in kvalitativnega določanja poliaminov s HPLC.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DEL	14
3.1 Seznam potrebnih kemikalij in laboratorijske opreme.....	14
3.1.1 Kemikalije	14
3.1.2 Pripomočki in oprema za gojenje kalčkov in mikrozelenjave	14
3.1.3 Pripomočki in oprema za pripravo vzorcev ter izvedbo analiz	15
3.2 Gojenje kalčkov in mikrozelenjave.....	18
3.3 Določanje suhe mase	19
3.4 Priprava vzorcev semen, kalčkov in mikrozelenjave	19
3.5 HPLC analiza	20
3.5.1 Priprava standardnih raztopin poliaminov	20
3.5.2 Derivatizacija	20
3.5.3 Pogoji za HPLC analizo	21
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	21
4.1 Gojenje kalčkov in mikrozelenjave.....	22
4.1.1 Gojenje mikrozelenjave brez stresnega šoka.....	22
4.1.2 Gojenje mikrozelenjave s stresnim šokom.....	23
4.2 Kvantitativno določanje poliaminov	24
4.3 Vsebnost poliaminov v nekaljenih semenih.....	27
4.4 Vsebnost poliaminov v kalčkih in mikrozelenjavi.....	27
4.5 Vsebnost poliaminov v posameznih delih kalčkov graha in pšenice	30
4.6 Vsebnost poliaminov v mikrozelenjavi graha in pšenice po kratkotrajnem šoku.....	31
4.7 Sklepi.....	33
5. ZAKLJUČEK.....	34
6. VIRI IN LITERATURA	35
7. PRILOGE	38

KAZALO SLIK

Slika 1: Kemijska zgradba putrescina	8
Slika 2: Kemijska zgradba kadaverina	8
Slika 3: Kemijska zgradba spermidina	8
Slika 4: Kemijska zgradba spermina	8
Slika 5: Shema sintez najpogostejših naravnih poliaminov	9
Slika 6: Kalilnik	14
Slika 7: LED svetilke	14
Slika 8: Vortex oz. vrtičnik	15
Slika 9: Homogenizator	16
Slika 10: HPLC	16
Slika 11: Analizator vlage	16
Slika 12: Centrifuga	17
Slika 13: Grelni blok	17
Slika 14: Kalčki	18
Slika 15: Mikrozelenjava	19
Slika 16: Derivatizacija	21
Slika 17: Mikrozelenjava pšenice, potopljena v raztopini NaCl oz. sorbitola	24
Slika 18: Ločeni deli graha in pšenice	30

KAZALO TABEL

Tabela 1: Podatki o semenih	18
Tabela 2: Podatki o temperaturi in relativni vlažnosti na mestu gojišča boba, pšenične trave, ječmena in soje	22
Tabela 3: Podatki o temperaturi in vlažnosti na mestu gojišča gorčice, čičerike, fižola mungo in graha	23
Tabela 4: Podatki o temperaturi in vlažnosti na mestu gojišča pšenične trave	23
Tabela 5: Podatki o temperaturi in vlažnosti na mestu gojišča graha	23

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Umeritvene krivulje	25
Graf 2: Kromatogram	26
Graf 3: Vsebnost poliaminov v suhih semenih	27
Graf 4: Vsebnost spermidina v različnih fazah rasti različnih semen	28
Graf 5: Vsebnost spermina v različnih fazah rasti različnih semen	28
Graf 6: Vsebnost putrescina v različnih fazah rasti različnih semen	29
Graf 7: Vsebnost kadaverina v različnih fazah rasti različnih semen	29
Graf 8: Primerjava vsebnosti poliaminov v poganjku in endospermu kalčka graha	31
Graf 9: Primerjava vsebnosti poliaminov v poganjku in endospermu kalčka pšenice	31
Graf 10: Vpliv osmotskega in solnega stresa na vsebnost poliaminov v mikrozelenjavi graha	32
Graf 11: Vpliv osmotskega in solnega stresa na vsebnost poliaminov v mikrozelenjavi pšenice	32

ZAHVALA

Za usmerjanje, materiale in uporabo laboratorijev se zahvaljujema profesorjema dr. Ireni Kralj Cigić in dr. Blažu Cigiću ter mladi raziskovalki Tjaši Rijavec. Za vodenje, motivacijo in vse strokovne nasvete se zahvaljujema profesorju Aleksandru Medvešu. Družinama pa se zahvaljujema za moralno podporo in spodbudo.

POVZETEK

Poliamini z raznolikimi funkcijami v živih bitjih igrajo pomembno vlogo pri ohranjanju notranjega ravnovesja. Organizmi jih lahko sintetizirajo endogeno in pridobijo eksogeno s prehranjevanjem. Na živa bitja lahko vplivajo pozitivno ali negativno. Med ugodne poliamine uvrščamo spermidin in spermin, med neugodne kadaverin. Putrescin ima relativno majhen negativen vpliv.

Pomemben vir poliaminov so kalčki in mikrozeljenjava, ki jih zaradi potrebe po homeostazi v času konstantne intenzivne rasti nujno potrebujejo. Pri gojenju graha, čičerike, fižola mungo, gorčice, pšenične trave, boba, soje in ječmena sva določali vsebnost poliaminov v različnih fazah rasti. Vsebnost poliaminov sva določili s tekočinsko kromatografijo visoke zmogljivosti (HPLC). Po gojenju naštetih so bili v vseh vzorcih, v vseh fazah, prisotni putrescin, spermidin in spermin. Zelo izrazito visoke koncentracije ugodnih poliaminov je imela mikrozeljenjava graha.

Da bi preverili možnost povečanja vsebnosti ugodnih poliaminov, sva mikrozeljenjavo graha in pšenice gojili še s kratkotrajnim šokom z NaCl in s sorbitolom. Močno so se zvišale vsebnosti putrescina, ki je prekursor spermidina, spermina in kadaverina. Zato sva opazili tudi višje koncentracije spermidina in spermina. Kadaverin ni bil prisoten v visokih koncentracijah, kar potrjuje ugodno prehransko vrednost kalčkov. Na osnovi rezultatov sva ugotovili, da je gojenje kalčkov in mikrozeljenjave enostaven in cenovno dostopen način pridobivanja ugodnih poliaminov.

Ključne besede: poliamini, putrescin, spermidin, spermin, kadaverin, HPLC, kalčki, mikrozeljenjava

ABSTRACT

Due to their diverse function, polyamines play a significant role in preserving the internal balance. Organisms can endogenously synthesize them or obtain them exogenously with food. They can have a positive or a negative impact on living beings. Favourable polyamines are spermidine and spermine, cadaverine is unfavourable, and putrescine has a relatively small negative impact.

An important source of polyamines are sprouts and microgreens due to their necessity in periods of constant and intense growth. By growing peas, chickpeas, mung beans, mustard, broad beans, wheatgrass, soy, and barley we determined the polyamine content throughout different stages of growth. Content analysis was conducted with high-performance liquid chromatography (HPLC). After growing the mentioned plants, high contents of putrescine, spermidine, and spermine were found in all stages of growth. Very high contents of favourable polyamines contained pea microgreens.

To test the potential increase in the contents of beneficial polyamines, we decided on growing pea and wheat microgreens using short-term NaCl and sorbitol shock. The concentrations of putrescine greatly rose. Putrescine is spermidine, spermine and cadaverine's precursor. Hence, we found higher concentrations of favourable polyamines. Cadaverine was not present in high

concentrations, which affirms the nutritional benefit of sprouts. We found that growing sprouts and microgreens is an easy and cheap way of attaining beneficial polyamines.

Key words: polyamines, putrescine, spermidine, spermine, cadaverine, HPLC, sprouts, microgreens

1. UVOD IN HIPOTEZE

Poliamini so organske spojine z več kot dvema amino skupinama. Omogočajo prenos signalov po centralnem živčnem sistemu, zmanjšujejo koncentracijo prostih radikalov, poleg tega pa sodelujejo pri procesu avtofagije v človeških celicah in v njih zmanjšujejo koncentracijo odpadnih snovi. Kot nevrottransmiterji in antioksidanti omogočajo, ne le človeškimi, pač pa tudi rastlinskim celicam daljše življenje in ohranjanje ravnovesja ob stresu.

Na podlagi raziskav se endogena sinteza spermina in spermidina zmanjšuje s starostjo. Manjšo endogeno biosintezo lahko nadomestimo s prehranskim vnosom, kar prispeva k daljši življenjski dobi ljudi [40].

Bogat vir poliaminov so kalčki in mikrozelenjava. Le-ti namreč vsebujejo velike količine človeku koristnih poliaminov, kot so putrescin, spermidin in spermin. Z uživanjem takšne hrane bi ugodno vplivali na svoje notranje ravnovesje in prihranili celicam odvečni stres.

Cilj najine naloge je bil najti cenovno dostopen, hiter in lahko izvedljiv način pridobivanja hrane, bogate s poliamini. Kalčki in mikrozelenjava so idealen primer takšnega vira poliaminov, saj so semena cenovno dostopna, njihovo gojenje traja le nekaj dni, ni zahtevno, tako da ga lahko izvedemo doma.

Postavili sva tri hipoteze:

1. Kalčki in mikrozelenjava pšenice, graha, fižola, ječmena, gorčice, boba, čičerike in soje so vir poliaminov s pozitivnimi učinki.
2. Zaradi ohranjanja ravnovesja v času rasti so najvišje koncentracije poliaminov v fazi kalčkov oz. mikrozelenjave. Poleg tega vsebujejo poganjki kalčkov v primerjavi s semeni kalčkov zaradi intenzivnejše rasti višje koncentracije poliaminov.
3. Ker poliamini skrbijo za ravnovesje, se bo njihova vsebnost ob kratkotrajnem šoku rastline z NaCl oz. sorbitolom povečala.

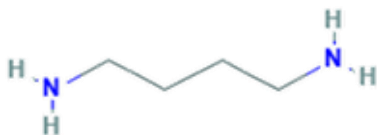
2. TEORETIČNI DEL

2.1 Kaj so poliamini?

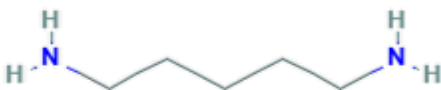
Poliamini so naravne ali sintetične organske dušikove spojine in produkti dekarboksilacije aminokislin. Najdemo jih povsod v naravi. Najpogosteje se pojavljata triamin – spermidin in tetraamin – spermin. Njun prekurzor je putrescin, ki je strukturno zelo podoben kadaverinu [1, 2].

2.2 Struktura nekaterih poliaminov

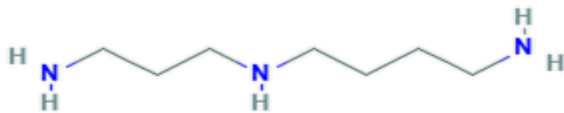
V svoji raziskovalni nalogi sva natančneje obravnavali naslednje poliamine: putrescin, spermidin, spermin in kadaverin. Njihove strukture so prikazane na slikah 1, 2, 3 in 4.



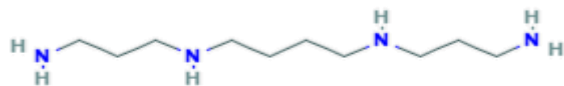
Slika 1: Kemijska zgradba putrescina



Slika 2: Kemijska zgradba kadaverina



Slika 3: Kemijska zgradba spermidina

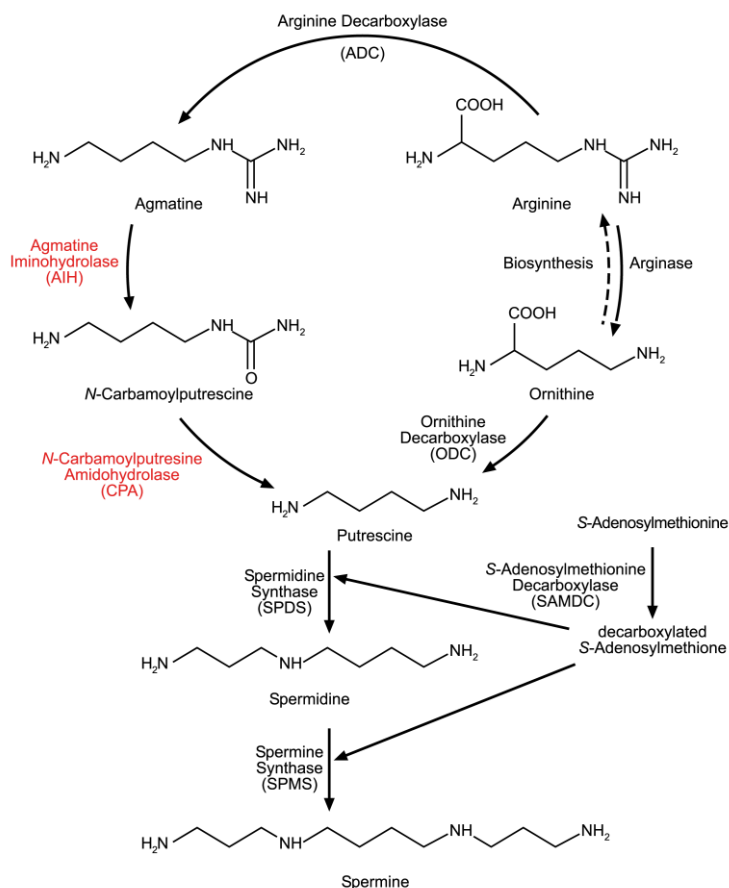


Slika 4: Kemijska zgradba spermina

2.3 Nastanek naravnih poliaminov

Spermidin in spermin, ki sta v naravi najpogostejša, nastaneta iz putrescina z dodatkom aminopropilnih skupin S-adenozil metionina. Biosinteza spermidina je katalizirana z encimom spermidin sintazo. Sinteza spermina, ki nastane iz spermidina, je katalizirana z encimom spermin sintazo.

Putrescin nastane na dva različna načina: iz arginina – po poti arginin dekarboksilaze ali ornitrina – po poti ornitrin dekarboksilaze [1, 3]. Oba načina sta prikazana na sliki 5.



Slika 5: Shema sintez najpogostejših naravnih poliaminov

Kadaverin nastane z dekarboksilacijo lizina. Ta proces je značilen za posmrtno spremembo pri živalih. Preverjanje vsebnosti kadaverina je prav zato pomembno za preverjanje kakovosti in varnosti ribjih produktov [4].

2.4 Funkcije poliaminov v človeškem telesu

2.4.1 Funkcije v celicah

Poliamini igrajo pomembno vlogo pri rasti celic in njihovem razmnoževanju, stabilizaciji negativno nabite DNA, transkripciji RNA, sintezi beljakovin, regulaciji odziva imunskega sistema, regulaciji ionskih kanalov, še posebej pri blokiranju kalijevih kanalov, in kot antioksidanti.

Njihovo antioksidativno delovanje vpliva predvsem na membranske lipide in nukleinske kisline. Najboljši antioksidant je spermin zaradi večjega števila amino skupin.

Predvideva se tudi, da lahko zmanjšajo koncentracijo prostih radikalov [6], ki so znani po tem, da zaradi svoje velike reaktivnosti povzročajo degenerativne bolezni [7].

Znano je, da v času hitre rasti celic, še posebej pri novorojenčkih, naraste potreba po poliaminih. Potreba po njih se pri človeku poveča tudi po operacijah, v času celjenja ran in pri staranju.

2.4.2 Funkcije pri staranju

V času staranja se celična vsebnost poliaminov, še posebej spermidina in spermina, in delovanje ornitrin dekarboksilaze, ki je potrebna za nastanek njunega prekursorja putrescina, zmanjša. Raziskave pravijo, da imajo osebe nad 50 let starosti manjšo vsebnost poliaminov kot

mlajše od 50 let. Primanjkljaj teh endogenih poliaminov je možno nadomestiti z uživanjem hrane, bogate s poliamini [9, 40].

Spermidin povečuje avtofagijo, ki poskrbi za izločanje poškodovanih beljakovin in organelov iz celic, ter s tem upočasnjuje staranje [6] in pojav starostnih bolezni, kot so Alzheimerjeva bolezen, Parkinsonova bolezen in sladkorna bolezen tipa 2. Pri Alzheimerjevi in Parkinsonovi bolezni so namreč odkrili, da se poveča aktivnost ornitirin dekarboksilaze, posledično se pojavi primanjkljaj poliaminov, ki bi jih bilo treba nadomestiti [9, 40].

Ena glavnih nalog poliaminov je interakcija z negativno nabitimi molekulami, kot so DNA, RNA, beljakovine in fosfolipidi. Sodelujejo pri sintezi DNA, RNA in beljakovinskih molekul ter regulirajo encimsko aktivnost. Z vsemi naštetimi procesi varujejo človekovo telo pred raznolikim stresom, ki spodbuja staranje: pred prostimi radikali, vročinskimi in psihiatričnim stresom ter UV žarki [9].

2.4.3 Poliamini in rak

Povečane vsebnosti poliaminov pri bolnikih z rakavimi obolenji so povezane z rastjo tumorja. Zaradi neravnovesja, ki nastane s povečanim delovanjem ornitirin dekarboksilaze, pride do visoke znotrajcelične vsebnosti poliaminov v rakavih celicah. Zaradi tega bi bila kontrola biosinteze poliaminov pri bolnikih z rakavimi obolenji koristna. Nasprotno od prvotne ideje večanja vsebnosti poliaminov bi v tem primeru bilo potrebno zavirati sintezo poliaminov, da bi učinkovito zmanjšali rakotvornost. Raziskave na temo reševanja tega problema se že izvajajo [6].

2.5 Funkcije poliaminov v rastlinah

Poliamini igrajo pomembno vlogo pri raznolikih procesih rasti in razvoja rastlin ter njihovih odzivih na okolje. Predvsem spermidin, spermin, kadaverin in putrescin so pomembni rastlinski poliamini. Sodelujejo pri uravnavanju različnih fizioloških procesov, npr. razvoju cvetov, embriogenezi, staranju in zorenju, organogenezi ter razvoju plodov [16].

2.5.1 Vsebnost in aktivnost poliaminov skozi različne faze rasti

Rast rastline poteka v več fazah. Začne se kot seme, ki zraste v kalček. Tej fazi sledi faza mikrozelenjave. To so mlade rastline, katerih klična lista sta razvita in razprta, opazni so tudi zametki pravih listov. Naslednja faza je odrasla rastlina, ki je zmožna dajati plodove [5].

Povečanje vsebnosti poliaminov je v literaturi omenjeno v fazi kaljenja rastlin, saj takrat rastline najbolj intenzivno rastejo. Kalitev se začne po obdobju mirovanja rastline in zanjo potrebujemo toploto, zrak in vodo. Semena ob stiku z vodo nabreknejo in encimi za razgradnjo škroba v enostavne sladkorje postanejo aktivni. Zarodek v semenu tako nadaljuje svoj razvoj. Na koncu kaljenja se koncentracija poliaminov zopet zmanjša [21].

V odraslih rastlinah je bilo ugotovljeno, da je aktivnost endogenih poliaminov največja v rastočih celicah, najnižja pa v starejših tkivih [17].

2.5.2 Vpliv abiotskega stresa na poliamine v rastlinah

Dejavniki, ki vplivajo na vsebnost poliaminov, so:

a) Temperaturni stres

V visokotemperaturnem stresu lahko poliamini spodbujajo fotosintezo in povečajo antioksidativno sposobnost ter sposobnost osmotskega prilagajanja rastlin. Če upoštevamo kombinacijo različnih raziskav, lahko ugotovimo, da se poliaminski odziv rastlin razlikuje glede na vrsto rastline [16].

b) Vodni stres

Večina raziskav o razmerju med poliamini in vodnim stresom se je osredotočila na odpornost proti suši. Spermin, spermidin in putrescin lahko uravnavajo odprtost kalijevega kanala ter velikost por v plazemski membrani zaščitnih celic. Tako uravnavajo odpiranje in zapiranje por. Na ta način lahko poliamini nadzirajo izgubo vode v rastlinah. Kombinacija različnih raziskav pa kaže, da se lahko funkcije poliaminov razlikujejo med različnimi rastlinami in celo različnimi deli iste rastline, bodisi pod osmotskim stresom bodisi vodnim stresom [16].

c) Solni stres

Visoka koncentracija soli zmanjšuje celovitost membrane, delovanje različnih encimov in slabša proces fotosinteze [16]. Eksogeni poliamini, zlasti spermin in spermidin, v raziskavah soje in sončnic so povzročili povečano presnovo reaktivnega kisika in fotosintezo, kar je izboljšalo rast rastlin ter zmanjšalo zaviralne učinke solnega stresa. Spremembe v presnovi poliaminov v stresnih pogojih (npr. sol, osmotske suše in oksidativne napetosti) so lahko del odziva rastlin na stres. Domneva se, da bi lahko poliamini prispevali k osmotski prilagoditvi in problemu presežka ionov z ohranjanjem ustreznega kationsko-anionskega ravnotežja in stabiliziranjem membran pri visoki zunanji slanosti [22].

Ker se koncentracija poliaminov znatno poveča po izpostavljenosti solnemu stresu, se domneva, da so poliamini zaščitni mehanizem rastlin pred fiziološkim stresom, zato v nekaterih primerih omogočajo toleranco proti stresu [22, 23].

Med drugimi so bile narejene tudi raziskave, ki so primerjale učinke dolgoročnega in kratkoročnega izpostavljanja solnemu stresu pri rastlinah. Potrjeno je bilo, da če je rastlina dolgo podvržena slani vodi, se vsebnost poliaminov ne bo povečala oziroma se lahko celo zmanjša, saj ta rastlina razvije sposobnost prilagoditve na tovrstne pogoje. Na višjo vsebnost poliaminov iz tega razloga bolje vpliva kratkoročna podvrženost stresu, torej stresni šok, ki zahteva takojšnjo prilagoditev rastline s pomočjo poliaminov [24].

V raziskavah s semeni pšenice, kjer so kot obliko stresa uporabili sorbitol, manitol in NaCl, so ugotovili, da različni osmoliti na presnovo poliaminov vplivajo na različne načine. Obdelava manitola in sorbitola je aktivirala presnovo poliaminov v listih, kar je povzročilo povišano količino putrescina in spermidina. Ti rezultati kažejo, da so različni osmoliti aktivirali različne presnovne procese tudi v izoosmotskem stresnem stanju in da so se te spremembe razlikovale tudi v listih in koreninah [28].

2.6 Viri poliaminov

2.6.1 Poliamini v živilih

V hrani sta spermidin in spermin najpogosteje prisotna že naravno, medtem ko se putrescin lahko pojavi zaradi fermentacije ali mikroorganizmov, ki onesnažujejo hrano. Na podlagi teh spoznanj je pomemben način shranjevanja in predelave hrane.

V eni od raziskav iz leta 2018 so Handa in sod. razvrstili različne skupine živil po njihovi vsebnosti posameznih poliaminov. Upoštevali so spermidin, spermin in putrescin. Prišli so do zaključka, da se vsebnost poliaminov razlikuje od ene skupine do druge, hkrati pa na dobljeno vsebnost vplivajo tudi različni dejavniki okolja in metode za določanje koncentracije.

a) Putrescin v živilih

Največ putrescina najdemo v rastlinski hrani in fermentiranih živilih. Hrana živalskega izvora vsebuje manj putrescina. Najdemo ga predvsem v fermentiranih salamah in klobasah, morski

hrani ter mleku. Izmed vseh živil, obravnavanih s strani Hande in sod., je imel največjo vsebnost putrescina sir Čedar – s 653 mg/kg.

b) Spermidin in spermin v živilih

Največjo vsebnost spermidina najdemo v siru, zelenjavi, stročnicah in žitih. Izstopajo zlasti pšenični kalčki in soja. Sadje ima v primerjavi zelenjavo manj spermidina. Nizke vrednosti so zabeležili predvsem v živilih živalskega izvora, z izjemo sira Čedarja in fazanovega mesa. Spermin je najmanj zastopan predstavnik poliaminov v živilih. Razen sojinih zrn, fižola, listov črnega čaja in indijskega oreščka vsa analizirana živila vsebujejo zanemarljive vrednosti spermina. [21, 41]

c) Kadaverin v živilih

Kadaverin se lahko v velikih koncentracijah akumulira v siru, ribah in ribjih izdelkih, fermentiranih klobasah ter v kislem zelju [8, 14].

2.7 Načini določanja poliaminov

Za določanje majhnih, biološko aktivnih molekul, kot so beljakovine, aminokisliline, lipidi, ogljikovi hidrati ipd., je najprimernejša tehnika določanja tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (high performance liquid chromatography – HPLC) [15, 29].

Tekočinska kromatografija je ena izmed najpogostejših separacijskih laboratorijskih kvantitativnih in kvalitativnih tehnik. Temelji na ločevanju analitov vzorca glede na njihove kemijske in fizikalne lastnosti ter posledično njihovo porazdelitvijo med mobilno in stacionarno fazo. Razlike v zadrževanju analitov na stacionarni fazi omogočajo kromatografsko ločbo in nanjo vplivajo.

Potek kromatografske metode je sestavljen iz več korakov [15, 32]:

1. priprava vzorcev: pred kromatografskim ločevanjem vzorec predhodno obdelamo, da povečamo občutljivost njihove zaznave;
2. izbira separacijskih pogojev: optimizacija vseh parametrov in komponent kromatografskega sistema (t. j. izbira najprimernejše mobilne faze, optimiziranje razmerja med topili, izbira ustrezne kolone s primerno stacionarno fazo ipd.);
3. kvantitativno določanje: izvedba raziskav s kromatografskimi standardi.

2.7.1 Priprava vzorcev z derivatizacijo

Pri določanju vsebnosti poliaminov je pomembna derivatizacija. To je tehnika, s katero kemijsko spojino pretvorimo v produkt s podobno strukturo oz. derivat. Derivatizacija daje produkte, ki se lahko analizirajo različno, tudi s HPLC, na podlagi njihovih fizikalnih razlik.

Derivatizacija poliaminov poteka preko amino skupine. Pomembna je zaradi odsotnosti kromoforov v poliaminih, ki so temelj za občutljivo zaznavanje. Derivatizirani vzorci imajo torej višjo stopnjo občutljivosti [34, 37, 38].

2.7.2 Potek kvantitativnega in kvalitativnega določanja poliaminov s HPLC

Analit s pomočjo tekoče mobilne faze potuje skozi kolono oz. stacionarno fazo. Ločitev poteka tako, da mobilna faza stalno potuje vzdolž kolone in prenese komponente vzorca, ki se porazdelijo med mobilno in stacionarno fazo. Ta porazdelitev se ponavlja vzdolž kolone, dokler se komponente ločeno ne eluirajo iz nje. Takrat jih zaznamo z detektorji, ki podajo signale v obliki kromatografskih vrhov ob različnih časih na kromatogramu. Ploščine pod kromatografskimi vrhovi so sorazmerne koncentracijam komponent v vzorcu in podajajo

kvantitativne informacije o le-teh komponentah. Glede na časovno razliko oz. retencijske čase pojavljanja kromatografskih vrhov pa kvalitativno določimo komponente vzorca [15, 29, 36].

Retencijski čas je čas, potreben, da se določena snov eluira skozi kolono. Konstanten je za vsako spojino pri določenih kromatografskih pogojih, ki smo jih določili v drugem koraku kromatografske metode. Na osnovi primerjanja časov pojavljanja kromatografskih vrhov in retencijskih časov znanih spojin ugotavljamo kvalitativno sestavo vzorca. V najini raziskovalni nalogi sva s pomočjo znanih retencijskih časov, ki sva jih dobili s pripravo standardnih raztopin poliaminov, določali vrste in koncentracije poliaminov v vzorcih [36].

3. EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 Seznam potrebnih kemikalij in laboratorijske opreme

3.1.1 Kemikalije

Uporabili sva naslednje kemikalije:

- 2 M raztopina NaOH,
- nasičena raztopina NaHCO₃,
- 0,4 M HCl,
- 10 mg/mL raztopina DNS-Cl (dansil klorid) v acetonu,
- 25 % raztopina NH₃,
- aceton,
- cetonitril,
- 1,7-diaminoheptan kot interni standard,
- NaCl,
- sorbitol – C₆H₁₄O₆.

3.1.2 Pripomočki in oprema za gojenje kalčkov in mikrozelenjave

Uporabili sva naslednje pripomočke in opremo:

- kalilniki (slika 6),
- svetilke LED (slika 7),
- hidro-termometer,
- kamena volna.



Slika 6: Kalilnik



Slika 7: Svetilke LED

3.1.3 Pripomočki in oprema za pripravo vzorcev ter izvedbo analiz

Uporabili sva naslednje pripomočke in opremo:

- 5 mL pipeta,
- 1000 μ L pipeta,
- 200 μ L pipeta,
- epruvete,
- 2 L buča,
- 15 mL plastične mikrocentrifugirke,
- 50 mL centrifugirke,
- viala,
- kavni mlinček,
- terilnica,
- tehtnica,
- vortex oz. vrtilnik (slika 8),
- homogenizator (slika 9),
- HPLC (slika 10),
- analizator vlage (slika 11),
- centrifuga (slika 12),
- grelni blok (slika 13).



Slika 8: Vortex oz. vrtilnik



Slika 9: Homogenizator



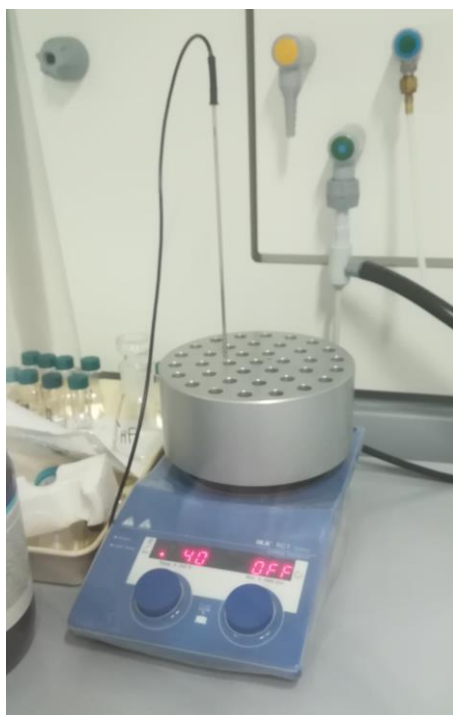
Slika 10: HPLC



Slika 11: Analizator vlage



Slika 12: Centrifuga



Slika 13: Grelni blok

3.2 Gojenje kalčkov in mikrozelenjave

Za gojenje kalčkov in mikrozelenjave sva uporabili semena, opisana v tabeli 1.

Tabela 1: Podatki o semenih

Vrsta	Proizvajalec
Gorčica	Eu, Amarant Kooperativa, D. O. O.
Čičerika	Eu, Amarant Kooperativa, D. O. O.
Fižol Mungo	Eu, Amarant Kooperativa, D. O. O.
Grah	Eu, Amarant Kooperativa, D. O. O.
Bob	Pro.S.O.L
Pšenična Trava	Eu, Amarant Kooperativa, D. O. O.
Ječmen	Hyvido
Soja	Rapunzel

Kalčke sva gojili pet dni. Prvi dan sva semena namakali približno 6 ur v vodovodni vodi na sobni temperaturi. Po nabrekanju sva jih skupaj z vodo izlili v kalilnike, kjer so se neenakomerno razporedili, zato sva jih še enkrat sprali z vodo enake temperature in s tem zagotovili, da so enakomerno razporejena in se ne prekrivajo. Zvečer sva jih ponovno namočili. V vsakem kalilniku so bile ločene vrste semen. Kalilnike sva naložili drug na drugega in jih pustili na sobni temperaturi. Nisva jih posebej osvetljevali (slika 14).

Trikrat dnevno (s 6-urnimi razmiki; okoli 8., 14. in 22. ure) sva jih naslednje štiri dni izpirali z vodovodno vodo, katero sva prej natočili in pustili v plastenki poleg kalčkov, da se je prilagodila temperaturi le-teh. Vodo sva v vsak kalilnik nalili do 2/3 višine do roba in pustili, da je voda pretekla preko odprtine na dnu. Ko je voda odtekla, sva kalilnike ponovno naložili enega na drugega.



Slika 14: Kalčki

Mikrozelenjava sva gojili na dva načina. Pri prvem načinu sva uporabili samo vodo, ker je predstavljalo običajno gojenje (slika 15). Pri drugem načinu sva vodi dodali NaCl ali sorbitol, kar je predstavljalo gojenje pod stresnim šokom.

Za gojenje s kratkotrajnim šokom sva pripravili vodni raztopini NaCl in sorbitola.

a) 100 mmol NaCl

$$M = N_{ArNa} + N_{ArCl} = 22,99 \text{ g/mol} + 35,453 \text{ g/mol} = 58,443 \text{ g/mol}$$

$$n = cV = 0,1 \text{ mol/L} \times 1 \text{ L} = 0,1 \text{ mol}$$

$$m = nM = 0,1 \text{ mol} \times 58,443 \text{ g/mol} = 5,8443 \text{ g}$$

b) 200 mmol sorbitol

$$M = N_{ArC} + N_{ArH} + N_{ArO} = 6 \times 12,011 \text{ g/mol} + 14 \times 1,008 \text{ g/mol} + 6 \times 16 \text{ g/mol} =$$

$$= 182,178 \text{ g/mol}$$

$$n = cV = 0,2 \text{ mol/L} \times 1 \text{ L} = 0,2 \text{ mol}$$

$$m = nM = 0,2 \text{ mol} \times 182,178 \text{ g/mol} = 36,4356 \text{ g}$$



Slika 15: Mikrozelenjava

3.3 Določanje suhe mase

Del stehtanih in narezanih kalčkov oziroma mikrozelenjave sva namestili v analizator vlage. Kalčke sva v analizatorju vlage sušili na 200 °C, in sicer 3 minute, nato pa na 145 °C vse do konstantne teže suhe mase oz. popolne izgube vode. Mikrozelenjavo sva sušili na 180 °C, 3 minute, nato pa na 130 °C do konstantne teže suhe mase.

3.4 Priprava vzorcev semen, kalčkov in mikrozelenjave

Za kvantitativno določitev poliaminov je potrebna predhodna priprava posameznih delov rastlin. Tako sva ločeno pripravili raztopine iz semen, kalčkov in mikrozelenjave.

Semena sva najprej strli v terilnici, jih zmleli v kavnem mlinčku in stehtali do 1,5 g. Tako pripravljenim vzorcem semen sva dodali 10 mL 0,4 M HCl z internim standardom, ki je bil pri 1,7-diaminoheptan. Raztopine vzorcev sva nato z vrtničnikom zmešali dvakrat po 30 sekund na 8000-8500 rpm, vmes pa 30 s ročno mešali. Homogenizirane raztopine vzorcev v 50 mL centrifugirkah sva centrifugirali še 5 minut pri 800 obratih.

Prišlo je do ločbe na tri plasti: na dnu so bili koščki, na vrhu lipidi, srednja plast pa raztopina s HCl. Z 1 mL pipeto sva (dvakrat po 600 mL) odvzeli 1,2 mL srednje plasti (motne raztopine)

v dve različni mikrocentrifugirki in jih centrifugirali pri 10 000 obratih 5 minut. Za to sva morali dodati v napravo še mikrocentrifugirke z vodo, ki sva jih prej stehtali, da bi bila teža mikrocentrifugirk enakomerno porazdeljena. Nato sva iz srednje plasti vsake mikrocentrifugirke odvzeli najprej 250 μL za analizo oz. derivatizacijo, preostalo prosojno srednjo plast iz obeh centrifugirk (vsaj 800 μL) pa shranili v tretjo mikrocentrifugirko in zamrznili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, v primeru, da bi jih kasneje še potrebovali.

Kalčke sva sesekljali in del spet shranili za določanje suhega deleža, del za homogenizacijo pa natehtali do 0,5 g. Homogenizirali sva jih na enak način kot mikrozelenjavo. Pri kalčkih pšenične trave in graha sva, drugače kot pri ostalih kalčkih, ločili semena in poganjke kalčka. Homogenizacija se ni razlikovala od homogenizacije ostalih kalčkov.

Mikrozelenjavo, ki sva jo gojili prvič, sva homogenizirali tako, da sva najprej odstrigli zgornji, zeleni del mikrozelenjave. Del sva nato sesekljali na čim manjše delce in jih zatehtali do 1,0 g, del pa sva pustili za kasnejšo meritev suhega deleža in računanje suhe mase. Zatehtani mikrozelenjavi sva dodali 10 mL 0,4 M HCl z internim standardom. Nato sva jo v homogenizatorju pod tlakom v intervalih 30 s dvakrat na 8000-8500 rpm homogenizirali, vmes 30 s čakali. Potem sva jo mešali tudi na vrtničniku dvakrat 30 sekund, vmes pa 30 s ročno mešali. Mikrozelenjavo, ki sva jo gojili drugič, z in brez stresnega šoka, sva homogenizirali drugače. Na homogenizatorju sva jo homogenizirali 60 s, na vrtničniku mešali 30 s in spet homogenizirali 60 s. Prav tako sva pri homogenizaciji uporabili le 5 mL HCl, saj je prej, pri 10 mL, mikrozelenjava plavala. Ker nisva vzgojili dovolj mikrozelenjave graha s stresnim šokom, sva za homogenizacijo le-te zatehtali le 0,3 g.

3.5 HPLC analiza

3.5.1 Priprava standardnih raztopin poliaminov

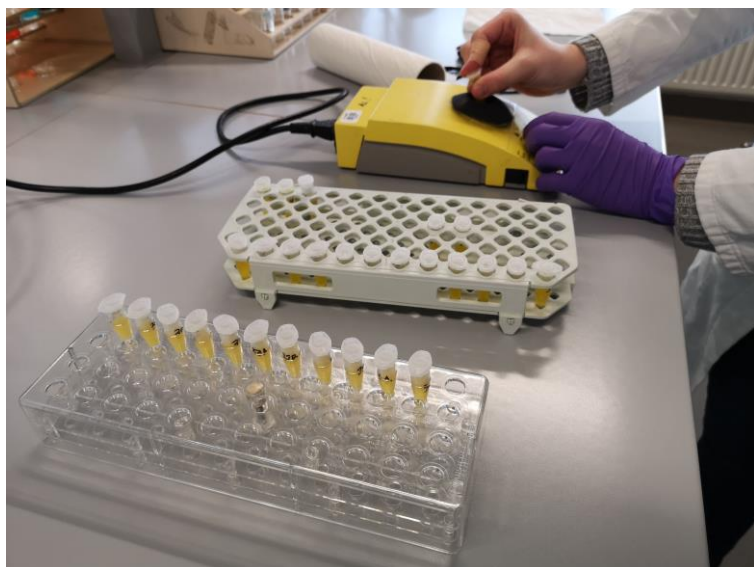
Iz osnovnih standardnih raztopin posameznih aminov PUT, CAD, SPD in SPM sva pripravili mešane standardne raztopine za kasnejšo izdelavo umeritvenih krivulj poliaminov. Z razredčevanjem s 0,4 M HCl z internim standardom (IS) sva pripravili naslednje mešane standardne raztopine:

- 50 mg/L: odpipetirali sva 2 x 500 μL 1 mg/mL raztopine in dodali 9,0 mL 0,4 M HCl z IS,
- 25 mg/L: odpipetirali sva 2 x 250 μL 1 mg/mL raztopine in dodali 9,5 mL 0,4 M HCl z IS,
- 10 mg/L: odpipetirali sva 2 x 100 μL 1 mg/mL raztopine in dodali 9,8 mL 0,4 M HCl z IS,
- 5 mg/L: odpipetirali sva 1 mL 50 mg/mL – mešane standardne raztopine in dodali 9,0 mL 0,4 M HCl z IS,
- 1 mg/L: odpipetirali sva 1 mL 10 mg/mL – mešane standardne raztopine in dodali 9,0 mL 0,4 M HCl z IS.

3.5.2 Derivatizacija

Derivatizacija je pri raztopinah vzorcev in pri standardnih raztopinah potekala enako. Za derivatizacijo sva v 1,5 mL plastično mikrocentrifugirko z avtomatsko batno pipeto odmerili 250 μL vzorcev in jim dodali 50 μL 2 M NaOH in 75 μL nasičene raztopine NaHCO_3 ter premešali na vrtničniku. Nato sva v raztopino dodali 500 μL 10 mg/mL raztopine DNS-Cl, zopet premešali (slika 16) in za 60 min pustili na $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ v grelnem bloku. V tem času je raztopina iz živo rumene barve bledela in se skoraj popolnoma razbarvala. Po 60 min sva reakcijo ustavili z dodatkom 25 μL 25% raztopine amonijaka in pustili na sobni temperaturi za 30 min. Nato sva mikrocentrifugirke dopolnili s 350 μL acetonitrila do skupnega volumna 1,25 mL. Raztopino

sva prenesli čez 0,45 µm filter v vialo. Viala sva nato postavili v avtomatski injektor HPLC inštrumenta.



Slika 16: Derivatizacija

3.5.3 Pogoji za HPLC analizo

Kolona: Kinetex XB-C18 (5 µm, 100 Å, 150 x 4,6 mm)

Gradientna elucija z mobilno fazo iz MQ vode in acetonitrila (topila in voda so bila primerne čistosti za HPLC)

Čas [min]	Acetonitril [%]	MQ voda [%]
0	40	60
25	80	20
30	100	0
35	100	0
40	40	60

Pretok mobilne faze: 0,7 mL/min

Detektorja:

UV/Vis detektor pri 254 nm in

fluorescentni detektor z $\lambda(\text{vzbujanja}) = 350 \text{ nm}$ in $\lambda(\text{emisije}) = 520 \text{ nm}$

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Cilj najine raziskovalne naloge je bil najti cenovno dostopen, hiter in enostaven način pridobivanja hrane, bogate s poliamini. Na podlagi literaturnega pregleda sva prišli do zaključka, da so kalčki in mikrozelenjava bogat vir poliaminov. Vzgoji jih lahko vsak doma, saj je njihovo gojenje zelo enostavno in poceni. Raziskovali sva na osmih vrstah semen: gorčica, čičerika, fižol mungo, grah, bob, pšenična trava, ječmen in soja. Vsebnost poliaminov putrescina, spermina, spermidina in kadaverina sva določali z analizo HPLC.

Pri raziskovalnem delu najine raziskovalne naloge je sodelovala Biotehniška fakulteta (BF) in Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo (FKKT) Univerze v Ljubljani. Delo je potekalo pri naju doma in v laboratorijih FKKT.

4.1 Gojenje kalčkov in mikrozelenjave

Za določanje vsebnosti poliaminov sva želeli pripraviti tri različne faze rasti gorčice, fižola mungo, graha, pšenične trave, ječmena, čičerike, boba in soje:

1. faza semena,
2. faza kalčkov,
3. faza mikrozelenjave.

Zaradi neuspešnega gojenja čičerike, boba in soje sva za analizo teh pripravili le prvo in tretjo fazo rasti čičerike ter le prvo fazo rasti boba.

Ker se iz semen gorčice pri namakanju izločijo polisaharidi, to predstavlja problem za kaljenje v kalilniku. Iz tega razloga zahteva drugačen način gojenja. Plastičen krožnik sva obložili s filter papirjem in nanj enakomerno razporedili suha semena gorčice. Nato sva z razpršilko z vodo semena dobro poškropili, da so se semena in papir dobro napojila. Prvih 10 ur sva škropili vsaki 2 uri, nato pa sva interval škropljenja prilagodili tistemu za ostale kalčke. Z drugim plastičnim krožnikom sva pokrili prvega in tako skrbeli za ohranjanje vlage.

Mikrozelenjavo sva gojili na dva načina. Pri prvem načinu sva uporabili samo vodo, ker je predstavljalo običajno gojenje. Pri drugem načinu sva vodi dodali NaCl ali sorbitol, kar je predstavljalo gojenje pod stresnim šokom.

4.1.1 Gojenje mikrozelenjave brez stresnega šoka

Vsaka od naju je doma 13 dni gojila po štiri vrste semen. Večer, pred začetkom gojenja, sva namočili eno jedilno žlico vsake vrste semen v trikrat več vode in jih pustili, da se čez noč namakajo.

Naslednje jutro sva semena vzeli iz vode, jih položili na kameno volno pod luči LED in jih ponovno poškropili z vodo. Vsak dan sva zjutraj in zvečer semena poškropili z vodo in s hidrotmometra odčitali temperaturo ter relativno vlažnost zraka na mestu gojenja (tabela 2 in 3). Ker sva gojili na dveh različnih gojiščih, so se vrednosti temperatur in relativne vlažnosti nekoliko razlikovale.

Tabela 2: Podatki o temperaturi in relativni vlažnosti na mestu gojišča boba, pšenične trave, ječmena in soje

DATUM	Temperatura [°C]	Relativna vlažnost [RH %]
16. 10. 2019	21,9	71
17. 10. 2019	22,0	72
18. 10. 2019	21,5	68
19. 10. 2019	22,2	72
20. 10. 2019	22,2	73
21. 10. 2019	22,5	71
22. 10. 2019	22,2	70
23. 10. 2019	20,7	66
24. 10. 2019	21,5	67
25. 10. 2019	20,0	55

26. 10. 2019	20,5	67
27. 10. 2019	19,9	62
28. 10. 2019	20,7	69

Tabela 3: Podatki o temperaturi in vlažnosti na mestu gojišča gorčice, čičerike, fižola mungo in graha

DATUM	Temperatura [°C]	Relativna vlažnost [RH %]
16. 10. 2019	21,0	72
17. 10. 2019	22,4	72
18. 10. 2019	23,1	72
19. 10. 2019	22,2	74
20. 10. 2019	23,0	70
21. 10. 2019	23,4	68
22. 10. 2019	24,0	76
23. 10. 2019	23,9	67
24. 10. 2019	23,8	69
25. 10. 2019	23,8	73
26. 10. 2019	24,2	72
27. 10. 2019	23,9	71
28. 10. 2019	22,5	72

4.1.2 Gojenje mikrozelenjave s stresnim šokom

V literaturi sva opazili, da spremenjeni pogoji gojenja lahko povečajo vsebnost poliaminov v mikrozelenjavi. Po tem postopku sva gojili le grah in pšenico, saj se na podlagi rezultatov prvega gojenja pri teh pojavijo največje vsebnosti zelenih poliaminov. Odločili sva se, da bova izkoristili osmotski stres. Ob takšnem stresu namreč nastane več poliaminov, s katerim želijo rastline vzpostaviti ravnovesje. Rastline sva šokirali najprej z raztopino 100 mmol NaCl oz. 200 mmol sorbitola, razredčene z enako količino vode (1 : 1), naslednji dan z isto raztopino brez razredčitve. Glede na to, da ima NaCl dva iona (Na^+ in Cl^-), je osmolarnost 100 mmol raztopine NaCl enaka osmolarnosti 200 mmol sorbitola.

To gojenje je trajalo 9 dni. Doma sva si postavili dve luči LED in hidro-termometer na mestu, kjer sva gojili semena. Podatki izmerjenih količin s hidro-termometra so zapisani v tabeli 4 in 5.

Tabela 4: Podatki o temperaturi in vlažnosti na mestu gojišča pšenične trave

DATUM	Temperatura [°C]	Relativna vlažnost [RH %]
20. 1. 2020	21,6	73
21. 1. 2020	20,4	77
22. 1. 2020	21,7	70
23. 1. 2020	20,8	72
24. 1. 2020	20,9	76
25. 1. 2020	21,4	75
26. 1. 2020	21,4	74
27. 1. 2020	21,7	82
28. 1. 2020	21,5	74

Tabela 5: Podatki o temperaturi in vlažnosti na mestu gojišča graha

DATUM	Temperatura [°C]	Relativna vlažnost [RH %]
20. 1. 2020	24,0	51
21. 1. 2020	23,9	57
22. 1. 2020	23,6	56
23. 1. 2020	24,5	54
24. 1. 2020	22,9	52
25. 1. 2020	22,5	56
26. 1. 2020	23,5	61
27. 1. 2020	24,2	62

28. 1. 2020	24,4	58
29. 1. 2020	24,2	60

Do šestega dneva sva gojili mikrozelenjavo na enak način, kot pri prvem gojenju. Šesti dan, zvečer, sva namočili mikrozelenjavo v 1,5 L 1 : 1 razredčenih vodnih raztopin NaCl oziroma sorbitola, kot prikazuje slika 17.



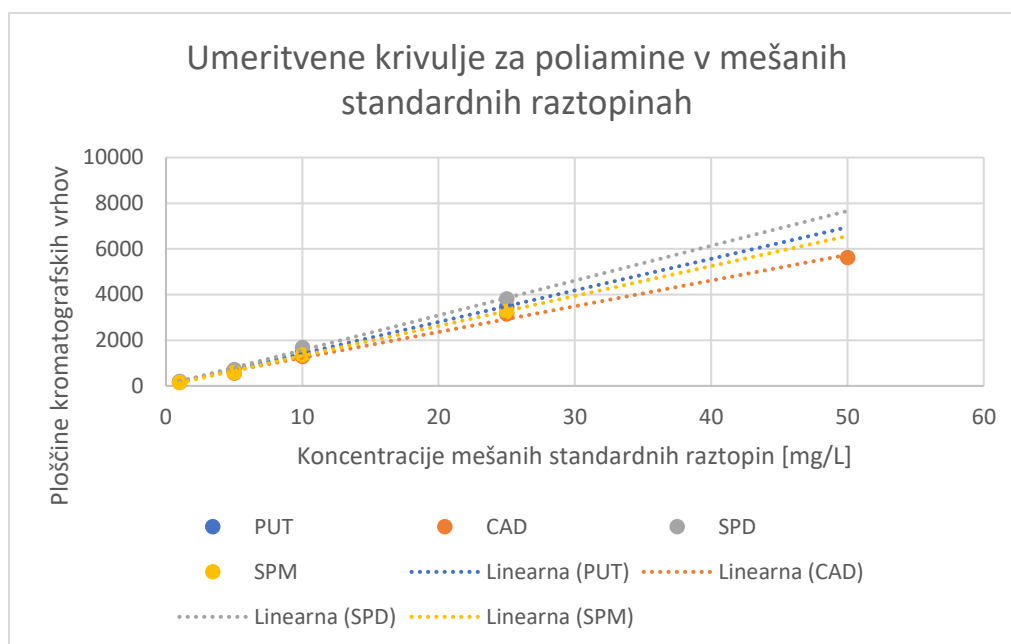
Slika 17: Mikrozelenjava pšenice, potopljena v raztopini NaCl oz. sorbitola

V teh raztopinah sva pustili mikrozelenjavo do naslednjega večera, ko sva jo potopili v isto količino nerazredčenih raztopin. Sedmi dan zvečer sva vzeli mikrozelenjavo iz raztopin in vsak pladenjček posebej stehali. To sva naredili, da bi lahko vsak dan dodajali vodo do stehane mase, saj je voda stalno izhlapevala, topljenec (NaCl ali sorbitol) pa je ostajal v kamenu volni, na kateri sva gojili mikrozelenjavo.

Rezultati vsebnosti poliaminov v mikrozelenjavi pri gojenju s stresnim šokom so opisani v poglavju 4.9.

4.2 Kvantitativno določanje poliaminov

Najprej sva s pomočjo kromatogramov mešanih standardnih raztopin izdelali umeritvene premice (graf 1) ter določili retencijske čase posameznih poliaminov. Prav tako sva na podlagi kromatogramov mešanic standardnih raztopin izračunali povprečno vrednost internega standarda. To je spojina, ki sva jo dodali v vsako mešanico standardnih raztopin, da nama je kasneje s svojim retencijskim časom olajšala kvalitativno določanje kromatografskih vrhov poliaminov. Z odstopanjem vrednosti internega standarda vseh kasnejših vzorcev od izračunanega povprečja vrednosti internega standarda v mešanih standardnih raztopinah sva korigirali koncentracije poliaminov v kasnejših vzorcih.



Graf 1: Umeritvene krivulje

Najprej sva izračunali masno koncentracijo posameznih aminov v vseh vzorcih po naslednji formuli:

$$\gamma = \frac{A}{k}$$

pri čemer je γ masna koncentracija, A ploščina kromatografskega vrha in k naklon umeritvene krivulje.

Za računanje mase poliaminov s pomočjo masne koncentracije sva potrebovali prostornino vzorcev. Prostornino sva izračunali po naslednji formuli:

$$V = V_{HCl} \times m_V$$

pri čemer je V_{HCl} prostornina HCl z internim standardom, katero sva pri pripravi vzorcev na analizo uporabili za razredčevanje, in m_V zatehtana masa vzorcev.

Maso posameznih poliaminov v vzorcih sva izračunali po naslednji formuli:

$$m_p = m_V \times V$$

Ker kalčki in mikrozelenjava vsebujejo veliko količino vode, sva za kasnejšo primerjavo vsebnosti poliaminov potrebovali suho snov posameznih delov rastlin.

Za merjenje suhega deleža graha, gojenega s stresnim šokom, nisva imeli dovolj vzgojenega letega, zato sva za računanje koncentracije poliaminov v suhi masi prevzeli podatke iz prvega gojenja.

Vsebnosti poliaminov sva preračunali na suho snov posameznih delov rastlin po naslednji formuli:

$$m_s = m_V \times W_s$$

pri čemer je m_s suha masa, m_V zatehtana masa vzorca in W_s suhi delež, podan z analizatorjem vlage.

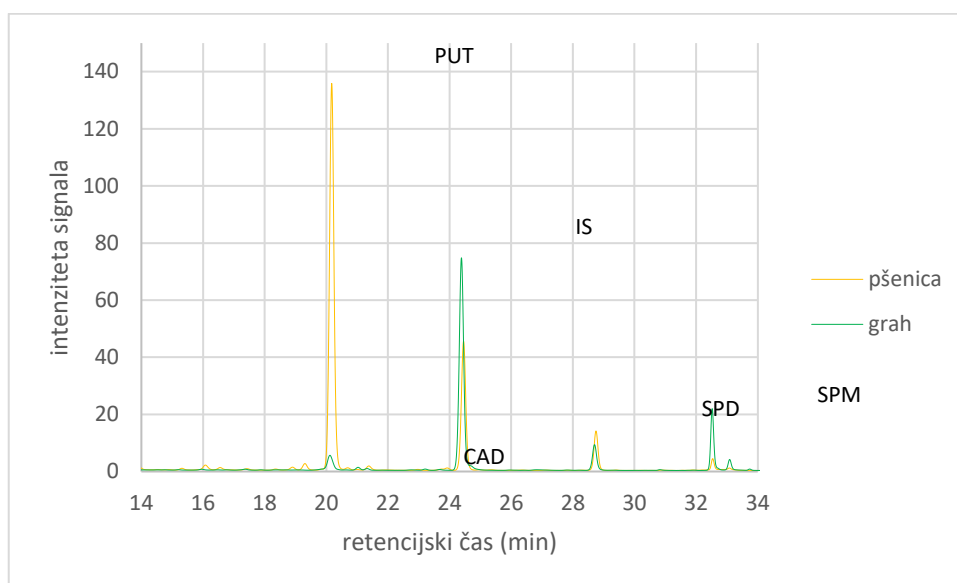
Končni delež poliaminov v enem kilogramu vzorca sva izračunali po naslednji formuli:

$$W = \frac{m_p}{m_s}$$

Ker sva vse vzorce analizirali v dveh paralelkah, sva na koncu izračunali še povprečje deležev poliaminov na podlagi obeh paralelek vsakega vzorca.

Za analiziranje vzorcev drugega gojenja mikrozeljenjave sva izdelali nove mešanice standardnih raztopin, izračunali novo povprečje vrednosti internega standarda in izdelali nove umeritvene krivulje. Prav tako sva pri analiziranju rezultatov vzorcev drugega gojenja vse vrednosti poliaminov v vseh vzorcih korigirali s pomočjo odstopanj vrednosti internega standarda v vzorcih od povprečja vrednosti internega standarda mešanih standardnih raztopin.

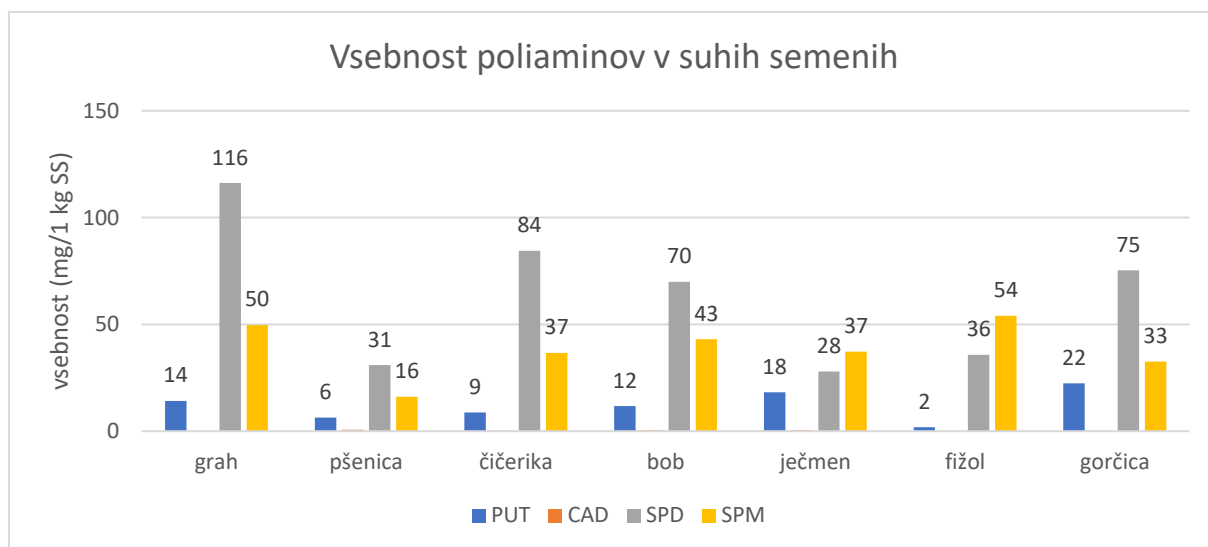
Primer kromatogramov, iz katerih sva odčitavali ploščine kromatografskih vrhov, po injiciranju raztopin realnih vzorcev, sta na grafu 2.



Graf 2: Kromatogram

Graf 2: Kromatograma po injiciranju raztopin vzorcev graha in pšenice. Označeni so kromatografski vrhovi za poliamine: putrescin (PUT), kadaverin (CAD), spermin (SPD) in spermidin (SPM) ter interni standard (IS).

4.3 Vsebnost poliaminov v nekaljenih semenih

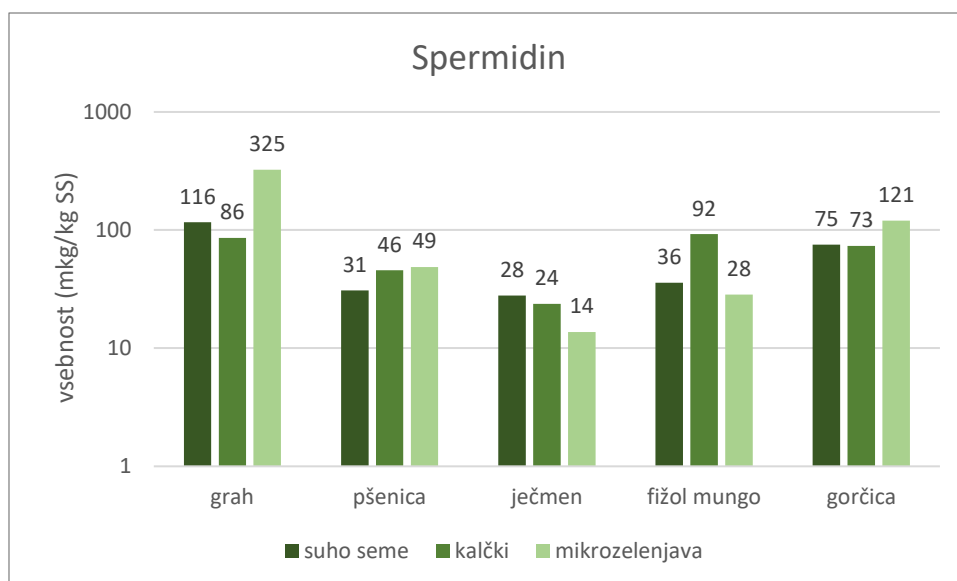


Graf 3: Vsebnost poliaminov v suhih semenih

Največ spermina in spermidina so vsebovala semena graha. Semena gorčice so vsebovala veliko količino spermidina, semena fižola mungo pa spermina. Manjšo količino teh dveh poliaminov smo zaznali v pšenici in ječmenu. Kadaverin se ni pojavljal v nobeni vrsti semen, putrescin pa zgolj v manjših količinah. Največ ga je bilo v semenih gorčice in ječmena, najmanj v semenih fižola mungo. Opaženo se le delno sklada z literaturo, v kateri lahko zasledimo, da je v stročnicah in žitu veliko spermidina. V grahu ga je namreč zelo veliko, v fižolu mungo, ječmenu in pšenici se pojavi v manjših količinah. V skladu z literaturo fižol mungo vsebuje največ spermina izmed navedenih vrst semen. Ker je neugodnih poliaminov, torej putrescina in kadaverina, manj oz. jih ni, je vsebnost poliaminov ugodna (graf 3).

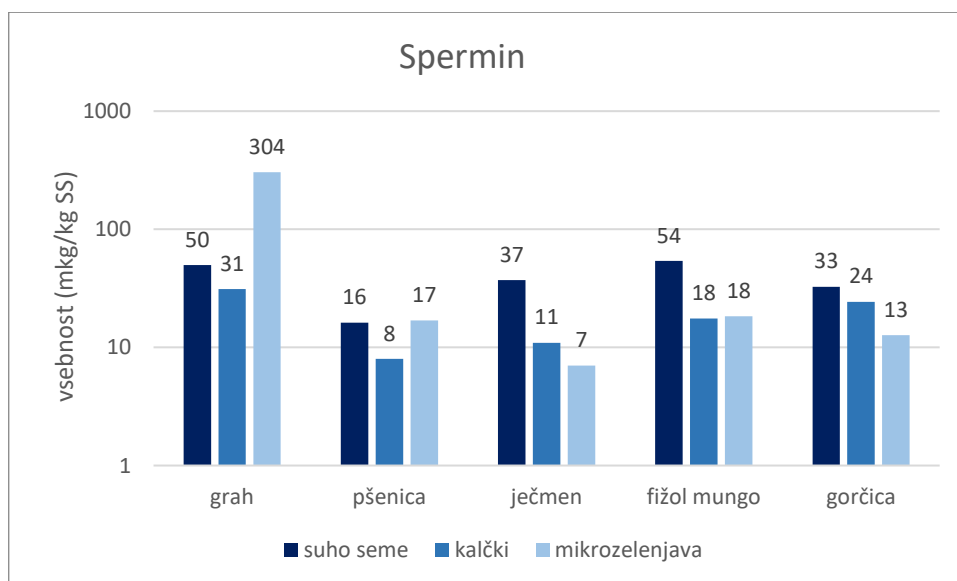
4.4 Vsebnost poliaminov v kalčkih in mikrozelenjavi

Rezultati prejšnjih raziskav, omenjenih v literaturi, kažejo, da se vsebnost in razmerja poliaminov spreminjajo glede na fazo rasti rastline. V času najintenzivnejše rasti naj bi bile v rastlinah največje vsebnosti poliaminov, zato sva se odločili, da bova analizirali in primerjali vsebnost poliaminov v mikrozelenjavi ter kalčkih.



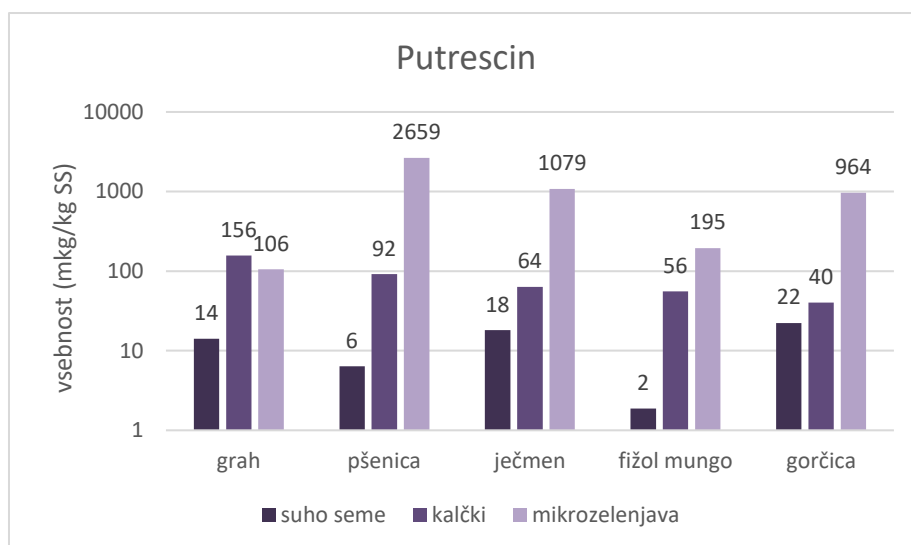
Graf 4: Vsebnost spermidina v različnih fazah rasti različnih semen

Ugotovili sva, da je v mikrozelenjavi graha, pšenice in gorčice spermidina več kot v kalčkih. Nasprotno, ječmen in fižol mungo vsebujeta več spermidina v fazi kalčka. Ječmen ima manjše količine spermidina v vseh fazah v primerjavi z drugimi vrstami rastlin. Iz rezultatov je razvidno, da je mikrozelenjava graha najbolj bogata s spermidinom; razlika med kalčki in mikrozelenjavo je tudi znatno višja kot pri drugih rastlinah (graf 4).



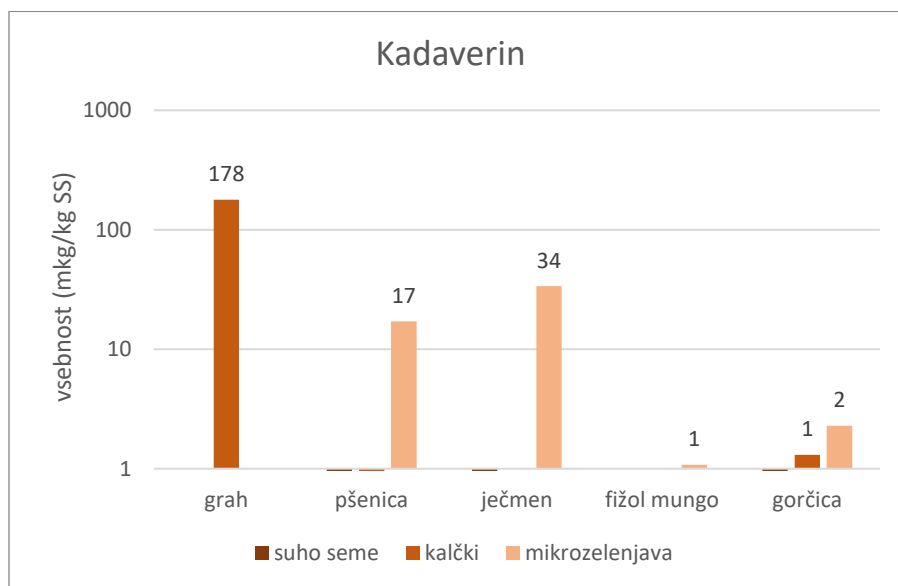
Graf 5: Vsebnost spermina v različnih fazah rasti različnih semen

Največ spermina je v mikrozelenjavi graha, v ostalih rastlinah se v vseh fazah pojavlja v manjših količinah. Razmerje med vsebnostjo spermina v kalčkih in mikrozelenjavi iste vrste se spreminjajo. Pri grahu in pšenici se z rastjo mikrozelenjave vsebnost spermina večja, pri gorčici in ječmenu pa manjša. Pri fižolu mungo ostaja vsebnost spermina v obeh fazah nespremenjena (graf 5).



Graf 6: Vsebnost putrescina v različnih fazah rasti različnih semen

Daleč največjo količino putrescina vsebuje mikrozelenjava pšenice, sledita ji mikrozelenjava ječmena in gorčice. Pri vseh rastlinah, razen pri grahu, je vsebnost putrescina največja v fazi mikrozelenjave. Rezultati torej kažejo na višjo stopnjo tvorbe putrescina v rastoči mikrozelenjavi. Najmanj putrescina imajo kalčki gorčice. Putrescin je eden slabših poliaminov, zato tako visoki rezultati niso idealni. Kalčki so iz tega vidika ugodnejši za prehrano (graf 6).



Graf 7: Vsebnost kadaverina v različnih fazah rasti različnih semen

Kadaverin se je v vseh rastlinah pojavljal v zelo majhnih količinah ali pa sploh ni bil zaznan. Pojavil se je v kalčkih graha, mikrozelenjavi pšenice, ječmena in nekoliko v mikrozelenjavi gorčice. Izstopa grah, ki ga ima največ v fazi kalčka. Tudi kadaverin je eden neugodnih poliaminov, vendar se ne pojavlja v velikih količinah. Za prehrano so ugodnejši vsi kalčki, razen graha, saj ga vsebujejo malo oz. ga sploh ne (graf 7).

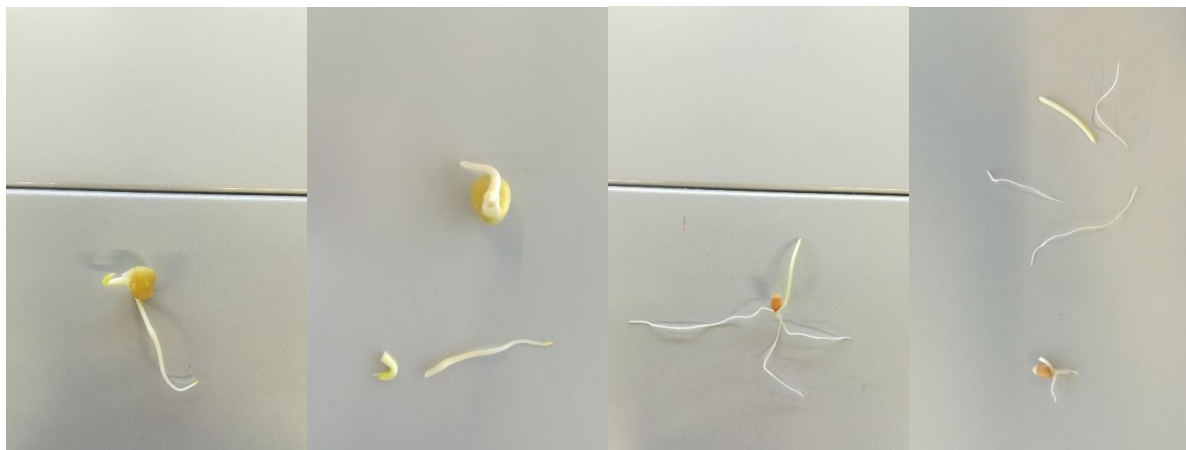
Na podlagi rezultatov analize je za prehrano najbolj ugodna mikrozelenjava graha, ki vsebuje veliko spermina in spermidina ter malo putrescina in kadaverina. Vsebnost ugodnih poliaminov v pšenici se, glede na faze rastline, ne razlikuje v veliki meri, vsebuje pa njena mikrozelenjava,

poleg velikih količin spermidina in putrescina, tudi veliko neugodnih poliaminov v primerjavi z ostalimi rastlinami; še posebej izstopa vsebnost putrescina. Pri ječmenu se zgodi podobno: spermina in spermidina je še manj kot pri pšenici, vsebnost putrescina in kadaverina je večja v primerjavi z ostalimi rastlinami. Mikrozeljenjava fižola mungo vsebuje nekaj spermidina in spermina, v primerjavi z ostalimi fazami izstopa po vsebnosti putrescina.

Za grah je mikrozeljenjava najugodnejša, saj vsebuje več ugodnih poliaminov in manj neugodnih poliaminov v primerjavi s kalčki graha. Mikrozeljenjava pšenice sicer vsebuje nekoliko več spermina in spermidina kot kalčki pšenice, vendar je v tej fazi moč zaznati veliko večje povečanje putrescina in kadaverina, zato je, kljub vsebnosti ugodnih poliaminov, mikrozeljenjava pšenice manj ugodna. Ugodnejši so kalčki pšenice, ki po vsebnosti ugodnih poliaminov ne zaostajajo tako zelo za mikrozeljenjavo, vsebujejo pa bistveno manj neugodnih poliaminov. Pri ječmenu je ugodnejša faza kalčkov, kjer zaznamo nekoliko več dobrih poliaminov, a bistveno manj slabih poliaminov v primerjavi z mikrozeljenjavo ječmena. Tudi za fižol mungo je značilno, da so kalčki nekoliko bolj ugodni za prehrano. Vsebujejo večje količine spermidina, enako količino spermina in veliko manj putrescina kot mikrozeljenjava. Kalčki in mikrozeljenjava gorčice sta si po razmerju dobrih poliaminov podobni, vendar večja vsebnost putrescina v mikrozeljenjavi kaže na večjo prednost kalčkov. Faza kalčkov je torej ugodnejša pri vseh rastlinah, razen pri grahu.

4.5 Vsebnost poliaminov v posameznih delih kalčkov graha in pšenice

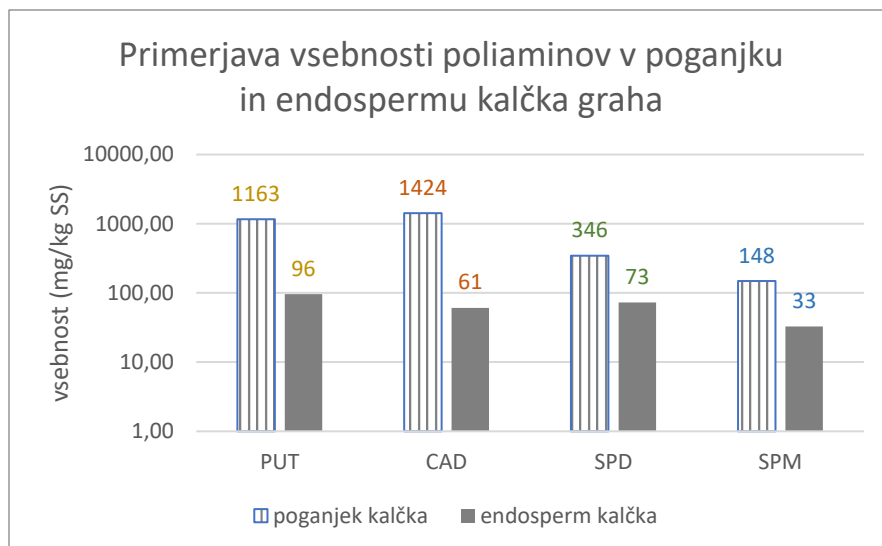
Kalčke pšenice in graha sva razdelili na posamezne dele in jih ločeno analizirali (slika 18). Tako sva želeli potrditi hipotezo, da je v delih rastlin, kjer je intenzivna rast, največ poliaminov.



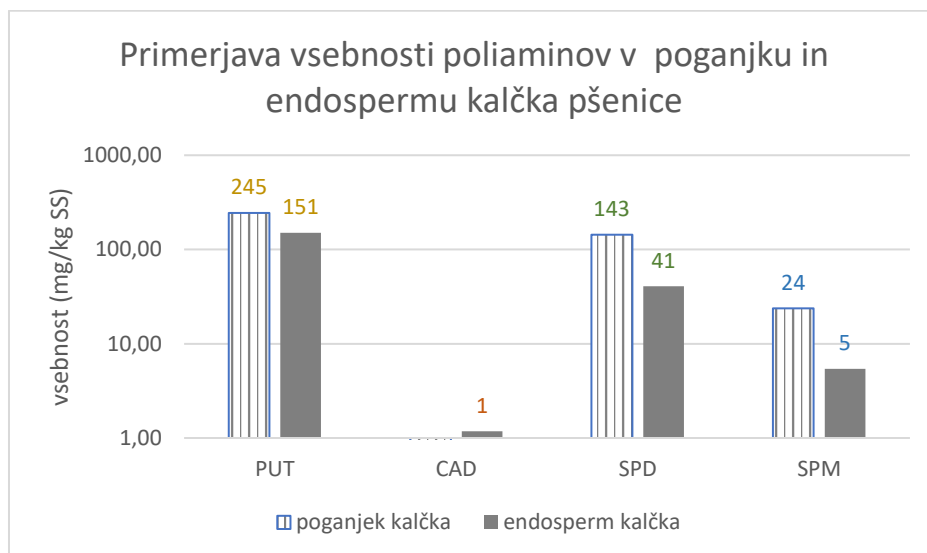
Slika 18: Ločeni deli graha in pšenice

Tako pri pšenici kot pri grahu so največ poliaminov vsebovali poganjki kalčkov (graf 8 in 9). Vsebnosti so zelo odstopale od semen kalčkov, kar je posledica večje sinteze poliaminov zaradi njihove pomembne vloge pri stabilizaciji DNK v rastočem tkivu.

Pri kalčkih graha se ponovijo rezultati visoke vsebnosti kadaverina, zato bi bilo verjetno uživanje kalčkov graha problematično.



Graf 8: Primerjava vsebnosti poliaminov v poganjku in endospermu kalčka graha

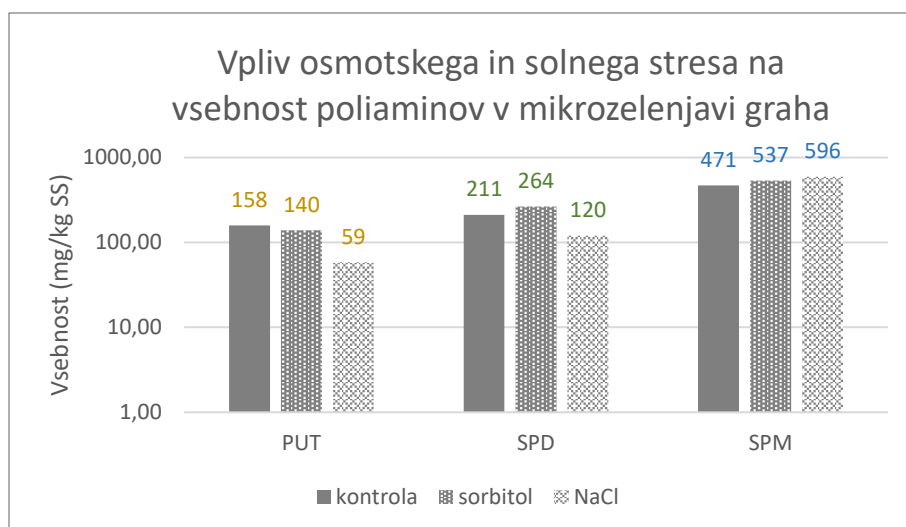


Graf 9: Primerjava vsebnosti poliaminov v poganjku in endospermu kalčka pšenice

4.6 Vsebnost poliaminov v mikrozeljavi graha in pšenice po kratkotrajnem šoku

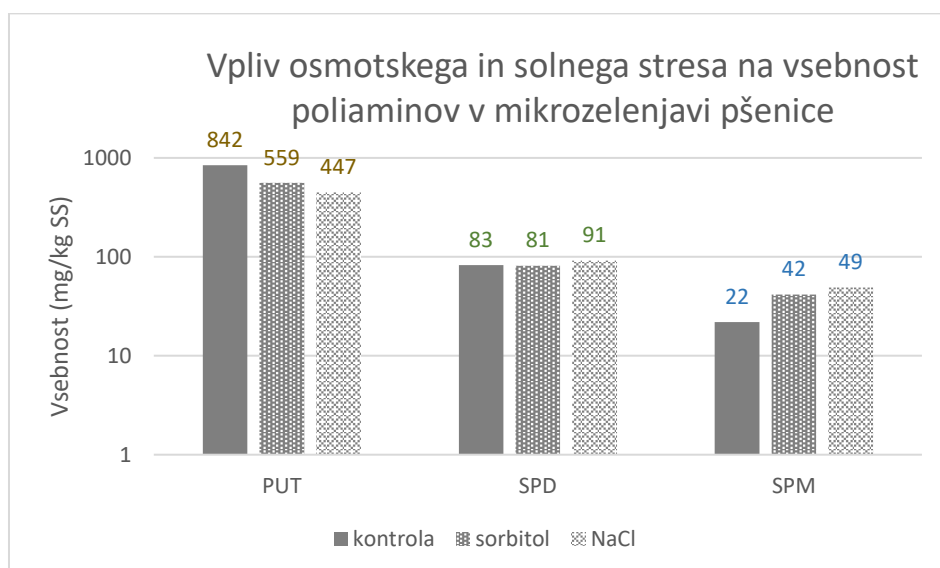
V nekaterih raziskavah, omenjenih v literaturi, se domneva, da bi lahko poliamini prispevali k osmotski prilagoditvi in problemu presežka ionov z ohranjanjem ustreznega kationsko-anionskega ravnotežja ter stabiliziranjem membran pri visoki zunanji slanosti [22].

Na podlagi rezultatov analize različnih faz rasti semen sva ugotovili, da so najboljše vrednosti ugodnih poliaminov v mikrozeljavi. Želeli sva ugotoviti, če lahko z osmotskim in solnim stresom vplivamo na vsebnost ter razmerja poliaminov.



Graf 10: Vpliv osmotskega in solnega stresa na vsebnost poliaminov v mikrozelenjavi graha

Po kratkotrajnem stresu mikrozelenjave graha z NaCl so se vrednosti spermina precej povečale, saj so poliamini v mikrozelenjavi poskušali ohranjati ravnovesje in so se zato njihove vrednosti povečale. Pozitivno so se zmanjšale tudi vrednosti neugodnega putrescina in ugodnega spermina. Tudi po kratkotrajnem stresu s sorbitolom so se vrednosti putrescina minimalno zmanjšale, povečale so se pa vrednosti spermina in spermidina (graf 10).



Graf 11: Vpliv osmotskega in solnega stresa na vsebnost poliaminov v mikrozelenjavi pšenice

Pri kratkotrajnem stresu mikrozelenjave pšenice s sorbitolom in NaCl se je v obeh primerih stresa povečala predvsem vsebnost spermina, minimalno tudi spermidina, močno zmanjšala pa vsebnost neugodnega putrescina (graf 11).

Bolj prehransko ugodne spremembe razmerij vsebnosti poliaminov se po kratkotrajnem stresu pojavijo pri mikrozelenjavi pšenice, saj se razpolovi vrednost neugodnega putrescina in podvoji vrednost spermina. Tudi po stresu mikrozelenjave graha se pojavijo pozitivno spremenjena razmerja vsebnosti.

4.7 Sklepi

Na podlagi vsega lahko izpostavimo naslednje sklepe:

- izrazito največ prehransko ugodnih poliaminov so med nekaljenimi semeni vsebovala semena graha, sledila so jim pa semena gorčice;
- vsebnosti vseh poliaminov se v fazi kaljenja in mikrozeljenjave močno spremenijo. Še posebej močno se povečajo vsebnosti putrescina, ki je prekursor vseh ostalih poliaminov. To posledično pomeni tudi povečanje vsebnosti spermidina in spermina;
- vsebnosti poliaminov v posameznih delih kalčkov se razlikujejo zaradi različno intenzivne rasti v njih. Poganjki vseh semen imajo zato veliko večje vsebnosti ugodnih poliaminov, semena kalčkov pa manjše;
- na spremembo razmerij vsebnosti poliaminov najugodnejše vpliva kratkotrajni solni stres, sicer pa tudi kratkotrajni stres s sorbitolom ugodno spremeni vsebnosti poliaminov. V obeh primerih se namreč zmanjšajo vrednosti putrescina in povečajo vsebnosti ugodnega spermidina ter spermina. Še posebej pozitivne spremembe razmerij vsebnosti so opazne pri mikrozeljenjavi pšenice.

5. ZAKLJUČEK

Poliamini s svojo nevrottransmittersko in homeostatsko funkcijo predstavljajo organske spojine, ki v živih bitjih opravljajo številne pomembne naloge. Poleg tega, da jih vsak organizem biosintetizira, jih lahko pridobi tudi s prehranjevanjem. Vir visokih vsebnosti ugodnih poliaminov so kalčki in mikrozelenjava.

Gojenje kalčkov ni zahtevno in traja le nekaj dni. Zanj so potrebna le semena, voda in osvetlitev. Za še ugodnejše gojenje je potrebno tudi nekaj ščepecev kuhinjske soli.

Določanje vsebnosti poliaminov v različnih fazah rasti semen je potekalo s pomočjo analiz HPLC. Pred tem sva vzorce pripravljali s pomočjo homogenizacije, ekstrakcije in derivatizacije. Za ustrezno primerjavo rezultatov vsebnosti poliaminov sva upoštevali tudi suhi delež semen, kalčkov in mikrozelenjave.

Na podlagi rezultatov kromatografskih analiz lahko potrdiva prvo hipotezo o veliki vsebnosti ugodnih poliaminov za vsa semena, razen semena boba in soje, saj gojenje le-teh ni bilo uspešno. S primerjanjem rezultatov analiz poliaminov istih semen v različnih fazah rasti lahko potrdiva tudi drugo hipotezo o večji vsebnosti poliaminov ob intenzivnejši rasti. Zaradi homeostatske funkcije poliaminov lahko z analitskimi rezultati potrdiva tudi tretjo hipotezo in zaključiva, da kratkotrajen stres ne vpliva na rast rastlin, pač pa le na njihovo notranje ravnovesje. Po takšnem stresu se namreč povečajo vsebnosti ugodnih poliaminov v mikrozelenjavi.

Cilj najine naloge je bil dosežen, saj je gojenje kalčkov in mikrozelenjave cenovno dostopno, hitro in enostavno. Prav tako so kalčki in mikrozelenjava bogati s poliamini, katerih vsebnost lahko povečamo, če v vodo, s katero škropimo zelenjavo, dodamo malo kuhinjske soli. Na tak način lahko vsak posameznik pridela svojo hrano in eksogeno pridobi poliamine, ki omogočajo zdravo in dolgo življenje.

6. VIRI IN LITERATURA

- 1 Polyamine. Wikipedia (13. 2. 2020). URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Polyamine#Biological_function (citirano 21. 2. 2020).
- 2 Mildner, B. (2014). Spojevi koji nastaju iz aminokiselina. URL: https://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/14obk-p33-porfirini_i_spojevi_aminokiselina.pdf (citirano 21. 2. 2020).
- 3 Piotrowski, M. Polyamine biosynthesis in plants. URL: http://homepage.ruhr-uni-bochum.de/Markus.Piotrowski/Research_Polyamine.html (citirano 21. 2. 2020).
- 4 Potočka, J., Kuehn, D. G. (2000). Natural polyamines and their biological consequence in mammals. URL: <https://actamedica.lfhk.cuni.cz/media/pdf/18059694.2019.124.pdf> (citirano 21. 2. 2020).
- 5 Gojenje kalic. Mineral (9. 2. 2018). URL: <https://www.mineralzarastline.si/gojenje-kalic/> (citirano 20. 2. 2021).
- 6 Muñoz-Esparza, N. C., Latorre-Moratalla, M. L., Comas-Basté, O., Toro-Funes, N., Veciana-Nogués, M. T., Vidal-Carou, M. C. (2019). Polyamines in Food. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6637774/> (citirano 23. 2. 2020).
- 7 Radikal (kemija). Wikipedia (16. 1. 2017). URL: [https://sl.wikipedia.org/wiki/Radikal_\(kemija\)](https://sl.wikipedia.org/wiki/Radikal_(kemija)) (citirano 23. 2. 2020).
- 8 del Rio, B., Redruello, B., Linares, D.M. et al. The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. *Sci Rep* 9, 120 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36239-w> (citirano 20. 2. 2021).
- 9 Kusano, T., Suzuki, H. (2015). Polyamines: A Universal Molecular Nexus for Growth, Survival, and Specialised Metabolism. URL: https://books.google.si/books?id=tOsXBgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=sl&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false (citirano 23. 2. 2020).
- 10 National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Putrescine, CID=1045, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Putrescine> (citirano 23. 2. 2020).
- 11 Reaktivna dušikova spojina. Wikipedia (30. 11. 2019). URL: https://sl.wikipedia.org/wiki/Reaktivna_du%C5%A1ikova_spojina (citirano 23. 2. 2020).
- 12 National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Spermidine, CID=1102, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Spermidine> (citirano 23. 2. 2020).
- 13 National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Spermine, CID=1103, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Spermine> (citirano 23. 2. 2020).
- 14 Rauscher-Gabernig, E., Gabernig, R., Brueller, W. et al. Dietary exposure assessment of putrescine and cadaverine and derivation of tolerable levels in selected foods consumed in

Austria. *Eur Food Res Technol* 235, 209–220 (2012). URL: <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1748-1> (citirano 20. 2. 2021).

15 Zabukovec, T. (2014). Razvoj in validacija HPLC analizne metode za določanje nesteroidnih protivnetnih učinkovin [na spletu]. Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. Pridobljeno s: <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?lang=slv&id=45676> (citirano 20. 5. 2020).

16 Chen, D., Shao, Q., Yin, L., Younis, A., Zheng, B. (2018). Polyamine Function in Plants: Metabolism, Regulation on Development, and Roles in Abiotic Stress Responses. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6335389/> (citirano 21. 2. 2020).

17 Bagni, N., Tassoni, A. (2006). The role of polyamines in relation to flower senescence. URL: https://www.researchgate.net/publication/313473018_The_role_of_polyamines_in_relation_to_flower_senescence (citirano 21. 2. 2020).

18 Liu J., Honda C., Moriguchi T. (2006). Involvement of polyamine in floral and fruit development. URL: https://www.researchgate.net/publication/228753510_Involvement_of_Polyamine_in_Floral_and_Fruit_Development (citirano 21. 2. 2020).

19 Nambeesan, S. Handa, A. K. Mattoo, A. (2008). Polyamines and regulation of ripening and senescence. URL: https://www.researchgate.net/publication/313099822_Polyamines_and_regulation_of_ripening_and_senescence (citirano 21. 2. 2020).

20 Yu, Z., Jia, D., Liu, T. (2019). Polyamine Oxidases Play Various Roles in Plant Development and Abiotic Stress Tolerance. URL: <https://www.mdpi.com/2223-7747/8/6/184/htm> (citirano 21. 2. 2020).

21 Frkal, N. (2019). Prehranski vnos in metabolizem poliaminov. URL: <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=109730&lang=slv> (citirano 21. 2. 2020).

22 Singh Gill, S., Tuteja, N. (2010). Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2835953/> (citirano 21. 2. 2020).

23 Zapata, P. J., Serrano, M., Pretel, M. T., Botella, M. A., (2008). Changes in free polyamine concentration induced by salt stress in seedlings of different species. (citirano 21. 2. 2020).

24 Zapata, P. J., Serrano, M., García-Legaz, M. F., Pretel, M. T., Botella, M. A. (2017). Short Term Effect of Salt Shock on Ethylene and Polyamines Depends on Plant Salt Sensitivity. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5440749/> (citirano 21. 2. 2020).

25 Obrul, L., Podpečan, N. (2015) Kaljivost semen v odvisnosti od koncentracije soli v vodi. URL: <http://www.knjiznica-celje.si/raziskovalne/4201504392.pdf> (citirano 22. 2. 2020).

26 Pogoji za kaljenje. Vrtobilja. URL: <https://vrtobilja.si/optimalen-prostor-za-vzgojo-lastnih-sadik> (citirano 22. 2. 2020).

- 27 Pospeševanje kaljenja semen. Vrtnarava. URL: <https://www.vrtnarava.si/nasveti/pospeševanje-kaljenja-semen> (citirano 22. 2. 2020).
- 28 Darko E., Végh B., Khalil R., Marček T., Szalai G., Pál M. (2019). Metabolic responses of wheat seedlings to osmotic stress induced by various osmolytes under iso-osmotic conditions. URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0226151> (citirano 22. 2. 2020).
- 29 Coskun O. (2016). Separation techniques: Chromatography. Northern clinics of Istanbul, 3(2), 156–160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757> (citirano 20. 2. 2021).
- 30 Berger, M., Gray, J. A., Roth, B. L. (2018). The Expanded Biology of Serotonin. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5864293/> (citirano 29. 2. 2020).
- 31 Melatonin. Wikipedia (8. 9. 2018). URL: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Melatonin> (citirano 29. 2. 2020).
- 32 Tekočinska kromatografija. Labtim. URL: <https://labtim.si/podrocja/tekocinska-kromatografija/> (citirano 20. 2. 2021).
- 33 Hanson, G. R., Venturelli, P. J., Fleckenstein, A. E. (2006). Drugs and Society. URL: https://books.google.si/books/about/Drugs_and_Society.html?id=dL3IDQAAQBAJ&redir_esc=y (citirano 29. 2. 2020).
- 34 Dai Z, Wu Z, Wang J, Wang X, Jia S, Bazer FW, Wu G. Analysis of polyamines in biological samples by HPLC involving pre-column derivatization with o-phthalaldehyde and N-acetyl-L-cysteine. Amino Acids. 2014 URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24633404/> (citirano 20. 2. 2021).
- 35 Kateholamini. Wikipedia (8. 9. 2018). URL: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Kateholamini> (citirano 29. 2. 2020).
- 36 Brodnjak Vončina, D. Analizna kemija II (2006). URL: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjO6K2z4PruAhX7AxAIHf6UAwoQFjABegQIAhAD&url=https%3A%2F%2Fwww.fkkt.um.si%2Fgradiva%2Ffajli%2Fanalizna2_gradivo.pdf&usg=AOvVaw3wPkIKuQ1uacLYwgMSE-VG (citirano 20. 2. 2021)
- 37 Rakar, A. Uvajanje metode HPLC za določanje biogenih aminov (2013). URL: <http://www.ung.si/~library/diplome/OKOLJE/125Rakar.pdf> (citirano 20. 2. 2021).
- 38 Magnes C, Fauland A, Gander E, et al. Polyamines in biological samples: rapid and robust quantification by solid-phase extraction online-coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry (2014). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3991419/> (citirano 20. 2. 2021).
- 40 Handa, A. K., Fatima T., Matto A.K. (2018). Polyamines: Bio-Molecules with Diverse Functions in Plant and Human Health and Disease. URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2018.00010/full> (citirano 1. 3. 2020).

41 Muñoz-Esparza, N. C., Latorre-Moratalla, M. L., Comas-Basté, O., Toro-Funes, N., Veciana-Nogués, M. T., Vidal-Carou, M. C. (2019) Polyamines in Food. URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2019.00108/full> (citirano 1. 3. 2020).

Slika 1-4: PubChem. (citirano 22. 2. 2020).

Slika 5: Vir 3.

7. PRILOGE

- Grafični povzetek

