

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Emilie Kokić i Jana Zekirovski

**Utjecaj temperaturnog stresa na koncentraciju
bioaktivnih spojeva i biološke učinke ekstrakata
mladih biljaka brokule (*Brassica oleracea* L. convar.
botrytis (L.) Alef. var. *cymosa* Duch.)**

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za fitokemiju na Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Ivane Šola i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2021./2022.

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. MATERIJAL I METODE	10
2.1. Materijal.....	10
2.2. Određivanje udjela klorofila, karotenoida i porfirina	11
2.3. Određivanje udjela ukupnih fenola.....	12
2.4. Određivanje udjela ukupnih proantocijanidina.....	12
2.5. Određivanje udjela ukupnih flavonoida.....	13
2.6. Određivanje udjela ukupnih tanina	13
2.7. Određivanje udjela topivih šećera.....	14
2.8. Određivanje udjela ukupnih fenolnih kiselina	14
2.9. Određivanje udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola	15
2.10. Određivanje udjela ukupnih intaktnih glukozinolata.....	15
2.11. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom ABTS	16
2.12. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom FRAP	17
2.13. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom DPPH	17
2.14. Određivanje stupnja inhibicije enzima α -amilaze.....	18
2.15. Određivanje stupnja inhibicije enzima lipaze	19
2.16. Razdvajanje, identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih spojeva metodom HPLC	20
2.17. Statistička obrada podataka.....	21
3. REZULTATI.....	23
3.1. Utjecaj temperaturnog stresa na udio klorofila, likopena, karotenoida i porfirina u mladim biljkama brokule	23
3.2. Utjecaj temperaturnog stresa na udio ukupnih proantocijanidina u mladim biljkama brokule	25

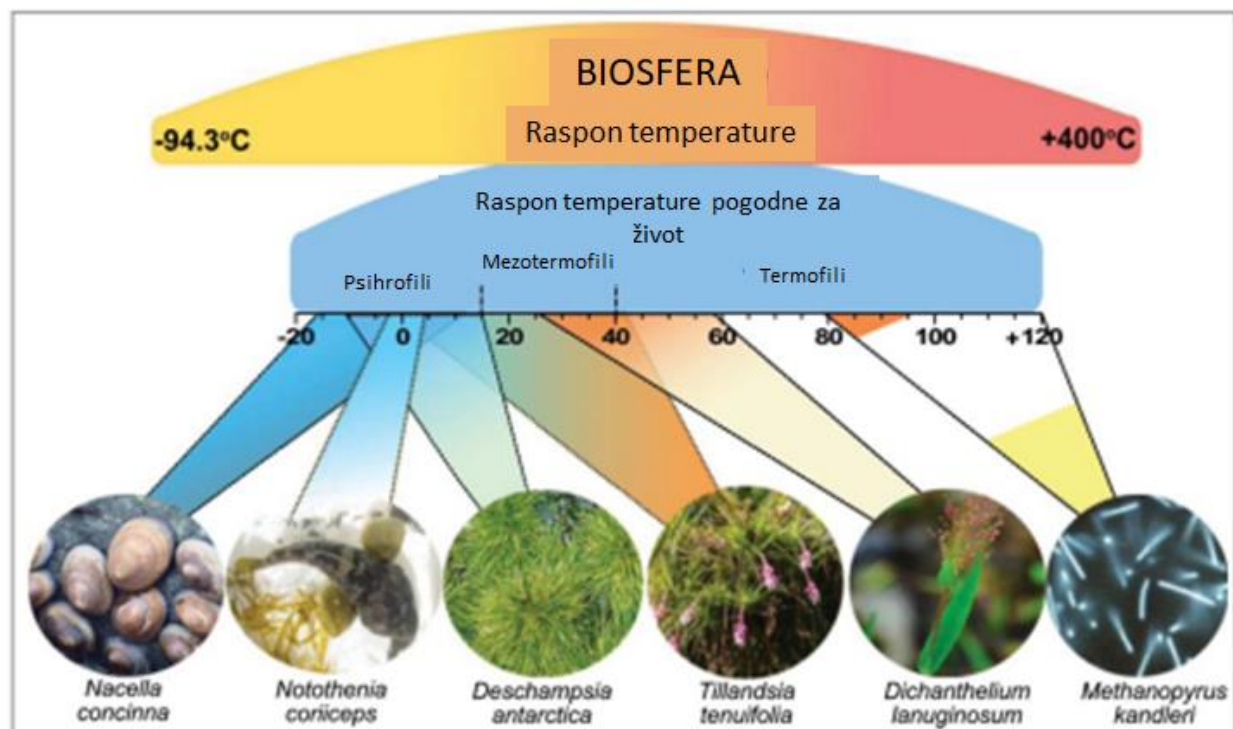
3.3. Utjecaj temperaturnog stresa na udio topivih šećera u mladim biljkama brokule	25
3.4. Utjecaj temperaturnog stresa na udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola u mladim biljkama brokule	26
3.5. Utjecaj temperaturnog stresa na udio ukupnih glukozinolata u mladim biljkama brokule ...	27
3.6. Utjecaj temperaturnog stresa na udio ukupnih fenola, flavonoida, tanina i fenolnih kiselina u mladim biljkama brokule	28
3.7. Razdvajanje, identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih spojeva u ekstraktima mladih biljaka brokule	29
3.8. Utjecaj temperaturnog stresa na koncentraciju vitamina C u mladim biljkama brokule	31
3.9. Utjecaj temperaturnog stresa na koncentraciju flavonoida kvercetina i kempferola u mladim biljkama brokule	31
3.10. Utjecaj temperaturnog stresa na koncentraciju <i>p</i> -kumarinske, ferulične i sinapinske kiseline u mladim biljkama brokule	32
3.11. Utjecaj temperaturnog stresa na antioksidacijski kapacitet mladih biljaka brokule	34
3.12. Utjecaj temperaturnog stresa na potencijal ekstrakata mladih biljaka brokule da inhibiraju enzim α -amilazu.....	35
3.13. Utjecaj temperaturnog stresa na potencijal ekstrakata mladih biljaka brokule da inhibiraju enzim lipazu	36
3.14. Odnos otpornih i susceptibilnih varijabli mladih biljaka brokule pod utjecajem temperaturnog stresa	37
3.15. Kemometrijske analize podataka	41
3.15.1. Analiza glavnih komponenti	41
3.15.2. Hijerarhijsko klasteriranje.....	42
3.15.3. Analiza Pearsonovih koeficijenata korelacije.....	43
4. RASPRAVA	45
5. ZAKLJUČAK	58

6. LITERATURA	59
7. SAŽETAK	60
8. SUMMARY	69

UVOD

1. UVOD

Temperatura predstavlja glavni čimbenik koji određuje geografsku distribuciju organizama (Hochachka i Somero, 2002). Toplinski raspon biosfere je širok te obuhvaća raspon temperature od $+400^{\circ}\text{C}$, na dnu oceana gdje djeluju hidrotermalni vjetrovi, do niske temperature od $-94,3^{\circ}\text{C}$, koju možemo naći u površinskom zraku iznad Antarktike (Scambos, pristupljeno u lipnju 2017. g.). Budući da ni jedan organizam nije tako dobro prilagođen da izdrži cijeli taj raspon temperature biosfere, život je ograničen na uži raspon, od -20°C do $+122^{\circ}\text{C}$ (Deming, 2002). Egzistencija biljaka ograničena je na temperaturni raspon od otprilike -10°C do $+60^{\circ}\text{C}$ (Fitter i Hay, 2002). Tako uski raspon temperature definiran je točkom smrzavanja unutarstanične tekućine i temperaturom denaturacije proteina (Zrobek Sokolnik, 2012). Važnost temperature kao fizičkog faktora koji djeluje na rasprostranjenost organizama vidimo po izravnom utjecaju na molekularnoj razini (promjena DNA, proteina, membrane i kromosoma) samih biljaka (Ruelland i Zachowski, 2010). Te prilagodbe na molekularnoj razini su brze, stoga se promjene temperature okoline mogu detektirati promatranjem specifičnih puteva biokemijskih i molekularnih odgovora kojima se biljke adaptiraju novonastalim uvjetima, te tako zauzimaju svoj položaj u toplinskoj niši (Knight, 2012). Na slici 1 prikazane su glavne toplinske niše biosfere.

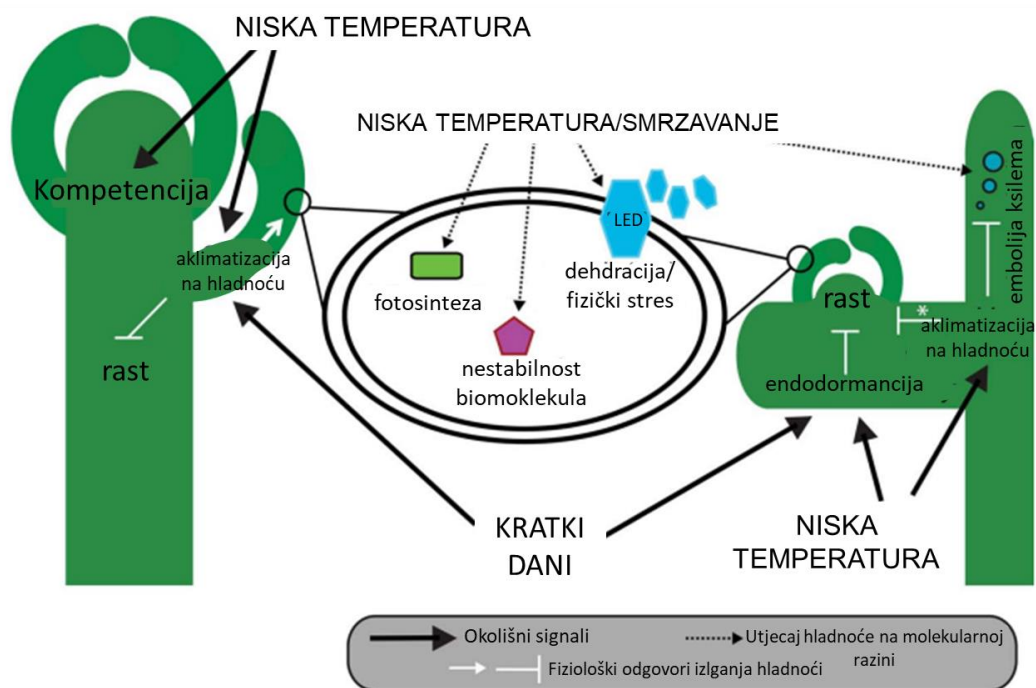


Slika 1. Shematski prikaz glavnih toplinskih niša biosfere. Gastropod *Nacella concinna* (Strebel, 1908), riba *Notothenia neglecta* Nybelin i vaskularna biljka *Deschampsia antarctica* E. Desv. prilagođene su ekstremno niskim temperaturnim uvjetima Antarktike. Bromelija *Tillandsia tenuifolia* L. prilagođena je toplinskoj amplitudi od 5°C do 46°C. Trava *Dichanthelium lanuginosum* (Elliott) Gould raste i razmnožava se u termofilnim tlima. Ekstremni termofilni mikroorganizam *Methanopyrus kandleri* Kurr i sur. (1992) nastanjuje geotermalna područja dubokog oceana. Preuzeto i prilagođeno iz Nievola i sur. (2017).

Izloženost biljaka niskim temperaturama jedan je od glavnih čimbenika okoliša koji utječe na njihov rast i razvoj (Janska i sur., 2010). Otprilike 57% svjetske površine tla i 26% ruralnih područja pogođeno je stresom uzrokovanim niskim temperaturama (Cramer i sur., 2011). Biljke koje su osjetljive na niske temperature mogu pretrpjeti oštećenja već pri temperaturama blizu 15°C, dok biljke koje su tolerantne preživljavaju na temperaturama malo ispod 5°C (Chen, 1994). Jedan od čestih tipova oštećenja uzrokovanih hlađenjem je smanjenje fotosintetske stope, budući

da hladnoća smanjuje stupanj prijenosa elektrona u tilakoidnim membranama i fiksaciju ugljika (Allen i Ort, 2001). Još jedan negativan učinak povezan s hladnoćom jest promjena u fluidnosti stanične membrane. Ovakav učinak također može biti uzrokovan i toplinom. Međutim, kod izlaganja membrane hladnoći, membrane postaju krute, dok kod povišene temperature postaju više tekuće (Buchanan i sur., 2015). Niske temperature, kao i toplina, mogu smanjiti apsorpciju vode u biljkama zbog smanjenja njihovog vodnog potencijala, što može dovesti do dehidracije (Ruelland i sur., 2009). Biljne vrste aklimatiziraju se tako što sintetiziraju krioprotektivne molekule kao što su topivi šećeri (saharoza, rafinoza, inozitol), šećerni alkoholi (sorbitol, ribitol, inozitol) i niskoenergetski dušikovi spojevi (glicin, prolin betain) (Janska i sur., 2009). Krioprotektivne otopljene tvari uključene su u održavanje hidrofobnih interakcija, homeostazi iona i zaštiti membranske plazme od adhezija leda (Iba, 2002). Povećanje aktivnosti antioksidacijskih enzima, kao što su superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza, askorbat peroksidaza i katalaza, te prisutnost neenzimatskih antioksidansa, kao što su tripeptidtriol, glutation, askorbinska kiselina (vitamin C) i alfa tokoferol (vitamin E), imaju važnu ulogu u aklimatizaciji na hladnoću i u održavanju stanične redoks homeostaze (Chen i Li, 2002). Aklimatizacija na hladno također utječe na sastav lipida u stanicama povećavajući udio nezasićenih masnih kiselina koje izgrađuju fosfolipide, što je neophodno za održavanje funkcionalnosti membranske plazme (Rajashekar, 2000.; De Palma i sur., 2008). Neke biljke prilagođavaju svoje djelovanje protiv smrzavanja pomoću kalcijevih iona, koji se ili oslobađa iz pektina ili veže na specifične proteine i pospješuje sintezu proteina koji inhibiraju aktivnost leda kao odgovor na stres uzrokovan hladnoćom (Moffatt i sur., 2006; Janska i sur., 2009). Danas zbog sve češćih ekstremnih promjena temperature, postoji potreba za razvojem usjeva koji su tolerantni na djelovanje temperaturnog

stresa (Foyer i Noctor, 2003). Na slici 2 prikazan je utjecaj hladnoće na fenotip zeljastih i drvenastih biljaka.

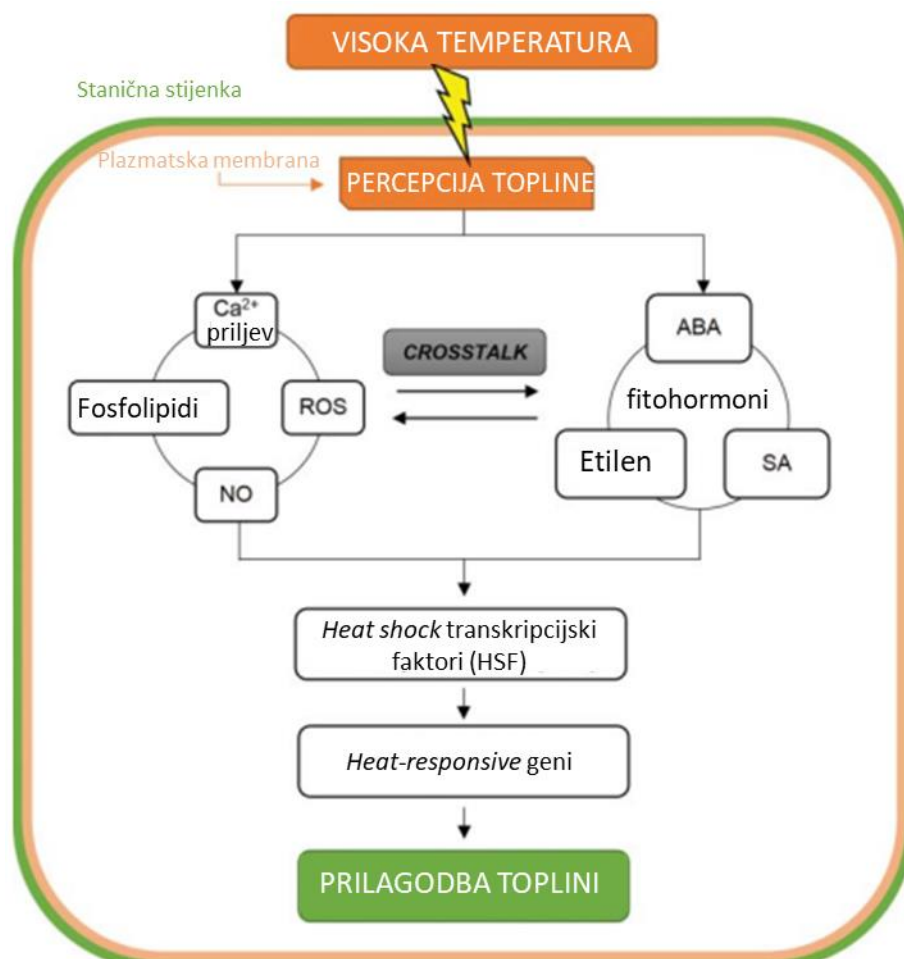


Slika 2. Utjecaj hladnoće na fenotip biljke. U zeljastim biljkama (lijevo) kao što su *A. thaliana* i pšenica, hladne jesenske temperature izazivaju hladnoću te se aklimatizacija uglavnom događa u mladom lišću, kao i stjecanje cvjetne kompetencije u vršnom meristemu izdanka. U *A. thaliana* također je izazvana aklimatizacija na hladnoću kratkim danima, a rezultira smanjenjem stope rasta i povećanjem tolerancije na smrzavanje unutar stanica (sredina). Kod drvenastih biljaka (desno) kao što su borovi i breza, endodormancija može biti inducirana već krajem ljeta i rezultira potpunim prestankom meristemske mitoze. Kao i kod zeljastih biljaka, niske temperature dovode do aklimatizacije na hladnoću i postupnog povećanja tolerancije na smrzavanje ponekad (npr. listopadnih stabala), ali ne uvijek (npr. zimzelena stabla) što rezultira smanjenjem u rastu cijele biljke. Na staničnoj razini, tolerancija na smrzavanje proizlazi iz sposobnost stanica da se nose s dehidracijom, stvaranjem kristala leda, ali dovodi i do nestabilnosti biomolekula i poremećaja fotosinteze. Na razini cijele biljke, neke drvenaste vrste otporne na smrzavanje mogu se nositi s povećanom ksilemskom embolijom koja je posljedica mjehurića koji nastaju kada se otopljeni

plinovi oslobode iz smrznutog soka ksilema. Zvijezdica označava razlike na razini vrste u prilagodbi rasta na hladnoću. Preuzeto i prilagođeno iz Preston i Sandve (2013).

Budući da globalna temperatura raste iz godine u godinu, postavlja se pitanje utjecaja toplinskog stresa na prinos, te bioaktivne spojeve biljke i posljedično biološke učinke njenih ekstrakata. Istraživanja provedena na raznim biljnim vrstama kao što su pšenica, riža, kukuruz, čili paprika, bamija, duhan i soja pokazala su da toplinski stres djeluje na biljke na razne, većinom negativne načine. Kod pšenice, na primjer, dolazi do smanjenja mase i prinosa zrna nakon 20 dana izlaganja dnevnoj temperaturi od 37°C i noćnoj temperaturi od 28°C (Rahman i sur., 2009). Kod kukuruza izloženog 14 dana dnevnim temperaturama od 38°C i noćnim od 28°C dolazi do oštećenja plazmatskih membrana, membrana kloroplasta i tilakoidnih membrana, te membrane mitohondrija (Suwa i sur., 2010). Kod duhana koji je čuvan na temperaturi od 43°C 2 sata u ranim stadijima rasta uočeno je smanjenje neto stope fotosinteze kao i smanjenje antioksidativne aktivnosti (Gunawardhana i de Silva, 2011). Kod bamije pri temperaturama između 32°C i 34°C kroz period rasta uočena je promjena u vidu smanjenja prinosa kao i u parametrima koji određuju kvalitetu mahune kao što je sadržaj vlakana (Edreira i Otegui, 2012). Također, zbog globalnih klimatskih promijena sve su češći šokovi niskom temperaturom, koji također mogu imati štetan utjecaj na biljke. Jedan takav primjer je kelj. U radu Hagen i sur. (2009) kelj je bio izložen i pohranjen na temperaturi od 1°C u trajanju od 3 i 6 tjedana na polju tijekom zimskih dana. Izlaganje kelja hladnoj temperaturi značajno je smanjilo udio vitamina C i topivih šećera. Najveće promjene u sadržaju bioaktivnih spojeva uočene su u biljkama koje su ostale na polju do 6 tjedana, pri čemu su bile najduže izložene utjecaju mraza. U tim biljkama razina ukupnih fenola, flavonola i antioksidacijski kapacitet smanjeni su za 25-35%, a udio vitamina C za više od 50%, dok su

topivi šećeri i suhe tvari povećani za 20-30%. Na slici 3 prikazane su komponente signalnog puta za aktivaciju mehanizama prilagodbe biljaka na toplinski stres.



Slika 3. Shematski prikaz percepcije visoke temperature od strane biljne stanice i komponenti signalnog puta za aktivaciju mehanizama prilagodbe na toplinski stres.

*ABA: abscizinska kiselina, Ca^{2+} : kalcij, NO: dušikov oksid, ROS: reaktivne kisikove vrste, SA: salicilna kiselina. Preuzeto i prilagođeno iz Nievola i sur. (2017).

Brokula (*Brassica oleracea* L. convar. *botrytis* (L.) Alef. var. *cymosa* Duch.) je dobro poznati varijetet iz porodice kupusnjača (*Brassicaceae*) koji se uzgaja i konzumira diljem svijeta, a stopa proizvodnje joj stalno raste (Rybarczyk-Plonska i sur., 2016). Sadrži visok udio bioaktivnih spojeva kao što su glukozinati, fenoli, vitamini i esencijalni elementi (Rakow, 2004). Upravo ti bioaktivni spojevi čine ju značajnom u prehrani te se može koristiti od stadija klijanca sve do odrasle biljke i preporuča ju se kao jednu od najzdravijih namirnica. Naime, epidemiološke studije dokazuju da je konzumacija povrća iz roda *Brassica*, uključujući brokulu, povezana sa smanjenim rizikom smrtnosti od nekoliko vrsta raka i kardiovaskularnih bolesti (Liu i Lv, 2013). Osim toga, njeni ekstrakti pokazuju protuupalno, antibakterijsko i antivirusno djelovanje (Bednarek i Osburn, 2009).

Fenolni spojevi specijalizirani su biljni metaboliti, a obuhvaćaju fenolne kiseline, flavonoide, tanine i hidroksicimetne kiseline (Cartea i sur., 2011). Čine jednu od najbrojnijih skupina spojeva u prirodi te ih je do danas poznato oko 8000. Kvantitativno najzastupljeniji polifenolni spojevi u brokuli su flavonoli i to derivati kempferola i kvercetina (Wu i sur., 2019). Fenolni spojevi u biljkama djeluju kao signalne molekule, sudjeluju u hormonskoj regulaciji, zaštiti od infekcija, ali djeluju i kao zaštitni agensi od UV zračenja. Ti spojevi važni su zbog svog antioksidacijskog djelovanja, odnosno služe za hvatanje slobodnih radikala što u konačnici ima pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje.

Glukozinolati su složena skupina spojeva tioglukozidne strukture koja je svojstvena biljkama iz porodice *Brassicaceae*. Glavna uloga glukozinolata u biljci je obrana od insekata i patogena (Radojčić Redovniković i sur., 2016). Oštećenjem tkiva glukozinolati dolaze u kontakt s mirozinazom koja dovodi do njihove razgradnje (Grubb i Abel, 2006.). Postoji nekoliko krajnjih produkata hidrolize glukozinolata, uključujući izotiocijanate, tiocijanate, nitrile, epitionitrile i

oksazolidine, čiji je konačni sastav određen raznim kemijskim uvjetima (Bones i Rossiter, 2006.). Sustav glukozinolat-mirozinaza igra važnu ulogu u obrani biljke, npr. neki produkti razgradnje glukozinolata su otrovni i odbijaju biljojede i patogene, ali i isto tako postoje i produkti koji posreduju u interakciji između biljaka i adaptiranih biljojeda (Björkman i sur., 2011). Glukozinolati također doprinose okusu i mirisu povrća roda *Brassica* (Schonhof i sur., 2004).

CILJ RADA

Cilj ovog istraživanja bio je proučiti utjecaj temperaturnog stresa na koncentraciju bioaktivnih spojeva i biološke učinke ekstrakata mladih biljaka brokule (stadij razvoja sa 6-8 pravih listova) kako bi se definiralo otporne i susceptibilne varijable, te izdvojilo one koje bi se potencijalno moglo koristiti kao biomarkere određenog tipa stresa u brokuli. Također, diskutirale smo mogućnost primjene određenog tipa stresa za uzgoj brokula obogaćenih spojevima od interesa za ljudsko zdravlje.

Proučavana su dva tipa temperaturnog stresa: tretman ledenom vodom (led je nanošen na supstrat u teglicama u kojima je brokula uzgajana) i tretman vrućom vodom (supstrat je zalijevan vodom temperature 80°C). Kontrolna skupina zalijevana je istim volumenom vode sobne temperature.

Parametri koje smo istraživale su: udio ukupnih fenola, flavonoida, flavonola, tanina, proantocijadinina, fenolnih kiselina, hidroksicimetnih kiselina, topivih šećera, glukozinolata, klorofila *a* i *b*, karotenoida, likopena, porfirina, koncentracija vitamina C, flavonoida kvercetina i kempferola, fenolnih kiselina *p*-kumarinske, ferulične i sinapinske, antioksidacijski kapacitet metodama ABTS, DPPH i FRAP, te sposobnost ekstrakata brokule da inhibiraju aktivnost enzima α -amilaza i lipaza.

MATERIJAL I METODE

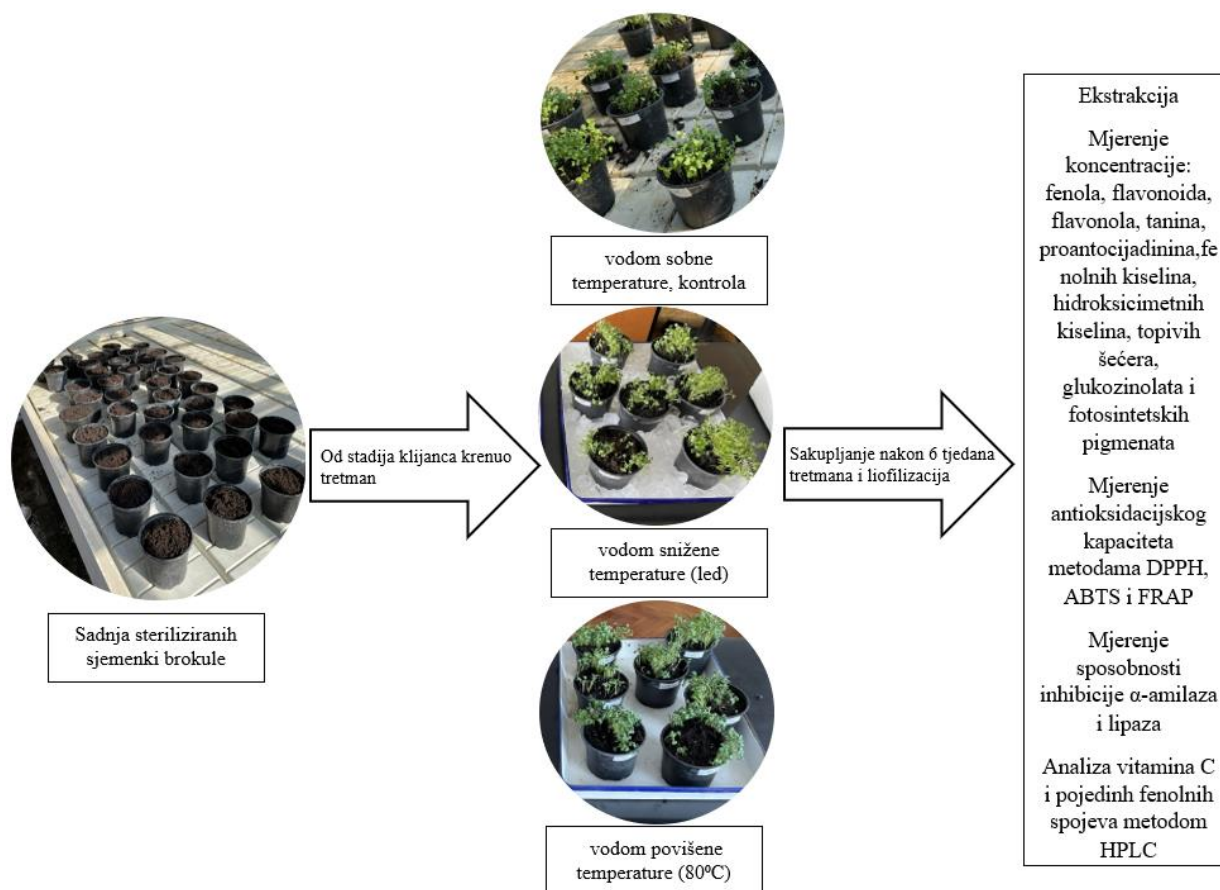
2. MATERIJAL I METODE

2.1. Materijal

Sjemenke brokule (*Brassica oleracea* L. convar. *botrytis* (L.) Alef. var. *cymosa* Duch.) kupljene su od ISP International Seeds Processing GmbH (Quedlinburg, Njemačka), te su na sterilnom supstratu uzgojene biljke do stadija s 2 prava lista (slika 4). Nakon toga biljke su podvrgnute tretmanu ledenom vodom (led je nanošen na supstrat u teglicama u kojima je brokula uzgajana) i tretmanu vrućom vodom (supstrat je zalijevan vodom temperature 80°C) sve do stadija razvoja sa 6-8 pravih listova. Kontrolna skupina biljaka zalijevana je vodom sobne temperature. Nakon sakupljanja nadzemnog dijela biljaka, isti je odmah zamrznut u tekućem dušiku i potom liofiliziran. Nakon liofilizacije biljni materijal je homogeniziran do stupnja praha te su pripremljeni ekstrakti različitih koncentracija u različitim otapalima, ovisno o metodi analize; koncentracije i otapala navedeni su kasnije u svakoj od metoda (slika 5). Materijal je obuhvaćao 3 biološke replike i od svake biološke odvagano je po 3 tehničke replike.



Slika 4. Fenotip A) kontrolne skupine biljaka, B) biljaka tretiranih vrućom vodom i C) biljaka tretiranih ledenom vodom.



Slika 5. Shematski prikaz eksperimenta.

2.2. Određivanje udjela klorofila, karotenoida i porfirina

Koncentracija pigmenta određena je prema metodi Sumanta i sur. (2014). Pripremile smo ekstrakt koncentracije 15 mg/mL u 80%-tnom acetonu. Smjesu smo promiješale na vrtložnoj miješalici i potom odcentrifugirale na temperaturi od 4°C pri 13000 rpm, 5 min. Supernatant smo odvojile u epruvetu, a talog još dva puta ekstrahirale 80%-tnim acetonom. Apsorbancije smo nakon toga izmjerile na spektrofotometru (Thermo Scientific Nanodrop 2000c) pri valnim duljinama od 470, 575, 590, 628, 647 i 663 nm.

2.3. Određivanje udjela ukupnih fenola

Za određivanje udjela ukupnih fenolnih spojeva pripremile smo ekstrakte koncentracije 20 mg/mL u 70%-tnom etanolu. Na 10 uL ekstrakta dodale smo 790 uL deionizirane vode i 50 uL Folin-Ciocalteu reagensa. Kao kontrola poslužila je ista otopina s 10 uL 70%-tnog etanola umjesto ekstrakta. Nakon kratkog miješanja na vrtložnoj miješalici dodale smo 150 uL Na₂CO₃ (1.88 M). Nakon 30 minuta inkubacije pri 45°C izmjerena je apsorbancija na optičkom čitaču mikropločica (Fluostar Optima) pri valnoj duljini od 765 nm. Za pripremu kalibracijskog pravca korištena je galna kiselina koncentracija u rasponu od 0,5-2,5 mg/mL. Rezultati su prikazani kao miligrami ekvivalenta galne kiseline u gramu suhe mase (mg EGK/g sm) uzorka.

2.4. Određivanje udjela ukupnih proantocijanidina

Ekstraktima koncentracije 20 mg/mL pripremljenim u 70%-tnom etanolu (25 uL) dodano je 150 uL 4%-tnog vanilina otopljenog u koncentriranom metanolu te je dodano 75 uL koncentrirane klorovodične kiseline. Kao kontrola poslužila je ista otopina s 25 uL etanola umjesto ekstrakta. Kao standard korišten je cijanidin klorid. Nakon toga slijedilo je miješanje na vrtložnoj miješalici te inkubacija od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je na čitaču mikropločica izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 500 nm. Za pripremu kalibracijskog pravca korištena je otopina cijanidin klorida koncentracija u rasponu od 0,025 -1 mg/mL. Rezultati su prikazani kao miligrami ekvivalenta cijanidin klorida u gramu suhe mase (mg ECN/g sm) uzorka.

2.5. Određivanje udjela ukupnih flavonoida

U 70 μL etanolnog ekstrakta dodano je 280 μL deionizirane vode i 21 μL 5%-tne vodene otopine NaNO_2 . Nakon toga je otopina promiješana na vrtložnoj miješalici te je nakon inkubacije od 5 min na sobnoj temperaturi u nju dodano 21 μL 10%-tne vodene otopine AlCl_3 . Nakon toga je otopina ponovo promiješana na vrtložnoj miješalici te je nakon inkubacije od 6 min na sobnoj temperaturi u nju dodano 140 μL 1M vodene otopine NaOH i 168 μL deionizirane vode. Otopina je promiješana na vrtložnoj miješalici te je na čitaču mikropločica izmjerena apsorbanacija pri valnoj duljini od 510 nm. Kao kontrola umjesto ekstrakta korišten je 70%-tni etanol, a za pripremu kalibracijskog pravca korištena je otopina kvercetina koncentracija u rasponu od 0,00625-0,5 mg/mL. Rezultati su prikazani kao miligrami ekvivalenta kvercetina u gramu suhe mase (mg EQ/g sm) uzorka.

2.6. Određivanje udjela ukupnih tanina

U 100 μL etanolnog ekstrakta dodano je 8.4 mL deionizirane vode, 500 μL Folin-Ciocalteu reagensa, 1 mL 3.5%-tne vodene otopine Na_2CO_3 . Kao kontrola korišteno je 100 μL 70%-tnog etanola umjesto ekstrakta. Nakon toga je otopina promiješana na vrtložnoj miješalici te stavljena na inkubaciju od 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Na čitaču mikropločica izmjerena je apsorbanacija pri valnoj duljini od 700 nm. Za pripremu kalibracijskog pravca korištene su otopine katehina koncentracija u rasponu od 0,00625-0,5 mg/mL. Rezultati su prikazani kao miligrami ekvivalenta katehina u gramu suhe mase (mg KAT/g sm) uzorka.

2.7. Određivanje udjela topivih šećera

Etanolni ekstrakt razrijeđen je do koncentracije od 1.0 mg/mL. Zatim je na 200 μ L razrijeđenog ekstrakta dodano 100 μ L 5%-tne vodene otopine fenola i 500 μ L koncentrirane sumporne kiseline. Za kontrolu je korišteno 200 μ L 70%-tnog etanola umjesto ekstrakta. Nakon toga je otopina promiješana na vrtložnoj miješalici te stavljena na inkubaciju od 10 minuta nakon koje je ponovno promiješana na vrtložnoj miješalici te stavljena u vodenu kupelj na temperaturu od 30°C na 20 minuta. Apsorbancija je izmjerena na čitaču mikropločica pri valnim duljinama od 480, 485 i 490 nm. Za pripremu kalibracijskog pravca korištena je otopina sahraoze koncentracija u rasponu od 0,0390625-10 mg/mL. Rezultati su prikazani kao miligrami ekvivalenta sahraoze u gramu suhe mase (mg SA/g sm) uzorka.

2.8. Određivanje udjela ukupnih fenolnih kiselina

Volumenu od 100 μ L etanolnog ekstrakta dodaje se 200 μ L 0.5M klorovodične kiseline, 200 μ L Arnou reagensa, 200 μ L NaOH i 210 μ L deionizirane vode. Otopina je zatim promiješana na vrtložnoj miješalici te joj je izmjerena apsorbancija na čitaču mikropločica pri valnim duljinama od 495 i 505 nm. Kao kontrola koristi se 100 μ L 70%-tnog etanola umjesto ekstrakta, a kao standard korištena je kavena kiselina. Za pripremu kalibracijskog pravca korištena je kavena kiselina koncentracija u rasponu od 0,025-1 mg/mL. Rezultati su prikazani kao miligrami ekvivalenta kavene kiseline u gramu suhe mase (mg Ca/g sm) uzorka.

2.9. Određivanje udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Na volumen od 25 μL etanolnog ekstrakta koncentracije 20 mg/mL dodano je 25 μL klorovodične kiseline otopljene u 96%-tnom etanolu pri koncentraciji 1g/L i 455 μL klorovodične kiseline otopljene u vodi pri koncentraciji 2g/L. Kao kontrola umjesto ekstrakta korišteno je 25 μL 70%-tnog etanola. Nakon toga je otopina promiješana na vrtložnoj miješalici te joj je na čitaču mikropločica izmjerena apsorbanacija pri valnim duljinama od 320 nm za hidroksicimetne kiseline i 360 nm za flavonole. Za pripremu kalibracijskog pravca korištena je otopina kavene kiseline koncentracija u intervalu od 0,05-0,7 mg/mL za hidroksicimetne kiseline, te otopina kvercetina koncentracija u rasponu od 0,00626-0,1 mg/mL za za flavonole. Rezultati su prikazani kao miligrami ekvivalenta kavene kiseline u gramu suhe mase (mg CA/g sm) uzorka za hidroksicimetne kiseline i kao miligrami ekvivalenta kvercetina u gramu suhe mase (mg Q/g sm) uzorka za flavonole.

2.10. Određivanje udjela ukupnih intaktnih glukozinolata

Za određivanje udjela ukupnih intaktnih glukozinolata ekstrakte smo pripremile u vrućem 70%-tnom metanolu. Nakon inkubacije od 2 minute na 90°C otopinu 5 minuta centrifugiramo pri 13000 rpm te uzimamo supernatant. Na 30 μL supernatanta dodajemo 900 μL vodene otopine Na_2PdCl_4 koncentracije 2 mM; kao kontrolu umjesto ekstrakta dodajemo metanol. Nakon toga smjesu promiješamo na vrtložnoj miješalici i ostavljamo inkubirati 60 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbanciju mjerimo na čitaču mikropločica pri valnoj duljini od 425 nm. Kao standard korištena je vodena otopina sinigrina u intervalu koncentracije od 0,01-0,1 mg/mL.

Rezultati su prikazani kao miligrami ekvivalenta sinirgina u gramu suhe mase (mg SG/g sm) uzorka.

2.11. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom ABTS

ABTS (*2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*) radikal potrebno je pripremiti 12 sati ranije na sljedeći način: 88 μ L vodene otopine K_2SO_4 koncentracije 140 mM nadopuniti do 5 mL otopinom ABTS koncentracije 7mM pripremljenom u fosfatnom puferu. Neposredno prije korištenja, apsorbanciju ABTS reagensa pri valnoj duljini od 734 nm prilagođavamo dodavanjem etanola na vrijednost od 0.7 \pm 0.02. Nakon toga se na 10 μ L ekstrakta dodaje 1 mL ABTS reagensa, otopina se promiješa na vrtložnoj miješalici i ostavi inkubirati 6 minuta u mraku. Konačna apsorbancija uzorka očitava se pri valnoj duljini od 734 nm na čitaču mikropločica. Kao kontrola korišteno je 10 μ L 70%-tnog etanola umjesto ekstrakta. Za izradu kalibracijskog pravca korištena je vodena otopina troloxa u intervalu koncentracije od 0,04-0,6 mg/mL. Rezultati su prikazani kao postotak inhibicije izračunat prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = ((\text{Abs K} - \text{Abs U}) / \text{Abs K}) * 100$$

pri čemu je:

Abs K = apsorbancija kontrole

Abs U = apsorbancija uzorka

2.12. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom FRAP

FRAP (*ferric reducing antioxidant power*) reagens priprema se miješanjem 300 mM acetatnog pufera pH 3.6, otopine TPTZ (10 mM u 40 mM kloridnoj kiselini) i 20 mM vodene otopine FeCl₃ u omjeru 10:1:1. Nakon toga se u 35 µL ekstrakta dodaje 665 µL FRAP reagensa. Zatim se otopina promiješa na vrtložnoj miješalici te se inkubira 4 minute. Kao kontrola, umjesto ekstrakta, korišteno je 35 µL 70%-tnog etanola. Za izradu kalibracijskog pravca korištena je vodena otopina troloxa u intervalu koncentracije od 0,005-0,3 mg/mL. Rezultati su prikazani kao postotak inhibicije izračunat prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = ((\text{Abs U} - \text{Abs K}) / \text{Abs U}) * 100$$

pri čemu je:

Abs U = apsorbancija uzorka

Abs K = apsorbancija kontrole.

2.13. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom DPPH

Otopinu DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) koncentracije 0.1 mM pripremile smo u etanolu, te dodale 665 µL te otopine na 35 µL ekstrakta. Nakon toga otopinu smo promiješale na vrtložnoj miješalici te stavile inkubirati 30 minuta u mraku. Zatim smo otopini mjerile apsorbanciju na čitaču mikropločica pri valnoj duljini od 517 nm. Kao kontrolu koristile smo 35 µL 70%-tnog etanola umjesto ekstrakta. Kao standard korištena je vodena otopina troloxa u intervalu

koncentracije od 0,005-0,16 mg/mL. Rezultati su prikazani kao postotak inhibicije izračunat prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = ((\text{Abs K} - \text{Abs U}) / \text{Abs K}) * 100$$

pri čemu je:

Abs K = apsorbancija kontrole

Abs U = apsorbancija uzorka.

2.14. Određivanje stupnja inhibicije enzima α -amilaze

Protokol koji smo koristile za određivanje stupnja inhibicije aktivnosti enzima α -amilaze prilagodile smo prema radovima Nampoothiri i sur. (2011) i Nyambe-Silavwe i sur. (2015). U 30 μ L etanolnog ekstrakta dodale smo 30 μ L otopine α -amilaze koncentracije 4 U/mL (α -amilaza otopljena je u 0.02 M natrij-fosfatnom puferu pH vrijednosti 6.9). Nakon toga se otopina promiješa na vrtložnoj miješalici i stavlja inkubirati 10 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim se dodaje 30 μ L otopine 1%-tnog škroba u 0.02 mM natrij-fosfatnom puferu pH 6.9, te se ponovno miješa na vrtložnoj miješalici i stavlja inkubirati 10 minuta na sobnoj temperaturi. Kako bi se zaustavilo reakciju, dodaje se 60 μ L DNS (3,5-dinitrisalicilna kiselina) reagensa te se otopinu stavlja inkubirati 10 minuta u kipućoj vodi. Nakon toga se hladi na sobnoj temperaturi te se dodaje 600 μ L deionizirane vode i promiješa na vrtložnoj miješalici. Na kraju smo uzorcima izmjerile apsorbanciju na čitaču mikropločica pri valnoj duljini od 540 nm. Kao kontrolu koristile smo 30 μ L 70%-tnog etanola umjesto ekstrakta. Kao pozitivna kontrola korištena je vodena otopina

maltoze koncentracije 20 mg/mL. Rezultati su prikazani kao postotak inhibicije izračunat prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = 1 - ((\text{Abs U} - \text{Abs}_{\text{U-A}}) / (\text{Abs K} - \text{Abs}_{\text{K-A}}))$$

pri čemu je:

Abs U = apsorbancija uzorka

Abs K = apsorbancija kontrole

Abs A = apsorbancija standarda (u ovom slučaju akarboza).

2.15. Određivanje stupnja inhibicije enzima lipaze

Protokol koji smo koristile za određivanje stupnja inhibicije aktivnosti enzima lipaze prilagodile smo prema radu Spínola i sur. (2019). U 40 μL etanolnog ekstrakta dodaje se 20 μL supstrata pripremljenog od 10 mM otopine *p*-nitrofenil-butirata u apsolutnom etanolu i 40 μL enzima lipaze koncentracije 2.5 mg/mL pripremljenog u 0.1 M fosfatnom puferu pH vrijednosti 8. Nakon miješanja na vrtložnoj miješalici otopina se stavlja na inkubaciju 20 minuta na 37°C. Nakon inkubacije dodaje se 600 μL deionizirane vode te se mjeri apsorbancija na čitaču mikropločica pri valnoj duljini od 405 nm. Kao pozitivna kontrola korištena je etanolna otopina orlistata koncentracije 20 mg/mL. Rezultati su prikazani kao postotak inhibicije izračunat prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = (1 - (\text{Abs U} - \text{Abs K}) / \text{Abs P}) * 100$$

pri čemu je:

Abs U = apsorbancija uzorka

Abs K = apsorbancija kontrole

Abs P = apsorbancija fosfatnog pufera.

2.16. Razdvajanje, identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih spojeva metodom HPLC

Tekućinska kromatografija visoke moći razlučivanja (eng. *High-Performance Liquid Chromatography* – HPLC) koristi se za razdvajanje komponenti iz smjese na osnovi kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze u stupcu. U ovom radu provele smo je u svrhu kvalitativne i kvantitativne analize aglikona fenolnih spojeva i *L*-askorbinske kiseline brokule. Etanolnom ekstraktu dodale smo koncentriranu klorovodičnu kiselinu (HCl) tako da je njena konačna koncentracija iznosila 1.2 M. Uzorke smo zatim 2 sata inkubirale na termostatiranoj tresilici pri temperaturi od 80°C i 300 okretaja u minuti. Nakon toga provedeno je razdvajanje, identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih spojeva na uređaju Agilent 1100 Series s UV/VIS detektorom. Razdvajanje smo provele 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. Metodu razdvajanja, identifikacije i kvantifikacije radile smo prema radu Šola i sur. (2020). Flavonoide smo analizirale pri valnoj duljini od 360 nm, fenolne kiseline pri 310 nm, a *L*-askorbinsku kiselinu pri 254 nm. Spojeve smo identificirale usporedbom retencijskih vremena pikova dobivenih analizom ekstrakata s retencijskim vremenima pikova dobivenih analizom standarda. Kvantifikaciju spojeva provele smo upotrebom baždarnih pravaca odgovarajućih standarda (Tablica 1) prema formuli:

$$x = \frac{y-b}{a} \quad (\text{mg/kg})$$

pri čemu je:

x = masa spoja

y = apsorbancija.

Baždarne pravce za svaki spoj definirale smo analizom otopina različitih koncentracija (0,01-0,25 mg/mL) standarda istom metodom kao i za ekstrakte.

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

Spoj	Jednadžba baždarnog pravca	R^2
Sinapinska kiselina	$y = 1842,1x + 25,56$	0,9982
Ferulična kiselina	$y = 2815,8x - 36,454$	0,9985
<i>p</i> -kumarinska kiselina	$y = 3502,6x + 40,25$	0,9989
Kempferol	$y = 1076,9x - 36,287$	0,9954
Kvercetin	$y = 944,51x - 39,118$	0,9991
<i>L</i> -askorbinska kiselina	$y = 649,31x - 42,759$	0,9987

2.17. Statistička obrada podataka

Podaci su statistički obrađeni pomoću računalnog softvera STATISTICA 12.0 (Stat Soft INC., SAD). Usporedba je provedena pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA) i primjenom *post hoc* testa višestrukih usporedbu (*Duncan's New Multiple Range Test*, DNMRT). Statistički značajnima smatrane su vrijednosti koje se razlikuju na razini $p \leq 0.05$. Za vizualizaciju

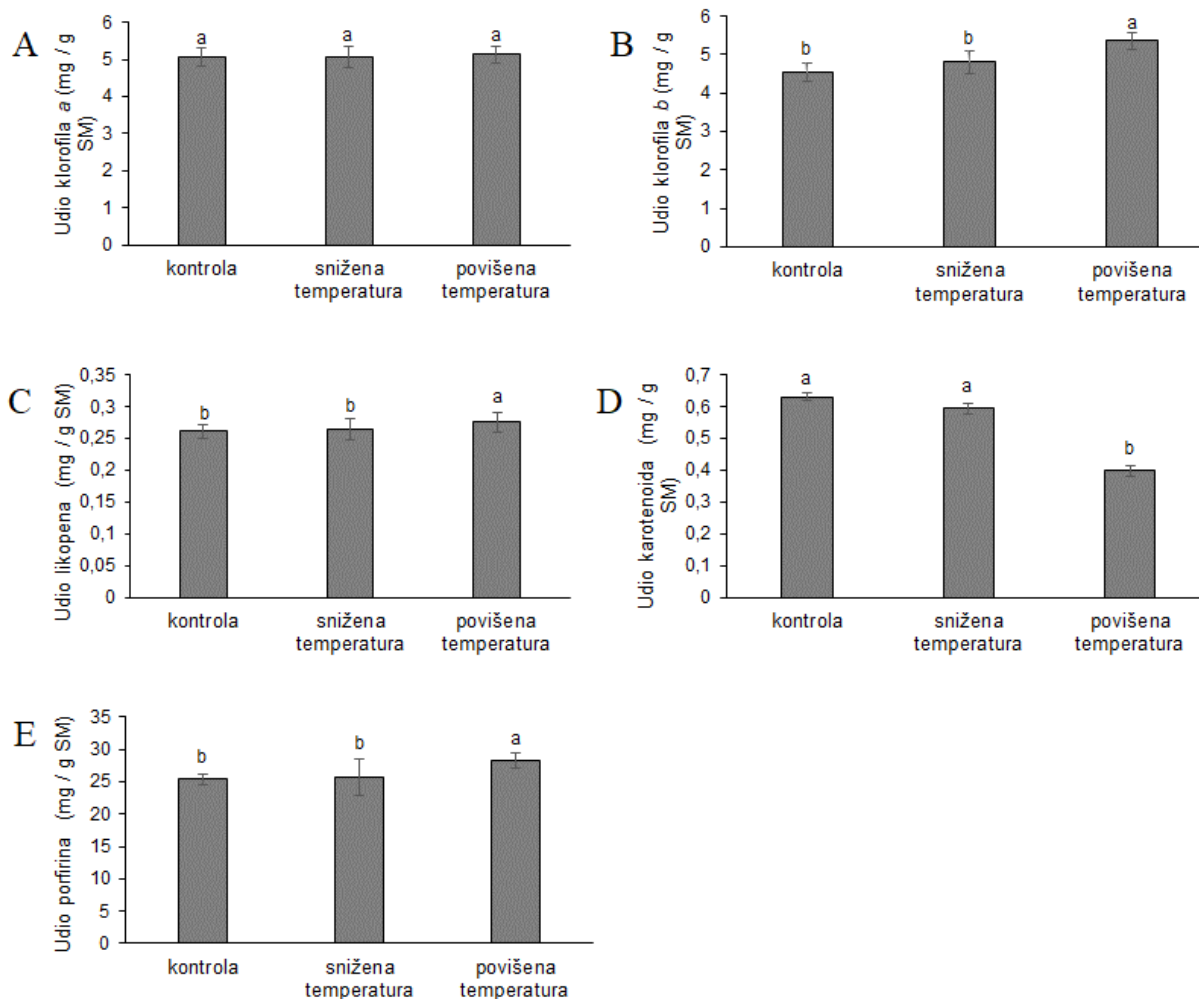
odnosa između uzoraka, kao i izmjerenih parametara korištena je analiza glavnih komponenata (PCA). Za dodatnu vizualizaciju grupiranja pojedinih istraživanih skupina na temelju izmjerenih parametara korištena je i metoda hijerarhijskog klasteriranja (HC) koja koristi Euklidsku udaljenost kao mjeru sličnosti ili različitosti između uzoraka. Za analizu korelacije između izmjerenih parametara izračunata su 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.).

REZULTATI

3. REZULTATI

3.1. Utjecaj temperaturnog stresa na udio klorofila, likopena, karotenoida i porfirina u mladim biljkama brokule

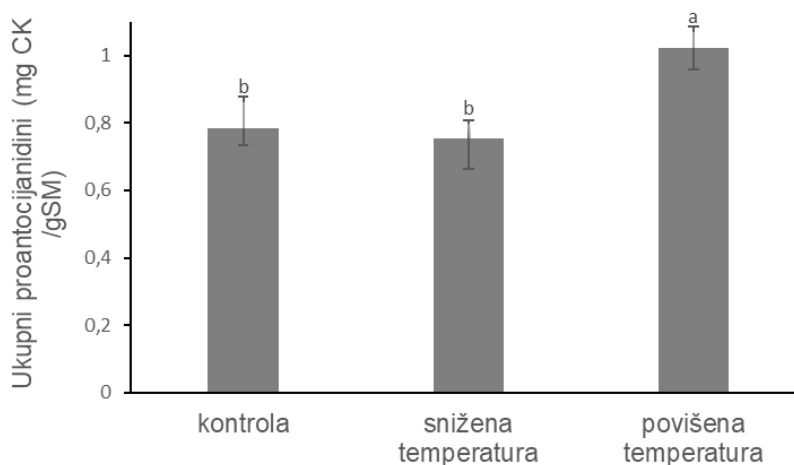
Kod svih pigmenata, osim klorofila *a*, zamijećena je statistički značajna razlika između skupine tretirane vodom povišene temperature i preostale dvije skupine (kontrolne i skupine tretirane vodom snižene temperature) (slika 6). Najveći udio klorofila *b* nalazio se kod skupine tretirane vodom povišene temperature te je iznosio $5,35 \pm 0,34$ mg/g suhe mase (sm). Udio kod skupine tretirane vodom snižene temperature bio je $4,80 \pm 0,63$ mg/g sm, a kod kontrolne skupine $4,55 \pm 0,22$ mg/g sm. Udio karotenoida je, s druge strane, najmanji u skupini tretiranoj vodom povišene temperature, te je iznosio $0,40 \pm 0,19$ mg/g sm. Kod preostalih dviju skupina on iznosi $0,60 \pm 0,22$ mg/g suhe mase (snižena temperatura vode) i $0,63 \pm 0,10$ mg/g suhe mase kod kontrolne skupine. Što se udjela likopena tiče, on je najveći kod skupine tretirane vodom povišene temperature te je iznosio $0,28 \pm 0,016$ mg/g sm. Kod preostalih dviju skupina ta vrijednost je iznosila $0,26 \pm 0,02$ mg/g sm (skupina tretirana vodom snižene temperature) i $0,26 \pm 0,01$ mg/g sm kod kontrolne skupine. Za ukupne porfirine je također primijećena razlika između skupine tretirane vodom povišene temperature i ostalih dviju skupina. Najveći udio iznosio je $28,27 \pm 1,09$ mg/g sm kod skupine tretirane vodom povišene temperature. Kod skupine tretirane vodom snižene temperature udio je bio $25,71 \pm 2,80$ mg/g sm, a kod kontrolne skupine $25,37 \pm 0,90$ mg/g sm.



Slika 6. Udio klorofila *a* (A), klorofila *b* (B), karotenoida (C), likopena (D) i porfirina (E) u mladim biljkama brokule. Kontrola = biljke zalijevane vodom sobne temperature, snižena temperatura = biljke zalijevane ledenom vodom, povišena temperatura = biljke zalijevane vodom temperature 80°C. SM = suha masa.

3.2. Utjecaj temperaturnog stresa na udio ukupnih proantocijanidina u mladim biljkama brokule

Udio ukupnih proantocijanidina bio je najveći kod skupine tretirane vodom povišene temperature, te je iznosio $1,21 \pm 0,064$ mg cijanidin klorida/ g sm (slika 7). Kod preostalih dviju skupina ta vrijednost je iznosila $0,78 \pm 0,052$ mg CK/g sm za kontrolnu skupinu i $0,76 \pm 0,093$ mg CK/g sm.

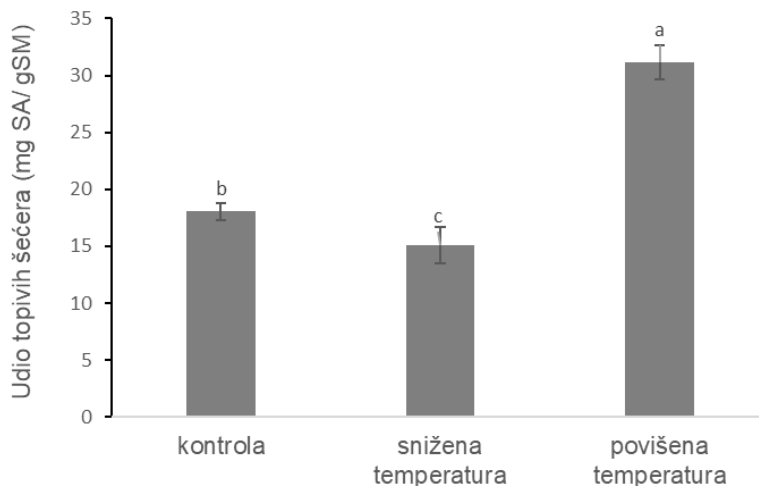


Slika 7. Udio ukupnih proantocijanidina u mladim biljkama brokule. Kontrola = biljke zalijevane vodom sobne temperature, snižena temperatura = biljke zalijevane ledenom vodom, povišena temperatura = biljke zalijevane vodom temperature 80°C. SM = suha masa.

3.3. Utjecaj temperaturnog stresa na udio topivih šećera u mladim biljkama brokule

Udio topivih šećera statistički se značajno razlikovao između sve tri eksperimentalne skupine (slika 8). Najviše ih je bilo u skupini tretiranoj vodom povišene temperature te je njihova vrijednost iznosila $31,14 \pm 1,47$ mg saharoze/g sm. U kontrolnoj skupini je njihov udio iznosio

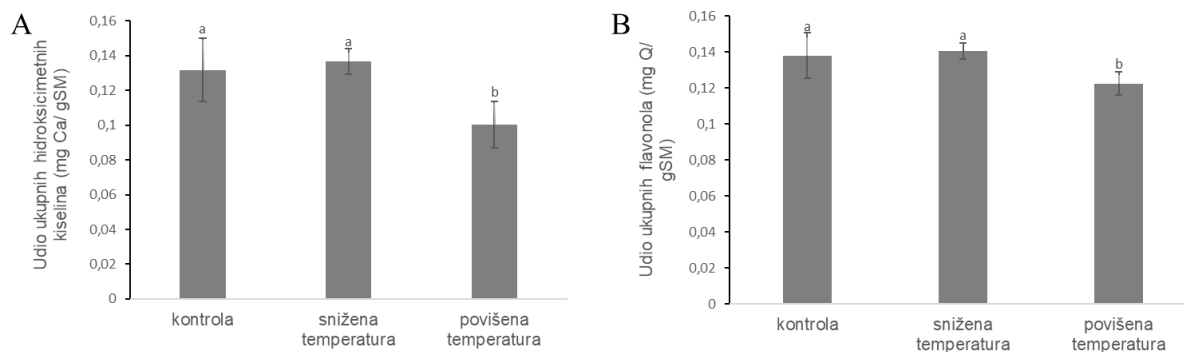
18,06 ± 0,75 mg saharoze/g sm, a u skupini tretiranoj vodom snižene temperature njihov je udio bio najmanji te je iznosio 15,07 ± 1,61 mg saharoze/g sm.



Slika 8. Udio topivih šećera u mladim biljkama brokule. Kontrola = biljke zalijevane vodom sobne temperature, snižena temperatura = biljke zalijevane ledenom vodom, povišena temperatura = biljke zalijevane vodom temperature 80°C. SM = suha masa.

3.4. Utjecaj temperaturnog stresa na udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola u mladim biljkama brokule

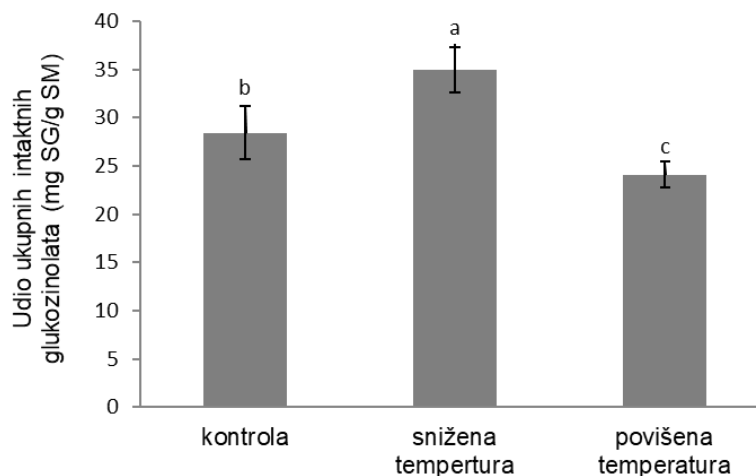
Udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola statistički je bio značajno manji kod skupine tretirane vodom povišene temperature nego kod preostalih dviju skupina (slika 9). Kod te skupine udio hidroksicimetnih kiselina iznosio je 0,10 ± 0,01 mg kavene kiseline/g sm. Kod kontrolne skupine iznosio je 0,13 ± 0,02 mg CA/g sm, a kod skupine tretirane vodom snižene temperature 0,14 ± 0,01 mg CA/g sm. Udio flavonola kod skupine tretirane vodom povišene temperature iznosio je 0,12 ± 0,01 mg kvercetina/g sm. Kod kontrolne skupine iznosio je 0,14 ± 0,01 mg Q/g sm, a kod skupine tretirane vodom snižene temperature 0,14 ± 0,01 mg Q/g sm.



Slika 9. Udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina (A) i flavonola (B) u mladim biljkama brokule. Kontrola = biljke zalijevane vodom sobne temperature, snižena temperatura = biljke zalijevane ledenom vodom, povišena temperatura = biljke zalijevane vodom temperature 80°C. CA = kavena kiselina, Q = kvercetin, SM = suha masa.

3.5. Utjecaj temperaturnog stresa na udio ukupnih glukozinolata u mladim biljkama brokule

Udio ukupnih intaktnih glukozinolata statistički se značajno razlikovao između sve tri eksperimentalne skupine (slika 10). Najveći je bio kod skupine tretirane vodom snižene temperature gdje je iznosio $34,96 \pm 2,37$ mg sinigrin/g sm. Kod kontrolne skupine taj udio je iznosio $28,42 \pm 2,76$ mg sinigrin/g sm, a kod skupine tretirane vodom povišene temperature bio je najmanji te je iznosio $24,07 \pm 1,34$ mg SG/g sm.



Slika 10. Udio ukupnih intaktnih glukozinolata u mladim biljkama brokule. Kontrola = biljke zalijevane vodom sobne temperature, snižena temperatura = biljke zalijevane ledenom vodom, povišena temperatura = biljke zalijevane vodom temperature 80°C. Sg = sinigrin, SM = suha masa.

3.6. Utjecaj temperaturnog stresa na udio ukupnih fenola, flavonoida, tanina i fenolnih kiselina u mladim biljkama brokule

Kao što je prikazano u tablici 2, udjeli ove četiri skupine spojeva nisu se statistički značajno razlikovali između eksperimentalnih skupina. U kontrolnoj skupini biljaka, ukupnih fenola zabilježeno je $10,56 \pm 0,55$ mg ekvivalenata galne kiseline/g sm, ukupnih flavonoida $16,31 \pm 0,89$ mg ekvivalenata kvercetina/g sm, ukupnih tanina $5,05 \pm 0,12$ mg ekvivalenata katehina/g sm, a ukupnih fenolnih kiselina $2,23 \pm 0,36$ ekvivalenata kavene kiseline/g sm. Obje tretirane skupine imale su udjele ovih spojeva slične onima u kontrolnoj skupini.

Tablica 2. Udio ukupnih fenola, flavonoida, tanina i fenolnih kiselina u mladim biljkama brokule.

	kontrola	snižena temperatura	povišena temperatura
Ukupni fenoli (mg EGK/g sm)	10,56 ± 0,55 a	10,20 ± 1,36 a	10,05 ± 0,98 a
Ukupni flavonoidi (mg EK/g sm)	16,31 ± 0,89 a	16,56 ± 0,73 a	17,01 ± 0,87 a
Ukupni tanini (mg EKAT/g sm)	5,05 ± 0,12 a	4,70 ± 0,78 a	4,62 ± 0,20 a
Ukupne fenolne kisljine (mg EKK/g sm)	2,23 ± 0,36 a	2,08 ± 0,30 a	2,32 ± 0,26 a

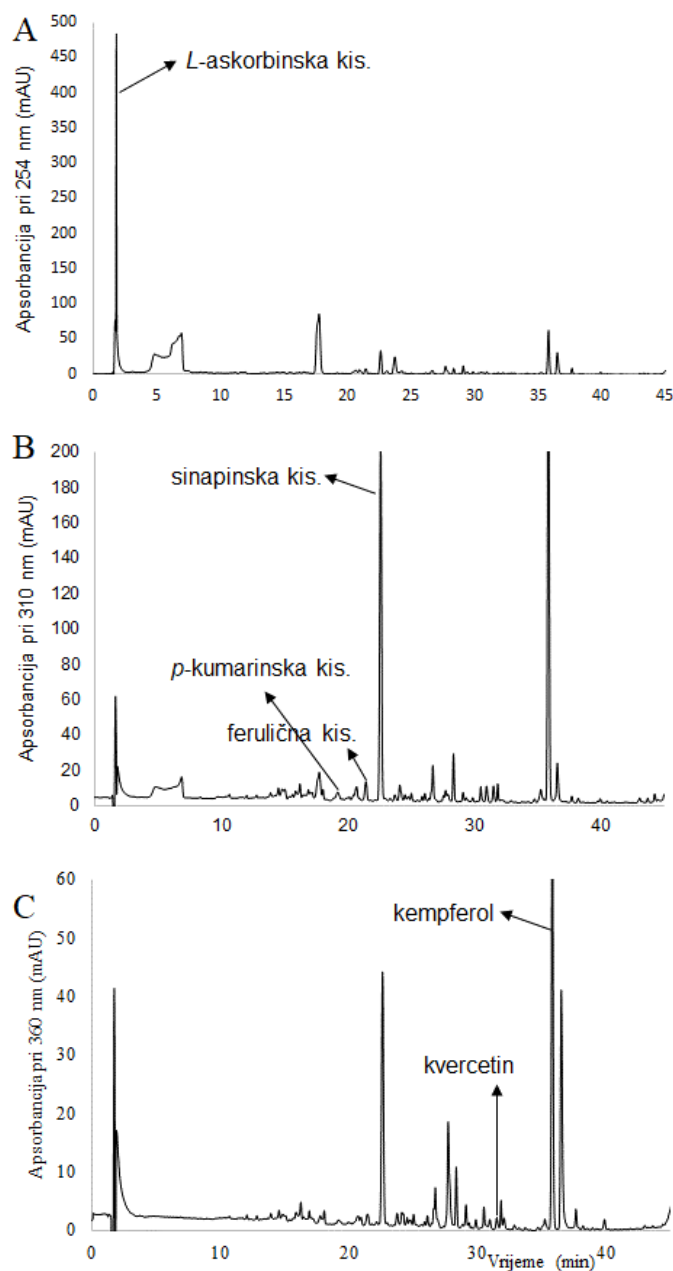
* EGK = ekvivalent galne kisljine, EK = ekvivalent kvercetina, EKAT= ekvivalent katehina, EKK = ekvivalent kavene kisljine, sm = suha masa.

* Slova u jednom redu označavaju statistički (ne)značajnu razliku između testnih i kontrolne skupine biljaka. Ista slova znače da nema statistički značajne razlike na razini $p \leq 0.05$ između uzoraka.

3.7. Razdvajanje, identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih spojeva u ekstraktima mladih biljaka brokule

Na slici 11 prikazani su kromatogrami dobiveni analizom etanolnog ekstrakta kontrolne skupine biljaka. Pri valnoj duljini od 254 nm identificirana je *L*-askorbinska kisljina poznata i pod nazivom vitamin C (slika 11 A). Pri 310 nm identificirane su fenolne kisljine iz skupine

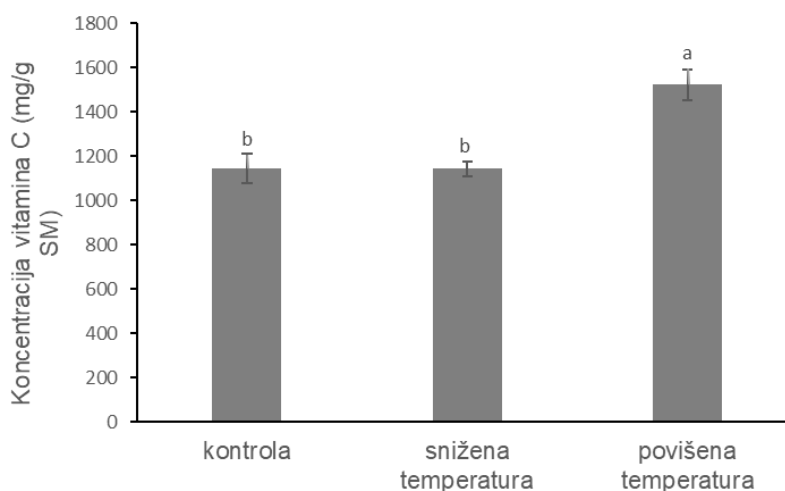
hidroksicimetnih kiselina, *p*-kumarinska, ferulična i sinapinska (slika 11 B), a pri 360 nm flavonoidi iz skupine flavonola, kvercetin i kempferol (slika 11 C).



Slika 11. Kromatogrami ekstrakta mlade brokule dobiveni tekućinskom kromatografijom visoke moći razlučivanja snimljeni pri valnoj duljini A) 254 nm, B) 310 nm i C) 360 nm. mAU = jedinica miliapsorbancije, *L*-askorbinska kis. = *L*-askorbinska kiselina, sinapinska kis. = sinapinska kiselina, ferulična kis. = ferulična kiselina, *p*-kumarinska kis. = *p*-kumarinska kiselina.

3.8. Utjecaj temperaturnog stresa na koncentraciju vitamina C u mladim biljkama brokule

Kod skupine tretirane vodom povišene temperature došlo je do statistički značajnog povećanja koncentracije vitamina C i ona je iznosila $1522,99 \pm 70,30$ mg/g sm (slika 12). Kontrolna i skupina tretirana vodom snižene temperature imale su $1144,43 \pm 66,64$ mg/g sm i $1143,09 \pm 33,32$ mg/g sm.

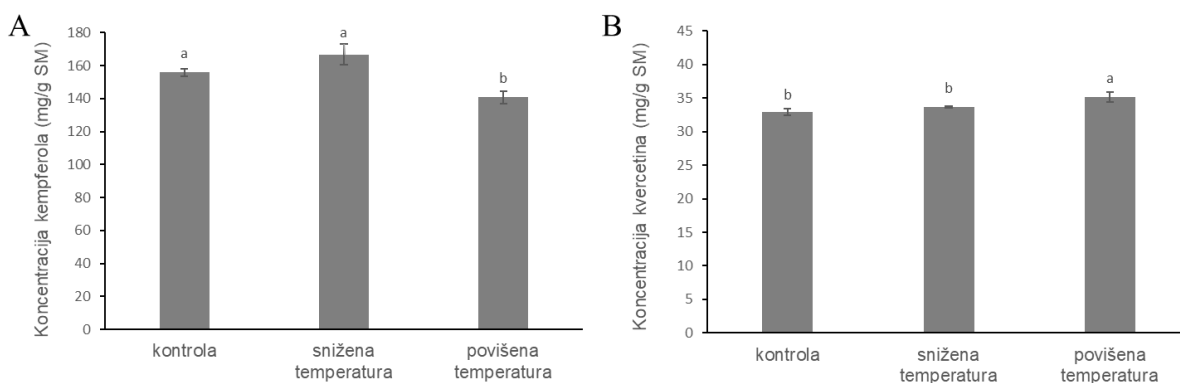


Slika 12. Koncentracija vitamina C u mladim biljkama brokule. Kontrola = biljke zalijevane vodom sobne temperature, snižena temperatura = biljke zalijevane ledenom vodom, povišena temperatura = biljke zalijevane vodom temperature 80°C.

3.9. Utjecaj temperaturnog stresa na koncentraciju flavonoida kvercetina i kempferola u mladim biljkama brokule

Skupina tretirana vodom snižene temperature nije se značajno razlikovala od kontrolne u koncentraciji kvercetina i kempferola (slika 13). Kontrolna skupina sadržavala je $32,93 \pm 0,45$ mg/g sm kvercetina, a skupina tretirana vodom snižene temperature $33,70 \pm 0,13$ mg/g sm.

Kempferola je u kontrolnoj skupini zabilježeno $155,82 \pm 2,24$ mg/g sm, a u skupini tretiranoj vodom snižene temperature $166,71 \pm 6,38$ mg/g sm. S druge strane, skupina tretirana vodom povišene temperature značajno se razlikovala u koncentracija oba flavonoida u odnosu na kontrolnu i skupinu tretiranu vodom snižene temperature. Naime, u ovoj skupini je koncentracija kvercetina bila značajno viša nego u ostale dvije te je iznosila $35,11 \pm 0,73$ mg/g sm, a koncentracija kempferola se značajno snizila u usporedbi s kontrolnom i skupinom tretiranom vodom snižene temperature te je iznosila $140,72 \pm 3,81$ mg/g sm.

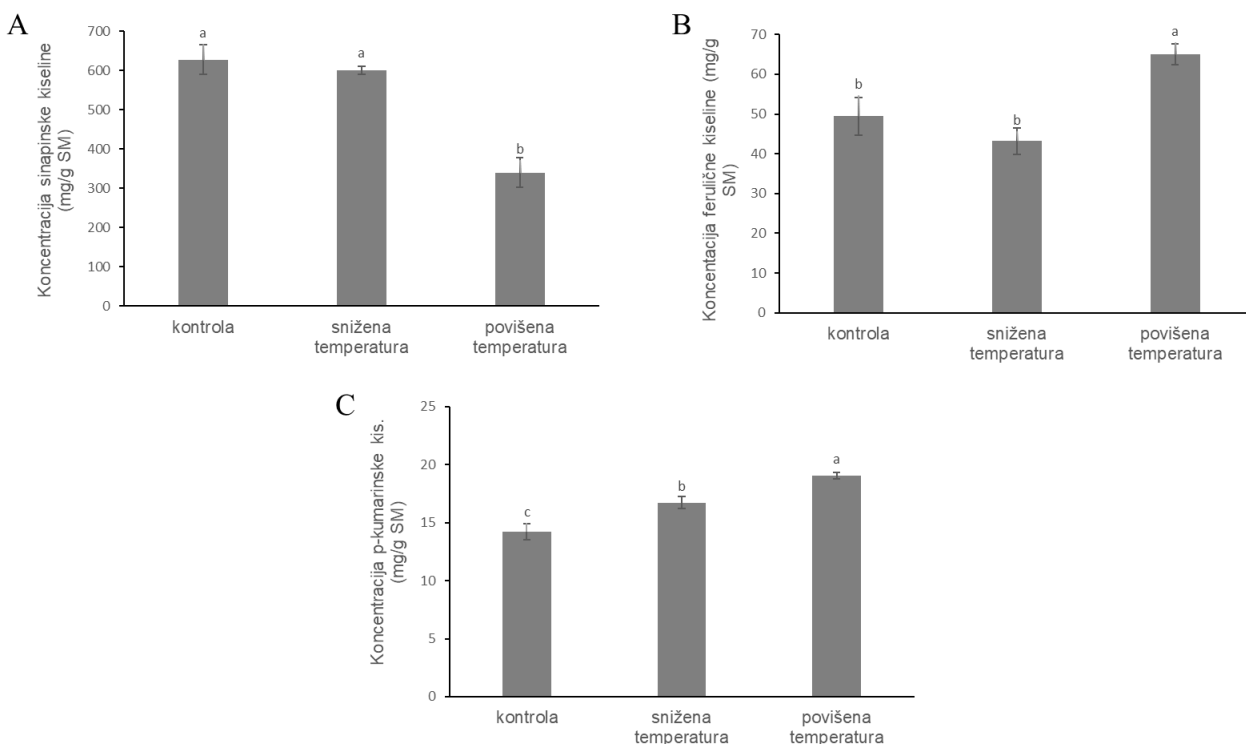


Slika 13. Koncentracija kvercetina i kempferola u mladim biljkama brokule. Kontrola = biljke zalijevane vodom sobne temperature, snižena temperatura = biljke zalijevane ledenom vodom, povišena temperatura = biljke zalijevane vodom temperature 80°C.

3.10. Utjecaj temperaturnog stresa na koncentraciju *p*-kumarinske, ferulične i sinapinske kiseline u mladim biljkama brokule

Oba tipa temperaturnog stresa značajno su povećala koncentraciju *p*-kumarinske kiseline u odnosu na kontrolnu skupinu, s tim da je tretman vodom povišene temperature uzrokovao intenzivniji porast koncentracije ove kiseline nego tretman vodom snižene temperature (slika 14).

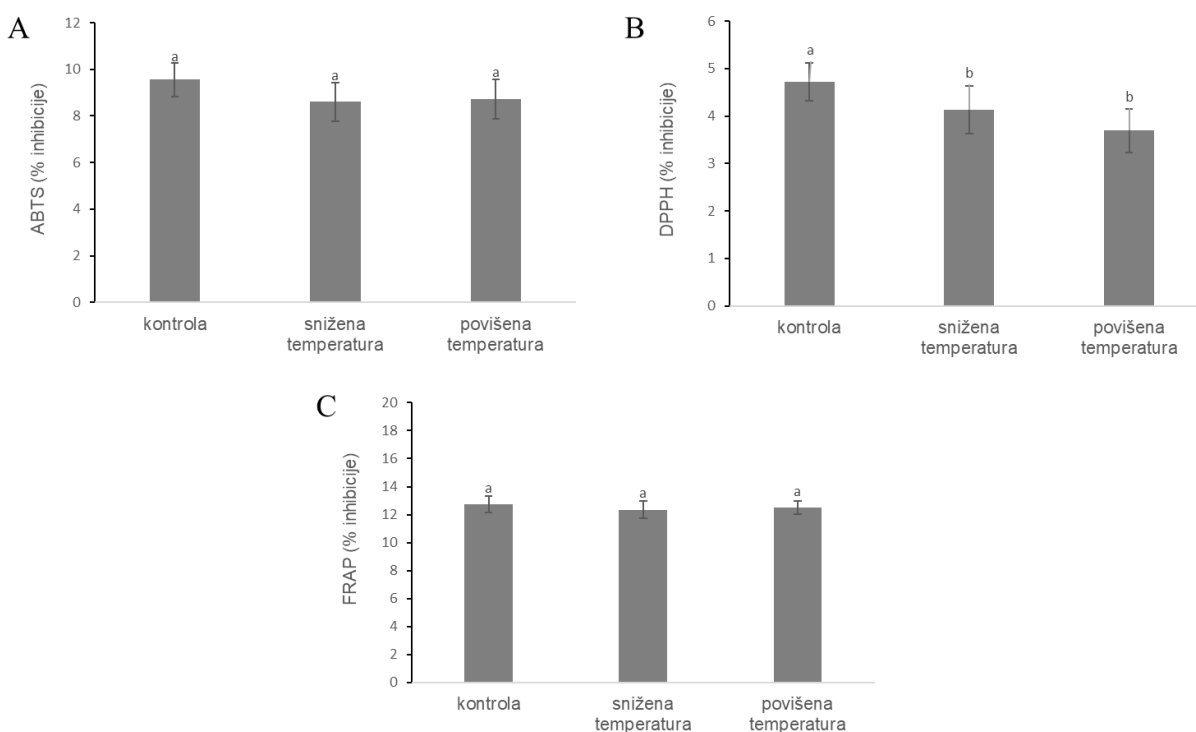
Konkretno, u kontrolnoj skupini zabilježena je koncentracija od $14,22 \pm 0,68$ mg/g sm, u skupini tretiranoj vodom snižene temperature $16,72 \pm 0,51$ mg/g sm, a u skupini tretiranoj vodom povišene temperature $19,04 \pm 0,29$ mg/g sm. Koncentracija ferulične kiseline značajno je bila povišena u skupini tretiranoj vodom povišene temperature, iznosila je $64,99 \pm 2,62$ mg/g sm. Kod kontrolne i skupine tretirane vodom snižene temperature nije se međusobno razlikovala i iznosila je, redom, $49,41 \pm 4,80$ mg/g sm i $43,18 \pm 3,28$ mg/g sm. Suprotno prethodnima, koncentracija sinapinske kiseline se nakon tretmana vodom povišene temperature znatno snizila, iznosila je $339,80 \pm 37,67$ mg/g sm, u odnosu na kontrolnu i skupinu tretiranu vodom snižene temperature koje se međusobno nisu razlikovale i sadržavale su, redom, $627,59 \pm 37,52$ mg/g sm i $599,33 \pm 10,14$ mg/g sm ove kiseline.



Slika 14. Koncentracija *p*-kumarinske, ferulične i sinapinske kiseline u mladim biljkama brokule. Kontrola = biljke zalijevane vodom sobne temperature, snižena temperatura = biljke zalijevane ledenom vodom, povišena temperatura = biljke zalijevane vodom temperature 80°C.

3.11. Utjecaj temperaturnog stresa na antioksidacijski kapacitet mladih biljaka brokule

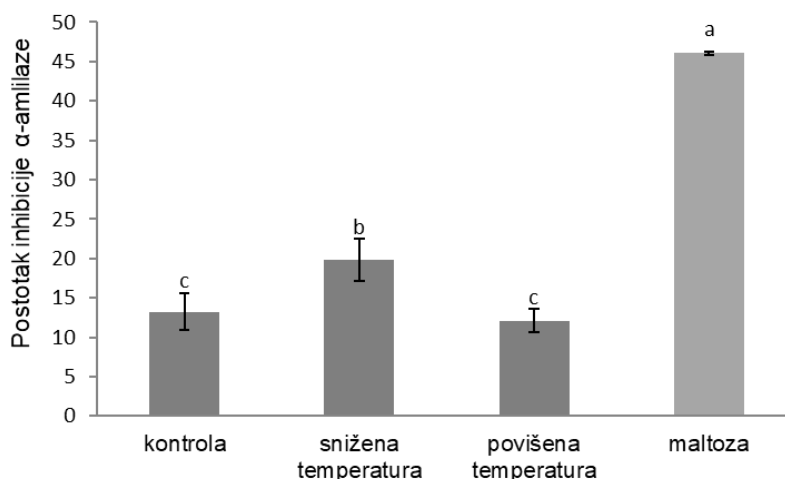
Upotrebom metode DPPH statistički se vrijednost kontrolne skupine značajno razlikovala od vrijednosti testnih skupina (slika 15). Najveći antioksidacijski kapacitet zabilježen je kod kontrolne skupine i iznosio je $4,71 \pm 0,40$ % u odnosu na standard trolox. Kod skupine tretirane vodom snižene temperature taj je kapacitet iznosio $4,13 \pm 0,51$ % u odnosu na standard trolox, a kod skupine tretirane vodom povišene temperature je bio najniži i iznosio je $3,69 \pm 0,46$ % u odnosu na standard trolox. Upotrebom metoda ABTS i FRAP nisu uočene statistički značajne razlike između skupina.



Slika 15. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata mladih biljaka brokule određen metodom A) ABTS, B) DPPH i C) FRAP u odnosu na standard trolox. Kontrola = biljke zalijevane vodom sobne temperature, snižena temperatura = biljke zalijevane ledenom vodom, povišena temperatura = biljke zalijevane vodom temperature 80°C.

3.12. Utjecaj temperaturnog stresa na potencijal ekstrakata mladih biljaka brokule da inhibiraju enzim α -amilazu

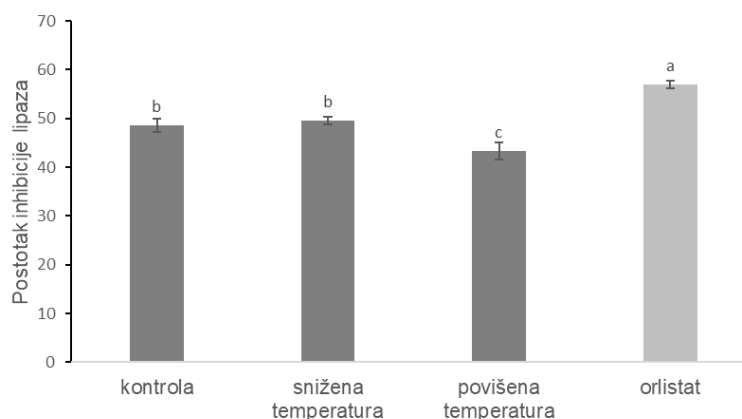
Rezultati stupnja inhibicije aktivnosti α -amilaze prikazani su na slici 16. Statistički najznačajniji postotak inhibicije zabilježen je za standard maltozu koncentracije 20 mg/mL i iznosio je $46,07 \pm 0,19\%$. Za skupinu tretiranu vodom snižene temperature taj postotak iznosio je $19,85 \pm 2,70\%$. Kod kontrolne i skupine tretirane vodom povišene temperature taj postotak se statistički nije razlikovao i iznosio je $13,26 \pm 2,36\%$ za kontrolnu skupinu, te $12,11 \pm 1,68\%$ za skupinu tretiranu vrućom vodom.



Slika 16. Postotak inhibicije enzima α -amilaze. Kontrola = biljke zalijevane vodom sobne temperature, snižena temperatura = biljke zalijevane ledenom vodom, povišena temperatura = biljke zalijevane vodom temperature 80°C .

3.13. Utjecaj temperaturnog stresa na potencijal ekstrakata mladih biljaka brokule da inhibiraju enzim lipazu

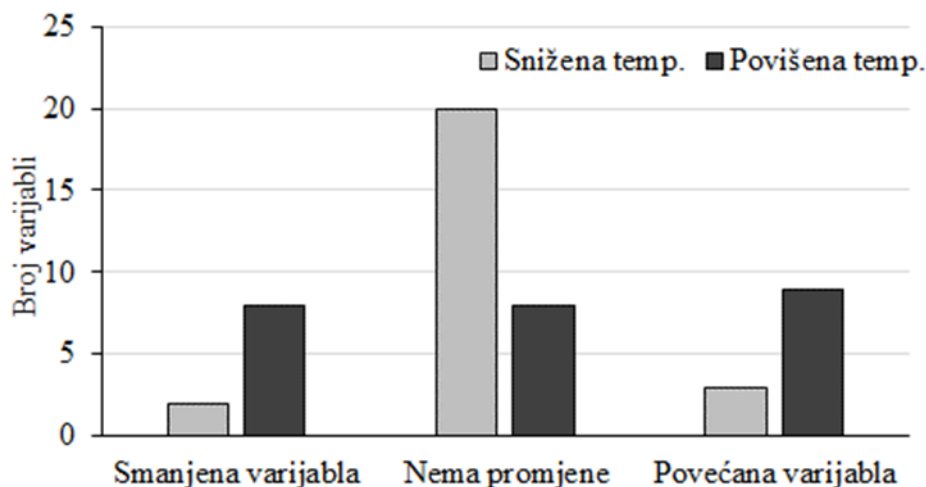
Rezultati stupnja inhibicije aktivnosti enzima lipaze prikazani su na slici 17. Statistički se međusobno značajno razlikuju podaci dobiveni za standard, skupinu tretiranu vodom povišene temperature i preostale dvije skupine. Standard je najznačajnije inhibirao aktivnost lipaze i stupanj inhibicije iznosio je $56,96 \pm 0,72\%$. Kod dviju skupina između kojih nema statistički značajne razlike stupanj inhibicije iznosio je $49,54 \pm 0,80\%$ za biljke tretirane vodom snižene temperature i $48,58 \pm 1,34\%$ za kontrolnu skupinu. Najmanji postotak inhibicije lipaze imala je skupina tretirana vodom povišene temperature, a iznosio je $43,32 \pm 1,75\%$.



Slika 17. Postotak inhibicije enzima lipaze. Kontrola = biljke zalijevane vodom sobne temperature, snižena temperatura = biljke zalijevane ledenom vodom, povišena temperatura = biljke zalijevane vodom temperature 80°C.

3.14. Odnos otpornih i susceptibilnih varijabli mladih biljaka brokule pod utjecajem temperaturnog stresa

Kao što se vidi na slici 18, tretman vodom povišene temperature promijenio je veći broj varijabli mladih biljaka brokule, nego tretman vodom snižene temperature. Konkretno, tretman vodom povišene temperature uzrokovao je značajno snižavanje vrijednosti osam varijabli, značajno povećanje vrijednosti devet varijabli, a vrijednosti osam varijabli bilo je otporno na ovaj tip stresa. Tretman vodom snižene temperature uzrokovao je značajno snižavanje vrijednosti svega dvije varijable, značajno povećanje vrijednosti tri varijable, a vrijednosti čak dvadeset varijabli ostale su nepromijenjene.



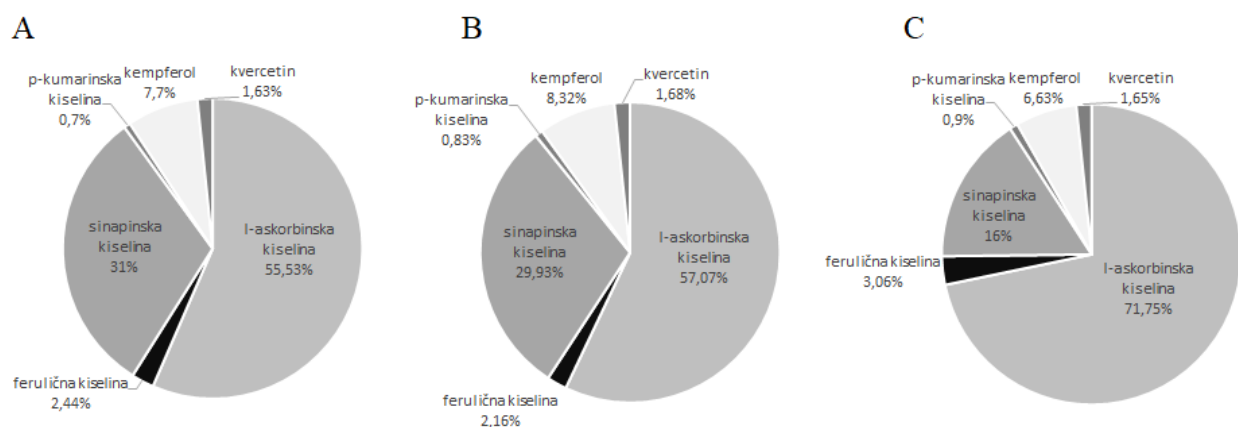
Slika 18. Broj otpornih (nema promjene) i susceptibilnih (smanjenih ili povećanih) varijabli mladih biljaka brokule tretiranih vodom snižene i povišene temperature u odnosu na kontrolnu skupinu biljaka zalijevanu vodom sobne temperature.

U tablici 3 nalazi se detaljan popis varijabli sniženih, povišenih i nepromijenjenih vrijednosti ovisno o tipu stresa.

Tablica 3. Raspodjela analiziranih varijabli mladih biljaka brokule s obzirom na njihovu otpornost/susceptibilnost uslijed tretmana vodom snižene i povišene temperature. Smanjena/povećana vrijednost = došlo je do statistički značajnog smanjenja/povećanja vrijednosti u odnosu na kontrolnu skupinu biljaka zalijevanu vodom sobne temperature. Nema promjene = nije zabilježena statistički značajna promjena vrijednosti u odnosu na kontrolnu skupinu biljaka, $p \leq 0.05$.

	Smanjena vrijednost	Nema promjene	Povećana vrijednost
Voda snižene temp.	<ul style="list-style-type: none"> • Topivi šećeri • DPPH 	<ul style="list-style-type: none"> • Klorofil <i>a</i> • Klorofil <i>b</i> • Likopen • Karotenoidi • Porfirini • Ukupni proantocijanidini • Ukupne hidroksicimetne kiseline • Ukupni flavonoli • Ukupni fenoli • Ukupni flavonoidi • Ukupni tanini • Ukupne fenolne kiseline • Vitamin C • Ferulična kis. • Sinapinska kis. • Kvercetin • Kempferol • ABTS • FRAP • Inhibicija lipaze 	<ul style="list-style-type: none"> • Intaktni glukozinolati • Inhibicija α-amilaze • <i>p</i>-kumarinska kis.
Voda povišene temp.	<ul style="list-style-type: none"> • Karotenoidi • Ukupne hidroksicimetne kiseline • Ukupni flavonoli • Intaktni glukozinolati • DPPH • Inhibicija lipaze • Sinapinska kis. • Kempferol 	<ul style="list-style-type: none"> • Klorofil <i>a</i> • Ukupni fenoli • Ukupni flavonoidi • Ukupni tanini • Ukupne fenolne kiseline • ABTS • FRAP • Inhibicija α-amilaze 	<ul style="list-style-type: none"> • Klorofil <i>b</i> • Likopen • Porfirini • Ukupni proantocijanidini • Topivi šećeri • Vitamin C • Ferulična kiselina • <i>p</i>-kumarinska kis. • Kvercetin

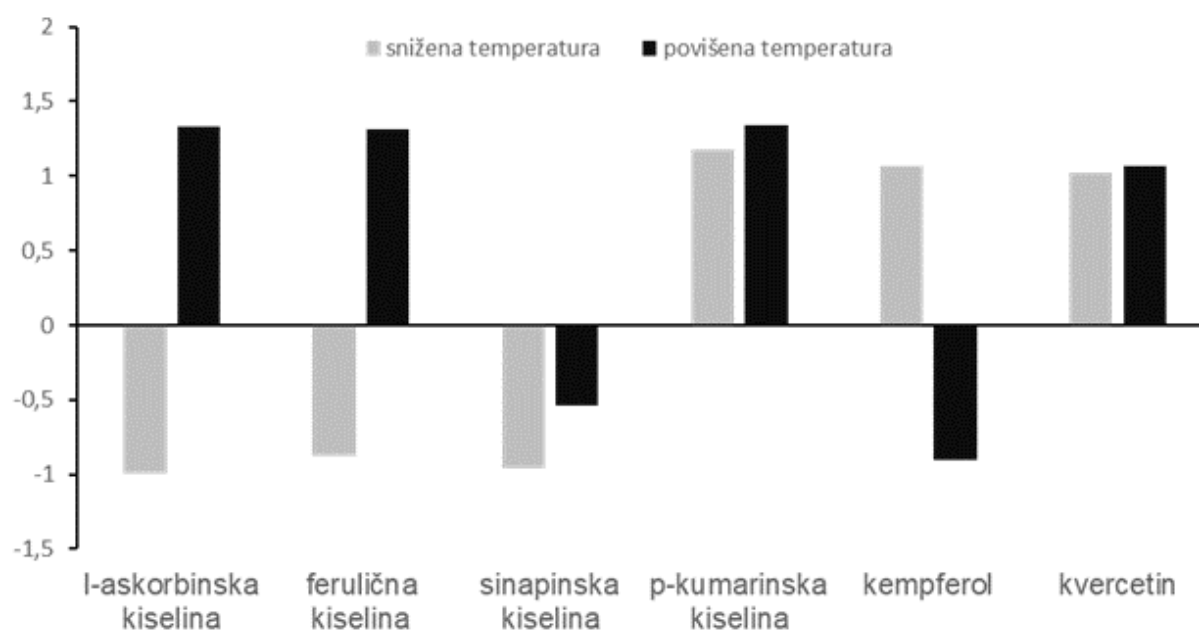
Na slici 19 prikazan je udio pojedinih identificiranih spojeva u kontrolnoj i testnim skupinama. Vidljivo je da je redoslijed spojeva po zastupljenosti u svakoj skupini isti, najzastupljenija je *L*-askorbinska kiselina s 56% u kontrolnoj skupini, 57% u skupini tretiranoj vodom snižene temperature i 72% u skupini tretiranoj vodom povišene temperature. Druga po zastupljenosti je sinapinska kiselina, međutim, za razliku od *L*-askorbinske, njena koncentracija u tretiranim skupinama je niža nego kod kontrole. Konkretno, kod kontrolne skupine iznosila je 31%, kod skupine tretirane vodom snižene temperature 30%, a kod skupine tretirane vodom povišene temperature svega 16%. Treći najzastupljeniji spoj bio je kempferol, zatim ferulična kiselina, kvercetin i, na kraju, *p*-kumarinska kiselina.



Slika 19. Udio pojedinog identificiranog spoja u A) kontrolnoj, B) skupini tretiranoj vodom snižene temperature i C) skupini tretiranoj vodom povišene temperature.

Intenzitet i smjer utjecaja stresa na koncentraciju identificiranih spojeva u odnosu na kontrolnu skupinu prikazan je na slici 20. Stres vodom snižene i povišene temperature imao je suprotan učinak na koncentraciju *L*-askorbinske i ferulične kiseline, te flavonola kempferola.

Jednak učinak, samo različitog intenziteta ova dva tipa stresa imala su na koncentraciju sinapinske i *p*-kumarinske kiseline, te flavonola kvercetina. Također, uočavamo da je voda snižene temperature povisila koncentraciju tri spoja i snizila koncentraciju ostala tri spoja, dok je voda povišene temperature povisila koncentraciju četiri spoja, a snizila koncentraciju dva spoja. Intenzivniji utjecaj na koncentraciju *L*-askorbinske, ferulične i *p*-kumarinske kiseline, te kvercetina imala je voda povišene temperature. S druge strane, voda snižene temperature intenzivnije je promijenila koncentraciju sinapinske kiseline i kempferola nego voda povišene temperature.

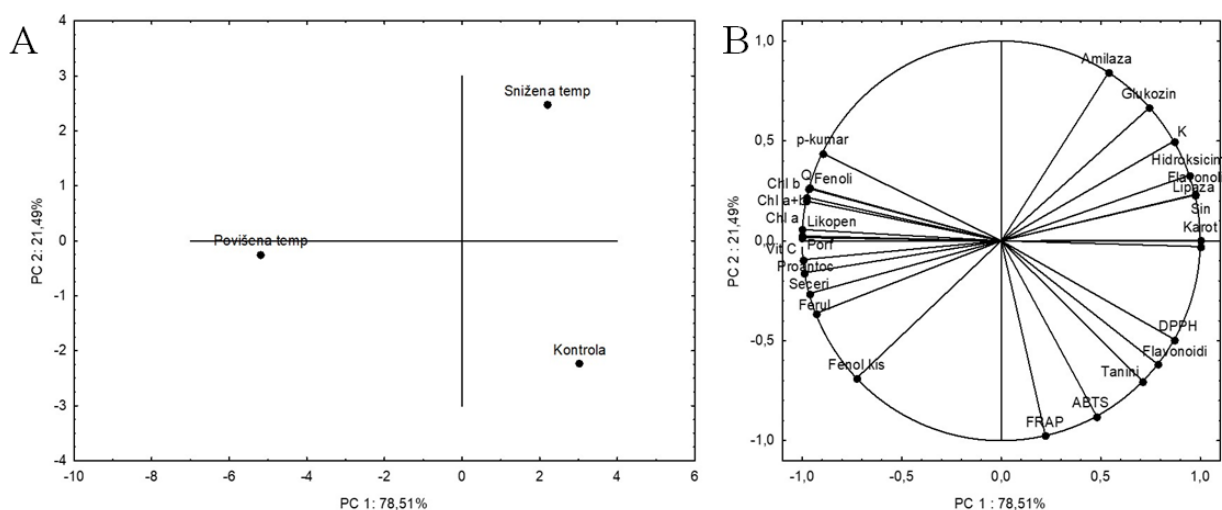


Slika 20. Intenzitet i smjer utjecaja stresa na koncentraciju identificiranih spojeva u odnosu na kontrolnu skupinu.

3.15. Kemometrijske analize podataka

3.15.1. Analiza glavnih komponenti

Dvije glavne komponente (PC 1 i PC 2) objasnile su 100% varijabilnosti. Analiza je jasno razdvojila tri analizirane skupine biljaka (slika 21 A). S obzirom na PC 1, tretman povišenom temperaturom odvojio se od ostala dva tretmana, dok je s obzirom na PC 2, tretman vodom snižene temperature udaljeniji od kontrolne skupine nego tretman vodom povišene temperature. Na slici 21 B vidljivo je da su odvajanju skupine tretirane vodom povišene temperature dominantno doprinijeli klorofili, likopen, porfirini, vitamin C, fenolni spojevi i šećeri. Odvajanju skupine tretirane vodom snižene temperature dominantno su doprinijeli sposobnost inhibicije aktivnosti enzima α -amilaze i lipaze, glukozinolati, hidroksicimetne kiselijne i flavonoli. Konačno, odvajanju kontrolne skupine od testnih najviše su doprinijeli flavonoidi, tanini i antioksidacijski potencijal (mjeren bilo kojom od 3 metode).

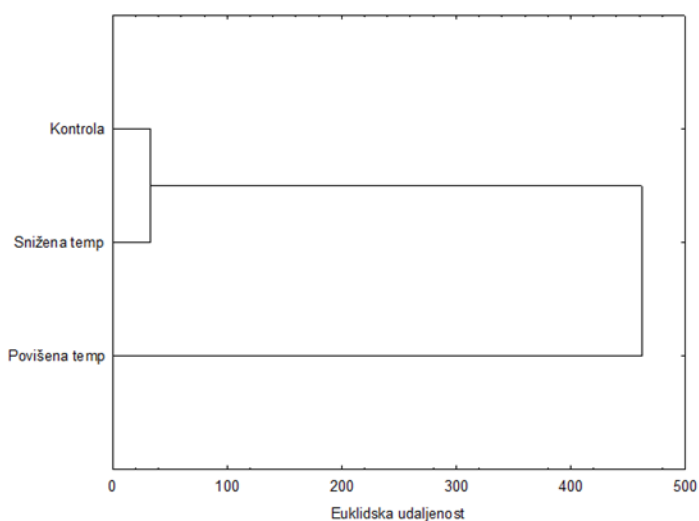


Slika 21. Dijagram (*biplot*) analize glavnih komponentata (*Principal Component Analysis*, PCA) između izmjerenih ukupnih i pojedinačnih bioaktivnih spojeva kontrolne i tretiranih skupina biljaka, njihovih fotosintetskih pigmenata, antioksidacijskog potencijala i sposobnosti inhibicije

enzima α -amilaze i lipaze. A) Grupiranje uzoraka, B) grupiranje analiziranih parametara. Proantoc = proantocijanidini, Fenol kis = fenolne kiseline, Hidroksicim=hidroksicimetne kiseline, Seceri=topivi šećeri, Glukozin = glukozinolati, Chl a = klorofil *a*, Chl b = klorofil *b*, Karot = karotnoidi, Porf = porfirini, ABTS = antioksidacijski kapacitet mjereno metodom ABTS, FRAP = antioksidacijski kapacitet mjereno metodom FRAP, DPPH = antioksidacijski kapacitet mjereno metodom DPPH, Amilaza = sposobnost inhibicije enzima α -amilaza, Lipaza = sposobnost inhibicije enzima lipaza, Vit C = vitamin C, p.kumar = *p*-kumarinska kiselina, Ferul = ferulična kiselina, Sin = sinapinska kiselina, Q = kvercetin, K = kempferol.

3.15.2. Hijerarhijsko klasteriranje

Metoda hijerarhijskog klasteriranja pokazala je veću sličnost između kontrolne i skupine tretirane vodom snižene temperature, dok se skupina tretirana vodom povišene temperature značajnije odvojila (slika 22).



Slika 22. Hijerarhijsko klasteriranje, izraženo kao Euklidska udaljenost, kontrolne i tretiranih skupina biljaka, na temelju izmjerenih ukupnih i pojedinačnih bioaktivnih spojeva, njihovih fotosintetskih pigmenata, antioksidacijskog potencijala i sposobnosti inhibicije enzima α -amilaze i lipaze.

3.15.3. Analiza Pearsonovih koeficijenata korelacije

Vrijednosti Pearsonovih koeficijenata korelacije između parametara fitokemijskih i analiza biološke aktivnosti za pojedine skupine biljaka prikazane su u Tablici 4. Uočljiva je vrlo visoka pozitivna korelacija između antioksidacijske aktivnosti mjerene metodama ABTS i DPPH s ukupnim flavonoidima i taninima u brokuli. Što se tiče sposobnosti inhibicije aktivnosti enzima α -amilaze, zabilježile smo vrlo visoku pozitivnu korelaciju s ukupnim glukozinolatima. Inhibicija aktivnosti enzima lipaze 100% pozitivno korelira s ukupnim flavonolima brokule. Isto tako, inhibicija ovog enzima vrlo visoko pozitivno korelira s ukupnim hidroksicimetnim kiselinama i karotenoidima, sinapinskom kiselinom i kempferolom.

Tablica 4. Pearsonovi koeficijenti korelacija između izmjerenih varijabli mladih biljaka brokule.

	Fenoli	Flavonoidi	Flavonoli	Tanini	Proantoc	Fenol kis	Hidroksicim	Seceri	Glukozin	Chl a	Chl b	Chl a+b	Likopen	Karot	Porf	ABTS	FRAP	DPPH	Amilaza	Lipaza	Vit C	p-kumar	Ferul	Sin	Q	K
Fenoli	1,000																									
Flavonoidi	-0,922	1,000																								
Flavonoli	-0,878	0,624	1,000																							
Tanini	-0,872	0,993	0,531	1,000																						
Proantoc	0,909	-0,678	-0,998	-0,589	1,000																					
Fenol kis	0,517	-0,146	-0,864	-0,032	0,827	1,000																				
Hidroksicim	-0,824	0,541	0,995	0,441	-0,985	-0,911	1,000																			
Seceri	0,860	-0,596	-0,999	-0,500	0,994	0,882	-0,998	1,000																		
Glukozin	-0,541	0,174	0,878	0,061	-0,842	-1,000	0,923	-0,895	1,000																	
Chl a	0,970	-0,801	-0,968	-0,727	0,983	0,710	-0,937	0,958	-0,729	1,000																
Chl b	0,999	-0,902	-0,900	-0,847	0,929	0,559	-0,851	0,884	-0,582	0,981	1,000															
Chl a+b	1,000	-0,912	-0,890	-0,859	0,920	0,540	-0,839	0,873	-0,563	0,976	1,000	1,000														
Likopen	0,977	-0,820	-0,959	-0,749	0,977	0,686	-0,925	0,948	-0,707	0,999	0,987	0,983	1,000													
Karot	-0,971	0,804	0,966	0,731	-0,982	-0,706	0,935	-0,956	0,726	-1,000	-0,982	-0,977	-1,000	1,000												
Porf	0,968	-0,796	-0,970	-0,722	0,984	0,715	-0,939	0,960	-0,734	1,000	0,979	0,975	0,999	-1,000	1,000											
ABTS	-0,695	0,919	0,266	0,958	-0,333	0,255	0,165	-0,231	-0,228	-0,500	-0,659	-0,676	-0,528	0,505	-0,493	1,000										
FRAP	-0,473	0,777	-0,007	0,844	-0,063	0,509	-0,110	0,043	-0,485	-0,245	-0,429	-0,449	-0,276	0,250	-0,238	0,962	1,000									
DPPH	-0,970	0,989	0,734	0,965	-0,780	-0,292	0,660	-0,709	0,319	-0,881	-0,956	-0,963	-0,896	0,884	-0,878	0,850	0,674	1,000								
Amilaza	-0,296	-0,096	0,718	-0,209	-0,667	-0,971	0,785	-0,742	0,963	-0,519	-0,343	-0,322	-0,491	0,515	-0,526	-0,481	-0,702	0,053	1,000							
Lipaza	-0,876	0,622	1,000	0,529	-0,997	-0,866	0,995	-0,999	0,879	-0,967	-0,899	-0,889	-0,958	0,966	-0,969	0,263	-0,010	0,732	0,720	1,000						
Vit C	0,935	-0,725	-0,991	-0,641	0,998	0,788	-0,971	0,985	-0,805	0,993	0,951	0,944	0,989	-0,992	0,994	-0,395	-0,129	-0,819	-0,616	-0,990	1,000					
p-kumar	0,983	-0,978	-0,775	-0,947	0,817	0,351	-0,705	0,751	-0,377	0,909	0,973	0,978	0,922	-0,911	0,906	-0,816	-0,627	-0,998	-0,115	-0,773	0,853	1,000				
Ferul	0,801	-0,508	-0,990	-0,406	0,978	0,926	-0,999	0,994	-0,937	0,923	0,830	0,817	0,910	-0,921	0,926	-0,127	0,148	-0,631	-0,809	-0,990	0,962	0,678	1,000			
Sin	-0,964	0,785	0,974	0,709	-0,987	-0,727	0,945	-0,965	0,747	-1,000	-0,976	-0,970	-0,998	1,000	-1,000	0,478	0,220	0,869	0,541	0,973	-0,996	-0,898	-0,932	1,000		
Q	1,000	-0,921	-0,880	-0,870	0,911	0,521	-0,826	0,862	-0,545	0,971	0,999	1,000	0,978	-0,972	0,969	-0,692	-0,469	-0,968	-0,300	-0,878	0,936	0,982	0,804	-0,965	1,000	
K	-0,704	0,374	0,958	0,266	-0,935	-0,972	0,982	-0,968	0,978	-0,855	-0,738	-0,722	-0,838	0,852	-0,859	-0,022	-0,294	0,508	0,887	0,959	-0,910	-0,561	-0,989	0,868	-0,707	1,000

*Proantoc = proantocijanidini, Fenol kis = fenolne kiseline, Hidroksicim=hidroksicimetne kiseline, Seceri=topivi šećeri, Glukozin = glukozinolati, Chl a = klorofil a, Chl b = klorofil b, Karot = karotrnoidi, Porf = porfirini, ABTS = antioksidacijski kapacitet mjeren metodom ABTS, FRAP = antioksidacijski kapacitet mjeren metodom FRAP, DPPH = antioksidacijski kapacitet mjeren metodom DPPH, Amilaza = sposobnost inhibicije enzima α-amilaza, Lipaza = sposobnost inhibicije enzima lipaza, Vit C = vitamin C, p.kumar = p-kumarinska kiselina, Ferul = ferulična kiselina, Sin = sinapinska kiselina, Q = kvercetin, K = kempferol.

RASPRAVA

4. RASPRAVA

Zbog klimatskih promjena sve su češće iznenadne i intenzivne promjene vremenskih uvjeta. Nepokretni organizmi poput biljaka ne mogu se „skloniti“ s visokih ili niskih temperatura, već prilagođavaju svoj metabolizam novonastalim uvjetima kako bi preživjele. U sklopu ovog rada istražile smo utjecaj vode snižene (led) i povišene temperature (80°C) na metabolizam mladih biljaka brokule s ciljem *a*) definiranja susceptibilnih i otpornih parametara ove biljke tijekom stresa vodom niske i visoke temperature, *b*) utvrđivanja stupnja promjene metabolizma brokule uslijed ova dva tipa stresa, te *c*) utvrđivanja stupnja promjene bioloških učinaka ekstrakata brokule uslijed navedenih tipova stresa. Naša hipoteza je da će tretmani vodom snižene temperature i povišene temperature značajno promijeniti određene parametre metabolizma brokule i da će te promjene biti specifične za pojedini tretman.

Fotosinteza je najvažniji izvor energije za rast biljaka (Li i sur., 2018) pri čemu je klorofil ključni pigment ovog procesa. Fotosintetska reakcija podijeljena je u tri koraka: 1) primarna reakcija, 2) fotosintetski prijenos elektrona i fotofosforilacija i 3) asimilacija ugljika. Klorofil *a* i *b* neophodni su za primarnu reakciju. Ukoliko je njihov udio u biljci značajno promijenjen, mogućnost korištenja Sunčeve energije za rast bit će promijenjena, a samim time i razvoj i funkcioniranje biljnog organizma. Fotosintetska prilagodba biljaka središnji je aspekt obrambenog odgovora biljaka na temperaturni stres, varira među biljnim vrstama i smatra ju se najboljim indikatorom stupnja termotolerancije (Ara i sur., 2013). Mogući biokemijski i fiziološki procesi na koje utječe visoka temperatura uključuju aktivnost fotosintetskih enzima poput enzima Rubisco, permeabilnost i integritet membrana, posebice tilakoidnih, fotorespiracija, fotofosforilacija, tok elektrona u kloroplastima i translokacija asimilata (Ara i sur., 2013), što u konačnici utječe na cijeli metabolizam biljke. U našem radu, tretman vodom snižene i povišene temperature nije značajno

utjecao na koncentraciju klorofila *a* u mladim biljkama brokule, no zato je voda povišene temperature značajno povećala koncentraciju klorofila *b*. Isti slučaj zabilježile smo i za likopen i za porfirine, voda povišene temperature značajno je povećala koncentraciju, dok voda snižene temperature nije utjecala na njihovu koncentraciju. Sličan rezultat, samo tretmanom sušom, a ne vodom visoke temperature, zabilježen je i kod mladih biljaka pekinškog kupusa (Šola i sur., 2021). Isto tako, kod genotipova riže koji su bili visoko otporni na stres visokom temperaturom također je zabilježen porast udjela klorofila *b* (Zafar i sur., 2017). Pretpostavlja se da je visok udio klorofila *b* povezan s tolerancijom na visoku temperaturu. S obzirom da je klorofil *a* primarni pigment fotosinteze, tj. primarni donor elektrona u transportnom lancu elektrona, stabilnost ove strukture u različitim uvjetima okoliša od izuzetne je važnosti za preživljavanje biljke i vjerojatno zato nije došlo do promjene njegova udjela u brokuli uslijed temperaturnog stresa. S druge strane, poznato je da biljke koje dobivaju manje Sunčeve energije (biljke sjene) sadrže više klorofila *b* koji im pomaže apsorbirati širi spektar valnih duljina i tako „bolje“ iskoristiti Sunce. Moguće je da je do sličnog mehanizma došlo i kod biljaka brokule tretiranih vrućom vodom, povećani udio klorofila *b* zapravo im je „pomagao“ dodatno iskoristiti Sunčevu energiju i bolje se prilagoditi stresu. Tewari i Tripathy (1998) zabilježili su drugačiji rezultat kod klijanaca krastavaca. Naime, oni su klijance krastavca tretirali niskom (7°C) i visokom (42°C) temperaturom i u oba slučaja zabilježili pad udjela ukupnog klorofila, s tim da je do značajnijeg pada udjela došlo tretmanom niskom nego visokom temperaturom.

Zanimljivo je primijetiti da je u slučaju koncentracije ukupnih karotenoida situacija bila upravo obrnuta. Naime, voda povišene temperature značajno je snizila njihovu koncentraciju, dok između kontrolne i skupine tretirane vodom snižene temperature nije bilo značajne razlike. Isti rezultat zabilježen je i kod različitih genotipova riže (Zafar i sur., 2017) i pšenice (Efeoglu i

Terzioglu, 2009). Na temelju ovoga zaključujemo da je uslijed tretmana vodom povišene temperature došlo do značajno intenzivnijeg pada koncentracije spojeva iz skupine karotenoida koji nisu likopen u odnosu na porast koncentracije samog likopena. To pak znači da su određeni spojevi iz skupine karotenoida osjetljiviji na tretman vodom povišene temperature nego sam likopen.

Omjer ukupnih klorofila i karotenoida pokazatelj je oštećenja biljke i njenog fotosintetskog aparata. Vrijednosti niže od 4.2 ukazuju na senescenciju, stres i bržu degradaciju klorofila od karotenoida (Zietz i sur., 2010). Iako u našem radu nismo zabilježile vrijednosti niže od 4.2, uočile smo smanjenje vrijednosti kod tretmana vodom niske temperature i povećanje vrijednosti kod tretmana vodom visoke temperature.

Proantocijanidini ili kondenzirani tanini, kako ih se još naziva, zbog svojstva adstringentnosti služe biljci za obranu od patogena i predatora, a zbog svog antioksidacijskog potencijala štite ju i od abiotičkog stresa (Rauf i sur., 2019). Koncentracija ukupnih proantocijanidina najveća je bila kod skupine tretirane vodom povišene temperature, dok kod one tretirane vodom snižene temperature ta vrijednost nije se statistički značajno razlikovala od vrijednosti kontrolne skupine. Suprotno ovom rezultatu, veći udio proantocijanidina zabilježen je u koži i sjemenkama plodova vinove loze koja je uzgajana pri niskoj temperaturi (Poudel i sur., 2020). Ovo ukazuje na specifičan odgovor različitih biljnih vrsta na razini ukupnih proantocijanidina spram temperaturnog stresa.

Akumulacija kemijskih spojeva poput prolina, šećera i poliola obično se smatra osnovnom strategijom zaštite i preživljavanja biljaka tijekom abiotičkog stresa (Chen i sur., 2007). Šećeri su poznati kao jedna od glavnih skupina osmoprotektanata. Udio topivih šećera najveći je bio kod skupine tretirane vodom povišene temperature. Slično kao i u našem radu, kratkotrajni stres

visokom temperaturom uzrokovao je povećanje udjela šećera u većini genotipova vrste *Vigna aconitifolia* (Harsh i sur., 2016). Međutim, suprotno našem očekivanju, kod skupine tretirane vodom snižene temperature udio je bio statistički značajno manji nego kod kontrolne skupine. Naime, akumulacija topivih šećera uobičajena je pojava kod stresa hladnoćom (Tarkowski i Van den Ende, 2015) pa je ovakav rezultat zanimljiv i sugerira dodatne analize. Topivi šećeri pomažu biljci u prilagodbi na temperaturne uvjete tako da potpomažu očvršćivanje staničnih membrana biljke i time sprječavaju uništavanje stanica. U radu Yuanyuan i sur. (2009) opisano je takvo djelovanje topivih šećera pri uvjetima hladnog šoka. S obzirom da mi nismo sasvim smrjavale biljke, već ih samo zalijevale hladnom vodom moguće je da šok nije bio dovoljno velik, te nije bilo potrebe za sintezom topivih šećera.

Glukozinolati su skupina specijaliziranih metabolita koji sadrže dušik i sumpor. Biljke ih sintetiziraju kao odgovor na stres i važna su nutritivna komponenta žitarica iz porodice kupusnjača (Brassicaceae). Glukozinolati i proizvodi njihove hidrolize imaju ključnu ulogu u rastu i razvoju biljaka, njihovom okusu, te obrambenom sustavu (Becker, 2015). Biljkama iz porodice kupusnjača daju njihov karakterističan okus i miris. U našem radu na mladoj brokuli zabilježile smo značajne promjene udjela ukupnih glukozinolata nakon oba tretmana. Voda snižene temperature značajno je povećala udio ovih spojeva, a voda visoke temperature ih je snizila. Ovo nam ukazuje na visok stupanj susceptibilnosti glukozinolata brokule spram temperaturnog stresa, te na specifičnost odgovora ovisno o temperaturi. Ovakvi rezultati ukazuju na potencijal korištenja niske temperature za uzgoj brokule obogaćene glukozinolatima. Slično našem rezultatu, dokazano je kako se količina svih tipova glukozinolata smanjuje s povišenjem temperature kod crvenog kupusa (Oerlemans i sur., 2006). Isto tako, niska temperatura povećala je koncentraciju ukupnih glukozinolata I u kelju (Hykkerud-Steindal i sur., 2015; Ljubej i sur., 2021).

Udio hidroksicimetnih kiselina, kao i flavonola, značajno se smanjio kod skupine tretirane vodom povišene temperature, dok se kod skupine tretirane vodom snižene temperature nije statistički značajno razlikovao u odnosu na kontrolu. Jedna od primarnih zadaća hidroksicimetnih kiselina je ta što biljci pruža zaštitu od UV zračenja te su u listovima pronađene i najveće koncentracije ovih komponenata (Ivančić, 2019). U radu Cartea i sur. (2011) pokazano je da blanširanje (kuhanjem na pari pri temperaturi od oko 80°C) povrća iz roda *Brassica* ne mora nužno uzrokovati gubitak antioksidativnih svojstava, već može dovesti i do značajnog povećanja koncentracije određenih komponenti u pojedinim vrstama ovog povrća. Ove rezultate možemo usporediti i s našima jer se temperatura kuhanja na pari i temperatura vode kojom smo zalijevale brokule kreću oko 80°C.

Prethodna istraživanja pokazala su diferencijalnu akumulaciju fenolnih spojeva u biljkama ovisno o tipu abiotičkog stresa (Martinez i sur., 2016). S obzirom da smo mi primijenile dva različita tipa stresa, također smo očekivale različite koncentracije fenolnih spojeva ovisno o tome je li brokula tretirana vodom snižene ili povišene temperature. Flavonoli koje smo metodom RP-HPLC identificirale u brokuli su kempferol i kvercetin. Kempferol je zastupljen s otprilike 3 x većom koncentracijom nego kvercetin. Voda snižene temperature nije značajno promijenila koncentraciju ovih flavonola, međutim voda povišene temperature je koncentraciju kempferola značajno snizila, a koncentraciju kvercetina povicila. Kod rajčice uzgajane pri povišenoj temperaturi zabilježen je isti rezultat vezano uz kvercetin, no u tom varijetetu je i koncentracija kempferola porasla (Martinez i sur., 2016).

Vitamin C (askorbinska kiselina) jedan je od najvažnijih parametara nutritivne kvalitete prehrambenih biljaka i esencijalni je nutrijent za ljudski organizam jer je snažan antioksidans i enzimski kofaktor (Yoon i sur., 2017). Koncentracija vitamina C značajno se povećala kod brokule

tretirane vodom povišene temperature, dok kod skupine tretirane vodom snižene temperature nije došlo do značajne promjene u odnosu na kontrolu. Isto kao i u našem radu, u vrsti *Festuca arundinacea* Schreb koncentracija vitamina C je značajno porasla paralelno s povećanjem temperature (Chen i sur., 2017). U radu provedenom na agrumima koji su najbogatiji vitaminom C utvrđeno je kako temperatura obrade voća značajno utječe na koncentraciju vitamina C. Tako je utvrđeno kako je koncentracija vitamina C veća kod soka iscijeđenog pri temperaturi od 20°C nego kod onih na temperaturi od 80°C (Njoku i sur., 2011). To ukazuje na termolabilnost vitamina C prilikom obrade biljnog materijala i, ono što je još važnije, na potpuno drugačiji učinak visoke temperature na ovaj vitamin u netaknutoj živoj biljci i ubranom biljnom materijalu.

Na koncentraciju ferulične kiseline u brokuli stres hladnom vodom nije značajno utjecao, ali je zato stres vrućom vodom značajno povećao koncentraciju ove kiseline. Laddomada i sur. (2022) nedavno su objavili da kod pšenice stres visokom temperaturom nije značajno utjecao na koncentraciju ove komponente. Król i sur. (2015) zabilježili su pad koncentracije ferulične kiseline u listovima vinove loze tretirane niskom temperaturom. S druge strane, u klijancima rajčice (Alhaithloul i sur., 2021) i pekinškom kupusu (Eom i sur., 2022) zabilježen je porast koncentracije ferulične kiseline nakon stresa niskom temperaturom, što sve upućuje na specifičan odgovor različitih vrsta spram temperaturnog stresa na razini ove fenolne kiseline. Ovakve razlike u rezultatima mogu se pripisati razlikama u intenzitetu i duljini trajanja stresa, stadiju razvoja biljke te dijelu biljke koji se analizira, npr. cvijet, plod, list, stabljika, korijen (Weidner i sur., 2009).

Sinapinska kiselina u brokuli izrazito je osjetljiva na stres povišenom temperaturom i koncentracija joj se smanjila gotovo u pola, dok tretman hladnom vodom nije značajno utjecao. Za usporedbu, nedavno su Eom i sur. (2022) zabilježili porast koncentracije ove kiseline u

pekinškom kupusu tretiranom hladnim stresom, a Laddomada i sur. (2022) nisu uočili značajnu promjenu koncentracije ove kiseline u pšenici uzgajanoj pri povišenoj temperaturi.

Kempferol je dominantno zastupljeni flavonol u mladoj brokuli. Njegova koncentracija je gotovo 3 puta veća od koncentracije kvercetina. Tretman vodom snižene temperature nije značajno utjecao na koncentraciju kempferola, međutim tretman vrućom vodom doveo je do značajnog snižavanja njegove koncentracije. Iz ovoga zaključujemo da matriks brokule bolje „štiti“ kempferol od stresa hladnoćom, nego povišenom temperaturom. Zanimljivo je da je kod klijanaca rajčice tretiranih niskom i visokom temperaturom koncentracija kempferola porasla (Alhailoul i sur., 2021).

Koncentracija kvercetina u brokuli je pod utjecajem vode visoke temperature značajno porasla, dok ledena voda nije pokazala značajan učinak. Za usporedbu, kod klijanaca rajčice tretiranih koncentracija kvercetina je porasla i nakon tretmana niskom i visokom temperaturom (Alhailoul i sur., 2021). S obzirom da je kod brokule stres povišenom temperaturom uzrokovao povećanje koncentracije kvercetina, a smanjivanje koncentracije kempferola, pretpostavljamo da u obrani ove vrste od visoke temperature značajniju ulogu ima kvercetin, iako je prisutan u bitno manjoj koncentraciji od kempferola. Također, na temelju ovog rezultata pretpostavljamo da su kvercetin i kempferol u brokuli međusobno u antagonističkom odnosu tijekom stresa povišenom temperaturom.

Oba tretmana povisila su koncentraciju *p*-kumarinske kiseline u brokuli. Ova kiselina važna je za biljni organizam jer je prekursor polifenolnih spojeva poput flavonoida i ostalih fenolnih kiselina kao što su kavena, ferulična, klorogenska i sinapinska kiselina, te lignina (Ferreira i sur., 2018), spoja u stijenci biljnih stanica koji doprinosi njihovoj čvrstoći i zaštiti od okolišnih uvjeta. Pretpostavljamo da je to jedan od mogućih razloga zašto su oba tipa stresa dovela do povećanja

koncentracije *p*-kumarinske kiseline; kako bi se biljku opskrbilo glavnim prekursorom niza obrambenih spojeva. Isti rezultat zabilježen je i kod pekinškog kupusa (Eom i sur., 2022), različitih kultivara pšenice izloženih toplinskom stresu (Laddomada i sur., 2021), rajčice (Martinez i sur., 2016; Alhaithloul i sur., 2021) i genotipu Predator vrste *Festuca trachyphylla* (Wang i sur., 2019). Međutim, suprotno našem rezultatu, Król i sur. (2015) zabilježili su pad koncentracije *p*-kumarinske kiseline u listovima vinove loze koju su podvrgli stresu niskom temperaturom u trajanju od tjedan dana, što nam sugerira specifičnost obrambenog odgovora posredovanog *p*-kumarinskom kiselinom kod različitih biljnih vrsta. Za *p*-kumarinsku kiselinu dokazana je sposobnost ublažavanja simptoma dijabetesa (Adisakwattana i sur., 2004; Park i sur., 2008; Pei i sur., 2016) različitim mehanizmima poput poboljšavanja funkcije β -stanica, povećavanja ekspresije gena za transportere glukoze, poboljšavanja antioksidacijskog i anti-upalnog djelovanja, moduliranja ili inhibicije enzima uključenih u metabolizam glukoze. Činjenica da je tretman vodom snižene temperature doveo do značajnog porasta koncentracije ove kiseline govori o velikom potencijalu primjene ovakvog tipa stresa za uzgoj brokule povećane zdravstvene vrijednosti.

Kako bismo provjerile učinak tretmana vodom visoke/niske temperature na bioaktivnost ekstrakata brokule, izmjerile smo njihov antioksidacijski i potencijal inhibicije aktivnosti enzima povezanih s dijabetesom, α -amilaze i lipaze. Oksidacijski stres uobičajeni je odgovor biljaka izloženih ekstremnim temperaturama (Hasanuzzaman i sur., 2013). Tijekom temperaturnog stresa, proizvodnja velike količine ROS-ova može biti glavni faktor rizika biljnim stanicama i zato se u njima potiče ekspresija ROS-detoksificirajućih enzima ili antioksidansa (Hossain i Fujita, 2011). Iako gotovo svi organizmi posjeduju antioksidanse i nekoliko enzimatskih sustava kao što su superoksid-dismutaza, katalaza, glutathion-peroksidaza i glutathion-reduktaza kako bi se zaštitili od

oksidacijskog oštećenja, ovi sustavi ne mogu u potpunosti spriječiti štetu. Stoga su potrebni antioksidansi ili hrana koja sadrži visoke koncentracije antioksidansa koji mogu pomoći u uklanjanju slobodnih radikala i smanjenju oksidacijskog oštećenja. Trenutno dostupni sintetski antioksidansi, uključujući butilirani hidroksitoluen (BHT), butilirani hidroksianizol (BHA), galnu kiselinu, itd., imaju mnoge nuspojave na ljudsko zdravlje (Shah i Modi, 2015). Stoga je njihova primjena ograničena i postoji trend njihove zamjene prirodnim antioksidansima iz biljaka. S obzirom da postoje različiti tipovi antioksidansa u biljnoj stanici, upotrijebile smo tri različite metode mjerenja antioksidacijskog potencijala, ABTS, DPPH i FRAP kako bismo dobile što pouzdanije informacije. S obzirom da je metoda ABTS osjetljivija od ostale tri (Floegel i sur. 2011, Almeida i sur. 2011) jer je ABTS topiv i u vodenom i u organskom mediju što ga, za analizu hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa i pigmentata, čini osjetljivijim i prikladnijim od DPPH i FRAP (Floegel i sur. 2011, Almeida i sur. 2011), očekivale smo razliku u odnosu na kontrolnu skupinu zabilježiti prvenstveno ovom metodom, no to nije bilo tako. Niti jedan od tretmana nije značajno promijenio antioksidacijski potencijal izmjeren metodama ABTS i FRAP, ali su zato oba uzrokovala pad potencijala mjeren metodom DPPH. Ovakva razlika u rezultatima između različitih metoda posljedica je različitih vrsta antioksidansa prisutnih u uzorcima koji reagiraju drugačije s korištenim radikalima. Sličan rezultat, vezano uz prikladnost metoda, zabilježili su Shah i Modi (2015) prilikom mjerenja antioksidacijskog potencijala micelija različitih vrsta gljiva. Na temelju ovih rezultata zaključujemo da upotrebom vode niske ili visoke temperature ne možemo značajno poboljšati antioksidacijski potencijal brokule; čak štoviše, prema metodi DPPH taj potencijal se smanji. Sličan rezultat zabilježen je već i na povrću vrste *Brassica oleracea*; kod skupine *acephala* (kelj) ABTS metoda je pokazala snižavanje antioksidacijskog potencijala, dok kod skupine *capitata* (kupus) nije bilo značajnog utjecaja (Soengas i sur., 2018). Isto tako, kod

pekinškog kupusa tretiranog niskom temperaturom smanjen je antioksidacijski potencijal mjeren metodama DPPH i ORAC, kao i aktivnost ključnih antioksidacijskih enzima katalaze i peroksidaze (Eom i sur., 2022).

Inhibicija α -amilaze, enzima koji igra važnu ulogu u probavi škroba i glikogena, smatra se strategijom liječenja poremećaja unosa ugljikohidrata, kao što su dijabetes i pretilost, kao i zubnog karijesa i parodontalne bolesti (de Sales i sur., 2012). Biljke su važan izvor kemijskih spojeva s potencijalom inhibicije α -amilaze i može ih se koristiti kao terapijsku ili funkcionalnu hranu. Do sada je zabilježeno oko 800 biljnih vrsta s antidijabetičkim svojstvima (de Sales i sur., 2012). Između ostalih, testirani su i ekstrakti dvaju varijeteta brokule (*Brassica oleracea* L. convar. *Italica botrytis* (L.) Alef. var. *cymosa* Duch. (Broccolo Fiolaro) and *Brassica oleracea acephala* L. convar. *acephala* (DC.) Alef. var. *sabellica* L. (Cavolo Nero)) i oba su pokazala sposobnost inhibicije aktivnosti α -amilaze (Mollica i sur., 2018). U našem radu, skupina tretirana vodom snižene temperature značajno je jače inhibirala aktivnost ovog enzima od kontrolne i skupine tretirane vodom povišene temperature. Sposobnost inhibicije α -amilaze skupine tretirane vodom povišene temperature i kontrolne skupine nije se značajno razlikovala. U usporedbi s potencijalom inhibicije ovog enzima standardom akarbozom koncentracije 20 mg/mL, naši ekstrakti brokule imali su znatno niži potencijal. No činjenica da se konzumacijom ekstrakata brokule, osim inhibitora α -amilaze, unosi i niz drugih bioaktivnih spojeva pozitivnog učinka na ljudski organizam, daje dodatnu vrijednost upotrebi ove biljne vrste u svakodnevnoj prehrani. S obzirom na naš rezultat, ukoliko je jedan od ciljeva konzumacije brokule i antidijabetički učinak, svakako bi bilo razumno brokulu tijekom uzgoja tretirati ledenom vodom kako bi se njen potencijal inhibicije α -amilaze značajno povećao. Ovaj rezultat ujedno sugerira daljnje istraživanje mogućnosti korištenja stresa ledenom vodom za povećanje antidijabetičkih svojstava biljnih vrsta.

Pretilost je snažan čimbenik rizika za razne bolesti, poput hipertenzije, arterioskleroze i dijabetesa (Danis i sur., 2015). Učinkovit način prevencije pretilosti jest inhibicija apsorpcije masti iz crijeva. Lipaza gušterače ključni je enzim za apsorpciju lipida. Samo mali broj tvari kao što je orlistat (tetrahidrolipstatin) dolazi direktno u interakciju s lipazama i inhibira njihovu aktivnost (Ballinger i Peikin, 2002), međutim takve tvari uzrokuju neugodne nuspojave u gastrointestinalnom sustavu i bubrezima i, uz to, su skupe. Stoga je jedan od pristupa smanjenju pretilosti liječenje prirodnim proizvodima. Danas je poznato da mnoge biljne vrste inhibiraju aktivnost lipaza i to zahvaljujući prisutnosti specijaliziranih metabolita kao što su polifenoli, benzopironi čiji članovi uključuju flavonoide, saponine, kumarine itd. koji su snažni inhibitori pankreasne lipaze. Nedavno su Elsbaey i sur. (2019) analizirali potencijal metanolnih ekstrakata dvanaest ljekovitih biljnih vrsta i četiri tipa poljoprivrednog otpada da inhibiraju aktivnost lipaze. Rezultati su pokazali da metanolni ekstrakti koncentracije 800 µg/mL grančica bijele topole (*Populus alba*), zeleni *Ononis vaginalis* i *Asparagus stipularis* imaju izuzetnu sposobnost inhibicije lipaze, redom 98%, 94% i 92%. Za usporedbu, standard orlistat koncentracije 1 µg/mL pokazao je 90% inhibicije. Ciljanim frakcioniranjem i izolacijom, identificirano je devet inhibitora pankreasne lipaze, među kojima su flavonoidi taksifolin i ampelopsin bili su najjači inhibitori, a odmah nakon njih *p*-hidroksibenzojeva kiselina. Na temelju tih rezultata zaključeno je da bi flavonoidi i fenolne kiseline iz grančica bijele topole mogli služiti kao osnova za razvoj novih lijekova za inhibiciju lipaze. Koliko nam je poznato, do sada nema objavljenih podataka o utjecaju temperaturnog stresa na sposobnost ekstrakta biljke da inhibira lipazu. Stoga smo mi u sklopu svog rada istražile upravo to - hoće li temperaturni stres promijeniti fitokemijski sastav do te mjere da se i sposobnost inhibicije lipaze ekstraktom biljke značajno promijeni. Rezultati su pokazali da je tretman vodom povišene temperature značajno smanjio sposobnost ekstrakta brokule da inhibira

aktivnost lipaze. Kod skupine tretirane vodom snižene temperature sposobnost inhibicije lipaze nije se značajno razlikovala u odnosu na kontrolnu skupinu. Također, vrijednosti inhibicije bile su relativno blizu postotcima inhibicije standarda orlistata koncentracije 20 mg/mL, što ukazuje na potencijal brokule u tu svrhu i sugerira daljnja istraživanja u ovom smjeru. Ovakav rezultat ukazuje na to da visoka temperatura negativno djeluje na spojeve brokule koji inhibiraju aktivnost lipaze i ukoliko se želi sačuvati taj potencijal, brokulu svakako ne bi trebalo izlagati visokoj temperaturi.

Analiza glavnih komponenata (PCA) jasno je razdvojila tri analizirane skupine biljaka; s obzirom na PC 1, tretman povišenom temperaturom odvojio se od ostala dva tretmana, dok je s obzirom na PC 2, tretman vodom snižene temperature udaljeniji od kontrolne skupine nego tretman vodom povišene temperature. Odvajanju skupine tretirane vodom povišene temperature dominantno su doprinijeli klorofili, likopen, porfirini, vitamin C, fenolni spojevi i šećeri. Odvajanju skupine tretirane vodom snižene temperature dominantno su doprinijeli sposobnost inhibicije aktivnosti enzima α -amilaze i lipaze, glukozinolati, hidroksicimetne kiseline i flavonoli. Konačno, odvajanju kontrolne skupine od testnih najviše su doprinijeli flavonoidi, tanini i antioksidacijski potencijal (mjereno bilo kojom od 3 metode). Dodatna statistička metoda, tzv. metoda hijerarhijskog klasteriranja pokazala je veću sličnost između kontrolne i skupine tretirane vodom snižene temperature, dok se skupina tretirana vodom povišene temperature značajnije odvojila. Na temelju ovoga zaključujemo da je, na temelju parametara koje smo analizirale, tretman vodom povišene temperature značajnije promijenio brokulu od tretmana vodom snižene temperature. Ovom zaključku doprinosi i fenotip biljaka, naime skupina tretirana vodom povišene temperature značajnije se razlikovala od ostale dvije skupine, te biljke bile su manje i sitnijih listova. Očigledno se fitokemijski sastav reflektirao na fenotip.

Što se tiče korelacija između pojedinih parametara, uočile smo vrlo visoku pozitivnu korelaciju antioksidacijske aktivnosti mjerene metodama ABTS i DPPH s ukupnim flavonoidima i taninima, što sugerira da su upravo ovi spojevi bili ključni za antioksidacijsko djelovanje ekstrakata. Zabilježile smo i vrlo visoku pozitivnu korelaciju inhibicije aktivnosti enzima α -amilaze s ukupnim glukozinolatima. Za usporedbu, Truong i Koyama (2020) su svojim *in vivo* istraživanjima na miševima otkrili da svakodnevna konzumacija sinigrina, jednog od najčešće zastupljenih glukozinolata u biljkama, smanjuje količinu glukoze u plazmi, razinu triglicerida i rezistenciju na inzulin te tako ispoljava antidijabetički učinak. Ovi podaci svakako sugeriraju daljnja detaljnija istraživanja primijenjivosti glukozinolata u liječenju dijabetesa tipa II, kao i strategija kako povećati njihovu koncentraciju u biljci.

Inhibicija aktivnosti enzima lipaze 100% pozitivno je korelirala s ukupnim flavonolima brokule. Isto tako, inhibicija ovog enzima vrlo je visoko pozitivno korelirala s ukupnim hidroksicimetnim kiselinama i karotenoidima, sinapinskom kiselinom i kempferolom. Kao što smo već prethodno napomenule, Elsbaey i sur. (2019) identificirali su flavonoide i fenolne kiseline kao najpotentniju skupinu spojeva u inhibiciji lipaze, i naši rezultati se u potpunosti slažu s njihovima. Karotenoid fukoksantin i njegov metabolit fukoksantinol iz jestivih morskih algi također su već prepoznati kao potencijalni inhibitori lipaze (Lunagariya i sur., 2014), a naši rezultati na brokuli pokazuju da bi se karotenoidne spojeve s potencijalom inhibicije lipaze moglo tražiti i među biljkama; u našem slučaju, konkretno u brokuli.

ZAKLJUČAK

5. ZAKLJUČAK

Klimatske promjene globalni su problem koji je promijenio i fiziološke i biokemijske parametre biljaka, te smanjio produktivnost usjeva. S obzirom na to su biljke sesilni organizmi, njihov opstanak ovisi o učinkovitoj aktivaciji metaboličkih mehanizama otpornosti na takav stres. U sklopu ovog rada istražile smo utjecaj vode niske i visoke temperature na metabolički odgovor brokule kako bismo definirale otporne i susceptibilne varijable brokule pod utjecajem temperaturnog stresa, te izdvojile one koje bi se potencijalno moglo koristiti kao biomarkere određenog tipa stresa u brokuli. Također, diskutirale smo mogućnost primjene određenog tipa stresa za uzgoj brokula obogaćenih spojevima od interesa za ljudsko zdravlje.

Varijable na koje su tretmani vodom povišene i snižene temperature djelovali oprečno su topivi šećeri i intaktni glukozinolati. Ovo nam sugerira da bi se ove dvije skupine spojeva moglo koristiti kao pouzdane biomarkere stresa uzrokovanog hladnom i vrućom vodom kod biljaka brokule. S obzirom da je voda povišene temperature povisila udio topivih šećera u brokuli, svakako bi valjalo dalje istražiti njihovu ulogu u obrambenom odgovoru ove vrste spram navedenog tipa stresa. Činjenica da je tretman hladnom vodom snizio udio topivih šećera u mladoj brokuli i istovremeno povisio sposobnost njenog ekstrakta da inhibira aktivnost enzima α -amilaze, sugerira mogućnost primjene ovakvog tipa stresa za uzgoj brokula prihvatljivijih osobama koje pate od dijabetesa tipa II. Ovaj rezultat svakako upućuje na daljnje detaljnije istraživanje utjecaja stresa hladnom vodom na antidijabetički potencijal brokule, a onda i drugih biljnih vrsta. Tretman hladnom vodom povisio je i udio intaktnih glukozinolata, spojeva s dokazanim snažnim antikancerogenim djelovanjem, u mladim brokula pa na temelju toga zaključujemo da je svakako zanimljiv za daljnja istraživanja i primjenu u svakodnevnom životu.

LITERATURA

LITERATURA

Adisakwattana S., Sookkongwaree K., Roengsumran S., Petsom A., Ngamrojnavanich N., Chavasiri W., Deesamer, S., Yibchok-anun S. (2004): Structure–activity relationships of trans-cinnamic acid derivatives on α -glucosidase inhibition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **14**: 2893–2896.

Alhaithloul H.A.S., Galal F.H., Seufi A.M. (2021): Effect of extreme temperature changes on phenolic, flavonoid contents and antioxidant activity of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *Peer Journal*, br.11193.

Allen D.J., Ort D.R. (2001): Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science*, **6**: 36–42.

Almeida M.M.B., De Sousa P.H.M., Arriaga A.M.C., Prado G. (2011): Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, **44**: 2155-2159.

Ara N., Yang J., Hu Z., Zhang M.F. (2013): Determination of heat tolerance of interspecific (*Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata*) inbred line of squash 'Maxchata' and its parents through photosynthetic response. *Tarim Bilimleri Dergisi*, **19**: 188-197.

Ballinger A., Peikin S. (2002): Orlistat: Its current status as an anti-obesity drug. *European Journal of Pharmacology*, **440**:109-17.

Becker T.M. (2015): The glucosinolate/myrosinase system: variation in glucosinolates, hydrolysis products, transcript abundance, and quinone reductase bioactivity in *Brassica sp.* Doctoral Dissertation. University of Illinois at Urbana-Champaign, Lincoln Hall, 702 S Wright St, Urbana, IL 61801.

Bendarek P., Osburn A. (2009): Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science*, **324**: 746-748.

Buchanan B.B., Grisse W., Jones R.L. (2015): Freezing and chilling stress. In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, 2nd Ed., Eds. Buchanan B.B., Grisse W. and Jones R.J. West Sussex, UK: Wiley Blackwell, 1068-1075.

Cartea M.E., Francisco M., Soengas P., Velasco P. (2011): Phenolic compounds in *Brassicae* vegetables. *Molecules*, **16**: 251-280.

Chen T.H.H. (1994): Plant adaptation to low temperature stress. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **16**: 231–236.

Chen W. P., Li P.H. (2002): Attenuation of reactive oxygen production during chilling in ABA-treated maize cultured cells. In: *Plant Cold Hardiness*, Eds. Li C. and Palva E.T. Dordrecht, UK: Kluwer Academic Publishers, 223–233.

Chen XS, Li YF, Cai YH, Xie YH, Deng ZM, Li F, Hou ZY (2019) Differential strategies to tolerate flooding in *Polygonum hydropiper* plants originating from low- and high-elevation habitats. *Frontiers in Plant Science*, **9**:1970

Chen, Z., Cuin, T.A., Zhou, M., Twomey, A., Naidu, B.P., Shabala, S., 2007. Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 4245–4255.

Cramer G.R., Urano K., Delrot S., Pezzotti M., Shinozaki K. (2011): Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, **11**: 163.

Danis O., Ogan A., Anbar D., Dursun B.Y., Demir S., Salan U. (2015) Inhibition of pancreatic lipase by culinary plant extracts. *International Journal of Plant Biology & Research*, **3**: br. 1038.

De Palma M., Grillo S., Massarelli I., Costa A., Balogh G., Vigh L., et al.(2008): Regulation of desaturase gene expression, changes in membrane lipid composition and freezing tolerance in potato plants. *Molecular Breeding*, **21**: 15–26.

De Sales P.M., Sousa P.M., Simeoni L.A., Magalhães P. (2012): α -amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **15**: 141 – 183.

- Deming J.W. (2002): Psychrophiles and polar regions. *Current Opinion in Microbiology*, **5**: 301–309.
- Edreira J.I.R., Otegui M.E. (2012): Heat stress in temperate and tropical maize hybrids: Differences in crop growth, biomass partitioning and reserves use. *Field Crops Research*, **130**: 87–98.
- Efeoglu, B., Terzioglu S. (2009): Photosynthetic responses of two wheat varieties to high temperature. *Eurasian Journal of Biosciences*, **3**: 97-106.
- Elsbaeya M., Amen J., Nakagawa T., Shimizu K. (2019): White poplar: Targeted isolation of pancreatic lipase inhibitors. *Industrial Crops and Products*, **141**: br. 111778.
- Eom S.H., Ahn M., Kim E., Lee H.J., Lee H.J. Wi S.H., Kim S.K., Lim H.B., Hyun T.K. (2022): Plant response to cold stress: cold stress changes antioxidant metabolism in heading type kimchi cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis*). *Antioxidants*, **11**: 700.
- Ferreira P.S., Victorelli F.D., Santos B.F., Chorilli M. (2018): A review of analytical methods for p-coumaric acid in plant-based products, beverages, and biological matrices. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, DOI:10.1080/10408347.2018.1459173.
- Fitter A., Hay R. (2002): Responses to environmental stress. In: *Environmental Physiology of Plants*, 3rd Ed., Eds. Fitter A. i Hay R. London, San Diego: Academic Press, 193-236.
- Flogel A., Kim D.O., Chung S.J., Koo S.I., Chun O.K. (2011): Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, **24**:1043-1048.
- Foyer C.H., Noctor G. (2003): Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia plantarum*, **119**: 355–364.
- Gunawardhana M.D.M., de Silva C.S. (2011): Impact of temperature and water stress on growth yield and related biochemical parameters of okra. *Tropical Agricultural Research*, **23**: 77–83.

Hagen S.F., Borge G.I.A., Solhaug K.A., Bengtsson G.B. (2009): Effect of cold storage and harvest date on bioactive compounds in curly kale (*Brassica oleracea* L. var *acephala*). *Postharvest Biology and Technology*, **51**: 36-42.

Harsh A., Sharma Y.K., Joshi U., Rampuria S., Singh G., Kumar S., Sharma R. (2016): Effect of short-term heat stress on total sugars, proline and some antioxidant enzymes in moth bean (*Vigna aconitifolia*). *Annals of Agricultural Sciences*, **61**: 57-64.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam M., Roychowdhury R., Fujita M. (2013): Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**: 9643–9684.

Hochachka P.W., Somero G.N. (2002): Temperature. In: *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. New York: Oxford University Press, 290-368.

Hossain M.A., Fujita M. (2011): Regulatory role of components of ascorbate-glutathione (AsA-GSH) pathway in plant tolerance to oxidative stress. In: *Oxidative Stress in Plants: Causes, Consequences and Tolerance*, Eds. Anjum, N.A., Umar S. i Ahmad A. IK International Publishing House Pvt. Ltd., 81–147

Hykkerud-Steindal A.L., Rødven R., Hansen E., Mølmann J. (2015): Effects of photoperiod, growth temperature and cold acclimatisation on glucosinolates, sugars and fatty acids in kale. *Food Chemistry*, **174**: 44-51.

Iba K. (2002): Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review Plant Biology*, **53**: 225–245.

Ivančić I. (2019): Promjene u sustavu i sadržaju fenolnih spojeva u listovima bijelih sorata vinove loze tijekom pojedinih fenofaza (diplomski rad). Agronomski fakultet, Zagreb.

Janska A., Mars P., Zelenkova S., Ovesna J. (2009): Cold stress and acclimation – what is important for metabolic adjustment? *Plant Biology*, **12**: 395–405.

Knight M., R., Knight H. (2012): Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants. *New Phytologist*, **195**:737–751.

Król A., Amarowicz R., Weidner S. (2015): The effects of cold stress on the phenolic compounds and antioxidant capacity of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. *Journal of Plant Physiology*, **189**: 97-104.

Laddomada B., Blanco A., Mita G., D'Amico L., Singh R.P., Ammar K., Crossa J., Guzmán C. (2022): Drought and heat stress impacts on phenolic acids accumulation in durum wheat cultivars. *Foods*, **10**: br. 2142.

Li Y., He N., Hou J., Xu L., Liu C., Zhang J., Wang Q., Zhang X., Wu X. (2018): Factors influencing leaf chlorophyll content in natural forests at the biome scale. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **6**: br. 64.

Lunagariya N.A., Patel N.K., Jagtap S.C., Bhutani K.K. (2014): Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives. *EXCLI Journal*, **13**: 897:921.

Ljubej V., Karalija E., Salopek-Sondi B., Šamec D. (2021): Effects of short-term exposure to low temperatures on proline, pigments, and phytochemicals level in kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*). *Horticulturae*, **7**: 341.

Ljubej V., Radojčić Redovniković I., Salopek-Sondi B., Smolko A., Roje S., Šamec D. (2021): Chilling and freezing temperature stress differently influence glucosinolates content in *brassica oleracea* var. *acephala*. *Plants*, **10**: 1305.

Martinez O., Bertos E., Torrecillas J., Ruiz C., Milia E., Lorenzo M.L., Jimenez B., Ortiz A., Rivas A. (2016): Phenolic compounds in extra virgin olive oil stimulate human osteoblastic cell proliferation. *PLoS ONE*, **11**: br. e0150045.

Moffatt B., Ewart V., Eastman A. (2006): Cold comfort: plant antifreeze proteins. *Physiologia Plantarum*, **126**: 5–16.

Mollica A., Stefanucci A., Zengin G., Locatelli M., Macedonio G., Orlando G., Ferrante C., Menghini L., Recinella L., Leone S., Chiavaroli A., Leporini L., Niso C., Brunetti L., Tayarab E., Ali I., Musa T.H., Musa H.H., Ahmed A.A. (2018): Polyphenolic composition, enzyme inhibitory effects ex-vivo and in-vivo studies on two Brassicaceae of north-central Italy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **107**: 129-138.

- Nampoothiri S.V., Prathapan A., Cherian O.L., Raghu K.G., 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 and Chemical Toxicology*, **49**: 125-131.
- Nievola C.C., Carvalho C.P., Carvalho V., Rodrigues E. (2017): Rapid responses of plants to temperature changes. *Temperature*, **4**: 371-405.
- Nyambe-Silavwe H., Villa-Rodriguez J.A., Ifie I., Holmes M., Azdin E., Jensen J.M.; Williamson G. (2015): Inhibition of human α -amylase by dietary polyphenols. *Journal of Functional Foods*, **19**: 723-732.
- Njoku P.C., Ayuk A.A., Okoye C.V. (2011): Temperature effects on vitamin C content in citrus fruits. *Pakistan Journal of Nutrition*, **10**: 1168-1169.
- Oerlemans K., Barrett D.M., Bosch-Suades C., Verkerk V., Dekker M. (2006): Thermal degradation of glucosinolates in red cabbage. *Food Chemistry*, **95**: 19-29.
- Park S. H, Kim D. S., Park S. H., Shin J. W., Youn S. W., Park K. C. (2008): Inhibitory effect of p-coumaric acid by *rhodiola sachalinensis* on melanin synthesis in B16F10 cells. *Pharmazie*, **63**: 290-295.
- Pei K., Ou J., Huang J., Ou S. (2016): p-coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **96**: 2952-2962.
- Preston J., Sandve S.R. (2013): Adaptation to seasonality and the winter freeze. *Frontiers in Plant Science*, **4**: 167.
- Radojčić Redovniković I., Cvjetko Bubalo M., Panić M., Radošević K. (2016): Biološki aktivni spojevi glukozinolati i polifenoli u cvatu, listu i stabljici brokule (*Brassica oleracea* var. *italica* L.). *Glasnik Zaštite Bilja*, **39**: 24-29.

- Rahman M.A., Chikushi J., Yoshida S., Karim A.J.M.S. (2009): Growth and yield components of wheat genotypes exposed to high temperature stress under control environment. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, **34**: 361–372.
- Rajashekar C.B. (2000): Cold response and freezing tolerance in plants. In: *Plant Environmental Interactions*, 2nd Edn., Eds. Wilkinson R.E. New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 321–341.
- Rakow G. (2004): Species origin and economic importance of *Brassica* in biotechnology. In: *Brassica*, Eds. Pua E.-C. i Douglas C.J. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Rauf A., Imran M., Izneid T., Haq I., Patel S., Pan X., Naz S., Silva A.S., Saeed F., Suleria H.A.R. (2019): Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **116**: br.108999
- Ruelland E., Vaultier M.N., Zachowski A., Hurry V. (2009): Physiology of cold stress. In: *Cold Signalling and Cold Acclimation in Plants*, Eds. Ruelland E., Vaultier M.N., Zachowski A., Hurry V. Ivry-sur-Seine, France; Umea, Sweden: Elsevier Ltd., 38-47.
- Ruelland E., Zachowski A. (2010): How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany*. **69**: 225–232.
- Scambos T. NASA-USGS Landsat 8 Satellite pinpoints coldest spots on Earth. <https://www.nasa.gov/content/goddard/nasa-usgs-landsat-8-satellite-pinpoints-cold-est-spots-on-earth> (pristupljeno 8. lipnja, 2017.)
- Shah P., Modi H.A. (2015): Comparative study of DPPH, ABTS and FRAP assays for determination of antioxidant activity. *International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology*, **3**: 636-641.
- Soengas P., Rodríguez V.M., Velasco P., Cartea M.E. (2018): Effect of temperature stress on antioxidant defenses in brassicaoleracea. *ACS Omega*, **3**: 5237-5243.
- Sumanta N., Haque C.I., Nishika J., Suprakash R. (2014): Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown Fren species by using various extracting solvents. *Research Journal of Chemical Sciences*, **4**: 63-69.

Suwa R., Hakata H., Hara H., El-Shemy H.A., Adu-Gyamfi J.J., Nguyen N.T., Kanai S., Lightfoot D.A., Mohapatra P.K., Fujita K. (2010): High temperature effects on photosynthetic partitioning and sugar metabolism during ear expansion in maize (*Zea mays* L.) genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry*, **48**: 124–130.

Šola I., Stić P., Rusak G. (2021): Effect of flooding and drought on the content of phenolics, sugars, photosynthetic pigments and vitamin C, and antioxidant potential of young Chinese cabbage. *European Food Research and Technology*, **247**: 1913–1920.

Tarkowski L., Van den Ende W. (2015): Cold tolerance triggered by soluble sugars: a multifaceted countermeasure. *Frontiers in Plant Science*, **14**: 203.

Tewari A.K., Tripathy B.C. (1998): Temperature-stress-induced impairment of chlorophyll biosynthetic reactions in cucumber and wheat. *Plant Physiology*, **117**: 851-858.

Truong T.T.P., Koyoama T. (2020): Glucosinolate sinigrin improves insulin resistance to suppress glutathione consumption in type 2 diabetic mice. *Journal of Diabetes & Metabolism*, **11**: br.859.

Wang J., Yuan B., Huang B. (2019): Differential Heat-Induced changes in phenolic acids associated with genotypic variations in heat tolerance for hard fescue. *Crop Science*, **59**: 667-674.

Weidner S., Karolak M., Karamać M., Kosińska A., Amarowicz R. (2009): Phenolic compounds and properties of antioxidants in grapevine roots (*Vitis vinifera*) under drought stress followed by regeneration. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, **78**: 97–103.

Wuensch KL, Evans JD (1996): Straightforward statistics for the behavioral sciences. *Journal of the American Statistical Association*, **91**: 1750.

Yoon Y., Kuppusamy S., Cho K.M., Kim P.J., Kwack Y.B., Lee Y.B. (2017): Influence of cold stress on contents of soluble sugars, vitamin C and free amino acids including gamma-aminobutyric acid (GABA) in spinach (*Spinacia oleracea*). *Food Chemistry*, **215**: 185-192.

Yuanyuan M., Yali Z., Jiang L., Hongbo S. (2009): Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress. *African Journal of Biotechnology*, **8**: 2004-2010.

Zafar S.A., Hameed A., Khan A.S., Ashraf M. (2017): Heat shock induced morpho-physiological response in indica rice (*Oryza sativa* L.) at early seedling stage. *Pakistan Journal of Botany*, **49**: 453-463.

Zietz M., Weckmüller A., Schmidt S., Rohn S., Schreiner M., Krumbein A., Kroh L.W. (2010): Genotypic and climatic influence on the antioxidant activity of flavonoids in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 2123–2130.

Zrobek Sokolnik A. (2012): Temperature stress and responses of plants. In: *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*. Eds. Ahmad P., Prasad M.N.V., New York, NY: Springer New York, 113–134.

SAŽETAK

SAŽETAK

Utjecaj temperaturnog stresa na koncentraciju bioaktivnih spojeva i biološke učinke ekstrakata mladih biljaka brokule (*Brassica oleracea* L. convar. *botrytis* (L.) Alef. var. *cymosa* Duch.)

Emilie Kokić, Jana Zekirovski

Klimatske promjene globalni su problem koji je promijenio i fiziološke i biokemijske parametre biljaka, te smanjio produktivnost usjeva. Opstanak biljaka ovisi o učinkovitoj aktivaciji metaboličkih mehanizama otpornosti na takav stres. U sklopu ovog rada istražile smo utjecaj vode niske i visoke temperature na metabolički odgovor brokule kako bismo definirale otporne i susceptibilne varijable pod utjecajem temperaturnog stresa, te izdvojile one koje bi se potencijalno moglo koristiti kao biomarkere određenog tipa stresa u brokuli. Također, diskutirale smo mogućnost primjene određenog tipa stresa za uzgoj brokula obogaćenih spojevima od interesa za ljudsko zdravlje. Varijable na koje su tretmani vodom povišene i snižene temperature djelovali oprečno su topivi šećeri i intaktni glukozinolati. Ovo nam sugerira da bi se ove dvije skupine spojeva moglo koristiti kao pouzdane biomarkere stresa uzrokovanog hladnom i vrućom vodom kod biljaka brokule. S obzirom da je voda povišene temperature povisila udio topivih šećera u brokuli, svakako bi valjalo dalje istražiti njihovu ulogu u obrambenom odgovoru ove vrste spram navedenog tipa stresa. Činjenica da je tretman hladnom vodom snizio udio topivih šećera u mladoj brokuli i istovremeno povisio sposobnost njenog ekstrakta da inhibira aktivnost enzima α -amilaze, sugerira mogućnost primjene ovakvog tipa stresa za uzgoj brokula prihvatljivijih osobama koje pate od dijabetesa tipa II. Ovaj rezultat svakako upućuje na daljnje detaljnije istraživanje utjecaja stresa hladnom vodom na antidijabetički potencijal brokule, a onda i drugih biljnih vrsta. Tretman hladnom vodom povisio je i udio intaktnih glukozinolata, spojeva s dokazanim snažnim antikancerogenim djelovanjem, u mladim brokula pa na temelju toga zaključujemo da je svakako zanimljiv za daljnja istraživanja i primjenu u svakodnevnom životu.

Ključne riječi: α -amilaza, fenolni spojevi, glukozinolati, klimatske promjene, lipaza, RP-HPLC, šećeri

SUMMARY

8. SUMMARY

The effect of temperature stress on the concentration of bioactive compounds and biological effects of young broccoli (*Brassica oleracea* L. convar. *botrytis* (L.) Alef. var. *cymosa* Duch.) plants extracts

Emilie Kokić, Jana Zekirovski

Climate change is a global problem that has changed both the physiological and biochemical parameters of plants, and reduced crop productivity. The survival of plants depends on the effective activation of metabolic mechanisms of resistance to such stress. As part of this work, we investigated the influence of low and high temperature water on the metabolic response of broccoli to define resistant and susceptible variables under the influence of temperature stress, and to single out those that could potentially be used as biomarkers of a certain type of stress in broccoli. We also discussed the possibility of applying a certain type of stress to growing broccoli enriched with compounds of interest to human health. Variables that were opposite affected by cold and hot water treatments were soluble sugars and intact glucosinolates. This suggests that these two groups of compounds could be used as reliable biomarkers of stress caused by cold and hot water in broccoli plants. Given that hot water has increased the proportion of soluble sugars in broccoli, their role in the defense response of this species to this type of stress should certainly be further explored. The fact that cold water treatment lowered the proportion of soluble sugars in young broccoli, and at the same time increased the ability of its extract to inhibit α -amylase enzyme activity, suggests the possibility of applying this type of stress for growing broccoli more acceptable to people with type II diabetes. This result certainly suggests further more detailed research into the effects of cold water stress on the antidiabetic potential of broccoli and then other plant species. Cold water treatment also increased the proportion of intact glucosinolates, compounds with proven strong anticancer activity, in young broccoli, so we conclude that it is certainly interesting for further research and application in everyday life.

Keywords: α -amylase, climate change, glucosinolates, lipase, phenolics, RP-HPLC, sugars