

Biološki aktivni spojevi glukozinolati i polifenoli u cvatu, listu i stabljici brokule (*Brassica oleracea* var. *italica* L.)

Sažetak

Brokula (*Brassica oleracea* var. *italica* L.) je povrće koje se smatra izvornim oblikom cvjetače, a uzgaja se zbog zelenih cvjetnih izdanaka smještenih na razgranatoj mekanoj stabljici. Brokula je bogata bioaktivnim spojevima, glukozinolatima i polifenolima te se uvelike istražuje radi njihova korisnog djelovanja na ljudsko zdravlje. U literaturi je mnogo više radova o sastavu i udjelima bioaktivnih spojeva u cvatu nego u listovima i stabljici biljke. U ovom radu analizirani su ukupni i pojedinačni glukozinolati, ukupni polifenolni spojevi te njihov antioksidacijski kapacitet u svim jestivim dijelovima brokule (cvat, listovi, stabljika). Utvrđeno je da je količina glukozinolata najveća u listu brokule pri čemu udio indolnih prevladava nad alifatskim spojevima što vrijedi i za cvat. U stabljici je veći udio alifatskih spojeva. Udio polifenolnih spojeva u uzorcima u rasponu je od 9,70-16,11 mg GE g⁻¹ s. tv. u stabljici, od 17,65-31,08 mg GE g⁻¹ s. tv. u cvatu i od 22,27-34,02 mg GE g⁻¹ s.tv. u listu brokule. Veću antioksidacijsku aktivnost pokazuju uzorci s većom koncentracijom polifenola. Ti rezultati upućuju da ne samo cvat brokule već i ostali dijelovi biljke mogu biti vrijedan izvor bioaktivnih spojeva te ih se preporuča također koristiti u prehrani. Nadalje, nusproizvodi nakon berbe, stabljike i listovi mogli bi se koristiti kao sirovina za njihovu izolaciju te eventualnu uporabu kao dodataka prehrani.

ključne riječi: brokula, glukozinolati, ORAC, polifenoli

Uvod

Brokula (*Brassica oleracea* var. *italica* L.) je povrće iz porodice Brassicaceae kojoj još pripadaju kupus, cvjetača, kelj, koraba, prokulica, repa, raštika i druge. Ime je dobila po *lat. braccium* što znači jaka ruka ili grana, a opisuje izgled brokulinih izdanaka. Jedan od najstarijih varijeteta, nastao u rimsko doba, ljubičaste je boje i naziva se *calabrese*. Najzastupljeniji u ljudskoj prehrani središnji su i postrani cvjetni izdanci smješteni na mekanoj i razgranatoj stabljici iako su jestivi i ostali nadzemni dijelovi biljke (slika 1). Danas se na tržištu najčešće susrećemo sa zelenom brokulom, iako postoje i bijeli i ljubičasti varijeteti. Brokula Romanesco ili tzv. šenon odnosno fraktalna brokula, hibrid između brokule i cvjetače, nalik cvjetači ali žuto-zelene boje i miješanog okusa, još je jedan od varijeteta brokule, a sve je zastupljeniji na tržištu. Brokula je rasprostranjena diljem svijeta i važan je dio dobro uravnotežene prehrane. Poput drugih vrsta iz obitelji kupusnjača (*Brassicaceae*), brokula je bogat izvor za zdravlje važnih nutrijenata, vitamina te fitokemikalija (glukozinolata, polifenola, karotenoida). Povećano konzumiranje povrća iz obitelji kupusnjača povezuje se sa širokim spektrom pozitivnih utjecaja na smanjenje rizika kod uznapredovalih kroničnih bolesti, osobito na rizik povezan s razvojem raznih vrsta tumora (pluća, želuca, kolorektalnog sustava i prostate) (Podsędek, 2007; Moreno i sur., 2006).

Zbog visokih udjela različitih biološki aktivnih spojeva i njihovog pozitivnog djelovanja na ljudski organizam, brokula se naziva funkcionalnom hranom. Brokula ima visok sadržaj bioaktivnih supstancija smještenih u nadzemnim i vanjskim dijelovima biljke. Zbog veće izloženosti tih dijelova suncu, pretpostavlja se da sunčevo svjetlo stimulira njihovu sin-

¹ Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

tezu. Bogatstvo glukozinolata, flavonoida, selena, vitamina (A, C, E, K1 i B skupine), minerala (Na, K, Mg, Ca, Fe, Zn) i netopljivih vlakana razlog su zašto se preporuča bilo u svježem obliku ili kao dodatak prehrani (Vallejo i sur.,2002; Moreno i sur., 2006; Podsedek 2007; Fabek i sur., 2012.; Radojčić Redovniković i sur., 2012.; Toth i sur., 2014.). Pozitivno djelovanje na ljudsko zdravlje očituje se kroz antikancerogeno, protuupalno, imuno-stimulirajuće, protugljivično, protubakterijsko i protuvirusno djelovanje. Populizirana je 90-ih godina prošlog stoljeća zbog antikarcinogenih svojstava izotiocijanata sulforafana, produkta enzimske hidrolize glukozinolata glukorafanina. Spomenuti polifenolni spojevi sekundarni su metaboliti, a smjesa su fenolnih kiselina i flavonoida (Hollman i Arts, 2000). Opće je prihvaćeno da antioksidacijska svojstva polifenolnih spojeva uvelike pridonose zaštiti od brojnih kroničnih bolesti kao što su razne vrste karcinoma, kardio- i cerebrovaskularne te neurološke bolesti (Hollman i Arts, 2000, Latté i sur. , 2011).



Slika 1. Cvat i listovi brokule

Promjenjiv sastav i udio bioaktivnih spojeva glavni su problem pri proizvodnji povrća kao funkcionalne hrane od koje se očekuje ujednačena razina zdravstvene vrijednosti. Na udio i sastav bioaktivnih spojeva utječu brojni čimbenici: genotip, utjecaj okoliša kao što su uvjeti uzgoja, kakvoća zemlje, zrelost u vrijeme žetve te uvjeti skladištenja nakon žetve (Hollman i Arts, 2000, Vallejo i sur.,2002; Moreno i sur., 2006; Podsedek 2007; Radojčić Redovniković i sur., 2008. i 2012; Latté i sur., 2011). Također, navedeni se spojevi uglavnom analiziraju u cvatu i mladima brokule, a manje je studija o njihovom rasporedu u ostalim dijelovima biljke, listovima i stabiljci. Stoga je u ovom radu istražen udio glukozinoata, polifenola i njihov antioksidativni kapacitet u cvatu, listovima i stabiljci.

Glukozinolati u brokuli

Glukozinolati su složena skupina spojeva tioglukozidne strukture svojstvena biljkama porodice *Brassicaceae*, u koju ubrajamo značajne kulture kao što su uljana repica, kupus, cvjetača, brokula, koraba, kelj, hren i gorušica. Do danas je opisano više od 110 glukozinolata koji imaju istu osnovnu strukturu kao β -tioglukozidi u kojima je glikonski dio najčešće glukoza, dok aglikonski dio tj. bočni lanac potječe od aminokiseline, prekursora u njihovoj biosintezi. Prema strukturi aminokiseline glukozinolati se dijele na: alifatske (nastali iz metionina, izoleucina, leucina i valina), indolne (nastali iz triptofana) i aromatske (nastali iz fenilalanina i tirozina). Sve biljke koje sadrže glukozinolate sadrže i endogeni enzim hidrolize – mirozinazu u odijeljenim dijelovima biljke, tako da su u normalnim uvjetima za biljku glukozinolati u intaktnom obliku. Oštećenjem tkiva oni dolaze u kontakt s enzimom mirozinazom te ovisno o strukturi glukozinolata nastaju različiti biološki aktivni produkti razgradnje, koji imaju čitav niz bioloških svojstava, od toksičnih do antikarcinogenih. Primarna uloga glukozinolata u biljci je obrana od insekata i fitopatogena, a neka istraživanja ukazuju da mogu služiti kao rezerva sumpora i/ili dušika. U životinjskoj i čovjekovoj prehrani razgradni produkti nekih alifatskih glukozinolata, kao što je progoitrin, povezani su s gušavošću, dok se razgradni produkti sulfoalkenilnih i indolnih glukozinolata smatraju an-

tikarcenogenima jer sudjeluju u indukciji enzima za detoksifikaciju ksenobiotika (Halkier i Gershenzon, 2006; Radojčić Redoviniković i sur., 2008.).

Najznačajniji glukozinolati u cvatu brokule jesu alifatski glukozinolat glukorafanin zbog čega je i brokula popularizirana 90-ih godina prošlog stoljeća zbog antikarcinogenih svojstava izotiocijanata sulforafana, produkta njihove enzimске hidrolize. Također sadrži i indolni glukozinolati poput glukobrasicina, neoglukobrasicina i 4-metoksiglukobrasicina. Ostali alifatski glukozinolati poput gluoiberina, progoitrin, glukoalizina, glukonapina i gluoerucina također su identificirani u tkivima brokule (tablica 1.) (Latte i sur., 2011).

Tablica 1. Glukozinolati (GSL) prisutni u brokuli (Latte i sur., 2011)

Komponenta	Strukturne karakteristike	Raspon udjela ($\mu\text{mol g}^{-1}$ s.tv.)
Glukoiberin	Alifatski GLS	0-7,8
Glukorafanin	Alifatski GLS	0,3-38,4
Glukoalizin	Alifatski GLS	0-5,9
Glukoerucin	Alifatski GLS	u tragovima
Glukoibervirin	Alifatski GLS	u tragovima
Glukonapin	Alifatski GLS	0-1
Progoitrin	Alifatski GLS	0,1-16,1
Sinigrin	Alifatski GLS	0-0,1
Napoleiferin	Alifatski GLS	0,3-0,7
Glukobrasikanapin	Alifatski GLS	0-0,6
Epiprogoitrin	Alifatski GLS	0-u tragovima
Glukonasturtin	Aromatski GLS	0-0,4
Glukobrasicin	Indolni GLS	1,1-33,4
Neoglukobrasicin	Indolni GLS	0,2-19,9
4-hidroksiglukobrasicin	Indolni GLS	0-0,6
4-metoksiglukobrasicin	Indolni GLS	0,2-2
Ukupni sastav GLC		12,8-20,9

Polifenolni spojevi u brokuli

Polifenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti i prisutni su u gotovo svom biljnom materijalu, uključujući prehrambene proizvode i izvorne biljke. Oni su sastavni dio ljudske i životinjske prehrane. Glavne skupine polifenola definiraju se prema prirodi ugljikovog kostura: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni i lignini (Andjelković i sur., 2006.). Čine jednu od najbrojnijih skupina spojeva u prirodi te ih je do danas poznato oko 8000. Kvantitativno najzastupljeniji polifenolni spojevi u brokuli su flavonoli. Fenolni ekstrakti brokule složene

su smjese flavonolnih glikozida (kvercetina i kamferol-3-O-soforozida kao glavnih flavonola i izokvercetina, kamferol-3-O-glukozida i kamferol diglukozida u manjim količinama) te derivata hidroksicimetnih kiselina (Vallejo i sur., 2002). Među različitim vrstama povrća, brokula se ističe visokom koncentracijom polifenolnih spojeva, a ranije studije rangirale su je na drugo mjesto prema antioksidacijskom kapacitetu od ukupno deset sličnih vrsta povrća te na šesto mjesto od ukupno 22 vrste svih vrsta povrća (Cao i sur., 1997). Iako prisutni u svim biljnim tkivima, nisu ravnomjerno raspoređeni, niti na razini stanice, niti tkiva. Površinski slojevi biljaka bogatiji su polifenolima nego unutarnji. Polifenoli u biljkama mogu djelovati kao signalne molekule, sudjeluju u hormonskoj regulaciji rasta biljaka, štite ih od infekcija mikroorganizmima (antibiotsko djelovanje), djeluju kao zaštitni agensi od UV zračenja, privlače oprašivače, pridonose pigmentaciji biljaka, dok u namirnicama pridonose gorčini, oštrini, boji, okusu, mirisu i oksidativnoj stabilnosti. Polifenolni spojevi u biljnoj hrani važni su zbog njihovog antioksidacijskog djelovanja vezanog uz sposobnost hvatanja slobodnih radikala te općenito pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje (Rice-Evans i sur., 1997; Posedeek, 2007). Polifenoli pokazuju mnoštvo bioloških aktivnosti, od kojih razlikujemo antibakterijsku, protuupalnu, antialergijsku, antitrombotičnu, antivirusnu, antikarcinogenu, hepatozaštitnu i vazodilatatornu aktivnost.

Tablica 2. Ukupni polifenoli u brokuli (*mg GAE g⁻¹ s.tv)

Autori	Godina	Udio polifenola u brokuli*
Kaur i Kapoor	2002.	8,75±0,81**
Zhang i Hamauzu	2004.	3,45±1,0
Ninfali i sur.	2005.	10,95±1,00
Mrkić i sur.	2006.	10,27±0,23
Heimler i sur.	2006.	12,85±0,19
Singh i sur.	2007.	6,34±1,31
Borowski i sur.	2008.	6,38±0,93
Gawlik-Dziki	2008.	27,00±0,20
Sikora i sur.	2008.	28,90±0,61

Biološki aktivni spojevi glukozinolati i polifenoli u cvatu, listu i stabljici brokule

Brojne nedavne publikacije upućuju da uzgojem različitih vrsta brokula u različitim uvjetima uzgoja nastaju velike varijacije u količini bioaktivnih spojeva među sortama; na njihov sastav i koncentraciju utječe veliki broj čimbenika. Također, navedeni se spojevi uglavnom analiziraju u cvatu i mladica brokule, a manje je studija o njihovom rasporedu u ostalim jestivim dijelovima biljke, listovima i stabljici. U ovom radu istražen je udio glukozinolata, polifenola i njihov antioksidativni kapacitet u cvatu, listovima i stabljici komercijalno dostupne brokule metodama UV/VIS spektrometrije, spektrofluorimetrije te tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (tablica 3.).

Tablica 3. Glukozinolati ($\mu\text{mol g}^{-1}$ s.tv.), ukupni polifenoli (mg g^{-1} s.tv.) i ORAC (μmol ekvivalent Troloxa g^{-1} s.tv.) vrijednosti u cvatu brokule, listu i stabljici brokule*

Bioaktivne komponente	Cvat	List	Stabljika
Glukoiberin	-	0,31	0,32
Progoitrin	1,74	0,67	0,13
Glukorafanin	0,97	2,13	1,29
4-hidroksiglukobrasicin	0,85	2,35	-
Glukobrasicin	2,99	1,61	0,52
4-metoksiglukobrasicin	0,32	0,36	0,39
Neoglukobrasicin	0,14	0,11	0,15
Ukupni glukozinolati	7,02	7,53	2,94
Ukupni polifenoli	31,08	34,02	16,11
Antioksidativni kapacitet (ORAC)	255,36	324,92	92,06

* rezultati su prosjek triju usporednih mjerenja

Kao što je vidljivo na temelju dobivenih rezultata analiziranih uzoraka utvrđene su velike razlike između pojedinih dijelova biljka u sastavu i udjelu bioaktivnih spojeva. U svim jestivim dijelovima brokule kvantificirani su: alkenilni glukozinolat progoitrin, alifatski glukozinolati sa sumporom u bočnom lancu glukoiberin i glukorafanin te indolni glukozinolati 4-hidroksiglukobrasicin, glukobrasicin, 4-metoksiglukobrasicin i neoglukobrasicin. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se analizirani uzorci razlikuju po udjelu ukupnih glukozinolata. Najmanje glukozinolata nalazi se u stabljici brokule ($2,80 \mu\text{mol g}^{-1}$ s. tv.), a najviše u listovima ($7,54 \mu\text{mol g}^{-1}$ s. tv.). Odnos alkenilnih i alifatskih prema indolnim spojevima u cvatu i listu brokule približno je jednak (1:1,4 i 1:1,6), uz prevladavanje indolnih glukozinolata, dok je taj odnos u stabljici obrnuto proporcionalan (1,6:1). Od indolnih glukozinolata u cvatu i listu prevladavaju 4-hidroksiglukobrasicin i glukobrasicin a u stabljici glukobrasicin i 4-metoksiglukobrasicin. Alkenilni i alifatski spojevi, glukorafanin i progoitrin, podudaraju se u svim dijelovima brokule, cvatu, listu i stabljici.

Iz dobivenih podataka vidljivo je da su u listu brokule udjeli ukupnih polifenola najviši, ($34,02 \text{ mg GE g}^{-1}$ s. tv.). Vrijednosti udjela ukupnih polifenola u cvatu iznose $31,08 \text{ mg GE g}^{-1}$ s. tv., a $16,11 \text{ mg GE g}^{-1}$ s. tv. u stabljici. Antioksidacijska aktivnost spojeva u pojedinim dijelovima brokule određena je ORAC metodom. Metodom se mjeri stupanj inhibicije djelovanja oksidirajućeg agensa antioksidansom te vrijeme trajanja inhibicije. Dobiveni su rezultati izraženi u ekvivalentima Troloxa, standarda uporabljenog pri mjerenju i ispitani uzorci su pokazali da najveću antioksidacijsku aktivnost pokazuju ekstrakti listova brokule ($324,92 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ s. tv.), a slijede ih cvat ($255,36 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ s. tv.) te stabljika ($92,06 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ ST). Također, utvrđeno je da je antioksidativna aktivnost viša u uzorcima s veći udjelom polifenolnih spojeva što upućuje da su polifenolni spojevi odgovorni za antioksidativno djelovanje ekstrakata brokule.

Zaključak

Ovi rezultati upućuju da ne samo cvat brokule, već i ostali dijelovi biljke, mogu biti vrijedan izvor bioaktivnih spojeva pri čemu su listovi brokule jednako vrijedan dio povrća za konzumaciju i ne bi ih trebalo zanemarivati u prehrani. Stabljika, iako siromašnija ovim bioaktivnim spojevima, značajan je izvor nutrijenata u obliku netopljivih vlakana, a sadrži i glukozinolate. Nadalje, nusproizvodi nakon berbe, stabiljke i listovi, mogli bi se koristiti kao sirovina za njihovu izolaciju te eventualnu uporabu kao dodataka prehrani.

Literatura

- Andjelkovic, M., van Camp, J., De Meulenaer, B., Depaemelaere, G., Socaciu, C., Verloo, M., Verhe, R. (2006). Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chem.* 98, 23-31.
- Borowski, J., Szajdek, A., Borowska, E. J., Ciska, E., Zieliski, H. (2008). Content of selected bioactive components and antioxidant properties of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Eur. Food. Res. Technol.* 226, 459-465.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structural-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 749-760.
- Fabek, S., Toth, N., Radojčić Redovniković, I., Custić Herak, M., Benko, B., Zutic, I. (2012). The Effect of Nitrogen Fertilization on Nitrate Accumulation, and the Content of Minerals and Glucosinolates in Broccoli Cultivars. *Food Technol. Biotechnol.* 50, 183-191.
- Gawlik-Dziki, U. (2008). Effect of hydrothermal treatment on the antioxidant properties of broccoli (*Brassica oleracea* var. botrytis italica) florets. *Food Chem.* 109, 393-401.
- Halkier, B.A., Gershenzon, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 303-333.
- Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M. G., Vincieri, F. F., Romani, A. (2006). Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chem.* 99, 464-469.
- Hollman, P. C. H., Arts, I. C. W. (2000). Flavonols, flavones and flavanols-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1081-1093.
- Kaur, C., Kapoor, H.C. (2002). Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37, 153-161.
- Latte, K.P., Appel, K., Lampen, A. (2011). Health benefits and possible risks of broccoli – An overview. *Food Chem. Toxicol.* 49, 3287-3309.
- Moreno, D. A., Carvajal, M., López-Berenguer, C., García-Viguera, C. (2006). Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, 1508-1522.
- Mrkić, V., Cocci, E., Dalla Rosa, M., Sacchetti, G. (2006). Effect of drying conditions on bioactive compounds and antioxidant activity of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *J. Sci. Food Agr.* 86, 1559-1566.
- Ninfali, P., Mea, G., Giorgini, S., Rocchi, M., Bacchiocca, M. (2005). Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. *Brit. J. Nutr.* 93, 257-266.
- Podsedek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *Food Sci. Technol.* 40, 1-11.
- Radojčić Redovniković, I., Glivetić, T., Delonga, K., Vorkapić-Furač, J. (2008). Glucosinolates and their potential role in plant. *Period. Biol.* 110, 297-309.
- Radojčić Redovniković, I., Repajić, M., Fabek, S., Delonga, K., Toth, N., Vorkapić-Furač, J. (2012). Comparison of selected bioactive compounds and antioxidative capacity in different broccoli cultivars. *Acta Alim.* 41, 221-232.
- Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2, 152-159.
- Sikora, E., Cieslik, E., Leszczynska, T., Filipiak-Florkiewicz, A., Pisulewski, P. M. (2008). The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chem.* 107, 55-59.
- Singh, J., Upadhyay, A. K., Prasad, K., Bahadur, A., Rai, M. (2007). Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in Brassica vegetables. *J. Food Compos. Anal.* 20, 106-112.
- Toth, N., Fabek, S., Benko, B., Herak Custić, M., Radojčić Redovniković, I. (2014). Yield components and glucosinolate contents of broccoli cultivars in summer-autumn growing cycle. *Acta Horticulturae* 1040, 323-329.
- Vallejo, F., Tomas-Barberan, F. A., Garcia-Viguera, C. (2002). Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain. *J. Sci. Food Agric.* 82, 1293-1297.
- Zhang, D., Hamauzu, Y. (2004). Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chem.* 88, 503-509.

Bioactive compounds glucosinolates and polyphenols in florets, leaves and stems of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* L.)

Summary

Broccoli is rich in bioactive compounds, polyphenols and glucosinolates, and as such considered as functional food and great experimental material. Previous scientific attention had mostly been focussed on composition and amounts of phytochemicals in florets rather than leaves and stem. In this research, content of total and individual glucosinolates, total polyphenols and antioxidative capacity were studied in broccoli florets, leaves and stems. Leaves showed to be the most abundant in glucosinolates with indolyl predominating aliphatic as was also the case in florets. In contrast, stem contained more aliphatic than indolyl glucosinolates. Polyphenol quantity ranged from 9.70-16.11 mg GE g⁻¹ DW in stems, from 17.65-31.08 mg GE g⁻¹ DW in florets and from 22.27-34.02 mg GE g⁻¹ DW in leaves and was the highest in leaves irrespective of extraction method. It was determined that samples containing the highest amounts of polyphenols also had the highest antioxidant activity.

Key words: broccoli, glucosinolates, ORAC, polyphenolic compounds