

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Dino Davosir

**Povećanje učinkovitosti međuvrsnog prijenosa
spojeva destabilizacijom stanične membrane s ciljem
poboljšanja fitokemijskog profila i biopotencijala
klijanaca kupusnjača (Brassicaceae)**

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za fitokemiju Botaničkog zavoda Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod vodstvom doc. dr. sc. Ivane Šola i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.

POPIS KRATICA

A – apsorbancija

ANOVA – analiza varijance (engl. *analysis of variance*)

Car – karotenoidi (engl. *carotenoids*)

CAT – katehin (engl. *catechin*)

Chl – klorofil (engl. *chlorophyll*)

DNMRT – Duncanov test višestrukih usporedbi (engl. *Duncan's New Multiple Range Test*)

E – ekvivalent

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetracetic acid*)

FC – Folin-Ciocalteu (reagens)

FRAP – sposobnost antioksidansa za redukciju Fe^{3+} (engl. *Ferric Reducing/Antioxidant Power*)

GA – galna kiselina (engl. *gallic acid*)

HC – hijerarhijsko klasteriranje (engl. *hierarchical clustering*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke moći razlučivanja (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*)

K – kempferol

PCA – analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

Q – kvercetin (engl. *quercetin*)

ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)

RUV – relativni udio vode

SM – suha masa

SS – ukupni topivi šećeri (engl. *soluble sugars*)

SVM – svježa masa

TC – ukupni katehini (engl. *total catechins*)

TEAC – ekvivalent antioksidacijskog kapaciteta Troloxa (engl. *Trolox equivalent antioxidant capacity*)

TF – ukupni flavonoidi (engl. *total flavonoids*)

TFI – ukupni flavonoli (engl. *total flavonols*)

TPA – ukupni proantocijanidini (engl. *total proanthocyanidins*)

TT – ukupni tanini (engl. *total tannins*)

SADRŽAJ RADA

1. UVOD	1
1. 1. Kupusnjače (Brassicaceae) u prehrani ljudi	2
1. 1. 1. Upotreba klica i mikropovrća u ljudskoj prehrani	4
1. 1. 2. Kupusnjače kao izvor antioksidansa	4
1. 1. 3. Antidiabetički potencijal kupusnjača	6
1. 2. Međuvrsni prijenos spojeva	8
1. 3. Fitokemijski sastav i biološki učinci ekstrakta čaja (<i>Camellia sinensis</i>)	10
1. 4. Destabilizacija stanične membrane	12
2. CILJEVI RADA	14
2. 1. Opći cilj rada	15
2. 2. Specifični ciljevi rada	16
3. MATERIJAL I METODE	18
3. 1. Popis korištenih kemikalija	19
3. 2. Uzgoj klijanaca	20
3. 2. 1. Sterilizacija sjemenki i naklijavanje.....	20
3. 2. 1. Međuvrsni prijenos spojeva	21
3. 3. Određivanje biomase uzoraka i relativnog udjela vode	21
3. 4. Priprema ekstrakata	22
3. 5. Određivanje udjela specijaliziranih metabolita	22
3. 5. 1. Određivanje udjela ukupnih fenola	22
3. 5. 2. Određivanje udjela ukupnih flavonoida	23
3. 5. 3. Određivanje udjela ukupnih flavonola	24
3. 5. 4. Određivanje udjela ukupnih katehina.....	25
3. 5. 5. Određivanje udjela ukupnih tanina	25
3. 5. 6. Određivanje udjela ukupnih proantocijanidina	26
3. 6. Određivanje udjela topivih šećera	27

3. 7. Određivanje sastava fotosintetskih pigmenta	27
3. 8. Razdvajanje, identifikacija i kvantifikacija vitamina C, kafeina i pojedinačnih fenolnih spojeva metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja	28
3. 9. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta	30
3. 9. 1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom ABTS.....	30
3. 9. 2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom DPPH.....	31
3. 9. 3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom FRAP	32
3. 10. Određivanje antidijabetičkih svojstava	33
3. 10. 1. Određivanje sposobnosti inhibicije enzima α -glukozidaze.....	33
3. 10. 2. Određivanje sposobnosti inhibicije enzima α -amilaze.....	34
3. 10. 3. Određivanje sposobnosti inhibicije enzima lipaze	35
3. 11. Statistička obrada podataka	36
4. REZULTATI.....	37
4. 1. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na biomasu klijanaca.....	38
4. 2. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na sadržaj specijaliziranih metabolita.....	40
4. 2. 1. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih fenola.....	40
4. 2. 2. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih flavonoida.....	41
4. 2. 3. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih flavonola.....	43
4. 2. 4. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih katehina	44
4. 2. 5. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih tanina	46
4. 2. 6. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio proantocijanidina.....	47
4. 3. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio topivih šećera.....	48
4. 4. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio i odnose između fotosintetskih pigmenta i udio porfirina	50
4. 5. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio kafeina, vitamina C i pojedinačnih fenolnih spojeva.....	56
4. 5. 1. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio <i>L</i> -askorbinske kiseline.....	61
4. 5. 2. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio kafeina	62

4. 5. 3. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ferulične kiseline	63
4. 5. 4. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio galne kiseline.....	65
4. 5. 5. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio kavene kiseline	66
4. 5. 6. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio <i>p</i> -kumarinske kiseline	67
4. 5. 7. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio sinapinske kiseline	69
4. 5. 8. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio kempferola.....	70
4. 5. 9. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio kvercetina	71
4. 5. 10. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio tilirozida	72
4. 6. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na antioksidacijski kapacitet	74
4. 6. 1. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na antioksidacijski kapacitet određen metodom ABTS.....	74
4. 6. 2. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na antioksidacijski kapacitet određen metodom DPPH.....	75
4. 6. 3. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na antioksidacijski kapacitet određen metodom FRAP.....	76
4. 7. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na antidijabetička svojstva	77
4. 7. 1. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na sposobnost inhibicije α -glukozidaze	77
4. 7. 2. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na sposobnost inhibicije α -amilaze	79
4. 7. 3. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na sposobnost inhibicije lipaze	80
4. 8. Kemometrijske analize	81
4. 8. 1. Analiza glavnih komponenti	81
4. 8. 2. Hijerarhijsko klasteriranje	84
4. 8. 3. Analiza Pearsonovih koeficijenata korelacije	85
5. RASPRAVA.....	88
5. 1. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na biomasu klijanaca.....	90
5. 2. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na sadržaj specijaliziranih metabolita.....	90
5. 2. 1. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih fenola.....	90
5. 2. 2. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih flavonoida.....	91

5. 2. 3. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih flavonola.....	93
5. 2. 4. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih katehina	94
5. 2. 5. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih tanina.....	95
5. 2. 6. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio proantocijanidina.....	95
5. 3. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio topivih šećera.....	96
5. 4. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio i odnose između fotosintetskih pigmentata i koncentraciju porfirina	97
5. 5. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio kafeina, vitamina C i pojedinačnih fenolnih spojeva.....	99
5. 5. 1. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio <i>L</i> -askorbinske kiseline.....	99
5. 5. 2. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio kafeina	100
5. 5. 3. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ferulične kiseline	101
5. 5. 4. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio galne kiseline.....	103
5. 5. 5. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio kavene kiseline	103
5. 5. 6. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio <i>p</i> -kumarinske kiseline	104
5. 5. 7. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio sinapinske kiseline	105
5. 5. 8. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio kempferola.....	105
5. 5. 9. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio kvercetina	106
5. 5. 10. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio tilirozida	106
5. 6. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na antioksidacijski kapacitet	107
5. 7. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na antidijabetička svojstva	110
5. 7. 1. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na sposobnost inhibicije α -glukozidaze ...	110
5. 7. 2. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na sposobnost inhibicije α -amilaze	111
5. 7. 3. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na sposobnost inhibicije lipaze	113
5. 8. Kemometrijske analize	114
5. 8. 1. Analiza glavnih komponenti	114
5. 8. 2. Hijerarhijsko klasteriranje	115
6. ZAKLJUČAK	116

7. ZAHVALE.....	119
8. POPIS LITERATURE	121
9. PRILOZI.....	133
10. SAŽETAK	142
11. SUMMARY	145

1. UVOD

1. 1. Kupusnjače (Brassicaceae) u prehrani ljudi

Porodica kupusnjača (Brassicaceae) sadrži preko četiri tisuće vrsta, od kojih su brojne ekonomski značajne vrste koje se koriste u prehrani, te se ubrajaju među prve biljke koje su ljudi uzgajali (Avato i Argentieri, 2015.). Prema Avato i Argentieri (2015.), najpoznatije vrste iz porodice kupusnjača koje se koriste kao povrće su varijeteti vrste *Brassica oleracea* (kupus, brokula, cvjetača, raštika i dr.), repa (*B. rapa*), rotkvica (*Raphanus sativus*), bijela gorušica (*Sinapis alba*). Brokula (*B. oleracea* var. *italica*) je među najpopularnijim kupusnjačama zastupljenima u prehrani ljudi, a fitokemijski sastav i biološki učinci zrelih jedinki detaljno su istraženi (Šamec i sur., 2019.). Uz brokulu, cvjetača (*B. oleracea* var. *botrytis*) je globalno vrlo važna kupusnjača te ju se također uzgaja širom svijeta i koristi kao povrće ili u druge svrhe (Ahmed i Ali, 2013.). S druge strane, raštika (*B. oleracea* var. *acephala*) se upotrebljava u tradicionalnoj prehrani, pogotovo na području Mediterana, no posljednjih godina stekla je veliku popularnost širom svijeta jer je dokazano da je bogata različitim bioaktivnim spojevima, te posjeduje veću otpornost na povišene temperature od ostalih kupusnjača (Šamec i sur., 2019.).

Prethodna istraživanja pokazala su da su kupusnjače bogate različitim nutrijentima, kao što su vitamini, karotenoidi i brojni polifenoli, ponajprije flavonoidi, hidroksicimetne kiseline, antocijani i lignani, a najviše istraživani specijalizirani metaboliti kupusnjača su glukozinolati (glikozidi koji sadrže sumpor i dušik) (Ramirez i sur., 2020.). Međutim, sastav specijaliziranih metabolita unutar porodice, pa čak i vrsta i varijeteta, razlikuje se ovisno o genetičkim i okolišnim čimbenicima. Glavni flavonoidi izolirani iz povrća kupusnjača su flavonoli kvercetin, kempferol i izoramnetin (Avato i Argentieri, 2015.). Također, u velikoj koncentraciji prisutni su i minerali, kao što su kalij, kalcij, magnezij i fosfor, vitamini C, E i K, te karotenoidi (Heimler i sur., 2006.). Uz to, vrste iz porodice kupusnjača sadrže i jedinstvene profile ostalih skupina specijaliziranih metabolita kao što su terpeni i fitosteroidi (Ramirez i sur., 2020.).

Suprotno tome, kupusnjače imaju nisku kalorijsku vrijednost, koja je uglavnom posljedica niskog udjela masti, dok s druge strane obiluju specijaliziranim metabolitima, što ih čini vrlo privlačnom hranom s nutritivnog stajališta (Heimler i sur., 2006.).

Zbog visoke koncentracije i raznolikosti specijaliziranih metabolita, upotreba kupusnjača u prehrani za posljedicu ima brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, kao što su antimikrobni, antiupalni, antialergeni, citotoksični i antioksidacijski učinci (Jahangir i sur., 2009.; Jeffery i Araya, 2009.; Ramirez i sur., 2020.). Također, brojne kliničke studije pokazale su da prehrana kupusnjačama smanjuje rizik za razvoj malignih tumora i ima antidijabetičke učinke, a glavnim medijatorima tih učinaka smatraju se upravo glukozinolati i fenolni spojevi (Avato i Argentieri, 2015.). No, ne treba zanemariti niti potencijalni utjecaj drugih prisutnih spojeva, kao što su vitamini i karotenoidi (Heimler i sur., 2006.). Iako je brokula najzastupljenija u prehrani ljudi i najčešće istraživani varijetet kupusnjača, epidemiološke studije uglavnom ne razlikuju učinke konzumiranja brokule i ostalih kupusnjača jer sve kupusnjače sadrže bioaktivne komponente koje imaju slične ili jednake mehanizme djelovanja, iako, naravno, mogu varirati u potentnosti (Jeffery i Araya, 2009.).

U posljednje vrijeme, sve se veći naglasak stavlja na konzumiranje tzv. funkcionalne hrane, koja, osim nutritivne vrijednosti, pokazuje i pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. S tendencijom povećanja brige o zdravlju dolazi i do povećane popularizacije hrane bogate bioaktivnim spojevima pa je tako hrana na bazi kupusnjača sve cijenjenija. S tim u vezi, zbog paralelne motiviranosti industrijskog sektora za označavanje proizvoda kao funkcionalne hrane, istraživanja povezana s pronalaskom novih načina poboljšanja fitokemijskog sastava, i posljedično bioloških učinaka biljaka, u posljednjih su nekoliko godina u značajnom porastu. Između ostaloga, jedan od fokusa tih istraživanja jest „elicitacija“ prilikom koje se primjenom biotičkih (npr. biljnim hormonima) i/ili abiotičkih (npr. temperatura, svjetlost) faktora

pokušava povećati udio fenolnih spojeva i glukozinolata u zrelim biljkama ili klicama kupusnjača (Ramirez i sur., 2020.).

1. 1. 1. Upotreba klica i mikropovrća u ljudskoj prehrani

Klice i klijanci sve se više koriste u prehrani jer su generalno bogati vitaminima, karotenoidima i drugim fitokemikalijama. Klijanci, koji se u zadnje vrijeme često reklamiraju kao tzv. mikropovrće (engl. *microgreens*), najčešće sadrže dvije kotiledone s prvim parom pravih listova koji izviru ili su otvoreni te se najčešće skupljaju bez korijenja 7-21 dan nakon sijanja. Razlog njihove sve učestalije upotrebe jest to što klijanci kupusnjača sadrže 2-10 puta veću koncentraciju fenolnih spojeva u usporedbi s korijenjem i cvatovima, inače najzastupljenijim biljnim organima u prehrani (Baenas i sur., 2017.). Na primjeru kineskog kupusa (*B. rapa ssp. pekinensis*) pokazano je da klice i klijanci sadrže veću količinu sinapinske i *L*-askorbinske kiseline (vitamina C) u usporedbi sa starijim stadijima. Međutim, varijacije u fitokemijskom sastavu tijekom različitih stadija su specifične ovisno o analiziranim spojevima, tako je kod pekinškog kupusa u starijim stadijima zabilježena veća koncentracija ferulične kiseline i izoramnetina nego u mlađim stadijima (Šola i sur., 2020a). Uz to, s obzirom na udio različitih spojeva s jakim antioksidacijskim djelovanjem, zabilježena je i vrsna specifičnost između različitih varijeteta klijanaca kupusnjača (Xiao i sur., 2019.).

1. 1. 2. Kupusnjače kao izvor antioksidansa

Pozitivan učinak konzumacije kupusnjača na ljudsko zdravlje može se pripisati antioksidacijskom kapacitetu koji potječe od visoke koncentracije antioksidanasa kao što su *L*-askorbinska kiselina, karotenoidi, tokoferoli i fenolni spojevi, kao i glukozinolati (Xiao i sur., 2016.). Pritom, uočeno je da različiti antioksidansi iz hrane pokazuju sinergističko djelovanje i da zajedno imaju jaču sposobnost utišavanja ROS (engl. *reactive oxygen species*, reaktivni

oblici kisika), u odnosu na primjenu pojedinačnih antioksidansa (Podsedek, 2007.). Naime, ROS nastaju u stanicama tijekom normalnog staničnog metabolizma, međutim, povećanje koncentracije ROS u stanicama može dovesti do oštećenja važnih bioloških makromolekula kao što su molekula DNA, proteini, ugljikohidrati i lipidi što u konačnici može dovesti do razvoja različitih bolesti. Razvoj različitih bolesti krvožilnog i cerebrovaskularnog sustava, neuroloških bolesti, a posebno različitih oblika malignih tumora povezan je s povećanjem koncentracije ROS u stanicama. Naime, ROS dovode do stvaranja oštećenja molekule DNA u obliku modifikacija baza, lomova molekule DNA i drugih oštećenja koja mogu dovesti do mutacija i u konačnici do razvoja malignih tumora (Lobo i sur., 2010.). Međutim, brojne epidemiološke studije pokazale su da prehrana bogata spojevima koji pokazuju jako antioksidacijsko djelovanje smanjuje rizik za razvoj malignih tumora, kardiovaskularnih bolesti i neurodegenerativnih bolesti (Pandey i Rizvi, 2009.). Stoga, zaključeno je da unos različitih vrsta antioksidansa u organizam hranom može dovesti do smanjena koncentracije ROS koji djeluju štetno na organizam i smanjiti rizik od razvoja bolesti. Uz to, antioksidansi, uz učinak na ROS u stanici, često pokazuju i različite druge biološke učinke, kao što su antibakterijski, antivirusni, antialergijski i protuupalni učinci (Köksal i Gülçen, 2008.).

Najvažnija skupina antioksidansa iz kupusnjača su fenolni spojevi, a kao najjači fenolni spojevi s antioksidacijskim djelovanjem prepoznati su flavonoidi koji štite organizam od ROS. Fenolni spojevi imaju jaku sposobnost utišavanja ROS zbog izrazite sposobnosti doniranja elektrona (Podsedek, 2007.). Različite *in vitro* studije pokazale su pozitivnu korelaciju između udjela ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta kako za kupusnjače, tako i za ostale biljke, što upućuje na snažno antioksidacijsko djelovanje fenola (Heimler i sur., 2006.; Marchioni i sur., 2021.). Također, brojne *in vitro* studije pokazale su da fenolni spojevi imaju jača antioksidacijska svojstva od vitamina i karotenoida, inače glavnih skupina antioksidansa iz

kupusnjača, što sugerira da su glavni medijatori antioksidacijskog djelovanja kupusnjača upravo fenolni spojevi (Re i sur., 1999.).

Iako se glavnim izvorom *L*-askorbinske kiseline (vitamina C) tradicionalno smatra limun i srodne vrste, u nekim dijelovima svijeta čak do polovice preporučenog dnevnog unosa ovog vitamina zadovoljava se prehranom kupusnjačama (Pennington i Fisher, 2010.). Kod biljaka se u uvjetima stresa, *L*-askorbinska kiselina oksidira u dehidroaskrobinsku kiselinu (Hodges i sur., 2001.), međutim oba oblika su fiziološki značajni za ljudsko zdravlje (Tsujimura i sur., 2008.). Nadalje, kao važna skupina antioksidansa izdvajaju se i karotenoidi, od kojih su neki prekursori vitamina A i djeluju kao antioksidansi, koji utišavaju slobodne radikale i singletne oblike kisika te su odgovorni za do 20% ukupnog antioksidacijskog kapaciteta kupusnjača (Podsedek, 2007.).

1. 1. 3. Antidijabetički potencijal kupusnjača

Unazad nekoliko godina, u sklopu različitih *in vitro* i *in vivo* studija analiziralo su učinke kupusnjača na razvoj kroničnih bolesti, te bioaktivne spojeve koji su potencijalno odgovorni za te učinke. Opaženi su pozitivni učinci prehrane bogate kupusnjačama primarno na prevenciju i smanjenje simptoma metaboličkih sindroma, dijabetesa i pretilosti, koja je jedan od rizičnih faktora za razvoj dijabetesa (Raiola i sur., 2017.). Kao glavni mehanizmi antidijabetičkog djelovanja kupusnjača zabilježeni su pojačavanje osjetljivosti na inzulin, inhibicija stvaranja glukoze i smanjivanje stvaranja ROS-ova, dok su mehanizmi djelovanja na simptome pretilosti inhibicija glukoneogeneze i lipogeneze te smanjivanje akumulacije lipida (Le i sur., 2020.)

Uočeno je da kod osoba oboljelih od dijabetesa tipa 2 prehrana obogaćena klijancima brokule može smanjiti učinke komplikacija uzrokovanih dijabetesom te se potiče njihova konzumacija kao dopunska terapija kod ove bolesti (Bahadoran i sur., 2013.). Također, uočeno

je da spojevi iz brokule imaju sposobnost aktivacije signalnih puteva koji dovode do smanjenje ekspresije gena uključenih u glukoneogenezu i lipogenezu, što dovodi do ublažavanja simptoma pretilosti i dijabetesa (Xu i sur., 2018.). Nadalje, na modelu štakora oboljelih od dijabetesa uočeno je da metanolni ekstrakti brokule imaju potencijal kao antidijabetička terapija i da se mogu koristiti u svrhu kontrole hiperglikemije, obzirom da su pojedine doze pokazale jednak ili bolji učinak na sniženje hiperglikemije od standardnog lijeka koji se koristio u eksperimentu (Sahai i Kumar, 2020.).

Jedan od potencijalnih pristupa kojima se nastoji smanjiti otpuštanje glukoze iz probavnog sustava jest inhibiranje enzima koji kataliziraju hidrolizu polisaharida, kao što su enzimi α -amilaza i α -glukozidaza. Inhibicija ovih enzima dovodi do smanjenja koncentracije glukoze u krvi, što potencijalno može prevenirati razvoj dijabetesa u ranim fazama (Koss-Mikołajczyk i sur., 2019.) Također, enzim lipaza bitan je u kontroli dijabetesa budući da katalizira reakciju hidrolize lipida, što dovodi do potrebe većeg unošenja masti (Aloo i sur., 2021.). Stoga, aktivnost ovog enzima se često cilja za liječenje pretilosti. Također, uočeno je da liječenje pretilosti inhibicijom enzima lipaze dovodi do smanjenja pojave dijabetesa tipa 2 (Gillies i sur., 2007.). Međutim, komercijalni lijekovi koji se koriste u terapiji kao inhibitori enzima α -amilaze i α -glukozidaze, kao što su akarboza i orlistat, često dovode do neželjenih nuspojava u probavnom sustavu (Ma i sur., 2015.). To je razlog zašto se potencijalni novi inhibitori ovih enzima aktivno traže u hrani i drugim prirodnim izvorima. Potencijal kupusnjača kao potencijalnih izvora novih prirodnih, nesintetskih inhibitora ovih enzima već je uočen (Aloo i sur., 2021.; Lee i sur., 2013.; Mccue i sur., 2005.; Tan i Chang, 2017.). Primjerice, dokazano je da etanolni ekstrakti klijanaca brokule pokazuju jači inhibitorski učinak na enzim α -glukozidazu od inhibitornog učinka standardnog inhibitora akarboze te da su bogat izvor inhibitora enzima lipaze. Međutim, ekstrakti nisu pokazali jači efekt na inhibiciju enzima lipaze od standardnog lijeka orlistata (Aloo i sur., 2021.). Također, utvrđen je i inhibitorski

učinak ekstrakata cvjetače na aktivnost enzima α -glukozidaze i α -amilaze (Koss-Mikołajczyk i sur., 2019.), što ukazuje da su kupusnjače dobar izvor fitokemikalija značajnog inhibitornog učinka spram ovih enzima.

1. 2. Međuvrsni prijenos spojeva

Kako bi se u biljci povećao udio spojeva koji pozitivno utječu na ljudsko zdravlje, npr. spojevi snažnog antioksidacijskog i/ili antidijabetičkog učinka, nastoje se razviti tehnologije tzv. biofortifikacije (engl. *biofortification*) koje najčešće uključuju metode genetičkog inženjerstva ili konvencionalne tehnike uzgoja (Raiola i sur., 2017.). Genetičko inženjerstvo idealna je tehnologija kojom se direktno može manipulirati genomom biljaka ili unositi gene iz drugih organizama s ciljem razvoja biljaka boljih nutritivnih svojstava. Primjerice, povećanjem ekspresije gena postignuto je povećanje razine alifatskih glukozinolata u kineskom kupusu (Seo i sur., 2016.). Nadalje, povećanjem ekspresije gena u biosintetskom putu vitamina E uspješno je povećan njegov udio kod vrste *B. napus* (Raclaru i sur., 2006.). Međutim, unatoč velikim postignućima koje su tehnike genetičkog inženjerstva dostigle u poboljšanju hrane, genetski modificirana hrana i dalje nailazi na izazove vezane uz zakonsku regulativu i negativne stavove građana, što otežava njen dolazak na tržište (Cui i Shoemaker, 2018.; Jansma i sur., 2020.).

Zbog toga razvijaju se druge tehnike i metode kojima bi se postiglo povećanje udjela spojeva koji pokazuju značajne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. Jedna od potencijalnih metoda jest elicitacija biotičkim ili abiotičkim faktorima koji mogu inducirati ili pojačati biosintezu određenih spojeva u biljkama (Halder i sur., 2019.). Međutim, elicitori potencijalno mogu povećati i razinu ROS-ova u biljkama (Angelova i sur., 2006.), što može dovesti do oksidacijskog stresa i inhibirati rast biljke, a pozitivni učinci elicitacije na fitokemijski sastav i

biološke učinke, kao što je antioksidacijski kapacitet biljaka, često nisu značajni (Natella i sur., 2016.).

Tehnika međuvrskog prijenosa spojeva pokazala se kao značajan i obećavajući pristup poboljšavanju fitokemijskog profila i bioaktivnih učinaka biljaka, a odnosi se na mogućnost prijenosa bioaktivnih spojeva iz jedne biljne vrste (donor) u drugu (akceptor) i poboljšanje bioloških učinaka akceptora (Šola i sur., 2020b). Obzirom na to da različite skupine biljnih specijaliziranih metabolita imaju značajne metaboličke učinke u biljkama (Falcone Ferreyra i sur., 2012.) i ljudima (Havsteen, 2002.), mogućnost prijenosa spojeva iz biljke donora u biljku akceptor značajno mijenja nutritivni potencijal biljaka bez potrebe da se koncentracija bioaktivnih spojeva povećava metodama genetičkog inženjerstva ili tradicionalnim agrikulturnim tehnikama (Šola i sur., 2020b). Naime, prije nekoliko godina utvrđeno je da biljke mente imaju sposobnost apsorpcije nikotina iz tla zagađenog ovim spojem, pa čak i iz duhanskog dima, te je to bio prvi dokaz da se ovaj alkaloid, koji je često detektiran u prehrambenim proizvodima, može prenijeti iz jedne biljne vrste u drugu čak i nakon smrti biljke donora (Selmar i sur., 2015.). Kasnije je i za druge tipove alkaloida utvrđeno da se iz tla prenose u biljke akceptore, te da količina apsorbiranih pirolizidin alkaloida ovisi o biljci akceptoru, a sam proces prijenosa nazvan je horizontalnim prijenosom prirodnih spojeva (Nowak i sur., 2016.). Smatra se da se egzogeni alkaloidi nakon apsorpcije preko korijena (Selmar i sur., 2019.), uglavnom pasivnom difuzijom preko plazma membrane (Trapp i Legind, 2011.), prenose ksilemom do drugih dijelova biljke (Nowak i sur., 2017.). Nakon unosa stranih spojeva, oni se mogu modificirati na različite načine, ovisno o vrsti biljke akceptora i unesenom spoju, najčešće hidrosilacijom i glukozilacijom (Hijazin i sur., 2019.). Izuzev alkaloida (Nowak i sur., 2016.; Selmar i sur., 2019.), za druge tipove spojeva kao što su flavonoidi do sada nije utvrđeno mogu li se prenositi između biljaka različitih vrsta, iako je poznato da se flavonoidi mogu prenositi na velike udaljenosti unutar biljke (Šola i sur., 2015.). Međutim,

iako su navedena istraživanja usmjerena na temeljne aspekte fenomena međuvrsnog prijenosa spojeva, autori Selmar i sur., (2015. , 2019.) naglasili su da ovakav horizontalni prijenos spojeva ima velik potencijal s prehrambenog stajališta i sugerira novi pristup uzgoju biljaka. Stoga, kako bi se provjerilo potencijal ovog procesa u proizvodnji biljaka s poboljšanim fitokemijskim sastavom i biološkim učincima, autori Šola i sur. (2020b) analizirali su učinak međuvrsnog prijenosa iz ekstrakata vrsta *Hypericum perforatum*, *Matricaria chamomilla*, *Rosa* sp. i *Tamus communis* na fitokemijski sastav i antioksidacijski kapacitet klijanaca kineskog kupusa, te na sposobnost ekstrakta klijanaca da inhibira enzim α -amilazu. Utvrđeno je da prijenos spojeva iz ekstrakta vrste *T. communis* dovodi do povećanja koncentracije *L*-askorbinske kiseline, kempferola i udjela ukupnih fenola te da povećava antioksidacijski kapacitet klijanaca kineskog kupusa, kao i sposobnost njihovog ekstrakta da inhibira enzim α -amilazu. S druge strane, utvrđeno je da ekstrakti vrsta *H. perforatum*, *M. chamomilla* i *Rosa* sp. dovode do povećanja antiproliferacijske aktivnosti klijanaca kineskog kupusa, što sugerira da je međuvrsni prijenos spojeva iz biljke donora u biljku akceptor obećavajući pristup za dobivanje biljaka poboljšanih svojstava (Šola i sur., 2020b). S obzirom da je istraživanje ovog aspekta poboljšavanja biopotencijala biljaka tek na početku, preostaje istražiti mnoge parametre koji bi mogli biti ključni za međuvrsni prijenos bioaktivnih spojeva. Na primjer, nije poznato kako na prijenos spojeva i unos u biljku akceptor, osim spojeva prisutnih u biljci donoru, utječe fitokemijski matriks i neki drugi parametri same biljke akceptor. Također, postavlja se pitanje kako povećati efikasnost takvog prijenosa spojeva između biljnih vrsta.

1. 3. Fitokemijski sastav i biološki učinci ekstrakta čaja (*Camellia sinensis*)

Za promjenu fitokemijskog sastava i bioloških učinaka biljke akceptora međuvrsnim prijenosom spojeva ključan je odabir kompatibilnih biljaka donora (Šola i sur., 2020b). Čaj (*C. sinensis*) je biljka koja se koristi za pripremu popularnog napitka, čaja. Ekstrakti biljke čaj kao

dominantne spojeve sadrže flavan-3-ole (katehine) na koje otpada do 30% suhe mase lista, a od ostalih polifenola zastupljeni su flavonoli i njihovi glikozidi i fenolne kiseline kao klorogenska kiselina. Uz to, čaj je bogat i kafeinom (3%) te drugim metilksantinima, kao što je teobromin i teofilin (Graham, 1992.). Eksperimenti *in vitro* pokazali su snažna antioksidacijska svojstva čaja (Rusak *i sur.*, 2008.), te je utvrđeno da je konzumiranje čaja povezano sa smanjenjem pojave kroničnih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti i maligni tumori (Henning *i sur.*, 2005.). Ti pozitivni učinci često su povezani s jakim antioksidacijskim svojstvima glavnih katehina iz čaja: (-)-epigalokatehina, (-)-epikatehina, (-)-epigalokatehin-3-galata i (-)-epikatehin-3-galata (Rietveld *i Wiseman*, 2003.). Utvrđeno je da čaj i spojevi iz čaja inhibiraju proliferaciju i potiču apoptozu tumorskih stanica (Lambert *i Yang*, 2003.). Primjerice, dokazano je da ekstrakt zelenog čaja pokazuje citotoksični učinak na staničnu liniju raka grkljana CK2 već nakon kraće inkubacije (Durgo *i sur.*, 2011.), a sami mehanizmi protutumorskih djelovanja ekstrakata čaja također su poznati (Mahmood *i sur.*, 2010.; Nayyar *i sur.*, 2017.). Osim jakih antioksidacijskih svojstava i protutumorskog potencijala, za čaj je utvrđen i širok spektar drugih važnih bioloških učinaka na ljudsko zdravlje kao što je smanjenje visokog krvnog tlaka, antimikrobni učinci, smanjenje pretilosti, a jedan od posebno bitnih svojstava čaja je i njegov antidijabetički učinak (Angelina Faraldo Corrêa *i sur.*, 2021.). Tako je dokazano da čaj smanjuje učinke oksidacijskog stresa, ublažava endotelnu disfunkciju, modulira ekspresiju citokina, smanjuje rezistenciju na inzulin, smanjuje učinak komplikacija povezanih s hiperglikemijom te djeluje inhibitorno na enzime α -amilazu i α -glukozidazu (Fu *i sur.*, 2017.). Na temelju navedenoga, zbog detaljno istraženog bogatog fitokemijskog sastava i raznih pozitivnih bioloških učinaka spojeva koje sadrži, čaj predstavlja potencijalno dobru biljku donor za međuvrtni prijenos spojeva.

1. 4. Destabilizacija stanične membrane

Stanična membrana predstavlja jednu od barijera tijekom međuvrskog prijenosa bioaktivnih spojeva. Zbog njenog kemijskog sastava, kroz membranu će različiti spojevi prolaziti različitim stupnjem učinkovitosti. Spojevi kao miricetin sa šest hidroksilnih skupina, koje ga čine vrlo hidrofilnim, teško prolaze kroz hidrofobnu staničnu membranu (Šola i sur., 2020b.). Međutim, autori Šola i sur. (2020b) pretpostavljaju da bi prisutnost saponina u ekstraktima nekih biljaka donora mogla povećati permeabilnost stanične membrane i tako povećati prijenos spojeva u biljku akceptor. Saponini su amfipatski glikozidi koji selektivno uklanjaju kolesterol iz stanične membrane (Scheffler i sur., 2014.) i često se koriste u metodama kao što je imunocitokemija s ciljem poboljšanja unosa antitijela u stanice u svrhu detekcije unutarstaničnih proteina (Wassler i sur., 1987.). Različite vrste permeabilizatora stanične membrane, kao što su saponini, primjenjuju se u metodama stanične biologije i genetičkog inženjerstva, gdje se primarno koriste za pospješivanje unosa vektora u stanice s ciljem kloniranja i ekspresije različitih proteina (Midoux i sur., 1998.).

Također, u svrhu permeabilizacije stanične membrane često se koriste različite vrste deterdženata (Scheffler i sur., 2014.) koji djeluju na proteine i lipide u staničnoj membrani (Hjertén i Johansson, 1972.). Na modelu fosfolipidnog dvosloja fosfatidilkolina, kao modela stanične membrane, utvrđeno je da deterdžent Tween povećava permeabilnost takvih membrana (Simões i sur., 2005.). Osim *in vitro* studija, utvrđeno je da Tween uzrokuje permeabilizaciju membrana i kod bakterijskih stanica (Reitermayer i sur., 2018.), te da u uvjetima *in vitro* u kulturi korijenja dature Tween također dovodi do permeabilizacije membrane (Boitel-Conti i sur., 1996.).

Nadalje, utvrđeno je da i tvari koje djeluju kao kelatori iona, kao što je EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina), djeluju na permeabilizaciju membrane. Smatra se da EDTA veže katione Ca^{2+} i Mg^{2+} koji stabiliziraju stanične membrane stanica, što dovodi do

destabilizacije membrane i povećane permeabilnosti (Vaara, 1992.). Osim toga, utvrđeno je da EDTA ima sposobnost interkaliranja u stanične membrane i da negativno nabijene skupine ovog spoja stupaju u interakciju s pozitivno nabijenim grupama analoga fosfatidilkolina (Prachayasittikul i sur., 2007.), što dodatno dovodi do povećanja permeabilnosti membrana. S obzirom da se EDTA i Tween već koriste u prehrambenoj industriji, njihova primjena u kontekstu poboljšanja biljne hrane ne predstavlja rizik za zdravlje ljudi (Evstatiev i sur., 2021.; Hwang i Winkler-Moser, 2016.).

2. CILJEVI RADA

2. 1. Opći cilj rada

Zbog sve veće potražnje za funkcionalnom hranom koja, osim hranidbene vrijednosti, ima ulogu i u poboljšanju ljudskog zdravlja, u ovom radu kao biljke akceptori korišteni su klijanci kupusnjača (Brassicaceae) – brokule, cvjetače i raštike, koji su zbog pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje (Xiao i sur., 2019.) sve zastupljeniji u svakodnevnoj ljudskoj prehrani. S ciljem dodatnog poboljšanja njihove hranjive vrijednosti i bioloških učinaka, klijanci su tretirani vodenim ekstraktom biljke *C. sinensis* (biljka donor) za koji je utvrđeno da sadrži bioaktivne spojeve kojih u klijancima kupusnjača nema ili su prisutni u vrlo niskim koncentracijama, a djeluju blagotvorno na ljudsko zdravlje (Mahmood i sur., 2010.; Nayyar i sur., 2017.; Rusak i sur., 2021.). Pretpostavka je bila da će doći do međuvrsnog prijenosa specijaliziranih metabolita iz ekstrakta biljke donora u biljke akceptore, te će fitokemijski sastav i biološki učinci biljaka akceptora biti poboljšani. Kao negativna kontrola korištena je skupina biljaka akceptora tretirana samo otapalom u kojemu je pripremljen ekstrakt biljke donora, tj. deioniziranom vodom.

Kako bi se provjerila mogućnost povećanja efikasnosti međuvrsnog prijenosa specijaliziranih metabolita u biljke akceptore, klice su inkubirane ekstraktima donora u kombinaciji s permeabilizatorima stanične membrane: deterdžentom Tween[®] 20 ili etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA), a koncentracije svakog od ova dva spoja odabrane su u skladu s prethodnim radovima (Boitel-Conti i sur., 1996.; Habiba i sur., 2015.). Deterdžent Tween djeluje na način da otapa proteine stanične membrane (Hjertén i Johansson, 1972.) i stupa u interakciju s lipidima u staničnoj membrani (Simões i sur., 2005.), što dovodi do permeabilizacije stanične membrane, dok EDTA interkaliranjem u staničnu membranu i vezanjem Ca²⁺ iona koji sudjeluju u održavanju stabilnosti membrane također doprinosi smanjenju stabilnosti stanične membrane i njenom permeabiliziranju (Prachayasittikul i sur., 2007.), što potencijalno može rezultirati povećanim unosom specijaliziranih metabolita iz

ekstrakta donora u biljke akceptore. Promjene u sastavu specijaliziranih metabolita nakon inkubacije u ekstraktima biljke donora analizirane su upotrebom spektrofotometrijskih analiza i tekućinskom kromatografijom visoke moći razlučivanja (HPLC).

Kako bi se dobio uvid u potencijalne promjene bioloških učinaka klijanaca kupusnjača nakon međuvrskog prijenosa spojeva, provedene su analize njihova antioksidacijskog kapaciteta, te antidijabetičkog potencijala mjerenjem sposobnosti njihovih ekstrakata da inhibiraju aktivnost enzima α -amilaze i α -glukozidaze, koji su povezani s dijabetesom i enzima lipaze koji je povezan s razvojem pretilosti, koja je jedan od rizičnih faktora za razvoj dijabetesa.

Konačno, kako bi se pouzdano procijenilo rezultate, provedene su statističke analize eksperimentalno dobivenih podataka na temelju kojih su doneseni zaključci o mogućnosti primjene Tween-a i EDTA za povećanje učinkovitosti međuvrskog prijenosa spojeva.

2. 2. Specifični ciljevi rada

Specifični ciljevi rada obuhvaćali su istraživanje utjecaja međuvrskog prijenosa spojeva sa i bez Tween i EDTA na:

- a) biomasu i udio vode u klijanacima,
- b) fitokemijski sastav klijanaca na razini udjela ukupnih fenola i flavonoida, ukupnih tanina, ukupnih proantocijanidina, ukupnih flavonola, ukupnih katehina i topivih šećera, analizirano spektrofotometrijskim mjerenjima
- c) koncentraciju pojedinačnih fenolnih spojeva u klijanacima - fenolnih kiselina (sinapinske, ferulične, kavene, *p*-kumarinske i galne kiseline), flavonoida (kvercetina i kempferola te njegovog derivata tilirozida), alkaloida kafeina i vitamina *L*-askorbinske kiseline, što je postignuto razdvajanjem, identifikacijom i kvantifikacijom ovih spojeva metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja,

- d) koncentraciju ukupnih fotosintetskih pigmenata, klorofila i karotenoida, pojedinačnih fotosintetskih pigmenata klorofila *a* i *b*, te porfirina spektrofotometrijskim analizama,
- e) antioksidacijski kapacitet klijanaca upotrebom triju različitih metoda ABTS, DPPH i FRAP,
- f) antidijabetički potencijal klijanaca mjerenjem stupnja inhibicije enzima α -amilaze, α -glukozidaze, lipaze, što je provedeno spektrofotometrijskim analizama.

U svrhu procjene statističke značajnosti promjena vrijednosti izmjerenih parametara, korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) i *post-hoc* test višestrukih usporedbi *Duncan's New Multiple Range Test* (DNMRT). S ciljem analize doprinosa svakog izmjerenog parametra pojedinoj istraživanoj skupini provedena je analiza glavnih komponenti (*Principal Component Analysis*, PCA) koja je također omogućila i uvid u međusobno grupiranje istraživanih skupina obzirom na izmjerene parametre. Uz to, provedena je i metoda hijerarhijskog klasteriranja (*Hierarchical Clustering*, HC) kako bi se dodatno vizualiziralo odnose između skupina klijanaca na temelju izmjerenih parametara. Međusobne korelacije između izmjerenih parametara utvrđene su analizom Pearsonovih koeficijenata korelacije.

3. MATERIЈAL I METODE

3. 1. Popis korištenih kemikalija

- ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfonska kiselina), $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$ (BioChemica)
- acetatni pufer, CH_3COOH/CH_3COONa (J. T. Baker)
- aceton, C_3H_6O (Gram mol)
- amonijev klorid, $AlCl_3$ (Kemika)
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Sigma Aldrich)
- DMACA (*p*-dimetilaminocinamaldehyd) (Sigma Aldrich)
- DNS (dinitrosalicilna kiselina) (Sigma Aldrich)
- etanol, C_2H_5OH (Gram mol)
- Folin-Ciocalteu (FC) reagens (Kemika)
- fosfatni pufer, NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 ; pH 7,0 (Kemika)
- galna kiselina, $C_7H_6O_5$ (Extrasynthese)
- Izosan[®] G (natrijev dikloroizocijanurat dihidrat), $C_{12}Na(NCO)_3 \times 2H_2O$ (Pliva)
- kalijev klorid, KCl (Alkaloid)
- katehin, $C_{15}H_{14}O_6$ (Sigma Aldrich)
- klorovodična kiselina, HCl (Kemika)
- metanol, CH_3OH (J. T. Baker)
- natrijev acetat, $CH_3COONa \times 3H_2O$ (Kemika)
- natrijev hidroksid, $NaOH$ (Kemika)
- natrijev karbonat, Na_2CO_3 (Gram mol)
- natrijev klorid, $NaCl$ (Lachner)
- natrijev nitrit, $NaNO_2$ (Kemika)
- Orlistat, (-)-tetrahidrolipstatin, $C_{29}H_{53}NO_5$ (Sigma Aldrich)
- *p*-nitrofenil-butirat, $C_{10}H_{11}NO_4$ (Sigma Aldrich)

- *p*-nitrofenil- α -*D*-glukopiranozid, C₁₂H₁₅NO₈ (ACRŌS ORGANICS[®])
- saharoza, C₁₂H₂₂O₁₁ (Pancreac)
- sumporna kiselina, H₂SO₄ (Kemika)
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-*s*-triazin), C₁₈H₁₂N₆ (Sigma Aldrich)
- Trolox (5-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), C₁₄H₁₈O₄ (ACRŌS ORGANICS[®])
- vanilin (4-hidroksi-3-metoksibenzaldehid), C₈H₈O₃ (Sigma Aldrich)
- željezov (II) klorid, FeCl₂ (Gram mol)

3. 2. Uzgoj klijanaca

Sjemenke brokule (*Brassica oleracea* var. *italica*), cvjetače (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) i raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*) kupljene su od tvrtke Agromlinar d.o.o (Zagreb, Hrvatska). Biljke sam uzgajao, tretirao i sakupljao u tri odvojene biološke replike u periodu od rujna do studenog 2020. godine.

3. 2. 1. Sterilizacija sjemenki i naklijavanje

Sjemenke sam površinski sterilizirao 15 minuta inkubacijom u otopini 2,55% (w/v) vodenoj otopini Izosan[®] G (Pliva, Hrvatska) s vrtnjom na digitalnom rotatoru (Thermo Fisher Scientific, Shanghai, Kina) pri brzini od 20 okretaja/min (rpm), nakon čega sam ih 8-10 puta isprao u deioniziranoj, autoklaviranoj vodi. Sterilizirane sjemenke smjestio sam u komorice za iskljavanje s filter papirom natopljenim s 50 mL deionizirane, autoklavirane vode te su uzgajane u stakleničkim uvjetima (22-25°C, vlažnost 65%), sklonjene od svjetlosti. Treći dan od smještanja u komorice za iskljavanje, sjemenke sam premjestio na svjetlost.

3. 2. 1. Međuvrsni prijenos spojeva

Šesti dan uzgoja ostatak vode uklonio sam iz komorice za isključivanje te sam klice podvrgnuo inkubaciji u vodenom ekstraktu biljke čaj (*Camellia sinensis*). Ekstrakt čaja pripremio sam kuhanjem 30 g zelenog čaja dobavljenog iz lokalne prodavaonice u 2 L kipuće deionizirane vode 5 minuta, nakon čega sam ekstrakt ohladio te, zbog isparavanja pri temperaturi kuhanja, volumen dopunio deioniziranom vodom do 2 L. Ekstrakt s dodatkom EDTA (2,5 mM) pripremio sam otapanjem odgovarajuće mase EDTA u pripremljenom ekstraktu čaja, a ekstrakt s dodatkom Tween 20 (3%, v/v) pripremio sam otapanjem odgovarajućeg volumena Tween 20 u pripremljenom ekstraktu čaja.

U svaku komoricu dodao sam 50 mL ekstrakta čaja, ekstrakt čaja s dodatkom EDTA ili ekstrakt čaja s dodatkom Tween 20, odnosno jednak volumen deionizirane vode za kontrolnu skupinu, te su klice inkubirane 4 h. Nakon inkubacije, klice sam temeljito isprao u deioniziranoj vodi kako bi ekstrakt uklonio s površine klica, te sam ih premijestio na hranjivi supstrat. Kljance sam uzgajao još dva tjedna, do pojave prvog pravog lista, u stakleničkim uvjetima (22-25°C, svjetlosni režim 16 dana svjetlo, 8 sati mrak, vlažnost 65%), te sam nakon toga sabrao njihove nadzemne dijelove i odmah izvagao svježu masu kljanaca. Potom sam biljni materijal smrznuo tekućim dušikom i pohranio ga na -80 °C do liofilizacije na uređaju Alpha 1-2 Christ freeze-dryer, nakon čega sam tkivo usitnio do praha korištenjem tarionika i tučka te sam dobiveni prah izvagao na analitičkoj vagi kako bih znao suhu masu kljanaca.

3. 3. Određivanje biomase uzoraka i relativnog udjela vode

Na temelju broja kljanaca i izvagane ukupne biomase kljanaca po pojedinom uzorku, izračunao sam relativnu masu po kljancu, a relativni udio vode u kljancima odredio sam prema formuli (Garnier i Laurent, 1994.):

$$RUV (\%) = \left(\frac{SVM - SM}{SVM} \right) \times 100$$

pri čemu je: RUV – relativni udio vode u klijancima, SVM – masa svježih uzoraka, SM – masa suhих uzoraka (nakon liofilizacije).

3. 4. Priprema ekstrakata

Ekstrakciju spojeva iz liofiliziranog biljnog materijala proveo sam korištenjem 70% etanola (v/v) tako da sam izvagao 20 mg biljnog materijala na koji sam dodao 1 mL 70% etanola, kako bih pripremio ekstrakt koncentracije 20 mg/mL. Kako bi se ekstrakcija pospješila, smjesu biljnog materijala i 70% etanola inkubirao sam na digitalnom rotatoru (Thermo Fisher Scientific, Shanghai, Kina) pri brzini od 20 rpm, 60 minuta. Nakon inkubacije, ekstrakt sam centrifugirao na sobnoj temperaturi 5 min, pri 13 000 rpm u centrifugi Eppendorf Centrifuge 5804R, nakon čega sam supernatant prenio u novu epruvetu te su uzorci do daljnjih analiza spremljeni na -20°C.

3. 5. Određivanje udjela specijaliziranih metabolita

3. 5. 1. Određivanje udjela ukupnih fenola

Za određivanje udjela ukupnih fenola koristio sam metodu prema Singleton i sur., 1999. Pomiješao sam 790 µL deionizirane vode, 10 µL ekstrakta i 50 µL Folin Ciocalteuovog (FC) reagensa te sam smjesu homogenizirao na vrtložnoj miješalici, nakon čega sam dodao 150 µL 1,88 M otopine Na₂CO₃. Otopinu sam još jednom homogenizirao i inkubirao 30 minuta u termostataranoj tresilici pri 45°C. Nakon inkubacije, prenio sam po 200 µL otopine, u četiri tehničke replike, svakog uzorka na mikrotitarsku pločicu s 96 jažica te sam spektrofotometrijski izmjerio intenzitet nastalog obojenja mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 765 nm na uređaju FLUOstar Optima. Kao kontrolu, umjesto ekstrakta koristio sam 70% etanol.

Izmjerene vrijednosti apsorbancije umanjio sam za vrijednost apsorbancije kontrolnog uzorka, a udio ukupnih fenola indirektno sam prikazao preko ekvivalenata galne kiseline (GAE) na temelju baždarnog pravca. Baždarni pravac prikazuje ovisnost apsorbancije različitih razrjeđenja standardne otopine galne kiseline, pripremljene istim postupkom, u odnosu na masenu koncentraciju otopine (0,1, 0,25, 0,5, 0,75 i 1 mg/mL), na temelju čega je dobivena jednadžba pravca s pripadajućom R^2 vrijednosti, preko koje sam izračunao koncentraciju ukupnih fenola u uzorcima i izrazio je u mg GAE / g suhe mase (SM).

Jednadžba baždarnog pravca za galnu kiselinu: $y = 0,5353x + 0,1129$; $R^2 = 0,9994$, pri čemu je: x – masena koncentracija galne kiseline, y – apsorbancija uzorka pri 765 nm.

3. 5. 2. Određivanje udjela ukupnih flavonoida

Za određivanje udjela ukupnih flavonoida koristio sam metodu prema Zhishen i sur., 1999. Pomiješao sam 280 μ L deionizirane vode, 70 μ L ekstrakta i 21 μ L 5% otopine NaNO_2 te sam homogenizirao smjesu na vrtložnoj miješalici i inkubirao je 5 minuta na sobnoj temperaturi (RT), nakon čega sam dodao 21 μ L 10% otopine AlCl_3 . Otopinu sam još jednom homogenizirao i inkubirao 6 minuta na RT. Nakon inkubacije, dodao sam 140 μ L 1 M NaOH i 168 μ L deionizirane vode te sam nakon miješanja na vrtložnoj miješalici po 200 μ L otopine u tri tehničke replike za svaki uzorak prenio na mikrotitarsku pločicu te sam spektrofotometrijski izmjerio intenzitet nastalog obojenja mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 510 nm na uređaju FLUOstar Optima. Kao kontrola, umjesto ekstrakta koristio sam 70% etanol.

Izmjerene vrijednosti apsorbancije umanjio sam za vrijednost apsorbancije kontrolnog uzorka, a koncentraciju ukupnih flavonoida indirektno sam prikazao preko ekvivalenata kvercetina (QE) na temelju baždarnog pravca koji prikazuje ovisnost apsorbancije uzoraka razrjeđenja standardne otopine kvercetina u odnosu na masenu koncentraciju otopina (0,01;

0,02; 0,04; 0,06; 0,08 i 0,1 mg/mL), na temelju čega je dobivena jednadžba pravca s pripadajućom R^2 vrijednosti, preko koje sam izračunao koncentraciju ukupnih flavonoida u uzorcima i izrazio ju kao mg QE / g SM.

Jednadžba baždarnog pravca za kvercetin: $y = 3,13x + 0,028$; $R^2 = 0,9959$, pri čemu je: x – masena koncentracija kvercetina, y – apsorbancija uzorka na 510 nm.

3. 5. 3. Određivanje udjela ukupnih flavonola

Za određivanje udjela ukupnih flavonola koristio sam metodu prema Howard i sur., 2003. Pomiješano sam 50 μ L ekstrakta, 50 μ L 1 mg/mL HCl u 96% etanolu (w/v) i 910 μ L 2 mg/mL HCl u deioniziranoj vodi te sam homogenizirao smjesu na vrtložnoj miješalici. Nakon mješanja po 200 μ L otopine u četiri tehničke replike za svaki uzorak prenio sam na mikrotitarsku pločicu te sam spektrofotometrijski izmjerio intenzitet nastalog obojenja mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 355 nm na uređaju FLUOstar Optima. Kao kontrolu, umjesto ekstrakta koristio sam 70% etanol.

Izmjerene vrijednosti apsorbancije umanjio sam za vrijednost apsorbancije kontrolnog uzorka, a koncentraciju ukupnih flavonola indirektno sam prikazao preko ekvivalenata kvercetina (QE) na temelju baždarnog pravca koji prikazuje ovisnost apsorbancije uzoraka razrijeđenja standardne otopine kvercetina u odnosu na masenu koncentraciju otopina (0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 i 0,1 mg/mL), na temelju čega je dobivena jednadžba pravca s pripadajućom R^2 vrijednosti, preko koje sam izračunao koncentraciju ukupnih flavonola u uzorcima i prikazao ju kao mg QE / g SM.

Jednadžba baždarnog pravca za kvercetin: $y = 1,0181x + 0,0023$; $R^2 = 0,9999$, pri čemu je: x – masena koncentracija kvercetina, y – apsorbancija uzorka na 355 nm.

3. 5. 4. Određivanje udjela ukupnih katehina

Za određivanje udjela ukupnih katehina (flavan-3-ola) koristio sam metodu koju sam modificirao prema Rusak i sur., 2021. Pomiješao sam 50 μL ekstrakta i 600 μL DMACA reagensa (0,1% *p*-dimetilaminocinamaldehyd u 1 M HCl, u metanolu). Nakon miješanja, po 200 μL otopine u tri tehničke replike za svaki uzorak prenio sam na mikrotitarsku pločicu te sam spektrofotometrijski izmjerio intenzitet nastalog obojenja mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 595 nm na uređaju FLUOstar Optima. Kao kontrolu, umjesto ekstrakta koristio sam 70% etanol.

Izmjerene vrijednosti apsorbancije umanjio sam za vrijednost apsorbancije kontrolnog uzorka, a koncentracija ukupnih katehina indirektno sam prikazao preko ekvivalenata katehina (CE) na temelju baždarnog pravca koji prikazuje ovisnost apsorbancije uzorka razrjeđenja standardne otopine katehina u odnosu na masenu koncentraciju otopina (0,01; 0,05; 0,5; 1; 2,5, 5 i 10 mg/mL), na temelju čega je dobivena jednadžba pravca s pripadajućom R^2 vrijednosti, preko koje sam izračunao koncentraciju ukupnih katehina u uzorcima i izrazio ju kao mg CE / g SM.

Jednadžba baždarnog pravca za katehin: $y = 2,651x + 0,0658$; $R^2 = 0,9999$, pri čemu je: x – masena koncentracija katehina, y – apsorbancija uzorka na 595 nm.

3. 5. 5. Određivanje udjela ukupnih tanina

Za određivanje udjela ukupnih tanina koristio sam metodu prema Sangeetha i Vedaşree, 2012. Sakriveno od svjetlosti, u epruveti sam pomiješao 1,68 mL deionizirane vode, 100 μL FC reagensa, 200 μL 3.5% otopine Na_2CO_3 i 20 μL ekstrakta te je sam homogenizirao smjesu na vrtložnoj miješalici i inkubirao ju 30 minuta na RT. Nakon inkubacije, po 500 μL smjese prenio sam u kivetu te sam u tri tehničke replike za svaki uzorak izmjerio intenzitet nastalog

obojenja mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 700 nm na spektrofotometru NanoDrop™ 2000c. Kao kontrola, umjesto ekstrakta koristio sam 70% etanol.

Koncentraciju ukupnih tanina indirektno sam prikazao preko ekvivalenata katehina (CATE) na temelju baždarnog pravca koji prikazuje ovisnost apsorbancije uzoraka razrjeđenja standardne otopine katehina pripremljene istim postupkom, u odnosu na masenu koncentraciju otopina (0,25; 0,5; 1 i 10 mg/mL), na temelju čega je dobivena jednadžba pravca s pripadajućom R^2 vrijednosti, preko koje sam izračunao koncentraciju ukupnih tanina u uzorcima i izrazio ju mg CATE / g SM.

Jednadžba baždarnog pravca za katehin: $y = 0,188x - 0,0195$; $R^2 = 0,9999$, pri čemu je: x – masena koncentracija katehina, y – apsorbancija uzorka na 700 nm.

3. 5. 6. Određivanje udjela ukupnih proantocijanidina

Za određivanje udjela ukupnih proantocijanidina (kondenziranih tanina) koristio sam metodu prema Šamec i sur., 2014. Sakriveno od svjetlosti, u epruveti sam pomiješao 420 μ L 4% otopine vanilina u metanolu, 70 μ L ekstrakta i 210 μ L klorovodične kiseline te sam smjesu homogenizirao na vrtložnoj miješalici i inkubirao 15 minuta na RT. Nakon inkubacije, po 500 μ L smjese prenio sam u kivetu te je u tri tehničke replike za svaki uzorak izmjeren intenzitet nastalog obojenja mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 500 nm na spektrofotometru NanoDrop™ 2000c. Kao kontrola umjesto ekstrakta koristio sam 70% etanol.

Koncentracija ukupnih proantocijanidina indirektno sam prikazao preko ekvivalenata katehina (CATE) na temelju baždarnog pravca koji prikazuje ovisnost apsorbancije uzoraka razrjeđenja standardne otopine katehina u odnosu na masenu koncentraciju otopina (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 mg/mL), na temelju čega je dobivena jednadžba pravca s pripadajućom R^2 vrijednosti, preko koje sam izračunao koncentraciju ukupnih tanina u uzorcima i izrazio ju mg CATE / g SM.

Jednadžba baždarnog pravca za katehin: $y = 0,4368x - 0,0077$; $R^2 = 0,9979$, pri čemu je: x – masena koncentracija katehina, y – apsorbancija uzorka na 500 nm.

3. 6. Određivanje udjela topivih šećera

Za određivanje udjela topivih šećera u uzorcima koristio sam metodu prema Dubois i sur., 1956. Ekstrakte razrijeđene do koncentracije 1 mg/mL volumena 200 μ L u epruveti sam pomiješao sa 100 μ L 5% vodene otopine fenola, 500 μ L koncentrirane H_2SO_4 te sam homogenizirao smjesu na vrtložnoj miješalici i inkubirao je 10 minuta pri RT, nakon čega sam ju ponovno homogenizirao na vrtložnoj miješalici i inkubirao 10 minuta u vodenoj kupelji pri 30°C. Nakon inkubacije, po 200 μ L otopine, u tri tehničke replike, svakog uzorka prenio sam na mikrotitarsku pločicu te je spektrofotometrijski izmjeren intenzitet nastalog obojenja mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 485 nm na uređaju FLUOstar Optima. Kao kontrolu umjesto ekstrakta koristio sam 70% etanol.

Izmjerene vrijednosti apsorbancije umanjio sam za vrijednost apsorbancije kontrolnog uzorka, a koncentraciju topivih šećera indirektno sam prikazao preko ekvivalenata saharoze (SE) na temelju baždarnog pravca koji prikazuje ovisnost apsorbancije uzoraka razrjeđenja standardne otopine saharoze u odnosu na masenu koncentraciju otopina (0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 i 1 mg/mL), na temelju čega je dobivena jednadžba pravca s pripadajućom R^2 vrijednosti, preko koje sam izračunao koncentraciju topivih šećera u uzorcima i izrazio ju mg SE / g SM.

Jednadžba baždarnog pravca za saharozu: $y = 4,0093x + 0,0033$; $R^2 = 0,9999$, pri čemu je: x – masena koncentracija saharoze, y – apsorbancija uzorka na 485 nm.

3. 7. Određivanje sastava fotosintetskih pigmenata

Za spektrofotometrijsko određivanje sastava fotosintetskih pigmenata koristio sam metodu prema Sumanta i sur., 2014. U tu svrhu, pripremio sam ekstrakte fotosintetskih

pigmenata iz liofiliziranog biljnog materijala korištenjem 80% acetona (v/v) kao otapala, tako da sam izvagao 15 mg biljnog materijala na koji sam dodao 1 mL 80% acetona, kako bih pripremio ekstrakt koncentracije 15 mg/mL. Ekstrakt sam potom centrifugirao na sobnoj temperaturi 5 minuta, pri 6000 rpm u centrifugi Eppendorf Centrifuge 5804R, nakon čega sam supernatant prenio u novu epruvetu te sam ekstrakciju na jednak način proveo još jednom, dok talog nije postao potpuno bijel. Po 500 μ L ekstrakta prenio sam u kivetu te sam u tri tehničke replike za svaki uzorak izmjerio apsorbanciju pri valnim duljinama 470, 575, 590, 628, 647 i 663 nm na spektrofotometru NanoDrop™ 2000c. Koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida odredio sam korištenjem sljedećih formula:

$$Chl\ a = 12,25 A_{663} - 2,79 A_{647}$$

$$Chl\ b = 21,5 A_{647} - 5,1 A_{663}$$

$$Car = \frac{(1000 A_{470} - 1,82 Chl\ a - 85,02 Chl\ b)}{198}$$

$$Porfirini = \frac{(12,25 A_{663} - 2,55 A_{647})}{892} + \frac{(20,31 A_{647} - 4,91 A_{663})}{906} + (196,25 A_{575} -$$

$$46,6 A_{590} - 58,68 A_{628}) + (61,81 A_{590} - 23,77 A_{575} - 3,55 A_{628}) +$$

$$(42,59 A_{628} - 34,32 A_{575} - 7,25 A_{590})$$

pri čemu je: A – apsorbancija (pri odgovarajućoj valnoj duljini), Chl *a* – koncentracija klorofila *a*, Chl *b* – koncentracija klorofila *b*, Car – koncentracija karotenoida.

3. 8. Razdvajanje, identifikacija i kvantifikacija vitamina C, kafeina i pojedinačnih fenolnih spojeva metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja

S ciljem kvalitativne i kvantitativne analize vitamina C, kafeina i pojedinačnih fenolnih spojeva iz ekstrakata, koristio sam metodu tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja obrnutih faza (engl. *reversed-phase high-performance liquid chromatography*, RP-HPLC). U

svrhu hidrolize glikoziliranih fenolnih spojeva i dobivanja aglikona, proveo sam kiselinu hidrolizu ekstrakata prema Rusak i sur., 2021., s modifikacijama. U epruveti sam pomiješao 224,6 μL ekstrakta i 25,4 μL 11,81 M HCl te sam smjesu homogenizirao na vrtložnoj miješalici. Uzorke sam zatim inkubirao 2 h na termostatoranoj tresilici pri temperaturi 80°C i 300 rpm. Nakon inkubacije, uzorke sam spremio na -20°C do analize.

Za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju vitamina C i fenolnih spojeva koristio sam uređaj Agilent 1100 Series s UV/Vis detektorom. Razdvajanje spojeva provedeno je na nepolarnoj koloni Poroshell 120 SB-C18 dimenzija 4,6 x 75 mm s veličinom čestica 2,7 μm uz upotrebu pretkolone Zorbax Rx-C18 dimenzija 4,6 x 12,5 mm s veličinom čestica 5 μm . Za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju spojeva koristio sam metodu iz Šola i sur., 2020. Kao mobilna faza A korištena je 0,2% octena kiselina, a kao mobilna faza B korištena je 0,2% octena kiselina i 80% metanol. Brzina protoka bila je 1 mL/min, a injektirani volumen iznosio je 25 μL . Gradijent profila (postotak mobilne faze A / postotak mobilne faze B) bio je: u 0. minuti (100/0), u 42. minuti (20/80), u 43. minuti (0/100) te u 45,1. minuti (100/0).

Flavonoide sam analizirao pri 360 nm, fenolne kiseline i tilirozid sam analizirao pri 310 nm, *L*-askorbinsku kiselinu i galnu kiselinu analizirao sam pri 254 nm, a kafein sam analizirao pri 210 nm. Fenolni spojevi, kafein i *L*-askorbinska kiselina identificirani su usporedbom s komercijalnim standardima. Za kvantitativnu analizu, injektirane su otopine standarda različitih koncentracija (0,01-0,25 mg/mL) i analizirane istom metodom kao i za ekstrakte te su na temelju njih izvedene jednadžbe pravaca za svaki spoj, prikazane u Tablica 1., na temelju kojih je provedena kvantifikacija spojeva u uzorcima prema formuli:

$$x = \frac{y - b}{a}$$

pri čemu je: x – masa spoja, y – apsorbancija.

Tablica 1. Jednadžbe baždarnih pravaca i R^2 vrijednosti standarda odabranih spojeva

Spoj	Jednadžba baždarnog pravca	R^2
<i>L</i> -askorbinska kiselina	$y = 649,31x - 42,759$	0,9987
Kafein	$y = 14996x - 27,482$	0,9993
Ferulična kiselina	$y = 2815,8x - 36,454$	0,9985
Galna kiselina	$y = 415,45x - 127,56$	0,9988
Kavena kiselina	$y = 1444,7x - 45,512$	0,9974
Kempferol	$y = 1076,9x - 36,287$	0,9954
Kvercetin	$y = 944,51x - 39,118$	0,9991
<i>p</i> -kumarinska kiselina	$y = 3502,6x + 40,25$	0,9989
Sinapinska kiselina	$y = 1842,1x + 25,56$	0,9982
Tilirozid	$y = 3509,1x - 10,7$	0,9995

3. 9. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

3. 9. 1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom ABTS

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfonska kiselina) proveo sam prema radu Poljuha i sur., 2017, a test se temelji na sposobnosti antioksidansa iz testiranog ekstrakta da obezboje plavo-zeleni radikal $ABTS^+$, reduciranjem u ABTS. Prethodno sam pripremio otopinu $ABTS^+$ radikala (88 μ L 140 nM $K_2S_2O_8$ dopunjeno do 5 mL sa 7 mM ABTS) kojoj sam apsorbanciju pri 734 nm namjestio na spektrofotometru NanoDrop™ 2000c na vrijednost 0,7 razrjeđivanjem otopine 96% etanolom. U epruveti sam pomiješao 10 μ L uzorka i 1 mL otopine $ABTS^+$ radikala te sam otopinu homogenizirao na vrtložnoj miješalici i inkubirao u mraku 6 minuta pri RT. Nakon inkubacije, po 200 μ L otopine, u tri tehničke replike, za svaki uzorak prenio sam na

mikrotitarsku pločicu te je spektrofotometrijski izmjeren intenzitet nastalog obojenja mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 734 nm na uređaju FLUOstar Optima. Kao kontrolu, umjesto ekstrakta koristio sam 70% etanol.

Na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbancije, izračunao sam postotak inhibicije ABTS radikala korištenjem formule:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{(Abs_{kontrola} - Abs_{uzorak}) \times 100}{Abs_{kontrola}}$$

pri čemu je: $Abs_{kontrola}$ = apsorbancija kontrolnog uzorka (10 μ L 70% etanola + 1 mL ABTS⁺ radikala), Abs_{uzorak} = apsorbancija ekstrakta.

Rezultate sam prikazao indirektno preko ekvivalenata antioksidacijskog djelovanja standardnog antioksidansa Troloxa (TEAC) koristeći baždarni pravac koji prikazuje ovisnost postotka inhibicije ABTS⁺ radikala o masenoj koncentraciji otopina Troloksa (0,05; 0,1; 0,25; 0,5 i 1 mg/mL), na temelju čega je dobivena jednadžba pravca (s pripadajućom R² vrijednosti) preko koje sam izračunao vrijednost TEAC uzoraka kao mg TE/g SM.

Jednadžba baždarnog pravca za TEAC: $y = 1,7136x + 0,3041$; $R^2 = 0,9973$,

pri čemu je: x – postotak inhibicije ABTS⁺ radikala otopinom Troloksa određene koncentracije, y – apsorbancija uzorka pri 734 nm.

3. 9. 2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom DPPH

Određivanje antioksidativnog kapaciteta metodom DPPH (2,2-difenil-2-pikrilhidrazil) proveo sam prema radu Poljuha i sur., 2017, a temelji se na reduciranju DPPH radikala kod prisustva antioksidansa u testiranom ekstraktu. Prethodno sam pripremio 0,1 mM otopinu DPPH u 96% etanolu (w/v). U epruveti sam pomiješao 35 μ L uzorka i 665 μ L otopine DPPH te sam otopinu homogenizirao na vrtložnoj miješalici i inkubirao u mraku 30 min pri RT. Nakon inkubacije, po 200 μ L otopine, u tri tehničke replike, za svaki uzorak prenio sam na mikrotitarsku pločicu te je spektrofotometrijski izmjeren intenzitet nastalog obojenja

mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 520 nm na uređaju FLUOstar Optima. Kao kontrola, umjesto ekstrakta koristio sam 70% etanol.

Na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbancije, izračunao sam postotak inhibicije DPPH radikala korištenjem formule:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{(Abs_{kontrola} - Abs_{uzorak}) \times 100}{Abs_{kontrola}}$$

pri čemu je: $Abs_{kontrola}$ predstavlja apsorbanciju kontrolnog uzorka (35 μ L 70% etanola i 655 μ L DPPH radikala), Abs_{uzorak} predstavlja apsorbanciju uzorka izmjerenu pri 520 nm.

Rezultate sam prikazao indirektno preko ekvivalenata antioksidativnog djelovanja standardnog antioksidansa Troloxa (TEAC) preko baždarnog pravca koji prikazuje ovisnost postotka inhibicije DPPH radikala razrjeđenjima standardne otopine Trolox reagensa u odnosu na masenu koncentraciju otopina (0,05; 0,1; 0,25; 0,5 i 1 mg/mL), na temelju čega je dobivena jednadžba pravca s pripadajućom R^2 vrijednosti, preko koje sam izračunao vrijednost TEAC uzoraka kao mg TE / g SM.

Jednadžba baždarnog pravca za TEAC: $y = 3,9235x + 0,0041$; $R^2 = 0,9997$, pri čemu je: x – postotak inhibicije otopine Trolox određene koncentracije, y – apsorbancija uzorka na 520 nm.

3. 9. 3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom FRAP

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom FRAP (engl. *Ferric reducing/Antioxidant power*) proveo sam prema radu Poljuha i sur., 2017, a temelji se na mjerenju reducirajuće moći ekstrakta. Prethodno sam pripremio FRAP reagens miješanjem 300 mM acetatnog pufera, pH 3,6, 10 mM otopine TPTZ u 40 mM kloridnoj kiselini i 20 mM otopine $FeCl_3$ u omjeru 10:1:1. U epruveti sam pomiješao 35 μ L ekstrakta i 665 μ L FRAP reagensa te sam otopinu homogenizirao na vrtložnoj miješalici i inkubirao u mraku 4 minuta pri RT. Nakon inkubacije, po 200 μ L otopine u tri tehničke replike za svaki uzorak prenio sam

na mikrotitarsku pločicu te je spektrofotometrijski izmjeren intenzitet nastalog obojenja mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 593 nm na uređaju FLUOstar Optima. Kao kontrola, umjesto ekstrakta koristio sam 70% etanol.

Na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbancije, izračunao sam postotak redukcije korištenjem formule:

$$\% \text{ redukcije} = \frac{(Abs_{uzorak} - Abs_{kontrola}) \times 100}{Abs_{uzorak}}$$

gdje $Abs_{kontrola}$ predstavlja apsorbanciju kontrolnog uzorka (35 μ L 70% etanola i 655 μ L FRAP reagensa), a Abs_{uzorak} predstavlja apsorbanciju uzorka izmjerenu na 593 nm.

Rezultate sam prikazao indirektno preko ekvivalenata antioksidativnog djelovanja standardnog antioksidansa Troloxa (TEAC) preko baždarnog pravca koji prikazuje ovisnost postotka redukcije razrjeđenja standardne otopine Trolox reagensa u odnosu na masenu koncentraciju otopina (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 5 i 10 mg/mL), na temelju čega je dobivena jednadžba pravca s pripadajućom R^2 vrijednosti, preko koje sam izračunao vrijednost TEAC uzoraka kao mg TE / g SM.

Jednadžba baždarnog pravca za TEAC: $y = 1,4058x - 0,0203$; $R^2 = 0,9999$, pri čemu je: x – postotak redukcije otopine Trolox određene koncentracije, y – apsorbancija uzorka pri 593 nm.

3. 10. Određivanje antidijabetičkih svojstava

3. 10. 1. Određivanje sposobnosti inhibicije enzima α -glukozidaze

Test inhibicije aktivnosti enzima α -glukozidaze proveo sam prema Nampoothiri i sur., 2011. i Vinholes i sur., 2011., s manjim preinakama. U epruveti sam pomiješao 20 μ L ekstrakta i 100 μ L 1 mM otopine *p*-nitrofenil- α -*D*-glukopiranozida u 100 mM fosfatnom puferu, pH 7,0 i inkubirao 10 minuta pri 37°C. Potom sam u smjesu dodao 100 μ L α -glukozidaze

koncentracije 56,6 mU/mL te sam smjesu homogenizirao na vrtložnoj miješalici i inkubirao 20 minuta pri 37°C, nakon čega sam dodao 500 µL 1 M Na₂CO₃ za zaustavljanje reakcije. Nakon inkubacije, po 200 µL otopine, u tri tehničke replike, za svaki uzorak prenio sam na mikrotitarsku pločicu te je spektrofotometrijski izmjeren intenzitet nastalog obojenja mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 405 nm na uređaju FLUOstar Optima. Kao negativnu kontrolu umjesto uzorka koristio sam 70% etanol, a kao pozitivnu kontrolu umjesto uzorka koristio sam otopinu akarboze koncentracije 20 mg/mL. Za svaki uzorak pripremio sam kontrolu kojoj je umjesto enzima α-glukozidaze dodan jednak volumen 100 mM fosfatnog pufera.

Postotak inhibicije aktivnosti enzima α-glukozidaze izračunao sam na temelju formule:

$$\% \text{ inhibicije} = \left(1 - \frac{Abs_{uzorak} - Abs_{uzorak bez enzima}}{Abs_{negativna kontrola} - Abs_{negativna kontrola bez enzima}} \right) \times 100$$

pri čemu je: Abs_{uzorak} – apsorbancija uzorka, $Abs_{uzorak bez enzima}$ – apsorbancija uzorka bez dodanog enzima, $Abs_{negativna kontrola}$ – apsorbancija negativne kontrole, $Abs_{negativna kontrola bez enzima}$ – apsorbancija negativne kontrole bez dodanog enzima.

3. 10. 2. Određivanje sposobnosti inhibicije enzima α-amilaze

Test inhibicije enzima α-amilaze proveo sam prema Nampoothiri i sur., 2011. i Nyambe-Silavwe i sur., 2015., s manjim preinakama. U epruveti sam pomiješao 30 µL ekstrakta i 30 µL α-amilaze koncentracije 10,34 U/mL u 0,02 M natrij-fosfatnom puferu, pH 6,9 s 6 mM NaCl i inkubirao 10 minuta na 25°C u termostatiranoj tresilici. Potom sam u smjesu dodao 30 µL 1% škroba otopljenog u 0,02 M natrij-fosfatnom puferu, pH 6,9 s 6 mM NaCl te sam smjesu homogenizirao na vrtložnoj miješalici i inkubirao 10 minuta na 25°C u termostatiranoj tresilici, nakon čega sam dodao 60 µL DNS reagensa. Smjesu sam potom inkubirao 10 minuta u kipućoj vodi u vodenoj kupelji, nakon čega je smjesa ohlađena te sam joj dodao 600 µL vode te sam smjesu ponovno homogenizirao na vrtložnoj miješalici. Po 200

μL otopine u tri tehničke replike za svaki uzorak prenio sam na mikrotitarsku pločicu te je spektrofotometrijski izmjeren intenzitet nastalog obojenja mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 520 nm na uređaju FLUOstar Optima. Kao negativna kontrola umjesto uzorka korišten je 70% etanol, a kao pozitivna kontrola umjesto uzorka korištena je otopina maltoze koncentracije 20 mg/mL. Za svaki uzorak pripremio sam kontrola kojoj je umjesto enzima α -amilaze dodan jednak volumen 0,02 M natrij-fosfatnog pufera.

Postotak inhibicije aktivnosti enzima α -amilaze izračunao sam na temelju formule:

$$\% \text{ inhibicije} = \left(1 - \frac{Abs_{uzorak} - Abs_{uzorak bez enzima}}{Abs_{negativna kontrola} - Abs_{negativna kontrola bez enzima}} \right) \times 100$$

pri čemu je: Abs_{uzorak} – apsorbancija uzorka, $Abs_{uzorak bez enzima}$ – apsorbancija uzorka bez dodanog enzima, $Abs_{negativna kontrola}$ – apsorbancija negativne kontrole, $Abs_{negativna kontrola bez enzima}$ – apsorbancija negativne kontrole bez dodanog enzima.

3. 10. 3. Određivanje sposobnosti inhibicije enzima lipaze

Test inhibicije enzima lipaze proveo sam prema metodi koju sam modificirao prema radu Spínola i sur., 2019. U epruveti sam pomiješao 40 μL ekstrakta i 20 μL 10 mM otopine *p*-nitrofenil-butirata u apsolutnom etanolu. Potom sam u smjesu dodao 40 μL lipaze koncentracije 2,5 mg/mL u 0,1 M fosfatnom puferu, pH 8 te sam smjesu homogenizirao na vrtložnoj miješalici i inkubirao 20 minuta na 37°C, nakon čega sam dodao 600 μL deionizirane vode. Po 200 μL otopine u tri tehničke replike, za svaki uzorak prenio sam na mikrotitarsku pločicu te je spektrofotometrijski izmjeren intenzitet nastalog obojenja mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 405 nm na uređaju FLUOstar Optima. Kao negativna kontrola umjesto uzorka korišten je 70% etanol, a kao pozitivna kontrola umjesto uzorka korištena je otopina orlistata koncentracije 20 mg/mL. Za svaki uzorak pripremljena je kontrola kojoj sam umjesto enzima lipaze dodao jednak volumen 100 mM fosfatnog pufera.

Postotak inhibicije aktivnosti enzima lipaze izračunao sam na temelju formule:

$$\% \text{ inhibicije} = \left(1 - \frac{Abs_{uzorak} - Abs_{uzorak bez enzima}}{Abs_{negativna kontrola} - Abs_{negativna kontrola bez enzima}} \right) \times 100$$

pri čemu je: $Ab_{Suzorak}$ – apsorbancija uzorka, $Ab_{Suzorak bez enzima}$ – apsorbancija uzorka bez dodanog enzima, $Ab_{Snegativna kontrola}$ – apsorbancija negativne kontrole, $Ab_{Snegativna kontrola bez enzima}$ – apsorbancija negativne kontrole bez dodanog enzima.

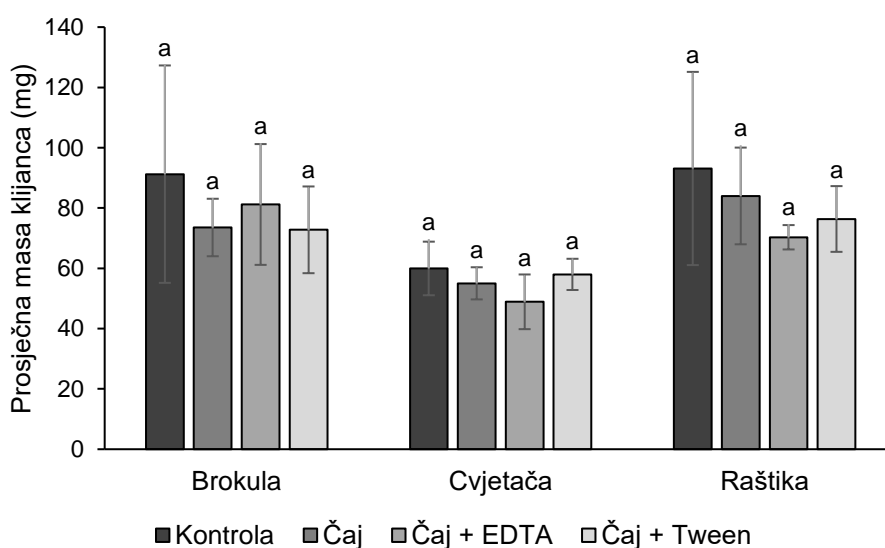
3. 11. Statistička obrada podataka

Statističku obradu podataka proveo sam u programu Statistica 13.1 (Stat Soft Inc., SAD). Usporedbu uzoraka s ciljem analize statistički značajnih razlika proveo sam pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA) i primjenom *post hoc* testa višestrukih usporedbi *Duncan's New Multiple Range Test* (DNMRT), a razlike između uzoraka pri $p \leq 0,05$ su u rezultatima označene različitim slovima. Za vizualizaciju odnosa između uzoraka, kao i izmjerenih parametara koristio sam analizu glavnih komponenta (PCA). Za dodatnu vizualizaciju grupiranja pojedinih istraživanih skupina na temelju izmjerenih parametara korištena je i metoda hijerarhijskog klasteriranja (HC) koja koristi Euklidsku udaljenost kao mjeru sličnosti ili različitosti između uzoraka. Za analizu korelacije između izmjerenih parametara izračunao sam vrijednosti Pearsonovih koeficijenata korelacije. Vrijednosti koeficijenata korelacije od 0,60-0,79 označavaju visok stupanj korelacije, a vrijednosti koeficijenata korelacije od 0,80-1,00 označavaju vrlo visok stupanj korelacije (Wuensch i Evans, 1996.).

4. REZULTATI

4. 1. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na biomasu klijanaca

Međuvrtni prijenos spojeva generalno nije imao utjecaj na ukupnu svježu masu klijanaca u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 2.), osim kod uzorka klijanaca cvjetače tretiranih ekstraktom čaja u kombinaciji s EDTA, kod kojeg je došlo do statistički značajnog ($p \leq 0,05$) smanjenja svježe mase uzorka za čak 35,00% u odnosu na kontrolnu skupinu. Međutim, na razini prosječne mase pojedinačnih klijanaca statistički značajna razlika nije zabilježena (Slika 1.). Međutim, usporedbom svih uzoraka, uočena je statistički značajna razlika između prosječne mase klijanaca kontrolnog uzorka klijanaca brokule te kontrolnog uzorka klijanaca raštike i uzorka klijanaca cvjetače tretiranih ekstraktom Cs u kombinaciji s EDTA (Prilog 5.).



Slika 1. Prosječna masa klijanaca brokule, cvjetače i raštike (mg / klijanac) za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

Također, nije došlo do statistički značajnih razlika između uzoraka pojedine vrste klijanaca u vrijednostima ukupne suhe mase i relativnog udjela vode u klijancima na razini $p \leq 0,05$ (Tablica 2.), niti do statistički značajnih razlika u izmjerenom relativnom udjelu vode između svih uzoraka (Tablica 2., Prilog 5.).

Tablica 2. Ukupna svježa masa (SVM), ukupna suha masa (SM) i relativni udio vode (RUV) klijanaca brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

		Ukupna svježa masa (SVM) / g	Ukupna suha masa (SM) / mg	Relativni udio vode (RUV) / %
Brokula	Kontrola	5,4 \pm 0,5 a	310,0 \pm 63,8 a	93,0 \pm 0,7 a
	Čaj	4,5 \pm 0,6 a	337,3 \pm 35,2 a	92,3 \pm 1,0 a
	Čaj + EDTA	4,8 \pm 0,4 a	330,6 \pm 41,1 a	93,2 \pm 0,7 a
	Čaj + Tween	4,1 \pm 1,1 a	302,1 \pm 75,6 a	92,6 \pm 0,7 a
Cvjetača	Kontrola	4,0 \pm 0,2 a	322,3 \pm 6,6 a	91,8 \pm 0,5 a
	Čaj	3,3 \pm 0,7 ab	260,2 \pm 54,9 a	92,0 \pm 0,6 a
	Čaj + EDTA	2,6 \pm 0,7 b	209,1 \pm 64,1 a	92,1 \pm 0,9 a
	Čaj + Tween	4,1 \pm 0,6 a	331,3 \pm 52,4 a	91,9 \pm 0,5 a
Raštika	Kontrola	6,4 \pm 1,3 a	462,1 \pm 108,3 a	92,8 \pm 0,2 a
	Čaj	6,3 \pm 1,6 a	462,7 \pm 144,4 a	92,7 \pm 0,5 a
	Čaj + EDTA	4,8 \pm 0,8 a	359,8 \pm 65,8 a	92,5 \pm 0,4 a
	Čaj + Tween	5,2 \pm 1,0 a	395,6 \pm 96,5 a	92,5 \pm 0,5 a

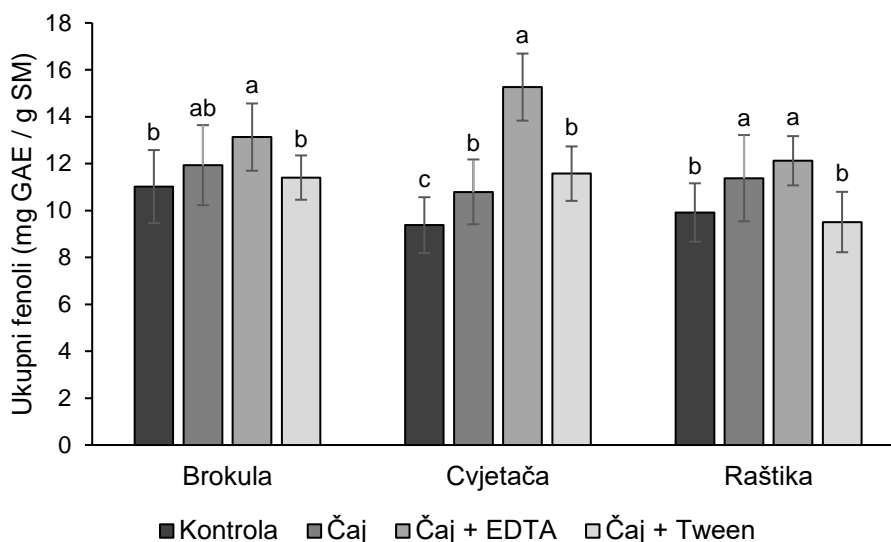
4. 2. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na sadržaj specijaliziranih metabolita

4. 2. 1. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na udio ukupnih fenola

Do najvećeg povećanja u udjelu ukupnih fenola došlo je kod klijanaca cvjetače inkubiranih čajem u kombinaciji s EDTA, kod kojih je koncentracija ukupnih fenola porasla za 62,79% u odnosu na kontrolnu skupinu i iznosi 15,26 mg ekvivalenata galne kiseline po gramu SM, što je ujedno porast od 41,41% u odnosu na skupinu klijanaca cvjetače tretiranih ekstraktom čaja (Slika 2.). Tretmanom klijanaca cvjetače čajem u kombinaciji s EDTA postignuta je koncentracija ukupnih fenola veća za 38,48% od one kontrolne skupine klijanaca brokule i za 31,89% veća od one kontrolne skupine raštike. Koncentracija ukupnih fenola kod kontrolne skupine klijanaca brokule bila za 17,56% viša od koncentracije ukupnih fenola u kontrolnoj skupini klijanaca cvjetače između kojih je uočena značajna statistička razlika pri $p \leq 0,05$ te je tim tretmanom fenolni sastav klijanaca cvjetače premašio koncentracije ukupnih fenola zabilježene u kljancima brokule i u kljancima raštike, prilikom međusobne usporedbe svih uzoraka.

Kod klijanaca brokule je samo tretman ekstraktom čaja doveo do statistički značajnog ($p \leq 0,05$) povećanja koncentracije ukupnih fenola za 19,14% u usporedbi s kontrolnom skupinom, dok tretmani ekstraktom čaja i ekstraktom čaja u kombinaciji s Tween nisu rezultirali statistički značajnim razlikama u koncentraciji ukupnih fenola. Kod klijanaca cvjetače, tretman čajem i čajem u kombinaciji s Tween, doveo je do statistički značajnog povećanja od, redom, 15,12% i 23,43% u usporedbi s kontrolnom skupinom, a tretman čajem u kombinaciji s EDTA doveo je do povećanja koncentracije ukupnih fenola koji se statistički razlikuje od kontrolne skupine i od druga dva tretmana. Kod klijanaca raštike, tretman čajem doveo je do statistički značajnog povećanja koncentracije ukupnih fenola od 14,75%, dok je tretman čajem u kombinaciji s EDTA doveo do statistički značajnog povećanja od 22,25%,

međutim ne postoji statistički značajna razlika između ta dva uzorka. Kod raštike tretirane čajem u kombinaciji s Tween nije došlo do statistički značajne razlike u koncentraciji ukupnih fenola od kontrolne skupine.



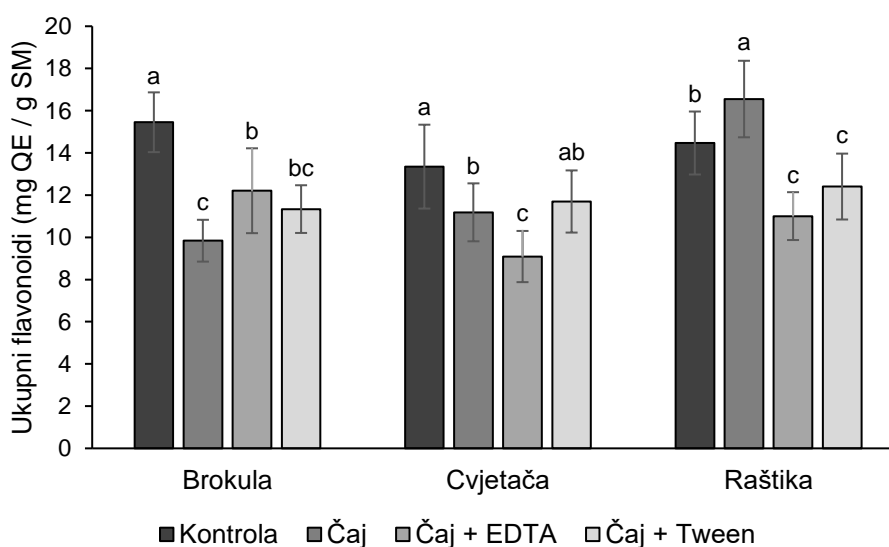
Slika 2. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih fenola u klijancima brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izraženu u miligramima ekvivalenta galne kiseline po gramu suhe mase (mg EGK / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 2. 2. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih flavonoida

Međuvrski prijenos spojeva generalno je doveo do smanjenja udjela ukupnih flavonoida u uzorcima, osim kod klijanaca cvjetače tretiranih čajem u kombinaciji s Tween gdje nije došlo do statistički značajnog pada udjela flavonoida te kod klijanaca raštike tretiranih

čajem gdje je došlo do statistički značajnog porasta udjela ukupnih flavonoida od 14,40% u usporedbi s kontrolnom skupinom (Slika 3.).

Najveći pad udjela ukupnih flavonoida zabilježen je kod klijanaca brokule tretiranih čajem i to za 36,32% u usporedbi s kontrolnom skupinom, a kod klijanaca brokule tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA i Tweenom zabilježen je redom pad koncentracije od 21,00% i 26,63% u usporedbi s kontrolnom skupinom. Kod klijanaca cvjetače, najveći pad koncentracije ukupnih flavonoida zabilježen je kod klijanaca tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA i iznosi 31,91% u odnosu na kontrolnu skupinu, te kod tretmana čajem u iznosu od 16,22%. Kod klijanaca raštike inkubiranih ekstraktima čaja u kombinaciji s EDTA i Tween došlo je do statistički značajnog pada u koncentraciji ukupnih flavonoida od 23,95% i 14,26%.



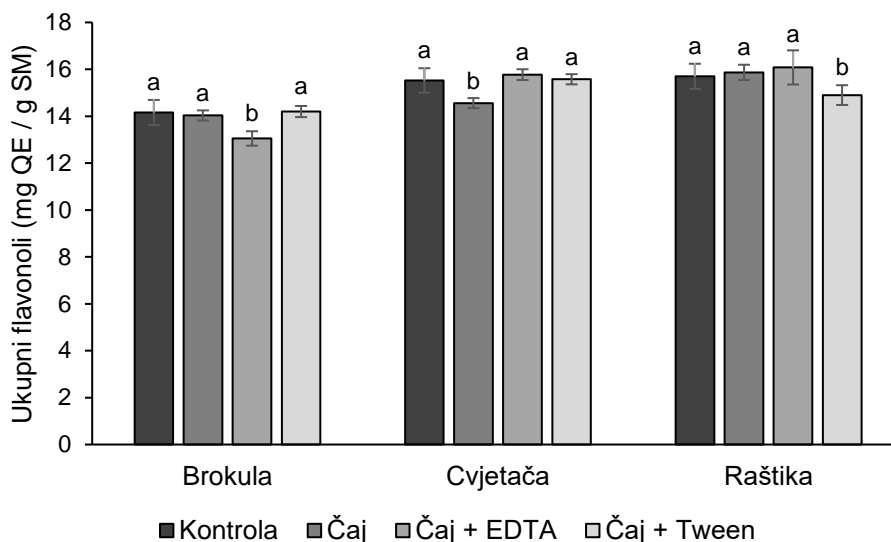
Slika 3. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih flavonoida u klijanacima brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izraženu u miligramima ekvivalenta kvercetina po gramu suhe mase (mg QE / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite

srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 2. 3. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih flavonola

Kod klijanaca brokule, statistički značajna razlika u udjelu ukupnih flavonola zabilježena je u uzorku klijanaca tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA, kod kojega je došlo do smanjenja udjela ukupnih flavonola za 7,81% u odnosu na kontrolnu skupinu, dok kod ostalih uzoraka nisu zabilježene statistički značajne razlike u usporedbi s kontrolnim uzorkom (Slika 4.). S druge strane, kod cvjetače je jedina skupina koja se statistički razlikovala od kontrolnog uzorka bio uzorak klijanaca tretiranih čajem, gdje je udio ukupnih flavonola smanjen za 5,96% u odnosu za kontrolnu skupinu, dok kod ostalih skupina nije zabilježena statistički značajna razlika od kontrolne skupine. Kod klijanaca raštike, do statistički značajne razlike u koncentraciji ukupnih flavonola došlo je kod skupine klijanaca tretiranih čajem u kombinaciji s Tween, gdje je koncentracija smanjena za 5,10%, dok kod ostalih skupina nije zabilježena statistički značajna razlika između uzoraka u odnosu na kontrolnu skupinu.

Međusobnom usporedbom svih ispitanih skupina (Prilog 5.) utvrđeno je da je najniži udio ukupnih flavonola zabilježen u uzorku klijanaca brokule tretirane čajem u kombinaciji s EDTA i iznosi 13,05 mg ekvivalenata kvercetina po gramu SM te u svim ostalim uzorcima klijanaca brokule, dok su najviše koncentracije ukupnih flavonola zabilježene kod uzorka klijanaca raštike tretirane čajem u kombinaciji s EDTA, kod kojeg koncentracija iznosi 16,08 mg ekvivalenata kvercetina po gramu SM te kod uzorka klijanaca raštike tretiranih čajem i kod uzorka klijanaca cvjetače tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA kod kojih koncentracija redom iznosi 15,87 i 15,77 mg ekvivalenata kvercetina po gramu SM.



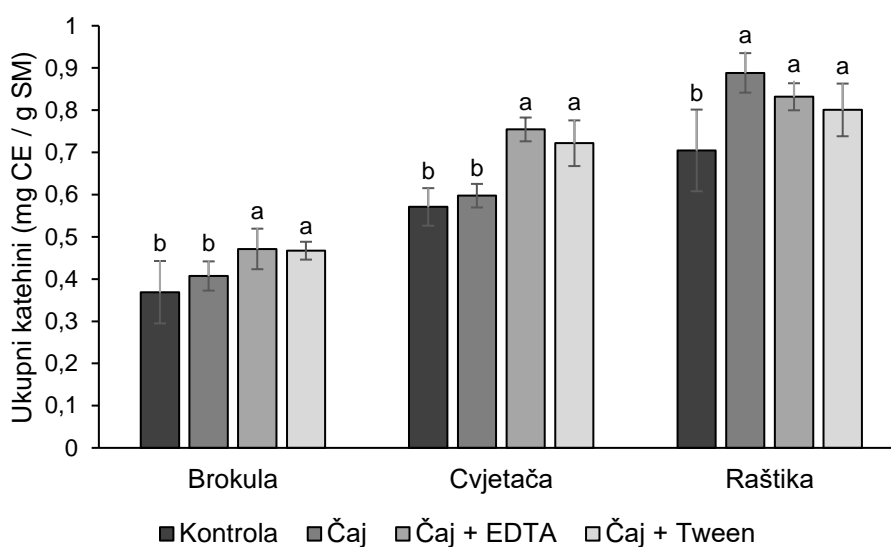
Slika 4. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih flavonola u klijancima brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izraženu u miligramima ekvivalenta kvercetina po gramu suhe mase (mg QE / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 2. 4. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih katehina

Kod klijanaca brokule, zapaženo je povećanje udjela ukupnih katehina kod klijanaca tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA i Tweenom i to u iznosu od 27,79% i 26,66%, dok tretman čajem nije doveo do statistički značajnog povećanja u udjelu ukupnih katehina u odnosu na kontrolni uzorak pri $p \leq 0,05$ (Slika 5.). Kod klijanaca cvjetače zablježeno je povećanje udjela ukupnih katehina kod klijanaca tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA i Tweenom u iznosu od 32,14% i 26,42%, međutim tretman ekstraktom čaja nije doveo do statistički značajnog povećanja udjela ukupnih katehina. Kod klijanaca raštike, najviši udio ukupnih katehina izmjeren je kod klijanaca tretiranih čajem, kod kojih je došlo do povećanja u

udjelu ukupnih katehina od 26,01%, dok je kod klijanaca tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA i Tweenom došlo do povećanja od 18,03% i 13,62%.

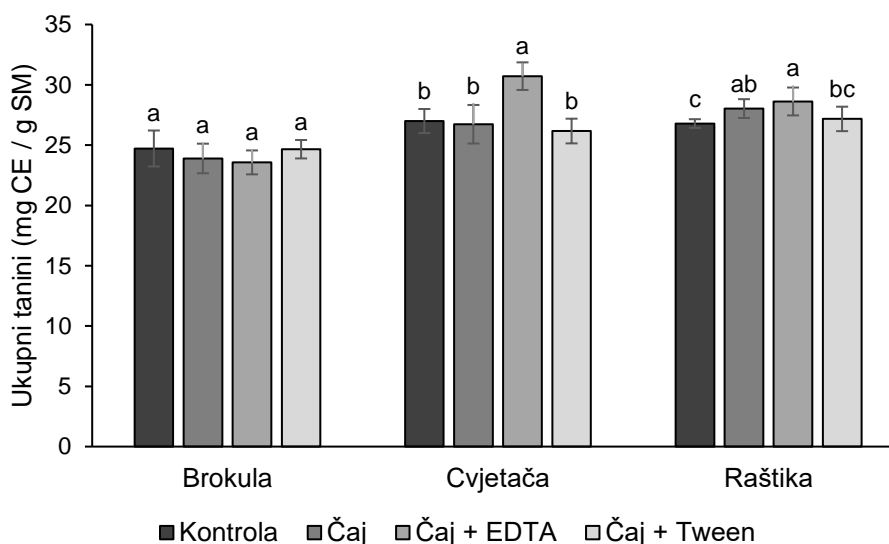
Međusobnom usporedbom svih skupina klijanaca (Prilog 5.), najviši udio ukupnih katehina utvrđen je kod klijanaca raštike tretiranih čajem. Usporedbom kontrolnih skupina, najmanji udio ukupnih katehina sadržavali su klijanci brokule, dok nije bilo statistički značajne razlike između kontrolne skupine klijanaca cvjetače i kontrolne skupine klijanaca raštike.



Slika 5. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih katehina u klijancima brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izraženu u miligramima ekvivalenata katehina po gramu suhe mase (mg CE / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 2. 5. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih tanina

Kod klijanaca cvjetače tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA zabilježeno je statistički značajno povećanje koncentracije ukupnih tanina u iznosu od 13,79% u odnosu na kontrolnu skupinu, dok kod ostalih dvaju skupina nije zabilježena statistički značajna promjena u koncentraciji ukupnih tanina pri $p \leq 0,05$ (Slika 6.). Kod klijanaca raštike, zabilježeno je povećanje u koncentraciji ukupnih tanina kod skupine tretirane čajem u kombinaciji s EDTA i kod skupine tretirane čajem i to redom u iznosu od 6,84% te 4,63%, dok tretman čajem u kombinaciji s Tween nije doveo do statistički značajne promjene u koncentraciji ukupnih tanina. S druge strane, kod klijanaca brokule nije zabilježena statistički značajna razlika koncentracije ukupnih tanina između kontrolne i tretiranih skupina. Također, kod skupina klijanaca brokule zabilježena je najniža koncentracija ukupnih tanina usporedbom svih analiziranih skupina (Prilog 5.).

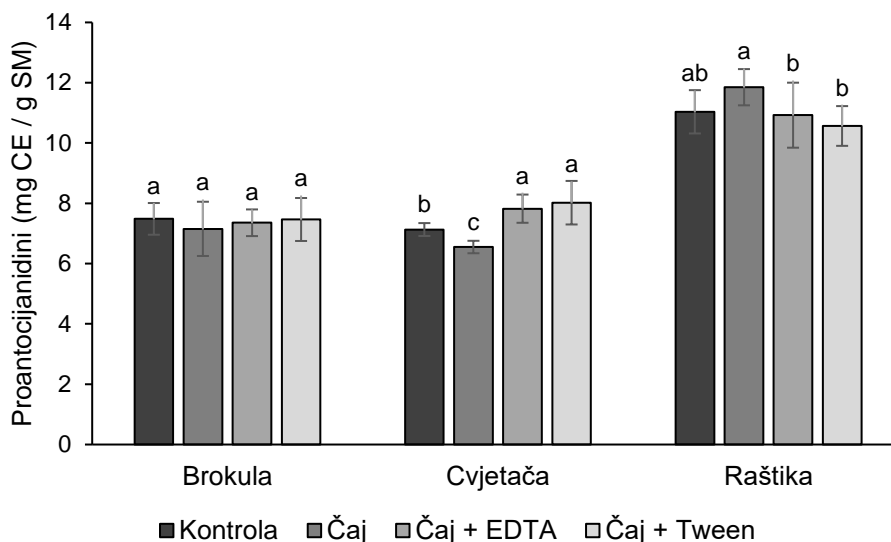


Slika 6. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih tanina u klijancima brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izraženu u miligramima ekvivalenata katehina po gramu suhe mase (mg CE / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje

vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 2. 6. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio proantocijanidina

Najviše koncentracije ukupnih proantocijanidina zabilježene su kod skupina klijanaca raštike (Slika 7.). Do statistički značajnog povećanja koncentracije ukupnih proantocijanidina došlo je kod klijanaca cvjetače tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA i čajem u kombinaciji s Tween i to redom u iznosu od 9,71%, odnosno 12,49%, dok je tretman čajem doveo do pada u koncentraciji proantocijanidina u odnosu na kontrolnu skupinu u iznosu od 8,13%. S druge strane, kod klijanaca brokule i raštike nije došlo do statistički značajnih promjena u koncentraciji proantocijanidina u odnosu na kontrolnu skupinu, međutim, kod uzoraka raštike tretirane s čajem u kombinaciji s EDTA i Tweenom, uočeno je statistički značajno manja koncentracija proantocijanidina u odnosu na skupinu tretiranu čajem i to sa smanjenjem od 7,83%, odnosno 10,85%.

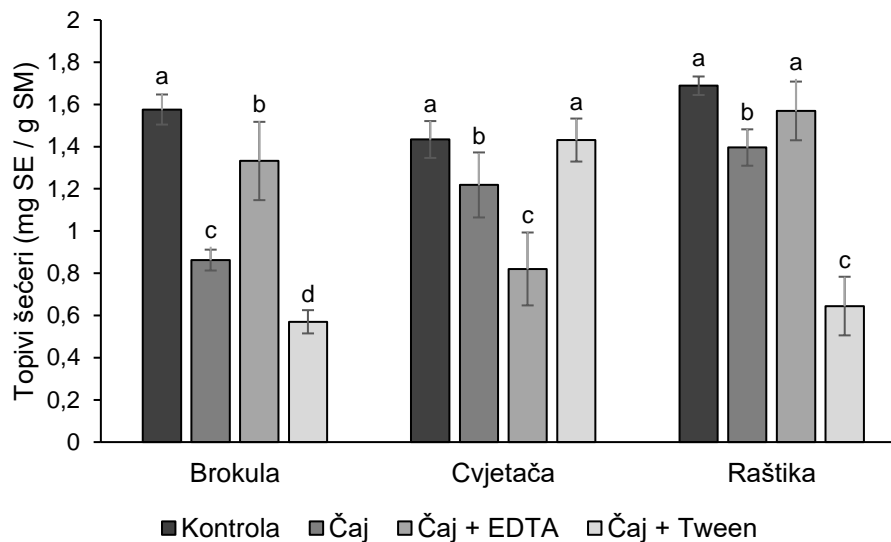


Slika 7. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih proantocijanidina u klijancima brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izraženu u miligramima ekvivalenata katehina po gramu suhe mase (mg CE / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 3. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio topivih šećera

Kod klijanaca brokule, nakon bilo kojeg od tretmana zabilježen je pad u udjelu topivih šećera u odnosu na kontrolnu skupinu pri $p \leq 0,05$ (Slika 8.). Kod klijanaca brokule tretiranih čajem zabilježen je pad udjela topivih šećera od 45,30%, kod klijanaca brokule tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA, došlo je do pada u udjelu u iznosu od 15,48%, a kod klijanaca brokule tretiranih čajem u kombinaciji s Tween u iznosu od 63,83%. Kod klijanaca cvjetače tretiranih čajem i čajem u kombinaciji s EDTA zabilježen je pad udjela topivih šećera i to redom u iznosu od 15,63% i 42,81%, međutim, kod klijanaca cvjetače tretiranih čajem u kombinaciji s Tween, nije došlo do statistički značajne promjene u udjelu u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod

klijanaca raštike tretiranih čajem te čajem u kombinaciji s Tween, došlo je do smanjenja udjela u odnosu na kontrolnu skupinu i to redom od 17,34% te 61,83%, međutim kod skupine klijanaca raštike tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA, nije došlo do statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu. Usporedbom svih analiziranih skupina, do najvećeg je pada udjela došlo kod klijanaca brokule i raštike tretiranih deterdžentom Tween, a udjeli topivih šećera između svih kontrolnih uzoraka nisu se statistički razlikovali pri $p \leq 0,05$ (Prilog 5.).



Slika 8. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio topivih šećera u klijancima brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izraženu u miligramima ekvivalenta saharoze po gramu suhe mase (mg SE / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 4. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na udio i odnose između fotosintetskih pigmenata i udio porfirina

Promjene udjela klorofila *a* nisu zabilježene između pojedinih skupina klijanaca brokule i cvjetače, međutim kod klijanaca raštike tretiranih čajem došlo je do povećanja udjela klorofila *a* u iznosu od 6,27% u odnosu na kontrolnu skupinu, dok ostali tretmani klijanaca raštike nisu doveli do statistički značajne promjene u udjelu pri $p \leq 0,05$ (Tablica 3.). S druge strane, tretman čajem doveo je do povećanja udjela klorofila *b* kod klijanaca brokule od 4,61% u odnosu na kontrolnu skupinu, a tretman čajem u kombinaciji s EDTA doveo je do smanjenja udjela klorofila *b* u iznosu od 5,32%, dok tretman čajem u kombinaciji s Tween nije doveo do statistički značajne promjene u udjelu u usporedbi s kontrolnom skupinom. Kod klijanaca cvjetače, tretman čajem i čajem u kombinaciji s EDTA doveo je do smanjenja u udjelu klorofila *b* u iznosu od, redom, 17,65% i 17,23%, dok tretman čajem u kombinaciji s Tween nije doveo do statistički značajne promjene ($p \leq 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod klijanaca raštike, i tretman čajem i tretman čajem u kombinaciji s EDTA nisu doveli do statistički značajne razlike u udjelu u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je tretman čajem u kombinaciji s Tween doveo do smanjenja u iznosu od 12,23%.

Omjer klorofila *a* i klorofila *b* kod analiziranih skupina klijanaca brokule nije se statistički promijenio u odnosu na kontrolnu skupinu, iako je kod klijanaca tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA zamijećena statistički značajno veća vrijednost od vrijednosti kod klijanaca tretiranih čajem i čajem u kombinaciji s EDTA. Kod klijanaca cvjetače, najveći omjeri klorofila *a* i *b* zamijećeni su kod klijanaca tretiranih čajem i čajem u kombinaciji s EDTA koji su za 25,00%, odnosno 16,67% veći u odnosu na kontrolnu skupinu, dok tretman čajem u kombinaciji s Tween nije doveo do statistički značajne promjene u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod klijanaca raštike vrijednosti omjera klorofila *a* i *b* se između tretmana ne razlikuju, međutim tretman čajem u kombinaciji s Tween doveo je do povećanja omjera u

iznosu od 7,69% u odnosu na kontrolnu skupinu, dok ostali tretmani nisu doveli do statistički značajne promjene omjera klorofila *a* i *b*.

Tablica 3. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio klorofila *a*, klorofila *b* i omjera klorofila *a* i klorofila *b* u klijancima brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izraženu u miligramima po gramu suhe mase (mg / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike ± standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

		Klorofil <i>a</i> (mg / g SM)	Klorofil <i>b</i> (mg / g SM)	Chl <i>a</i> / Chl <i>b</i>
Brokula	Kontrola	30,1 ± 0,3 a	28,2 ± 0,3 b	1,1 ± 0,0 ab
	Čaj	30,4 ± 0,6 a	29,5 ± 1,2 a	1,0 ± 0,1 b
	Čaj + EDTA	30,0 ± 0,5 a	26,7 ± 0,3 c	1,1 ± 0,0 a
	Čaj + Tween	29,2 ± 1,2 a	29,2 ± 0,8 ab	1,0 ± 0,1 b
Cvjetača	Kontrola	29,2 ± 1,8 a	23,8 ± 0,8 a	1,2 ± 0,1 b
	Čaj	29,3 ± 2,0 a	19,6 ± 0,7 b	1,5 ± 0,2 a
	Čaj + EDTA	28,2 ± 1,1 a	19,7 ± 1,0 b	1,4 ± 0,1 a
	Čaj + Tween	28,3 ± 1,4 a	23,2 ± 0,3 a	1,2 ± 0,1 b
Raštika	Kontrola	28,7 ± 1,8 b	22,9 ± 0,6 ab	1,3 ± 0,1 b
	Čaj	30,5 ± 1,0 a	23,3 ± 0,6 a	1,3 ± 0,1 ab
	Čaj + EDTA	28,4 ± 0,7 b	22,1 ± 0,7 b	1,3 ± 0,0 ab
	Čaj + Tween	28,1 ± 0,5 b	20,1 ± 0,5 c	1,4 ± 0,0 a

Udio ukupnih klorofila nakon tretmana klijanaca brokule čajem porastao je za 4,61%, dok je udio kod klijanaca tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA pao za 5,31%, a tretman klijanaca tretiranih čajem u kombinaciji s Tween nije doveo do statistički značajne promjene u odnosu na kontrolnu skupinu pri $p \leq 0,05$. Također, ni kod klijanaca cvjetače tretman čajem u

kombinaciji s Tween nije doveo do promjene koncentracije ukupnih klorofila, dok su tretmani čajem i čajem u kombinaciji s EDTA smanjili koncentraciju klorofila za 7,74%, odnosno 9,62% u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod klijanaca raštike, tretman čajem povećao je koncentraciju klorofila za 4,66% u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je tretman čajem u kombinaciji s Tween doveo do smanjena koncentracije u iznosu od 6,41%.

Koncentracija porfirina kod klijanaca brokule tretiranih čajem i čajem u kombinaciji s Tween nije se statistički značajno razlikovala u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je koncentracija kod klijanaca tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA pala za 5,24%. Kod klijanaca raštike, koncentracija porfirina kod skupine tretirane čajem porasla je za 8,55% u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je nakon tretmana čajem u kombinaciji s Tween smanjena za 6,98%. Nadalje, koncentracije karotenoida između tretmana kod klijanaca brokule i raštike nisu se značajno mijenjale, dok je kod klijanaca cvjetače nakon tretmana čajem i čajem u kombinaciji s EDTA koncentracija porasla za 33,33% u oba slučaja.

Tablica 4. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio porfirina, ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida u klijanacima brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izraženu u miligramima po gramu suhe mase (mg / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

		Porfirini	Klorofili	Karotenoidi
		(mg / g SM)	(mg / g SM)	(mg / g SM)
Brokula	Kontrola	70,6 \pm 0,4 a	58,3 \pm 0,6 b	2,3 \pm 0,6 a
	Čaj	69,5 \pm 0,6 a	59,8 \pm 0,8 a	1,6 \pm 0,6 a
	Čaj + EDTA	66,9 \pm 1,4 b	56,7 \pm 0,7 c	2,2 \pm 0,5 a
	Čaj + Tween	68,8 \pm 2,0 ab	58,4 \pm 0,5 b	1,6 \pm 0,6 a
Cvjetača	Kontrola	63,5 \pm 0,9 a	53,0 \pm 1,4 a	3,3 \pm 0,6 b
	Čaj	55,5 \pm 0,6 c	48,9 \pm 1,4 b	4,4 \pm 0,5 a
	Čaj + EDTA	53,9 \pm 1,7 c	47,9 \pm 0,8 b	4,4 \pm 0,5 a
	Čaj + Tween	59,9 \pm 1,3 b	51,5 \pm 1,3 a	3,5 \pm 0,4 b
Raštika	Kontrola	57,3 \pm 0,7 b	51,5 \pm 1,2 b	3,7 \pm 0,4 a
	Čaj	62,2 \pm 0,7 a	53,9 \pm 0,6 a	3,8 \pm 0,8 a
	Čaj + EDTA	58,0 \pm 1,0 b	50,5 \pm 0,9 b	3,7 \pm 0,5 a
	Čaj + Tween	53,3 \pm 1,7 c	48,2 \pm 0,9 c	4,5 \pm 0,3 a

Udio klorofila u sumi klorofila i karotenoida kod klijanaca brokule iznosio je 96,00%, dok je kod klijanaca cvjetače i raštike iznosio 90,00%, dok je kod klijanaca cvjetače i raštike udio karotenoida bio 10,00% te između tretmana nisu zabilježene statistički značajne razlike unutar vrsta klijanaca (Tablica 5.). Omjer klorofila i karotenoida kod klijanaca brokule i raštike između tretmana nije se statistički razlikovao, dok je kod klijanaca cvjetače najveća vrijednost zabilježena kod kontrolne skupine i skupine tretirane čajem u kombinaciji s Tween, a kod klijanaca tretiranih čajem, odnosno čajem u kombinaciji s EDTA omjer je pao za 32,12%,

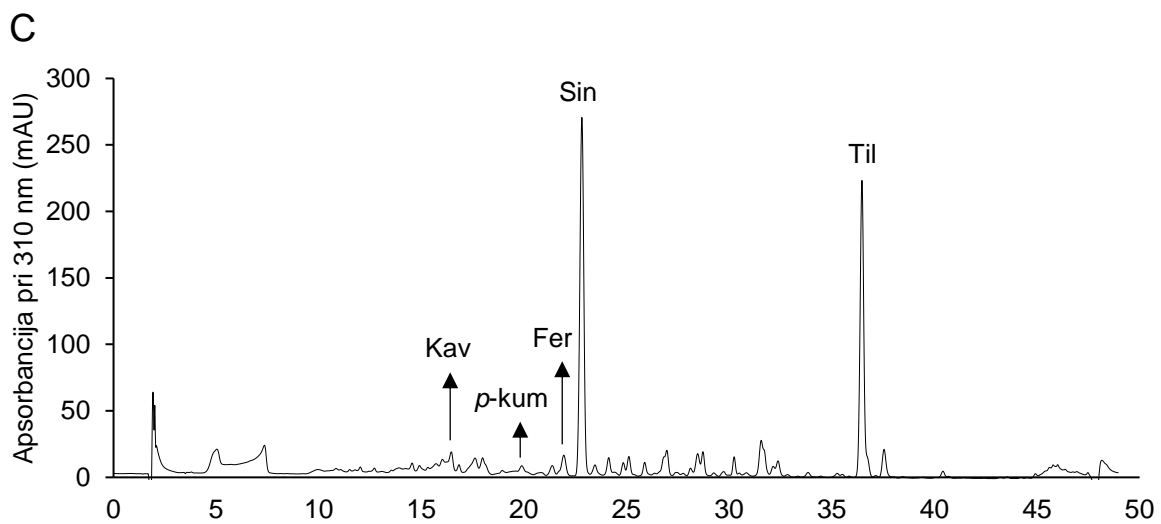
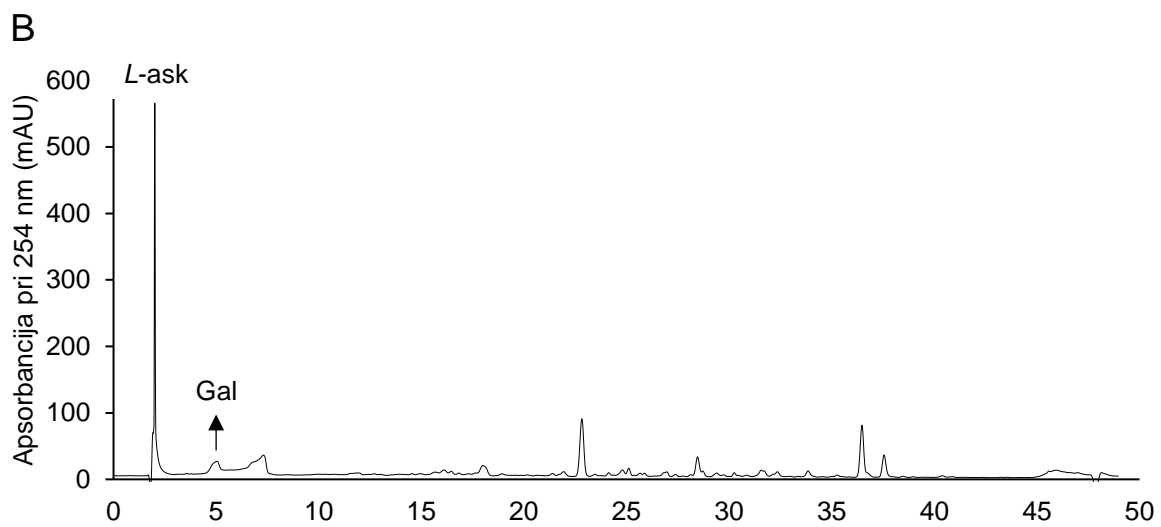
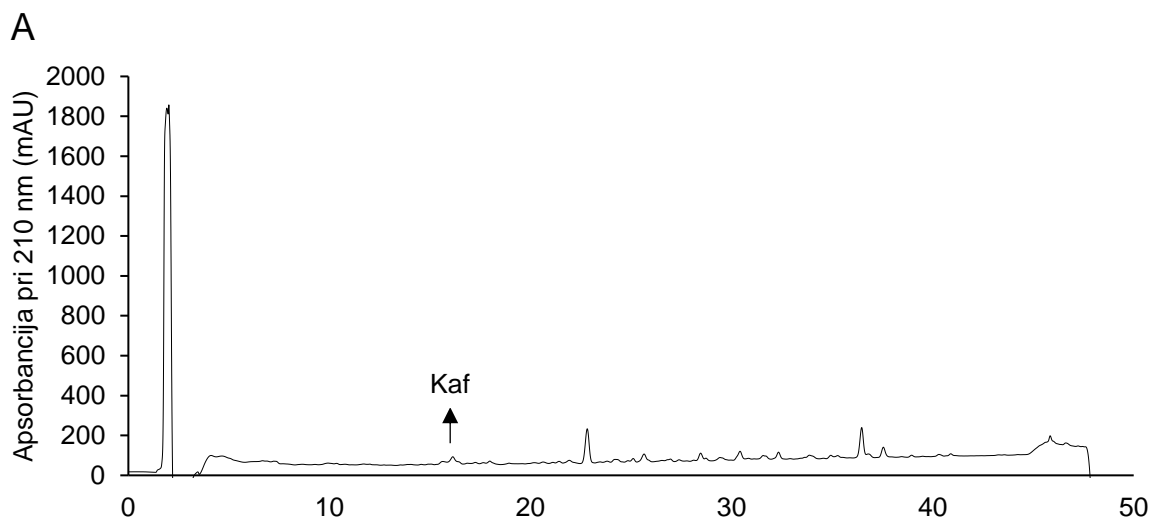
odnosno 32,72%. Ukupna koncentracija ukupnih fotosintetskih pigmenata (klorofila i karotenoida) kod klijanaca tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA pala za 2,64%, a koncentracija klijanaca tretiranih čajem i čajem u kombinaciji s Tween nije dovela do statistički značajne promjene u odnosu na kontrolnu skupinu. Također, ni kod klijanaca cvjetače tretman čajem u kombinaciji s Tween nije doveo do promjene koncentracije ukupnih klorofila i karotenoida, dok su tretmani čajem i čajem u kombinaciji s EDTA smanjili koncentraciju ukupnih karotenoida i klorofila za 5,33%, odnosno 7,28% u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod klijanaca raštike, tretman čajem povećao je koncentraciju ukupnih karotenoida i klorofila za 4,17% u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je tretman čajem u kombinaciji s Tween doveo do smanjena koncentracije u iznosu od 4,53%.

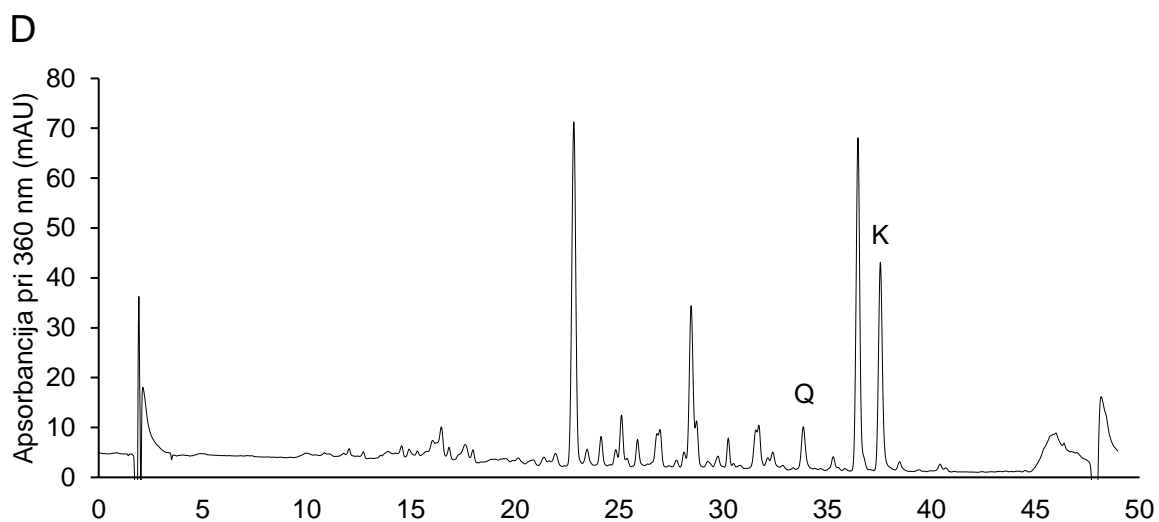
Tablica 5. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na odnose koncentracija ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida u klijancima brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

		Car + Chl	Chl / (Car + Chl)	Car / (Car + Chl)	Chl / Car
Brokula	Kontrola	60,6 \pm 0,5 ab	1,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	27,9 \pm 10,4 a
	Čaj	61,5 \pm 0,8 a	1,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	43,7 \pm 17,3 a
	Čaj + EDTA	59,0 \pm 0,9 c	1,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	26,9 \pm 6,5 a
	Čaj + Tween	60,0 \pm 0,7 bc	1,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	48,1 \pm 28,3 a
Cvjetača	Kontrola	56,3 \pm 1,7 a	0,9 \pm 0,0 a	0,1 \pm 0,0 a	16,5 \pm 3,0 a
	Čaj	53,3 \pm 1,7 bc	0,9 \pm 0,0 a	0,1 \pm 0,0 a	11,2 \pm 1,0 b
	Čaj + EDTA	52,2 \pm 0,4 c	0,9 \pm 0,0 a	0,1 \pm 0,0 a	11,1 \pm 1,5 b
	Čaj + Tween	55,0 \pm 1,1 ab	0,9 \pm 0,0 a	0,1 \pm 0,0 a	15,0 \pm 2,1 a
Raštika	Kontrola	55,2 \pm 1,3 b	0,9 \pm 0,0 a	0,1 \pm 0,0 a	14,2 \pm 1,4 ab
	Čaj	57,6 \pm 1,3 a	0,9 \pm 0,0 a	0,1 \pm 0,0 a	15,0 \pm 3,8 a
	Čaj + EDTA	54,3 \pm 0,7 bc	0,9 \pm 0,0 a	0,1 \pm 0,0 a	13,9 \pm 2,4 ab
	Čaj + Tween	52,7 \pm 1,0 c	0,9 \pm 0,0 a	0,1 \pm 0,0 a	10,7 \pm 0,9 b

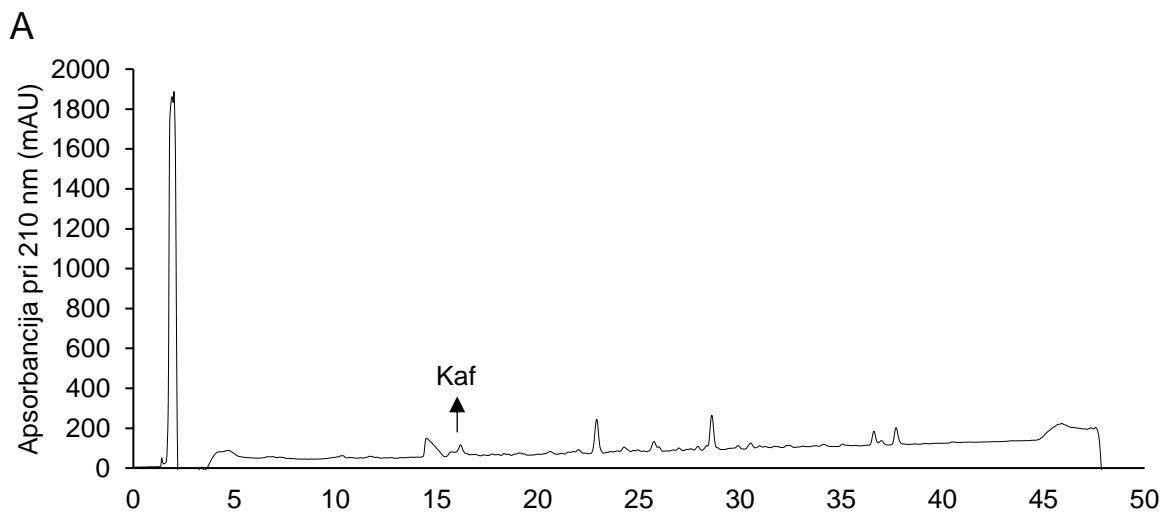
4. 5. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio kafeina, vitamina C i pojedinačnih fenolnih spojeva

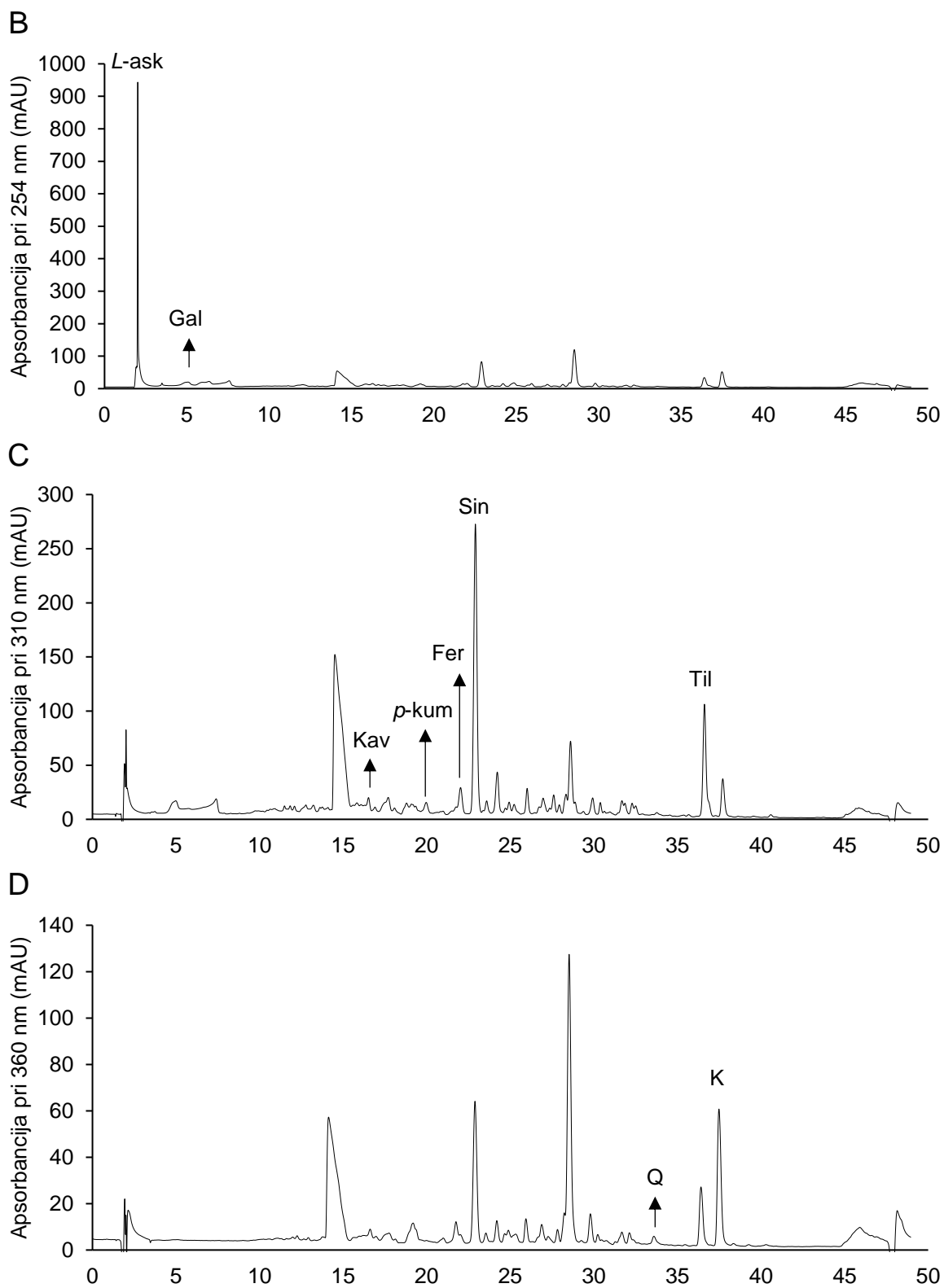
Ukupno je identificirano i kvantificirano 10 spojeva, od čega pet fenolnih kiselina (ferulična, galna, kavena, sinapinska i *p*-kumarinska), dva flavonoida (kempferol i kvercetin), jedan derivat flavonoida (tilirozid) te *L*-askorbinska kiselina (vitamin C) i kafein. Fenolni profili brokule, cvjetače i raštike nakon tretmana ekstraktom čaja s označenim identificiranim spojevima prikazani su na Slikama 9., 10. i 11. Udio ukupnih identificiranih spojeva između kontrolne skupine i tretiranih skupina za sve tri vrste klijanaca nije se statistički razlikovao. Usporedbom svih analiziranih skupina (Prilog 6.), najmanji udio ukupnih identificiranih spojeva zabilježen je kod uzoraka klijanaca brokule, a najveći kod klijanaca cvjetače tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA, tretiranih čajem i tretiranih čajem u kombinaciji s Tween te kod uzoraka klijanaca raštike tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA. Tako je kod klijanaca cvjetače tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA ukupni udio identificiranih spojeva veći za 13,16% u odnosu na kontrolnu skupinu. Također, nije zabilježena statistički značajna razlika između udjela ukupnih identificiranih fenolnih spojeva, ukupnih identificiranih fenolnih kiselina i flavonoida između kontrolne skupine i tretiranih skupina za sve od tri vrste klijanaca pri razini značajnosti $p \leq 0,05$. S druge strane, kod klijanaca brokule i raštike je nakon tretmana čajem u kombinaciji s EDTA zabilježen statistički značajan rast udjela ukupnih identificiranih ne-fenolnih spojeva.





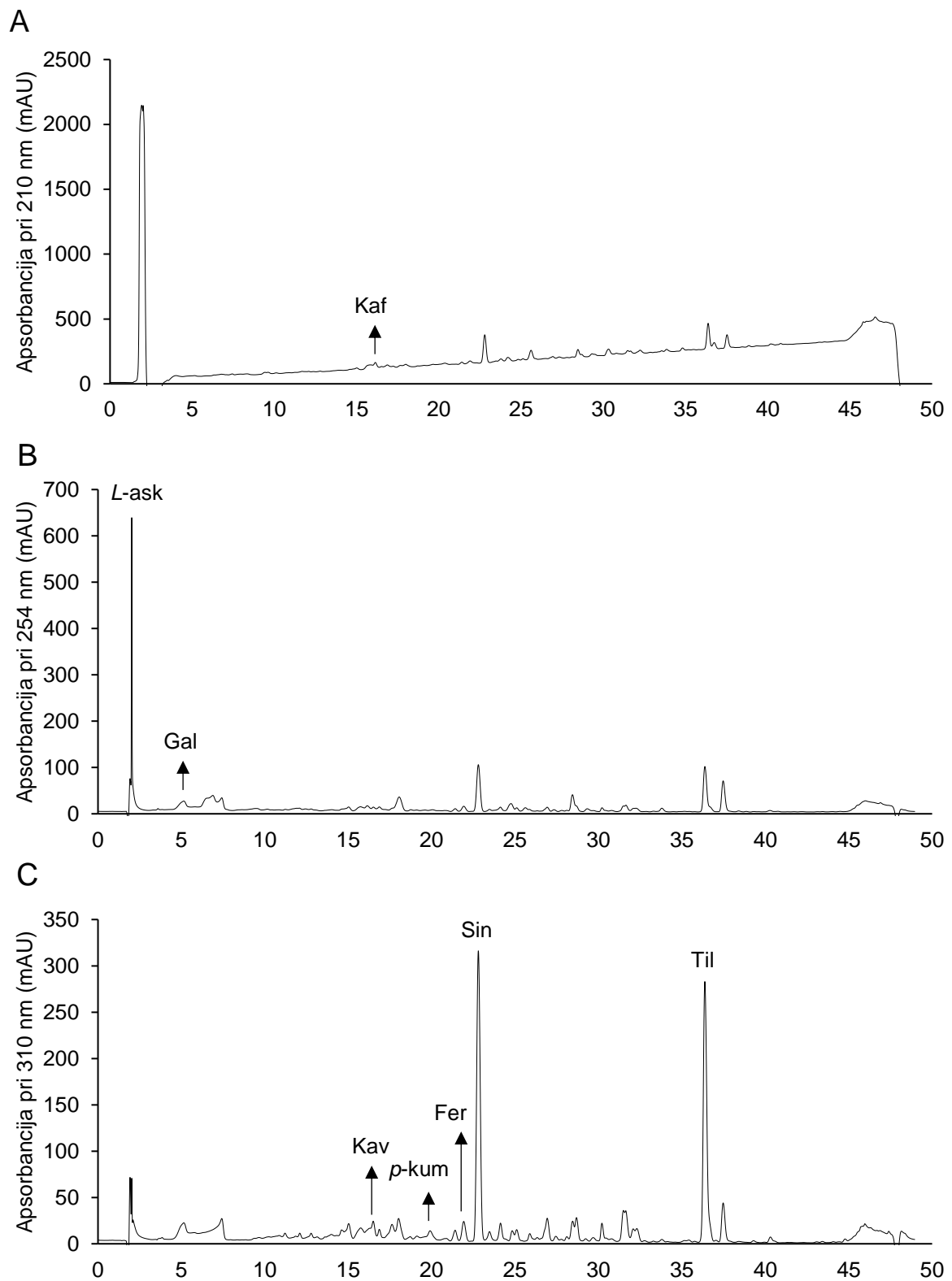
Slika 9. Kromatogrami ekstrakta klijanaca brokule dobiveni tekućinskom kromatografijom visoke moći razlučivanja snimljeni (A) pri valnoj duljini 210 nm (B) pri valnoj duljini 254 nm, (C) pri valnoj duljini 310 nm, (D) pri valnoj duljini 360 nm. Kaf – kafein, *L*-ask - *L*-askrobinska kiselina, Gal – galna kiselina, Fer – ferulična kiselina, Kav – kavena kiselina, *p*-kum – *p*-kumarinska kiselina, Sin – sinapinska kiselina, Til – tilirozid, K – kempferol, Q – kvercetin.

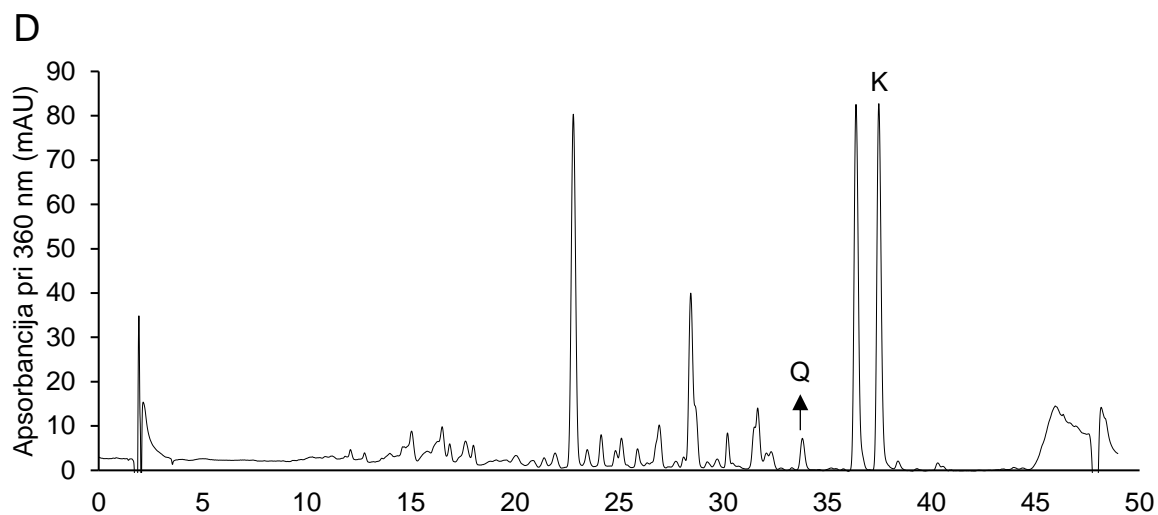




Slika 10. Kromatogrami ekstrakta klijanaca cvjetače dobiveni tekućinskom kromatografijom visoke moći razlučivanja snimljeni (A) pri valnoj duljini 210 nm (B) pri valnoj duljini 254 nm, (C) pri valnoj duljini 310 nm, (D) pri valnoj duljini 360 nm. Kaf – kafein, *L*-ask - *L*-askrobinska

kiselina, Gal – galna kiselina, Fer – ferulična kiselina, Kav – kavena kiselina, *p*-kum – *p*-kumarinska kiselina, Sin – sinapinska kiselina, Til – tilirozid, K – kempferol, Q – kvercetin.

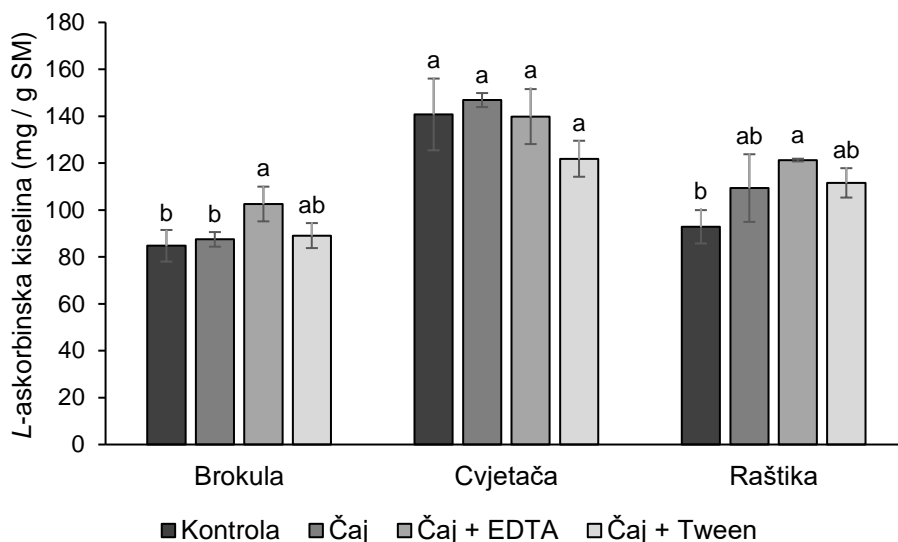




Slika 11. Kromatogrami ekstrakta klijanaca raštike dobiveni tekućinskom kromatografijom visoke moći razlučivanja snimljeni (A) pri valnoj duljini 210 nm (B) pri valnoj duljini 254 nm, (C) pri valnoj duljini 310 nm, (D) pri valnoj duljini 360 nm. Kaf – kafein, *L*-ask - *L*-askorbinska kiselina, Gal – galna kiselina, Fer – ferulična kiselina, Kav – kavena kiselina, *p*-kum – *p*-kumarinska kiselina, Sin – sinapinska kiselina, Til – tilirozid, K – kempferol, Q – kvercetin.

4. 5. 1. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio *L*-askorbinske kiseline

Usporedbom svih analiziranih skupina, opaženo je da najveću koncentraciju *L*-askorbinske kiseline sadrže klijanci cvjetače (Prilog 6.). Kod klijanaca brokule i raštike tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA zabilježen je porast koncentracije *L*-askorbinske kiseline od 21,03%, odnosno 30,64%, dok kod ostalih tretmana klijanaca brokule i raštike nije zabilježena statistički značajna razlika u koncentraciji ovog vitamina u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 12.). Također, ni kod jednog tretmana klijanaca cvjetače nije zabilježena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu pri $p \leq 0,05$.

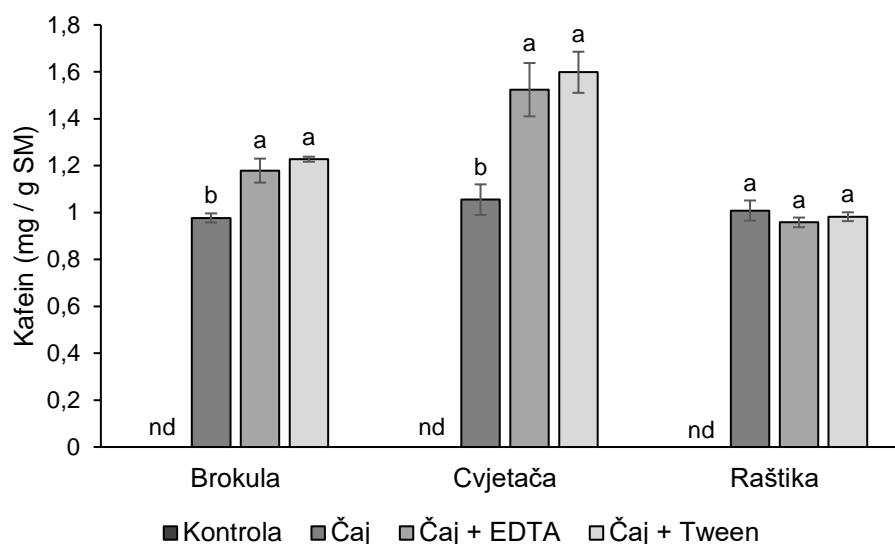


Slika 12. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio *L*-askorbinske kiseline u klijancima brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izraženu u miligramima po gramu suhe mase (mg / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike ± standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 5. 2. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio kafeina

Kod kontrolnih skupina klijanaca brokule, cvjetače i raštike, nije detektirana prisutnost kafeina (Slika 13.). Kod klijanaca brokule tretiranih čajem koncentracija kafeina iznosila je 0,98 mg / g SM, a kod klijanaca brokule tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA, odnosno s Tweenom, došlo je do povećanja koncentracije u odnosu na skupinu tretiranu čajem od 20,65%, odnosno 25,62%. Kod klijanaca cvjetače tretiranih čajem koncentracija kafeina iznosila je 1,05 mg / g SM, a kod klijanaca brokule tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA, odnosno s Tweenom, došlo je do povećanja koncentracije u odnosu na skupinu tretiranu čajem od 44,45%, odnosno 51,50%, što su ujedno najviše koncentracije kafeina, u usporedbi sa svim

uzorcima (Prilog 6.). S druge strane, kod klijanaca raštike tretiranih čajem, koncentracija kafeina iznosila je 1,01 mg / g SM, međutim koncentracija kafeina u uzorcima tretiranima čajem u kombinaciji s EDTA i Tween nije se statistički razlikovala od uzorka tretiranih čajem.

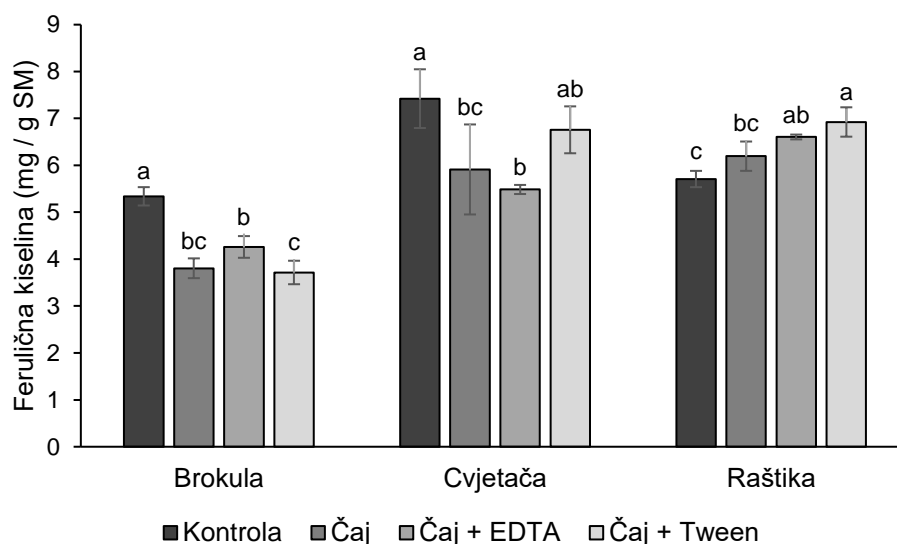


Slika 13. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio kafeina u klijancima brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izraženu u miligramima po gramu suhe mase (mg / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 5. 3. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ferulične kiseline

Kod klijanaca brokule, nakon tretmana čajem, čajem u kombinaciji s EDTA i čajem u kombinaciji s Tween zabilježen je pad koncentracije ferulične kiseline u usporedbi s kontrolnom skupinom u iznosu od, redom, 28,73%, 20,21% te 30,41% (Slika 14.). Kod klijanaca cvjetače, nakon tretmana čajem i čajem u kombinaciji s EDTA, zabilježen je pad

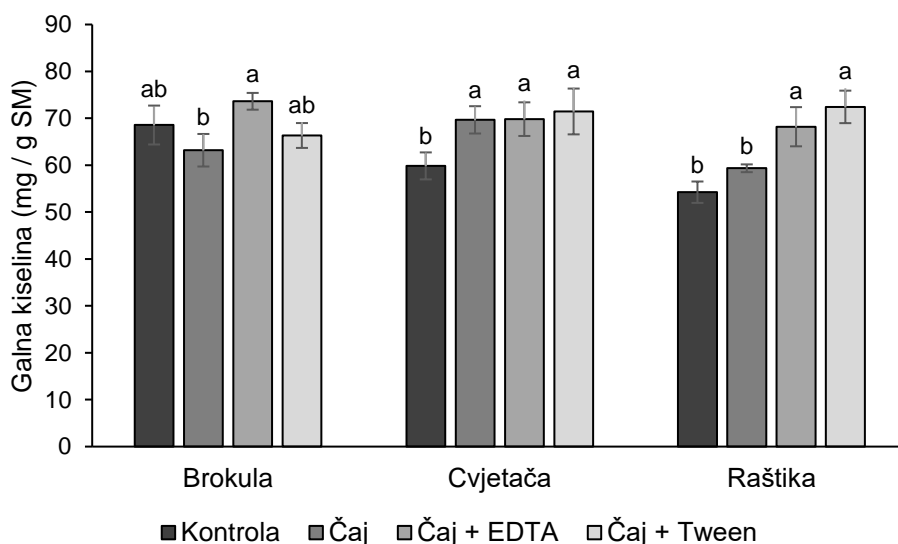
koncentracije ferulične kiseline u odnosu na kontrolnu skupinu od 20,34%, odnosno 25,10%, međutim kod skupine tretirane čajem u kombinaciji s Tween, nije došlo do statistički značajne promjene koncentracije u odnosu na kontrolnu skupinu. S druge strane, kod klijanaca raštike tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA i Tween opaženo je statistički značajno povećanje koncentracije za 15,71%, odnosno 21,32%. Najviša koncentracija ferulične kiseline u kontrolnim uzorcima zabilježena je kod klijanaca cvjetače, a kod klijanaca raštike tretiranih EDTA i Tween zabilježene su koncentracije ferulične kiseline čije se vrijednosti statistički ne razlikuju od koncentracije zabilježene kod kontrolne skupine klijanaca cvjetače na razini statističke značajnosti od $p \leq 0,05$ (Prilog 6.).



Slika 14. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na udio ferulične kiseline u klijanacima brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izraženu u miligramima po gramu suhe mase (mg / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 5. 4. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio galne kiseline

Kod klijanaca cvjetače, kod sva tri tretmana zabilježen je statistički značajan porast u koncentraciji galne kiseline u odnosu na kontrolnu skupinu te između koncentracija galne kiseline u tretiranim skupinama nije bilo statistički značajnih razlika (Slika 15.). Kod klijanaca raštike, nakon tretmana čajem nije došlo do statistički značajnog povećanja u koncentraciji galne kiseline u usporedbi s kontrolnom skupinom, međutim nakon tretmana čajem u kombinaciji s EDTA i čajem u kombinaciji s Tweenom, došlo je do statistički značajnog povećanja u iznosu od 25,74%, odnosno 33,54%. S druge strane, kod klijanaca brokule nije došlo do statistički značajne razlike između koncentracija zabilježenih u kontrolnoj skupini i tretiranim skupinama, međutim kod klijanaca brokule tretiranih čajem, zabilježena je statistički značajno niža koncentracija galne kiseline od koncentracije izmjerene kod klijanaca brokule tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA, u iznosu od 14,17%.

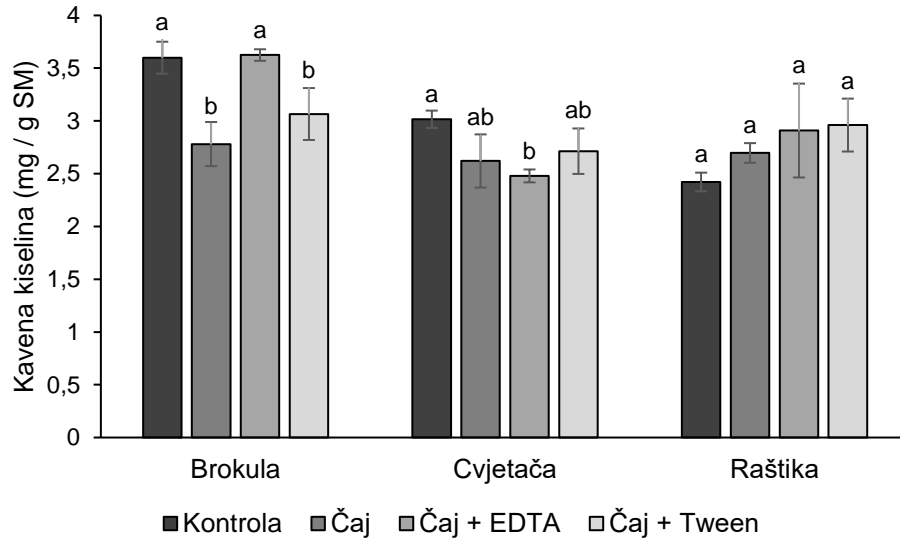


Slika 15. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio galne kiseline u klijancima brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izraženu u miligramima po gramu suhe mase (mg / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke

replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 5. 5. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio kavene kiseline

Kod tretiranih skupina klijanaca raštike, nije došlo do statistički značajnih razlika u koncentraciji kavene kiseline u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 16.). Kod klijanaca brokule, nakon tretmana čajem te tretmana čajem u kombinaciji s Tween, došlo je do statistički značajnog smanjenja u koncentraciji kavene kiseline u odnosu na kontrolnu skupinu od 22,73%, odnosno 14,81%, dok kod tretmana čajem u kombinaciji s EDTA, nije zabilježena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu. Suprotno, kod tretmana klijanaca cvjetače čajem u kombinaciji s EDTA, došlo je do statistički značajnog pada u koncentraciji kavene kiseline od 17,81%, dok nakon tretmana čajem i čajem u kombinaciji s Tween, nije došlo do statistički značajnog pada u koncentraciji kavene kiseline te se izmjerene koncentracije nisu statistički razlikovale između tretiranih skupina klijanaca cvjetače. Usporedbom svih analiziranih skupina (Prilog 6.), najviše koncentracije kavene kiseline zabilježene su kod klijanaca brokule kontrolne skupine te skupine tretirane čajem u kombinaciji s EDTA. Značajno, nakon tretmana klijanaca raštike čajem u kombinaciji s Tweenom, kod kojih je u kontrolnoj skupini zabilježena najniža koncentracija kavene kiseline, koncentracija kavene kiseline je dostigla koncentraciju zabilježenu u klijancima kontrolne skupine cvjetače, od kojih je kontrolna skupina raštike imala koncentraciju nižu za 19,72%, nakon tretmana nije zabilježena statistička razlika između ta dva uzorka, usporedbom svih analiziranih skupina.

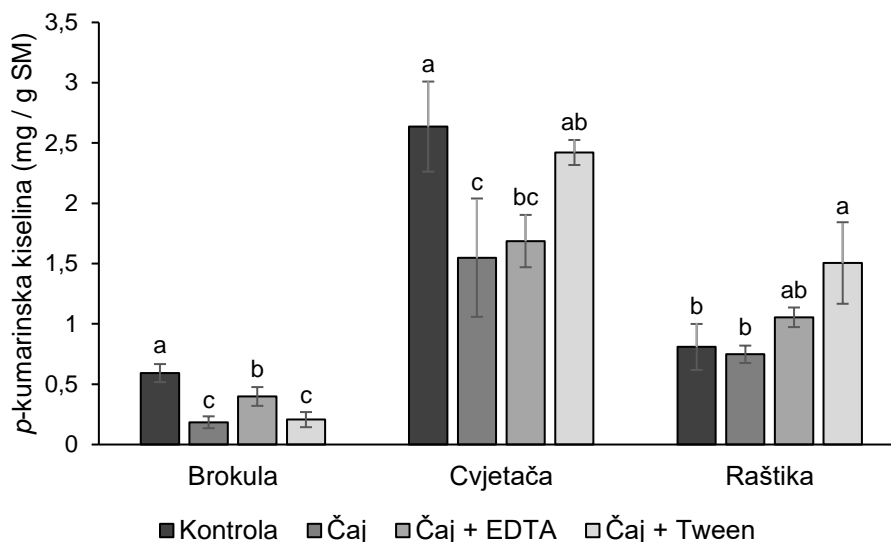


Slika 16. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio kavene kiseline u klijancima brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izraženu u miligramima po gramu suhe mase (mg / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 5. 6. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio *p*-kumarinske kiseline

Kod tretiranih skupina klijanaca brokule zamijećen je statistički značajan pad koncentracije *p*-kumarinske kiseline, kod klijanaca tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA od 32,77%, a kod klijanaca tretiranih čajem i čajem u kombinaciji s Tween zabilježen je pad koncentracije u iznosu od 68,75%, odnosno 65,14% u odnosu na kontrolnu skupinu, a vrijednosti su se također statistički značajno razlikovale od koncentracije kod klijanaca tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA (Slika 17.). Kod klijanaca cvjetače zabilježen je statistički značajan pad u koncentraciji *p*-kumarinske kiseline kod skupine tretirane čajem u iznosu od 40,48% te kod skupine tretirane čajem u kombinaciji s EDTA u iznosu od 36,00% u

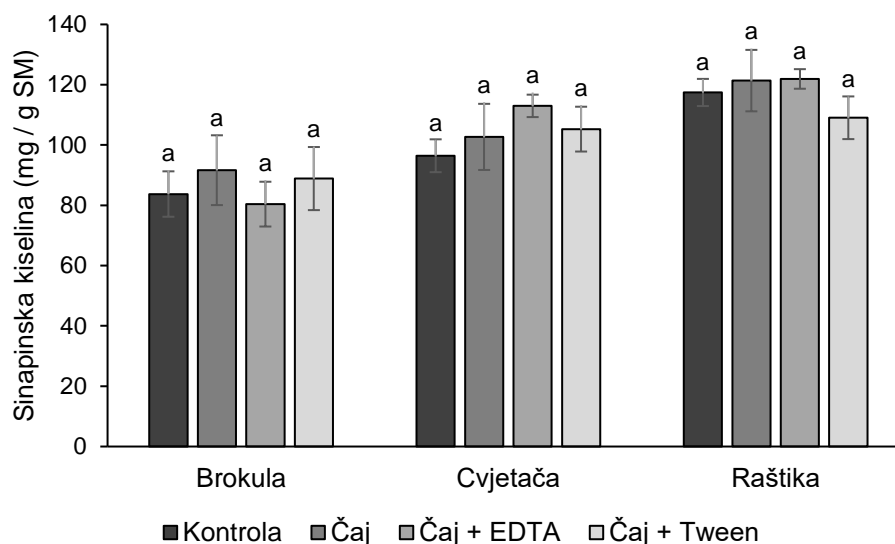
odnosu na kontrolnu skupinu. Međutim, kod klijanaca cvjetače tretiranih čajem u kombinaciji s Tween, nije došlo do statistički značajnog pada u koncentraciji *p*-kumarinske kiseline usporedbom s kontrolnom skupinom. Također, vrijednost koncentracije *p*-kumarinske kiseline kod klijanaca cvjetače tretiranih čajem u kombinaciji s Tween nije se statistički razlikovala od koncentracije izmjerene kod klijanaca cvjetače tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA, čija se vrijednost koncentracije nije razlikovala od koncentracije izmjerene u skupini klijanaca cvjetače tretiranih čajem. Kod klijanaca raštike, najviša koncentracija *p*-kumarinske kiseline zabilježena je kod klijanaca raštike tretiranih čajem u kombinaciji s Tween, čija se vrijednost nije statistički razlikovala od koncentracije utvrđene kod klijanaca raštike tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA. Također, kod klijanaca raštike tretiranih čajem i čajem u kombinaciji s EDTA nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu. Pritom, usporedbom svih analiziranih skupina (Prilog 6.), najviše su vrijednosti koncentracije *p*-kumarinske kiseline zabilježene kod uzoraka kontrolne skupine klijanaca cvjetače i klijanaca cvjetače inkubiranih čajem u kombinaciji s Tween, dok koncentracija u kljancima raštike inkubiranih čajem u kombinaciji s Tween konkurrira koncentraciji u kljancima cvjetače inkubiranim čajem i čajem u kombinaciji s EDTA, dok su najniže koncentracije zabilježene kod klijanaca brokule te kontrolne skupine klijanaca raštike i skupine klijanaca raštike tretiranih čajem.



Slika 17. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio *p*-kumarinske kiseline u klijancima brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izraženu u miligramima po gramu suhe mase (mg / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 5. 7. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio sinapinske kiseline

Koncentracija sinapinske kiseline nakon tretmana između uzoraka nije se statistički značajno mijenjala niti kod jedne vrste klijanaca (Slika 18.). Međutim, usporedbom svih analiziranih uzoraka (Prilog 6.), kod kontrolne skupine klijanaca raštike opažena je koncentracija sinapinske kiseline veća od kontrolnih skupina klijanaca brokule i cvjetače, između kojih nije bilo statistički značajne razlike. No, kod tretiranih skupina klijanaca cvjetače, koncentracija sinapinske kiseline u skupini tretiranoj čajem u kombinaciji s EDTA, odnosno Tweenom dovela je do povećanja koncentracije koja konkurira koncentraciji sinapinske kiseline u kontrolnoj skupini klijanaca raštike.

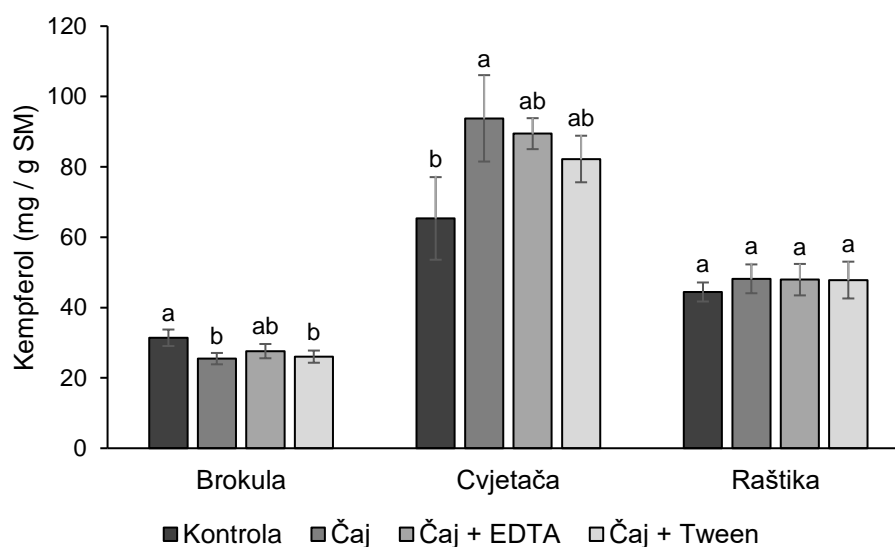


Slika 18. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio sinapinske kiseline u klijancima brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izraženu u miligramima po gramu suhe mase (mg / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 5. 8. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio kempferola

Najviše koncentracije kempferola zabilježene su kod uzoraka klijanaca cvjetače, dok su najniže koncentracije zabilježene kod uzorka klijanaca brokule (Slika 19.). Pritom, kod klijanaca cvjetače tretiranih čajem došlo je do povećanja u koncentraciji kempferola od 43,56% u odnosu na kontrolnu skupinu, no kod ostalih tretmana, koncentracija kempferola u klijancima cvjetače nije se statistički razlikovala od kontrolne skupine, te nije zabilježena statistički značajna razlika između koncentracija kempferola kod tretiranih skupina klijanaca cvjetače međusobno. S druge strane, kod klijanaca brokule, nakon tretmana čajem i tretmana čajem u kombinaciji s Tween došlo je do smanjenja koncentracije kempferola u odnosu na kontrolnu

skupinu u iznosu od 18,88%, odnosno 17,10%, dok se vrijednost koncentracije kempferola kod klijanaca brokule tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA nije statistički razlikovala ni od koncentracije u kontrolnoj skupini klijanaca ni od koncentracija u ostala dva tretmana klijanaca brokule. Kod klijanaca raštike nije uočena statistički značajna razlika u koncentraciji kempferola između kontrolne skupine i tretiranih skupina.

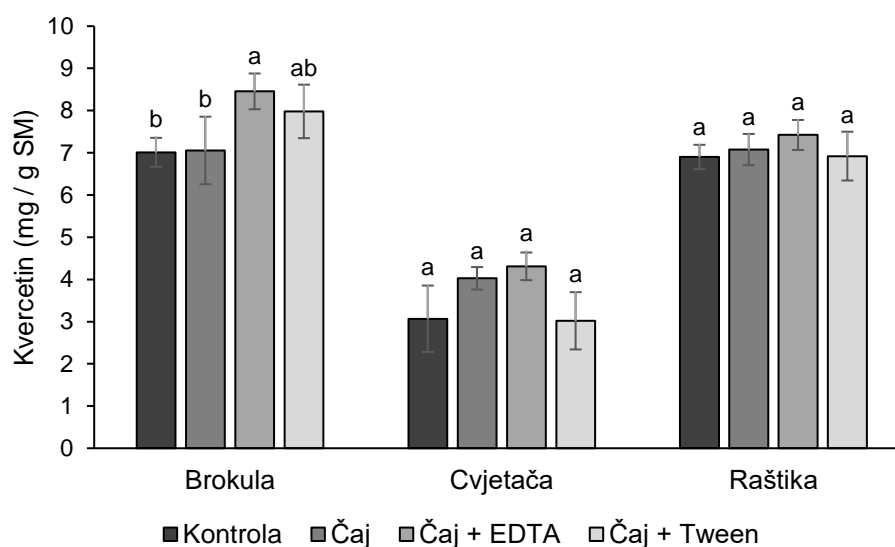


Slika 19. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio kempferola u klijancima brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izraženu u miligramima po gramu suhe mase (mg / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 5. 9. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio kvercetina

Kod klijanaca cvjetače i raštike, nije zabilježena promjena koncentracije kvercetina kod tretiranih skupina u odnosu na kontrolne skupine klijanaca (Slika 20.). Međutim, kod klijanaca

brokule tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA zamijećeno je statistički značajno povećanje koncentracije kvercetina u odnosu na kontrolnu skupinu u iznosu od 20,54%, dok druga dva tretmana nisu dovela do statistički značajne razlike u koncentraciji kvercetina u odnosu na kontrolnu skupinu. Usporedbom svih analiziranih skupina (Prilog 6.), najniže koncentracije kvercetina zabilježene su u skupinama klijanaca cvjetače.

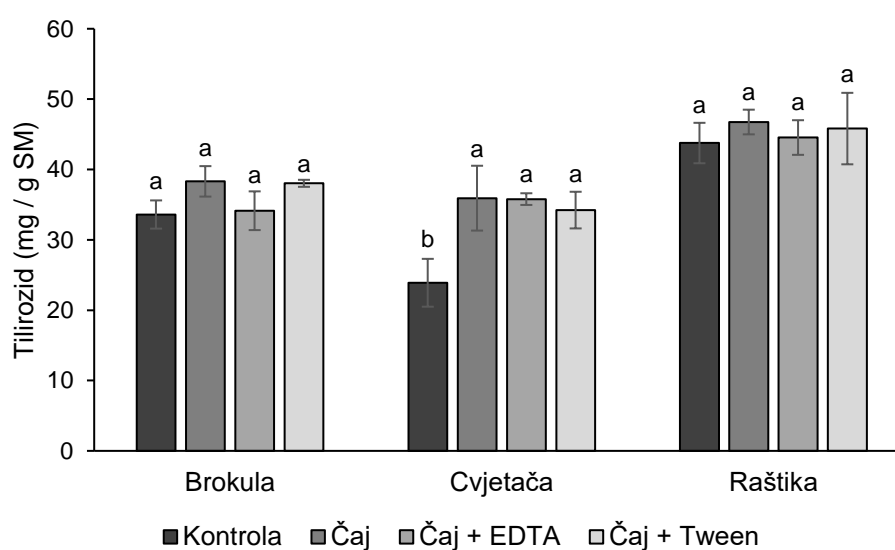


Slika 20. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na udio kvercetina u klijancima brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izraženu u miligramima po gramu suhe mase (mg / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 5. 10. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na udio tilirozida

Kod klijanaca cvjetače tretiranih čajem, čajem u kombinaciji s EDTA i čajem u kombinaciji s Tween došlo je do statistički značajnog povećanja koncentracije tilirozida u

odnosu na kontrolnu skupinu u iznosu od, redom, 50,36%, 49,77% i 43,28%, te se te vrijednosti međusobno nisu statistički razlikovale (Slika 21.). Ujedno, kod kontrolne skupine klijanaca cvjetače zabilježena je najniža koncentracija tilirozida, a koncentracija je kod tretiranih skupina klijanaca cvjetače dostigla koncentracije tilirozida izmjerene u skupinama klijanaca brokule (Prilog 6.). Kod klijanaca brokule i raštike nije uočena statistički značajna razlika u koncentracijama između skupina.

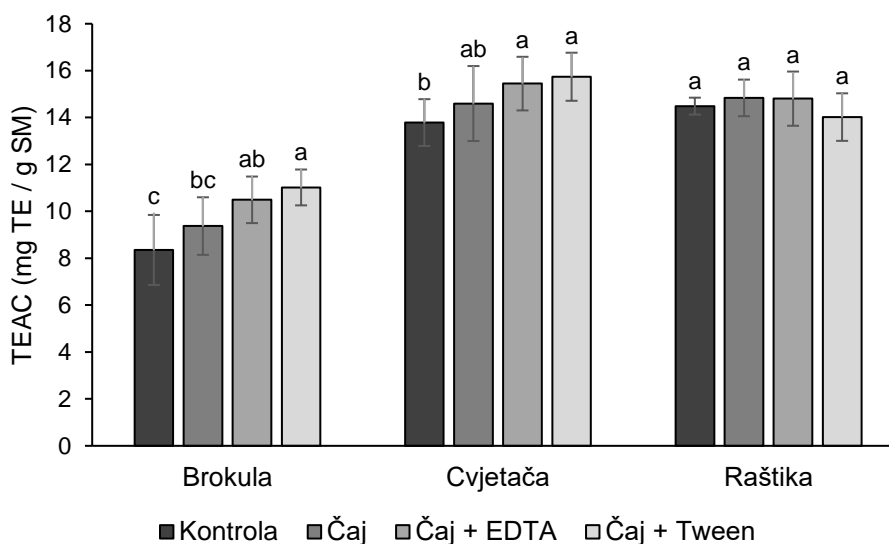


Slika 21. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio tilirozida u klijanacima brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izraženu u miligramima po gramu suhe mase (mg / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 6. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na antioksidacijski kapacitet

4. 6. 1. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na antioksidacijski kapacitet određen metodom ABTS

Kod klijanaca cvjetače tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA i Tween zabilježen je porast antioksidacijskog kapaciteta u iznosu od 12,06%, odnosno 14,17%, dok tretman čajem nije doveo do statistički značajnog povećanja u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod klijanaca brokule, vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta porasle su nakon tretmana čajem u kombinaciji s EDTA i Tween u iznosu od 25,66%, odnosno 26,14%, te se međusobno nisu statistički značajno razlikovale, dok je tretman čajem u kombinaciji s Tween kod klijanaca brokule doveo do statistički značajnog povećanja u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu tretiranu čajem. Također, kod skupina klijanaca brokule je usporedbom svih analiziranih skupina zabilježen najniži antioksidacijski kapacitet. Kod klijanaca raštike nije zamijećena statistički značajna razlika između analiziranih skupina.

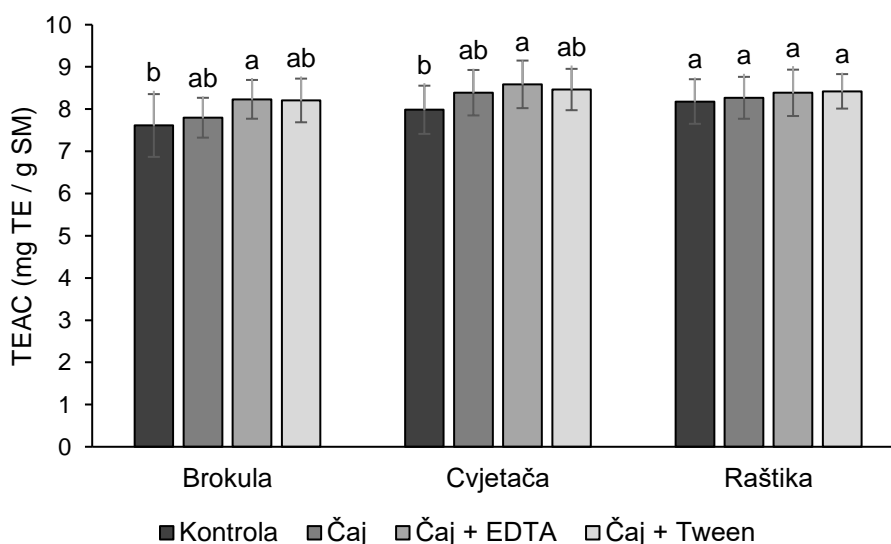


Slika 22. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na antioksidacijski kapacitet određen metodom ABTS klijanaca brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween,

izražen kao mg ekvivalenta Troloxa po gramu suhe mase (mg / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 6. 2. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na antioksidacijski kapacitet određen metodom DPPH

Kod klijanaca brokule i cvjetače, tretman čajem u kombinaciji s EDTA doveo je do statistički značajnog povećanja antioksidacijskog kapaciteta u iznosu od 8,14%, odnosno 7,54%. S druge strane, tretmani čajem i čajem u kombinaciji s Tween kod klijanaca brokule i cvjetače nisu doveli do statistički značajne razlike u antioksidacijskom kapacitetu u odnosu na kontrolnu skupinu, te se vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta svih tretiranih skupina obaju skupina klijanaca nisu statistički razlikovale. Također, nijedan od tretmana nije doveo do povećanja antioksidacijskog kapaciteta kod klijanaca raštike u odnosu na kontrolnu skupinu.

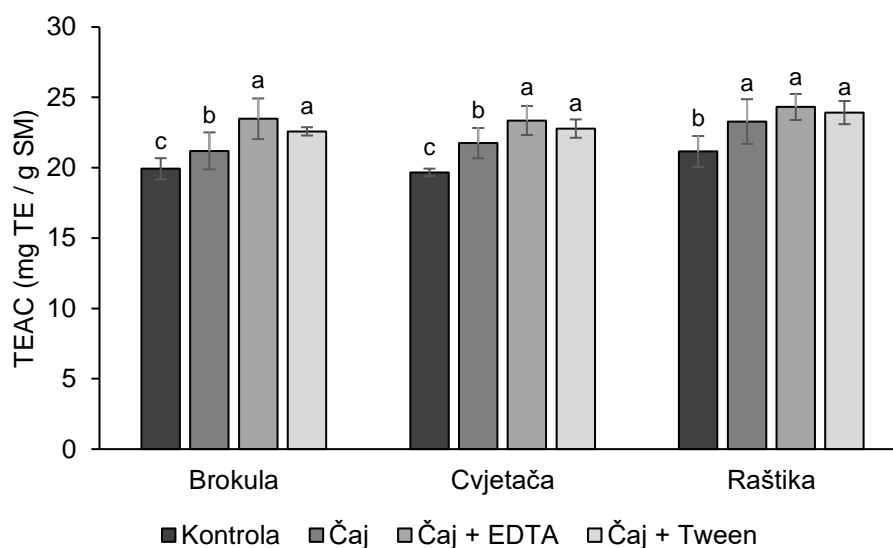


Slika 23. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na antioksidacijski kapacitet, određen metodom DPPH, klijanaca brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran

čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izražen kao TEAC (engl. *Trolox equivalent antioxidant capacity*, ekvivalent antioksidacijskog kapaciteta Troloxa), odnosno mg ekvivalenta Troloxa po gramu suhe mase (mg / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 6. 3. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na antioksidacijski kapacitet određen metodom FRAP

Kod svih tretiranih skupina klijanaca brokule, cvjetače i raštike, zabilježen je statistički značajan porast antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na antioksidacijski kapacitet odgovarajućih kontrolnih skupina. Tako, kod klijanaca brokule tretiranih čajem zabilježeno je povećanje antioksidacijskog kapaciteta za 6,38% u odnosu na kontrolnu skupinu, a vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta klijanaca tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA i Tween statistički su se razlikovale od vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta kontrolne skupine te od skupine tretirane čajem te su bile povećane za 17,84%, odnosno 13,35% u odnosu na kontrolnu skupinu. Jednak trend kao i kod klijanaca brokule, zabilježen je i kod klijanaca cvjetače, kod kojih je došlo do povećanja antioksidacijskog kapaciteta klijanaca tretiranih čajem od 10,60%, kod klijanaca tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA od 18,77% te kod klijanaca tretiranih čajem u kombinaciji s Tween od 15,84%, u odnosu na kontrolnu skupinu klijanaca cvjetače. Kod svih tretiranih skupina klijanaca raštike došlo je do povećanja antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na kontrolnu skupinu te se vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta tretiranih skupina klijanaca raštike međusobno nisu statistički razlikovale. Pritom, kod klijanaca raštike tretiranih čajem, došlo je do povećanja od 10,06% u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je kod klijanaca raštike tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA, odnosno Tween, došlo do povećanja u iznosu od 14,95%, odnosno 13,07%.



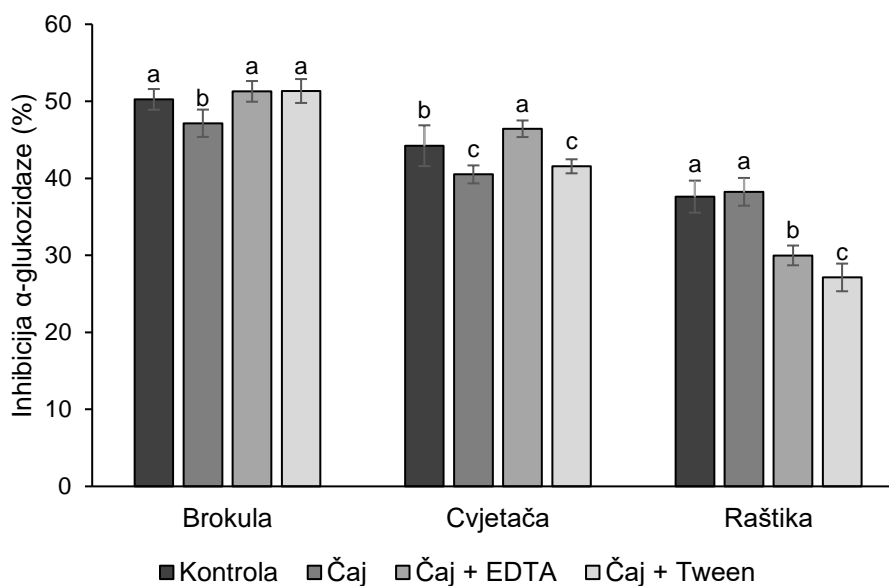
Slika 24. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na antioksidacijski kapacitet određen metodom FRAP klijanaca brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izražen kao TEAC (engl. *Trolox equivalent antioxidant capacity*, ekvivalent antioksidacijskog kapaciteta Troloxa), odnosno mg ekvivalenta Troloxa po gramu suhe mase (mg / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 7. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na antidijabetička svojstva

4. 7. 1. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na sposobnost inhibicije α -glukozidaze

Povećanje sposobnosti inhibicije enzima α -glukozidaze u odnosu na kontrolnu skupinu zabilježeno je kod klijanaca cvjetače tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA od 4,97%, dok su ostala dva tretmana dovela do smanjenja sposobnosti inhibicije enzima α -glukozidaze, kod klijanaca tretiranih čajem u iznosu od 8,41%, a kod klijanaca tretiranih čajem u kombinaciji s Tween od 6,04% (Slika 25.). Kod klijanaca brokule, tretman čajem doveo je do smanjena

spособnosti inhibicije u iznosu od 6,17%, dok ostala dva tretmana nisu dovela do statistički značajnih promjena u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod klijanaca raštike, tretman čajem nije doveo do statistički značajnih razlika u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je kod klijanaca raštike tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA, postotak inhibicije smanjen za 20,29%, a kod klijanaca raštike tretiranih čajem u kombinaciji s Tween, postotak inhibicije smanjen je za 27,89%. Pritom, usporedbom svih analiziranih skupina, najveći postotak inhibicije enzima α -glukozidaze zabilježen je kod klijanaca brokule kontrolne skupine te skupina tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA i Tween, dok je najniži postotak inhibicije uočen kod klijanaca raštike tretiranih čajem u kombinaciji s Tween. Za usporedbu, postotak inhibicije aktivnosti α -glukozidaze akarbozom, standardnim inhibitorom α -glukozidaze, iznosio je $92,70\% \pm 1,21$.

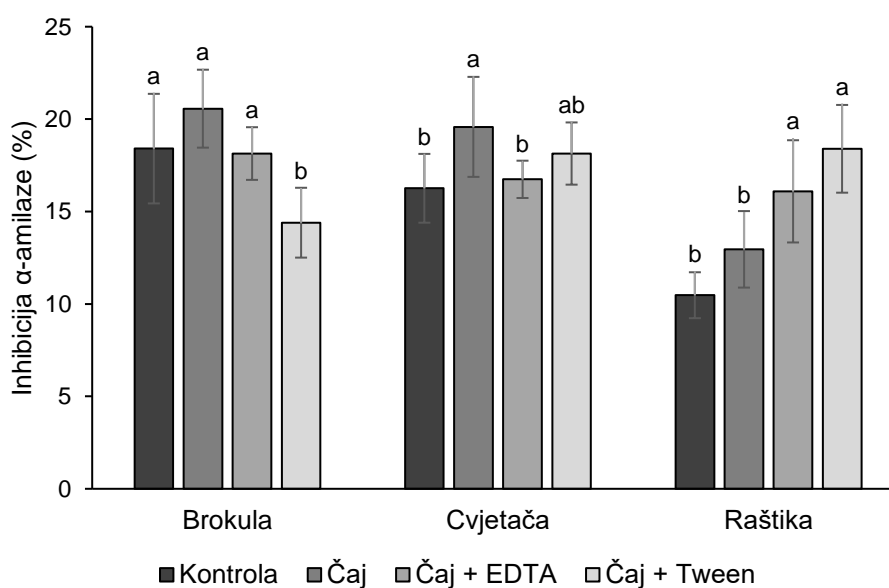


Slika 25. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na sposobnost inhibicije enzima α -glukozidaze ekstraktima klijanaca brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izražen kao postotak inhibicije enzima (%). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti

između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 7. 2. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na sposobnost inhibicije α -amilaze

Kod klijanaca raštike tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA, odnosno Tween, zabilježeno je povećanje postotka inhibicije enzima α -amilaze u iznosu od 53,65%, odnosno 75,62% u odnosu na kontrolnu skupinu, dok tretman čajem nije doveo do statistički značajne promjene u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 26.). Kod klijanaca cvjetače, tretman čajem doveo je do povećanja postotka inhibicije u iznosu 20,43%, dok ostali tretmani nisu doveli do statistički značajne promjene u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod klijanaca brokule, tretmani čajem i čajem u kombinaciji s EDTA nisu doveli do statistički značajne promjene u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je tretman čajem u kombinaciji s Tween doveo do smanjenja postotka inhibicije u iznosu od 21,77%. Za usporedbu, postotak inhibicije enzima lipaze standardnim inhibitorom maltozom iznosio je $26,43\% \pm 2,95$.

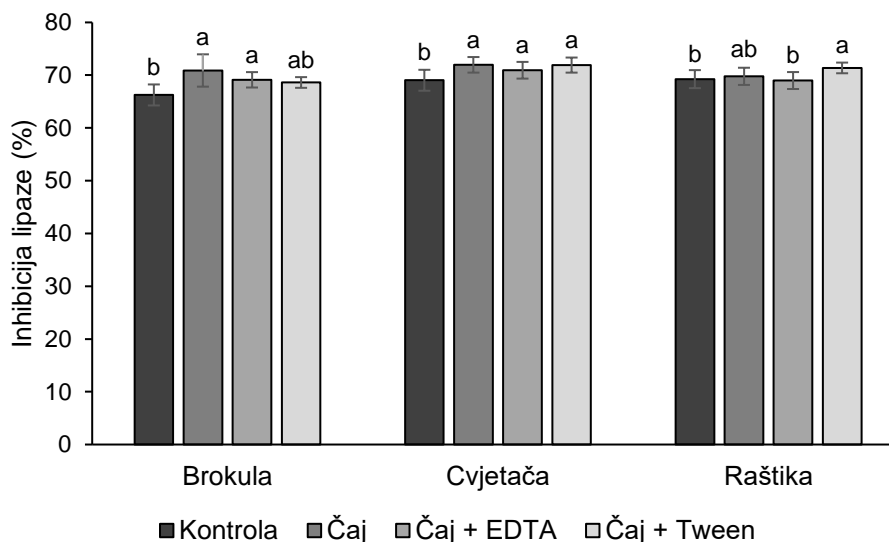


Slika 26. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na sposobnost inhibicije enzima α -amilaze ekstraktima klijanaca brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem,

uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izražen kao postotak inhibicije enzima (%). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 7. 3. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na sposobnost inhibicije lipaze

Sva tri tretmana kod klijanaca cvjetače dovela su do povećanja postotka inhibicije enzima lipaze (Slika 27.). Kod klijanaca cvjetače tretiranih čajem došlo je do povećanja od 4,24% u odnosu na kontrolnu skupinu, kod klijanaca cvjetače tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA u iznosu od 2,75%, a kod klijanaca cvjetače tretiranih čajem u kombinaciji s Tween do povećanja u iznosu od 4,17%. Kod klijanaca brokule, tretmani čajem i čajem u kombinaciji s EDTA doveli su do povećanja u iznosu od 7,00%, odnosno 4,33%, dok tretman čajem u kombinaciji s Tween nije doveo do statistički značajne promjene u postotku inhibicije u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod klijanaca raštike, tretman čajem u kombinaciji s Tween doveo je do povećanja u iznosu od 3,07%, dok ostali tretmani nisu doveli do statistički značajne promjene u odnosu na kontrolnu skupinu. Postotak inhibicije standardnog inhibitora lipaze, orlistata, iznosio je $81,97\% \pm 0,25$.



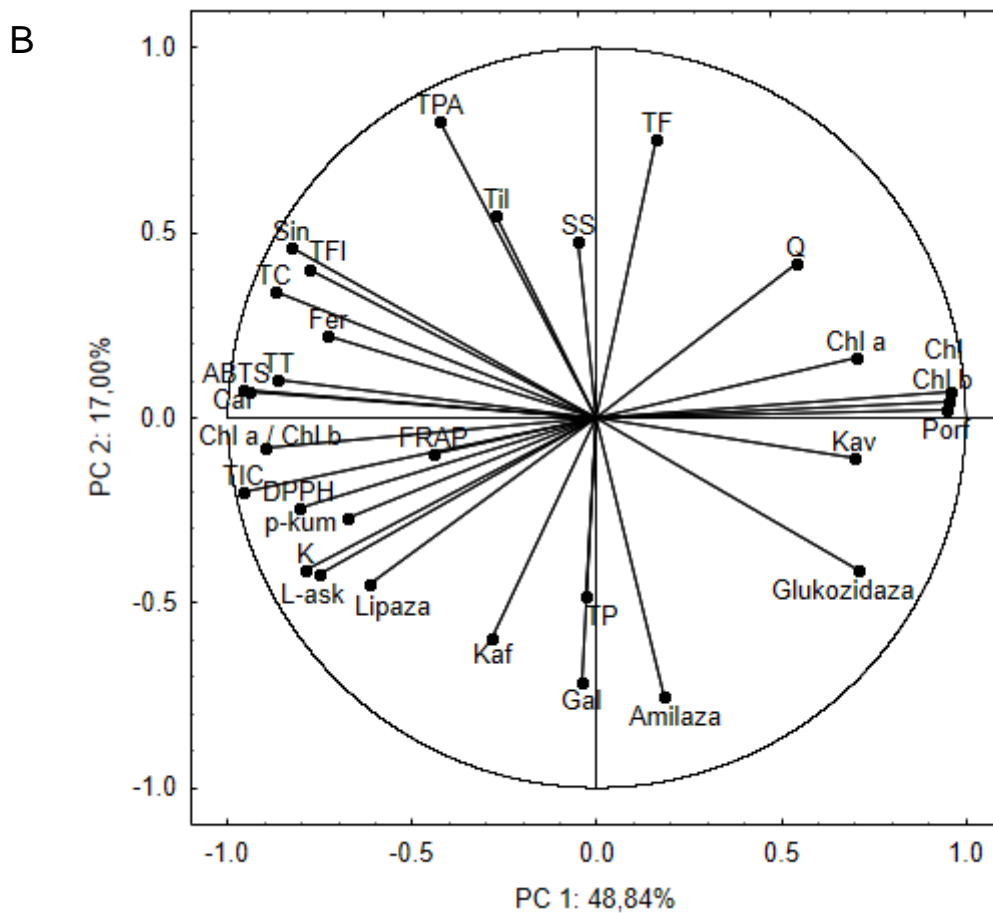
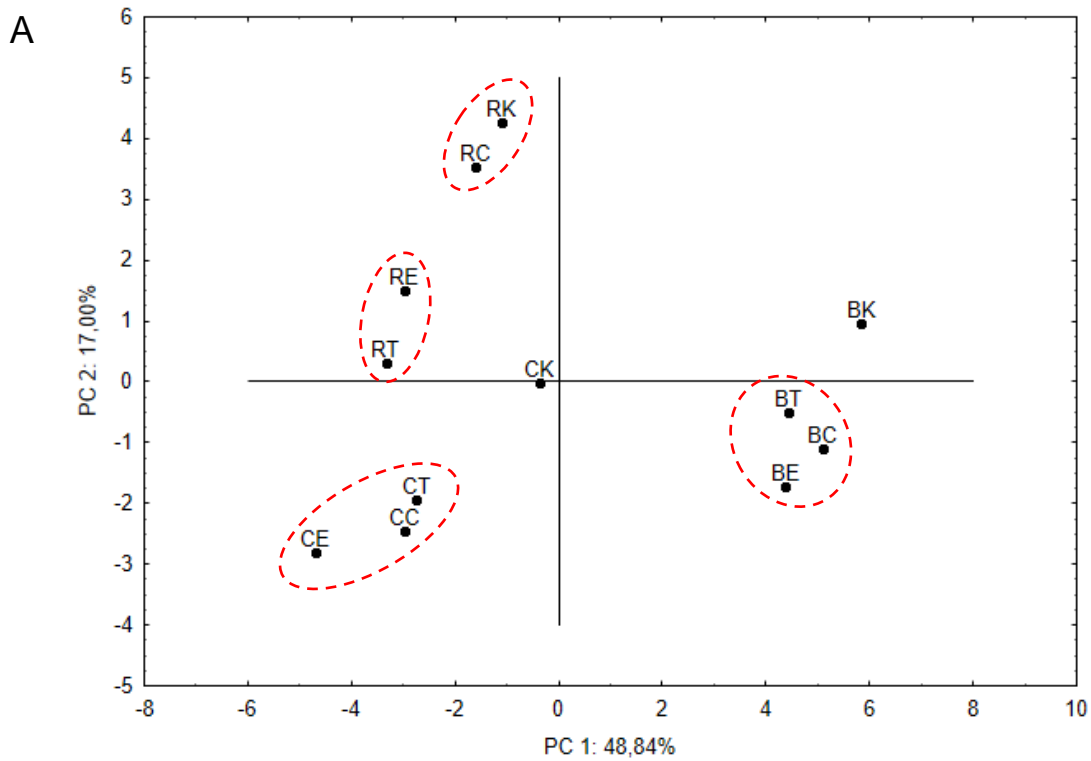
Slika 27. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na sposobnost inhibicije enzima lipaze ekstraktima klijanaca brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izražen kao postotak inhibicije enzima (%). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4. 8. Kemometrijske analize

4. 8. 1. Analiza glavnih komponenti

Dvije glavne komponente (PC 1 i PC 2) objasnile su ukupno 62,84% ukupne varijabilnosti. Analiza je jasno razdvojila analizirane skupine na temelju vrste klijanaca. Pritom, najudaljeniji uzorci od ostalih su uzorci klijanaca brokule. Odvajanju analiziranih skupina klijanaca brokule od uzoraka klijanaca cvjetače i raštike najviše su pridonijele izmjerene koncentracije ukupnih klorofila, klorofila *a*, klorofila *b*, porfirina, koncentracija kavene kiseline i kvercetina te sposobnost inhibicije enzima α -glukozidaze. Kod klijanaca brokule, sva tri tretmana su se grupirala zajedno te su se jasno odvojili od kontrolne skupine

klijanaca brokule. Skupina klijanaca raštike tretiranih čajem i kontrolne skupine klijanaca raštike grupirale su se zajedno i odvojile od klijanaca raštike tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA, odnosno Tween, koje su se međusobno zajedno grupirale. Kod klijanaca cvjetače, sva tri tretmana su se grupirala zajedno te su se jako odvojili od kontrolne skupine klijanaca cvjetače, a najudaljenija od kontrolne skupine bila je skupina klijanaca cvjetače tretirana čajem u kombinaciji s EDTA.

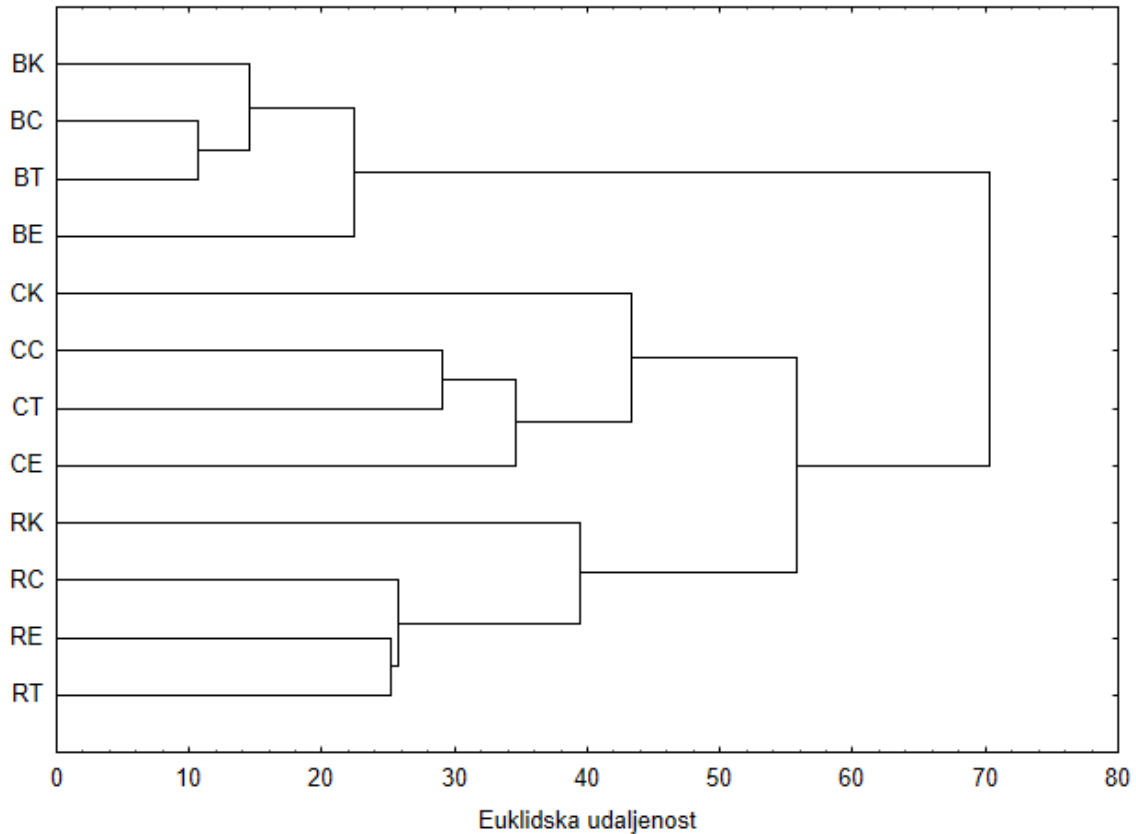


Slika 28. Dijagram (*biplot*) analize glavnih komponentata (*Principal Component Analysis*, PCA) između izmjerenih ukupnih i pojedinačnih bioaktivnih spojeva kontrolne i tretiranih

skupina klijanaca brokule cvjetače i raštike, njihovih fotosintetskih pigmenata, antioksidacijskog kapaciteta i sposobnosti inhibicije dijabetičkih enzima. A) Grupiranje uzoraka, B) grupiranje analiziranih parametara. B – brokula, C – cvjetača, R – raštika, K – kontrolna skupina, C – skupina tretirana čajem, E – skupina tretirana čajem u kombinaciji s EDTA, T – skupina tretirana čajem u kombinaciji s Tween, ABTS, FRAP i DPPH – metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta, TPA – ukupni proantocijanidini, TF – ukupni flavonoidi, TFl – ukupni flavonoli, TT – ukupni tanini, TP – ukupni fenoli, TC – ukupni katehini, SS – topivi šećeri, TIC – ukupni identificirani spojevi, Chl – ukupni klorofili, Chl a – klorofil *a*, Chl b – klorofil *b*, Chl a / Chl b – omjer klorofila *a* i *b*, Car – ukupni karotenoidi, Porf – ukupni porfirini, Glukozidaza – postotak inhibicije α -glukozidaze, Amilaza – postotak inhibicije α -amilaze, Lipaza – postotak inhibicije lipaze, Q – kvercetin, Kav – kavena kiselina, Gal – galna kiselina, Kaf – kafein, L-ask – *L*-askorbinska kiselina, K – kempferol, *p*-kum – *p*-kumarinska kiselina, Fer – ferulična kiselina, Sin – sinapinska kiselina, Til – tilirozid.

4. 8. 2. Hijerarhijsko klasteriranje

Metoda hijerarhijskog klasteriranja razdvojila je na jednu granu skupine klijanaca brokule, a na drugu granu skupine klijanaca cvjetače i raštike, nakon čega se grana koja sadrži skupine klijanaca cvjetače i raštike razdvojila na granu koja sadrži skupinu klijanaca cvjetače i granu koja sadrži skupinu klijanaca raštike. Kod klijanaca brokule, u prvom grananju odvojila se skupina tretirana čajem u kombinaciji s EDTA koja se najviše razlikuje od ostalih skupina, nakon toga se odvojila kontrolna skupina od skupine tretirane čajem i čajem u kombinaciji s Tween. Kod klijanaca cvjetače, prvo se odvojila kontrolna skupina od tretiranih skupina, nakon čega se u sljedećem grananju odvojila skupina klijanaca tretirana čajem u kombinaciji s EDTA od skupina tretiranih čajem i čajem u kombinaciji s Tween. Kod klijanaca raštike, prvo se odvojila kontrolna skupina kao zasebna grana od tretiranih skupina te se nakon odvojila skupina tretirana čajem od skupina tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA, odnosno Tween.



Slika 29. Hijerarhijsko klasteriranje, izraženo kao Euklidska udaljenosti, kontrolne i tretiranih skupina klijanaca brokule, cvjetače i raštike, na temelju izmjerenih ukupnih i pojedinačnih bioaktivnih spojeva, njihovih fotosintetskih pigmenata, antioksidacijskog kapaciteta i sposobnosti inhibicije dijabetičkih enzima. B – brokula, C – cvjetača, R – raštika, K – kontrolna skupina, C – skupina tretirana čajem, E – skupina tretirana čajem u kombinaciji s EDTA, T – skupina tretirana čajem u kombinaciji s Tween.

4. 8. 3. Analiza Pearsonovih koeficijenata korelacije

Vrijednosti Pearsonovih koeficijenata korelacije između izmjerenih parametara vrijednosti za pojedine analizirane biološke učinke i fitokemijskih analiza za pojedine skupine klijanaca, kao i ostale korelacije svih izmjerenih parametara, prikazane su u Prilozima 2., 3. i 4. Pritom, vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta kod klijanaca brokule izmjerene metodama ABTS, FRAP i DPPH pokazale su najvišu pozitivnu korelaciju s vrijednostima koncentracije

ukupnih katehina te koeficijenti redom iznose 0,98, 0,98 i 1,00. Također, vrijednosti dobivene metodom FRAP kod klijanaca brokule pokazale su visoku pozitivnu korelaciju sa vrijednostima koncentracije kvercetina od 0,95 i negativnu korelaciju s koncentracijom porfirina od -0,96. Također, vrijednosti dobivene metodom DPPH za klijanace brokule pokazale su visoku koncentraciju s vrijednostima dobivenima metodom ABTS i FRAP. Kod klijanaca cvjetače, najveća pozitivna korelacija uočena je između vrijednosti koncentracija kafeina i svih triju metoda mjerenja antioksidacijskog kapaciteta, te je uočena negativna korelacija između koncentracije kavene kiseline i antioksidacijskog kapaciteta izmjerenog metodom DPPH u iznosu od -0,95. Također, kod klijanaca cvjetače uočena je pozitivna korelacija između vrijednosti izmjerenih metodom DPPH i FRAP u iznosu od 0,99. Kod klijanaca raštike, uočena je pozitivna korelacija između koncentracije ukupnih flavonola i sinapinske kiseline s vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta izmjerenog metodom ABTS od 0,96, odnosno 0,99. Također, vrijednosti izmjerene metodom FRAP pozitivno su korelirale s vrijednostima koncentracija *L*-askorbinske kiseline, kavene kiseline te vrijednosti koncentracija ukupnih identificiranih spojeva, dok su vrijednosti izmjerene metodom DPPH najjače korelirale s vrijednostima koncentracija kavene, galne i ferulične kiseline.

Kod klijanaca brokule, vrijednosti postotaka inhibicije enzima α -amilaze pokazale su najveću pozitivnu korelaciju s koncentracijom klorofila a od 0,99 te je uočena negativna korelacija između vrijednosti ukupnih flavonoida i postotaka inhibicije lipaze, međutim između vrijednosti postotaka inhibicije α -glukozidaze i drugih izmjerenih parametra nije uočena korelacija iznad razine 0,95. Također, kod klijanaca cvjetače između vrijednosti postotaka inhibicije dijabetičkih enzima i drugih izmjerenih parametra nije uočena korelacija iznad razine 0,95. Kod klijanaca raštike, vrijednosti postotaka inhibicije α -amilaze pokazale su najveće pozitivne korelacije s koncentracijama kavene, galne i ferulične kiseline. Također, uočena je negativna korelacija između koncentracije galne kiseline i vrijednosti postotaka

inhibicije α -glukozidaze te između vrijednosti postotaka inhibicije lipaze i vrijednosti koncentracije topivih šećera, a između vrijednosti postotaka inhibicije lipaze i vrijednosti koncentracija karotenoida uočena je pozitivna korelacija.

5. RASPRAVA

Međuvrsni prijenos spojeva jednostavna je tehnika koja ne uključuje genetičku modifikaciju i lako je primjenjiva u svakodnevnom životu. Obzirom da postoji potreba za poboljšanjem sastava hrane, ovaj pristup ima velik potencijal. Stoga, u ovom istraživanju, istražen je utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva iz ekstrakta biljke donora, čaja u klijance kupusnjača, brokule, cvjetače i raštike, koji predstavljaju biljke akceptore, na njihov fitokemijski profil i svojstva koja doprinose funkcionalnosti klijanaca brokule, cvjetače i raštike kao hrane. Pritom, ekstrakt *C. sinensis* odabran je zbog bogatog fitokemijskog sastava i dobro istraženih pozitivnih bioloških učinaka na ljudsko zdravlje (Nayyar i sur., 2017.; Rusak i sur., 2008.). Obzirom na veliku raznolikost varijeteta unutar vrste *B. oleracea*, a i općenitu varijabilnost i plastičnost metaboloma vrsta roda Brassica (Ramirez i sur., 2020.), kako bi se istražili učinci međuvrsnog prijenosa, korištena su tri različita varijeteta vrste *B. oleracea*, koji su vrlo visoko zastupljeni u prehrani ljudi u svijetu i u Republici Hrvatskoj. Nadalje, kako bi se istražila mogućnost povećanja učinkovitosti međuvrsnog prijenosa spojeva, ekstrakt je primijenjen u kombinaciji s permeabilizatorima stanične membrane koji potencijalno dovode do učinkovitijeg prijenosa spojeva iz ekstrakta biljke donora u biljke akceptore. Na temelju rezultata, procijenjena je značajnost međuvrsnog prijenosa spojeva sa stajališta poboljšanja antioksidacijskog kapaciteta i antidijabetičkih svojstava klijanaca te povećanja koncentracije spojeva sa značajnim nutritivnim svojstvima i biološkim učincima na ljudsko zdravlje. Ovo je prvo istraživanje kojim se nastoji dokazati da će prijenos spojeva iz ekstrakta biljke donora biti različito učinkovit obzirom na vrstu biljke akceptora i kojim se nastoji dobiti uvid u potencijal povećanja učinkovitosti međuvrsnog prijenosa spojeva. Uz to, raspravljani su razlozi smanjenog ili povećanog prijenosa pojedinačnih spojeva ili skupina spojeva u biljke akceptore, obzirom na njihovu kemijsku strukturu i biološka svojstva te mogući fiziološki mehanizmi koji se aktiviraju kao odgovor biljaka na unos egzogenih spojeva u biljke akceptore.

5. 1. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na biomasu klijanaca

Djelovanje različitih vrsta egzogenih faktora na biljke potencijalno dovodi do pojave oksidativnog stresa u biljkama, koji posljedično može dovesti do smanjenog rasta i smanjenja biomase biljaka (Biba i sur., 2020.; Teh i sur., 2016.; Wu i sur., 2019.). Obzirom da u ovom istraživanju međusobnom usporedbom vrijednosti prosječne mase klijanaca između tretmana nisu uočene statistički značajne razlike, može se zaključiti da primijenjeni tretmani ne djeluju inhibitorno na rast klijanaca brokule, cvjetače i raštike i da neće dovesti do smanjenog prinosa njihove biomase. Također, jednako rezultatima Habiba i sur. (2015.) koji su istraživali djelovanje EDTA na biomasu klijanaca vrste *B. napus* L., nije uočena statistički značajna razlika u biomasi između kontrolne skupine i klijanaca izloženima EDTA, što upućuje da on također ne djeluje inhibitorno na prirast biomase u ispitivanoj koncentraciji. Nadalje, niti tretman s deterdžentom Tween 20 nije djelovao inhibitorno na rast biljaka, a isto je primijećeno u radu Knypl, 1977. gdje Tween 20 nije imao učinka na stimulaciju rasta hipokotila klijanaca vrste *Amaranthus caudatus*, dok su druge vrste deterdženta Tween 50 i 65 pokazale značajno povećanje rasta. Budući da je jedan od najvećih izazova biljne biologije povećanje proizvodnje hrane i postizanje veće produkcije hrane na manjoj površini (Gruissem i sur., 2012.; Rothstein, 2007.), ova metoda povećavanja hranjive vrijednosti klijanaca neće dovesti do potrebe za većom proizvodnjom obzirom da ne dovodi do smanjenog prinosa biomase.

5. 2. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na sadržaj specijaliziranih metabolita

5. 2. 1. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na udio ukupnih fenola

Tretmani klijanaca cvjetače doveli su do značajnog povećanja koncentracije ukupnih fenola, i budući da je cvjetača u odraslom stadiju prema radu Heimler i sur. (2006.) sadrži čak dvostruko manju koncentraciju ukupnih fenola, ova tehnika pokazuje velik potencijal za povećanje fenolnog sastava cvjetače, prvenstveno tretman u čajem u kombinaciji s EDTA.

Općenito, ova kombinacija je i kod ostale dvije analizirane skupine klijanaca, uz tretman čajem, pokazala najveći potencijal za povećanje udjela ukupnih fenola. U radu Šola i sur., 2020b također je zabilježeno statistički značajno povećanje koncentracije ukupnih fenola izmjereno u inicijalnoj fazi *in vitro* modela probave klijanaca vrste kineskog kupusa tretiranih ekstraktima *Matricaria chamomilla* i *Tamus communis* gdje je postignuto povećanje od 38,62%, odnosno 33,02% u odnosu na kontrolnu skupinu. Međutim, to povećanje manje je od povećanja koncentracije ukupnih fenola zabilježenog nakon tretmana klijanaca cvjetače čajem u kombinaciji s EDTA u iznosu od 62,79%. Na temelju toga, može se zaključiti da je cvjetača od triju proučavanih vrsta klijanaca najkompatibilniji akceptor spojeva iz čaja. S druge strane, jednako kao u radu Šamec i sur., 2018. nije opažena statistički značajna razlika u razinama ukupnih fenola između klijanaca brokule i raštike te vrijednosti nakon tretmana čajem u kombinaciji s EDTA između te dvije vrste također nisu varirale međusobno, a vrijednosti koncentracija kod cvjetače tretirane istim tretmanom premašile su vrijednosti druge dvije vrste. Zanimljivo, uočena je vrlo visoka korelacija između koncentracije sinapinske kiseline i koncentracije ukupnih fenola kod klijanaca cvjetače i raštike, vjerojatno zbog njene visoke koncentracije u vrstama porodice Brassicaceae i dominantnom udjelu među fenolnim kiselinama ovih vrsta (Nguyen i sur., 2021.).

5. 2. 2. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na udio ukupnih flavonoida

Smanjenje koncentracije ukupnih flavonoida nakon tretmana potencijalno se može objasniti mehanizmom negativne povratne sprege. Naime, ulaskom egzogeno dodanih flavonoida ili fenolnih spojeva iz apliciranog ekstrakta, potencijalno je došlo do smanjenja aktivnosti enzima u biosintetskom putu flavonoida ili smanjenja ekspresije gena u biosintetskom putu flavonoida. U radu Šola i sur., 2020b. tako je utvrđeno metodom kvantitativni PCR (qPCR) da je međuvrsnim prijenosom iz biljaka donora u klijanice kineskog

kupusa došlo do smanjenja ekspresije gena za kalkan sintazu koja katalizira prvu reakciju u biosintetskom putu flavonoida. Mehanizmi povratnih sprega i regulacija biosintetskog puta flavonoida još uvijek nisu potpuno istraženi, međutim identificirana je skupina gena koji kodiraju transkripcijske faktore koji igraju ulogu u regulaciji ekspresije gena u flavonoidnom biosintetskom putu na razini transkripcije (Xu i sur., 2015.). Točan mehanizam ove regulacije nije poznat i nije poznato događa li se regulacija na razini transkripcije ili na epigenetičkoj razini (DNA metilacija, histonske modifikacije). Povezano, uočena je vrlo visoka pozitivna korelacija između koncentracije *p*-kumarinske kiseline i koncentracije ukupnih flavonoida kod klijanaca brokule od 0,96 te je moguće da je pad u koncentraciji flavonoida povezan sa smanjenjem koncentracije *p*-kumarinske kiseline koja je jedan od početnih intermedijera u fenilpropanoidnom biosintetskom putu koji se nalazi na početku biosintetskog puta flavonoida. Nešto manja korelacija od 0,78 zamijećena je i kod klijanaca cvjetače. Također, kod klijanaca cvjetače zabilježena je vrlo visoka negativna korelacija između razine ukupnih fenola i flavonoida od -0,95 te je upravo potencijalno povećana koncentracija fenola dovela do smanjenja koncentracije flavonoida, no koja klasa fenolnih spojeva je glavni medijator te negativne korelacije nije utvrđeno. Stoga, ukoliko se daljnjim ekspresijskim analizama utvrdi da je negativna povratna sprega regulirana direktno egzogeno dodanim flavonoidima, s ciljem uspostavljanja normalnih koncentracija flavonoida u biljkama akceptorima i zaobilaznja negativne povratne sprege, jedna od mogućnosti jest smanjivanje koncentracije flavonoida u ekstraktima biljaka donora, modificiranjem ekstrakcijskih metoda korištenjem otapala koje će minimalizirati ekstrakciju flavonoida iz biljaka.

U skladu s rezultatima objavljenima u radu Heimler i sur. (2006.), niža koncentracija ukupnih flavonoida zabilježena je kod kontrolnih skupina cvjetače u odnosu s raštiku, dok između kontrolnih skupina brokule i raštike nije uočena statistički značajna razlika, koja je utvrđena u radu Šamec i sur., 2018., gdje je utvrđena nešto veća koncentracija ukupnih

flavonoida kod raštike, nego kod klijanaca brokule. Razlog toga potencijalno je različita metoda ekstrakcije, koja je dovela do navedene razlike. Do smanjenja udjela flavonoida u odnosu na kontrolnu skupinu nije došlo samo kod tretmana klijanaca cvjetače čajem u kombinaciji s Tween i klijanaca raštike tretiranih čajem, gdje je čak došlo do povećanja koncentracije ukupnih flavonoida, a razlog tome može biti smanjena efikasnost prijenosa spojeva koji su inhibirali biosintetski put flavonoida kod ova dva tretmana.

5. 2. 3. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih flavonola

Promjene u koncentraciji ukupnih flavonola obzirom na tretmane bile su vrsno-specifične, kod klijanaca brokule tretman čajem u kombinaciji s EDTA doveo je do smanjenja koncentracije ukupnih flavonola, kod klijanaca cvjetače tretman čajem, a kod klijanaca raštike tretman čajem u kombinaciji s Tween, dok su kod ostalih tretmana koncentracije nepromijenjene u odnosu na kontrolnu skupinu. Kako su flavonoli u vodenom ekstraktu čaja uglavnom u glikozidnoj formi, jer su kao aglikoni netopljivi u vodi (Mahmood i sur., 2010.), njihov je prijenos kroz staničnu membranu u biljke akceptore vjerojatno bio otežan zbog vezanih šećernih komponenti te zbog toga vjerojatno nije došlo do prijenosa i povećanja koncentracije ukupnih flavonola. Stoga, kako bi se prijenos flavonola povećao, za ekstrakciju flavonola iz čaja potrebno je modulirati metodu pripreme ekstrakta biljke donora kako bi se koncentracija aglikonskih formi flavonola povećala i omogućio učinkovitiji prijenos ili je potrebno ekstrakte čaja podvrgnuti hidrolizi kako bi se flavonoli oslobodili šećera i povećala efikasnost njihovog unosa u biljke akceptore. Nadalje, obzirom da su koncentracije flavonola nakon tretmana uglavnom bile stabilne i nisu se statistički razlikovale od kontrolne skupine, dok su koncentracije ukupnih flavonoida (u koje pripadaju i flavonoli) značajno varirale u odnosu na kontrolne skupine, skupina flavonoida čija je koncentracija bila znatno promijenjena

nakon tretmana nisu flavonoli, već se radi o nekoj drugoj skupini flavonoida čije je smanjenje udjela dovelo do smanjenja koncentracije ukupnih flavonoida.

5. 2. 4. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih katehina

Katehini (flavan-3-oli) glavni su fenolni spojevi u ekstraktima čaja i čine 20-30% suhe mase zelenog čaja (Mahmood i sur., 2010.), stoga je povećanje koncentracije nakon tretmana čajem u biljkama akceptorima očekivano. Međutim, do povećanja koncentracije katehina kod brokule i cvjetače došlo je tek nakon inkubacije čajem u kombinaciji s permeabilizatorima membrane, dok je kod raštike koncentracija porasla i kod tretmana čajem. Statistički značajno povećanje koncentracije katehina tek inkubacijom u kombinaciji s permeabilizatorima upućuje na njihov potencijal u povećanju efikasnosti međuvrskog prijenosa katehina. Iako u radu Šamec i sur. (2018.) nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentracijama endogeno prisutnih katehina između brokule i raštike, u ovom istraživanju utvrđeno je da je koncentracija u kontrolnoj skupini raštike veća nego u kontrolnoj skupini brokule. To upućuje na iznimnu plastičnost sekundarnog metabolizma kupusnjača koji ovisi o mnogim faktorima. Nadalje, iako je kod klijanaca raštike zabilježena najviša koncentracija ukupnih katehina nakon tretmana čajem, postotak tog povećanja u odnosu na kontrolnu ipak je manji od povećanja koncentracije nakon tretmana klijanaca cvjetače čajem u kombinaciji s EDTA, što upućuje da su klijanci cvjetače bolji akceptori katehina, te da je efikasnost prijenosa vjerojatno neovisna o endogeno prisutnoj koncentraciji određenog spoja. Također, koncentracija katehina pokazala je visoku pozitivnu korelaciju s koncentracijama kafeina kod klijanaca brokule, cvjetače i raštike što potencijalno može značiti da je prijenos ovih spojeva međusobno ovisan ili da je efikasnost prijenosa ovih spojeva iz ekstrakta biljke donora jednaka zbog određenih zajedničkih kemijskih ili drugih svojstava. Ovo povećanje u koncentraciji katehina potencijalno moglo bi pojačati

biološke učinke biljaka donora, obzirom da je za katehini i njihove metaboliti dokazano jako antimikrobno, antidijabetičko, antioksidativno i brojna druga djelovanja (Nayyar i sur., 2017.).

5. 2. 5. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih tanina

U skladu s rezultatima u radu Heimler i sur., 2006., koncentracija ukupnih tanina veća je kod klijanaca cvjetače, nego kod klijanaca brokule. Nadalje, pod utjecajem tretmana koncentracija tanina kod klijanaca brokule ostala je konstantna, dok je kod klijanaca cvjetače tretirane čajem u kombinaciji s EDTA koncentracija značajno porasla, a jednako je povećanje koncentracije tanina zabilježeno i kod raštike tretirane čajem u kombinaciji s EDTA i tretmanom čajem. Iako su tanini generalno nepoželjni u prehrani zbog svojstva agregiranja proteina što dovodi do stežućeg okusa u ustima prilikom konzumiranja hrane bogate taninima, utvrđeno je da imaju antioksidacijsko djelovanje i njihov visoki udio u čaju djelomično se pripisuje jakom antioksidacijskom i antikancerogenom djelovanju čaja (Chung i sur., 1998.; Nayyar i sur., 2017.).

5. 2. 6. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio proantocijanidina

Najviša koncentracija proantocijanidina detektirana je kod klijanaca raštike, što je u skladu s ranije objavljenim rezultatima (Šamec i sur., 2018.). Nadalje, koncentracija proantocijanidina kod klijanaca brokule u rang je već objavljenih vrijednosti (Tan i Chang, 2017.). Međutim, povećanje koncentracije proantocijanidina u odnosu na kontrolnu skupinu zabilježeno je samo kod tretmana klijanaca cvjetače čajem u kombinaciji s permeabilizatorima membrane. Obzirom da su neki tipovi proantocijanidina oligomeri katehina, postoji mogućnost da su katehini iz čaja kod ovih klijanaca polimerizirali u proantocijanidine, što bi bio potencijalni razlog njihove povišene koncentracije. U prilog tome, uočena je vrlo visoka korelacija između koncentracije proantocijanidina i ukupnih katehina kod uzoraka klijanaca

cvjetače. Nadalje, u čaju je dokazana visoka, čak 13 puta viša koncentracija proantocijanidina, nego ona zabilježena kod klijanaca brokule (Tan i Chang, 2017.), stoga je vjerojatno da povećanje koncentracije u biljkama akceptorima nije zabilježeno kod više uzoraka zbog visoke molekulske mase proantocijanidina, što je vjerojatno otežalo njihov prijenos kroz membranu biljaka akceptora.

5. 3. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na udio topivih šećera

Šećeri, kao značajan sastojak staničnih membrana, sudjeluju u održavanju stabilnosti staničnih membrana (Hincha i sur., 2006.). Stoga, u skladu s tim, očekivano je bilo povećanje koncentracije topivih šećera čijom bi povećanom sintezom stanica kompenzirala destabilizaciju stanične membrane permeabilizatorima. Međutim, osim kod klijanaca cvjetače tretirane čajem u kombinaciji s Tween i klijanaca raštike tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA, zabilježen je pad koncentracije topivih šećera. Tako je između vrijednosti koncentracija ukupnih fenola i koncentracija topivih šećera kod uzoraka klijanaca cvjetače uočena vrlo visoka negativna korelacija od -0,90, što potencijalno ukazuje da kod klijanaca cvjetače unos fenolnih spojeva dovodi do smanjenja koncentracije topivih šećera. Jedan od razloga toga potencijalno je promjena ravnoteže specijaliziranih metabolita i posljedično aktiviranje biosintetskih putova koji koriste šećere kao supstrate u biosintetskim reakcijama. Smanjenje koncentracije šećera u hrani poželjno je zbog njegovih negativnih učinaka na ljudsko zdravlje (Kroemer i sur., 2018.), stoga opaženi učinak međuvrsnog prijenosa spojeva koji djeluje na smanjenje koncentracije topivih šećera u klijanima je itekako poželjan. Nadalje, izmjerene vrijednosti koncentracije topivih šećera kod klijanaca brokule odgovaraju nedavno objavljenim podacima za koncentraciju određenu u uzorcima svježe mase i usporedbom s rezultatima vrijednosti ostalih istraživanih klijanaca, klijanci brokule, zajedno s klijancima cvjetače i

raštike, istraženih u ovom radu, predstavljaju vrste klijanaca s najmanjim udjelom šećera (Marchioni i sur., 2021.).

Zabilježena je iznimno visoka korelacija između vrijednosti koncentracije karotenoida i koncentracije topivih šećera kod istraživanih skupina klijanaca brokule od 0,97. Pozitivna korelacija između koncentracije šećera i karotenoida zabilježena je ranije (Park i sur., 2017.). Razlog tome je očita veza između koncentracije fotosintetskih pigmenata i šećera kao finalnih produkata fotosinteze. Također, postoje dokazi da glukoza kao jedan od glavnih topivih šećera, aktivira biosintezu karotenoida (Couée i sur., 2006.). S druge strane, kod klijanaca raštike i brokule uočena je negativna korelacija između koncentracije topivih šećera i karotenoida, za što je vjerojatno odgovoran mehanizam pozitivne povratne sprege koji potiče fotosintezu prilikom smanjenje koncentracije šećera preko sinteze karotenoida. Uočene vrsno-specifične razlike u odgovoru na promjene koncentracije topivih šećera i promjene koncentracije karotenoida značajne su u istraživanjima mehanizma regulacije fotosinteze.

5. 4. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na udio i odnose između fotosintetskih pigmenata i koncentraciju porfirina

Analiza koncentracije i odnosa fotosintetskih pigmenata može dati uvid u fiziološko stanje biljke (Sims i Gamon, 2002.), na temelju čega se indirektno mogu dobiti zaključci o potencijalnom stresnom učinku određenog tretmana na biljku. Nepromijenjenost koncentracije klorofila *a* između analiziranih skupina klijanaca brokule i cvjetače potencijalno bi moglo značiti da međuvrsni prijenos spojeva ne dovodi do oksidativnog stresa i drugih vrsta stresa koje bi mogle negativno djelovati na fotosintezu. S druge strane, uočeno povećanje koncentracije klorofila *a* kod klijanaca raštike tretiranih čajem moglo bi biti uzrokovano pokušajem nadvladavanja smanjenja stope fotosinteze zbog potencijalnih oksidativnih oštećenja. S druge strane, koncentracija klorofila *b* nije bila konstantna između analiziranih

skupina i uočena je veća varijabilnost u njejoj koncentraciji te je između različitih tretmana između različitih vrsta klijanaca uočen specifičan odgovor na udio klorofila *b*. Tako je tretman čajem kod klijanaca brokule povisio koncentraciju klorofila *b*, a kod klijanaca cvjetače je došlo do smanjenja koncentracije klorofila *b*, dok je kod klijanaca raštike nakon istog tretmana koncentracija ostala nepromijenjena u odnosu na kontrolnu skupinu. Tretman čajem u kombinaciji s EDTA smanjio je koncentraciju klorofila *b* kod klijanaca brokule i cvjetače, stoga je moguće da je EDTA sam ili u kombinaciji s određenim spojevima iz ekstrakta čaja uzorkovao oksidacijski stres koji je doveo do smanjenja koncentracije klorofila *b*. Ovakvi podaci ukazuju da je odgovor različitih vrsta klijanaca na jednak tretman različit i nejednoznačan, na razini promjene koncentracije fotosintetskih pigmenata. Međutim, do smanjenja koncentracije klorofila *b* potencijalno je moglo doći i zbog smanjene potrebe za fotosintezom, obzirom da je egzogeni prijenos spojeva doveo do povećanja koncentracije specijaliziranih metabolita i potencijalno posljedično zaustavio određene biosintetske puteve specijaliziranog metabolizma te time smanjio potrebu biljke da provodi fotosintezu. Nadalje, koncentracija ukupnih klorofila vrlo je visoko korelirala s koncentracijom klorofila *b* kod svih vrsta klijanaca, što je očekivano obzirom da je koncentracija klorofila *a* između uzoraka uglavnom bila konstantna. Značajne podatke o fotosintetskim procesima može dati analiza omjera klorofila *a* i *b*. Autori Marchioni i sur., 2021. kod klijanaca brokule utvrdili su omjer u iznosu od 3,37, dok je u radu Šamec i sur., 2018. utvrđen omjer kod klijanaca brokule od 2,39, a kod klijanaca raštike od 1,91. Nešto niže vrijednosti dobivene u ovom eksperimentu kod kontrolnih i tretiranih skupina, od prethodno objavljenih mogu biti rezultat brojnih faktora, a dodatno daju informacije o plastičnosti fotosintetskih procesa, posebno kod mladih biljaka. Razlike u koncentraciji fotosintetskih pigmenata između različitih autora mogu biti uzrokovane različitim načinom uzgoja, korištenjem različitih supstrata za uzgoj i slično te vrijeme sabiranja

i različita sezona uzgoja također mogu utjecati na razlike u rezultatima (Marchioni i sur., 2021.).

Tretman čajem u kombinaciji s EDTA kod klijanaca brokule i cvjetače doveo je do smanjenja koncentracije porfirina. Potencijalni razlog toga mogla bi biti slična kemijska struktura EDTA i intermedijera u biosintetskom putu porfirina, što je potencijalno omogućilo vezanje EDTA u aktivno mjesto enzima u biosintetskom putu porfirina i inhibiralo njihovu aktivnost, što je onda potencijalno dovelo do smanjenja koncentracije porfirina kod klijanaca brokule i cvjetače. Nadalje, koncentracije karotenoida kod klijanaca brokule i raštike ostale su jednake između tretiranih skupina i kontrolnih skupina, međutim kod klijanaca cvjetače tretman čajem i čajem u kombinaciji s EDTA doveo je do povećanja koncentracije karotenoida. Ovo povećanje koncentracije karotenoida je značajno, obzirom da su to spojevi s jakom antioksidacijskom aktivnošću, koja je bitna značajka funkcionalne hrane (Marchioni i sur., 2021.). Koncentracija karotenoida kod klijanaca brokule viša je nego dosad objavljene vrijednosti, koje su iznosile od 0,22 mg / g SM (Marchioni i sur., 2021.) do 0,46 mg / g SM (Šamec i sur., 2018.), što je vjerojatno posljedica različitih uvjeta uzgoja.

5. 5. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na udio kafeina, vitamina C i pojedinačnih fenolnih spojeva

5. 5. 1. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na udio *L*-askorbinske kiseline

Veća koncentracija *L*-askorbinske kiseline zabilježena je kod klijanaca cvjetače, nego kod klijanaca brokule i raštike. S druge strane, kod odraslih stadija cvjetače i raštike zamijećen je obrnut rezultat, zabilježena je srednja vrijednost koncentracija *L*-askorbinske kiseline kod brokule u iznosu od 52,9 mg/100 g SVM, a kod cvjetače je iznosila 19,3 mg/100 g SVM (Singh i sur., 2007.), što upućuje na razlike u koncentraciji pojedinih spojeva između različitih razvojnih stadija. Razlike u koncentraciji *L*-askorbinske kiseline između različitih razvojnih

stadija iste biljke zamijećene su i na primjeru kineskog kupusa, gdje je najviša koncentracija *L*-askorbinske kiseline zamijećena kod klijanaca, a kod starijih analiziranih stadija njena je koncentracija značajno smanjena (Šola i sur., 2020a). U radu Pérez-Balibrea i sur. (2011.) opaženo je da se koncentracija *L*-askorbinske kiseline u klijanima brokule može povećati sedmodnevnim tretmanom salicilnom kiselinom za više od 20% u odnosu na kontrolnu skupinu. U sklopu ovog istraživanja, značajan porast koncentracije *L*-askorbinske kiseline od 21,03% kod klijanaca brokule tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA u duljini od četiri sata čini iznimno obećavajućom strategijom za povećanje koncentracije *L*-askorbinske kiseline kod klijanaca brokule, obzirom da uz smanjeno vrijeme inkubacije dovodi do sličnog povećanja u koncentraciji. Nadalje, u radu Šola i sur. (2020b), povećanje koncentracije *L*-askorbinske kiseline uočeno je kod kineskog kupusa nakon međuvrsnog prijenosa spojeva iz ekstrakta vrste *T. communis* za 5,08% u odnosu na kontrolnu skupinu, što je daleko niži rezultat od rezultata dobivenih nakon tretmana klijanaca brokule i raštike čajem u kombinaciji s EDTA. Pretpostavlja se da je tretman čajem u kombinaciji s EDTA kod klijanaca brokule i raštike doveo do povećanja koncentracije *L*-askorbinske kiseline prijenosom spojeva koji sudjeluju u biosintetskom putu *L*-askorbinske kiseline, a ne direktnim prijenosom *L*-askorbinske kiseline, obzirom da je u ekstraktu čaja koncentracija *L*-askorbinske kiseline niska ili ispod razine detekcije (Somanchi i sur., 2018.). Zabilježeno povećanje koncentracije *L*-askorbinske kiseline iznimno je značajno, obzirom na jako antioksidacijsko djelovanje i druge značajne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje (Domínguez-Perles i sur., 2014.).

5. 5. 2. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na udio kafeina

Prisutnost spoja koji nije endogeno prisutan kod netretiranih biljaka pokazuje sposobnost klijanaca brokule da unose i zadržavaju spojeve koji nisu prirodno prisutni u njima. Kako porodica kupusnjača ne sadrži enzime uključene u biosintetski put kafeina, kao što je

enzim kafein sintetaza koji je eksprimiran u rodovima *Camellia*, *Coffea* i *Theobroma* (Kato i sur., 2000.; Mizuno i sur., 2003.; Yoneyama i sur., 2006.), pretpostavlja se da u biljci nije moguć ni katabolizam tog spoja te da se zbog toga nakon prijenosa iz ekstrakta biljke donora njegova koncentracija u biljci akceptoru naknadno ne mijenja. Pretpostavlja se da je kafein nakon unosa u stanice, kao ksenobiotik za kupusnjače, unesen u vakuolu posredstvom transportera iz porodice ABC (Rea, 2007.; Yazaki, 2006.). Podatak o ovakvom heterolognom prijenosu spoja koji prirodno nije prisutan u biljci akceptoru, važan je jer naglašava važnost odabira najoptimalnijih kombinacija biljaka donora i akceptora kako bi se postigao efekt prijenosa spojeva koje biljka ne može metabolizirati i koji bi onda bili bioraspoloživi inducirati pozitivne biološke učinke u ljudskom organizmu, nakon konzumacije biljaka akceptora poboljšanima spojevima iz biljaka donora koji potencijalno nisu adekvatni za ljudsku prehranu.

Nadalje, povećan unos kafeina prilikom inkubacije klijanaca brokule i cvjetače u kombinaciji s permeabilizatorima membrane dodatno naglašava njihov učinak na povećanje efikasnosti međuvrsnog prijenosa spojeva iz biljke donora i akceptora. S druge strane, kod raštike nije uočeno povećanje prilikom inkubacije klijanaca s permeabilizatorima, što upućuje na veću rigidnost stanične membrane kod klijanaca raštike i ukazuje na potencijalnu potrebu korištenja veće koncentracije permeabilizatora kako bi se postigao povećani efekt prijenosa.

5. 5. 3. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na udio ferulične kiseline

Jedan od razloga smanjenja koncentracije ferulične kiseline kod svih tretiranih skupina klijanaca brokule te kod klijanaca cvjetače tretiranih čajem i čajem u kombinaciji s EDTA potencijalno je usmjeravanje slobodne ferulične kiseline u izgradnju stanične stijenke, gdje se veže najčešće na O-2 atom arabinoze i na O-6 atom galaktoze u bočnim ograncima pektina, te na O-5 atom arabinofuranoze (Saulnier i Thibault, 1999.). Također, polimerizacija ferulične kiseline i njenog alkohola dovodi do sinteze lignina (Šamec i sur., 2021.), za koji je dokazano

da se sintetizira prilikom stresa uzrokovanog niskom temperaturom kod duhana (Zhou i sur., 2019.) te se njegova sinteza također mogla aktivirati prilikom stresa induciranog inkubacijom biljaka akceptora u ekstraktima biljaka donora. Kako je prijenos spojeva potencijalno doveo do smanjenja integriteta stanične membrane i stijenke, potencijalno je stanica slobodnu feruličnu kiselinu usmjerila u sintezu pektina i lignina u staničnoj stijenci kako bi se integritet stanice ostao očuvan. Obzirom da kod klijanaca raštike smanjenje koncentracije ferulične kiseline nije uočeno, to potencijalno ukazuje na veću rigidnost stanične stijenke i membrane klijanaca raštike. Drugi potencijalni razlog smanjenja koncentracije ferulične kiseline je mehanizam negativne povratne sprege do kojeg je potencijalno došlo zbog egzogenog unosa fenolnih spojeva koji su onda smanjili ekspresiju gena ili aktivnost enzima u fenolnom biosintetskom putu, a obzirom da je enzim kafeat *O*-metiltransferaza koji prevodi kavenu kiselinu u feruličnu kiselinu treći enzim u fenilpropanoidnom biosintetskom putu (Lam i sur., 1996.), smanjenje koncentracije ferulične kiseline nije neočekivano. Također, uočena vrlo visoka pozitivna korelacija između koncentracije ferulične kiseline i ukupnih flavonoida kod klijanaca brokule i cvjetače dodatno potvrđuje hipotezu o negativnoj povratnoj sprezi u fenolnom biosintetskom putu. S druge strane, međuvrtni prijenos spojeva u kineski kupus kao akceptor nije doveo do promjene u koncentraciji ferulične kiseline nakon tretmana ekstraktima četiri biljaka donora, a autori smatraju da do prijenosa ferulične kiseline koja je detektirana u ekstraktima biljaka donora nije došlo zbog metoksi skupine u strukturi ferulične kiseline koja potencijalno sprječava prijenos kroz staničnu membranu (Šola i sur., 2020b). Stoga, kako je kod klijanaca raštike tretiranih čajem u kombinaciji s Tween došlo do povećanja koncentracije ferulične kiseline, a kod klijanaca cvjetače tretiranih istim tretmanom nije zabilježen pad koncentracije, postoji vjerojatnost da je Tween u ekstraktu kod ovih biljaka neutralizirao negativan učinak metoksi skupine ferulične kiseline na prijenos i omogućio njen prijenos u klijance cvjetače i raštike.

5. 5. 4. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio galne kiseline

Galna kiselina prisutna je u vodenom ekstraktu čaja (Hodgson i sur., 2000.; Rusak i sur., 2021.), stoga je njen prijenos u biljke akceptore bio očekivan. Međutim, do prijenosa je došlo kod tretiranih skupina klijanaca cvjetače te kod klijanaca raštike inkubiranih čajem u kombinaciji s permeabilizatorima stanične membrane. Nadalje, uočena visoka korelacija između koncentracije kavene kiseline i koncentracije galne kiseline kod klijanaca brokule i raštike očekivana je, obzirom da je, između ostalog, moguća sinteza galne kiseline iz kavene preko intermedijera 3,4,5-trihidroksicimetne kiseline. Također, pozitivna korelacija uočena je između koncentracije ukupnih katehina i galne kiseline, što je očekivano obzirom da su katehini (flavan-3-oli) često esterificirani s galnom kiselinom, tvoreći katehin galate (Bontpart i sur., 2016.).

5. 5. 5. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio kavene kiseline

Kavena kiselina, kod biljaka se sintetizira iz *p*-kumarinske kiseline enzimom kumarat 3-hidroksilaza, prekursor je ferulične kiseline (Li i sur., 2020.). No, kako za razliku od *p*-kumarinske kiseline i ferulične kiseline, nije dokazano da kavena kiselina direktno sudjeluje u izgradnji stanične stijenke biljnih stanica (Zhang i sur., 2019.), smatra se da je to razlog što nije došlo do smanjenja koncentracije kavene kiseline kod klijanaca brokule tretiranih čajem u kombinaciji s EDTA i klijanaca cvjetače tretiranih čajem i čajem u kombinaciji s Tween, dok je došlo do smanjenja koncentracije *p*-kumarinske kiseline i ferulične kiseline zbog potencijalnog usmjeravanja slobodnih molekula *p*-kumarinske i ferulične kiseline u sintezu sastojaka stanične stijenke, kao što je predstavljeno u poglavlju 5. 5. 3. Između vrijednosti koncentracija *p*-kumarinske kiseline i kavene kiseline, uočena je vrlo visoka pozitivna korelacija kod svih triju vrsta klijanaca, kao i između vrijednosti koncentracija kavene kiseline i ferulične kiseline, što naglašava visoku regulaciju ovog biosintetskog puta.

5. 5. 6. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio *p*-kumarinske kiseline

Suprotno rezultatima u radu Šola i sur., 2020b., gdje je opaženo da međuvrski prijenos spojeva iz četiri različitih biljaka donora dovodi do povećanja koncentracije *p*-kumarinske kiseline u klijancima kineskog kupusa, jednak trend nije zabilježen nakon međuvrskog prijenosa spojeva u klijance brokule, cvjetače i raštike. Do povećanja koncentracije *p*-kumarinske kiseline kod biljaka akceptora potencijalno nije došlo zbog vrlo niskih koncentracija *p*-kumarinske kiseline u ekstraktu čaja (Rusak i sur., 2021.). Štoviše, zabilježen je pad koncentracije te se smatra da je do smanjenja koncentracije *p*-kumarinske kiseline iz jednakog razloga kao i do smanjenja koncentracije ferulične kiseline, zbog mehanizma negativne povratne sprege koji djeluje na sintezu *p*-kumarinske kiseline, zbog egzogenog unosa fenolnih spojeva, obzirom da je reakcija sinteze *p*-kumarinske kiseline iz fenilalanina enzimom fenilalanin-amonij lijaza (PAL) na samom početku fenilpropanoidnog biosintetskog puta. Povezanost opadanja koncentracije ferulične kiseline i *p*-kumarinske kiseline može se uočiti i na temelju visoke pozitivne korelacije ($r = 0,97$) koncentracija tih dvaju kiselina, te da je uzrok te promjene za ta dva spoja zajednički. Pretpostavlja se da bi se ovo smanjenje moglo izbjeći ukoliko ekstrakt biljke donora sadrži višu koncentraciju *p*-kumarinske kiseline, kao što je bio slučaju kod ekstrakata korištenih za međuvrski prijenos spojeva u radu Šola i sur. (2020b) te bi to onda potencijalno moglo smanjiti i efekt smanjenja koncentracije ukupnih flavonoida, do kojeg je potencijalno došlo zbog smanjenja koncentracije *p*-kumarinske kiseline. Drugi potencijalni razlog smanjenja koncentracije *p*-kumarinske kiseline, primarno kod klijanaca cvjetače je usmjeravanje *p*-kumarinske kiseline u sintezu tilirozida, čije je povećanje koncentracije uočeno nakon tretmana klijanaca cvjetače. Naime, tilirozid se sintetizira kemijskom reakcijom glikoziliranog oblika kempferola i *p*-kumarinske kiseline. Također, visoka negativna korelacija ($r = -0,79$) između koncentracije *p*-kumarinske kiseline i tilirozida govori u prilog tome da je dio *p*-kumarinske kiseline usmjeren u sintezu tilirozida, obzirom da

je smanjenjem koncentracije *p*-kumarinske kiseline došlo do povećanja koncentracije tilirozida kod klijanaca cvjetače.

5. 5. 7. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio sinapinske kiseline

Sinapinska kiselina dominantna je fenolna kiselina kod porodice kupusnjača (Ayaz i sur., 2008.) te vjerojatno zbog njene visoke koncentracije, nije došlo do dovoljnog jakog efekta koji bi doveo do jake modulacije biosintetskog puta sinapinske kiseline i promjene njene endogene koncentracije. Također, utvrđeno je da vodeni ekstrakti čaja sadrže vrlo niske koncentracije sinapinske kiseline (Jeszka-Skowron i sur., 2018.), stoga nije očekivano njeno povećanje zbog prijenosa iz ekstrakta biljke donora. S druge strane, u radu Šola i sur., 2020b. prijenos spojeva u kineski kupus doveo je do smanjenja koncentracije sinapinske kiseline nakon tretmana ekstraktom vrste *Rosa* sp., zbog čega se može zaključiti da je koncentracija sinapinske kiseline nakon prijenosa spojeva stabilnija u klijanima brokule, cvjetače i raštike, nego u klijanima kineskog kupusa.

5. 5. 8. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio kempferola

Kempferol je već ranije identificiran kao glavni flavonoidni aglikon kod cvjetače, a značajno je da su iz nje izolirani i okarakterizirani glikozidi kempferola s više od četiri šećerne komponente (Llorach i sur., 2003.). Stoga, viša koncentracija kempferola kod klijanaca cvjetače u usporedbi s klijanima drugih vrsta nije iznenađujuća. Kako je povećanje koncentracije kempferola zabilježeno samo kod klijanaca cvjetače tretiranih čajem, smatra se da je zbog već visoke endogene koncentracije kempferol unesen prijenosom iz čaja zadržan u obliku kempferola, a da je kod drugih vrsta klijanaca koje endogeno sadrže nižu koncentraciju kempferola, egzogeno unesen kempferol iz čaja metaboliziran dalje niz flavonoidni biosintetski put u produkte koji su u tim vrstama stabilniji. To je potencijalan razlog zašto nije

zabilježeno povećanje koncentracije kempferola kod tretiranih skupina klijanaca raštike i brokule, iako je kempferol identificiran kao sastojak čaja (Rusak i sur., 2021.).

5. 5. 9. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio kvercetina

Kvercetin je dominantan flavonol u ekstraktu čaja te je prisutan u višestruko većoj koncentraciji nego kempferol (Rusak i sur., 2021.). Kod klijanaca brokule i raštike kvercetin je dominirao u usporedbi s kempferolom, dok je kod klijanaca cvjetače zabilježen obrnut odnos. Međutim, kod odraslih biljaka brokule je kempferol izdvojen kao dominantni flavonoid (Vallejo i sur., 2004.), dok su kod varijeteta raštike *B. oleracea* convar. *acephala* var. *sabellica*, koncentracije kempferola i kvercetina bile podjednake (Olsen i sur., 2009.). To upućuje da su odnosi koncentracija ovih spojeva između razvojnih stadija vrlo dinamični i skloni promjenama. Tretman klijanaca brokule ekstraktom čaja u kombinaciji s EDTA doveo je do povećanja koncentracije kvercetina, dok s druge strane kod cvjetače nije zabilježeno statistički značajno povećanje koncentracije kvercetina, vjerojatno zbog toga što je kod klijanca brokule kvercetin dominantan spoj pa je nakon prijenosa favorizirana njegova akumulacija u obliku kvercetina, dok je kod klijanaca cvjetače uneseni kvercetin vjerojatno metaboliziran u spojeve koji su stabilniji i dominantniji u stanicama klijanaca cvjetače, kako bi se održala homeostaza sadržaja flavonoida unutar biljke. Kod klijanaca raštike nije zamijećena promjena koncentracije kvercetina, vjerojatno zbog otežanog unosa flavonola poput kvercetina kroz rigidne stanične membrane raštike, obzirom da sadrži pet hidroksilnih skupina, koje otežavaju prijenos kroz hidrofobnu staničnu membranu.

5. 5. 10. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio tilirozida

Tilirozid je derivat kempferola i *trans-p*-kumarinske kiseline (Goto i sur., 2012.). Kod cvjetače, kod koje je uočeno povećanje koncentracije tilirozida kod tretiranih skupina u odnosu

na kontrolnu skupinu, zabilježena je pozitivna korelacija ($r = 0,96$) između koncentracije kempferola i tilirozida, što upućuje da povećanje koncentracije kempferola prijenosom iz ekstrakta biljke donora dovodi do povećanja koncentracije tilirozida. To upućuje da cvjetača egzogeno unesen kempferol skladišti u obliku glukozida tilirozida, konjugacijom s *trans-p*-kumarinskom kiselinom. S druge strane, kako kod klijanaca brokule i raštike nakon tretmana nije zamijećeno povećanje koncentracije kempferola, jednako tako nije niti došlo do promjene u koncentraciji tilirozida između kontrolne i tretiranih skupina.

5. 6. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na antioksidacijski kapacitet

Mjerenjem antioksidacijskog kapaciteta metodom FRAP zabilježen je porast antioksidacijskog kapaciteta nakon sva tri tretmana kod svih triju vrsta klijanaca, dok je metodom DPPH zabilježen porast antioksidacijskog kapaciteta kod klijanaca brokule i cvjetače samo nakon tretmana čajem u kombinaciji s EDTA. Metodom ABTS zabilježeno je povećanje antioksidacijskog kapaciteta nakon tretmana klijanaca brokule i cvjetače čajem u kombinaciji s EDTA, odnosno Tween. Različiti rezultati izmjereni različitim metodama očekivani su, obzirom da različite metode koriste različite mehanizme te posljedično reagiraju s različitim skupinama antioksidansa u uzorku (Huang i sur., 2005.; Magalhães i sur., 2008.). Usporedbom rezultata svih triju metoda, može se zaključiti da je tretman čajem u kombinaciji s EDTA kod klijanaca brokule i cvjetače doveo do najvećeg povećanja antioksidacijskog kapaciteta, obzirom da je kod svih triju korištenih metoda kod ovih uzoraka zamijećeno povećanje antioksidacijskog kapaciteta, što ukazuje na velik potencijal EDTA na povećanje prijenosa spojeva s antioksidacijskim djelovanjem iz ekstrakta biljke donora u biljke akceptore. S druge strane, metodama ABTS i DPPH nije zamijećena razlika u antioksidacijskom kapacitetu između kontrolne skupine i tretiranih skupina klijanaca raštike, što upućuje na to da je prijenos spojeva s antioksidacijskim djelovanjem u klijance raštike otežan, što ga potencijalno ne čini

kompatibilnom biljkom akceptorom za prijenos bioaktivnih spojeva iz čaja. U radu Šola i sur., 2020b. uočeno je da prijenos spojeva iz ekstrakta vrste *M. chamomilla* u klijance kineskog kupusa povećava antioksidacijski kapacitet izmjeren metodom ABTS za čak 39,57% u odnosu na kontrolnu skupinu. Potencijalni razlog što ekstrakt čaja nije doveo do ovako visokog povećanja je što ekstrakt *M. chamomilla* vjerojatno sadrži puno više razine antioksidansa koji jako djeluju na inhibiciju ABTS radikala, a koji su međuvrtnim prijenosom spojeva preneseni u kineski kupus, a ta razina je u čaju vjerojatno niža. S druge strane, u istom radu, metodom FRAP najveće je povećanje antioksidacijskog kapaciteta zabilježeno tretmanom kineskog kupusa ekstraktom *T. communis*, što je dovelo do povećanja za tek 7,40%, dok je tretman čajem u kombinaciji s EDTA kod klijanaca cvjetače doveo do povećanja od 15,81% u odnosu na kontrolnu skupinu, što je daleko veće povećanje i upućuje da čaj sadrži visok udio antioksidansa koji reagiraju sa spojevima korištenima u metodi FRAP. Povezano s tim, veće su vrijednosti zabilježene prilikom mjerenja antioksidacijskog kapaciteta metodom FRAP, nego prilikom mjerenja metodama ABTS i DPPH (Rusak i sur., 2021.), što dodatno upućuje na to da je metoda FRAP optimalna za mjerenje antioksidacijskog kapaciteta čaja. Nadalje, s ciljem povećanja antioksidacijskog kapaciteta klijanaca brokule, u radu Natella i sur., 2016., autori su klijance brokule tretirali različitim koncentracijama manitola, saharoze, natrijevog klorida, salicilne kiseline, 1-aminociklopropan-1-karboksilne kiseline i metil-jasmonata, te je od svih tretmana jedino tretman manitolom koncentracije 176 mM doveo do povećanja antioksidacijskog kapaciteta klijanaca brokule izmjerenog metodom ABTS. Stoga se s ciljem povećanja antioksidacijskog kapaciteta klijanaca brokule, potencijalno optimalnijim čini tretman čajem u kombinaciji s EDTA ili Tween.

Nadalje, vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta kod klijanaca brokule i cvjetače izmjerene metodama ABTS, FRAP i DPPH međusobno su vrlo visoko korelirale, dok kod klijanaca raštike vrijednosti izmjerene metodom ABTS nisu korelirale s vrijednostima

izmjerenima metodama DPPH i FRAP, dok je između njih zabilježena vrlo visoka korelacija. Nadalje, vrijednosti koncentracija ukupnih fenola visoko ili vrlo visoko korelirale su s vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta izmjerenog svima trima metodama kod klijanaca cvjetače, dok je korelacija kod klijanaca brokule zamijećena između koncentracije ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta izmjerenog metodama FRAP i DPPH, a kod klijanaca raštike je zamijećena samo između rezultata mjerenja metodom ABTS i koncentracije ukupnih fenola. Visoke i vrlo visoke korelacije između vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta i koncentracije ukupnih fenola u skladu su s već ranije objavljenim opažanjima (Augusto i sur., 2015.; Marchioni i sur., 2021.; Piluzza i Bullitta, 2011.; Rusak i sur., 2021.; Turumtay i sur., 2014.) koja upućuju da su fenoli jedni od glavnih medijatora antioksidacijskog djelovanja. Nadalje, kod klijanaca brokule i cvjetače zabilježena je vrlo visoka, odnosno visoka korelacija između koncentracija ukupnih katehina i vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta izmjerenog svih trima metodama, što ukazuje na njihovu potencijalnu ulogu u posredovanju antioksidacijskog djelovanja klijanaca kupusnjača i što potvrđuju ranije objavljeni rezultati o antioksidacijskim sposobnostima katehina (Grzesik i sur., 2018.). Također, vrlo visoka korelacija uočena je između koncentracije kvercetina i antioksidacijskog kapaciteta kod klijanaca brokule, što upućuje na jak doprinos flavonoida kvercetina antioksidacijskom djelovanju klijanaca brokule, što je za očekivati obzirom na jak antioksidacijski učinak flavonoida (Avato i Argentieri, 2015.) i visoku koncentraciju flavonoida kvercetina kod brokule (Vallejo i sur., 2004.). Također, kod klijanaca raštike i brokule, utvrđena je vrlo visoka korelacija između antioksidacijskog kapaciteta izmjerenog metodama FRAP i DPPH i koncentracije *L*-askorbinske kiseline, što nije iznenađujuće obzirom na njenu visoku koncentraciju u kljancima brokule i raštike (Domínguez-Perles i sur., 2014.; Šamec i sur., 2018.) te njeno jako antioksidacijsko djelovanje (Jahangir i sur., 2009.). Kod klijanaca cvjetače, uočena je vrlo visoka korelacija između koncentracije kafeina i antioksidacijskog kapaciteta

izmjerenog svima trima korištenim metodama. To vjerojatno upućuje na to da je prijenosom kafeina paralelno unesena vrlo visoka koncentracija drugih spojeva s jakim antioksidacijskim učincima, što je dovelo do ove vrlo visoke korelacije, međutim, unatoč njegovoj niskoj koncentraciji u tretiranim skupinama klijanaca, ne treba ni zanemariti antioksidacijske učinke samog kafeina, koji su detaljno istraženi (Azam i sur., 2003.; Shi i sur., 1991.; Vieira i sur., 2020.).

5. 7. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na antidijabetička svojstva

5. 7. 1. Utjecaj međuvrsnog prijenosa spojeva na sposobnost inhibicije α -glukozidaze

Sposobnost inhibicije enzima α -glukozidaze ekstraktima odraslih biljaka cvjetače (Koss-Mikołajczyk i sur., 2019.) i brokule (Lee i sur., 2013.) već je istražena, a nedavno su objavljeni podaci o potencijalu klijanaca brokule kao bogatog izvora inhibitora α -glukozidaze (Aloo i sur., 2021.). Međutim, jedino je tretman klijanaca cvjetače čajem u kombinaciji s EDTA doveo do povećanja inhibicije enzima α -glukozidaze njihovim ekstraktom. Kako je kod određenih tretmana čak došlo do smanjenja sposobnosti inhibicije enzima α -glukozidaze, vjerojatno je međuvrtni prijenos spojeva narušio biosintetske puteve ključnih metabolita koji djeluju kao jaki inhibitori enzima α -glukozidaze, što je u konačnici dovelo do smanjene sposobnosti inhibicije enzima α -glukozidaze ekstrakata klijanaca kupusnjača. Također, vrijednosti postotka inhibicije bile su značajno niže od vrijednosti postotka inhibicije standardnog inhibitora enzima α -glukozidaze, akarboze, što ukazuje da se ekstrakti klijanaca kupusnjača u analiziranoj koncentraciji ne bi bili adekvatna zamjena standardnih lijekova u terapiji i prevenciji dijabetesa koja cilja enzim α -glukozidazu. Međutim, uočena je vrlo visoka korelacija ($r = 0,85$) između vrijednosti postotka inhibicije enzima α -glukozidaze i koncentracije ukupnih tanina kod klijanaca cvjetače. To ukazuje da su upravo tanini iz klijanaca cvjetače potencijalni medijatori inhibicije enzima α -glukozidaze. To je u skladu s

prethodnim istraživanjima koja su identificirala taninsku kiselinu, specifični tip tanina, kao vrlo jak inhibitor enzima α -glukozidaze, s nižom vrijednosti IC_{50} od akarboze, što ukazuje na njen velik potencijal kao inhibitor enzima α -glukozidaze (Xiao i sur., 2015.). S druge strane, kod klijanaca cvjetače i raštike, uočena je vrlo visoka korelacija između koncentracije ukupnih proantocijanidina (kondenziranih tanina) i vrijednosti postotka inhibicije enzima α -glukozidaze, što upućuje da su proantocijanidini iz klijanaca cvjetače i raštike glavni medijatori inhibitornog učinka na enzim α -glukozidazu. Također, proantocijanidini su već ranije identificirani kao jaki inhibitori enzima α -glukozidaze (Budi Sasmito i Puspitasari, 2016.; Kunyanga i sur., 2011.).

5. 7. 2. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na sposobnost inhibicije α -amilaze

Najveće poboljšanje u sposobnosti inhibicije enzima α -amilaze pokazali su klijanci raštike tretirani čajem u kombinaciji s EDTA, odnosno Tween, u odnosu na kontrolnu skupinu, te klijanci cvjetače tretirani čajem. To ukazuje da su kod klijanaca raštike, permeabilizatori stanične membrane omogućili prijenos spojeva koji su jaki inhibitori enzima α -amilaze iz ekstrakta čaja u klijance raštike. S druge strane, kod klijanaca cvjetače prijenos spojeva koji imaju jaku sposobnost inhibicije enzima α -amilaze iz ekstrakta čaja bio prilikom tretmana ekstraktom čaja. Već je ranije utvrđeno da ekstrakt čaja ima jaku sposobnost inhibicije enzima α -amilaze (Desseaux i sur., 2018.; Miao i sur., 2015.). Uočeno je da spojevi iz ekstrakta čaja imaju sposobnost vezanja na aminokiselinske ostatke enzima α -amilaze stvarajući komplekse vodikovim vezama i Van der Waalsovima interakcijama, što dovodi do inhibicije aktivnosti enzima (Miao i sur., 2015.). Također, i kupusnjače su poznate kao dobar izvor inhibitora enzima α -amilaze. Tako je za vodene ekstrakte odraslog oblika cvjetače uočen postotak inhibicije enzima α -amilaze od 24% (Koss-Mikołajczyk i sur., 2019.), što je veći postotak od zabilježenog postotka inhibicije u slučaju etanolnog ekstrakta kontrolne skupine klijanaca

cvjetače. To potencijalno upućuje na to da su jaki inhibitori enzima α -amilaze hidrofilni spojevi. Nadalje, usporedbom raznih vrsta povrća, klijanci brokule su se pokazali iznimno jakim inhibitorima ovog enzima (Mccue i sur., 2005.), a za ekstrakte raštike nisu pronađeni podaci. No, obzirom da je kod kontrolne skupine klijanaca raštike uočen najniži postotak inhibicije od svih analiziranih skupina, upućuje na njihov slabiji potencijal kao inhibitora enzima α -amilaze, no obzirom na najviši postotak povećanja inhibitorne sposobnosti, potencijal klijanaca raštike nakon međuvrskog prijenosa spojeva nije zanemariv. Također, između vrijednosti postotaka inhibicije enzima α -amilaze ekstraktima klijanaca raštike i koncentracije kavene, galne i ferulične kiseline uočene su vrlo visoke korelacije, redom 0,98, 0,99 i 1,00. To upućuje da bi glavni medijatori ovog inhibitornog učinka mogle biti navedene fenolne kiseline. Njihov potencijal kao inhibitora enzima α -amilaze već je prepoznat, te su zabilježne IC_{50} vrijednosti za galnu i kavenu kiselinu bile niže od vrijednosti standardnog inhibitora, što upućuje na njihov jak inhibitorni učinak prema enzimu α -amilazi. Također, jak inhibitorni učinak pokazala je i ferulična kiselina, međutim IC_{50} vrijednost ferulične kiseline prema enzimu α -amilazi nije bila niža od vrijednosti standardnog inhibitora (Tan i Chang, 2017.). Potencijal međuvrskog prijenosa spojeva kao alata za poboljšanje inhibitornog učinka prema enzimu α -amilazi već je analiziran (Šola i sur., 2020b.) te je uočeno da od četiri ispitana tretmana, jedino tretman ekstraktom *T. communis* dovodi do povećanja postotka inhibicije tog enzima, dok je kod određenih tretmana također uočena tendencija pada vrijednosti postotka inhibicije. Međutim, uočeno povećanje vrijednosti postotaka inhibicije bilo je manje od vrijednosti uočenih u ovom istraživanju, što dodatno upućuje na potencijal čaja kao biljke donora.

5. 7. 3. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na sposobnost inhibicije lipaze

Potencijal ekstrakata kupusnjača, posebno brokule, kao izvora inhibitora enzima lipaze već je istražen, te je u komparativnoj studiji uočeno da semi-purificirani ekstrakti brokule pokazuju puno jači učinak na inhibiciju enzima lipaze od učinka ekstrakta zelenog čaja (Tan i Chang, 2017.). Međutim, prijenos spojeva iz ekstrakta čaja doveo je do povećanja sposobnosti inhibicije enzima lipaze ekstraktima klijanaca kupusnjača, primarno ekstraktima klijanaca cvjetače gdje su sva tri tretmana pokazala povećanje postotaka inhibicije tog enzima. Kod klijanaca brokule do povećanja su doveli tretman čajem i čajem u kombinaciji s EDTA, dok je kod klijanaca raštike do povećanja doveo samo tretman čajem u kombinaciji s Tween. Međutim, nijedan tretman nije doveo do povećanja koje bi kompetiralo vrijednostima koje je pokazao standardni inhibitor, orlistat. No, značajno je da nijedan tretman nije doveo do smanjena vrijednosti postotaka inhibicije, kao što je to bio slučaj kod sposobnosti inhibicije enzima α -glukozidaze i α -amilaze, gdje su određeni tretmani doveli do smanjenja vrijednosti postotka inhibicije. To ukazuje da prijenos spojeva iz čaja ne djeluje negativno na biosintetske puteve ključnih inhibitora enzima lipaze iz klijanaca kupusnjača, što ga čini potencijalnim alatom za povećanje ovog biološkog učinka klijanaca kupusnjača. Nadalje, kod klijanaca cvjetače uočena je vrlo visoka pozitivna korelacija između vrijednosti koncentracije tilirozida i vrijednosti postotaka inhibicije enzima lipaze, što upućuje na njegov jak inhibitorni učinak prema tom enzimu. Već je ranije uočeno da tilirozid ublažava metaboličke poremećaje kod modela pretilih miševa (Goto i sur., 2012.), a obzirom da je enzim lipaza jedan od ciljeva terapije pretilosti (Tan i Chang, 2017.), inhibicija enzima lipaze jedan je od potencijalnih mehanizama ovog opaženog učinka. Također, kod klijanaca raštike uočena je vrlo visoka ($r = 0,97$) pozitivna korelacija između vrijednosti postotaka inhibicije enzima lipaze i koncentracije karotenoida. Pritom, postoje dokazi o inhibitornom djelovanju određenih karotenoida na enzim lipazu (Lunagariya i sur., 2014.).

5. 8. Kemometrijske analize

5. 8. 1. Analiza glavnih komponenti

Prema dijagramu dobivenom na temelju analiz glavnih komponenti, koji je dobiven na temelju setova podataka dobivenih prethodnim analizama i omogućuje vizualizaciju stupnja ovisnosti pojedine istraživane varijable o pojedinom tretmanu i vizualizaciju odnosa između uzoraka, može se uočiti da je obzirom na glavnu komponentu 1 (PC 1) tretman koji je doveo do najvećeg udaljavanja od kontrolne skupine, tretman klijanaca cvjetače čajem u kombinaciji s EDTA. To pokazuje da je ovaj tretman doveo do najvećih promjena u fitokemijskom sastavu i biološkim učincima klijanaca cvjetače u odnosu na kontrolnu skupinu. Iako su se i ostala dva tretmana klijanaca cvjetače jasno odvojili od kontrolne skupine, tretman čajem u kombinaciji s Tween bliži je kontrolnoj skupini, što potencijalno ukazuje da je tretman u kombinaciji s Tween djelomično inhibirao prijenos određenih spojeva, obzirom da je tretman čajem udaljeniji od kontrolne skupine. Odvajanje tretiranih skupina od kontrolne skupine klijanaca nakon međuvrskog prijenosa spojeva iz različitih biljaka donora već je utvrđeno (Šola i sur., 2020b). S druge strane, za razliku od klijanaca cvjetače, kod klijanaca raštike može se vidjeti da se tretman čajem grupirao zajedno s kontrolnim uzorkom, što ukazuje da samo tretman čajem nije doveo do velikih razlika u odnosu na kontrolnu skupinu, no tretmani čajem u kombinaciji s permeabilizatorima odvojili su se od kontrolne skupine, što ukazuje na to da je korištenje permeabilizatora prilikom prijenosa spojeva iz čaja u klijance raštike preporučljivo i neophodno kako bi se postigao traženi učinak. Nadalje, svi tretmani klijanaca brokule odvojili su se od kontrolnog uzorka klijanaca brokule, i kao i u slučaju cvjetače, iako je efekt odvajanja manji, najudaljeniji je uzorak klijanaca tretiran čajem u kombinaciji s EDTA, dok je najbliži kontrolnom uzorku uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, što potencijalno ukazuje da je tretman u kombinaciji s Tween djelomično inhibirao prijenos određenih spojeva, obzirom

da je tretman čajem udaljeniji od kontrolne skupine, a da tretman čajem u kombinaciji s EDTA dovodi do najvećih promjena kod klijanaca brokule u odnosu na kontrolnu skupinu.

5. 8. 2. Hijerarhijsko klasteriranje

Na temelju analize metodom hijerarhijskog klasteriranja, dobiveni rezultati su odgovarali rezultatima dobivenima metodom analize glavnih komponenti. Uočava se najveća udaljenost između klijanaca cvjetače i raštike i klijanaca brokule, što je uočeno i na temelju dijagrama dobivenih PCA. Pritom, kod klijanaca brokule, uočeno je najveće odvajanje uzorka tretiranog čajem u kombinaciji s EDTA, što ukazuje da je taj tretman doveo do najvećeg efekta u vidu promjene fitokemijskog sastava i bioloških učinaka, odnosno svih izmjerenih parametara u ovom istraživanju, dok su tretmani čajem i čajem u kombinaciji s Tween doveli do sličnog učinka. Nadalje, kod klijanaca cvjetače, najveći je učinak na diferencijaciju od kontrolne skupine, kao i kod klijanca brokule, imao tretman čajem u kombinaciji s EDTA, dok su tretmani čajem i čajem u kombinaciji s Tween međusobno bliski. Kod klijanaca raštike, svi su se tretmani odvojili od kontrolne skupine, a tretmani čajem u kombinaciji s permeabilizatorima su se dodatno odvojili od tretmana čajem, što ukazuje na to da je njihova upotreba prilikom prijenosa spojeva iz čaja u kljance raštike poželjna.

6. ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju, utvrđene su promjene kod klijanaca brokule, cvjetače i raštike prijenosom spojeva iz ekstrakta čaja na razini fitokemijskog sastava i antioksidacijskog kapaciteta te sposobnosti inhibicije enzima α -amilaze, α -glukozidaze i lipaze, povezanih s razvojem dijabetesa i pretilosti te je testirana mogućnost poboljšanja učinkovitosti prijenosa spojeva u biljke akceptore djelovanjem na staničnu membranu biljaka akceptora tvarima koje narušavaju njenu stabilnost, kao što su EDTA i Tween. Najznačajnije, utvrđeno je povećanje koncentracije ukupnih fenola nakon tretmana klijanaca brokule, cvjetače i raštike čajem, a do najvećeg je povećanja doveo tretman čajem u kombinaciji s EDTA kod klijanaca cvjetače gdje je koncentracija ukupnih fenola povećana za 62,79% u odnosu na kontrolnu skupinu. PCA je također potvrdila da je tretman čajem imao najveći utjecaj na promjenu fitokemijskog sastava i analiziranih bioloških učinaka kod klijanaca cvjetače, što pokazuje da su klijanci cvjetače najkompatibilniji akceptor spojeva iz čaja. Obzirom na ostale fitokemijske parametre i koncentracije identificiranih pojedinačnih spojeva, uočena je iznimna vrsna specifičnost u prijenosu pojedinih spojeva u različite akceptore, ali i unutar pojedinačnih vrsta klijanaca, ovisno o tretmanu. Nadalje, utvrđeno je povećanje antioksidacijskog kapaciteta klijanaca, ovisno o korištenoj metodi. Tako je metodom FRAP utvrđeno da svi tretmani kod svih vrsta klijanaca dovode do povećanja antioksidacijskog kapaciteta, što ukazuje na prijenos bioaktivnih spojeva s jakim antioksidacijskim djelovanjem i na potencijal ovakvih klijanaca kao potentnijih utišivača slobodnih radikala u ljudskom organizmu. Uočeno je da tretman klijanaca čajem dovodi do povećanja inhibitornog djelovanja prema enzimu lipazi u najvećem broju analiziranih uzoraka, što dodatno pojačava biopotencijal ovih klijanaca kao hrane. Može se zaključiti da je tretman klijanaca brokule, cvjetače i raštike obećavajući pristup povećanju fitokemijskog sastava i bioloških učinaka, što potvrđuje hipotezu da međuvrtni prijenos spojeva dovodi do pozitivnih promjena u sastavu specijaliziranih metabolita, antioksidacijskom kapacitetu i inhibitornom djelovanju na analizirane enzime. Sinergističko

djelovanje prenesenih s endogenim spojevima biljke akceptora moglo bi biti ključnim za značajno poboljšanje njenih pozitivnih bioloških učinaka. Ovaj rad daje temelj za daljnja istraživanja potencijala međuvrsnog prijenosa spojeva u razvoju biljaka poboljšanih svojstava i pronalazak najkompatibilnijih kombinacija biljaka donora i akceptora. Pritom, kao obećavajuće biljke donori primjenu bi potencijalno mogle naći invazivne biljne vrste koje su često bogate specijaliziranim biljnim metabolitima. Međutim, potrebna su daljnja *in vitro* i *in vivo* istraživanja učinaka ovakvih biljaka na raznim modelima kako bi se dobila šira slika učinaka biljaka poboljšanih međuvrsnim prijenosom spojeva, kao i daljnja istraživanja fizioloških, biokemijskih i promjena u ekspresiji gena i proteina u samim biljkama akceptorima nakon unosa egzogenih spojeva.

7. ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Ivani Šola, na neizmjernom trudu, predanosti i volji te iznimnoj stručnosti i doprinosu u provedbi ovog rada. Također, zahvaljujem joj na brojnim korisnim savjetima i vještinama koje sam stekao pod njenim mentorstvom.

Također, zahvaljujem svim djelatnicima Botaničkog zavoda i Zavoda za mikrobiologiju na Marulićevom trgu 9a na iznimno ugodnoj atmosferi i prijateljskim razgovorima tijekom provedbe eksperimenata.

8. POPIS LITERATURE

- Ahmed FA, Ali RFM (2013). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh and processed white cauliflower. *Biomed Res Int* **2013**.
- Aloo SO, Ofosu FK, Daliri EBM, Oh DH (2021). UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS metabolite profiling of the antioxidant and antidiabetic activities of red cabbage and broccoli seeds and sprouts. *Antioxidants* **10**: 852.
- Angelina Faraldo Corrêa T, Campos Rozenbaum A, Macedo Rogero M (2021). Role of tea polyphenols in metabolic syndrome. *Bioact Compd Nutraceutical Funct Food Good Hum Heal*.
- Angelova Z, Georgiev S, Roos W (2006). Elicitation of plants. *Biotechnol Biotechnol Equip* **20**: 72–83.
- Augusto TR, Scheuermann Salinas ES, Alencar SM, D’Arce MABR, Camargo AC De, Vieira TMF de S (2015). Phenolic compounds and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts of wild and cultivated murtilla (*Ugni molinae* Turcz.). *Food Sci Technol* **34**: 667–673.
- Avato P, Argentieri MP (2015). Brassicaceae: a rich source of health improving phytochemicals. *Phytochem Rev* **14**: 1019–1033.
- Ayaz FA, Hayirlioglu-Ayaz S, Alpay-Karaoglu S, Grúz J, Valentová K, Ulrichová J, i sur. (2008). Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chem* **107**: 19–25.
- Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM (2003). Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med Sci Monit* **9**: 325–330.
- Baenas N, Gómez-Jodar I, Moreno DA, García-Viguera C, Periago PM (2017). Broccoli and radish sprouts are safe and rich in bioactive phytochemicals. *Postharvest Biol Technol* **127**: 60–67.
- Bahadoran Z, Mirmiran P, Azizi F (2013). Potential efficacy of broccoli sprouts as a unique supplement for management of type 2 diabetes and its complications. *J Med Food* **16**: 375–382.
- Biba R, Matić D, Lyons DM, Štefanić PP, Cvjetko P, Tkalec M, i sur. (2020). Coating-dependent effects of silver nanoparticles on tobacco seed germination and early growth. *Int J Mol Sci* **21**: 3441.
- Boitel-Conti M, Gontier E, Laberche J-C, Ducrocq C, Sangwan-Norreel BS (1996). Inducer effect of Tween 20 permeabilization treatment used for release of stored tropane alkaloids in *Datura innoxia* Mill. hairy root cultures. *Plant Cell Rep* **16**: 241–244.
- Bontpart T, Marlin T, Vialet S, Guiraud JL, Pinasseau L, Meudec E, i sur. (2016). Two

- shikimate dehydrogenases, VvSDH3 and VvSDH4, are involved in gallic acid biosynthesis in grapevine. *J Exp Bot* **67**: 3537–3550.
- Budi Sasmito B, Puspitasari YE (2016). Antidiabetic and antioxidant activities of tannin extract of *Rhizophora mucronata* leaves. *J Chem Pharm Res* **8**: 143–148.
- Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y (1998). Tannins and human health: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **38**: 421–464.
- Couée I, Sulmon C, Gouesbet G, Amrani A El (2006). Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *J Exp Bot* **57**: 449–459.
- Cui K, Shoemaker SP (2018). Public perception of genetically-modified (GM) food: A nationwide Chinese consumer study. *Sci Food* **2**: 3–12.
- Desseaux V, Stocker P, Brouant P, Ajandouz EH (2018). The mechanisms of alpha-amylase inhibition by flavan-3-ols and the possible impacts of drinking green tea on starch digestion. *J Food Sci* **83**: 2858–2865.
- Domínguez-Perles R, Mena P, García-Viguera C, Moreno DA (2014). Brassica foods as a dietary source of vitamin C: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **54**: 1076–1091.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* **28**: 350–356.
- Durgo K, Kostić S, Gradiški K, Komes D, Osmak M, Franekić J (2011). Genotoxic effects of green tea extract on human laryngeal carcinoma cells in vitro. *Arh Hig Rada Toksikol* **62**: 139–146.
- Evstatiev R, Cervenka A, Austerlitz T, Deim G, Baumgartner M, Beer A, i sur. (2021). The food additive EDTA aggravates colitis and colon carcinogenesis in mouse models. *Sci Rep* **11**: 5188.
- Falcone Ferreyra ML, Rius SP, Casati P (2012). Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci* **3**: 222.
- Fu QY, Li QS, Lin XM, Qiao RY, Yang R, Li XM, i sur. (2017). Antidiabetic effects of tea. *Molecules* **22**: 849.
- Garnier E, Laurent G (1994). Leaf anatomy, specific mass and water content in congeneric annual and perennial grass species. *New Phytol* **128**: 725–736.
- Gillies CL, Abrams KR, Lambert PC, Cooper NJ, Sutton AJ, Hsu RT, i sur. (2007). Pharmacological and lifestyle interventions to prevent or delay type 2 diabetes in people with impaired glucose tolerance: Systematic review and meta-analysis. *Br Med J* **334**: 299–302.

- Goto T, Teraminami A, Lee JY, Ohyama K, Funakoshi K, Kim Y II, i sur. (2012). Tilirozide, a glycosidic flavonoid, ameliorates obesity-induced metabolic disorders via activation of adiponectin signaling followed by enhancement of fatty acid oxidation in liver and skeletal muscle in obese-diabetic mice. *J Nutr Biochem* **23**: 768–776.
- Graham HN (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med (Baltim)* **21**: 334–350.
- Gruissem W, Lee CH, Oliver M, Pogson B (2012). The global plant council: Increasing the impact of plant research to meet global challenges. *J Plant Biol* **55**: 343–348.
- Grzesik M, Naparło K, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I (2018). Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. *Food Chem* **241**: 480–492.
- Habiba U, Ali S, Farid M, Shakoor MB, Rizwan M, Ibrahim M, i sur. (2015). EDTA enhanced plant growth, antioxidant defense system, and phytoextraction of copper by *Brassica napus* L. *Environ Sci Pollut Res* **22**: 1534–1544.
- Halder M, Sarkar S, Jha S (2019). Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Eng Life Sci* **19**: 880–895.
- Havsteen BH (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* **96**: 67–202.
- Heimler D, Vignolini P, Dini MG, Vincieri FF, Romani A (2006). Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chem* **99**: 464–469.
- Henning SM, Niu Y, Liu Y, Lee NH, Hara Y, Thames GD, i sur. (2005). Bioavailability and antioxidant effect of epigallocatechin gallate administered in purified form versus as green tea extract in healthy individuals. *J Nutr Biochem* **16**: 610–616.
- Hijazin T, Radwan A, Abouzeid S, Dräger G, Selmar D (2019). Uptake and modification of umbelliferone by various seedlings. *Phytochemistry* **157**: 194–199.
- Hincha DK, Popova A V., Cacula C (2006). Chapter 6 Effects of Sugars on the Stability and Structure of Lipid Membranes During Drying. *Adv Planar Lipid Bilayers Liposomes* **3**: 189–217.
- Hjertén S, Johansson KE (1972). Selective solubilization with tween 20 of membrane proteins from *Acholeplasma laidlawii*. *BBA - Biomembr* **288**: 312–325.
- Hodges DM, Forney CF, Wismer W V (2001). Antioxidant responses in harvested leaves of two cultivars of spinach differing in senescence rates. *J Amer Soc Hort Sci* **126**.
- Hodgson JM, Morton LW, Puddey IB, Beilin LJ, Croft KD (2000). Gallic acid metabolites are markers of black tea intake in humans. *J Agric Food Chem* **48**: 2276–2280.
- Howard LR, Clark JR, Brownmiller C (2003). Antioxidant capacity and phenolic content in

- blueberries as affected by genotype and growing season. *J Sci Food Agric* **83**: 1238–1247.
- Huang D, Boxin OU, Prior RL (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* **53**: 1841–1856.
- Hwang HS, Winkler-Moser JK (2016). Oxidative Stability and Shelf Life of Frying Oils and Fried Foods. *Oxidative Stab Shelf Life Foods Contain Oils Fats*. 251–285.
- Jahangir M, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R (2009). Health-affecting compounds in Brassicaceae. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **8**: 31–43.
- Jansma SR, Gosselt JF, Kuipers K, Jong MDT de (2020). Technology legitimization in the public discourse: applying the pillars of legitimacy on GM food. *Technol Anal Strateg Manag* **32**: 195–207.
- Jeffery EH, Araya M (2009). Physiological effects of broccoli consumption. *Phytochem Rev* **8**: 283–298.
- Jeszka-Skowron M, Zgoła-Grześkowiak A, Frankowski R (2018). *Cistus incanus* a promising herbal tea rich in bioactive compounds: LC–MS/MS determination of catechins, flavonols, phenolic acids and alkaloids—A comparison with *Camellia sinensis*, Rooibos and Hoan Ngoc herbal tea. *J Food Compos Anal* **74**: 71–81.
- Kato M, Mizuno K, Crozier A, Fujimura T, Ashihara H (2000). Caffeine synthase gene from tea leaves. *Nature* **406**: 956–957.
- Knypl JS (1977). Tween surfactants stimulate growth of *Amaranthus* Seedlings. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **81**: 147–152.
- Köksal E, Gülçen İhami (2008). Antioxidant Activity of Cauliflower (*Brassica oleracea* L.). *Turk J Agric* **32**.
- Koss-Mikołajczyk I, Kusznierevicz B, Wiczowski W, Płatosz N, Bartoszek A (2019). Phytochemical composition and biological activities of differently pigmented cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) varieties. *J Sci Food Agric* **99**: 5499–5507.
- Kroemer G, López-Otín C, Madeo F, Cabo R de (2018). Carbotoxicity—Noxious effects of carbohydrates. *Cell* **175**: 605–614.
- Kunyanga CN, Imungi JK, Okoth M, Momanyi C, Biesalski HK, Vadivel V (2011). Antioxidant and antidiabetic properties of condensed tannins in acetonic extract of selected raw and processed indigenous food ingredients from Kenya. *J Food Sci* **76**: .
- Lam TBT, Iiyama K, Stone BA (1996). Caffeic acid: O-methyltransferases and the biosynthesis of ferulic acid in primary cell walls of wheat seedlings. *Phytochemistry* **41**: 1507–1510.
- Lambert JD, Yang CS (2003). Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *J Nutr*

- Le TN, Chiu C-H, Hsieh P-C (2020). Bioactive compounds and bioactivities of *Brassica oleracea* L. var. *Italica* sprouts and microgreens: An updated overview from a nutraceutical perspective. *Plants (Basel, Switzerland)* **9**: 1–23.
- Lee SG, Kim JH, Son MJ, Lee EJ, Park WD, Kim JB, i sur. (2013). Influence of extraction method on quality and functionality of broccoli juice. *Prev Nutr Food Sci* **18**: 133–138.
- Li Y, Mao J, Liu Q, Song X, Wu Y, Cai M, i sur. (2020). De novo biosynthesis of caffeic acid from glucose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol* **9**: 756–765.
- Llorach R, Gil-Izquierdo A, Ferreres F, Tomás-Barberán FA (2003). HPLC-DAD-MS/MS ESI characterization of unusual highly glycosylated acylated flavonoids from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) agroindustrial byproducts. *J Agric Food Chem* **51**: 3895–3899.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev* **4**: 118–126.
- Lunagariya NA, Patel NK, Jagtap SC, Bhutani KK (2014). Inhibitors of pancreatic lipase: State of the art and clinical perspectives. *EXCLI J* **13**: 897–921.
- Ma YY, Zhao DG, Zhou AY, Zhang Y, Du Z, Zhang K (2015). α -Glucosidase inhibition and antihyperglycemic activity of phenolics from the flowers of *Edgeworthia gardneri*. *J Agric Food Chem* **63**: 8162–8169.
- Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta* **613**: 1–19.
- Mahmood T, Akhtar N, Khan BA (2010). The morphology, characteristics, and medicinal properties of *Camellia sinensis*' tea. *J Med Plants Res* **4**: 2028–2033.
- Marchioni I, Martinelli M, Ascrizzi R, Gabbrielli C, Flamini G, Pistelli L, i sur. (2021). Small functional foods: Comparative phytochemical and nutritional analyses of five microgreens of the Brassicaceae family. *Foods* **10**: 1–15.
- Mccue P, Kwon YI, Shetty K (2005). Anti-amylase, anti-glucosidase and anti-angiotensin I-converting enzyme potential of selected foods. *J Food Biochem* **29**: 278–294.
- Miao M, Jiang B, Jiang H, Zhang T, Li X (2015). Interaction mechanism between green tea extract and human α -amylase for reducing starch digestion. *Food Chem* **186**: 20–25.
- Midoux P, Kichler A, Boutin V, Maurizot JC, Monsigny M (1998). Membrane permeabilization and efficient gene transfer by a peptide containing several histidines. *Bioconjug Chem* **9**: 260–267.
- Mizuno K, Okuda A, Kato M, Yoneyama N, Tanaka H, Ashihara H, i sur. (2003). Isolation of

- a new dual-functional caffeine synthase gene encoding an enzyme for the conversion of 7-methylxanthine to caffeine from coffee (*Coffea arabica* L.). *FEBS Lett* **534**: 75–81.
- Nampoothiri S V., Prathapan A, Cherian OL, Raghu KG, Venugopalan V V., Sundaresan A (2011). *In vitro* antioxidant and inhibitory potential of Terminalia bellerica and Emblica officinalis fruits against LDL oxidation and key enzymes linked to type 2 diabetes. *Food Chem Toxicol* **49**: 125–131.
- Natella F, Maldini M, Nardini M, Azzini E, Foddai MS, Giusti AM, i sur. (2016). Improvement of the nutraceutical quality of broccoli sprouts by elicitation. *Food Chem* **201**: 101–109.
- Nayyar A, Das M, Deosarkar B, Deosarkar SB, Karan A, Sinha P, i sur. (2017). Green tea in medicine: A brief overview. *Int J Dent Res* **5**: 191.
- Nguyen VPT, Stewart JD, Ioannou I, Allais F (2021). Sinapic acid and sinapate esters in Brassica: Innate accumulation, biosynthesis, accessibility via chemical synthesis or recovery from biomass, and biological activities. *Front Chem* **9**: 350.
- Nowak M, Wittke C, Lederer I, Klier B, Kleinwächter M, Selmar D (2016). Interspecific transfer of pyrrolizidine alkaloids: An unconsidered source of contaminations of phytopharmaceuticals and plant derived commodities. *Food Chem* **213**: 163–168.
- Nowak M, Yahyazadeh M, Lewerenz L, Selmar D (2017). Horizontal natural product transfer: A so far unconsidered source of contamination of medicinal plants. *Med Plants Environ Challenges* 215–225doi:10.1007/978-3-319-68717-9_12.
- Nyambe-Silavwe H, Villa-Rodriguez JA, Ifie I, Holmes M, Aydin E, Jensen JM, i sur. (2015). Inhibition of human α -amylase by dietary polyphenols. *J Funct Foods* **19**: 723–732.
- Olsen H, Aaby K, Borge GIA (2009). Characterization and quantification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in curly kale (*Brassica oleracea* L. convar. *acephala* var. *sabellica*) by HPLC-DAD-ESI-MSn. *J Agric Food Chem* **57**: 2816–2825.
- Pandey KB, Rizvi SI (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* **2**: 270–278.
- Park YJ, Park SY, Arasu MV, Al-Dhabi NA, Ahn HG, Kim JK, i sur. (2017). Accumulation of carotenoids and metabolic profiling in different cultivars of tagetes flowers. *Molecules* **22**: 313.
- Pennington JAT, Fisher RA (2010). Food component profiles for fruit and vegetable subgroups. *J Food Compos Anal* **23**: 411–418.
- Pérez-Balibrea S, Moreno DA, García-Viguera C (2011). Improving the phytochemical composition of broccoli sprouts by elicitation. *Food Chem* **129**: 35–44.
- Piluzza G, Bullitta S (2011). Correlations between phenolic content and antioxidant properties

- in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. *Pharm Biol* **49**: 240–247.
- Podsedeck A (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Sci Technol* **40**: 1–11.
- Poljuha D, Sladonja B, Šola I, Dudaš S, Bilić J, Rusak G, i sur. (2017). Phenolic composition of leaf extracts of *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae) with antibacterial and antifungal activity equivalent to standard antibiotics. *Nat Prod Commun* **12**: 1609–1612.
- Prachayasittikul V, Isarankura-Na-Ayudhya C, Tantimongcolwat T, Nantasenamat C, Galla HJ (2007). EDTA-induced membrane fluidization and destabilization: Biophysical studies on artificial lipid membranes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **39**: 901–913.
- Raclaru M, Gruber J, Kumar R, Sadre R, Lühs W, Zarhloul MK, i sur. (2006). Increase of the tocochromanol content in transgenic *Brassica napus* seeds by overexpression of key enzymes involved in prenylquinone biosynthesis. *Mol Breed* **18**: 93–107.
- Raiola A, Errico A, Petruk G, Monti D, Barone A, Rigano M (2017). Bioactive compounds in Brassicaceae vegetables with a role in the prevention of chronic diseases. *Molecules* **23**: 15.
- Ramirez D, Abellán-Victorio A, Beretta V, Camargo A, Moreno DA (2020). Functional ingredients from Brassicaceae species: Overview and perspectives. *Int J Mol Sci* **21**: 1998.
- 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 Radic Biol Med* **26**: 1231–1237.
- Rea PA (2007). Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 347–375.
- Reitermayer D, Kafka TA, Lenz CA, Vogel RF (2018). Interrelation between Tween and the membrane properties and high pressure tolerance of *Lactobacillus plantarum*. *BMC Microbiol* **18**: 1–14.
- Rietveld A, Wiseman S (2003). Antioxidant effects of tea: Evidence from human clinical trials. *J Nutr* **133**: .
- Rothstein SJ (2007). Returning to our roots: Making plant biology research relevant to future challenges in agriculture. *Plant Cell* **19**: 2695–2699.
- Rusak G, Komes D, Likić S, Horžić D, Kovač M (2008). Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chem* **110**: 852–858.
- 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.

J Food Sci Technol 1–11.

- Sahai V, Kumar V (2020). Anti-diabetic, hepatoprotective and antioxidant potential of Brassica oleracea sprouts. *Biocatal Agric Biotechnol* **25**: 101623.
- Šamec D, Bogović M, Vincek D, Martinčić J, Salopek-Sondi B (2014). Assessing the authenticity of the white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*) cv. “Varaždinski” by molecular and phytochemical markers. *Food Res Int* **60**: 266–272.
- Šamec D, Karalija E, Šola I, Vujčić Bok V, Salopek-Sondi B (2021). The role of polyphenols in abiotic stress response: The influence of molecular structure. *Plants* **10**: 1–24.
- Šamec D, Pavlović I, Radojčić Redovniković I, Salopek-Sondi B (2018). Comparative analysis of phytochemicals and activity of endogenous enzymes associated with their stability, bioavailability and food quality in five Brassicaceae sprouts. *Food Chem* **269**: 96–102.
- Šamec D, Urlić B, Salopek-Sondi B (2019). Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) as a superfood: Review of the scientific evidence behind the statement. *Crit Rev Food Sci Nutr* **59**: 2411–2422.
- Sangeetha R, Vedaşree N (2012). *In vitro* α -amylase inhibitory activity of the leaves of *Thespesia populnea*. *Int Sch Res Netw ISRN Pharmacol* **2012**: .
- Saulnier L, Thibault JF (1999). Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *J Sci Food Agric* **79**: 396–402.
- Scheffler JM, Schiefermeier N, Huber LA (2014). Mild fixation and permeabilization protocol for preserving structures of endosomes, focal adhesions, and actin filaments during immunofluorescence analysis. *Methods Enzymol* **535**: 93–102.
- Selmar D, Engelhardt UH, Hänsel S, Thräne C, Nowak M, Kleinwächter M (2015). Nicotine uptake by peppermint plants as a possible source of nicotine in plant-derived products. *Agron Sustain Dev* **35**: 1185–1190.
- Selmar D, Radwan A, Hijazin T, Abouzeid S, Yahyazadeh M, Lewerenz L, i sur. (2019). Horizontal Natural Product Transfer: Intriguing Insights into a Newly Discovered Phenomenon. *J Agric Food Chem* **67**: 8740–8745.
- Seo MS, Jin M, Chun JH, Kim SJ, Park BS, Shon SH, i sur. (2016). Functional analysis of three BrMYB28 transcription factors controlling the biosynthesis of glucosinolates in *Brassica rapa*. *Plant Mol Biol* **90**: 503–516.
- Shi X, Dalal NS, Jain AC (1991). Antioxidant behaviour of caffeine: Efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Food Chem Toxicol* **29**: 1–6.
- Simões SI, Tapadas JM, Marques CM, Cruz MEM, Martins MBF, Cevc G (2005). Permeabilisation and solubilisation of soybean phosphatidylcholine bilayer vesicles, as

- membrane models, by polysorbate, Tween 80. *Eur J Pharm Sci* **26**: 307–317.
- Sims DA, Gamon JA (2002). Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sens Environ* **81**: 337–354.
- Singh J, Upadhyay AK, Prasad K, Bahadur A, Rai M (2007). Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in Brassica vegetables. *J Food Compos Anal* **20**: 106–112.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* **299**: 152–178.
- Šola I, Piantanida I, Crnolatac I, Rusak G (2015). Europium improves the transport of quercetin through *Arabidopsis thaliana*. *Biol Plant* **59**: 554–559.
- Šola I, Vujčić Bok V, Dujmović M, Rusak G (2020a). Developmentally-related changes in phenolic and L-ascorbic acid content and antioxidant capacity of Chinese cabbage sprouts. *J Food Sci Technol* **57**: 702–712.
- Šola I, Vujčić Bok V, Pinterić M, Auer S, Ludwig-Müller J, Rusak G (2020b). Improving the phytochemical profile and bioactivity of Chinese cabbage sprouts by interspecific transfer of metabolites. *Food Res Int* **137**: 109726.
- Somanchi M, Phillips K, Haile E, Pehrsson P (2018). Vitamin C content in dried and brewed green tea from the US retail market. *FASEB J* **31**: 956.8-956.8.
- Spínola V, Pinto J, Llorent-Martínez EJ, Tomás H, Castilho PC (2019). Evaluation of *Rubus grandifolius* L. (wild blackberries) activities targeting management of type-2 diabetes and obesity using in vitro models. *Food Chem Toxicol* **123**: 443–452.
- Sumanta N, Imranul Haque C, Nishika J, Suprakash R (2014). Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents *Res J Chem Sci* **4**.
- Tan Y, Chang SKC (2017). Digestive enzyme inhibition activity of the phenolic substances in selected fruits, vegetables and tea as compared to black legumes. *J Funct Foods* **38**: 644–655.
- Teh CY, Shaharuddin NA, Ho CL, Mahmood M (2016). Exogenous proline significantly affects the plant growth and nitrogen assimilation enzymes activities in rice (*Oryza sativa*) under salt stress. *Acta Physiol Plant* **38**: 1–10.
- Trapp S, Legind CN (2011). Uptake of Organic Contaminants from Soil into Vegetables and Fruits. *Deal with Contam Sites* 369–408.
- Tsujimura M, Higasa S, Nakayama K, Yanagisawa Y, Iwamoto S, Kagawa Y (2008). Vitamin

- C activity of dehydroascorbic acid in humans - Association between changes in the blood vitamin C concentration or urinary excretion after oral loading. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **54**: 315–320.
- Turumtay EA, Islamoğlu F, Çavuş D, Şahin H, Turumtay H, Vanholme B (2014). Correlation between phenolic compounds and antioxidant activity of Anzer tea (*Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*). *Ind Crops Prod* **52**: 687–694.
- Vaara M (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* **56**: 395–411.
- Vallejo F, Tomás-Barberán FA, Ferreres F (2004). Characterisation of flavonols in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) by liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionisation mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1054**: 181–193.
- Vieira AJSC, Gaspar EM, Santos PMP (2020). Mechanisms of potential antioxidant activity of caffeine. *Radiat Phys Chem* **174**: 108968.
- Vinholes J, Grosso C, Andrade PB, Gil-Izquierdo A, Valentão P, Pinho PG De, i sur. (2011). *In vitro* studies to assess the antidiabetic, anti-cholinesterase and antioxidant potential of *Spergularia rubra*. *Food Chem* **129**: 454–462.
- Wassler M, Jonasson I, Persson R, Fries E (1987). Differential permeabilization of membranes by saponin treatment of isolated rat hepatocytes. Release of secretory proteins. *Biochem J* **247**: 407–415.
- Wu Z, Yang L, Jiang L, Zhang Z, Song H, Rong X, i sur. (2019). Low concentration of exogenous ethanol promoted biomass and nutrient accumulation in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Signal Behav* **14**: .
- Wuensch KL, Evans JD (1996). Straightforward Statistics for the Behavioral Sciences. *J Am Stat Assoc* **91**: 1750.
- Xiao H, Liu B, Mo H, Liang G (2015). Comparative evaluation of tannic acid inhibiting α -glucosidase and trypsin. *Food Res Int* **76**: 605–610.
- Xiao Z, Codling EE, Luo Y, Nou X, Lester GE, Wang Q (2016). Microgreens of Brassicaceae: Mineral composition and content of 30 varieties. *J Food Compos Anal* **49**: 87–93.
- Xiao Z, Rausch SR, Luo Y, Sun J, Yu L, Wang Q, i sur. (2019). Microgreens of Brassicaceae: Genetic diversity of phytochemical concentrations and antioxidant capacity. *LWT* **101**: 731–737.
- Xu L, Nagata N, Ota T (2018). Glucoraphanin: a broccoli sprout extract that ameliorates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Adipocyte* **7**: 218–225.
- Xu W, Dubos C, Lepiniec L (2015). Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-

- bHLH-WDR complexes. *Trends Plant Sci* **20**: 176–185.
- Yazaki K (2006). ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Lett* **580**: 1183–1191.
- Yoneyama N, Morimoto H, Ye CX, Ashihara H, Mizuno K, Kato M (2006). Substrate specificity of N-methyltransferase involved in purine alkaloids synthesis is dependent upon one amino acid residue of the enzyme. *Mol Genet Genomics* **275**: 125–135.
- Zhang Y, Legland D, Hage F El, Devaux MF, Guillon F, Reymond M, i sur. (2019). Changes in cell walls lignification, feruloylation and p-coumaroylation throughout maize internode development. *PLoS One* **14**.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* **64**: 555–559.
- Zhou P, Li Q, Liu G, Xu N, Yang Y, Zeng W, i sur. (2019). Integrated analysis of transcriptomic and metabolomic data reveals critical metabolic pathways involved in polyphenol biosynthesis in *Nicotiana tabacum* under chilling stress. *Funct Plant Biol* **46**: 30–43.

9. PRILOZI

Prilog 1. Utjecaj međuvrskog prijenosa spojeva na udio ukupnih identificiranih fenolnih spojeva, ukupnih identificiranih fenolnih kiselina, flavonoida, ne-fenolnih spojeva te ukupnih identificiranih spojeva u klijancima brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, izraženu u miligramima po gramu suhe mase (mg / g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka pojedine vrste klijanaca označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

		Ukupni identificirani fenolni spojevi (mg / g SM)	Ukupne identificirane fenolne kiseline (mg / g SM)	Ukupni identificirani flavonoidi (mg / g SM)	Ukupni identificirani ne-fenolni spojevi (mg / g SM)	Ukupni identificirani spojevi (mg / g SM)
Brokula	Kontrola	233,8 \pm 3,2 a	161,8 \pm 3,5 a	72,0 \pm 4,2 a	84,7 \pm 6,8 b	318,6 \pm 8,4 a
	Čaj	232,5 \pm 9,5 a	161,6 \pm 8,2 a	70,8 \pm 3,3 a	88,5 \pm 3,1 b	320,9 \pm 11,2 a
	Čaj + EDTA	232,5 \pm 8,9 a	162,3 \pm 6,4 a	70,2 \pm 4,9 a	103,7 \pm 7,4 a	336,2 \pm 14,8 a
	Čaj + Tween	234,2 \pm 8,2 a	162,2 \pm 9,4 a	72,0 \pm 1,2 a	90,3 \pm 5,3 ab	324,6 \pm 13,4 a
Cvjetača	Kontrola	261,7 \pm 19,5 a	169,4 \pm 5,5 a	92,3 \pm 14,8 a	140,8 \pm 15,3 a	402,4 \pm 26,4 a
	Čaj	285,1 \pm 58,8 a	175,6 \pm 22,1 a	109,5 \pm 36,8 a	147,9 \pm 3,0 a	433,0 \pm 56,0 a
	Čaj + EDTA	322,0 \pm 10,3 a	192,5 \pm 7,4 a	129,5 \pm 5,0 a	141,4 \pm 11,7 a	463,4 \pm 20,8 a
	Čaj + Tween	308,1 \pm 21,9 a	188,6 \pm 13,0 a	119,5 \pm 9,7 a	123,5 \pm 7,6 a	431,6 \pm 28,5 a
Raštika	Kontrola	275,7 \pm 10,0 a	180,6 \pm 5,2 a	95,1 \pm 5,8 a	92,9 \pm 7,1 b	368,5 \pm 15,0 a
	Čaj	292,3 \pm 12,5 a	190,3 \pm 10,9 a	102,0 \pm 6,2 a	110,4 \pm 14,5 ab	402,7 \pm 26,6 a
	Čaj + EDTA	300,6 \pm 12,3 a	200,7 \pm 5,5 a	99,9 \pm 7,3 a	122,3 \pm 0,6 a	422,8 \pm 12,5 a
	Čaj + Tween	293,4 \pm 22,1 a	192,9 \pm 11,4 a	100,5 \pm 10,9 a	112,5 \pm 6,3 ab	406,0 \pm 28,4 a

Prilog 2. Pearsonovi koeficijenti korelacije između izmjerenih parametara fitokemijskog sastava, antioksidacijskog kapaciteta i stupnja inhibicije enzima α -amilaze, α -glukozidaze i lipaze za pojedine uzorke klijanaca brokule. Tamno otisnute vrijednosti značajne su na razini $p \leq 0,05$. *Opis kratica korištenih u tablici zbog veličine nalazi se na kraju ovog poglavlja.

	ABTS	FRAP	DPPH	Amil	Gluk	Lip	TP	TF	TFI	TC	SS	TT	TPA	Chl a	Chl b	Chl	Car	Porf	L-ask	Kaf	Kav	Gal	Fer	Sin	Til	Q	K	p-kum	TIC
ABTS	1,00																												
FRAP	0,91	1,00																											
DPPH	0,97	0,97	1,00																										
Amil	-0,65	-0,41	-0,60	1,00																									
Gluk	0,48	0,49	0,59	-0,78	1,00																								
Lip	0,41	0,44	0,33	0,34	-0,57	1,00																							
TP	0,46	0,77	0,61	0,24	0,11	0,53	1,00																						
TF	-0,56	-0,48	-0,44	-0,09	0,46	-0,96	-0,38	1,00																					
TFI	-0,34	-0,69	-0,54	-0,18	-0,31	-0,23	-0,95	0,07	1,00																				
TC	0,98	0,98	1,00	-0,56	0,52	0,40	0,63	-0,50	-0,53	1,00																			
SS	-0,66	-0,36	-0,46	0,44	0,14	-0,59	0,10	0,80	-0,36	-0,50	1,00																		
TT	-0,24	-0,56	-0,36	-0,53	0,24	-0,69	-0,94	0,50	0,83	-0,40	-0,09	1,00																	
TPA	0,06	-0,05	0,11	-0,73	0,84	-0,88	-0,41	0,74	0,16	0,04	0,25	0,69	1,00																
Chl a	-0,73	-0,48	-0,66	0,99	-0,72	0,21	0,19	0,04	-0,17	-0,63	0,54	-0,46	-0,63	1,00															
Chl b	-0,07	-0,42	-0,31	-0,07	-0,56	0,28	-0,66	-0,43	0,87	-0,27	-0,69	0,48	-0,26	-0,12	1,00														
Chl	-0,36	-0,59	-0,56	0,33	-0,83	0,36	-0,57	-0,40	0,77	-0,51	-0,45	0,28	-0,51	0,28	0,92	1,00													
Car	-0,46	-0,16	-0,24	0,24	0,38	-0,64	0,20	0,81	-0,49	-0,29	0,97	-0,11	0,40	0,35	-0,83	-0,66	1,00												
Porf	-0,77	-0,96	-0,89	0,21	-0,44	-0,41	-0,90	0,38	0,86	-0,89	0,13	0,71	0,11	0,26	0,61	0,69	-0,06	1,00											
L-ask	0,57	0,86	0,74	-0,05	0,45	0,28	0,94	-0,18	-0,96	0,74	0,14	-0,76	-0,08	-0,08	-0,79	-0,80	0,32	-0,96	1,00										
Kaf	0,91	0,88	0,87	-0,30	0,11	0,75	0,61	-0,83	-0,39	0,90	-0,72	-0,52	-0,36	-0,42	0,03	-0,14	-0,58	-0,78	0,58	1,00									
Kav	-0,18	0,06	0,03	-0,11	0,68	-0,72	0,20	0,82	-0,51	-0,03	0,82	0,00	0,63	0,00	-0,87	-0,84	0,94	-0,21	0,42	-0,42	1,00								
Gal	0,20	0,49	0,42	-0,16	0,73	-0,37	0,59	0,47	-0,81	0,38	0,60	-0,34	0,44	-0,10	-0,97	-0,98	0,78	-0,63	0,78	0,02	0,89	1,00							
Fer	-0,76	-0,62	-0,63	0,22	0,19	-0,84	-0,34	0,95	0,05	-0,68	0,90	0,35	0,51	0,35	-0,41	-0,26	0,85	0,47	-0,23	-0,92	0,74	0,38	1,00						
Sin	0,03	-0,27	-0,21	0,07	-0,67	0,53	-0,44	-0,65	0,70	-0,15	-0,76	0,23	-0,49	-0,02	0,96	0,92	-0,90	0,44	-0,63	0,22	-0,97	-0,97	-0,58	1,00					
Til	0,41	0,13	0,20	-0,14	-0,47	0,70	-0,16	-0,85	0,46	0,25	-0,94	0,04	-0,49	-0,25	0,83	0,70	-0,99	0,06	-0,31	0,58	-0,97	-0,80	-0,85	0,92	1,00				
Q	0,84	0,95	0,95	-0,53	0,72	0,14	0,70	-0,19	-0,72	0,93	-0,16	-0,42	0,23	-0,55	-0,59	-0,79	0,08	-0,93	0,87	0,70	0,34	0,69	-0,38	-0,51	-0,12	1,00			
K	-0,68	-0,56	-0,55	0,08	0,31	-0,90	-0,36	0,98	0,05	-0,61	0,87	0,42	0,62	0,22	-0,43	-0,33	0,84	0,43	-0,21	-0,89	0,79	0,43	0,99	-0,62	-0,86	-0,29	1,00		
p-kum	-0,62	-0,43	-0,45	0,13	0,36	-0,84	-0,17	0,96	-0,14	-0,51	0,93	0,25	0,57	0,26	-0,59	-0,47	0,93	0,27	-0,02	-0,81	0,87	0,57	0,97	-0,75	-0,94	-0,16	0,98	1,00	
TIC	0,65	0,90	0,81	-0,17	0,52	0,26	0,91	-0,19	-0,93	0,80	0,07	-0,70	-0,01	-0,19	-0,76	-0,81	0,27	-0,98	0,99	0,63	0,41	0,77	-0,28	-0,61	-0,27	0,92	-0,24	-0,06	1,00

Prilog 3. Pearsonovi koeficijenti korelacije između izmjerenih parametara fitokemijskog sastava, antioksidacijskog kapaciteta i stupnja inhibicije enzima α -amilaze, α -glukozidaze i lipaze za pojedine uzorke klijanaca cvjetače. Tamno otisnute vrijednosti značajne su na razini $p \leq 0,05$. *Opis kratica korištenih u tablici zbog veličine nalazi se na kraju ovog poglavlja.

	ABTS	FRAP	DPPH	Amil	Gluk	Lip	TP	TF	TFI	TC	SS	TT	TPA	Chl a	Chl b	Chl	Car	Porf	L-ask	Kaf	Kav	Gal	Fer	Sin	Til	Q	K	p-kum	TIC		
ABTS	1,00																														
FRAP	0,95	1,00																													
DPPH	0,90	0,99	1,00																												
Amil	0,22	0,26	0,36	1,00																											
Gluk	0,01	0,10	0,05	-0,86	1,00																										
Lip	0,73	0,74	0,79	0,83	-0,58	1,00																									
TP	0,71	0,85	0,83	-0,16	0,58	0,33	1,00																								
TF	-0,67	-0,87	-0,90	-0,11	-0,38	-0,50	-0,95	1,00																							
TFI	0,32	0,21	0,07	-0,84	0,76	-0,41	0,44	-0,14	1,00																						
TC	0,93	0,91	0,84	-0,13	0,39	0,44	0,87	-0,75	0,59	1,00																					
SS	-0,37	-0,62	-0,66	0,13	-0,61	-0,17	-0,90	0,92	-0,18	-0,56	1,00																				
TT	0,26	0,47	0,47	-0,47	0,85	-0,14	0,86	-0,79	0,47	0,56	-0,93	1,00																			
TPA	0,74	0,58	0,45	-0,44	0,44	0,09	0,56	-0,32	0,86	0,85	-0,16	0,32	1,00																		
Chl a	-0,85	-0,79	-0,69	0,32	-0,49	-0,26	-0,80	0,62	-0,76	-0,97	0,46	-0,54	-0,94	1,00																	
Chl b	-0,27	-0,56	-0,67	-0,44	-0,06	-0,52	-0,62	0,82	0,41	-0,26	0,81	-0,56	0,27	0,06	1,00																
Chl	-0,47	-0,73	-0,80	-0,34	-0,18	-0,56	-0,78	0,93	0,21	-0,49	0,89	-0,67	0,03	0,30	0,97	1,00															
Car	0,29	0,57	0,68	0,45	0,05	0,53	0,62	-0,82	-0,41	0,27	-0,81	0,56	-0,27	-0,07	-1,00	-0,97	1,00														
Porf	-0,53	-0,77	-0,85	-0,40	-0,12	-0,63	-0,78	0,93	0,22	-0,52	0,85	-0,62	0,00	0,33	0,96	1,00	-0,96	1,00													
L-ask	-0,64	-0,36	-0,24	0,08	0,13	-0,27	-0,07	-0,10	-0,53	-0,55	-0,38	0,29	-0,81	0,64	-0,56	-0,38	0,55	-0,31	1,00												
Kaf	0,97	0,98	0,97	0,40	-0,08	0,84	0,73	-0,77	0,11	0,86	-0,47	0,29	0,55	-0,73	-0,49	-0,64	0,50	-0,70	-0,46	1,00											
Kav	-0,73	-0,91	-0,95	-0,38	-0,11	-0,72	-0,85	0,96	0,07	-0,70	0,81	-0,59	-0,22	0,53	0,86	0,95	-0,86	0,97	-0,06	-0,86	1,00										
Gal	0,89	0,92	0,94	0,62	-0,30	0,95	0,59	-0,70	-0,14	0,70	-0,38	0,13	0,34	-0,54	-0,55	-0,66	0,56	-0,72	-0,36	0,97	-0,85	1,00									
Fer	-0,52	-0,77	-0,84	-0,35	-0,17	-0,59	-0,80	0,95	0,18	-0,53	0,88	-0,66	-0,01	0,35	0,96	1,00	-0,96	1,00	-0,32	-0,69	0,96	-0,70	1,00								
Sin	0,82	0,94	0,93	0,01	0,41	0,51	0,98	-0,96	0,34	0,90	-0,83	0,75	0,56	-0,81	-0,64	-0,81	0,64	-0,88	-0,16	0,85	-0,91	0,74	-0,83	1,00							
Til	0,77	0,89	0,94	0,64	-0,22	0,91	0,65	-0,81	-0,26	0,62	-0,56	0,28	0,16	-0,43	-0,76	-0,83	0,77	-0,88	-0,08	0,91	-0,94	0,96	-0,86	0,78	1,00						
Q	0,21	0,51	0,61	0,21	0,29	0,32	0,69	-0,85	-0,24	0,29	-0,91	0,73	-0,21	-0,13	-0,97	-0,96	0,97	-0,93	0,61	0,40	-0,82	0,41	-0,94	0,67	0,65	1,00					
K	0,58	0,76	0,85	0,70	-0,25	0,85	0,58	-0,79	-0,44	0,43	-0,60	0,29	-0,09	-0,21	-0,88	-0,90	0,89	-0,93	0,17	0,77	-0,92	0,86	-0,91	0,69	0,96	0,77	1,00				
p-kum	-0,27	-0,55	-0,66	-0,53	0,04	-0,58	-0,56	0,78	0,49	-0,22	0,75	-0,48	0,32	0,01	0,99	0,95	-1,00	0,95	-0,54	-0,49	0,85	-0,58	0,94	-0,60	-0,79	-0,94	-0,91	1,00			
TIC	0,75	0,92	0,93	0,13	0,35	0,56	0,96	-0,99	0,18	0,81	-0,88	0,75	0,40	-0,69	-0,77	-0,90	0,77	-0,91	-0,01	0,83	-0,97	0,76	-0,92	0,98	0,84	0,79	0,79	-0,74	1,00		

Prilog 4. Pearsonovi koeficijenti korelacije između izmjerenih parametara fitokemijskog sastava, antioksidacijskog kapaciteta i stupnja inhibicije enzima α -amilaze, α -glukozidaze i lipaze za pojedine uzorke klijanaca raštike. Tamno otisnute vrijednosti značajne su na razini $p \leq 0,05$. *Opis kratica korištenih u tablici zbog veličine nalazi se na kraju ovog poglavlja.

	ABTS	FRAP	DPPH	Amil	Gluk	Lip	TP	TF	TFI	TC	SS	TT	TPA	Chl a	Chl b	Chl	Car	Porf	L-ask	Kaf	Kav	Gal	Fer	Sin	Til	Q	K	p-kum	TIC	
ABTS	1,00																													
FRAP	0,03	1,00																												
DPPH	-0,34	0,91	1,00																											
Amil	-0,47	0,86	0,99	1,00																										
Gluk	0,57	-0,71	-0,93	-0,94	1,00																									
Lip	-0,83	0,30	0,52	0,63	-0,53	1,00																								
TP	0,89	0,46	0,12	-0,02	0,13	-0,67	1,00																							
TF	0,28	-0,52	-0,70	-0,67	0,85	-0,04	-0,11	1,00																						
TFI	0,96	-0,07	-0,39	-0,52	0,52	-0,94	0,85	0,12	1,00																					
TC	0,45	0,74	0,43	0,37	-0,06	0,10	0,63	0,17	0,23	1,00																				
SS	0,79	-0,48	-0,69	-0,78	0,68	-0,98	0,53	0,21	0,90	-0,19	1,00																			
TT	0,71	0,72	0,42	0,30	-0,15	-0,40	0,95	-0,26	0,64	0,76	0,24	1,00																		
TPA	0,74	-0,17	-0,53	-0,58	0,81	-0,39	0,47	0,82	0,58	0,53	0,46	0,31	1,00																	
Chl a	0,64	-0,11	-0,46	-0,49	0,75	-0,23	0,39	0,86	0,45	0,59	0,31	0,27	0,99	1,00																
Chl b	0,84	-0,48	-0,79	-0,86	0,91	-0,79	0,50	0,64	0,83	0,10	0,87	0,22	0,83	0,73	1,00															
Chl	0,81	-0,34	-0,69	-0,75	0,90	-0,59	0,49	0,78	0,71	0,34	0,67	0,26	0,96	0,91	0,95	1,00														
Car	-0,86	0,43	0,68	0,78	-0,73	0,97	-0,60	-0,29	-0,93	0,07	-0,99	-0,31	-0,58	-0,43	-0,92	-0,76	1,00													
Porf	0,90	-0,11	-0,50	-0,58	0,77	-0,60	0,67	0,66	0,78	0,52	0,64	0,49	0,96	0,91	0,90	0,97	-0,74	1,00												
L-ask	0,22	0,97	0,84	0,76	-0,63	0,08	0,63	-0,56	0,14	0,72	-0,28	0,84	-0,12	-0,09	-0,33	-0,25	0,23	0,00	1,00											
Kaf	0,09	0,94	0,79	0,75	-0,50	0,38	0,43	-0,20	-0,09	0,89	-0,52	0,68	0,10	0,19	-0,34	-0,12	0,43	0,09	0,88	1,00										
Kav	-0,24	0,96	0,99	0,97	-0,86	0,49	0,22	-0,62	-0,31	0,56	-0,66	0,52	-0,40	-0,32	-0,70	-0,58	0,63	-0,37	0,90	0,87	1,00									
Gal	-0,44	0,87	0,99	1,00	-0,96	0,58	0,02	-0,72	-0,47	0,35	-0,74	0,33	-0,60	-0,52	-0,85	-0,76	0,74	-0,59	0,78	0,73	0,97	1,00								
Fer	-0,41	0,90	0,99	1,00	-0,91	0,62	0,04	-0,62	-0,48	0,46	-0,77	0,36	-0,50	-0,40	-0,81	-0,68	0,76	-0,51	0,80	0,81	0,98	0,99	1,00							
Sin	0,99	-0,03	-0,38	-0,51	0,57	-0,89	0,87	0,23	0,99	0,35	0,85	0,67	0,69	0,57	0,85	0,78	-0,90	0,86	0,17	0,00	-0,29	-0,48	-0,46	1,00						
Til	0,03	0,50	0,32	0,34	-0,01	0,53	0,10	0,44	-0,23	0,83	-0,53	0,27	0,48	0,61	-0,08	0,23	0,40	0,32	0,37	0,76	0,43	0,28	0,42	-0,08	1,00					
Q	0,66	0,62	0,40	0,26	-0,24	-0,55	0,92	-0,49	0,69	0,50	0,37	0,94	0,08	0,00	0,18	0,11	-0,40	0,32	0,78	0,47	0,45	0,31	0,29	0,66	-0,07	1,00				
K	0,15	0,93	0,76	0,71	-0,46	0,33	0,48	-0,17	-0,03	0,92	-0,47	0,72	0,15	0,23	-0,29	-0,06	0,37	0,15	0,88	1,00	0,84	0,70	0,78	0,06	0,76	0,50	1,00			
p-kum	-0,80	0,55	0,83	0,90	-0,94	0,77	-0,43	-0,66	-0,79	-0,03	-0,86	-0,14	-0,81	-0,72	-1,00	-0,94	0,91	-0,87	0,41	0,41	0,76	0,89	0,86	-0,81	0,12	-0,11	0,36	1,00		
TIC	0,21	0,98	0,84	0,77	-0,62	0,11	0,62	-0,52	0,12	0,76	-0,30	0,84	-0,09	-0,06	-0,33	-0,23	0,25	0,02	1,00	0,91	0,90	0,78	0,81	0,16	0,42	0,76	0,91	0,41	1,00	

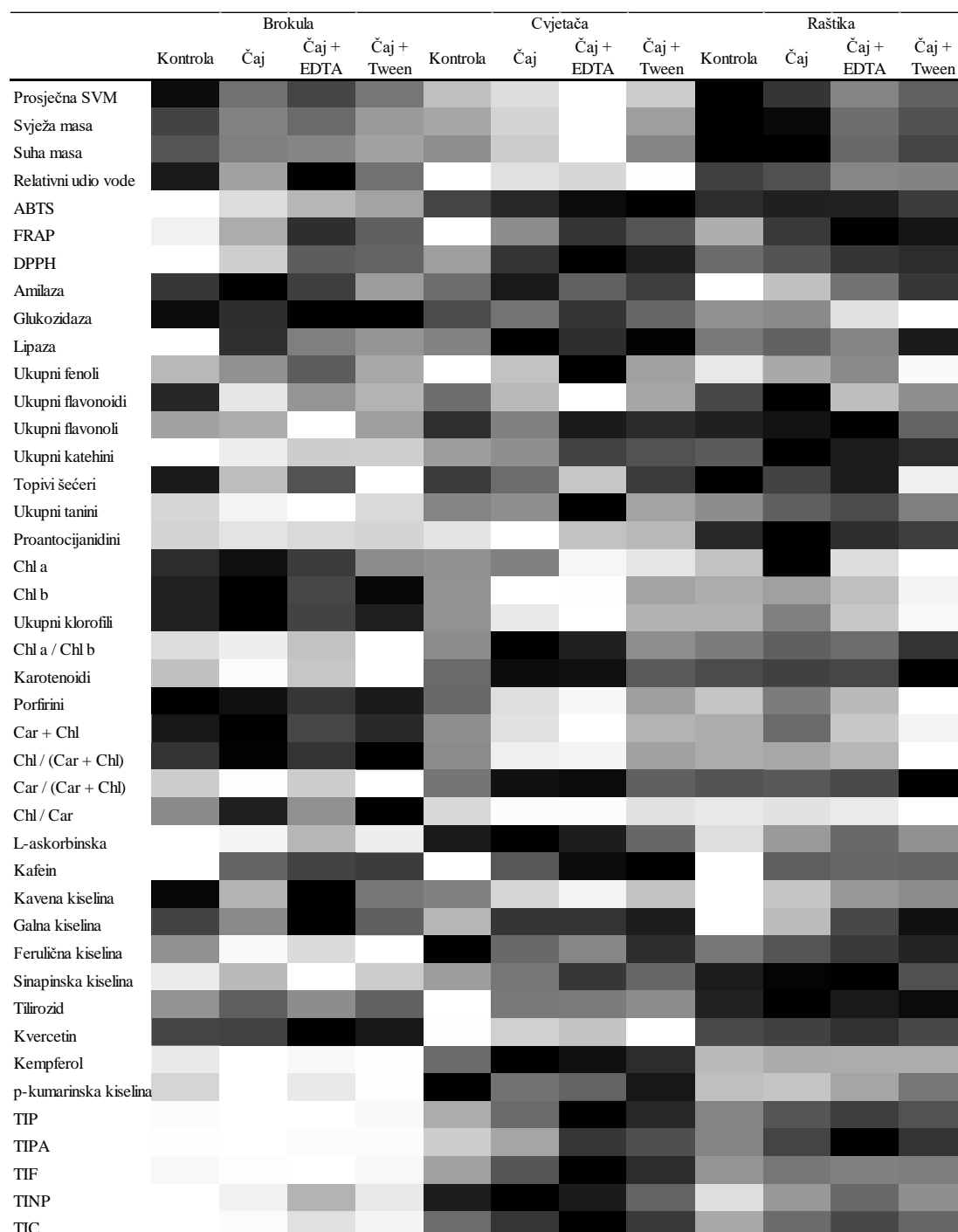
Prilog 5. Rezultati statističke obrade podataka (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$) između svih uzoraka klijanaca brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka označene su različitim slovom. *Opis kratica korištenih u tablici zbog veličine nalazi se na kraju ovog poglavlja.

		Prosječna SVM	Svježa masa	Suha masa	Relativni udio vode	ABTS	FRAP	DPPH	Amilaza	Glukozidaza	Lipaza	Ukupni fenoli	Ukupni flavonoidi	Ukupni flavonoli	Ukupni katehini	Topivi šećeri	Ukupni tanini	Proantocijanidini	Chl a	Chl b	Ukupni klorofili	Chl a / Chl b
Brokula	Kontrola	a	ab	abc	a	e	e	c	a	b	e	cd	ab	e	g	ab	ef	cd	abc	b	b	e
	Čaj	ab	abcd	abc	a	e	d	bc	a	a	abc	bc	fg	e	g	e	f	de	ab	a	a	e
	Čaj + EDTA	ab	abc	abc	a	d	ab	ab	a	a	cd	b	de	f	f	cd	f	cd	abcd	c	c	de
	Čaj + Tween	ab	bcd	abc	a	d	bc	ab	b	a	d	c	ef	e	f	f	ef	cd	abcd	a	b	e
Cvjetača	Kontrola	ab	bcd	abc	a	c	e	abc	b	b	cd	f	cd	b	e	bc	bcd	de	abcd	d	d	cd
	Čaj	ab	bc	bc	a	abc	cd	ab	a	c	a	cde	ef	d	e	d	cd	e	abcd	f	f	a
	Čaj + EDTA	b	c	c	a	ab	ab	a	b	a	abc	a	g	ab	cd	e	a	cd	cd	f	f	ab
	Čaj + Tween	ab	bcd	abc	a	a	bc	a	ab	c	a	c	def	b	d	bc	de	c	cd	de	e	cd
Raštika	Kontrola	a	a	a	a	bc	d	abc	b	a	cd	def	bc	b	e	a	cd	b	abcd	de	e	c
	Čaj	ab	a	a	a	abc	ab	ab	b	a	bcd	c	a	ab	a	c	bc	a	a	d	d	bc
	Čaj + EDTA	ab	abc	abc	a	abc	a	ab	a	b	cd	bc	ef	a	b	ab	b	b	bcd	e	e	bc
	Čaj + Tween	ab	abc	ab	a	c	a	a	a	c	ab	ef	de	c	bc	f	bcd	b	d	f	f	abc

Prilog 6. Rezultati statističke obrade podataka (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$) između svih uzoraka klijanaca brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween. Statistički značajno različite srednje vrijednosti između uzoraka označene su različitim slovom. *Opis kratica korištenih u tablici zbog veličine nalazi se na kraju ovog poglavlja.

		Karotenoidi	Porfirini	Car + Chl	Chl / (Car + Chl)	Car / (Car + Chl)	Chl / Car	L-askorbinska	Kafein	Kavena kiselina	Galna kiselina	Ferulična kiselina	Sinapinska kiselina	Tilirozid	Kvercetin	Kempferol	p-kumarinska kiselina	TIP	TIPA	TIF	TINP	TIC
Brokula	Kontrola	c	a	a	a	c	b	d	d	a	ab	e	f	d	b	d	def	c	c	c	g	d
	Čaj	c	ab	a	a	c	a	d	c	bcd	bc	f	def	bcd	b	d	f	c	c	c	g	d
	Čaj + EDTA	c	c	bc	a	c	b	bcd	b	a	a	f	f	d	a	d	ef	c	c	c	efg	d
	Čaj + Tween	c	b	ab	a	c	a	d	b	b	abc	f	ef	cd	ab	d	f	c	c	c	g	d
Cvjetača	Kontrola	b	d	de	b	b	b	a	d	b	cd	a	cdef	e	d	b	a	bc	bc	bc	abc	bc
	Čaj	a	g	gh	c	a	b	a	c	bcd	ab	cde	bcde	d	cd	a	b	ab	bc	ab	a	ab
	Čaj + EDTA	a	gh	h	c	a	b	a	a	cd	ab	e	abc	d	c	a	b	a	ab	a	ab	a
	Čaj + Tween	b	e	ef	b	b	b	b	a	bcd	a	abc	abcde	d	d	a	a	ab	ab	ab	bcd	ab
Raštika	Kontrola	ab	f	ef	b	b	b	cd	d	d	d	de	ab	abc	b	c	de	abc	abc	bc	fg	cd
	Čaj	ab	d	cd	b	b	b	bc	c	bcd	cd	bcde	a	a	b	c	de	ab	ab	ab	def	bc
	Čaj + EDTA	ab	f	fg	b	b	b	bc	c	bcd	ab	abcd	a	ab	ab	c	cd	ab	a	abc	cde	abc
	Čaj + Tween	a	h	gh	c	a	b	b	c	bc	a	ab	abcd	a	b	c	bc	ab	ab	abc	de	bc

Prilog 7. Usporedba rezultata izmjerenih parametara između svih uzoraka klijanaca brokule, cvjetače i raštike za kontrolni uzorak, uzorak tretiran čajem, uzorak tretiran čajem u kombinaciji s EDTA i uzorak tretiran čajem u kombinaciji s Tween, prikazani kao tzv. *heatmap*. *Opis kratica korištenih u tablici zbog veličine nalazi se na kraju ovog poglavlja.



Legenda:



*ABTS, FRAP i DPPH – metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta, TPA – ukupni proantocijanidini, TF – ukupni flavonoidi, TFl – ukupni flavonoli, TT – ukupni tanini, TP – ukupni fenoli, TC – ukupni katehini, SS – topivi šećeri, TIC – ukupni identificirani spojevi, TIP – ukupni identificirani fenolni spojevi, TIPA – ukupne identificirane fenolne kiseline, TIF – ukupni identificirani flavonoidi, TINP – ukupni identificirani nefenolni spojevi, Chl – ukupni klorofili, Chl a – klorofil *a*, Chl b – klorofil *b*, Chl a / Chl b – omjer klorofila *a* i *b*, Car – ukupni karotenoidi, Porf – ukupni porfirini, Gluk – postotak inhibicije α -glukozidaze, Amil – postotak inhibicije α -amilaze, Lip – postotak inhibicije lipaze, Q – kvercetin, Kav – kavena kiselina, Gal – galna kiselina, Kaf – kafein, L-ask – *L*-askorbinska kiselina, K – kempferol, p-kum – *p*-kumarinska kiselina, Fer – ferulična kiselina, Sin – sinapinska kiselina, Til – tilirozid, SVM – svježa masa.

10. SAŽETAK

**POVEĆANJE UČINKOVITOSTI MEĐUVRSNOG PRIJENOSA
SPOJEVA DESTABILIZACIJOM STANIČNE MEMBRANE S CILJEM
POBOLJŠANJA FITOKEMIJSKOG PROFILA I BIOPOTENCIJALA
KLIJANACA KUPUSNJAČA (BRASSICACEAE)**

Sve veća potražnja za hranom koja ima pozitivne učinke na ljudsko zdravlje povlači potrebu za razvojem strategija koje dovode do poboljšanja bioloških učinaka hrane. Međuvrsni prijenos spojeva pristup je kojim se spojevi iz biljke donora prenose u biljku akceptor. U ovom radu, klijanci brokule (*Brassica oleracea* var. *italica*), cvjetače (*B. oleracea* var. *botrytis*) i raštike (*B. oleracea* var. *acephala*) inkubirani su u ekstraktu čaja (*Camellia sinensis*) sa i bez permeabilizatora stanične membrane kako bi se istražilo mogućnost povećanja učinkovitosti prijenosa spojeva iz donora u biljku akceptor, a u svrhu dobivanja biljaka obogaćenih bioaktivnim spojevima i poboljšanih bioloških učinaka. Fitokemijski sastav klijanaca analiziran je primjenom spektrofotometrijskih metoda i metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja, a s ciljem analize biopotencijala klijanaca provedene su *in vitro* analize antioksidacijskog kapaciteta njihovih ekstrakata i sposobnosti inhibicije enzima α -amilaze, α -glukozidaze i lipaze povezanih s dijabetesom i pretilosti. Utvrđeno je da tretman čajem u kombinaciji s EDTA dovodi do najvećeg povećanja koncentracije fenolnih spojeva kod svih analiziranih klijanaca, s tim da je kod klijanaca cvjetače povećanje bilo najznačajnije. Obzirom na ostale analizirane parametre, uočena je iznimna vrsna specifičnost u prijenosu spojeva, što upućuje na ulogu fitokemijskog matriksa biljke akceptora u međuvrsnom prijenosu spojeva. Za klijance cvjetače tretirane čajem u kombinaciji s EDTA utvrđeno je povećanje sposobnosti inhibicije enzima α -glukozidaze u odnosu na kontrolnu skupinu, dok su najveće povećanje sposobnosti inhibicije enzima α -amilaze pokazali klijanci cvjetače tretirani čajem i klijanci raštike tretirani čajem u kombinaciji s Tween, odnosno EDTA, što naglašava potencijal

upotrebe permeabilizatora stanične membrane za učinkovitiji prijenos spojeva iz čaja koji pokazuju inhibitornu aktivnost prema enzimima koji se ciljaju u liječenju dijabetesa. Također, uočeno je povećanje antioksidacijskog potencijala klijanaca brokule, cvjetače i raštike nakon prijenosa spojeva iz čaja. Rezultati ukazuju na velik potencijal međuvrsnog prijenosa spojeva u stvaranju funkcionalne biljne hrane, te upućuju na potrebu daljnjih istraživanja različitih kombinacija akceptora i donora s ciljem dobivanja biljaka poboljšanog fitokemijskog profila i bioloških učinaka.

Ključne riječi: antioksidansi, čaj, kupusnjače, međuvrsni prijenos, permeabilizatori membrane

11. SUMMARY

**IMPROVING THE EFFICIENCY OF INTERSPECIFIC METABOLITE
TRANSFER BY DESTABILIZING THE CELL MEMBRANE FOR
IMPROVEMENT OF PHYTOCHEMICAL PROFILE AND
BIOPOTENTIAL OF BRASSICACEAE SPROUTS**

Demand for food that exerts positive effects on human health is growing, which entails the development of strategies for improving the biological effects of food. Interspecific metabolite transfer is an approach in which metabolites are transferred from donor to acceptor plants. In this study, sprouts of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), cauliflower (*B. oleracea* var. *botrytis*) and kale (*B. oleracea* var. *acephala*) were incubated in tea (*Camellia sinensis*) extract. To assess the possibility of improving the efficiency of interspecific transfer through the cell membrane by improving its permeability, acceptor plants were incubated with donor extracts in combination with EDTA or Tween detergent. Phytochemical composition of the sprouts was assessed using the spectrophotometric methods and high-performance liquid chromatography, and to assess the biopotential of the sprouts, *in vitro* antioxidative capacity assays and the inhibition assays of enzymes linked to diabetes and obesity, α -amylase, α -glucosidase and lipase, were carried out. It was revealed that the treatment with tea in combination with EDTA lead to the biggest improvement in concentration of total phenolics in all the tested sprouts, with the increase in cauliflower sprouts being the most significant. Regarding the other tested parameters, a remarkable species-specificity was revealed, which points out the role of acceptor plants phytochemical matrix in interspecific metabolite transfer. Improvement of inhibitory activity against α -glucosidase was demonstrated for cauliflower sprouts treated with tea extract in combination with EDTA, while the biggest improvement in α -amylase inhibitory activity was demonstrated for cauliflower sprouts treated with tea, and kale sprouts treated with tea in combination with EDTA and Tween. This emphasizes the potential of the cell membrane

permeabilizers to improve the transfer of compounds exerting inhibitory activity against enzymes targeted in diabetes treatment. Furthermore, an improvement in antioxidative properties of broccoli, cauliflower and kale sprouts was determined upon interspecific transfer of compounds from tea. Results point out a great potential of interspecific metabolite transfer in obtaining functional plant food, and emphasize the need for further investigation of different acceptor and donor combinations with the aim of obtaining plants of improved phytochemical profile and biological effects.

Key words: antioxidants, Brassicaceae, interspecific transfer, membrane permeabilization, tea