

# Utjecaj visoke temperature na biodostupnost polifenolnih spojeva i antioksidacijski potencijal klica brokule (*Brassica oleracea* L. convar. botrytis (L.) Alef)

---

**Kolomaz, Mihael**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:189399>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Mihael Kolomaz

**Utjecaj visoke temperature  
na biodostupnost polifenolnih spojeva i  
antioksidacijski potencijal klica brokule  
(*Brassica oleracea* L. convar. *botrytis* (L.) Alef.)**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Mihael Kolomaz

**Influence of high temperature  
on bioavailability of polyphenolic compounds and  
antioxidant potential of broccoli seedlings  
(*Brassica oleracea* L. convar. *botrytis* (L.) Alef.)**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj je rad izrađen u Laboratoriju za fitokemiju na Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom doc. dr. sc. Ivane Šola i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Valerije Vujčić Bok. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

*Zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Ivani Šoli, na velikoj pomoći, ukazanome povjerenju i pruženoj prilici za izradu ovoga rada.*

*Zahvaljujem se neposrednoj voditeljici dr. sc. Valeriji Vujčić Bok na uloženom trudu i hvala svima koji su na bilo koji način sudjelovali u izradi ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem svim kolegama i kolegicama koji su mi godine studiranja učinili jednostavnijima i zabavnijima te dragim prijateljima koji su dijelili sreću i nesreću studentskih dana.*

*Posebno zahvaljujem svojoj obitelji na pruženoj podršci i omogućenom školovanju.*

*I slava onomu koji je uvijek s nama.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Utjecaj visoke temperature na biodostupnost polifenolnih spojeva i antioksidacijski potencijal klica brokule (*Brassica oleracea* L. convar. *botrytis* (L.) Alef.)

Mihael Kolomaz

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Biljke se toplinskom stresu prilagođavaju promjenama u vlastitom kemijskom sastavu. Kupusnjače su zastupljene u prehrani ljudi i životinja, stoga je važno kako će visoka temperatura (VT) utjecati na njihovu nutritivnu vrijednost. Cilj ovoga rada bio je istražiti utjecaj VT (38°C) na biodostupnost različitih skupina i pojedinačnih polifenolnih spojeva u klicama brokule (*Brassica oleracea* L. convar. *botrytis* (L.) Alef.) prije i tijekom simulirane ljudske probave *in vitro*, kao i na njihov antioksidacijski potencijal, kako bi se utvrdio stupanj stabilnosti/podložnosti navedenih parametara prema VT. Spektrofotometrijski je određen udio različitih skupina spojeva, a metodom HPLC razdvojeni su, identificirani i kvantificirani metaboliti: *L*-askorbinska, galna, benzojeva, kavena, *p*-kumarinska, ferulična i sinapinska kiselina te tilirozid, kempferol i kvercetin. Antioksidacijski potencijal određen je metodama ABTS, DPPH i FRAP. VT značajno je povećala biodostupnost ukupnih flavonola i hidroksicimetnih kiselina klica brokule. Jedini spoj čija se koncentracija razlikovala u izvornom ekstraktu između pokusnih skupina je ferulična kiselina, kojoj se koncentracija pri VT snizila, pa bi je se moglo razmotriti kao biomarker VT okoliša. Što se tiče probave, biodostupnost benzojeve kiseline je veća, a kavene manja iz klica uzgojenih pri VT tijekom svih faza probave. Biodostupnost kvercetina u fazama usta i želuca bila je viša kod klica uzgajanih pri VT. VT je smanjila ili nije utjecala na antioksidacijski potencijal klica brokule u izvornom ekstraktu i nakon probave *in vitro*.

(45 stranica, 20 slika, 3 tablice, 44 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: klimatske promjene, kupusnjače, HPLC, flavonoidi, fenolne kiseline, probava *in vitro*, vitamin C

Voditelj: doc. dr. sc. Ivana Šola

Neposredni voditelj: dr. sc. Valerija Vujčić Bok

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Ivana Šola

izv. prof. dr. sc. Duje Lisičić

doc. dr. sc. Marin Ježić

Rad prihvaćen: 04.11.2011.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

### Influence of high temperature on bioavailability of polyphenolic compounds and antioxidant potential of broccoli seedlings (*Brassica oleracea* L. convar. *botrytis* (L.) Alef.)

Mihael Kolomaz

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Plants adapt to heat stress by changing their own chemical composition. Brassicaceae are present in the diet of humans and animals, so it is important to know how high temperature (HT) will affect their nutritional value. The aim of this study was to investigate the influence of HT (38°C) on the bioavailability of different groups and individual polyphenolic compounds in broccoli sprouts (*Brassica oleracea* L. convar. *botrytis* (L.) Alef.) before and after *in vitro* simulated human digestion, as well as on their antioxidant potential, in order to determine the degree of stability/susceptibility of these parameters to HT. The proportion of different groups of compounds was determined spectrophotometrically, and individual metabolites were separated, identified and quantified by HPLC: *L*-ascorbic, gallic, benzoic, caffeic, *p*-coumaric, ferulic and synapic acid, and tyroside, kaempferol and quercetin. Antioxidant potential was determined by ABTS, DPPH and FRAP methods. HT significantly increased the bioavailability of total flavonols and hydroxycinnamic acids of broccoli sprouts. The only compound which concentration differed in the original extract between the experimental groups was ferulic acid; at HT its concentration decreased, so it could be assessed as a potential environmental HT biomarker. In terms of digestion, the bioavailability of benzoic acid was higher and caffeine lower from sprouts grown at HT during each phase of digestion. The bioavailability of quercetin in the salivary and gastric phase was higher in sprouts grown at HT. HT reduced or did not affect the antioxidant potential of broccoli sprouts in the original extract and after *in vitro* digestion.

(45 pages, 20 figures, 3 tables, 44 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: climate change, Brassicaceae, plant metabolites, HPLC, flavonoids, phenolic acids, vitamin C

Supervisor: Dr. Ivana Šola, Assist. Prof.

Assistant Supervisor: Dr. Valerija Vujčić Bok

Reviewers: Dr. Ivana Šola, Assist. Prof.

Dr. Duje Lisičić, Assoc. Prof.

Dr. Marin Ježić, Assist. Prof.

Thesis accepted: November, 4<sup>th</sup>, 2021

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
1.1. Kupusnjače	1
1.2. Utjecaj temperature na kemijski sastav biljaka	2
1.3. Klice kao izvor bioaktivnih spojeva	2
1.4. Polifenolni spojevi	3
1.5. Antioksidacijski potencijal	5
1.6. Ljudska probava	5
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b>	<b>7</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b>	<b>8</b>
3.1. Materijal	8
3.2. Ekstrakcija polifenolnih spojeva	8
3.3. Probava in vitro	8
3.4. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva	9
3.5. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina	10
3.6. Određivanje ukupnih flavonoida	10
3.7. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola	11
3.8. Određivanje ukupnih antocijana	11
3.9. Tekućinska kromatografija visoke moći razlučivanja	12
3.10. Određivanje antioksidacijskog potencijala metodom ABTS	13
3.11. Određivanje antioksidacijskog potencijala metodom DPPH	14
3.12. Određivanje antioksidacijskog potencijala metodom FRAP	14
3.13. Statistička obrada podataka	15
<b>4. REZULTATI</b>	<b>16</b>
4.1. Utjecaj visoke temperature na udio ukupnih fenolnih spojeva u izvornom ekstraktu i tijekom in vitro probave	16



4.2.	Utjecaj visoke temperature na udio ukupnih flavonoida u izvornom ekstraktu i tijekom in vitro probave	17
4.3.	Utjecaj visoke temperature na udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina u izvornom ekstraktu i tijekom in vitro probave	18
4.4.	Utjecaj visoke temperature na udio ukupnih flavonola u izvornom ekstraktu i tijekom in vitro probave	19
4.5.	Utjecaj visoke temperature na udio ukupnih antocijana u izvornom ekstraktu i tijekom in vitro probave	20
4.6.	Utjecaj visoke temperature na udio ukupnih fenolnih kiselina u izvornom ekstraktu i tijekom in vitro probave	21
4.7.	Utjecaj visoke temperature na udio pojedinačnih fenolnih spojeva u izvornom ekstraktu i tijekom in vitro probave	22
4.7.1.	Utjecaj visoke temperature na udio L-askorbinske kiseline u izvornom ekstraktu i tijekom in vitro probave	22
4.7.2.	Utjecaj visoke temperature na udio galne kiseline u izvornom ekstraktu i tijekom in vitro probave	23
4.7.3.	Utjecaj visoke temperature na udio benzojeve kiseline u izvornom ekstraktu i tijekom in vitro probave	23
4.7.4.	Utjecaj visoke temperature na udio kavene kiseline u izvornom ekstraktu i tijekom in vitro probave	24
4.7.5.	Utjecaj visoke temperature na udio p-kumarinske kiseline u izvornom ekstraktu i tijekom in vitro probave	25
4.7.6.	Utjecaj visoke temperature na udio ferulične kiseline u izvornom ekstraktu i tijekom in vitro probave	26
4.7.7.	Utjecaj visoke temperature na udio sinapinske kiseline u izvornom ekstraktu i tijekom in vitro probave	27
4.7.8.	Utjecaj visoke temperature na udio tilirozida u izvornom ekstraktu i tijekom in vitro probave	28
4.7.9.	Utjecaj visoke temperature na udio kvercetina u izvornom ekstraktu i tijekom in vitro probave	29

4.7.10. Utjecaj visoke temperature na udio kempferola u izvornom ekstraktu i tijekom in vitro probave	30
4.8. Utjecaj visoke temperature na antioksidacijski potencijal izvornog ekstrakta klica brokule i za vrijeme probave in vitro	31
<b>5. RASPRAVA</b>	<b>35</b>
<b>6. ZAKLJUČAK</b>	<b>40</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>41</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS</b>	<b>45</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Kupusnjače

Porodica kupusnjača (*Brassicaceae*) broji otprilike 4000 vrsta i mnoge su značajan izvor hrane, biljnog ulja i začina. Najpoznatije su vrste *Brassica oleracea* kojoj pripadaju kupus, brokula, cvjetača, itd.; *Brassica rapa*, repa; *Brassica napus*, repica (čiji je kultivar uljana repica); *Brassica nigra*, crna gorušica; *Raphanus sativa*, radić (Avato i sur. 2015). Monofiletska skupina kupusnjača naziva se još i krstašicama (*Cruciferaeae*) zbog četiri unakrsno složene latice cvijeta. Široko su rasprostranjene, a ne nalazimo ih jedino u tropskim i polarnim područjima. Među kupusnjačama također valja istaknuti vrste *Arabidopsis thaliana* i *Degenia velebica*, prvu kao modelnog organizma, potonju kao hrvatskog endema. U hrvatskoj flori zastupljeno je oko 60 rodova unutar porodice kupusnjača ([www.enciklopedija.hr](http://www.enciklopedija.hr)).



Slika 1. Fenotip klica brokule (*Brassica oleracea* L. convar. *botrytis* (L.) Alef.).

Brokula se najčešće uzgaja do faze cvjetnih pupova kada se stavlja na tržište i jede neprocvtjerala. Osim glukozinolata kao osnovne skupine bioaktivnih spojeva, u brokuli je identificiran i niz drugih metabolita: flavonoidi i derivati hidrokscimetne kiseline, askorbinska kiselina, minerali selenij i kalcij, biljni pigmenti i biljna vlakna (Aires i sur. 2011). Brojna klinička istraživanja pokazala su smanjenje oksidacijskog stresa u organizmu nakon konzumacije brokule (Rodriguez-Casado 2016).

Jestive klice kupusnjača predstavljaju vrijedan izvor različitih hranjivih i mineralnih tvari, a danas su dostupne u trgovinama kao izvor nutrijenata i korisnih ljekovitih spojeva. Jestive klice bogate su bjelančevinama, biljnim vlaknima, vitaminima (poput vitamina C, odnosno *L*-askorbinske kiseline), mineralima i specijaliziranim biljnim metabolitima, ponajprije glukozinolatima i fenolnim spojevima, a sadrže malo ugljikohidrata (Moreno i sur. 2006).

Konkretno, klice brokule bogate su flavonoidima kvercetinom i kempferolom, glukozinolatima, te derivatima fenolnih kiselina – sinapinske i ferulične (Baenas i sur. 2017). Konzumacijom klica brokule smanjuje se rizik obolijevanja od raka, degenerativnih bolesti, metaboličkih poremećaja povezanih s pretilošću, povećava se antioksidacijski kapacitet i ublažavaju upalni procesi (Abellán i sur. 2019).

## 1.2. Utjecaj temperature na kemijski sastav biljaka

Budući da su biološki učinci biljnih vrsta povezani s njihovim kemijskim sastavom, promjene u ekspresiji gena i profilu metabolita, koje na globalnoj razini uzrokuju visoke temperature, od velikog su značaja za čovječanstvo. Npr., Olennikov i sur. (2017) zabilježili su značajan učinak promjene temperature na nutritivnu vrijednost i antioksidacijski potencijal jedne biljne vrste iz sjevernog Sibira. Na višoj temperaturi membrana je sadržavala više nezasićenih masnih kiselina, smanjen je sadržaj fenolnih spojeva i izmjeren je manji antioksidacijski potencijal. Ragusa i sur. (2016) također su otkrili da temperatura klijanja utječe na sadržaj glukozinolata, fenola i antioksidacijski potencijal vrste *Dracocephalum palmatum* Steph. ex Wild.

Mølmann i sur. (2015) dokazali su da temperatura uzgoja utječe na organoleptička svojstva (aroma, tekstura i okus) brokule i povezali to s promjenom njezina kemijskog sastava. Pri nižoj temperaturi i dužem fotoperiodu, uvjetima karakterističnima za višu geografsku širinu, uzgojena brokula imala je veće cvjetne pupove koje je uvježbana senzorna komisija percipirala slađima i manje obojenima od brokule uzgajane pri višoj temperaturi. Udio vitamina C nije varirao dok su udjeli kvercetina i kempferola bili veći pri višoj temperaturi i dužem fotoperiodu.

## 1.3. Klice kao izvor bioaktivnih spojeva

Klice su građene od mladog tkiva koje je biokemijski vrlo aktivno, pa su obično bogatije bioaktivnim spojevima od zrelih jedinki. Bolji su izvor aminokiselina, pektina i šećera dok zrele jedinke obiluju karotenoidima, klorofilima i organskim kiselinama. Visoki antioksidacijski potencijal klica smatra se rezultatom velikog sadržaja polifenolnih spojeva i *L*-askorbinske kiseline. Klice kupusnjača prepoznate su prije nekoliko godina kao funkcionalna hrana bogata bioaktivnim spojevima koji promiču zdravlje i sve su zastupljenije u ljudskoj prehrani. Klice brokule dobar su primjer funkcionalne hrane koju se savjetuje konzumirati na dnevnoj bazi (Wojdyło i sur. 2020).

Cevallos-Casals i Cisneros-Zevallos (2010) analizirali su trinaest različitih vrsta suhih sjemenki, natopljenih vodom i proklijalih sjemenki (7 dana stare klice) i utvrdili da klice sadrže i do 20 puta više fenolnih spojeva od sjemenki u stadiju dormancije i, posljedično, značajno veći antioksidacijski potencijal. Dakle, klijanjem sjemenki poboljšavaju se njihova nutritivna svojstva. Udio fenolnih spojeva u klicama brokule iznosio je oko 34 mg ekvivalenta klorogenske kiseline po gramu suhe mase, što je iznad prosjeka analiziranih vrsta (Cevallos-Casals i Cisneros-Zevallos, 2010). Klice brokule poznate su i kao odličan izvor izotiocijanata, snažnih antikancerogenih tvari; podaci o učinku visoke temperature na njihovu koncentraciju i biodostupnost već su dostupni (Guo i sur. 2014).

Međutim, o biodostupnosti polifenolnih biološki aktivnih spojeva klica brokule nema podataka, niti je istražen utjecaj visoke temperature na njihovu koncentraciju i antioksidacijski potencijal. Stoga je potrebno istražiti u kojoj mjeri (značajno ili ne) i u kojem smjeru (povećanje ili smanjivanje) povišena temperatura utječe na navedene parametre.

#### 1.4. Polifenolni spojevi

Polifenolni spojevi najčešći su specijalizirani metaboliti u biljaka. Za razliku od primarnih metabolita koji su dio osnovnog fotosintetskog ili respiracijskog metabolizma biljaka i time neophodni za život biljnog organizma i funkcioniranje stanica (lipidi, nukleinske kiseline, ugljikohidrati, bjelančevine i sl.), specijalizirani ili sekundarni metaboliti služe za interakciju s okolišem, dio su reproduktivne strategije i/ili obrambenog mehanizma (Cheyner 2013).

Nazivi „polifenoli“ i „fenoli“ koriste se naizmjenično u različitim radovima i obuhvaćaju skupinu s više od 8000 različitih kemijskih spojeva koji sadrže aromatsku jezgru i jednu ili više hidroksilnih skupina. Harborn je (1980) predložio podjelu fenolnih spojeva na osnovi broja ugljikovih atoma koja se široko upotrebljava i danas. U tablici 1. prikazane su skupine i spojevi koji su istraživani u ovome radu. Fenoli se u prirodi najčešće nalaze konjugirani u obliku glikozida, tj. s jednom ili više vezanih šećernih jedinica, obično glukozom vezanom preko hidroksilne skupine. No, vežu se i drugi šećeri te je moguće vezanje izravno na ugljikov atom aromatskog prstena.

Šamec i sur. (2018) istražili su polifenolne spojeve u kelju. Flavonoidi su najbolje proučena skupina polifenola, među kojima dominiraju kempferol i kvercetin, odnosno njihovi glikozidi. Crvenkaste biljke obiluju antocijanima među kojima se ističu glikozidi cijanidina. Fenolne kiseline predstavljaju veliku skupinu fenolnih spojeva, a izvode se iz benzojeve i cimetine kiseline, dominantno su zastupljene hidroksicimetine kiseline. U listovima su

najučestalije fenolne kiseline kavena, ferulična i sinapinska kiselina. Lin i Harnly (2009, 2010) pokazali su svojom komparativnom studijom kako različiti varijeteti vrste *Brassica oleracea* L. imaju sličan polifenolni sastav, te da nijedan varijetet ne posjeduje značajno veću količinu ovih spojeva.

Tablica 1. Skupine fenolnih spojeva s obzirom na broj ugljikovih atoma i strukturu, te odabrani primjeri

<i>skupina fenola</i>	<i>broj ugljikovih atoma</i>	<i>osnovna struktura</i>	<i>primjeri</i>
fenolne kiseline	7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	galna i benzojeva kiselina
hidroksicimetne kiseline, fenilpropani, kumarini	9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	ferulična, p-kumarinska, sinapinska, kavena kiselina
flavonoidi, izoflavonoidi	15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	kvercetin, kempferol, tilirozid

Fenolne kiseline aromatski su specijalizirani metaboliti koji sadrže karboksilnu skupinu. Odgovorne su za organoleptička svojstva voća i povrća. Obično se pojavljuju kao derivati hidroksibenzojeve (benzojeva i galna) ili hidroksicimetne (ferulična, p-kumarinska, sinapinska i kavena) kiseline. Poznati su antioksidansi, neutraliziraju slobodne radikale i utišavaju nastanak singletnog kisika (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh 2011).

Flavonoidi su raznolika skupina polifenolnih spojeva kojima je zajednički osnovni ugljikov kostur od 15 ugljikovih atoma raspoređenih u tri aromatska prstena. Nezamjenjive su sastavnice današnjih nutritivnih, farmaceutskih, medicinskih i kozmetičkih preparata zbog antioksidativnih, protuupalnih i antikarcinogenih svojstava potvrđenih mnogobrojnim istraživanjima. Podskupinu antocijana čine pigmenti zaslužni za boju listova, cvjetova i plodova biljaka, primjerice cijanidin. Osjetljivi su na vrijednosti pH, stoga su prirodni bioindikatori kiselosti. Podskupinu flavonola čine flavonoidi s ketonskom skupinom, nalaze se u različitom povrću i voću (kupusnjače su bogati izvor flavonola), a među najistraživanijima su kvercetin i kempferol (Panche i sur. 2016).

### 1.5. Antioksidacijski potencijal

Aerobni metabolizam razvio se kako bi stanice iskoristile atmosferu bogatu kisikom. Kisik kao vrlo reaktivni element sudjeluje u oksidaciji (sagorijevanju) mnogih tvari pri čemu se otpušta puno energije. Stanice aerobnih organizama kontroliranim staničnim disanjem osiguravaju dovoljno energije za sve ostale stanične procese. No, to svojstvo reaktivnosti rezultira i negativnim posljedicama za stanicu, a to je nastanak reaktivnih kisikovih vrsta koje oštećuju bjelančevine, lipide i druge molekule ključne za postojanje stanice. Reaktivne kisikove vrste neutraliziraju enzimi prisutni u stanicama poput katalaze ili neenzimatski antioksidansi poput *L*-askorbinske kiseline i polifenolnih spojeva koje unosimo u organizam prehranom. Neravnoteža između količine reaktivnih kisikovih vrsta i antioksidanasa koja stvara štetu naziva se oksidativnim stresom (Lobo i sur. 2010). Mogućnost antioksidanasa da neutraliziraju različite slobodne radikale koji predstavljaju reaktivne kisikove vrste zovemo antioksidacijskim potencijalom.

*L*-askorbinska kiselina, popularno nazvana vitaminom C, nije polifenolni spoj, no snažan je antioksidans i važna hranjiva tvar za ljudski organizam čiji nedostatak izaziva bolest skorbut. Mehanizam njezina neobična djelovanja prema najnovijim spoznajama predložili su Njus i sur (2020), ona donira jedan reducirajući ekvivalent, a radikal koji tvori reagira preferentno sa slobodnim radikalima umjesto da oštećuje druge spojeve.

### 1.6. Ljudska probava

Kemijski spojevi hrane sve se češće analiziraju, izolira ih se iz uzgojenih biljaka ili sintetizira različitim načinima te se potom nastoji istražiti njihov učinak na fiziologiju ljudskog organizma. Shodno tome, zadnjih godina raste zanimanje znanstvene zajednice za razumijevanje sudbine unesenih hranjivih tvari u probavni sustav. Budući da je razgradnju i apsorpciju hrane u ljudskom organizmu (i životinjskom organizmu općenito) teško proučavati, ne samo zbog tehničkog ili financijskog, već i etičkog pitanja, pribjegava se različitim modelima probave *in vitro*. Bohn i sur. (2018) istražili su biodostupnost polifenola kao fitokemikalija relativno topljivih u vodi. Nakon što su otpušteni iz stanice u vodenu fazu u probavilu, polifenole treba apsorbirati epitel crijeva. Čini se, prema trenutnim spoznajama, da se glukozidi moraju razgraditi na pripadajuće aglikone kako bi se oni pasivnom difuzijom ili putem transportera apsorbirali. Razgradnju glikozida u manjoj mjeri uspijeva napraviti kiselina želuca, a većim dijelom enzimi poput  $\beta$ -glukozidaze ili florizin-hidrolaze. Međutim, mnogi se



spojevi ponovno izlučuju u crijeva putem transportera ili se glukuroniraju/sulfoniraju da bi se dalje metabolizirali u drugom tkivu (jetri). Stoga, da bi se istraživala biodostupnost polifenola, probava *in vitro* mora simulirati mehaničku razgradnju zubima, nizak pH želuca i utjecaj probavnih enzima. Uz ovakav tip simulacije, i dalje ostaju tri izazova vezana za probavu *in vitro*: a) nedostatak fermentacije u debelom crijevu – polifenoli su aktivno metabolizirani pomoću crijevne mikrobiote što može rezultirati produktima koji se lako apsorbiraju, b) polifenoli mogu biti vezani za neekstrabilnu frakciju sve do zadnjih faza probave u debelom crijevu, c) biodostupnost polifenola promjenjiva je uslijed djelovanja transportera u stanicama crijeva, različitih metaboličkih reakcija i brzog izlučivanja.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Visoke temperature uzrokuju globalne promjene u ekspresiji gena i profilima metabolita, a samim time i promjene nutritivne vrijednosti i biopotencijala biljaka (Olennikov i sur., 2017; Ragusa i sur., 2017). Cilj je ovoga rada istražiti utjecaj visoke temperature (38°C) na koncentraciju različitih skupina i pojedinačnih polifenolnih spojeva u klicama brokule (*Brassica oleracea* L. convar. *botrytis* (L.) Alef.) prije i tijekom simulirane ljudske probave *in vitro*, kao i na njihov antioksidacijski potencijal, kako bi se utvrdio stupanj stabilnosti/podložnosti navedenih parametara prema visokoj temperaturi. Svi dobiveni podaci bit će statistički obrađeni i korelirani, te će: a) omogućiti razlikovanje termosenzitivnih i termostabilnih polifenolnih spojeva u klicama brokule i b) dati uvid u utjecaj visoke temperature na biodostupnost pojedinačnih spojeva i antioksidacijski potencijal klica tijekom *in vitro* probave.

### **3. MATERIJAL I METODE**

### 3.1. Materijal

Sjemenke brokule (*Brassica oleracea* L. convar. *botrytis* (L.) Alef.), kupljene su od tvrtke ISP International Seeds Processing GmbH (Quedlinburg, Njemačka), naklijane su u klimatiziranoj komori na vlažnom filter-papiru u mraku pri 23°C. Nakon što su sjemenke proklijale (četiri do pet dana), presađene su u posude sa sterilnim supstratom Stender B400 (Schermbeck, Njemačka) za uzgoj biljaka i razdvojene u dvije pokusne skupine: jednu čine klice brokule uzgajane u klimatiziranoj komori pri sobnoj temperaturi u uvjetima 23°C-16h-dan/18°C-8h-mrak, drugu skupinu čine klice brokule uzgajane u klimatiziranoj komori pri visokoj temperaturi u uvjetima 38°C-16h-dan/33°C-8h-mrak. Sve klice uzgojene su u tri biološke replike. Kada su dosegle stadij s dva prava lista, klice su sakupljene, smrznute pod tekućim dušikom i liofilizirane. Uzgoj i prikupljanje biljnog materijala provedeno je u ožujku i travnju 2021. godine.

### 3.2. Ekstrakcija polifenolnih spojeva

Izvagao sam na analitičkoj vagi 100 mg liofiliziranog tkiva i dodao 2,00 mL 70%-tnog etanola (u vodi). Uzorke sam inkubirao 60 minuta na vrtložnoj mješalici pri 20 okretaja u minuti na sobnoj temperaturi da bi ih potom centrifugirao 5 minuta pri 13000 okretaja u minuti na sobnoj temperaturi. Odvojio sam supernatante u epruvete i pohranio ih kao izvorne ekstrakte masene koncentracije 50 mg/mL na -20°C do daljnjih analiza.

### 3.3. Probava *in vitro*

Pripremio sam fosfatni pufer koncentracije 20 mmol dm<sup>-3</sup> (pH = 7) otapanjem dikalijeva hidrogenfosfata i kalijeva dihidrogenfosfata u deioniziranoj vodi. Za simulaciju ljudske probave *in vitro* u četiri sukcesivne faze (inicijalna, faza usta, želudca i crijeva) odvagao sam potrebne količine enzima i otopio ih u odgovarajućem otapalu prema tablici 2., (Rusak i sur. 2021).

Tablica 2. Sadržaj otopina enzima upotrebljenih za simulaciju pojedinih faza probave *in vitro*

Faza probave <i>in vitro</i>	enzim	koncentracija	otapalo
inicijalna faza	-	-	fosfatni pufer (20 mmol dm <sup>-3</sup> )
faza usta	$\alpha$ -amilaza	0,48 mg/mL	fosfatni pufer (20 mmol dm <sup>-3</sup> )
faza želuca	svinjski pepsin	3,00 mg/mL	HCl (0,10 mol dm <sup>-3</sup> )
faza crijeva	žučne soli	2,40 mg/mL	fosfatni pufer (20 mmol dm <sup>-3</sup> )
	svinjska lipaza pankreatin	0,20 mg/mL 0,40 mg/mL	

Prvo sam pomiješao po 300  $\mu\text{L}$  izvornog ekstrakta i fosfatnog pufera. Nakon toga sam probavu u ustima (faza usta) simulirao dodatkom 10  $\mu\text{L}$  enzima amilaze (0,48 mg/mL) i inkubacijom na tresilici pri 150 okretaja u minuti u trajanju od 5 minuta na temperaturi 37°C. Usljedila je probava u želucu (faza želuca) koju sam simulirao dodatkom 400  $\mu\text{L}$  otopine svinjskog pepsina (3,00 mg/mL u klorovodičnoj kiselini koncentracije 0,1 mol dm<sup>-3</sup>), zakiseljavanjem klorovodičnom kiselinom (1,00 mol dm<sup>-3</sup>) na pH 2 i inkubacijom na tresilici pri 150 okretaja u minuti u trajanju od 60 minuta na temperaturi 37°C. Probavu u crijevima (faza crijeva) simulirao sam dodavanjem natrijeva hidrogenkarbonata (1,00 mol dm<sup>-3</sup>) do pH 5,3, dodavanjem 900  $\mu\text{L}$  sokova gušterače (žučne soli 2,40 mg/mL, svinjska lipaza 0,20 mg/mL, pankreatin 0,40 mg/mL), dodavanjem natrijeva hidroksida (1,00 mol dm<sup>-3</sup>) do pH 7, te nadopunom do 2,00 mL fosfatnim puferom i inkubacijom na tresilici pri 150 okretaja u minuti u trajanju od 120 minuta na temperaturi 37°C. Sve uzorke nadopunio sam fosfatnim puferom do 2,00 mL i centrifugirao 10 minuta pri 13000 okretaja u minuti na temperaturi 4°C. Zatim sam odvojio supernatante u epruvete i pohranio ih kao uzorke probave *in vitro* masene koncentracije 7,5 mg/mL na -20°C do daljnjih analiza.

#### 3.4. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva

Udio ukupnih fenolnih spojeva u uzorcima odredio sam spektrofotometrijski mjerenjem intenziteta obojenja pri valnoj duljini 765 nm. Metoda se temelji na reakciji fenolnih spojeva s Folin-Ciocalteuovim reagensom koji je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline, a one se pri oksidaciji fenolnih spojeva reduciraju u plavo obojene volframove i molibdenove okside. Udio fenola određuje se očitavanjem s baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancije otopina galne kiseline različitih koncentracija (Ough i Amerine, 1998).

U epruvete sam ulio po 790  $\mu\text{L}$  deionizirane vode, 10  $\mu\text{L}$  izvornog ekstrakta, uzorka probave *in vitro*, alkoholne otopine galne kiseline (raspon masenih koncentracija 0,05 – 5,00 g/mL) ili 70%-tnog etanola kao kontrolu te 50  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteuova reagensa. Otopinu sam promiješao na vrtložnoj miješalici. Potom sam dodao 150  $\mu\text{L}$  otopine natrijeva karbonata koncentracije 1,88 mol dm<sup>-3</sup> i promiješao na vrtložnoj miješalici. Uzorke sam inkubirao 30 minuta na tresilici pri 150 okretaja u minuti i temperaturi 45°C. Po 200  $\mu\text{L}$  svake otopine ulio sam u jažice mikrotitarske pločice (tri tehničke replike) kako bih izmjerio apsorbanciju pri valnoj duljini 740 nm na spektrofotometru FLUOstar Optima. Izradio sam baždarni pravac za galnu kiselinu i dobio sljedeću jednadžbu:

$$y = 0,6678 x + 0,0384 (R^2 = 0,9934),$$

pri čemu je  $y$  izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini 740 nm, a  $x$  masena koncentracija galne kiseline. Pomoću baždarnog pravca odredio sam udio ukupnih fenolnih spojeva u uzorcima kao ekvivalente galne kiseline.

### 3.5. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina

Za određivanje ukupnih fenolnih kiselina koristi se svježe pripremljen Arnowljev reagens. Pripremio sam ga otapanjem 1,00 g natrijeva nitrita i 1,17 g natrijeva molibdata dihidrata u 10,00 mL deionizirane vode.

U jažice mikrotitarske pločice ulio sam po 20  $\mu\text{L}$  klorovodične kiseline koncentracije 0,50 mol  $\text{dm}^{-3}$ , 10  $\mu\text{L}$  izvornog ekstrakta, uzorka probave *in vitro*, alkoholne otopine kavene kiseline (raspon masenih koncentracija 0,006 – 0,50 g/mL) ili 70%-tnog etanola kao kontrolu, 20  $\mu\text{L}$  svježe pripremljenog reagensa, 20  $\mu\text{L}$  8,5%-tne vodene otopine natrijeva hidroksida i 30  $\mu\text{L}$  deionizirane vode. Izmjerio sam apsorbanciju pri valnoj duljini 510 nm na spektrofotometru. Izradio sam baždarni pravac za kavenu kiselinu:

$$y = 0,6192 x (R^2 = 0,9964),$$

pri čemu je  $y$  izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini 490 nm, a  $x$  masena koncentracija kavene kiseline. Pomoću baždarnog pravca odredio sam koncentraciju ukupnih fenolnih kiselina u uzorcima u ekvivalentima kavene kiseline.

### 3.6. Određivanje ukupnih flavonoida

Metoda prema Zhishen i sur. (1999) temelji se na svojstvu flavonoida da s aluminijskim kloridom tvore kompleks kojemu je intenzitet obojenja razmjernan količini prisutnih flavonoida i koji ima maksimum apsorbancije pri 510 nm. Udio ukupnih flavonoida određuje se očitavanjem s baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancije otopine kvercetina ili katehina.

U jažice mikrotitarske pločice ulio sam po 80  $\mu\text{L}$  deionizirane vode, 20  $\mu\text{L}$  izvornog ekstrakta, uzorka probave *in vitro*, alkoholne otopine katehina (raspon masenih koncentracija 0,006 – 5,00 g/mL) ili 70%-tnog etanola kao kontrolu, i 6  $\mu\text{L}$  5%-tnog natrijeva nitrita. Pločicu sam inkubirao 5 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim sam dodao 6  $\mu\text{L}$  aluminijskoga klorida (10%-tna vodena otopina) i inkubirao 6 minuta pri sobnoj temperaturi. Na kraju sam dodao 40  $\mu\text{L}$  natrijeva hidroksida koncentracije 1,00 mol  $\text{dm}^{-3}$  i 48  $\mu\text{L}$  deionizirane vode. Izmjerio sam apsorbanciju pri valnoj duljini 510 nm na spektrofotometru. Izradio sam baždarni pravac za katehin:

$$y = 1,4108 x + 0,0514 (R^2 = 0,9923),$$

pri čemu je  $y$  izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini 510 nm, a  $x$  masena koncentracija katehina. Pomoću baždarnog pravca odredio sam koncentraciju ukupnih flavonoida u ekvivalentima katehina u uzorcima.

### 3.7. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Ukupne hidroksicimentne kiseline i flavonole odredio sam spektrofotometrijskom metodom prema Howard i sur. (2003). U epruvete sam ulio po 25  $\mu\text{L}$  izvornog ekstrakta, uzorka probave *in vitro*, alkoholne otopine kavene kiseline (raspon masenih koncentracija 0,006 – 1,00 g/mL), alkoholne otopine kvercetina (0,006 – 0,30 g/mL) ili 70%-tnog etanola za kontrolu. Potom sam dodao 25  $\mu\text{L}$  klorovodične kiseline masene koncentracije 1,00 g  $\text{dm}^{-3}$  otopljene u 95%-tnom etanolu i 455  $\mu\text{L}$  vodene otopine klorovodične kiseline masene koncentracije 2,00 g  $\text{dm}^{-3}$ . Sadržaj epruveta promiješao sam na vrtložnoj miješalici i u triplikatima po 200  $\mu\text{L}$  nanio na jažice mikrotitarske pločice te izmjerio apsorbanciju na spektrofotometru pri valnoj duljini 310 nm za hidroksicimetne, te pri 360 nm za flavonole. Na temelju izmjerenih apsorbancija izradio sam baždarni pravac za kavenu kiselinu:

$$y = 2,2172 x + 0,0435 (R^2 = 0,9953)$$

i kvercetin:

$$y = 1,5557 x + 0,0118 (R^2 = 0,9999),$$

pri čemu je  $y$  izmjerena apsorbancija pri 310, odnosno 360 nm, a  $x$  masena koncentracija kavene kiseline, odnosno kvercetina. Pomoću baždarnih pravaca odredio sam koncentraciju ukupnih hidroksicimentnih kiselina u ekvivalentima kavene kiseline, te koncentraciju ukupnih flavonola u ekvivalentima kvercetina u uzorcima.

### 3.8. Određivanje ukupnih antocijana

Ukupne antocijane odredio sam upotrijebivši njihovo svojstvo prirodnih indikatora kiselosti otopina mjereći UV/VIS spektrofotometrijom apsorbanciju uzoraka pri različitim vrijednostima pH (Lo Scalzo i sur. 2008).

Proveo sam dvije reakcije: u jažice mikrotitarskih pločica ulio sam po 20  $\mu\text{L}$  izvornog ekstrakta, uzorka probave *in vitro*, alkoholne otopine cijanidin-3-glikozida (raspon koncentracija od 22,30 do 223,00  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ ) ili 70%-tnog etanola za kontrolu te po 80  $\mu\text{L}$  kalijeva klorida koncentracije 0,025 mol  $\text{dm}^{-3}$  za prvu ili natrijeva acetata koncentracije 0,40 mol  $\text{dm}^{-3}$  za drugu reakciju (tri tehničke replike). Prva otopina imala je pH 1,0, a druga pH 4,5.



Uzorke sam inkubirao 15 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Izmjerio sam apsorbancije na spektrofotometru pri valnim duljinama 520 i 740 nm.

Koncentraciju antocijana izračunao sam prema sljedećim matematičkim izrazima:

$$A = (A_{520} - A_{740})_{\text{pH}=1,0} - (A_{520} - A_{740})_{\text{pH}=4,5} \quad (\text{A})$$

$$\gamma \text{ (mg/mL)} = A R M \varepsilon^{-1} l^{-1} \quad (\text{B})$$

pri čemu je  $(A_{\lambda})_{\text{pH}}$  apsorbancija uzroka pripadajućeg pH izmjerena pri valnoj duljini  $\lambda$ , a  $\gamma$  masena koncentracija dobivena pomoću Beer-Lambertova zakona kvocijentom umnoška apsorbancije  $A$ , faktora razjedenja  $R$  i molarne mase cijanidin-3-glukozida ( $449,2 \text{ g mol}^{-1}$ ) te umnoška molarog apsorpcijskog koeficijenta cijanidin-3-glukozida ( $26900 \text{ dm}^{-3} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) i širine kivete  $l$  (1 cm).

Dobio sam pravac za cijanidin-3-glukozid:

$$y = 631,54 x \quad (R^2 = 0,9565)$$

pri čemu je  $y$  apsorbancija izračunata prema gornjem matematičkom izrazu označenom slovom  $A$ , a  $x$  množinska koncentracija cijanidin-3-glukozida.

### 3.9. Tekućinska kromatografija visoke moći razlučivanja

Tekućinska kromatografija visoke moći razlučivanja (engl. *High-Performance Liquid Chromatography* – HPLC) analitička je metoda kojom se razdvajaju tekući uzorci prolaskom kroz kolonu, te se pritom identificiraju i kvantificiraju UV/VIS apsorpcijskom spektroskopijom. Koristio sam je za kvalitativnu i kvantitativnu analizu aglikona fenolnih spojeva i *L*-askorbinske kiseline brokule.

Uzorke sam pripremio zakiseljavanjem 200  $\mu\text{L}$  izvornog ekstrakta koncentriranom klorovodičnom kiselinom do konačne koncentracije  $1,20 \text{ mol dm}^{-3}$  i inkubacijom na tresilici u trajanju od dva sata, pri temperaturi  $80^\circ\text{C}$  i brzini 300 okretaja u minuti. Ovim postupkom dolazi do hidrolize ekstrakata. Pripremljeni uzorci pohranjeni su na temperaturi  $-20^\circ\text{C}$ .

Za razdvajanje, identifikaciju i određivanje koncentracije spojeva koristio sam sustav Agilent 1100 Series koji sadrži UV/VIS detektor, nepolarnu kolonu Poroshell 120 EC-C18 dimenzija  $100 \times 4,6 \text{ mm}$  s veličinom čestica  $4 \mu\text{m}$  i pretkolonu Zorbax SB-C18 dimenzija  $12,5 \times 4,6 \text{ mm}$  s veličinom čestica  $5 \mu\text{m}$ , te metodu prema radu Šola i sur. (2020).

Usporedbom retencijskih vremena maksimuma apsorbancije analiziranih ekstrakata i analiziranih standarda pri odgovarajućim valnim duljinama identificirao sam pojedine metabolite prikazane tablicom 3. Potom sam derivacijom površine ispod pikova i upotrebom

baždarnih pravaca (čije su jednadžbe također prikazane u tablici 3. i gdje  $y$  predstavlja apsorbanciju, a  $x$  masu spoja u mikrogramima) kvantificirao te spojeve.

Baždarni pravci svakog spoja prethodno su napravljeni istom metodom kao i za ekstrakte prema standardiziranim otopinama u rasponu koncentracija 0,01 do 0,25 mg/mL.

Tablica 3. Popis metabolita s valnom duljinom  $\lambda$  pri kojoj su identificirani i jednadžbom baždarnog pravca pomoću koje su kvantificirani, te pripadnom vrijednosti  $R^2$

metabolit	$\lambda$ (nm)	jednadžba baždarnog pravca	$R^2$
<i>L</i> -askorbinska kiselina	254	$y = 649,31x - 42,759$	0,9987
benzojeva kiselina	210	$y = 1052,6x - 12,738$	0,9992
ferulična kiselina	310	$y = 2815,8x - 36,454$	0,9985
galna kiselina	254	$y = 415,45x - 127,56$	0,9988
kavena kiselina	310	$y = 1444,7x - 45,512$	0,9990
kempferol	360	$y = 1076,9x - 36,287$	0,9954
<i>p</i> -kumarinska kiselina	310	$y = 3502,6x + 40,25$	0,9989
kvercetin	360	$y = 944,51x - 39,118$	0,9991
sinapinska kiselina	310	$y = 1842,1x + 25,56$	0,9982
tilirozid	310	$y = 3509,1x - 10,7$	0,9973

### 3.10. Određivanje antioksidacijskog potencijala metodom ABTS

Metoda se temelji na reakciji antioksidanasa uzorka s plavozelenim radikalom monokationom 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) po čijoj se pokrati ( $ABTS^{+}$ ) naziva metoda. Otopina tog radikala dobiva se reakcijom otopine ABTS-a s kalijevim persulfatom, a maksimumi apsorbancije nalaze se pri valnim duljinama 645, 734 i 815 nm. Kontakt otopine radikala s antioksidansima rezultira obezbojenjem otopine uslijed smanjenja koncentracije radikala  $ABTS^{+}$ , stoga se mjeri smanjenje apsorbancije radikala, a vrijednosti dobivene za uzorke uspoređuju se s vrijednosti dobivenom za poznati antioksidans Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), u vodi topivi analog vitamina E, pri istim uvjetima (Re i sur. 1999).

Jažice mikrotitarske pločice ispunio sam s 200  $\mu$ L radikala  $ABTS^{+}$ , zatim sam dodao po 2  $\mu$ L 70%-tnog etanola za kontrolu ili po 2  $\mu$ L izvornog ekstrakta za uzorke. Pločicu sam inkubirao 6 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Potom sam izmjerio apsorbanciju pri valnoj duljini 734 nm na spektrofotometru. Postotak inhibicije radikala  $ABTS^{+}$  izračunao sam prema matematičkom izrazu:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \cdot 100 ,$$

pri čemu je  $A_0$  apsorbancija kontrole, a  $A_t$  apsorbancija mjenog uzorka.

### 3.11. Određivanje antioksidacijskog potencijala metodom DPPH

Metoda se temelji na reakciji antioksidansa s relativno stabilnim ljubičastim 2,2-difenil-pikrilhidrazil-radikalom (DPPH $\cdot$ ) po čijoj je pokrati nazvana metoda. U prisutnosti antioksidansa dolazi do pretvorbe DPPH $\cdot$  u neradikalni oblik (DPPH-H) pri čemu se boja otopine mijenja u žutu, a smanjenje apsorbancija DPPH $\cdot$  možemo najbolje pratiti na maksimumu pri 517 nm (Plank i sur., 2012).

U jažice mikrotitarske pločice ulio sam 190  $\mu$ L otopine radikala DPPH $\cdot$  i 10  $\mu$ L izvornog ekstrakta uzorka ili 10  $\mu$ L 70%-tnog etanola (kontrola). Pločicu sam inkubirao 30 minuta u mraku na tresilici pri 150 okretaja u minuti na sobnoj temperaturi. Potom sam izmjerio apsorbanciju pri valnoj duljini 520 nm na spektrofotometru. Postotak inhibicije radikala DPPH $\cdot$  izračunao sam prema matematičkom izrazu:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \cdot 100 ,$$

pri čemu je  $A_0$  apsorbancija kontrole, a  $A_t$  apsorbancija mjenog uzorka.

### 3.12. Određivanje antioksidacijskog potencijala metodom FRAP

Metoda se temelji na reakciji antioksidansa uzorka sa željezovim(III) tripiridiltriazinom (Fe $^{3+}$ -TPTZ) u kojoj nastaje plavo obojenje kompleksa Fe $^{2+}$ -TPTZ. Maksimum apsorbancije tog kompleksa nalazi se pri valnoj duljini 593 nm. Naziv metode dolazi od pokrate s engleskog jezika *Ferric reducing/antioxidant power assay* što bi u slobodnom prijevodu bio ispit moći redukcije/antioksidacije željezovog trovalentnog kationa (Benzie i Strain 1999).

U jažice mikrotitarske pločice ulio sam 190  $\mu$ L reagensa koji sadrži kompleks Fe $^{3+}$ -TPTZ i 10  $\mu$ L 70%-tnog etanola (kontrola) ili 10  $\mu$ L izvornog ekstrakta uzorka. Pločicu sam inkubirao 4 minute u mraku na sobnoj temperaturi. Potom sam izmjerio apsorbanciju pri valnoj duljini 593 nm na spektrofotometru. Postotak redukcije kompleksa Fe $^{3+}$ -TPTZ izračunao sam prema matematičkom izrazu:

$$\% \text{ redukcije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \cdot 100 ,$$

pri čemu je  $A_0$  apsorbancija kontrole, a  $A_t$  apsorbancija mjenog uzorka.

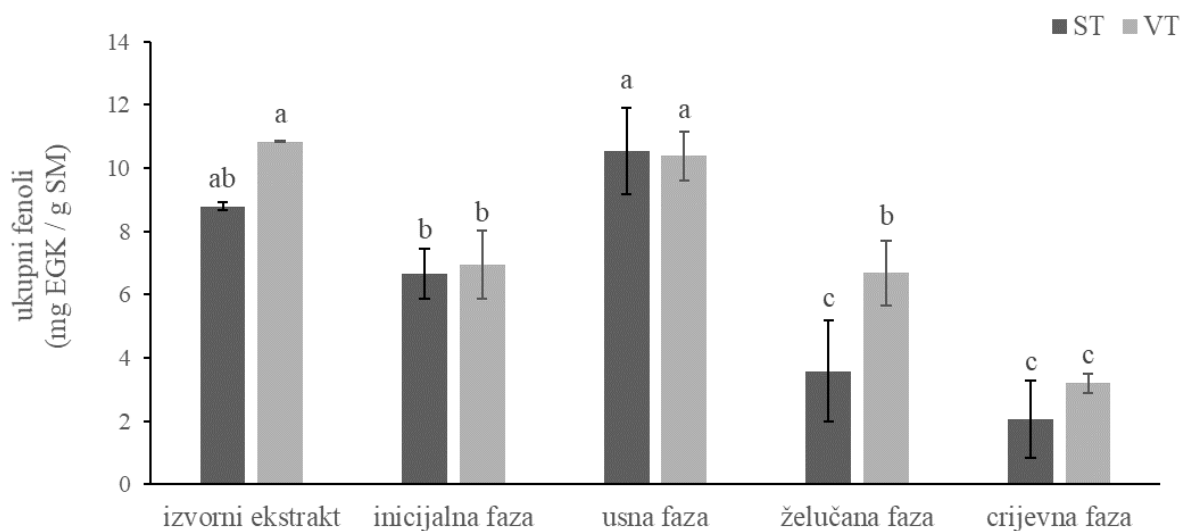
### 3.13. Statistička obrada podataka

Prikupljene sam podatke statistički usporedio jednosmjernom analizom varijance (ANOVA-om) i primjenom testa „*Duncan's New Multiple Range Test*“ (test višestrukih usporedbi *post hoc*) u programu Statistica 13.1 (StatSoft Inc., SAD). Usporedio sam sve uzorke (prije i nakon svake faze probave) međusobno. Dobivene srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama i statističkom značajnošću prikazao sam grafikonima pomoću programa Microsoft Office 365: Excel (Microsoft Corporation, SAD).

## 4. REZULTATI

#### 4.1. Utjecaj visoke temperature na udio ukupnih fenolnih spojeva u izvornom ekstraktu i tijekom *in vitro* probave

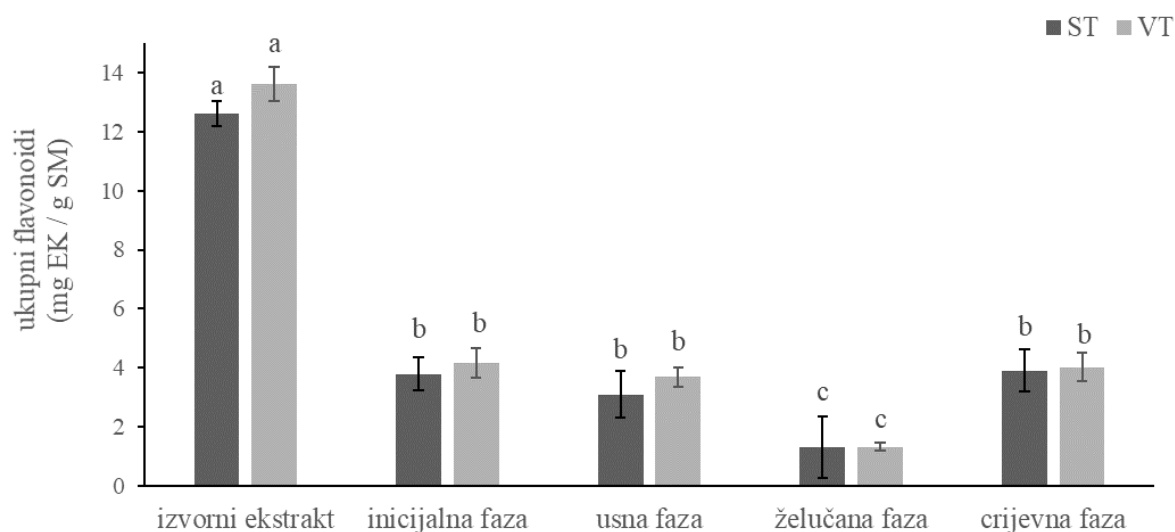
Na slici 2. prikazani su rezultati utjecaja visoke temperature na udio ukupnih fenolnih spojeva u izvornom ekstraktu, inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro*. Uzgoj pri visokoj temperaturi rezultirao je nešto višim udjelom ukupnih fenolnih spojeva u izvornom ekstraktu klica brokule u odnosu na uzgoj pri sobnoj temperaturi, no na razini  $p \leq 0,05$  to nije bilo statistički značajno; pri sobnoj temperaturi iznosio je 8,79 mg EGK / g SM, a pri visokoj temperaturi 10,84 mg EGK / g SM. Značajna razlika u udjelu ove skupine spojeva zamijećena je jedino u fazi želuca; klice brokule uzgajane na visokoj temperaturi imale su značajno veći udio ukupnih fenolnih spojeva u odnosu na klice pri sobnoj temperaturi. Ista tendencija zamijećena je i u fazi crijeva, no na razini  $p \leq 0,05$  razlika nije bila statistički značajna. Općenito, visoka temperatura je povećala ili nije značajno promijenila udio ukupnih fenolnih spojeva u klicama brokule.



Slika 2. Udio ukupnih fenolnih spojeva klica brokule prije probave *in vitro* (izvorni ekstrakt), u inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro* (faza usta, želuca i crijeva) izražen u miligramima ekvivalenta galne kiseline po gramu suhe mase uzorka (mg EGK / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ) prikazane su različitim slovima. ST = sobna temperatura, VT = visoka temperatura.

#### 4.2. Utjecaj visoke temperature na udio ukupnih flavonoida u izvornom ekstraktu i tijekom *in vitro* probave

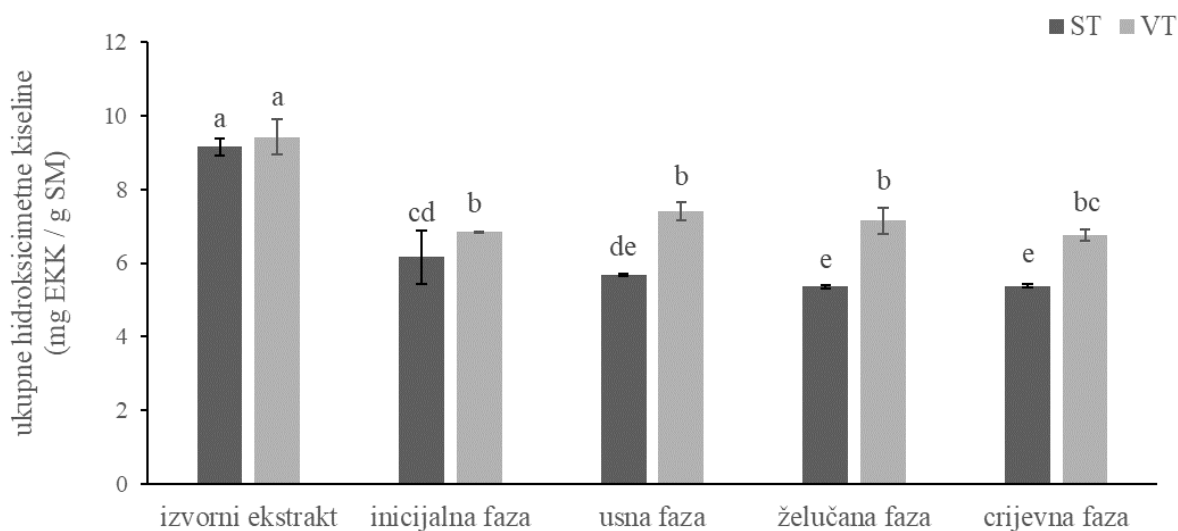
Na slici 3. prikazani su rezultati utjecaja visoke temperature na udio ukupnih flavonoida izvornom ekstraktu, inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro*. U izvornom ekstraktu značajno je veći udio ukupnih flavonoida (12,60 mg EK / g SM pri sobnoj temperaturi i 13,61 mg EK / g SM pri visokoj temperaturi) nego u fazama probave *in vitro*. Nije pronađena značajna razlika u udjelima ukupnih flavonoida između klica brokule uzgajanih na sobnoj i visokoj temperaturi niti prije probave (izvorni ekstrakt), niti u bilo kojoj od faza probave. Općenito, visoka temperatura nije značajno promijenila udio ukupnih flavonoida u klicama brokule.



Slika 3. Udio ukupnih flavonoida klica brokule prije probave *in vitro* (izvorni ekstrakt), u inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro* (faza usta, želuca i crijeva) izražen u miligramima ekvivalenta kvercetina po gramu suhe mase uzorka (mg EK / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ) prikazane su različitim slovima. ST = sobna temperatura, VT = visoka temperatura.

### 4.3. Utjecaj visoke temperature na udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina u izvornom ekstraktu i tijekom *in vitro* probave

Na slici 4. prikazani su rezultati utjecaja visoke temperature na udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina izvornom ekstraktu, inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro*. U izvornom ekstraktu značajno je veći udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina nego u fazama probave *in vitro*; pri sobnoj temperaturi iznosio je 9,15 mg EKK / g SM, a pri visokoj temperaturi 9,41 mg EKK / g SM. Nije zabilježena statistički značajna razlika u udjelu ovih kiselina između izvornog ekstrakta klica uzgajanih pri sobnoj i visokoj temperaturi. S druge strane, u inicijalnoj i svakoj od faza probave zabilježen je značajno veći udio hidroksicimetnih kiselina kod klica brokule uzgajanih na visokoj temperaturi. Generalno, visoka temperatura je povećala ili nije promijenila udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina u klicama brokule.

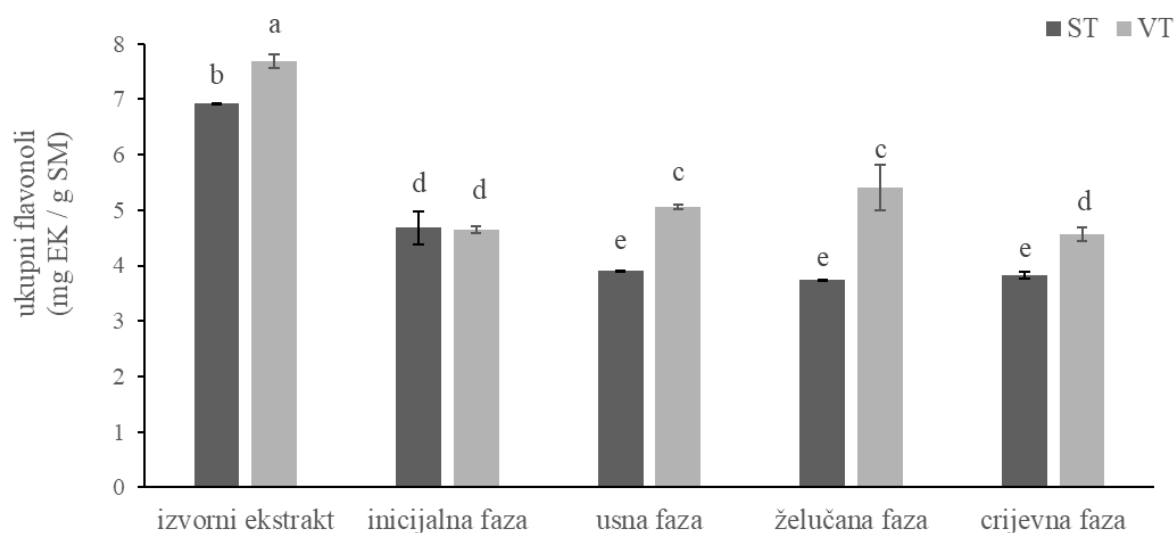


Slika 4. Udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina klica brokule prije probave *in vitro* (izvorni ekstrakt), u inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro* (faza usta, želuca i crijeva) izražen u miligramima ekvivalenta kavene kiseline po gramu suhe mase uzorka (mg EKK / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ) prikazane su različitim slovima. ST = sobna temperatura, VT = visoka temperatura.



#### 4.4. Utjecaj visoke temperature na udio ukupnih flavonola u izvornom ekstraktu i tijekom *in vitro* probave

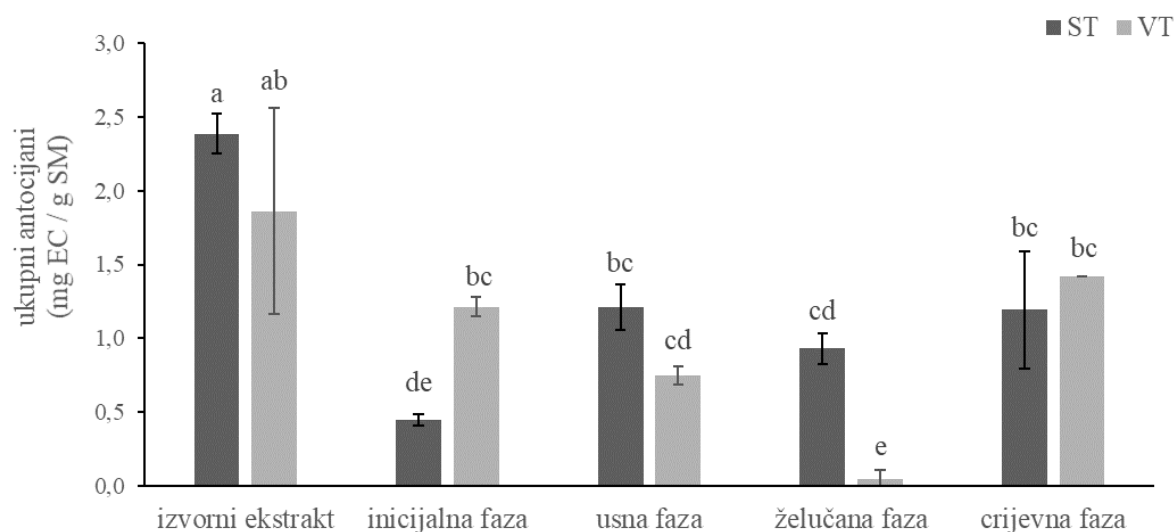
Na slici 5. prikazani su rezultati utjecaja visoke temperature na udio ukupnih flavonola u izvornom ekstraktu, inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro*. U izvornom ekstraktu, kao i u svim fazama probave, izuzev inicijalne, očava se povećanje koncentracije ukupnih flavonola kod klica brokule uzgajanih na visokoj temperaturi, osim u početnoj fazi probave *in vitro*. U izvornom ekstraktu otkriven je značajno veći udio ukupnih flavonola nego u fazama probave *in vitro*. U usnoj i želučanoj fazi koncentracija ukupnih flavonola veća je nego u inicijalnoj i crijevnoj fazi probave *in vitro* kod klica brokule uzgajanih na visokoj temperaturi. Općenito, visoka temperatura je ili povećala ili nije promijenila udio ukupnih flavonola u klicama brokule.



Slika 5. Udio ukupnih flavonola klica brokule prije probave *in vitro* (izvorni ekstrakt), u inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro* (faza usta, želuca i crijeva) izražen u miligramima ekvivalenta kvercetina po gramu suhe mase uzorka (mg EK / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ) prikazane su različitim slovima. ST = sobna temperatura, VT = visoka temperatura.

#### 4.5. Utjecaj visoke temperature na udio ukupnih antocijana u izvornom ekstraktu i tijekom *in vitro* probave

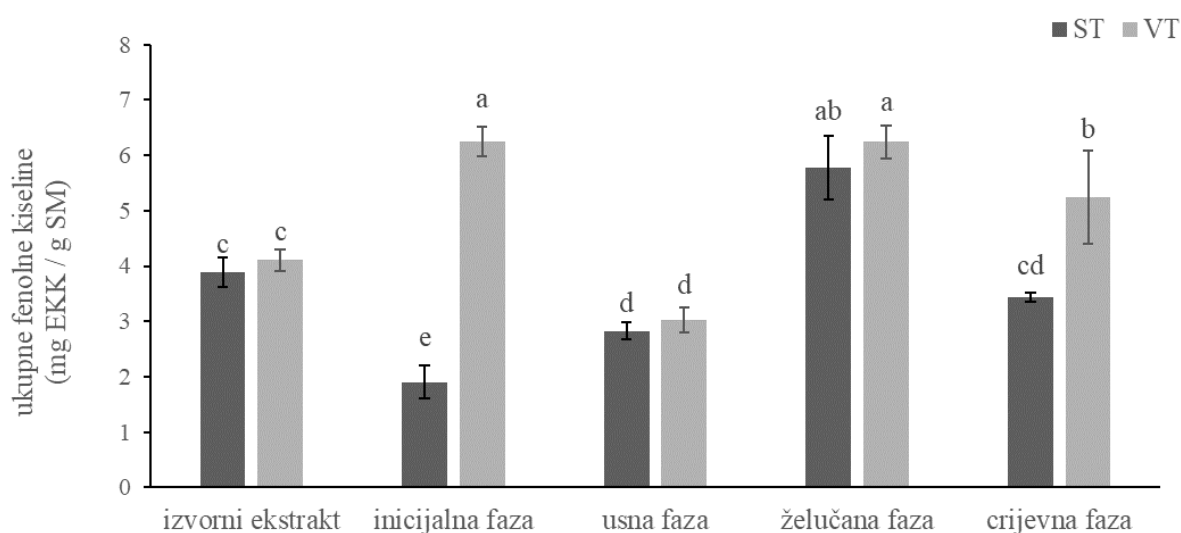
Na slici 6. prikazani su rezultati utjecaja visoke temperature na udio ukupnih antocijana u izvornom ekstraktu, inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro*. U izvornom ekstraktu značajno je veći udio ukupnih antocijana nego u fazama probave *in vitro*. Pri visokoj temperaturi dolazi do tendencije smanjivanja ukupnih antocijana u izvornom ekstraktu, no zbog velike standardne devijacije to nije statistički značajno. U inicijalnoj fazi uočavam značajno veći udio antocijana kod klica brokule uzgajanih na visokoj temperaturi, dok je u želučanoj fazi probave pri visokoj temperaturi udio antocijana značajno niži. Također, klice brokule uzgajane pri sobnoj temperaturi imale su najniži udio antocijana u inicijalnoj fazi, dok su one uzgajane pri visokoj temperaturi najmanje antocijana imale u fazi želuca.



Slika 6. Udio ukupnih antocijana klica brokule prije probave *in vitro* (izvorni ekstrakt), u inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro* (faza usta, želuca i crijeva) izražen u miligramima ekvivalenta cijanidin-3-glukozida po gramu suhe mase uzorka (mg EC-3-g/g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ) prikazane su različitim slovima. ST = sobna temperatura, VT = visoka temperatura.

#### 4.6. Utjecaj visoke temperature na udio ukupnih fenolnih kiselina u izvornom ekstraktu i tijekom *in vitro* probave

Na slici 7. prikazani su rezultati utjecaja visoke temperature na udio ukupnih fenolnih kiselina u izvornom ekstraktu, inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro*. U inicijalnoj i fazi crijeva uočavam značajno viši udio fenolnih kiselina kod klica brokule uzgajanih pri visokoj temperaturi. U izvornom ekstraktu, fazi usta i želuca visoka temperatura nije značajno utjecala na udio fenolnih kiselina u klicama brokule. Generalno, visoka temperatura je ili povećala ili nije promijenila udio fenolnih kiselina u klicama brokule.



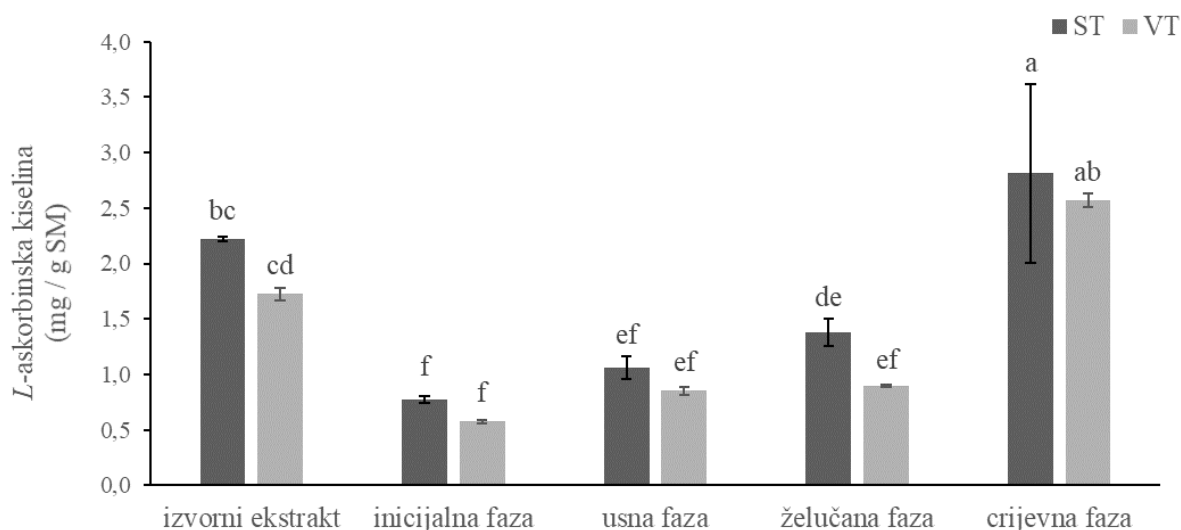
Slika 7. Udio ukupnih fenolnih kiselina klica brokule prije probave *in vitro* (izvorni ekstrakt), u inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro* (faza usta, želuca i crijeva) izražen u miligramima ekvivalenta kavene kiseline po gramu suhe mase uzorka (mg EKK / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ) prikazane su različitim slovima. ST = sobna temperatura, VT = visoka temperatura.

#### 4.7. Utjecaj visoke temperature na udio pojedinačnih fenolnih spojeva u izvornom ekstraktu i tijekom *in vitro* probave

Metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) razdvojeni su, identificirani i kvantificirani flavonoidi kvercetin, kempferol i tilirozid, hidroksibenzojeve kiseline benzojeva i galna, hidroksicimentne kiseline kavena, *p*-kumarinska, ferulična i sinapinska, te vitamin C (*L*-askorbinska kiselina) iz klica brokule.

##### 4.7.1. Utjecaj visoke temperature na udio *L*-askorbinske kiseline u izvornom ekstraktu i tijekom *in vitro* probave

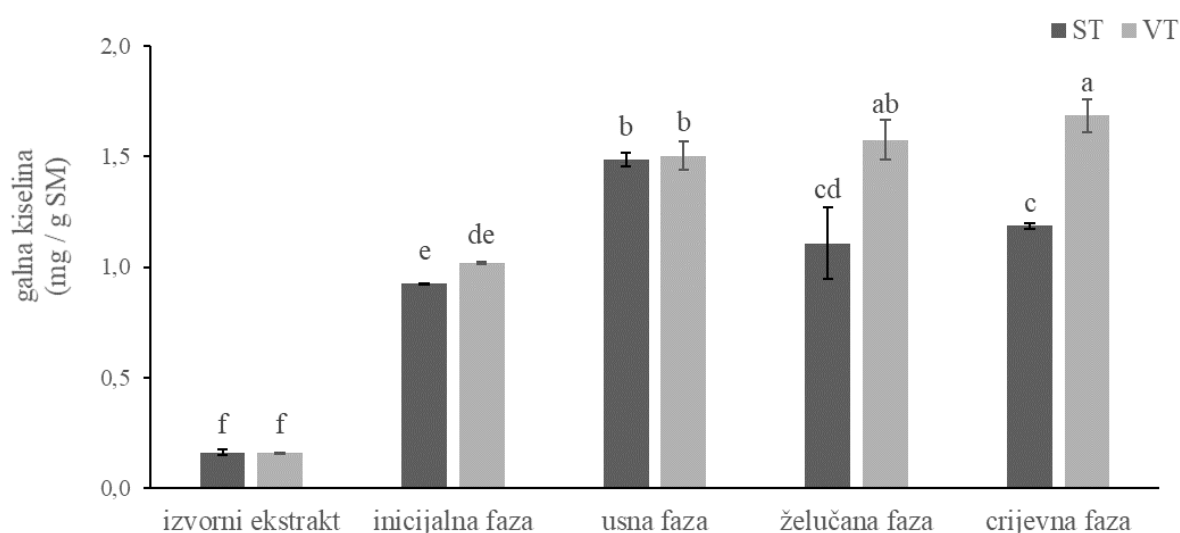
Visoka temperatura nije značajno promijenila udio *L*-askorbinske kiseline ni u izvornom ekstraktu, niti tijekom probave (sl. 8.) iako je primjetna tendencija blagog pada ovog vitamina. Tijekom simulirane ljudske probave od faze usta do faze crijeva udio *L*-askorbinske kiseline se povećava i kod klica uzgajanih pri sobnoj i kod onih uzgajanih pri visokoj temperaturi (slika 8.).



Slika 8. Udio *L*-askorbinske kiseline u klicama brokule prije probave *in vitro* (izvorni ekstrakt), u inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro* (faza usta, želuca i crijeva) izražen u miligramima po gramu suhe mase uzorka (mg / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ) prikazane su različitim slovima. ST = sobna temperatura, VT = visoka temperatura.

#### 4.7.2. Utjecaj visoke temperature na udio galne kiseline u izvornom ekstraktu i tijekom *in vitro* probave

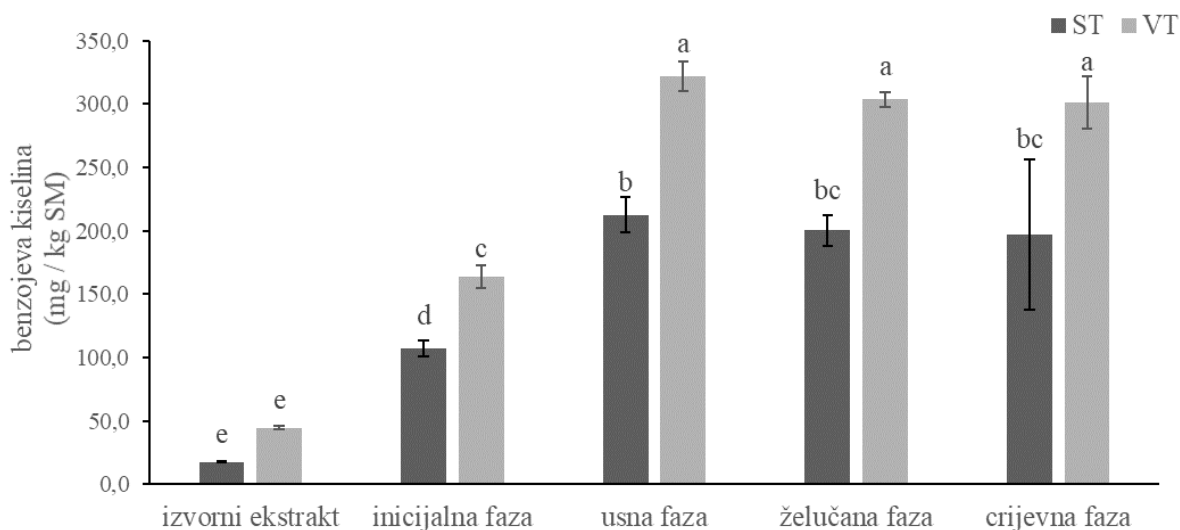
Visoka temperatura povećala je (želučana i crijevna faza probave *in vitro*) ili nije utjecala na udio galne kiseline (slika 9.). Tijekom simulirane ljudske probave uočava se tendencija povećanja udjela galne kiseline kod klica uzgajanih pri visokoj temperaturi, dok kod onih uzgajanih pri sobnoj raste u fazi usta, ali se snižava u želučanoj i crijevnoj fazi probave.



Slika 9. Udio galne kiseline u klicama brokule prije probave *in vitro* (izvorni ekstrakt), u inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro* (faza usta, želuca i crijeva) izražen u miligramima po gramu suhe mase uzorka (mg / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ) prikazane su različitim slovima. ST = sobna temperatura, VT = visoka temperatura.

#### 4.7.3. Utjecaj visoke temperature na udio benzojeve kiseline u izvornom ekstraktu i tijekom *in vitro* probave

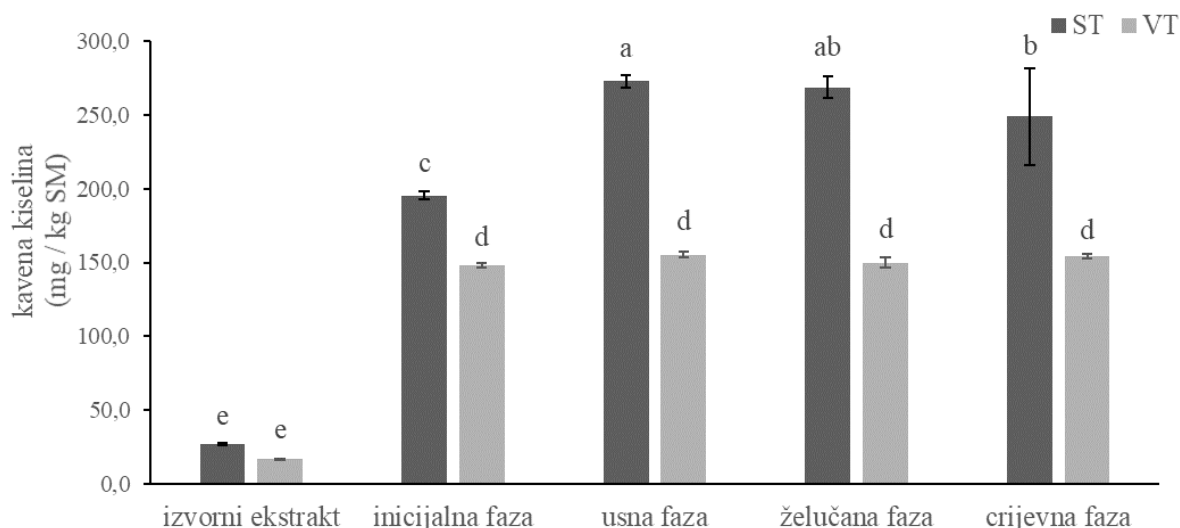
Visoka temperatura povećala je udio benzojeve kiseline u svim uzorcima klica brokule tijekom probave *in vitro* (slika 10.). Faza usta, želuca i crijeva imaju podjednak udio benzojeve kiseline, a veći u odnosu na inicijalnu fazu i izvorni ekstrakt, neovisno pri kojoj temperaturi su klice brokule bile uzgajane (slika 10.).



Slika 10. Udio benzojeve kiseline u klicama brokule prije probave *in vitro* (izvorni ekstrakt), u inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro* (faza usta, želuca i crijeva) izražen u miligramima po kilogramu suhe mase uzorka (mg / kg SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ) prikazane su različitim slovima. ST = sobna temperatura, VT = visoka temperatura.

#### 4.7.4. Utjecaj visoke temperature na udio kavene kiseline u izvornom ekstraktu i tijekom *in vitro* probave

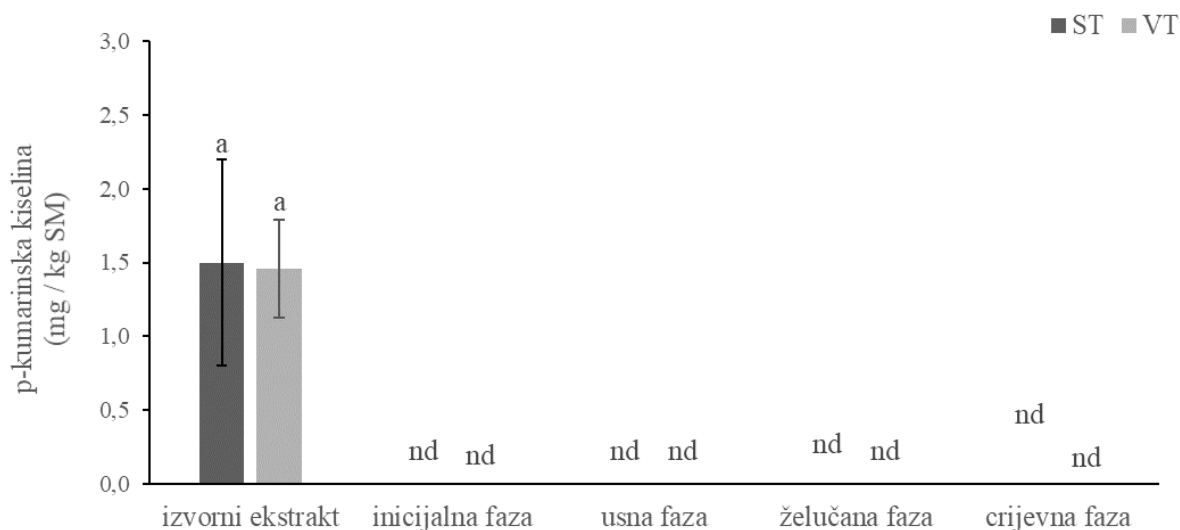
Na slici 11. prikazani su rezultati utjecaja visoke temperature na udio kavene kiseline u izvornom ekstraktu, inicijalnoj fazi i za vrijeme pojedine faze probave *in vitro*. U inicijalnoj fazi i tijekom probave uočava se značajno manji udio kavene kiseline kod klica uzgajanih na visokoj temperaturi nego na sobnoj. Također, kod obje pokusne skupine veći je udio kavene kiseline u usnoj, želučanoj i crijevnoj fazi probave nego u inicijalnoj fazi, a razlika je još značajnija u odnosu na izvorni ekstrakt u kojemu je zabilježen najniži udio ove kiseline pri obje temperature.



Slika 11. Udio kavene kiseline u klicama brokule prije probave *in vitro* (izvorni ekstrakt), u inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro* (faza usta, želuca i crijeva) izražen u miligramima po kilogramu suhe mase uzorka (mg / kg SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ) prikazane su različitim slovima. ST = sobna temperatura, VT = visoka temperatura.

#### 4.7.5. Utjecaj visoke temperature na udio *p*-kumarinske kiseline u izvornom ekstraktu i tijekom *in vitro* probave

Na slici 11. prikazani su rezultati utjecaja visoke temperature na udio *p*-kumarinske kiseline u izvornom ekstraktu klica brokule. Nije zabilježena značajna razlika u udjelu *p*-kumarinske kiseline između klica uzgajanih pri sobnoj i visokoj temperaturi. U uzorcima probave *in vitro* ova kiselina bila je ispod razine detekcije.

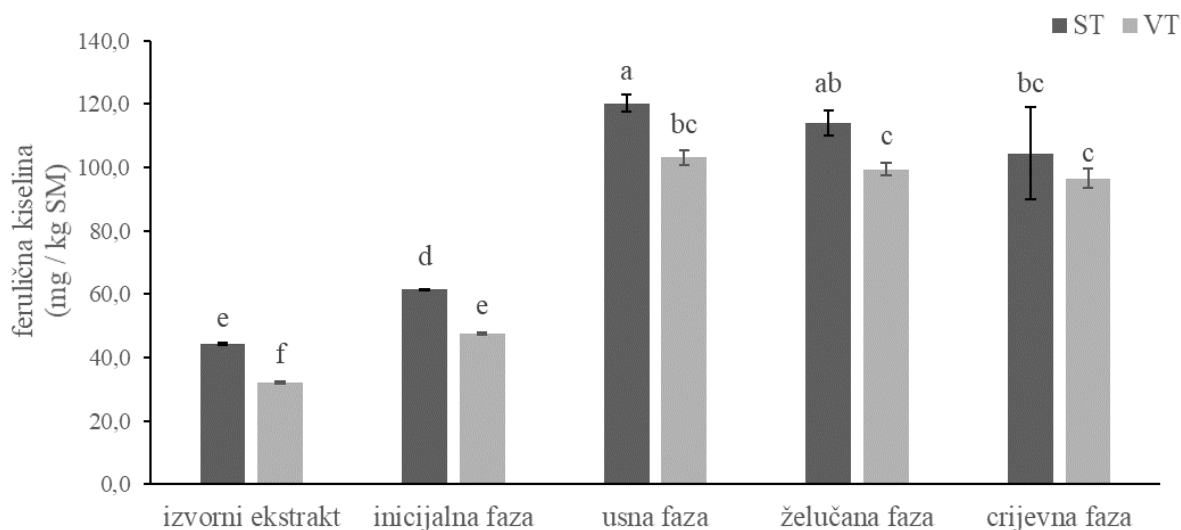


Slika 12. Udio *p*-kumarinske kiseline u klicama brokule prije probave *in vitro* (izvorni ekstrakt), u inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro* (faza usta, želuca i crijeva) izražen u miligramima po kilogramu suhe mase uzorka (mg / kg SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ) prikazane su različitim slovima. ST = sobna temperatura, VT = visoka temperatura.

#### 4.7.6. Utjecaj visoke temperature na udio ferulične kiseline u izvornom ekstraktu i tijekom *in vitro* probave

Na slici 13. prikazani su rezultati utjecaja visoke temperature na udio ferulične kiseline u izvornom ekstraktu, inicijalnoj fazi i za vrijeme pojedine faze probave *in vitro*. I u izvornom ekstraktu, kao i tijekom probave uočava se manji udio ferulične kiseline kod klica uzgajanih na visokoj temperaturi nego na sobnoj. Razlika je manje izražena nego za kavenu kiselinu prikazanu na slici 11. Također, kod obje pokusne skupine veći je udio ferulične kiseline u usnoj, želučanoj i crijevnoj fazi probave nego u inicijalnoj fazi, a razlika je još značajnija u odnosu na izvorni ekstrakt u kojemu je zabilježen najniži udio ove kiseline pri obje temperature.

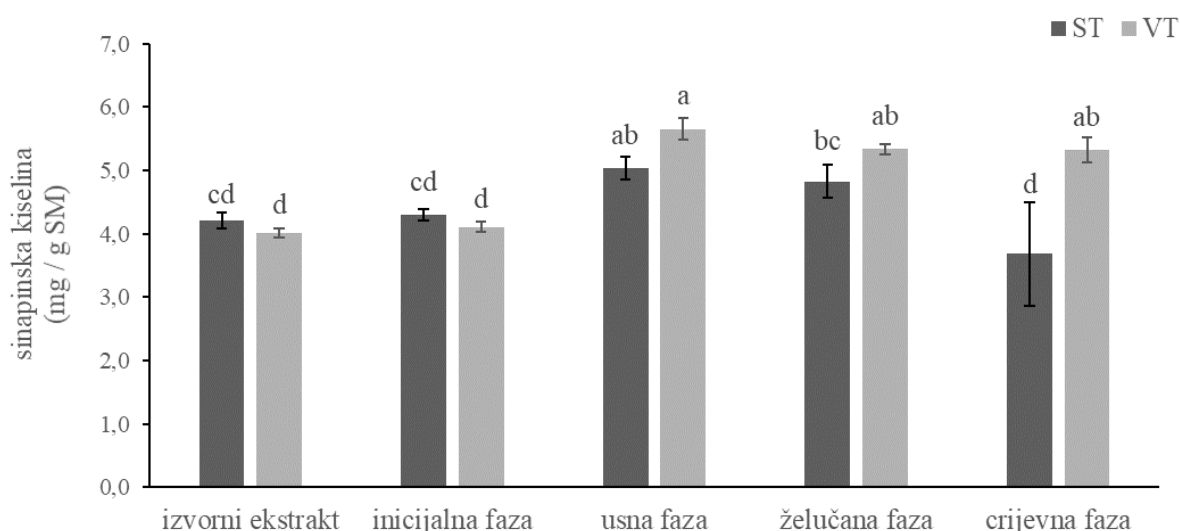




Slika 13. Udio ferulične kiseline u klicama brokule prije probave *in vitro* (izvorni ekstrakt), u inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro* (faza usta, želuca i crijeva) izražen u miligramima po kilogramu suhe mase uzorka (mg / kg SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ) prikazane su različitim slovima. ST = sobna temperatura, VT = visoka temperatura.

#### 4.7.7. Utjecaj visoke temperature na udio sinapinske kiseline u izvornom ekstraktu i tijekom *in vitro* probave

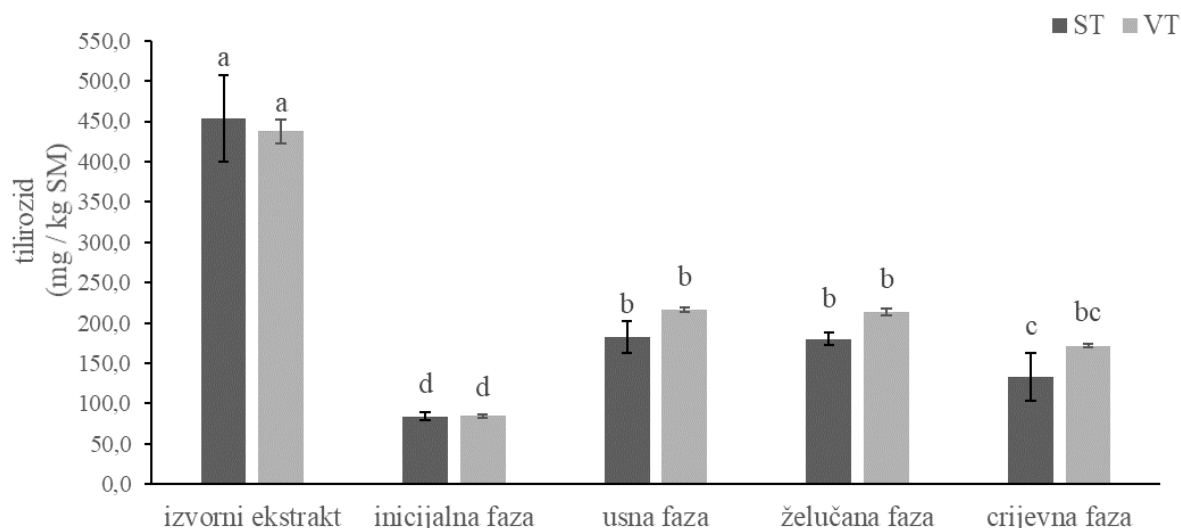
Na slici 14. prikazani su rezultati utjecaja visoke temperature na udio sinapinske kiseline u izvornom ekstraktu, inicijalnoj fazi i za vrijeme pojedine faze probave *in vitro*. Istaknut je veći udio sinapinske kiseline u usnoj fazi probave nego u inicijalnoj fazi. Prije probave *in vitro* nema značajne razlike u udjelu sinapinske kiseline između klica brokule uzgajanih na sobnoj i visokoj temperaturi, dok je za vrijeme probave u fazi crijeva veći udio ove kiseline zabilježen kod klica uzgajanih na visokoj temperaturi.



Slika 14. Udio sinapinske kiseline u klicama brokule prije probave *in vitro* (izvorni ekstrakt), u inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro* (faza usta, želuca i crijeva) izražen u miligramima po gramu suhe mase uzorka (mg / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ) prikazane su različitim slovima. ST = sobna temperatura, VT = visoka temperatura.

#### 4.7.8. Utjecaj visoke temperature na udio tilirozida u izvornom ekstraktu i tijekom *in vitro* probave

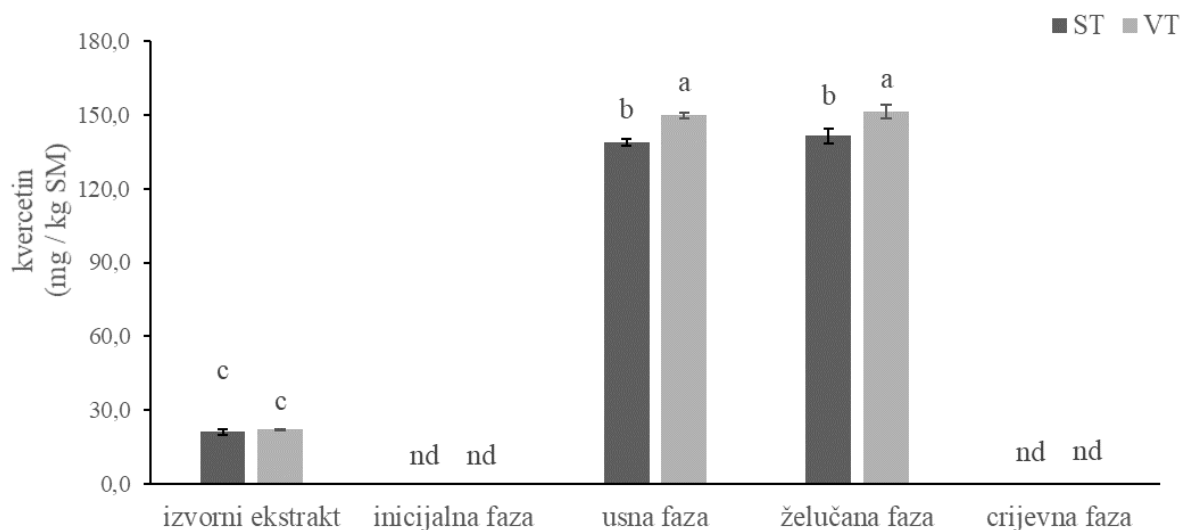
Na slici 15. prikazani su rezultati utjecaja visoke temperature na udio tilirozida u izvornom ekstraktu, inicijalnoj fazi i za vrijeme pojedine faze probave *in vitro*. Nema značajne razlike između udjela tilirozida u klicama brokule uzgajanim na različitim temperaturama. Najveći udio tilirozida detektiran je u izvornom ekstraktu, najmanji u inicijalnoj fazi probave dok je u usnoj, želučanoj i crijevnoj fazi zabilježen vrlo sličan udio tilirozida.



Slika 15. Udio tilirozida u klicama brokule prije probave *in vitro* (izvorni ekstrakt), u inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro* (faza usta, želuca i crijeva) izražen u miligramima po kilogramu suhe mase uzorka (mg / kg SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ) prikazane su različitim slovima. ST = sobna temperatura, VT = visoka temperatura.

#### 4.7.9. Utjecaj visoke temperature na udio kvercetina u izvornom ekstraktu i tijekom *in vitro* probave

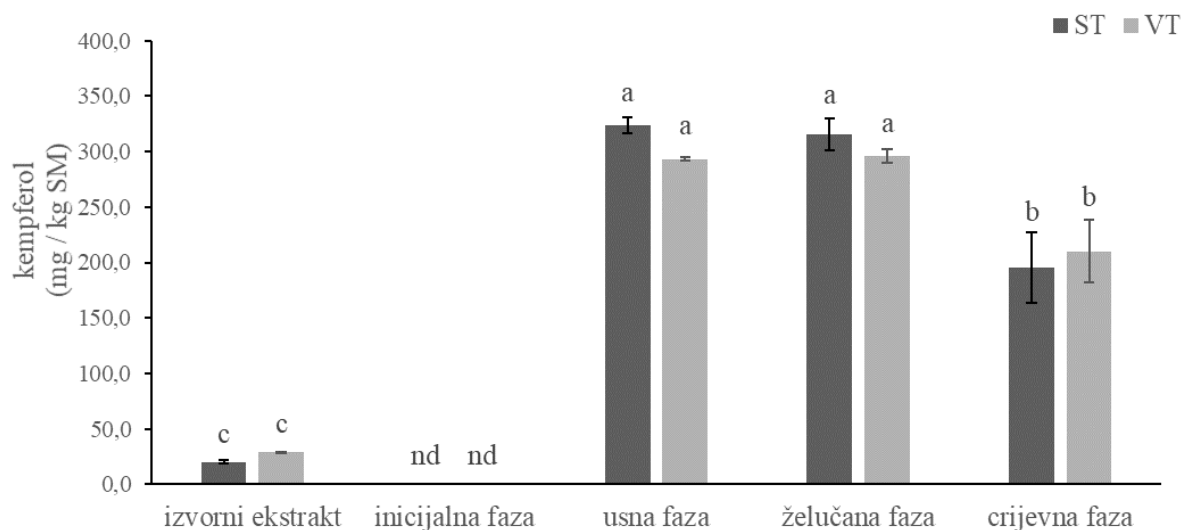
Na slici 16. prikazani su rezultati utjecaja visoke temperature na udio kvercetina u izvornom ekstraktu, inicijalnoj fazi i za vrijeme pojedine faze probave *in vitro*. U izvornom ekstraktu očitano je značajno manji udio kvercetina nego li u usnoj i želučanoj fazi probave. U inicijalnoj i crijevnoj fazi probave kvercetin nije detektiran. U izvornom ekstraktu nije uočena razlika u udjelu kvercetina između klica uzgojenih na sobnoj i visokoj temperaturi, dok je u fazi usta i želuca u klicama uzgojenim pri visokoj temperaturi udio ovog flavonoida značajno veći nego u klica uzgojenih pri sobnoj temperaturi.



Slika 16. Udio kvercetina u klicama brokule prije probave *in vitro* (izvorni ekstrakt), u inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro* (faza usta, želuca i crijeva) izražen u miligramima po kilogramu suhe mase uzorka (mg / kg SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ) prikazane su različitim slovima. ST = sobna temperatura, VT = visoka temperatura.

#### 4.7.10. Utjecaj visoke temperature na udio kempferola u izvornom ekstraktu i tijekom *in vitro* probave

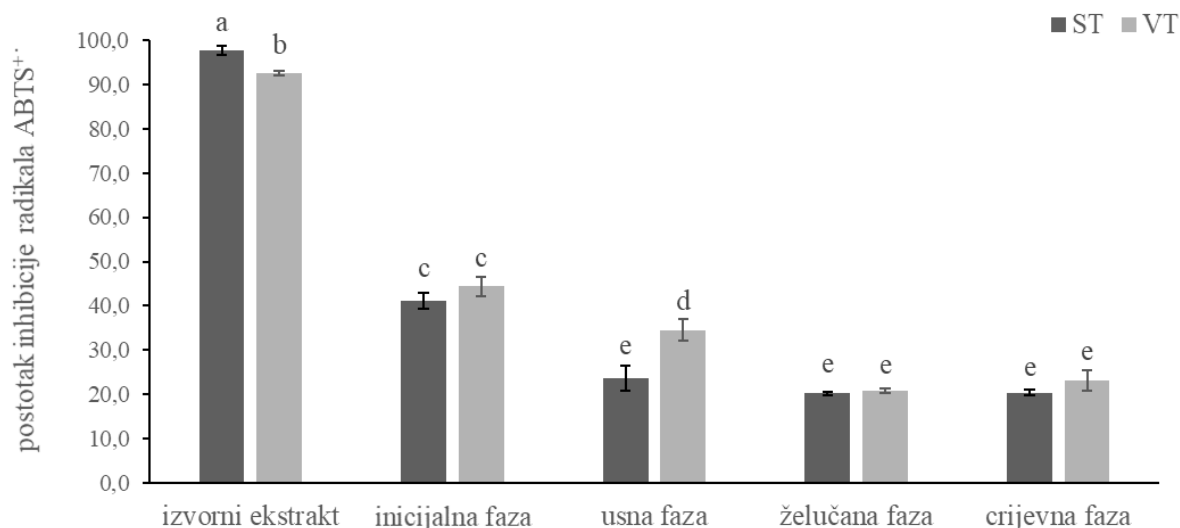
Na slici 17. prikazani su rezultati utjecaja visoke temperature na udio kempferola u izvornom ekstraktu, inicijalnoj fazi i za vrijeme pojedine faze probave *in vitro*. Najveći udio kempferola uočen je u usnoj i želučanoj fazi probave, značajno manji udio u crijevnoj fazi, a najmanji u izvornom ekstraktu. Kempferol nije detektiran u usnoj fazi probave. Nije uočena razlika u udjelu kempferola između klica uzgojenih na sobnoj i visokoj temperaturi ni prije, niti tijekom probave.



Slika 17. Udio kempferola u klicama brokule prije probave *in vitro* (izvorni ekstrakt), u inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro* (faza usta, želuca i crijeva) izražen u miligramima po kilogramu suhe mase uzorka (mg / kg SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ) prikazane su različitim slovima. ST = sobna temperatura, VT = visoka temperatura.

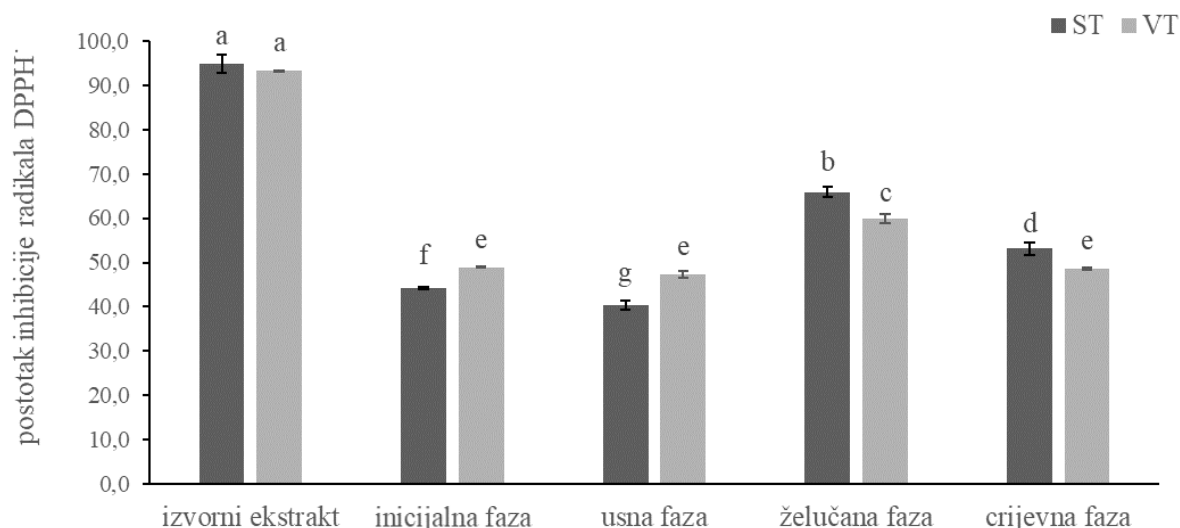
#### 4.8. Utjecaj visoke temperature na antioksidacijski potencijal izvornog ekstrakta klica brokule i za vrijeme probave *in vitro*

Na slici 18. prikazani su rezultati utjecaja visoke temperature na antioksidacijski potencijal klica brokule, izmjeren metodom ABTS, u izvornom ekstraktu, inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro*. Najveći antioksidacijski potencijal detektiran je u izvornom ekstraktu, pri čemu je visoka temperatura snizila taj potencijal. Značajno manji antioksidacijski potencijal detektiran je u inicijalnoj fazi probave gdje nema razlike između pokusnih skupina. U fazama probave (usnoj, želučanoj i crijevnoj) zabilježen je najniži antioksidacijski potencijal, pri čemu su jedino u fazi usta klice uzgojene pri visokoj temperaturi imale veći antioksidacijski potencijal od onih uzgojenih pri sobnoj temperaturi.



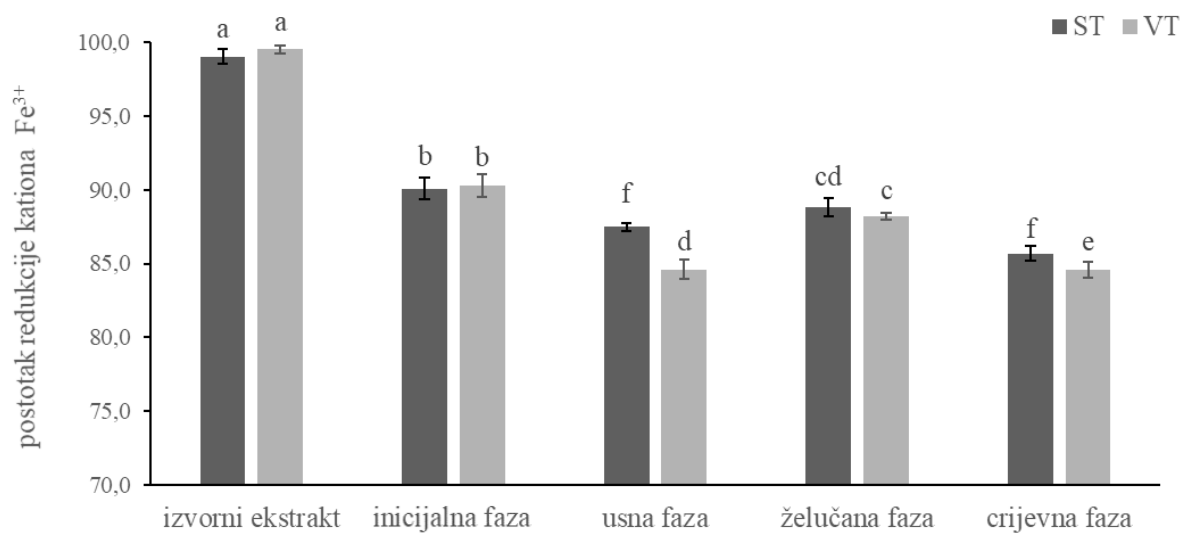
Slika 18. Antioksidacijski potencijal klica brokule prije probave *in vitro* (izvorni ekstrakt), u inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro* (faza usta, želuca i crijeva) izmjeren metodom ABTS. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ) prikazane su različitim slovima. ST = sobna temperatura, VT = visoka temperatura.

Na slici 19. prikazani su rezultati utjecaja visoke temperature na antioksidacijski potencijal klica brokule, izmjeren metodom DPPH, u izvornom ekstraktu, inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro*. Najveći antioksidacijski potencijal detektiran je u izvornom ekstraktu, pri čemu nije vidljiva razlika između klica uzgajanih na različitim temperaturama. U inicijalnoj i fazi usta izmjeren je najniži antioksidacijski potencijal, s tim da je viši kod klica brokule uzgajanih na visokoj temperaturi. S druge strane, u želučanoj i crijevnoj fazi klice brokule uzgajane na visokoj temperaturi imale su niži antioksidacijski potencijal od onih na sobnoj temperaturi.



Slika 19. Antioksidacijski potencijal klica brokule prije probave *in vitro* (izvorni ekstrakt), u inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro* (faza usta, želuca i crijeva) izmjeren metodom DPPH. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ) prikazane su različitim slovima. ST = sobna temperatura, VT = visoka temperatura.

Na slici 20. prikazani su rezultati utjecaja visoke temperature na antioksidacijski potencijal klica brokule, izmjeren metodom FRAP, u izvornom ekstraktu, inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro*. Najveći antioksidacijski potencijal detektiran je u izvornom ekstraktu, s tim da nije bilo razlike između klica na sobnoj i visokoj temperaturi. Razlika između pokusnih skupina uočava se u fazi usta i crijeva, gdje je visoka temperatura uzrokovala smanjivanje antioksidacijskog potencijala.



Slika 20. Antioksidacijski potencijal klica brokule prije probave *in vitro* (izvorni ekstrakt), u inicijalnoj fazi i tijekom pojedine faze probave *in vitro* (faza usta, želuca i crijeva) izmjeren metodom FRAP. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ) prikazane su različitim slovima. ST = sobna temperatura, VT = visoka temperatura.



## 5. RASPRAVA

Visoke temperature (38°C) uzrokuju globalne promjene u ekspresiji gena i profilima metabolita, a samim time i promjene nutritivne vrijednosti i biopotencijala biljaka (Olennikov i sur. 2017; Ragusa i sur. 2017). To je od posebne važnosti kada se radi o biljkama koje se intenzivno uzgaja i konzumira kao što je primjerice povrće iz porodice Brassicaceae (kupusnjače) koje predstavlja glavni dio ljudske prehrane (Jahangir i sur. 2009). Dokazano je da temperatura uzgoja utječe na senzornu kvalitetu (aroma, tekstura i okus) kupusnjača, što je povezano s promjenom sadržaja njihovih bioaktivnih spojeva (Mølmann i sur. 2015). Klice su građene od mladog tkiva koje je biokemijski vrlo aktivno, pa su u mnogo slučajeva bogatije bioaktivnim spojevima od zrelih jedinki (Wojdyło i sur. 2020). Štoviše, koncentracija polifenolnih spojeva i glukozinolata 10 puta je veća u klicama u usporedbi sa zrelim biljkama kupusnjača (Cevallos-Casals i Cisneros-Zevallos 2010). Ovo je i jedan od razloga zašto su klice kupusnjača prepoznate kao funkcionalna hrana bogata bioaktivnim spojevima koji promiču zdravlje i sve su zastupljenije u ljudskoj prehrani. Klice brokule poznate su kao odličan izvor izotiocijanata, snažnih antikancerogenih tvari, i podaci o biodostupnosti ovih spojeva, kao i učinak visoke temperature na njihovu koncentraciju su dostupni (Guo i sur. 2014). Međutim, o biodostupnosti polifenolnih biološki aktivnih spojeva klica brokule nema podataka, niti je istražen utjecaj visoke temperature na njihovu koncentraciju i antioksidacijski potencijal. Stoga sam u sklopu svog rada istražio u kojoj mjeri i u kojem smjeru povišena temperatura utječe na navedene parametre.

Udio ukupnih fenolnih spojeva detektiranih u izvornom ekstraktu klica brokule iznosio je 8,79 mg ekvivalenta galne kiseline / g SM pri sobnoj temperaturi i 10,84 mg ekvivalenta galne kiseline / g SM, što je unutar raspona 5,4 – 28,0 mg koji su zabilježili De La Fuente i sur. (2019) istom metodom za mlade biljke brokule. Uzgoj pri visokoj temperaturi nije značajno promijenio udio ukupnih fenolnih spojeva u izvornom ekstraktu klica brokule iako sam zamijetio tendenciju porasta (sl. 2.). Ista tendencija zabilježena je i za ukupne flavonoide (sl. 3.), hidroksicimetne kiseline (sl. 4.) i ukupne fenolne kiseline (sl. 7.). Za usporedbu, udio ukupnih flavonola značajno je porastao pod utjecajem visoke temperature (sl. 5.). Zanimljivo, iako udio ukupnih antocijana nije značajno promijenjen, primijećena je tendencija pada pod visokom temperaturom (sl. 6.). Na temelju ovih rezultata zaključujem da su ukupni flavonoli klica brokule, i moguće antocijani, podložni visokoj temperaturi okoliša dok su ukupni fenolni spojevi, flavonoidi, hidroksicimetne kiseline i ukupne fenolne kiseline termostabilni i njihov udio nije se značajno promijenio. Pretpostavljam da uzgoj na visokoj temperaturi pojačava oksidacijski stres u klicama brokule, zbog čega se one brane povećanjem udjela ukupnih flavonola. Ovo pokazuje da bi ukupni flavonoli kod klica brokule mogli biti dobri markeri

(abiotičkog) stresa uzrokovanog visokom temperaturom uzgoja te ukazuje mogućnost njihova korištenja u daljnjim istraživanjima temperaturnog stresa na biljkama. Martinez i sur. (2016) istražili su kako stres izazvan slanosti tla i toplinom utječe na fenolne spojeve u biljci u pogledu oksidativnog stresa. Otkriveno je da su flavonoli moćni antioksidansi, značajniji od hidroksicimetnih kiselina, koji pridonose otpornosti na abiotički stres.

Tijekom probave *in vitro* klice brokule uzgajane na visokoj temperaturi imale su veći udio ukupnih fenolnih spojeva u želučanoj fazi probave dok u ostalim fazama nije zabilježen značajan utjecaj (sl. 2.). Udio ukupnih flavonoida nije se mijenjao tijekom probave (sl. 3) i značajno je niži nego u izvornom ekstraktu. Ovo ukazuje na nestabilnost flavonoida u uvjetima probavnog sustava, ali i stabilnost prema visokoj temperaturi uzgoja. Kao i kod izvornog ekstrakta, udio ukupnih flavonola je i tijekom probave značajno viši u klica uzgajanih pri visokoj temperaturi, pa bi za unos veće koncentracije ukupnih flavonola u organizam savjet bio uzgajati klice brokule pri povišenoj temperaturi. Udio antocijana kod klica s visoke temperature pokazao je zanimljiv profil tijekom probave; naime, izuzetno je nizak nakon faze probave u želucu (sl. 6.). Niži udio zabilježen je i kod klica uzgojenih na sobnoj temperaturi, no to nije bila značajna promjena u odnosu na prethodnu fazu probave pa zaključujem da niska vrijednost pH želuca nije ključan razlog značajnog smanjenja udjela ukupnih antocijana u klicama uzgojenih na visokoj temperaturi, već je mogući uzrok promijenjen odnos antocijana i ostalih fitokemikalija u klicama koji za posljedicu ima nestabilnost antocijana pri povišenoj temperaturi. Udio ukupnih fenolnih kiselina tijekom probave u ustima i želucu nije se mijenjao, ali je zato nakon probave u fazi crijeva značajno viši kod klica uzgojenih pri visokoj temperaturi. I ovdje bi, kao i u slučaju ukupnih flavonola, za unos veće koncentracije fenolnih kiselina u organizam savjet bio uzgajati klice brokule pri povišenoj temperaturi. Također, zanimljivo je primijetiti da je razlika u udjelu ovih kiselina između klica uzgojenih pri sobnoj i visokoj temperaturi značajno veća nakon faze probave u crijevima nego kod izvornog ekstrakta, što pokazuje da, kada su u pitanju ukupne fenolne kiseline, uvjeti probave dodatno naglašavaju razliku između ove dvije skupine klica. Konačno, udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina u svakoj fazi probave značajno je viši u klicama s visoke temperature dok u izvornom ekstraktu razlike između skupina nije bilo, što govori da i u ovom slučaju uvjeti probave dodatno naglašavaju razliku između klica brokule sa sobne i visoke temperature. Na temelju navedenih rezultata zaključujem da visoka temperatura značajno utječe na biodostupnost ukupnih flavonola i hidroksicimetnih kiselina klica brokule; konkretno povećava njihovu biodostupnost.

Metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja (HPLC) usporedio sam koncentracije pojedinačnih spojeva (*L*-askorbinske kiseline (oblik vitamina C), fenolnih

kiselina i flavonoida) između klica uzgojenih pri sobnoj i visokoj temperaturi, te različitih faza probave *in vitro*. Visoka temperatura uzgoja nije značajno utjecala na koncentraciju vitamina C, galne, benzojeve, kavene, *p*-kumarinske i sinapinske kiseline, te flavonoida tilirozida, kvercetina i kempferola u izvornim ekstraktima klica brokule. Jedino je koncentracija ferulične kiseline značajno niža kod klica brokule uzgajanih na visokoj temperaturi. Stoga zaključujem da je među testiranim spojevima klica brokule ferulična kiselina najpodložnija visokoj temperaturi uzgoja. Ovo ukazuje na podložnost biosinteze i/ili kemijske strukture ferulične kiseline u klicama brokule visokoj temperaturi okoliša, te bi ju se kao takvu moglo razmotriti kao biomarker visoke temperature okoliša.

Uzgoj na visokoj temperaturi nije značajno utjecao na koncentraciju vitamina C niti u jednoj od faza probave. Ono što sam uočio jest da je biodostupnost ovog vitamina značajno niža u fazama usta i želuca u odnosu na izvorni ekstrakt pri obje temperature uzgoja, ali je zato u fazi crijeva viša. Sličan rezultat zabilježili su Sanz i Luyten (2006) za biodostupnost izoflavona iz mliječne kreme (*custard dessert*). S druge strane, Rodríguez-Roque i sur. (2013) analizirali su biodostupnost vitamina C iz miješanog voćnog (naranča, kivi i ananas) soka i zabilježili sukcesivni pad njegove biodostupnosti tijekom procesa probave. Najvjerojatniji razlog razlike u fazi crijeva između mog rezultata na klicama brokule i njihovog na miješanom voćnom soku jest različit postupak probave u crijevima. Naime, Rodríguez-Roque i sur. (2013) proveli su crijevnu fazu probave s dijalizom (koristili su dijalizni filter, tj. membranu) te odvojeno analizirali nedijalizirani dio ekstrakta (koji oni nazivaju crijevnom fazom) i dijalizirani dio, a ja sam proveo crijevnu fazu probave u jednom koraku, dakle bez dijalize. Drugi razlog mogao bi biti i različiti matriks, tj. ostali kemijski spojevi prisutni uz vitamin C u ekstraktu koji više ili manje stabiliziraju ovaj vitamin u crijevnoj fazi probave. Slično je zaključeno i vezano za biodostupnost karotenoida iz hrane (Southon i Faulks 2003). Uz to, veću biodostupnost fenolnih spojeva (kavene i ferulične kiseline) u crijevnoj fazi zabilježili su i Zhang i sur. (2020). Ukoliko je tome tako, tada zaključujem da matriks klica brokule stabilizira vitamin C u fazi crijeva, dok je matriks miješanog voćnog soka u tome manje učinkovit.

Iako u izvornom ekstraktu i fazi probave u ustima nije bilo razlike u koncentraciji galne kiseline između klica sa sobne i visoke temperature, njihovom daljnjom probavom u fazi želuca i crijeva razlika postaje značajna, klice s visoke temperature imaju značajno više galne kiseline od onih sa sobne temperature. Pretpostavljam da visoka temperatura mijenja matriks klica na način da on tada dodatno stabilizira galnu kiselinu u prisutnosti enzima želuca i crijeva i povećava njenu biodostupnost. Isto sam primijetio i za benzojevu kiselinu, štoviše njena je biodostupnost značajno veća iz klica uzgojenih pri visokoj temperaturi tijekom svih faza

probave, dok u izvornom ekstraktu nije bilo značajne razlike. Suprotno tome, biodostupnost kavene kiseline u svim fazama probave niža je iz biljaka uzgojenih pri visokoj temperaturi nego iz onih sa sobne temperature. Iako u izvornom ekstraktu to nije bilo vidljivo (nije bilo značajne razlike između dvije skupine biljaka), tijekom probave je razlika došla do punog izražaja. Ovo sugerira nestabilnost kavene kiseline u klicama brokule pri visokoj temperaturi okoliša i naglašava potrebu analize ekstrakata i u modelu probave budući da ti uvjeti očigledno dodatno naglašavaju potencijalne razlike između uzoraka. Pretpostavljam da što su uvjeti analize specifičniji, to će razlike između uzoraka doći više do izražaja.

Biodostupnost ferulične kiseline u fazi usta i želuca niža je iz biljaka uzgojenih pri visokoj nego sobnoj temperaturi, dok u fazi crijeva razlike nema. Dakle, uvjeti crijevne probave uklanjaju razliku u biodostupnosti ferulične kiseline iz klica brokule uzgojenih pri različitim temperaturama. Upravo suprotno ovome, biodostupnost sinapinske kiseline nije se razlikovala među skupinama biljaka sve do crijevne faze probave; tu je značajno veća iz klica uzgojenih pri visokoj temperaturi pa bi se za veći prinos ove kiseline u crijevu svakako preporučilo uzgajati klice brokule pri povišenoj temperaturi. Na temelju ovoga zaključujem da matriks biljke različito djeluje na biodostupnost različitih spojeva u uvjetima visoke temperature.

Što se tiče *p*-kumarinske kiseline, uopće je nisam detektirao za vrijeme probave, pa zaključujem da nije stabilna u takvim uvjetima, što potvrđuju i rezultati Zhang i sur. (2020).

Biodostupnost flavonoida tilirozida i kempferola ne razlikuju se u pokusnim skupina niti u jednoj od faza probave, dok je biodostupnost kvercetina u fazama usta i želuca viša kod klica uzgajanih na visokoj temperaturi. Iz ovoga zaključujem da, između ova tri flavonoida, uvjeti probave klica brokule uzgojenih pri različitim temperaturama najznačajnije djeluju na kvercetin.

Antioksidacijski potencijal izvornih ekstrakata klica brokule mjeren metodom ABTS smanjen je pri visokoj temperaturi uzgoja, dok metodama DPPH i FRAP nije zabilježena razlika između ispitanih skupina. Metoda ABTS osjetljivija je od ostale dvije metode jer je ABTS radikal topiv i u vodenom i u organskom mediju, što znači da može reagirati i s hidrofilnim i s lipofilnim antioksidansima (Floegel i sur. 2011; Almeida i sur. 2011), stoga pretpostavljam da visoka temperatura u slučaju klica brokule djeluje na oba tipa antioksidanasa i to u negativnom smislu. Budući da je izmjeren porast ukupnih fenolnih spojeva i flavonola, a jedino je udio ukupnih antocijana pokazao tendenciju pada pri visokoj temperaturi, mogli bi zaključiti da ili postoji značajan izvor drugih antioksidacijskih spojeva u klicama brokule koji su termolabilne prirode, ili tendencija smanjenja udjela antocijana značajno utječe na antioksidacijski potencijal.

Dobiveni rezultati u sklopu ovog rada predstavljaju osnovu za daljnja istraživanja utjecaja visoke temperature na metabolom biljaka i posljedično njihove biološke učinke. Činjenica da se u klicama brokule pod utjecajem visoke temperature biodostupnost određenih spojeva povećava mogla bi biti iskorištena za proizvodnju biljnog materijala obogaćenog ciljanim bioaktivnim spojevima.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih u sklopu ovog diplomskog rada zaključujem sljedeće:

1. Udio ukupnih fenolnih spojeva, flavonoida, fenolnih i hidroksicimetnih kiselina u izvornom ekstraktu klica brokule nije značajno promijenjen pod utjecajem visoke temperature uzgoja.
2. Udio ukupnih flavonola u izvornom ekstraktu i tijekom probave značajno je viši kod klica brokule uzgajanih pri visokoj temperaturi.
3. Udio ukupnih antocijana u izvornom ekstraktu nije značajno promijenjen, ali je primijećena tendencija pada pod visokom temperaturom uzgoja.
4. Tijekom probave *in vitro* klice brokule uzgajane na visokoj temperaturi imale su veći udio ukupnih fenolnih spojeva u želučanoj fazi probave, dok u ostalim fazama nije zabilježen značajan utjecaj.
5. Udio ukupnih fenolnih kiselina tijekom probave u ustima i želucu nije se mijenjao, ali je zato nakon probave u fazi crijeva značajno viši kod klica uzgojenih pri visokoj temperaturi.
6. Udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina u svakoj fazi probave značajno je viši u klicama uzgajanim pri visokoj temperaturi dok u izvornom ekstraktu razlike između skupina nije bilo.
7. Između pojedinačnih spojeva klica brokule ferulična kiselina najpodložnija je visokoj temperaturi uzgoja; njena biodostupnost značajno se smanji.
8. Iako u izvornom ekstraktu i fazi probave u ustima nije bilo razlike u koncentraciji galne kiseline između klica sa sobne i visoke temperature, njihovom daljnjom probavom u fazi želuca i crijeva razlika postaje značajna, klice s visoke temperature imaju značajno veću biodostupnost galne kiseline od onih sa sobne temperature.
9. Biodostupnost benzojeve kiseline značajno je veća iz klica brokule uzgojenih pri visokoj temperaturi tijekom svih faza probave, dok u izvornom ekstraktu nije bilo značajne razlike između uzoraka.
10. Biodostupnost kavene kiseline u svim fazama probave je niža u klica brokule uzgojenih pri visokoj temperaturi nego u onih sa sobne temperature.
11. Biodostupnost flavonoida tilirozida i kempferola ne razlikuju se u pokusnim skupinama niti u jednoj od faza probave dok je biodostupnost kvercetina u fazama usta i želuca viša kod klica uzgajanih na visokoj temperaturi.



## 7. LITERATURA

- Abellán, Á.; Domínguez-Perles, R.; Moreno, D. A.; García-Viguera, C. 2019. Sorting out the Value of Cruciferous Sprouts as Sources of Bioactive Compounds for Nutrition and Health. *Nutrients* 11/2. 429.
- Aires, A.; Fernandes, C.; Carvalho, R.; Bennett, R. N.; Saavedra, M. J.; Rosa, E. A. 2011. Seasonal effects on bioactive compounds and antioxidant capacity of six economically important *Brassica* vegetables. *Molecules* 16/8. 6816–6832.
- Almeida, M. M. B.; de Sousa, P. H. M.; Arriaga, Â. M. C.; do Prado, G. M.; Magalhães, C. E.; de C.; Maia, G. A.; de Lemos, T. L. G. 2011. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International* 44/7. 2155–2159.
- Avato, P.; Argentieri, M. P. 2015. Brassicaceae: a rich source of health improving phytochemicals. *Phytochemistry Reviews* 14. 1019-1033.
- Baenas, N.; Gómez-Jodar, I.; Moreno, D.A.; García-Viguera, C.; Periago, P.M. 2017. Broccoli and radish sprouts are safe and rich in bioactive phytochemicals. *Postharvest Biology and Technology* 127. 60–67.
- Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology* 299. 15-27.
- Bohn, T.; Carriere, F.; Day, L.; Deglaire, A.; Egger, L.; Freitas, D.; Golding, M.; Le Feunteun, S.; Macierzanka, A.; Menard, O.; Miralles, B.; Moscovici, A.; Portmann, R.; Recio, I.; Rémond, D.; Santé-Lhoutelier, V.; Wooster, T.J.; Lesmes, U.; Mackie, A. R.; Dupont, D. 2018. Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58/13. 2239-2261.
- Cevallos-Casals, B. A.; Cisneros-Zevallos, L. 2010. Impact of germination on phenolic content and antioxidant activity of 13 edible seed species. *Food Chemistry* 119/4. 1485-1490.
- Cheynier, V.; Comte, G.; Davies, K. M.; Lattanzio, V.; Martens, S. 2013. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry* 72. 1-20.
- De La Fuente, B.; López-García, G.; Máñez, V.; Alegría, A.; Barberá, R.; Cilla, A. 2019. Evaluation of the Bioaccessibility of Antioxidant Bioactive Compounds and Minerals of Four Genotypes of *Brassicaceae* Microgreens. *Foods* 8/7. 250.

- Floegel, A.; Kim, D.-O.; Chung, S.-J.; Koo, S. I.; Chun, O. K. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 24/7. 1043–1048.
- Ghasemzadeh, A.; Ghasemzadeh, N. 2011. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research* 5/31. 6697-6703.
- Guo, L.; Yang, R.; Wang, Z.; Guo, Q.; Gu, Z. 2014. Glucoraphanin, sulforaphane and myrosinase activity in germinating broccoli sprouts as affected by growth temperature and plant organs. *Journal of Functional Foods* 9. 70-77.
- Harborne, J. B. 1980. *Encyclopedia of plant physiology: Plant phenolics*. Springer-Verlag. New York.
- Howard, L. R.; Clark, J. R.; Brownmiller, C. 2003. Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83/12. 1238-1247.
- Jahangir, M.; Kim, H. K; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. 2009. Health-Affecting Compounds in Brassicaceae. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8/2. 31-43.
- Krstašice. 2021. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža. Zagreb. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=34206>. (pristupljeno 26. 10. 2021.)
- Lin, L.-Z. i Harnly, J. M. 2009. Identification of the Phenolic Components of Collard Greens, Kale, and Chinese Broccoli. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 57; 7401–7408.
- Lin, L.-Z. i Harnly, J. M. 2010. Phenolic Component Profiles of Mustard Greens, Yu Choy, and 15 Other Brassica Vegetables. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 58, 6850–6857.
- Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; Chandra, N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 4. 118-126.
- Lo Scalzo, R.; Genna, A.; Branca, F.; Chedin, M.; Chassaigne, H. 2008. Anthocyanin composition of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) and cabbage (*B. oleracea* L. var. *capitata*) and its stability in relation to thermal treatments. *Food Chemistry* 107. 136-144.
- Martinez, V.; Mestre, T. C.; Rubio, F.; Girones-Vilaplana, A.; Moreno, D. A.; Mittler, R.; Rivero, R. M. 2016. Accumulation of Flavonols over Hydroxycinnamic Acids Favors Oxidative Damage Protection under Abiotic Stress. *Frontiers in Plant Science* 7. 838.

- Miceli, N.; Cavò, E.; Ragusa, M.; Cacciola, F.; Mondelo, L.; Dugo, L.; Acquaviva, R.; Malfa, G. A.; Marino, A.; D'Arrigo, M.; Taviano, M. F. 2020. *Brassica incana* Ten. (Brassicaceae): Phenolic Constituents, Antioxidant and Cytotoxic Properties of the Leaf and Flowering Top Extracts. *Molecules* 25/6. 1461.
- Mølmann, J. A. B.; Steindal, A. L. H.; Bengtsson, G. B.; Seljåsen, R.; Lea, P.; Skaret, J.; Johansen, T. J. 2015. Effects of temperature and photoperiod on sensory quality and contents of glucosinolates, flavonols and vitamin C in broccoli florets. *Food Chemistry* 172. 47-55.
- Moreno, D.A.; Perez-Balibrea, S.; Garcia-Viguera, C. 2006. Phytochemical quality and bioactivity of edible sprouts. *Natural Product Communications* 11. 1037–1048.
- Njus, D.; Kelley, P. M.; Tu, Yi-Jung; Schlegel, H. B. 2020. Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine* 159. 37-43.
- Olennikov, D. N.; Chirikova, N. K.; Kashchenko, N. I.; Gornostai, T. G., Seyutina, I. Y.; Zilfikarov, I. N. 2017. Effect of Low Temperature Cultivation on the Phytochemical Profile and Bioactivity of Arctic Plants: A Case of *Dracocephalum palmatum*. *International Journal of Molecular Sciences* 18/12. 2579.
- Ough, C. S.; Amerine, M. A. 1988. *Methods Analysis of Musts and Wines: Phenolic compounds*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Plank, D.W.; Szpylka, J.; Sapirstein, H.D.; Woollard, D.; Zapf, C.M.; Lee, V.; Chen, C.-Y.O.; Liu, R.H.; Tsao, R.; Düsterloh, A.; Baugh, S. 2012. Determination of antioxidant activity in foods and beverages by reaction with 2,2'-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH): Collaborative study first action 2012.04. *Journal of AOAC International* 95/6. 1562-1569.
- Panche, A. N.; Diwan, A. D.; Chandra, S. R. 2016. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science* 5/47. 1-15.
- Ragusa, L.; Picchi, V.; Tribulato, A.; Cavallaro, C.; Scalzo, R. L.; Branca, F. 2016. The effect of the germination temperature on the phytochemical content of broccoli and rocket sprouts. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 68/4. 411-420.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26. 1231-1237.
- Rodríguez-Casado, A. 2016. The Health Potential of Fruits and Vegetables Phytochemicals: Notable Examples. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56/7. 1097-1107.
- Rodríguez-Roque, M. J.; Rojas-Graü, M. A.; Elez-Martínez, P.; Martín-Belloso, O. 2013. Changes in Vitamin C, Phenolic, and Carotenoid Profiles Throughout in Vitro

- Gastrointestinal Digestion of a Blended Fruit Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61/8. 1860-1867.
- Rusak, G.; Šola, I.; Vujčić Bok, V. 2021. Matcha and Sencha green tea extracts with regard to their phenolics pattern and antioxidant and antidiabetic activity during in vitro digestion. *Journal of Food Science and Technology* 58. 3568-3578.
- Sanz, T.; Luyten, H. 2006. Effect of thickening agent in the in vitro mouth, stomach and intestine release of tyrosol from enriched custards. *Food Hydrocolloids* 20/5. 703-711.
- Scrob, T.; Hosu, A.; Cimpoiu, C. 2019. The Influence of in Vitro Gastrointestinal Digestion of Brassica oleracea Florets on the Antioxidant Activity and Chlorophyll, Carotenoid and Phenolic Content. *Antioxidants* 8/7. 212.
- Southon, S.; Faulks, R. 2003. Carotenoids in food: bioavailability and functional benefits. *Phytochemical Functional Foods*. 107-127.
- Šamec, D.; Urlič, B.; Salopek-Sondi, B. 2018. Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) as a superfood: review of the scientific evidence behind the statement. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59/15. 2411-2422.
- Šola, I.; Vujčić Bok, V.; Dujmović, M.; Rusak, G. 2019. Developmentally-related changes in phenolic and L-ascorbic acid content and antioxidant capacity of Chinese cabbage sprouts. *Journal of Food Science and Technology* 57/2. 702-712.
- Šola, I.; Vujčić Bok, V.; Pinterić, M.; Auer, S.; Ludwig-Müller, J.; Rusak, G. 2020. Improving the phytochemical profile and bioactivity of Chinese cabbage sprouts by interspecific transfer of metabolites. *Food Research International* 137. 109726.
- Wojdyło, A.; Nowicka, P.; Tkacz, K.; Turkiewicz, I. P. 2020. Sprouts vs. Microgreens as Novel Functional Foods: Variation of Nutritional and Phytochemical Profiles and Their In Vitro Bioactive Properties. *Molecules* 25/20. 4648.
- Zhang, Q.; Xing, B.; Sun, M.; Zhou, B.; Ren, G.; Qin, P. 2020. Changes in bio-accessibility, polyphenol profile and antioxidants of quinoa and djulis sprouts during in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Food Science & Nutrition*. 15/8. 4232-4241.
- Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64. 555-559.

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 9. studenoga 1997. u Virovitici. Djetinjstvo provodim u slavonskom selu Čačinci zanimajući se za različite biološke i biotehnološke procese (rad u vrtu, uzgoj domaćih životinja, dobivanje vina). Osnovnu školu Vijenac pohađam u Osijeku do 2012. godine, nakon čega upisujem opću gimnaziju u Srednjoj školi Mate Balote u Poreču gdje se upoznajem s istarskim krajem. Po završetku gimnazije upisujem 2016. godine Sveučilišni preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i tri godine kasnije stječem titulu sveučilišnog prvostupnika molekularne biologije (*univ. bacc. biol. mol.*) na osnovi koje upisujem Sveučilišni diplomski studij molekularne biologije (2019. g.). Ovdje stječem potvrdu o osposobljenosti za rukovanje laboratorijskim životinjama LabAnim A 2019. godine. Učestalo se služim engleskim jezikom, a slobodno vrijeme najradije provodim penjući se po Medvednici.