

# Bioaktivni i antioksidacijski potencijal klica

---

Štruml, Monika

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:718498>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-07**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac, 2024.

Monika Štrumf

**BIOAKTIVNI I ANTIOKSIDACIJSKI  
POTENCIJAL KLICA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća, povrća i začinskog bilja na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta pod mentorstvom prof. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević, te uz pomoć dr. sc. Anice Bebek Markovinović.

Ovo istraživanje provedeno je u sklopu

PRIMA Projekta „From Edible Sprouts to Healthy Food – Feed“ (Prima Call 2022, Prima Section 2 – Multi Topic 2022, Topic 2.3.1 (RIA) Enabling the transition to healthy and sustainable dietary behaviour)

Voditeljica projekta: prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević



*Zahvaljujem svojoj mentorici i profesorici dr. sc. Danijeli Bursać Kovačević kao i dr. sc. Anici Bebek Markovinović na ugodnom iskustvu, motivaciji, strpljenju, velikoj pomoći i savjetima te prilici da steknem dodatna iskustva i znanja čime sam završila ovo poglavlje svog života.*

*Zahvaljujem svojim roditeljima bez čijeg usmjeravanja, podrške i odricanja ne bih bila ovdje gdje jesam, sestri Nikolini s kojom od rođenja dijelim svaki trenutak te gospodinu Frediju na svemu za što se riječima ni ne mogu dovoljno zahvaliti.*

*Također, hvala ostatku obitelji i svim mojim prijateljima na divnim uspomnama te svakom dobrom savjetu, utjesi i smijehu koji su mi davali snagu sve ove godine.*

*Za kraj, hvala mom Ediju na bezuvjetnoj ljubavi, podršci i razumijevanju, što je moj oslonac i što mu je svako moje iskustvo jednako važno kao i svoje.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za kemiju i tehnologiju voća, povrća i začinskog bilja

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

### BIOAKTIVNI I ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL KLICA

Monika Štruml, univ. bacc. ing. techn. aliment.  
0058214865

#### Sažetak:

Cilj ovog rada bio je istražiti bioaktivni i antioksidacijski potencijal pet vrsta klica – alfalfa, češnjaka, rotkvice, mungo graha i cikle – s posebnim naglaskom na utjecaj metoda sušenja na njihova funkcionalna svojstva. Primijenjene metode obrade uključivale su liofilizaciju i konvencionalno sušenje, a analizirani su sadržaj suhe tvari, ukupni fenoli, hidroksicimetne kiseline, flavonoli, flavonoidi i polimerni proantocijanidini, kao i antioksidacijski kapacitet primjenom FRAP i ABTS metoda. Rezultati su pokazali da liofilizacija učinkovitije djeluje na očuvanje bioaktivnih spojeva, dok konvencionalno sušenje u nekim slučajevima smanjuje njihov udio. Klice rotkvice i cikle istaknule su se visokim antioksidacijskim kapacitetom, dok su različite vrste klica pokazale specifične odgovore na metode obrade. Rezultati ovog istraživanja naglašavaju važnost odabira vrste klica i metode obrade za očuvanje bioaktivnog i funkcionalnog potencijala, čime se otvaraju mogućnosti za širu primjenu klica u proizvodnji funkcionalne hrane i svakodnevnoj prehrani.

**Ključne riječi:** *klice, bioaktivni spojevi, antioksidacijska aktivnost, liofilizacija, konvencionalno sušenje*

**Rad sadrži:** 60 stranica, 10 slika, 124 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Anica Bebek Markovinović

#### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Tomislav Bosiljkov (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino (član)
4. prof. dr. sc. Senka Djaković (zamjenski član)

**Datum obrane:** 18. prosinca 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Laboratory for Chemistry and Technology of Fruits, Vegetables and Aromatic Herbs

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Safety Management

### BIOACTIVE AND ANTIOXIDANT POTENTIAL OF SPROUTS

Monika Štruml, univ. bacc. ing. techn. aliment.  
0058214865

#### **Abstract:**

This study investigated the bioactive and antioxidant potential of five types of sprouts – alfalfa, garlic, radish, mung bean, and beetroot – with a particular focus on the impact of drying methods on their functional properties. The applied processing methods included freeze-drying and conventional drying, while analyses were conducted on dry matter content, total phenolics, hydroxycinnamic acids, flavonols, flavonoids, and polymeric proanthocyanidins, as well as antioxidant capacity using the FRAP and ABTS methods. The results showed that freeze-drying was more effective in preserving bioactive compounds, whereas conventional drying, in some cases, reduced their levels. Radish and beetroot sprouts demonstrated high antioxidant capacity, while different types of sprouts exhibited specific responses to the processing methods. The findings of this research highlight the importance of selecting the sprout type and processing method to preserve bioactive and functional potential, thus paving the way for broader applications of sprouts in functional food production and daily diets.

**Keywords:** *sprouts, bioactive compounds, antioxidant activity, freeze-drying, conventional drying*

**Thesis contains:** 60 pages, 10 figures, 124 references

**Original in:** Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in the Library of the University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** Danijela Bursać Kovačević, PhD, Full professor

**Technical support and assistance:** Anica Bebek Markovinović, PhD

#### **Reviewers:**

1. Tomislav Bosiljkov, PhD, Full professor (president)
2. Danijela Bursać Kovačević, PhD, Full professor (mentor)
3. Antonela Ninčević Grassino, PhD, Associate professor (member)
4. Senka Djaković, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** December 18<sup>th</sup>, 2024



## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>2</b>
2.1. KLICE KAO FUNKCIONALNA HRANA.....	2
2.2. PRIMJENA KLICA U LJUDSKOJ PREHRANI.....	3
2.3. PROMJENE U KEMIJSKOM SASTAVU TIJEKOM KLIJANJA .....	4
2.3.1. Ugljikohidrati .....	5
2.3.2. Proteini.....	6
2.3.3. Masti .....	7
2.3.4. Fitati i minerali.....	8
2.3.5. Polifenolni spojevi .....	8
2.3.6. Antioksidansi.....	10
2.4. ZNAČAJ KLICA ZA LJUDSKO ZDRAVLJE .....	12
2.5. PERSPEKTIVA UPORABE KLICA U PROIZVODNJI FUNKCIONALNE HRANE .....	13
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>15</b>
3.1. MATERIJALI.....	15
3.2. METODE RADA .....	16
3.2.1. Sušenje klica i priprema ekstrakata .....	16
3.2.2. Određivanje suhe tvari sušenjem na 105 °C.....	17
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola.....	18
3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola.....	20
3.2.5. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida .....	22
3.2.6. Određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom .....	24
3.2.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom .....	25
3.2.8. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom .....	28
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>31</b>
4.1. REZULTATI ANALIZE SUHE TVARI .....	31
4.2. REZULTATI ANALIZE SADRŽAJA UKUPNIH FENOLA .....	33
4.3. REZULTATI ANALIZE SADRŽAJA UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA I FLAVONOLA .....	35

4.4. REZULTATI ANALIZE SADRŽAJA UKUPNIH FLAVONOIDA .....	39
4.5. REZULTATI ANALIZE SADRŽAJA POLIMERNIH PROANTOCIJANIDINA .....	41
4.6. REZULTATI ANALIZE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI PRIMJENOM FRAP METODE .....	43
4.7. REZULTATI ANALIZE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI PRIMJENOM ABTS METODE .....	45
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>47</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>48</b>

## 1. UVOD

Sve više ljudi danas prepoznaje važnost povezanosti prehrane i zdravlja, zbog čega raste zanimanje za funkcionalnu hranu. Funkcionalna hrana obogaćena je nutrijentima i bioaktivnim spojevima i, osim što zadovoljava osnovne nutritivne potrebe, pruža dodatne benefite za zdravlje, poput jačanja imuniteta, smanjenja rizika od bolesti i poboljšanja općeg stanja organizma (Granato i sur., 2020). S takvim zanimanjem potrošača, rastu i zahtjevi za istraživanjima načina na koje se može postići veća funkcionalnost hrane. Povrće je oduvijek poznato po svom nutritivnom sastavu i bioaktivnom potencijalu, ono predstavlja sinonim za zdravu prehranu, no ono što je novitet na tržištu danas su njihove klice – mlade biljke u početnoj fazi razvoja (Ikram i sur., 2021). Tijekom klijanja u sjemenu se odvijaju razne biokemijske reakcije koje poboljšavaju njegov nutritivni profil, bioaktivna svojstva i senzorske karakteristike. Razgradnjom makronutrijenata povećava se udio jednostavnih šećera, slobodnih aminokiselina, nezasićenih masnih kiselina i drugih organskih tvari, dok se sadržaj antinutrijenata, poput fitata, smanjuje čime se pospješuje apsorpcija minerala. Osim toga, klijanje potiče biosintezu polifenolnih spojeva, poput hidroksicimetnih kiselina i flavonoida, ali i glukozinolata i vitamina povećavajući njihovu bioraspoloživost i antioksidacijsku aktivnost (Aziz i sur., 2022; Benincasa i sur., 2019). Klice su pogodne za uzgoj kod kuće, a zbog jednostavnosti i isplativosti tog procesa, imaju i potencijal za industrijsku proizvodnju (Galienu i sur., 2020).

Ovaj rad istražuje bioaktivni i antioksidacijski potencijal pet različitih vrsta klica – alfalfa, češnjaka, rotkvice, mungo graha i cikle, s naglaskom na utjecaj metoda sušenja na njihova funkcionalna svojstva. Primijenjene metode sušenja su liofilizacija i konvencionalno sušenje, a posebna pažnja posvećena je promjenama u sadržaju ključnih bioaktivnih spojeva koji utječu na antioksidacijski kapacitet samih klica. Svim uzorcima klica određivan je sadržaj suhe tvari i analiziran ukupni sadržaj fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavonola, flavonoida i polimernih proantocijanidina te antioksidacijski kapacitet primjenom FRAP i ABTS metoda. Cilj ovog istraživanja bio je proučiti i usporediti sastav pojedinih vrsta klica te razumjeti kako ovi postupci obrade utječu na očuvanje ili povećanje njihovog bioaktivnog sastava, čime bi se omogućila šira primjena klica u proizvodnji funkcionalne hrane. Dobiveni rezultati mogli bi poslužiti kao osnova za daljnja istraživanja u pogledu unaprjeđenja tehnologija proizvodnje i uvrštavanja klica u svakodnevnu prehranu.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KLICE KAO FUNKCIONALNA HRANA

Današnje društvo sve više je svjesno povezanosti svojih životnih navika i prehrane sa zdravljem pa je, sa strane potrošača, potražnja za hranom sve više orijentirana prema funkcionalnoj hrani, a sa strane proizvođača, prema unaprjeđenju metoda za poboljšanje funkcionalnosti hrane. Funkcionalna hrana je ona koja, osim nutritivnih potreba koje zadovoljava, nudi i mnoge benefite za zdravlje (Granato i sur., 2020). Štoviše, izbijanje pandemije korona virusa potaknulo je još više ljudi na poboljšanje svoga imuniteta što se velikim dijelom postiže kvalitetnom prehranom (Djekić i sur., 2023; Profeta i sur., 2021). Tako u novije vrijeme rastuću popularnost imaju istraživanja klica i njihova terapijska svojstva (Aloo i sur., 2021). Radi se o povrću ubranom u svojoj početnoj fazi sazrijevanja biljke – germinacije ili klijanja (Benincasa i sur., 2019). Dakle, pojam „klice“ označava „proizvod dobiven klijanjem sjemena i njegova razvoja u vodi ili drugom mediju, ubran prije razvitka pravih listova i namijenjen konzumaciji kao cijelog, uključujući i sjeme“ (ESSA, 2016). Mogu se proizvesti brzo i jednostavno uz niske troškove zbog jednostavnosti uvjeta uzgoja i potrebne opreme, a sam proces traje svega nekoliko dana ili tjedana. To nudi mogućnost za razvoj i povećanje industrijske proizvodnje u tom smjeru uz istovremeno poticanje potrošača da biraju nutritivno bogatu hranu. Osim toga, vrlo su povoljne za uzgoj i kod kuće (Galieni i sur., 2020). U usporedbi s dijelovima odraslih biljaka koje konzumiramo, klice su bogatije sastojcima koji imaju dokazane benefite na zdravlje. Oni se povezuju s prisustvom fitokemikalija iz skupine glukozinolata, polifenola, vitamina i minerala (Aziz i sur., 2022). Naime, klijanjem sjeme raste u mladu biljku i kroz taj proces opskrbljuje se vodom i energijom, a popratno se time mijenjaju i nutritivna te biokemijska svojstva sjemena. Klijanje povećava nutritivnu vrijednost proizvoda tako što potiče razgradnju makrohraniva čime se povećava količina slobodnih aminokiselina, jednostavnih šećera, nezasićenih masnih kiselina, bioaktivnih spojeva, organskih kiselina i drugih komponenata. To povećava učinkovitost enzima koji razgrađuju proteine, ugljikohidrate, masti i ostale makrohranjive pa se klijanje može smatrati i vrstom tzv. *predigestije* jer pomaže u razgradnji visokomolekularnih složenih materijala u njihove građevne blokove. Osim toga, ovaj proces osobito povećava sadržaj i bioraspoloživost određenih vitamina i minerala te potiče sintezu blagotvornih sastojaka dok simultano reducira antinutritivne faktore koji inhibiraju apsorpciju hranjivih tvari (npr. fitinska kiselina, lektin, inhibitori proteaze) (Márton i sur., 2010). Proklijale sjemenke su također bogate i dijetalnim vlaknima koja, ne samo da doprinose zdravoj probavi, već i pomažu u održavanju uravnotežene razine šećera u krvi čime se, recimo, može regulirati tjelesna težina i zdravlje metabolizma (Bazaria i Neeraj, 2023). Proces klijanja tako postaje sve popularniji proizvodni proces na tržištu i predstavlja ponovno buđenje trendova zdrave prehrane zbog pozitivnog učinka na sastav hranjivih tvari, ali i okusa (Ikram i sur., 2021).

Klice su zapravo širok pojam, odnosno čine ih različiti tipovi proizvoda dobiveni od sjemena, ovisno o dijelu biljke koja se bere i konzumira te kada se bere, zadržava li se sjeme ili uklanja te o supstratu za uzgoj i uvjetima tijekom klijanja. Prema tome, postoje razne varijante klica, primjerice izdanci (engl. *shoots*), mikrozelenje (engl. *microgreens*) ili mikropovrće, kres salata (engl. *cress*), proklijala pšenica (engl. *wheatgrass*) i slično (Benincasa i sur., 2019). Izdanci su iznikli iz sjemena u vodi iz kojega je nastao mali zeleni izdanak s prvim, mladim listićima ili kotiledonima, a proizvod ne sadržava sjemenu opnu ni korjenčić (ESSA, 2016). Mikrozelenje, odnosno mikropovrće su najčešći tip klica i na njih se pojam „klice“ na tržištu najčešće odnosi, samo je razlika u tome što se klice beru nakon nekoliko dana, a mikropovrće nakon dva tjedna i više. To su mlade biljke, odnosno sadnice povrća, začinskog bilja ili žitarica u fazi potpuno proširenih kotiledona ili izniklih prvih pravih listova (Mir i sur., 2017). Kres salata su izdanci uzgojeni u tlu ili hidroponskom supstratu, a konzumira se mlada rozeta lišća ili cijeli nadzemni dio biljke u fazi kotiledona (Anonymous 1). Proklijala pšenica su svježije proklijali prvi listovi biljke *Triticum aestivum*, točnije obične pšenice koja se bere 6-10 dana nakon klijanja (Pant i sur., 2013). Na tržištu su vrlo popularni proizvodi brašno od proklijale pšenice, koje ima nižu razinu glutena i bolju probavljivost (Anonymous 2) te prahovi ili sokovi za detoks, energiju i protuupalni učinak (Butler, 2021).

## **2.2. PRIMJENA KLICA U LJUDSKOJ PREHRANI**

Korištenje klica u kulinarstvu je kod nekih kultura već od davnina dio tradicije, pogotovo na istoku Zemlje gdje su njihov nutritivni profil i učinci na zdravlje već poznati pa se i smatraju vrijednom komponentom prehrane. Od 80-ih godina prošloga stoljeća, klice postaju sve popularnije i zapadnije zbog interesa potrošača prema dijetetici i egzotičnim zdravim namirnicama, posebice onima koje su minimalno procesirane i bez aditiva. Tako da se prehrambena industrija u današnje vrijeme sve više fokusira na razvoj zdravijih proizvoda koji su prilagođeniji promjenjivim zahtjevima potrošača (Benincasa i sur., 2019). Sam proces klijanja isplativ je proces s obzirom na to da ne zauzima puno mjesta prilikom uzgoja u stakleniku, ne zahtijeva sofisticiranu opremu, ciklus klijanja traje svega nekoliko tjedana (maksimalno tri) i pruža poprilično velike prinose (Kyriacou i sur., 2016). Prilikom tog procesa dolazi do kaskade biokemijskih reakcija kojima se značajno poboljšava njihov nutritivni profil kao i senzorske karakteristike, odnosno imaju veću nutritivnu vrijednost, niži sadržaj antinutrijenata, bogate su bioaktivnim spojevima te imaju slađi okus što ih čini dobrim izborom za dodatak raznim jelima (Aloo i sur., 2021). Na europskom i dalekoistočnom tržištu razvila se raznolika ponuda klica, a najpopularnije su klice alfalfa, azuki i mungo graha, soje, heljde, brokule, rotkvice, gorušice i crvenog kupusa (Márton i sur., 2010). Mogu se koristiti za obogaćivanje okusa, izgleda i nutritivne vrijednosti raznih jela, kao sendviča, salata i raznih priloga, ili se mogu koristiti u formi

proizvoda spremnih za jelo (engl. *ready-to-eat*) ili se pak mogu dalje obraditi, primjerice sušiti ili peći (Benincasa i sur., 2019). Nakon klijanja i sušenja, cijelo zrno se može samljati u brašno ili preraditi u griz, pahuljice i slično (Aziz i sur., 2022). Proizvodnja brašna od klica žitarica se može pridružiti današnjem trendu proizvodnje brašna od drugih izvora osim zrna pšenice za daljnju proizvodnju pšeničnog kruha, tjestenine, rezanaca ili beskrvasnog kruha (Shingare i Thorat, 2013). Ipak, korištenje klica žitarica za proizvodnju takvih proizvoda predstavlja izazov jer je proizvesti brašno koje daje savršena svojstva tijesta tijekom pečenja zahtjevno. Ukoliko uvjeti klijanja nisu kontrolirani, oni mogu uzrokovati visoku akumulaciju enzimatske aktivnosti što može uvelike utjecati na fizikalna svojstva tijesta i u konačnici gotov proizvod (Marti i sur., 2018). Osim u kruhu i tjestenini, klice žitarica se danas koriste i u tortiljama, granoli, keksima, krekerima, *muffinima* te raznim *snackovima* i energetske pločicama (Aziz i sur., 2022). U tortiljama, brašno od proklijale cjelovite pšenice može pomoći u omekšavanju tijesta, produljenju roka trajanja i poboljšanju senzorskih karakteristika (Yudiono i Kurniawati, 2018). Proklijala pšenica ima potencijal za povećanje dopadljivosti takvih tortilja i kruha kod potrošača što bi moglo dovesti do povećanja konzumacije cjelovitih žitarica, a time i ogromnog napretka za ljudsko zdravlje (Das i Sharangi, 2022). U prirodno bezglutenske namirnice, kao proso, heljda, amarant, kvinoja i mnoge druge žitarice, spadaju i njihove klice koje se mogu koristiti kao dio bezglutenskih dijeta. Sami spektar dostupnih klica je vrlo širok pa je time i znanstvenicima te istraživačima dato puno kreativne slobode prilikom osmišljavanja inovacija prehrambenih proizvoda. Prilikom toga je svakako važno identificirati funkcionalne razlike između klica i njihovih neproklijalih ekvivalenata za optimalnu formulaciju, prerađivanje i karakteristike krajnjeg proizvoda (Aziz i sur., 2022).

### **2.3. PROMJENE U KEMIJSKOM SASTAVU TIJEKOM KLIJANJA**

Prilikom klijanja, u sjemenu se događaju procesi koji započinju upijanjem vode mladog i suhog sjemena u stanju mirovanja, a završavaju izduživanjem embrionalne osi, obično radikule (korjenčića) koja se proteže kako bi prodrla u strukture koje ju okružuju. Naknadna mobilizacija glavnih skladišnih rezervi povezana je s rastom sadnice (Bewley, 1997). U pozadini tog procesa leže fizičke i biokemijske reakcije, kao što su slabljenje omotača sjemena, aktivacija metaboličke aktivnosti, aktivacija transkripcije gena, te biogeneza organela (Logan i sur., 2001). Taj proces obuhvaća tri faze. Tijekom Faze I (faza imbibicije), sjeme upija vodu, njegove stanice ju apsorbiraju. Ona traje dok sve matrice i sadržaj stanica nisu potpuno hidratizirani. Potom nastupa Faza II (faza metaboličke aktivacije) u kojoj dolazi do ograničenog unosa vode, ali uz snažnu metaboličku reaktivaciju koja će biti potrebna za pokretanje korjenčića u sljedećim fazama. Na kraju Faze II počinje izbijati korjenčić. U posljednjoj fazi, tj. Fazi III (faza rasta sadnice) zbiva se značajna mobilizacija svih rezervnih tvari uz povećan unos vode što za

posljedicu ima izduživanje stanica, tj. rast sadnice. Time dolazi do završetka klijanja (Pathak i Singh, 2022). Nakon upijanja vode, sjemenke u stanju mirovanja brzo obnavljaju svoju metaboličku aktivnost, što implicira važne biokemijske, nutritivne i senzorske promjene u jestivim proizvodima kojima se utječe na svojstva proizvoda – oblik, bioaktivnost, konzistenciju, okus i probavljivost (Katina i sur., 2007). Klijanje potiče enzime da razgrade ugljikohidrate, lipide i proteine u osnovne sastojke (Ikram i sur., 2021). Naime, nastali primarni i sekundarni metaboliti imaju različite biološke učinke na zdravlje kada se konzumiraju u usporedbi sa sjemenkama koje nisu proklijale. Opseg promjena glavnih metabolita te enzimatska aktivnost ovise o vrsti, fazi rasta sadnice, uvjetima klijanja i laboratorijskim tehnikama analize tih promjena (Benincasa i sur., 2019).

### **2.3.1. Ugljikohidrati**

Postoje dvije vrste ugljikohidrata u klicama: strukturni i nestrukturni. Mobilizacija nestrukturnih ugljikohidrata ključan je proces u razvoju klica jer osigurava potrebnu energiju i hranjive tvari prilikom rasta biljke. Škrob, kao glavni složeni ugljikohidrat prisutan u većini povrća, pohranjuje se u obliku amiloze i amilopektina. Njihovu hidrolizu kataliziraju amilaze, čime ih razgrađuju na jednostavnije šećere. Za primjer su uzete klice žitarica. U proklijalim žitaricama amilaze su pokazale svoju aktivnost pa se škrob razgrađuje na reducirajuće šećere glukozu i maltozu te u manjoj mjeri na nereducirajući šećer – saharozu (Aoki i sur., 2006). To rezultira većom probavljivošću što je od važnosti za prehrambenu vrijednost i primjenu proklijalih žitarica. Međutim, profil šećera u proklijalim žitaricama varira ovisno o vrsti. Primjerice neka istraživanja pokazala su da riža, sirak i proso akumuliraju više maltoze, nego glukoze, dok heljda akumulira više glukoze, nego maltoze (Benincasa i sur., 2019). Osim razlika među vrstama, različiti su i učinci ovisno o fazi klijanja. Tako kod pšenice dominira saharoza tijekom početne faze klijanja, a glukoza i maltoza tijekom kasnijih faza klijanja (Aoki i sur., 2006). Također, tkivo proklijalih žitarica utječe na razinu ugljikohidrata, pri čemu pšenica i riža imaju viši sadržaj glukoze u endospermu, dok je saharoza prisutnija u skutelumu (štitniku) (Scofield i sur., 2007).

Strukturni ugljikohidrati, odnosno dijetalna vlakna, predstavljaju jednu od ključnih komponenata cjelovitih žitarica. Mogu biti topljivi u vodi, kao što su to celuloza, hemiceluloza i lignani ili netopljivi kao  $\beta$ -glukani i arabinoksilani (Hübner i Arendt, 2013). Ječam i zob su osobito bogati  $\beta$ -glukanima, kao i sirak i proso, dok su kod drugih vrsta oni prisutni samo u malim udjelima (Lemmens i sur., 2018). Utjecaj klijanja na razinu dijetalnih vlakana u proklijalim žitaricama nije konzistentan i ovisi o tipu vlakna, vremenu klijanja i genotipu žitarice (Nelson i sur., 2013). Na primjer, proklijala pšenica pokazuje značajno povećanje ukupnih dijetalnih vlakana nakon 196 sati inkubacije, no nakon prvih 48 sati pokazuje smanjenje (Koehler i sur.,

2007). Ječam ne pokazuje značajne promjene u razini dijetalnih vlakana nakon 72 sata inkubacije (Teixeira i sur., 2016), dok se u riži ona povećava zbog formiranja novih stanica tijekom procesa sladovanja (Lee i sur., 2007). Ovo povećanje primijećeno je i kod topljivih i netopljivih segmenata vlakana, iako omjer topljivih i netopljivih vlakana varira ovisno o genotipu klica i uvjetima prerade (Ohtsubo i sur., 2005). Ipak, u proklijalom ječmu i zobi, hidrolitička aktivnost endogenih  $\beta$ -glukana reducira razinu samih  $\beta$ -glukana čime se s vremenom smanjuje ukupna razina topljivih vlakana (Hübner i Arendt, 2013). Taj obrazac u suprotnosti je sa pšenicom, gdje je sadržaj topljivih vlakana u početku stabilan, a onda dolazi do povećanja (Koehler i sur., 2007).

### 2.3.2. Proteini

Klijanje značajno utječe na promjene u sastavu proteina, što može rezultirati različitim ishodima u pogledu nutritivne vrijednosti i probavljivosti. Tijekom klijanja zrna, skladišni proteini se pomoću proteolitičkih enzima razgrađuju na peptide i aminokiseline nakon 2-3 dana od početka upijanja vode (faze imbibicije). Time se povećava biološka raspoloživost hranjivih tvari (Taylor i sur., 1985). Na primjer, u cjelovitim žitaricama, sirovi proteini čine 8 do 16 % suhe tvari (Donkor i sur., 2012). Endopeptidaze, koje se formiraju tijekom klijanja i skrivaju unutar aleuronskog sloja i skuteluma, imaju ključnu ulogu u rastu klica jer razgrađuju pohranjene proteine potrebne za proizvodnju funkcionalnih proteina, primjerice  $\beta$ -amilaze (Faltermaier i sur., 2015). Proteoliza je posebno izražena nakon duljih perioda klijanja i na ekstremnim temperaturama, ali općenito ne uzrokuje značajne promjene u ukupnom sadržaju proteina, iako dolazi do razgradnje proteina (Cáceres i sur., 2014).

Klijanje također utječe na topljivost i probavljivost proteina. Glavni skladišni proteini se uglavnom mogu klasificirati prema svojstvima topljivosti na albumine (topljivi u vodi), globuline (topljivi u soli), gluteline (topljivi u lužinama) i prolamine (topljivi u alkoholu) (Taylor i sur., 1985). Opće je poznato da se sadržaj prolamina smanjuje produljenjem trajanja klijanja, što je trend primijećen u istraživanjima na tritikali, ječmu, raži, zobi i pšenici (Lorenz i D'Appolonia, 1980). S druge strane, nekoliko istraživanja je zabilježilo povećanje razine sirovih proteina u ječmu (Youssef i sur., 2013), voštanoj pšenici (Hung i sur., 2012) i smeđoj riži (Moongngarm i Saetung, 2010). Ovo povećanje je rezultat razgradnje pohranjenih proteina i aminokiselina zbog apsorpcije vode, koje se zatim pretvaraju u prijenosne amide i dopremaju do razvijajućih dijelova klica (Tian i sur., 2010). Međutim, sadržaj proteina ovisi o ravnoteži između razgradnje proteina i biosinteze proteina tijekom klijanja (Rusydi i sur., 2011). Zabilježeno je povećanje ukupnog sadržaja aminokiselina, a uz to i značajne promjene u sastavu slobodnih aminokiselina do kojih dolazi tijekom klijanja, pri čemu proklijale žitarice sadrže veće količine esencijalnih aminokiselina, koje su važne za sintezu proteina u ljudskom tijelu. Na sastav



aminokiselina najviše utječu vrsta žitarice i trajanje klijanja (Benincasa i sur., 2019). Kod voštane pšenice, esencijalne aminokiseline kao što su izoleucin, leucin, fenilalanin i valin dosegnule su svoje najviše razine nakon 36 sati klijanja, dok su treonin i metionin dosegle vrhunac nakon 24, odnosno 48 sati (Hung i sur., 2012). Za slad od riže i heljde, veće količine aminokiselina proizvedene su nakon 5, odnosno 4 dana klijanja, a obje vrste su pokazale niske razine asparagina, metionina i histidina (Agu i sur., 2012).

### 2.3.3. Masti

Metabolizam masti tijekom klijanja uključuje složene procese koji dovode do pretvorbe lipida u energiju i druge hranjive tvari potrebne za rast biljke. Čak i u žitaricama, gdje je škrob glavni spremnik ugljika u endospermu, lipidi su prisutni u poprilično velikim količinama u živim tkivima cjelovitih zrna (tj. embrija, skuteluma i aleurona). Prisutni su u obliku triacilglicerola (TAG), a mobiliziraju se iz uljnih tijela putem koordinirane metaboličke aktivnosti koja započinje klijanjem, a završava konačnom pretvorbom ulja u šećere. Naime, enzimi lipaze razgrađuju esterificirane masne kiseline, odnosno TAG na slobodne masne kiseline (SMK) koje se pritom oslobađaju i mogu se razgraditi reakcijama  $\beta$ -oksidacije i glioksilatnog ciklusa, a potom pretvoriti u šećere koji su izvor energije za rast same sadnice (Graham, 2008).

Primjerice, u zobi se cijepanje TAG u embriju odvija prije nego cijepanje TAG u skutelumu, dok se mobilizacija TAG u endospermu odvija kasnije. To je logičan slijed s obzirom na to da je zob specifična žitarica u odnosu na ostale jer sadrži visoki udjel ulja u odnosu na udjel škroba i udjel proteina (Leonova i sur., 2010). Kod voštane pšenice, klijanje tijekom 48 sati nije značajno utjecalo na sastav slobodnih i vezanih lipida, niti na sadržaj esencijalnih masnih kiselina poput linolne i linolenske kiseline (Hung i sur., 2012). Međutim, klijanje ima značajan utjecaj na sastav masnih kiselina u starijim sadnicama, gdje se primjećuje povećanje linolenske kiseline (18:3, odnosno omega-3 masne kiseline) uz smanjenje količine cis-18:1 (npr. oleinska) i cis,cis-18:2 masnih kiselina (npr. linolna) (Ozturk i sur., 2012).

Proces klijanja također utječe na ukupni lipidni sastav zbog katabolizma lipida tijekom rasta sadnice koji služe kao izvor ugljika i energije tijekom biokemijskih procesa. Tako, recimo, kod prosa klijanog na sobnoj temperaturi tijekom tri dana, ječma klijanog na temperaturi 22 °C tijekom pet dana i zobi klijane na 16 °C kroz šest dana, dolazi do smanjenja ukupnog sadržaja lipida za 8 do 15 %. Povećanjem temperature klijanja, dolazi do veće razgradnje lipida, pri čemu je zabilježen pad ukupnih lipida od 18-28 % kod prosa klijanog na 32 °C tijekom dva dana, pšenice na 30 °C tijekom dva dana i riže na 25-30 °C tijekom 1-5 dana. Razgradnja TAG na SMK i glicerol, katalizirana lipazama, omogućuje da se glicerol i SMK pretvore primarno u šećere, koji se koriste za prehranu korjenčića i skuteluma (Kubicka i sur., 2000).

#### 2.3.4. Fitati i minerali

Fitat, odnosno fitinska kiselina prirodni je sastojak koji se može pronaći u sjemenkama biljaka, poput žitarica, mahunarki i grahorica te predstavlja glavni oblik skladištenja fosfora u zrelim biljkama. Međutim, nedovoljna razina endogene crijevne fitaze kod ljudi ograničava iskorištavanje fosfora, a zbog svog velikog afiniteta prema kationima s kojima tvori kelatne komplekse, smanjuje bioraspoloživost minerala, kao što su  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+/3+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  i  $Cu^{2+}$ . Zbog toga se fitat smatra antinutritivnim faktorom (Kumar i sur., 2010). Fitaze, kao podskupina histidinskih kiselih fosfataza sudjeluju u hidrolizi kelatnih kompleksa fitata u mio-inozitol, orto-fosfat i anorganski fosfat, a njihova aktivnost se povećava tijekom klijanja. Kao posljedica toga, sadržaj fitata se tijekom klijanja smanjuje, no različitim intenzitetom, ovisno o vrsti biljke (Hübner i Arendt, 2013). Recimo, u istraživanju na žitaricama, kod ječma je primijećena vrlo niska aktivnost fitaze na početku klijanja, ali se ona nakon nekoliko dana povećala čak osmerostruko (Boukid i sur., 2017). Vrijednosti koncentracije fitaze u žitaricama variraju od najviših vrijednosti u raži te najnižih u zobi (Hübner i Arendt, 2013). Klijanje smeđe riže tijekom 12 do 72 sata dovelo je do smanjenja sadržaja fitata za 60 % (Liang i sur., 2007), dok je kod četverodnevnik klica sirka zabilježena razgradnja fitata do 87 % (Maghoub i Elhag, 1998).

Kako su navedena istraživanja pokazala da se sadržaj fitata tijekom klijanja smanjuje, sukladno tome se bioraspoloživost fosfora i minerala povećava (Benincasa i sur., 2019). Naime, minerali su u ljudskom tijelu potrebni za obavljanje procesa koji ga održavaju zdravim, kao što je kalcij potreban za funkciju srca, mišića, izgradnju kostiju i krvnih stanica, a željezo potrebno za sintezu proteina hemoglobina u krvi. Bakar, molibden, selen i cink ključni su sastojci mnogih značajnih enzima u metabolizmu. Magnezij je bitan za obradu adenozin trifosfata (ATP) i zdravlje kostiju. Natrij i kalij su elektroliti potrebni za regulaciju ATP-a, a fosfor, koji se nalazi u kostima i stanicama, predstavlja ključan element za metabolizam energije i DNA kao fosfat u nukleotidima (Godswill i sur., 2020). Klijanje je dovelo do povećanja koncentracije magnezija u zobi (Hübner i sur., 2010), ječmu i pšenici, dok se koncentracija kalcija u ječmu i pšenici smanjila (Plaza i sur., 2003). U kukuruzu se sadržaj glavnih makroelemenata (Na, K, Mg, Ca i P) nakon dva dana klijanja smanjio, ali se do šestog dana povećao. Sadržaj mikroelemenata (Fe, Zn, Mn, Cu i Co) također je rastao tijekom klijanja (Sokrab i sur., 2012).

#### 2.3.5. Polifenolni spojevi

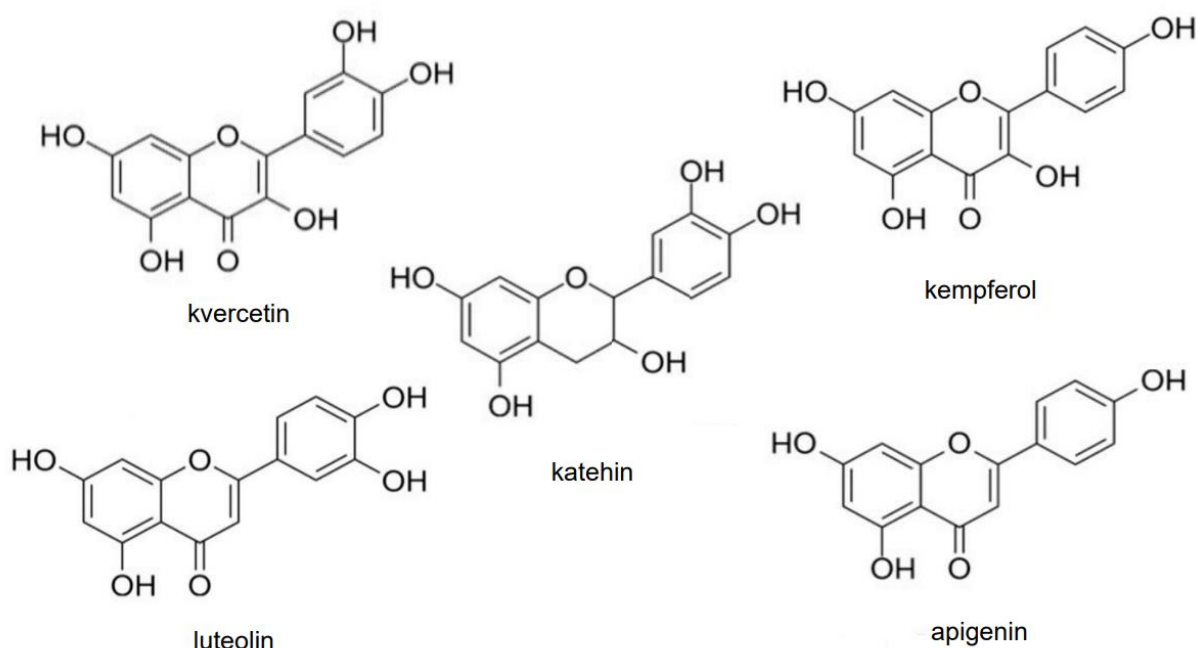
Fenolne tvari, sekundarni metaboliti koje biljke proizvode tijekom klijanja, sadrže barem jedan aromatski prsten s jednom ili više hidroksilnih supstituenata, a na temelju kemijske strukture se mogu podijeliti na flavonoide, tanine, fenolne kiseline, kinone, kumarine i lignane (Agati i sur., 2012). Tako su i fenolni spojevi široko prisutni u hrani biljnog podrijetla, a

najraširenija podskupina su flavonoidi (Roche i sur., 2017). Klice su bogate polifenolnim spojevima koji djeluju kao reducensi, a nastaju kao odgovor na biotički ili abiotički stres. Njihova multifunkcionalnost proizlazi iz njihove prisutnosti u različitim tkivima i organima biljaka pri različitim koncentracijama. U posljednje vrijeme, fenolni spojevi se opsežno istražuju zbog antioksidacijskih, antialergijskih, antikancerogenih, protuupalnih, antivirusnih, antihepatotoksičnih i antiproliferativnih svojstava (Liu i sur., 2019). Točnije, oni štite stanicu od oksidativnih oštećenja, a njihova antioksidacijska učinkovitost ovisi o stabilnosti spoja u različitim uvjetima te o količini i raspodjeli hidroksilnih skupina unutar molekula (Roche i sur., 2017). Fenolne strukture u biljci uglavnom postoje u otopljenom ili vezanom obliku pri čemu vezane strukture sudjeluju u stvaranju stanične stijenke jer nastaju transportom otopljenih fenolnih struktura u staničnu stijenkicu, gdje zatim tvore esterske i glikozidne veze s organskim molekulama stanične stijenke, uključujući hidrolizabilne tanine, lignine, celulozu i proteine (Agati i sur., 2012). Primarni fenoli, poput vanilinske, ferulinske, sinapinske, *p*-kumarinske, *p*-hidroksibenzojeve kiseline i avenantramida uobičajeni su u žitaricama, posebice u zobi. Tijekom klijanja se fenolne kiseline biosintetiziraju, a novonastali enzimi celulaze i endoksilanaze razgrađuju stanične stijenke čime se, iz vezanih, oslobađaju slobodne fenolne kiseline koje su superiorniji antioksidansi od vezanih. Tako se, povećavanjem količine slobodnih fenola, povećava antioksidacijski potencijal samih klica (Lemmens i sur., 2019).

Neka istraživanja otkrila su da se sadržaj fenola u žitaricama povećava nakon klijanja. Kod različitih proklijalih sjemenki postoji značajna razlika u ukupnom sadržaju fenola (engl. *Total Phenolic Content*, *TPC*) u odnosu na neproklijale žitarice. Međutim, istraživanja na klicama soje i leće, mungo graha i crnog graha pokazala su pad koncentracije ukupnih topljivih polifenola, no te namirnice su u manjini. Topljivi fenoli više su proučavani nego vezani, ali neke proklijale i sirove sjemenke proizvode visoke razine vezanih fenola. Nasuprot tome, kod nekih proklijalih žitarica, kao što su smeđa riža i smeđa pšenica, količina vezanih fenola se kontinuirano smanjuje tijekom klijanja. Kod nekih pak istraživanja količina vezanih fenola u proklijalim žitaricama najprije pada, a zatim raste tijekom klijanja. Pretpostavlja se da količina vezanih fenola ovisi o brzini razgradnje i ponovnog vezanja u biljci. Zbog razgradnje konjugata fenola i drugih organskih molekula, vezani fenoli se mogu osloboditi iz tog kompleksa uglavnom tijekom početne faze klijanja (Ikram i sur., 2021).

Najčešći spojevi koji spadaju u skupinu flavonoida i prisutni su u klicama su kvercetin, kempferol, luteolin, katehin, apigenin, čije kemijske strukture su prikazane na slici 1, i njihovi *O*-glikozidi te brojni različiti flavonoidni aglikoni, kao i njihovi *O*-glikozidi. Svaki od njih dio je jedne od mnogih podskupina flavonoida – flavona (npr. apigenin, luteolin), flavonola (npr. kvercetin, kempferol), flavanona (npr. naringenin, hesperidin), flavanola (npr. katehin, epikatehin), izoflavona (npr. genistein, daidzein) i antocijana (npr. cijanidin, pelargonidin) (Panche i sur.,

2016). Ključni flavonoidi se u različitim vrstama klica dakako razlikuju. Primjerice u klicama mungo graha, tamnog graha, rotkvice, suncokreta, brokule i heljde pronađen je kempferol, a također, u njima su pronađeni i njegovi razni derivati – kempferol 3-O-rutinozid, kempferol 3-glukozid, itd. (Paucar-Menacho i sur., 2018). Rutin, poznat i kao kvercetin-3-O-rutinozid, je pronađen u klicama mungo graha, crvenog graha i heljde, a kvercetin i ostali derivati (izokvercetin, kvercetin 3-O-glukozid, itd.) u klicama tamnog graha, mungo graha, brokule, rotkvice, heljde i suncokreta (Ikram i sur., 2021). Luteolin je pronađen u klicama rotkvice, heljde, mungo graha, suncokreta, brokule i sezama (Ha i sur., 2017). U klicama mungo graha, brokule i suncokreta, pronađen je apigenin (Pajak i sur., 2014). U klicama heljde, azuki grahu, penjačkom grahu, zelenom mungo grahu, sjemenu sezama i rižinom grahu pronađen je katehin (Ha i sur., 2017), dok je u azuki grahu, penjačkom grahu, sjemenu sezama, rižinom grahu i šarenom crnom grahu pronađen epikatehin (Gan i sur., 2016). Flavonoidi u klicama su uglavnom prisutni u netopljivom obliku, stoga su vezani unutar raznih struktura unutar stanice ili integrirani u strukture koje čine staničnu stijenku, odnosno vezani za druge spojeve unutar žitarica (Ikram i sur., 2021).



**Slika 1.** Kemijske strukture najčešćih flavonoida prisutnih u klicama (Păcularu-Burada i sur., 2024)

### 2.3.6. Antioksidansi

Klice su stekle popularnost u prehrani jer su izvrstan izvor nekih mikronutrijenata, makronutrijenata i sekundarnih metabolita, odnosno biološki aktivnih spojeva čija je aktivnost u uskoj vezi s njihovom antioksidacijskom sposobnošću. Ta sposobnost u klicama pomaže u

smanjenju oksidacijskog stresa uzrokovanog previsokim razinama reaktivnih kisikovih vrsta u stanicama, tzv. slobodnim radikalima. Antioksidansi, koji su prisutni u klicama, djeluju kao molekularni alati koji pomažu uravnotežiti ovaj proces tako što neutraliziraju slobodne radikale čime se smanjuje njihov negativan utjecaj na stanice i održava redoks ravnoteža (Abellán i sur., 2019). Takvo djelovanje, u konačnici doprinosi smanjenju učestalosti npr. raka i raznih degenerativnih bolesti (Maqbool i sur., 2023). Redoks potencijal tvari utječe na njezinu antioksidacijsku aktivnost, a istraživanjem antioksidacijskog kapaciteta u mnogim klicama, otkriveno je da proces klijanja na njega utječe. Postoje mnoge metode istraživanja, no sve se svode na to da klijanje može značajno poboljšati antioksidacijski kapacitet u klijanim sjemenkama u odnosu na neprokljale sjemenke. To se pripisuje povećanju razine mnogih komponenata s antioksidacijskom sposobnošću (Gan i sur., 2017a). Antioksidanse predstavljaju, dakle, sve molekule s tom sposobnošću, a to su razni već spomenuti polifenolni spojevi, te glukozinolati i vitamini.

Glukozinolati, spojevi karakteristični kupusnjačama, su sekundarni metaboliti odgovora na stres u biljci, no nisu biološki aktivne molekule, već zapravo supstrat za hidrolizu u takve spojeve, od čega su najznačajniji izotiocijanati. Izotiocijanati su široko poznati kao kemopreventivni i detoksifikacijski agensi (Xu i sur., 2009). Kllice kupusnjača, kao što je brokula, bogate su glukozinolatima, od čega je najpoznatiji glukorafanin koji se pomoću crijevne mikroflore hidrolizira u izotiocijanat i sulforafan, a koji se aktivira u prisutnosti glutationa te pomaže u borbi protiv bolesti (Márton i sur., 2010). Osim toga, krstašice (npr. brokula, kelj) sadrže glukooiberin koji također pomaže u smanjenju oksidativnog stresa i prevenciji raka (Moreno i sur., 2006) te indol-3-karbinol koji može spriječiti proliferaciju vrsta stanica raka putem različitih signalnih puteva (Adwas i sur., 2016). U klicama crvene rotkvice, od glukozinolata su prisutni glukorafasatin i glukorafenin. Glukorafasatin se hidrolizira u izotiocijanat sulforafen koji smanjuje oksidacijski stres i ima antimutageni učinak (Baenas i sur., 2017). U radu Márton i sur. (2010) navodi se kako mnoge kllice sadrže višu koncentraciju glukozinolata u usporedbi s neprokljalim sjemenkama, kao i odraslim biljkama. Iz rada se može zaključiti kako su kllice zbog toga vrijedan izvor ovih za zdravlje korisnih spojeva u prehrani.

Vitamini su organske tvari koje su prije svega ključne za rast same biljke jer sudjeluju u brojnim biokemijskim procesima koji dovode do rasta i razvoja klica. Prilikom klijanja, sjeme koristi vlastite rezerve vitamina i drugih hranjivih tvari tako da dolazi do njihove povećane biosinteze u sjemenu, a oni se mogu sintetizirati *de novo* ili transformirati u druge organske tvari (Gan i sur., 2017a). Na taj način, povećava se nutritivna vrijednost samih klica zbog brojnih zdravstvenih učinaka vitamina u ljudskom tijelu. Kao i sadržaj fenolnih spojeva, tijekom klijanja se povećava i sadržaj vitamina topljivih u vodi u različitim sjemenkama. To su primjerice vitamini B1 (tiamin) i B6 (piridoksin) u klicama heljde, vitamin B9 (folat) u klicama soje ili zelenog graha,

te vitamin C (askorbinska kiselina) u klicama heljde, slanutka, lupine, mungo graha i soje (Miyahira i sur., 2021). Vitamin C je prisutan u gotovo svom voću i povrću, a istraživanja pokazuju da se njegov sadržaj značajno povećava tijekom klijanja. Sadržaj vitamina C u sjemenkama prije klijanja je ili vrlo nizak ili nepostojeći, a u procesu klijanja se sintetizira *de novo* (Gan i sur., 2017a). Što se tiče vitamina topljivih u mastima, kao što je vitamin E (tokoferol) u klicama soje, njegov sadržaj, točnije sadržaj  $\gamma$ -tokoferola se tijekom klijanja također povećava, no kod drugih klica – mungo graha i lupine se smanjuje. S obzirom na to, sadržaj vitamina E vjerojatno ovisi o vrsti (Gan i sur., 2017a). S druge strane, u pšenici i riži se sadržaj svih oblika tokoferola ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -) povećava tijekom klijanja. Razlike u vitaminima i njihovim udjelima u različitim klicama ovise o njihovoj vrsti te uvjetima klijanja. Primjerice kod vitamina C je vrlo važno paziti na parametre klijanja kako bi se očuvao jer je foto- i termosenzibilan (Ikram i sur., 2021).

## 2.4. ZNAČAJ KLICA ZA Ljudsko ZDRAVLJE

Kemijske modifikacije koje se zbivaju tijekom klijanja u biljci slične su ljudskom probavnom procesu poboljšavajući na taj način dostupnost makro- i mikronutrijenata. Već je spomenuto kako su klice složena prehrambena matrica u kojoj su hranjive tvari gotovo u cijelosti dostupne te da su bogate bioaktivnim spojevima i antioksidansima (Nelson i sur., 2013). Takav sastav omogućuje im povoljno djelovanje u ljudskom organizmu koje u konačnici dovodi do smanjenja učestalosti i smrtnosti od različitih kroničnih i nezaraznih bolesti, poput kardiovaskularnih, moždanih i gastrointestinalnih bolesti te dijabetesa tipa 2 (Maqbool i sur., 2023).

Do danas je proveden velik broj predkliničkih i eksperimentalnih studija na klijanoj smeđoj riži. Primjerice Lemmens i sur. (2019) došli su do zaključka kako konzumacija klica smeđe riže daje veći funkcionalni učinak jer je pokazala snažan potencijal za bolju kontrolu glikemije, korekciju dislipidemije, smanjenje oksidacijskog stresa, smanjenje inhibitora plazminogen aktivatora tipa 1 (PAI-1) te povećanje koncentracije natrij-kalij ATP-aze i homocistein tiolaktone. Ovi specifični učinci ne mogu se pripisati određenom bioaktivnom spoju, već sinergijskoj interakciji među svim bioaktivnim spojevima međusobno ili s drugim spojevima, primjerice prehrambenim vlaknima (Benincasa i sur., 2019). Klice tatarske heljde korištene za novu „funkcionalnu tjesteninu“ dokazano smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti i metaboličkih poremećaja, poput hipertenzije kod štakora. Naime, spontano hipertenzivni štakori hranjeni tjesteninom koja sadrži 30 % klica tatarske heljde i 70 % durum pšenice imali su bolje parametre krvnog tlaka, što se pripisuje višim razinama kvercetina i rutina (Merendino i sur., 2014). Prehrambena vlakna prisutna u klicama imaju ključnu ulogu u održavanju zdravlja probavnog sustava jer ona reguliraju pražnjenje crijeva, moduliraju crijevnu mikrofloru i pomažu u apsorpciji glukoze i lipida, što je i od važnosti za kontrolu probavnih poremećaja, kao što je

sindrom iritabilnog crijeva (Nagarajan i sur., 2015). Konzumacija vlakana dovodi do stvaranja maslačne kiseline koja smanjuje upale u crijevima modulacijom protuupalnih i proupalnih citokina te pomaže u održavanju zdravlja samog probavnog sustava (Gill i sur., 2021).

Zbog prisutnosti snažnih antioksidansa, odnosno polifenolnih spojeva, klice imaju i neuroprotektivne učinke jer oni svojim djelovanjem poboljšavaju kognitivne funkcije. Naime, oni inhibiraju djelovanje kolinesteraze, čime se smanjuje oksidativni stres u mozgu (Basli i sur., 2012). Primjerice, prema nekim istraživanjima, resveratrol kao česti polifenolni spoj u klicama, pokazao je terapijski potencijal u liječenju Parkinsonove bolesti. Ipak, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se ustanovio temeljni mehanizam njegovog učinka (Jin i sur., 2008).

Osim toga, zbog prisutnosti bioaktivnih spojeva, klice imaju i znatan učinak na sprječavanje oštećenja DNA i antigenotoksičnost čime pokazuju ulogu u sprječavanju zloćudnih bolesti (Gill i sur., 2004). Klice povrća iz porodice kupusnjača (*Brassica*) su pokazale svoj doprinos u smanjenju učestalosti pojave plućnog i kolorektalnog karcinoma (Gawlik-Dziki i sur., 2012), a također su pokazale i hepatoprotektivna, antidijabetska, antioksidacijska (Sahai i Kumar, 2020) te antibakterijska svojstva protiv bakterije *Helicobacter pylori* (Yanaka i sur., 2006). Bilo kako bilo, dosadašnja istraživanja pokazuju velik potencijal klica kao funkcionalne hrane, a daljnja istraživanja trebala bi samo dokazati točne mehanizme djelovanja različitih komponenti prisutnih u klicama na održavanje zdravlja i prevencije bolesti (Maqbool i sur., 2023).

## **2.5. PERSPEKTIVA UPORABE KLICA U PROIZVODNJI FUNKCIONALNE HRANE**

Visoka bioraspoloživost, izvrsne senzorske karakteristike i dulji rok trajanja proizvoda su danas glavni zahtjevi potrošača kojima prehrambena industrija pokušava udovoljiti. Uporaba klica u proizvodnji funkcionalne hrane predstavlja perspektivu za unaprjeđenje nutritivne vrijednosti i senzorskih karakteristika prehrambenih proizvoda te stvaranje noviteta na tržištu (Ikram i sur., 2021). Tijekom klijanja, zrna prolaze kroz brojne biološke promjene koje povećavaju sadržaj vitamina, minerala, antioksidansa i probiotika čime se povećava njihova bioraspoloživost te nutritivna vrijednost proizvoda. Osim toga, te promjene dovode i do poboljšanja senzorskih karakteristika proizvoda. Zbog toga, klice se sve više koriste kao funkcionalni sastojak u raznim prehrambenim proizvodima, pogotovo pekarskim, mliječnim i mesnim proizvodima te pićima (Maqbool i sur., 2023).

U pekarskoj industriji, korištenje klica žitarica za proizvodnju kruha pokazalo je poboljšanje teksture, boje, poroznosti i okusa. Kruh od pšenice s dodatkom klica postaje mekši i ima bolju strukturu, a u bezglutenskim proizvodima, poput kruha od smeđe riže, sirka, kvinoje i zobi, klice doprinose poboljšanju konzistencije i stabilnosti proizvoda što ih čini privlačnijima za potrošače (Ikram i sur., 2021). Primjena brašna od klica žitarica smanjuje potrebu za aditivima, a istovremeno povećava prihvatljivost proizvoda među potrošačima (Marti i sur., 2017). Klice

mahunarki također se mogu koristiti kao sastojak jer doprinose smanjenju antinutritivnih elemenata bez da ugrožavaju nutritivnu kvalitetu (Grassi i sur., 2018). Isto tako, brašno od klica slanutka pokazalo je poboljšanje nutritivnih i reoloških karakteristika proizvoda (Marengo i sur., 2017).

U mliječnim proizvodima, klice su se pokazale korisnima jer mogu povećati sadržaj dijetalnih vlakana te poboljšati teksturu jogurta i drugih fermentiranih proizvoda (Zagorska i sur., 2010). Osim toga, dodatak klica u jogurt doprinosi i povećanju funkcionalnosti proizvoda. Na primjer, dodatak klica raži u jogurt dovelo je do povećanja preživljavanja probiotika što poboljšava prebiotičku aktivnost (Noori i sur., 2017). Brašno od proklijale pšenice koristi se, uz mlijeko i šećer, u proizvodnji „Dhodha“ proizvoda. Proizvod je privlačnih senzorskih karakteristika, a također i dobar izvor prehrambenih vlakana koja obično u mliječnim proizvodima nedostaju (Maqbool i sur., 2023).

Klice se koriste i u razvoju funkcionalnih napitaka. Žitarice su održiva alternativa nemliječnim sirovinama za proizvodnju fermentiranih napitaka, a ujedno i jedan od najvažnijih izvora bioaktivnih spojeva u ljudskoj prehrani (Schwan i Ramos, 2019). Pića na bazi klica, bogata su antioksidansima i, osim što povećavaju nutritivnu vrijednost proizvoda, doprinose stabilnosti probiotika. Tako primjerice napitak na bazi klica sirka, raži i lucerne, u kombinaciji s probioticima *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus plantarum*, ima dobar učinak na održivost probiotika te dobre senzorske ocjene (Mohammadi i sur., 2021), a napitci na bazi klica zobi fermentirani raznim sojevima *Lactobacillus*, imaju višu razinu antioksidansa i fenolnih spojeva za razliku od nefermentiranih napitaka (Luana i sur., 2014).

U mesnoj industriji, klice se koriste kako bi se poboljšala hranjivost proizvoda zbog visokog sadržaja vitamina, minerala i antioksidansa. Potrebe za mesom sve više rastu zbog sve većih potreba za proteinima, što otežava oslanjanje na uzgoj stoke tako da se klice koriste i kao izvor proteina u kombinaciji s pekarskim proizvodima ili napitcima (Benincasa i sur., 2019).

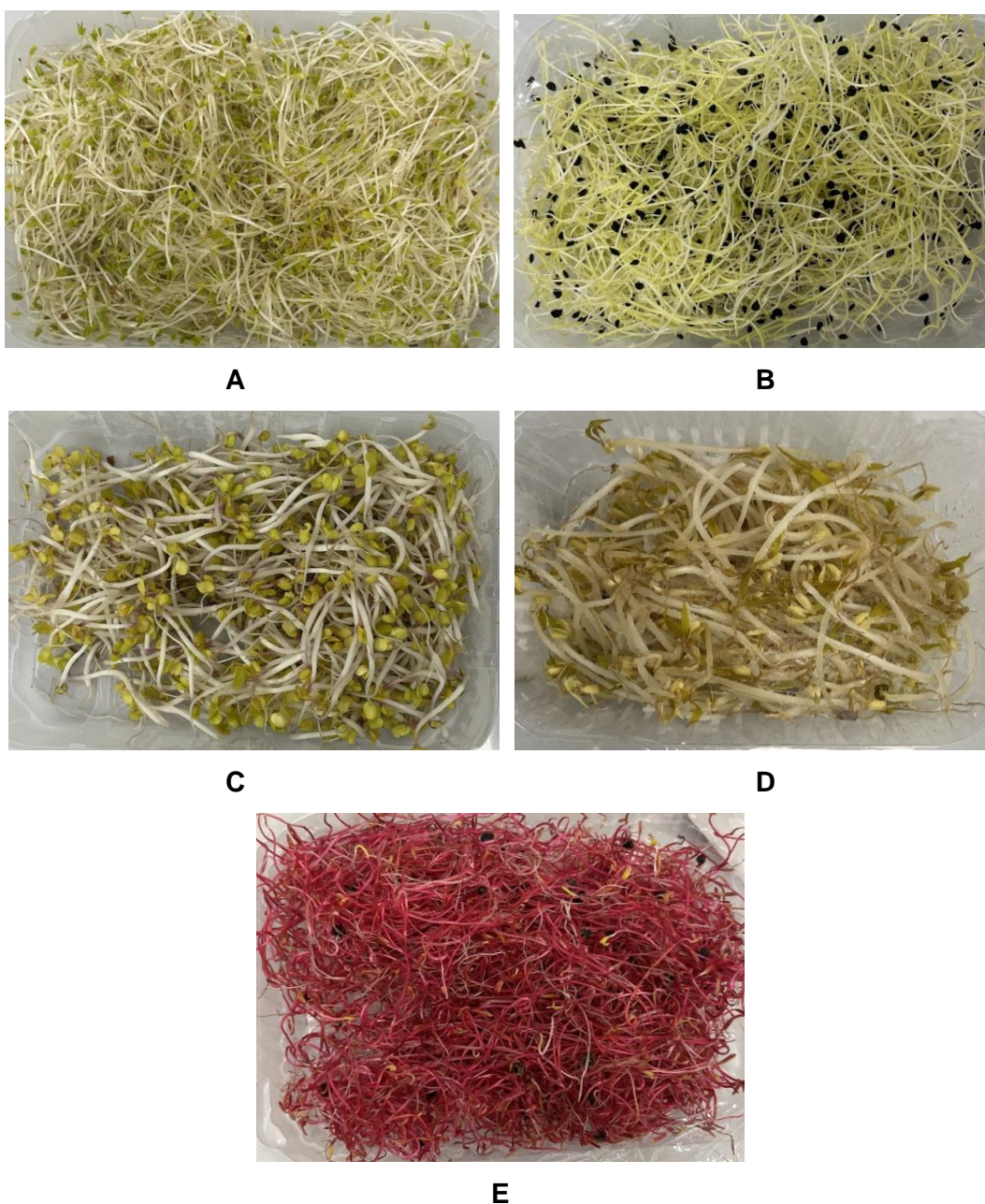
Same klice i mikrobilje se najviše koriste kao svježije prilikom pripreme kod kuće, stoga su potrebne odgovarajuće prakse rukovanja i skladištenja kako bi se održala njihova kvaliteta i sigurnost te odgovarajući rok trajanja. Uz to, istraživanja na klicama moraju uzeti u obzir i optimalne parametre klijanja kako bi se očuvala nutritivna vrijednost proizvoda. Klice su podložne raznim postupcima prerade, kao što su smrzavanje, sušenje, prženje, kuhanje ili centrifugiranje (za proizvodnju soka od klica) kojima se proizvode određeni tipovi proizvoda u kojima je, naravno, poželjno da je sadržaj fitokemikalija i ostalih sastojaka zbog kojih klice imaju bogat nutritivni profil zadržan (Galieni i sur., 2020).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

Za pripremu uzoraka u eksperimentalnom dijelu ovog rada korištene su klice alfalfa, češnjak, rotkvica, mungo grah i cikla proizvođača Solina klice, OPG Brankica Solina (Zagreb, Hrvatska, zemlja podrijetla sjemena: Italija) te su prikazane na slici 2. Svježe klice su usitnjene štapnim mikserom Silvercrest SSMS 600 A1 (Kompernass, Njemačka) te su potom korištene za pripremu ekstrakata. Pored ovih uzoraka, ekstrakti su pripremljeni i iz uzoraka klica osušenih konvencionalno (5 uzoraka), te liofilizacijom (5 uzoraka).



**Slika 2.** Svježi uzorci klica: **A** alfalfa **B** češnjak **C** rotkvica **D** mungo grah **E** cikla (*vlastite fotografije*)

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Sušenje klica i priprema ekstrakata

Dio usitnjenog svježeg uzorka podvrgnut je postupku konvencionalnog sušenja, a dio postupku smržavanja na -20 °C potom na -80 °C kako bi se podvrgnuo postupku liofilizacije. Konvencionalno sušenje uzoraka provedeno je u sušioniku Sahara (Brod&Taylor, Berkshire Innovations Inc., Williamstown, SAD) pri temperaturi 65 °C tijekom 4,5 h. Liofilizacija je provedena u liofilizatoru Christ Alpha 1-2 LD plus (Martin Christ, Osterode, Njemačka dvaput pod 24 h.

Od svježih usitnjenih uzoraka, konvencionalno osušenih uzoraka i liofiliziranih uzoraka pripremljeni su alkoholni ekstrakti.

#### *Aparatura i pribor:*

- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (DT 514 H SONOREX DIGITEC 13.5L, 860W, 40 kHz, Bandelin electronic, Njemačka)
- Sušionik Sahara (Brod&Taylor, Berkshire Innovations Inc., Williamstown, SAD)
- Liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus (Martin Christ, Osterode, Njemačka)
- Špatula
- Erlenmeyerova tikvica sa šlifom, volumena 50 mL
- Menzura, volumena 50 mL
- Odmjerna tikvica, volumena 25 mL
- Stakleni lijevak, filter papir
- Plastične epruvete falcon, volumena 50 mL
- Vortex PV-1 (Grant Instruments Ltd., Cambs, Engleska)
- Staklene čaše, volumena 100 mL

#### *Kemikalije:*

- Etanol, 96 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Etanol 70 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

70 %-tni etanol je pripremljen na način da se 730 mL 96 %-tnog etanola prenijelo u odmjernu tikvicu od 1 L te nadopunilo destiliranom vodom do oznake.

#### Postupak pripreme ekstrakata:

Za pripremu ekstrakata svježih usitnjenih klica odvagano je na analitičkoj vagi 5 g ( $\pm 0,0001$ ) uzorka, za sušeni uzorak 1 g ( $\pm 0,0001$ ) uzorka, a za liofilizirani uzorak 0,5 g ( $\pm 0,0001$ ) uzorka u Erlenmeyerovu tikvicu sa šlifom od 50 mL. Potom je u tikvicu nadodano 20 mL

ekstrakcijskog otapala (70 % otopina etanola, v/v). Tako pripremljena smjesa ekstrahirana je u ultrazvučnoj kupelji pri temperaturi 50 °C tijekom 15 min. Po provedenoj ekstrakciji, ekstrakt je filtriran u odmjernu tikvicu volumena 25 mL i nadopunjen ekstrakcijskim otapalom do oznake.

Dobiveni ekstrakti su prebačeni u falcon epruvete od 50 mL te skladišteni u hladnjaku na +4 °C do provedbe analiza.

### **3.2.2. Određivanje suhe tvari sušenjem na 105 °C**

*Princip određivanja:* Ukupna suha tvar predstavlja cjelokupnu količinu tvari iz sastava proizvoda koja pod određenim uvjetima ne isparava. Svaka sirovina sastoji se od vode i suhe tvari, u kojoj su sadržani svi parametri koji čine prehrambenu vrijednost namirnice. Dakle, svi sastojci, osim vode, čine suhu tvar namirnice.

Metoda se primjenjuje za određivanje ukupne suhe tvari u proizvodima od voća i povrća, a odnosi se na sve takve proizvode osim za one s velikom količinom šećera ili eteričnih ulja. Određivanje ukupne suhe tvari proizvoda provodi se sušenjem na 105 °C. Ovim postupkom određuje se ostatak nakon sušenja na 105 °C do konstantne mase (Pravilnik, 1983).

#### *Aparatura i pribor:*

- Plastična ladica za vaganje, špatula
- Stakleni štapić
- Laboratorijski sušionik
- Eksikator sa sredstvom za sušenje
- Aluminijske posude ili posude od nehrđajućeg čelika ili staklene cilindrične posude s ravnim dnom promjera 60 mm, dubine 25 mm s poklopcem s kojim se posuda hermetički zatvara, a koji se lako skida
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)

#### *Otapala i reagensi:*

- Koncentrirana klorovodična kiselina 37 % (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- 5 %-tna klorovodična kiselina

*Priprema:* 5 %-tna klorovodična kiselina pripremi se tako da se 67,567 mL 37 %-tne klorovodične kiseline prenese u odmjernu tikvicu od 500 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- Kvarcni pijesak ili pijesak koji se upotrebljava za guste proizvode i koji se treba

tretirati s 5 %-tnom klorovodičnom kiselinom, isprati od ostatka kiseline, osušiti i prosijati kroz sito, tako da čestice budu veličine od 100 nm do 400 nm, a nakon toga užariti.

Priprema uzorka: Ukoliko je uzorak kašasti ili tekući, potrebno ga je homogenizirati miješanjem, a ukoliko se radi o cijelom plodu ili dijelovima ploda, uzorak je potrebno usitniti i homogenizirati.

Postupak određivanja: U suhu i izvaganu posudicu za sušenje s poklopcem stavi se oko 5 g kvarcnog pijeska i stakleni štapić. U izvaganu posudicu s kvarcnim pijeskom stavi se 2,5-5 g pripremljenog uzorka koji se staklenim štapićem dobro izmiješa te se sve zajedno izvaže. Posudica s kvarcnim pijeskom i ispitivana količina uzorka stavi se u laboratorijski sušionik zagrijan na temperaturu  $105 \pm 0,5$  °C i zagrijava se sa skinutim poklopcem jedan sat. Potom se hladi u eksikatoru i važe, a sušenje se nastavlja sve dok razlika između dva uzastopna sušenja u razmaku od pola sata ne bude manje od 0,001 g. Na ispitivanom uzorku naprave se najmanje dva određivanja.

Izračunavanje: prema jednadžbi [1]

$$SUHA TVAR (\%) = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \cdot 100 \quad [1]$$

gdje je:

$m_0$  (g) – masa posudice i pomoćnog materijala (kvarcni pijesak, stakleni štapić, poklopac)

$m_1$  (g) – masa posudice s ispitivanim uzorkom prije sušenja

$m_2$  (g) – masa posudice s ostatkom nakon sušenja.

### 3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja: Određivanje ukupnih fenola provodi se u etanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se bazira na specifičnoj reakciji fenolnih spojeva s Folin-Ciocalteu reagensom. Takva reakcija daje plavo obojenje čiji se intenzitet mjeri pri 725 nm (Yuan i sur., 2018).

*Aparatura i pribor:*

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Mikropipete Eppendorf, volumena 1000 i 5000  $\mu$ L
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Vortex PV-1 (Grant Instruments Ltd., Cambs, Engleska)

- Staklene čaše, volumena 100 mL
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastična ladica za vaganje, špatula
- Odmjerne tikvice, volumena 100 i 1000 mL
- Staklena menzura, volumena 1000 mL
- Pipeta, volumena 10 mL

*Otapala i reagensi:*

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens), 5x razrijeđen (Fisher Scientific UK, Loughborough, Velika Britanija)
- Etanol 70 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat bezvodni (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Otopina natrijevog karbonata, 7,5 % (w/v)

*Priprema:* Odvaži se 75 g bezvodnog natrijeva karbonata u staklenoj čaši te se pomoću destilirane vode kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 1000 mL te destiliranom vodom nadopuni do oznake.

- Standard galne kiseline 97,5-102,5 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Otopina standarda galne kiseline 5 g/L

*Priprema:* Odvaži se 500 mg galne kiseline te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

Postupak određivanja:

Određivanje ukupnih fenola u uzorcima provodi se tako da se u epruvetu otpipetira redom 400 µL ekstrakta, 400 µL F.C. reagensa (prethodno razrijeđenog s destiliranom vodom 5x) i 4 mL 7,5 %-tne otopine natrijeva karbonata. Reakcijska smjesa se izmiješa na Vortexu te stoji 20 minuta na sobnoj temperaturi. Potom se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 725 nm. Određivanje se provodi u paraleli, a za slijepu probu se uzima ekstrakcijsko otapalo.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca potrebno je od dobivene otopine galne kiseline koncentracije 5 g/L napraviti razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 25 mL tako da se redom u svaku tikvicu otpipetira 50, 125, 250, 500, 750 i 1250 µL alikvota te se one nadopune destiliranom vodom do oznake. Koncentracije galne kiseline u tikvicama iznose 10, 25, 50, 100, 150 i 250 mg/L. Iz svake tikvice se u staklene epruvete otpipetira 400 µL standarda galne kiseline te redom dodaje 400 µL F.C. reagensa (5x razrijeđenog) i 4 mL 7,5 %-tnog natrijevog karbonata (w/v). Slijepa

proba priprema se na isti način, samo se umjesto otopine standarda dodaje destilirana voda. Reakcijske smjese stoje 20 minuta na sobnoj temperaturi, a potom im se mjeri apsorbancija pri 725 nm. Pomoću standarda galne kiseline izrađen je baždarni pravac iz kojega se izračuna koncentracija ukupnih fenola prema jednadžbi [2]:

$$y = 0,0078x - 0,0032 \quad [2]$$

gdje je:

y- apsorbancija uzorka pri 725 nm

x- koncentracija galne kiseline (mg/L)

### 3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Princip određivanja: Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola se provodi u alkoholnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na mjerenju intenziteta nastalog obojenja u reakciji pri 320 nm i 360 nm (Howard i sur., 2003).

*Aparatura i pribor:*

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene i kvarcne kivete
- Mikropipete Eppendorf od 200, 1000 i 5000  $\mu$ L
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Vortex PV-1 (Grant Instruments Ltd., Cambs, Engleska)
- Staklene čaše, volumena 100 mL
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastična lađica za vaganje, špatula
- Pipete, volumena 1, 2, 5, 10 i 25 mL
- Odmjerne tikvice, volumena 25, 100 i 1000 mL
- Menzura, volumena 100 i 1000 mL

*Otapala i reagensi:*

- Koncentrirana klorovodična kiselina 37 % (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Etanol 96 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična otopina 1 g/L HCl u 96 % etanolu (v/v)

*Priprema:* 0,227 mL 37 %-tne koncentrirane klorovodične kiseline se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni 96 %-tnim etanolom do oznake.

- Klorovodična otopina 2 g/L HCl u destiliranoj vodi (v/v)

*Priprema:* 0,454 mL 37 %-tne koncentrirane klorovodične kiseline se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te se nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- Standard kvercetin hidrat 95 % (Acros Organics, Kina)
- Otopina standarda kvercetina koncentracije 600 mg/L
- Metanol za HPLC  $\leq$  99,9 % (Honeywell, Riedel-de-Haën TM, Francuska)

*Priprema:* Otopina standarda kvercetina koncentracije 600 mg/L pripremi se tako da se odvažuje 60 mg standarda kvercetina te se otopi u 30 mL 100 %-tnog metanola i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL, a potom nadopuni metanolom do oznake.

- Klorogenska kiselina, min. 95 %-tna (Alfa aesar, ThermoFisher, Kandel, Njemačka)
- Otopina standarda klorogenske kiseline koncentracije 600 mg/L

*Priprema:* Otopina standarda klorogenske kiseline u koncentraciji 600 mg/L pripremi se tako da se odvažuje 60 mg klorogenske kiseline te se otopi u 30 mL 100 %-tnog metanola i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL, a potom nadopuni metanolom do oznake.

#### Postupak određivanja:

Analiza se provodi tako da se u staklenu epruvetu redom otpipetira 250  $\mu$ L ekstrakta, 250  $\mu$ L 1 g/L HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl te se sadržaj epruvete izmiješa na Vortexu. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina koriste se kvarcne kivete te se apsorbancija mjeri na 320 nm, a za određivanje ukupnih flavanola koriste se staklene kivete te se apsorbancija mjeri na 360 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, samo se umjesto ekstrakta koristi otapalo u kojem je uzorak ekstrahiran. Određivanje se provodi u paraleli.

#### Izrada baždarnog pravca:

Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za klorogensku kiselinu [3], dok se određivanje ukupnih flavanola provodi pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kvercetin [4].

#### ***Klorogenska kiselina***

Iz otopine standarda 600 mg/L pripreme se razrjeđenja tako da se iz alikvotne otopine u odmjerne tikvice od 25 mL otpipetira redom 0,416; 1,042; 2,083; 3,125; 4,166; 6,25; 8,333; 12,5 i 20,833 mL te se nadopuni 100 %-tnim metanolom do oznake. Koncentracije u tim otopinama pritom iznose: 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 i 500 mg/L. Slijepa proba pripremi se na isti način, samo se umjesto standarda dodaje 100 %-tni metanol.

U staklenu epruvetu se redom otpipetira 250  $\mu$ L otopine standarda, 250  $\mu$ L 1 g/L HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Apsorbancija se potom mjeri na 320 nm u kvarcnim kivetama.

Koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina izračunava se iz jednadžbe baždarnog pravca [3]:

$$y = 0,0025x - 0,0038 \quad [3]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 320 nm,

X – koncentracija klorogenske kiseline (mg/L).

### **Kvercetin**

Iz alikvotne otopine standarda kvercetina 600 mg/L pripreme se slijedeća razrjeđenja: 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 i 500 mg/L tako da se iz alikvotne otopine otpipetira redom: 0,416; 1,042; 2,083; 3,125; 4,166; 6,25; 8,333; 12,5; 16,666 i 20,833 mL u odmjerne tikvice od 25 mL te nadopuni 100 %-tnim metanolom do oznake. Slijepa proba pripremi se na isti način, samo se umjesto standarda uzima 100 %-tni metanol.

U staklenu epruvtu se redom otpipetira 250 µL otopine standarda, 250 µL 1 g/L HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Apsorbancija se potom mjeri na 360 nm u staklenim kivetama. Koncentracija ukupnih flavonola izračunava se iz jednadžbe baždarnog pravca [4]:

$$y = 0,0026x + 0,0083 \quad [4]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 360 nm,

X – koncentracija kvercetina (mg/L).

### **3.2.5. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida**

Princip određivanja: Određivanje ukupnih flavonoida provodi se u etanolnom ekstraktu uzorka pomoću spektrofotometrijske metode koja se temelji na specifičnosti flavonoida da reagiraju s aluminijskim kloridom i kalijevim acetatom te mjerenjem intenziteta nastalog obojenja pri 415 nm (Chang i sur., 2002).

*Aparatura i pribor:*

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Mikropipete Eppendorf od 100, 1000 i 5000 µL
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Vortex PV-1 (Grant Instruments Ltd., Cambs, Engleska)
- Staklene čaše, volumena 100 mL
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)



- Plastične lađice za vaganje, špatula
- Pipete, volumena 1, 2, 5, 10 i 25 mL
- Odmjerne tikvice, volumena 25, 100 i 1000 mL
- Menzura, volumena 100 i 1000 mL

*Otapala i reagensi:*

- Etanol 96 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Aluminijev klorid, 98,5 %, anhidrid (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Aluminijev klorid, 10 % (w/v)

*Priprema:* 10 g aluminijevog klorida se otopi u 10 mL destilirane vode i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- Kalijev acetat, 99 %, anhidrid (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Kalijev acetat, 1 M

*Priprema:* Odvaže se 9,845 g kalijevog acetata te otopi u 10 mL destilirane vode i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL, a potom nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- Metanol za HPLC  $\leq 99,9$  % (Honeywell, Riedel-de-Haën TM, Francuska)
- Standard kvercetin, 95 %, hidrat (Acros Organics, Kina)
- Otopina standarda kvercetina, 200 mg/L

*Priprema:* 20 mg standarda kvercetina odvaže se u plastičnoj lađici za vaganje i otopi se u 10 mL 100 %-tnog metanola te se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 200 mL. Potom se do oznake nadopuni metanolom. Iz alikvotne otopine se prirede redom slijedeća razrjeđenja: 10, 25, 50, 75, 100 i 150 mg/L.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 0,5 mL ekstrakta, 1,5 mL 96%-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Slijepa proba se pripremi na isti način, no umjesto ekstrakta se koristi ekstrakcijsko otapalo dok se umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Nakon termostatiranja na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta, reakcijskoj smjesi se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 415 nm. Određivanje se provodi u paraleli.

Izrada baždarnog pravca:

U odmjerne tikvice volumena 25 mL se otpipetira redom 1,25; 3,125; 6,25; 9,375; 12,5 i 18,75 mL alikvota otopine standarda kvercetina koncentracije 200 mg/L, koje se potom nadopune 100

%-tnim metanolom do oznake. Koncentracije otopina standarda kvercetina u tako pripremljenim razrjeđenjima iznose 10, 25, 50, 75, 100 i 150 mg/L.

Iz svake tikvice se otpipetira redom 0,5 mL otopine standarda, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Slijepa proba se pripremi na isti način, osim što se umjesto standarda dodaje 100 %-tni metanol, a umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida se dodaje destilirana voda. Potom se reakcija odvija 30 minuta na sobnoj temperaturi te se nakon toga mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 415 nm. Koncentracija ukupnih flavonoida se izračunava iz jednadžbe baždarnog pravca [5]:

$$y = 0,0064x - 0,0362 \quad [5]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 415 nm,

X – koncentracija kvercetina (mg/L).

### 3.2.6. Određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom

*Princip određivanja:* Određivanje polimernih proantocijanidina se temelji na kolornoj reakciji spojeva iz skupine flavan-3-ola s vanilinom uslijed čega nastaju obojeni spojevi koji se kvantitativno određuju mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 500 nm (Sun i sur., 1998).

*Aparatura i pribor:*

- Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Germany)
- Staklene kivete
- Mikropipete Eppendorf volumena 200 i 1000 µL
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Vortex PV-1 (Grant Instruments Ltd., Cambs, Engleska)
- Staklene čaše, volumena 100 mL
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Germany)
- Plastične ladice za vaganje, špatula
- Pipete, volumena 1, 2, 5, 10 i 25 mL
- Odmjerne tikvice, volumena 25, 50, 100 i 1000 mL
- Menzure, volumena 100 i 1000 mL

*Otapala i reagensi:*

- Metanol za HPLC ≤ 99,9 % (Honeywell, Riedel-de-Haën TM, Francuska)
- Vanilin, 99 % (ThermoFisher, Kandel, Njemačka)
- 1 %-tna metanolna otopina vanilina

*Priprema:* 1 g vanilina se prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni 100 %-tnim

metanolom do oznake.

- Koncentrirana H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 96 % (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- 25 %-tna otopina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

*Priprema:* 13,02 mL 96 %-tne H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se prenese u odmjernu tikvicu od 50 mL u koju je prethodno dodano cca 20 mL 100 %-tnog metanola. Tikvica se obavezno drži u hladnoj vodenoj kupelji, a konc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se dodaje u malim obrocima! Nakon dodatka cijelog volumena kiseline, tikvica se nadopuni 100 %-tnim metanolom do oznake.

- Standard katehina (5 g/L)

*Priprema:* 500 mg standarda katehina se odvažuje u lađici za vaganje i kvantitativno se pomoću 10 mL 100 %-tnog metanola prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL tako što se otopi u datom volumenu. Potom se nadopuni metanolom do oznake.

#### Postupak određivanja:

Određivanje polimernih proantocijanidina odvija se tako da se u staklenu epruvetu otpipetira 2,5 mL 1 %-tnog vanilina, 2,5 mL 25 %-tne otopine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 1 mL ekstrakta. Sve skupa se promiješa i homogenizira pomoću tresilice Vortex, a reakcijska smjesa potom stoji 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 500 nm. Slijepa proba sadržava sve osim ekstrakta, umjesto kojeg se uzima ekstrakcijsko otapalo. Određivanje se provodi u paraleli.

#### Izrada baždarnog pravca:

Od alikvotne otopine standarda katehina koncentracije 5 g/L se otpipetira redom 50, 150, 300, 450 i 600 µL otopine u odmjerne tikvice volumena 25 mL te se nadopune 100 %-tnim metanolom do oznake. Koncentracije razrijeđenih otopina iznose 10, 30, 60, 90 i 120 mg/L.

Iz svake tikvice se u staklene epruvete otpipetira 1 mL standarda katehina, a potom 2,5 mL 1 %-tnog vanilina i 2,5 mL 25 %-tne otopine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Reakcijske smjese stoje 10 minuta pri sobnoj temperaturi, a potom im se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 500 nm. Za slijepu probu dodaje se sve na isti način, ali se umjesto standarda dodaje metanol.

Koncentracija polimernih proantocijanidina se izračunava iz jednadžbe baždarnog pravca [6]:

$$y = 0,0053x - 0,0124 \quad [6]$$

gdje je:

y- apsorbancija uzorka pri 500 nm

x- koncentracija katehina (mg/L).

### **3.2.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom**

*Princip određivanja:* Određivanje antioksidacijske aktivnosti temelji se na redukciji željezo-

2,4,6-tris-2-piridil-s-triazina (TPTZ-a) koji je žuto obojeni kompleks pri čemu nastaje fero-tripiridiltriazin, plavo obojeni kompleks, koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Benzie, 1996).

*Aparatura i pribor:*

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)
- Električna vodena kupelj Grant (JBN5, Cambridge, UK)
- Staklene čaše, volumena 50 i 500 mL
- Menzura, volumena 50 mL
- Staklene pipete, volumena 5 mL
- Mikropipete Eppendorf od 200, 1000 i 5000  $\mu$ L
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Tehnička vaga Kern (PCB 2500-2, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastična lađica za vaganje, špatula
- Pipete, volumena 1, 2, 5, 10 i 25 mL
- Odmjerne tikvice, volumena 10, 25, 100 i 1000 mL

*Otapala i reagensi:*

- Klorovodična kiselina, 37 %-tna (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Klorovodična kiselina, 40 mM

*Priprema:* 330  $\mu$ L 37 %-tne klorovodične kiseline se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- TPTZ (2,4,6-tris-2-piridil-s-triazin) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- TPTZ (2,4,6-tris-2-piridil-s-triazin) reagens, 10 mM

*Priprema:* U plastičnoj lađici za vaganje se odvaži 0,0312 g TPTZ-a i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL te nadopuni s 40 mM klorovodičnom kiselinom do oznake.

- Željezo (III)-klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Željezo (III)-klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ), 20 mM otopina

*Priprema:* U plastičnoj lađici za vaganje se odvaži 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- Ledena octena kiselina,  $\geq 99,8$  % (Honeywell, Fluka TM, Seelze, Njemačka)
- Natrijev acetat trihidrat otporan prema kalijevu permanganatu (Kemika, Zagreb,

Hrvatska)

- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6

*Priprema:* U plastičnoj ladici za vaganje se odvaže 3,1 g natrijevog acetata trihidrata i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 1 L pomoću destilirane vode. Potom se u tikvicu otpipetira 16 mL ledene octene kiseline koja se zatim nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- FRAP reagens

*Priprema:* U staklenoj čaši volumena 400 mL pomiješa se 250 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.

- Metanol za HPLC  $\leq 99,9\%$  (Honeywell, Riedel-de-Haën TM, Francuska)
- Standard Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) (Biosynth s.r.o., Bratislava, Slovačka)
- Otopina Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina), 1 mM

*Priprema:* Za izradu baždarnog pravca pripremi se 1 mM otopina Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) na način da se odvaga od 0,025 g Trolox otopi u 100 %-tnom metanolu te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni metanolom do oznake.

#### Postupak određivanja:

Prije provedbe analize potrebno je pripremiti svježi FRAP reagens. Prije početka rada sve reagense i standarde je potrebno inkubirati na 37 °C. Analiza se provodi tako da se u staklene epruvete redom otpipetira 600  $\mu$ L adekvatno razrijeđenog ekstrakta i 4500  $\mu$ L FRAP reagensa te se reakcijska smjesa dobro homogenizira. Nakon termostatiranja na temperaturi 37 °C tijekom 10 minuta, reakcijskoj smjesi se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba se pripremi na isti način, no umjesto uzorka se dodaje ekstrakcijsko otapalo. Određivanje se provodi u paraleli.

#### Izrada baždarnog pravca:

U odmjerne tikvice volumena 25 mL redom se otpipetira 0,25; 0,625; 1,25; 2,5; 3,125; 3,75 i 5 mL otopine Trolox (1 mM) te se iste nadopune 100 %-tnim metanolom do oznake. Time se pripreme razrijeđenja otopine Trolox u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 125 i 150  $\mu$ M.

U staklene epruvete se redom otpipetira 600  $\mu$ L otopine standarda i 4500  $\mu$ L FRAP reagensa, a zatim se dobro promiješaju i termostatiraju na temperaturi 37 °C tijekom 10 minuta. Slijepa proba pripremi se na isti način, samo se umjesto standarda dodaje 100 %-tni metanol.

Antioksidacijski kapacitet uzoraka izračunava se iz dobivene jednadžbe baždarnog pravca [7]:

$$y = 0,005x - 0,0081 \quad [7]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 593 nm,

X – koncentracija Troloxa ( $\mu\text{M}$ ).

### 3.2.8. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

*Princip određivanja:* Metoda se temelji na reakciji redukcije stabilnog radikala kationa 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) ( $\text{ABTS}^+$ ) pomoću antioksidanasa. U njihovoj prisutnosti stabilni  $\text{ABTS}^+$  kation se reducira u  $\text{ABTS}^{\cdot-}$  što se u reakciji manifestira obezbojenjem plavo-zelene otopine (Re i sur., 1999).

*Aparatura i pribor:*

- Odmjerna tikvica, volumena 5 mL
- UV/VIS spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Staklena lađica, špatula
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)
- Mikropipete, volumena 100 i 1000  $\mu\text{L}$
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Odmjerne tikvice, volumena 5, 10, 25 i 100 mL
- Pipete, volumena 1, 2, 5 i 10 mL

*Otapala i reagensi:*

- 7 mM otopina  $\text{ABTS}^+$  (m/v)

*Priprema:* 0,0192 g  $\text{ABTS}^+$ -a otopi se u odmjerne tikvici od 5 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- 140 mM otopina kalijeva persulfata (m/v),  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$

*Priprema:* 0,18920 g  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  se otopi u odmjerne tikvici od 5 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- $\text{ABTS}^+$  reagens
- $\text{ABTS}^+$  1 %-tna otopina

*Priprema:* Prvi dan se 88  $\mu\text{L}$  kalijeva persulfata otpipetira u odmjernu tikvicu s 5 mL otopine  $\text{ABTS}^+$ . Tikvica se obloži aluminijskom folijom i čuva u mraku 12-16 sati prije analize. Drugi dan se od pripremljenog  $\text{ABTS}^+$  reagensa priprema 1 %-tna  $\text{ABTS}^+$  otopina tako da se otpipetira 1000  $\mu\text{L}$   $\text{ABTS}^+$  reagensa u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni 96 %-tnim etanolom do

oznake. Pripremljenoj otopini se mjeri apsorbancija pri 734 nm, a kao slijepa proba uzima se 96 %-tni etanol. Apsorbancija treba iznositi  $0,734 \pm 0,02$ , a ukoliko je veća od 0,734, ABTS<sup>+</sup> otopinu je potrebno razrijediti 96 %-tnim etanolom te ukoliko je manja od 0,734, potrebno je nadodati ABTS<sup>+</sup> reagensa i mjerenja uzastopno ponavljati dok se ne dostigne zadana apsorbancija.

#### Postupak određivanja:

Analiza se provodi tako da se u staklenu epruvetu otpipetira 240  $\mu$ L adekvatno razrijeđenog ekstrakta te 3 mL ABTS<sup>+</sup> reagensa. Potom se reakcijska smjesa inkubira na sobnoj temperaturi u mraku 10 minuta. Nakon toga, mjeri se apsorbancija pri 734 nm, a kao slijepa proba koristi se etanol. Ukoliko izmjerene apsorbance ekstrakata prelaze vrijednost 0,513 ekstraktima je potrebno prilagoditi razrijeđenje.

#### Izračunavanje:

Rezultati se prikazuju kao % inhibicije pomoću formule [8] ili pomoću jednadžbe baždarnog pravca [9].

$$I (\%) = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100 \quad [8]$$

gdje je:

$A_0$  – apsorbancija ABTS<sup>+</sup> otopine

$A_s$  – apsorbancija uzorka

#### Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca pripremi se 1 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) na način da se odvaga od 0,025 g Troloxa otopi u 96 %-tnom etanolu i nadopuni etanolom do oznake u odmjerne tikvici od 100 mL.

Od te 1 mM otopine Troloxa otpipetira se redom 0,625; 1,25; 2,5; 5 i 7,5 mL u odmjerne tikvice od 25 mL koje se potom nadopune 96 %-tnim etanolom do oznake pri čemu koncentracije otopina iznose 25, 50, 100, 200 i 300  $\mu$ M.

U staklene epruvete se redom otpipetira 160  $\mu$ L otopine standarda i 2 mL ABTS<sup>+</sup> otopine. Potom se reakcijske smjese inkubiraju u mraku na sobnoj temperaturi. Slijepa proba je etanol. Na kraju im se mjeri apsorbancija pri 734 nm.

Antioksidacijski kapacitet uzoraka izračuna se iz jednadžbe baždarnog pravca [9]:

$$y = -0,0015x + 0,5143 \quad [9]$$

$$R^2 = 0,9992$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 734 nm

x – koncentracija ABTS<sup>+</sup> otopine

R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

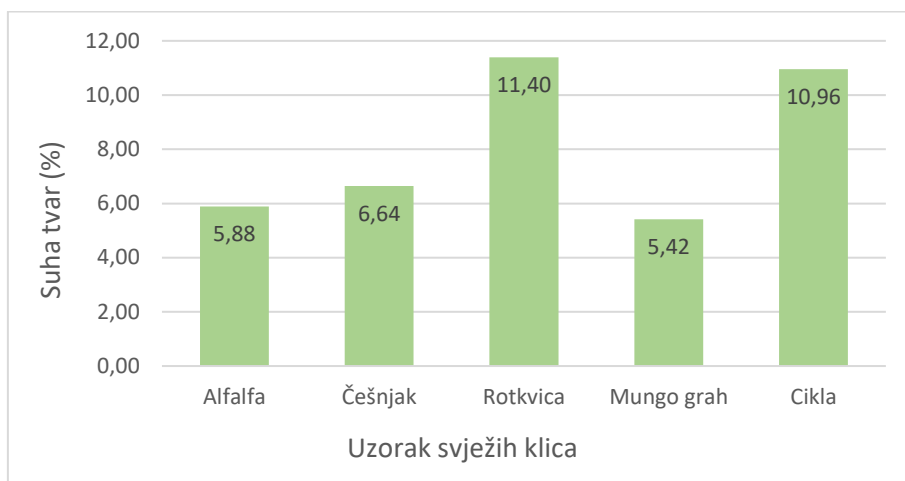
U ovom istraživanju ispitivan je bioaktivni i antioksidacijski potencijal u 15 uzoraka klica, od čega se 5 uzoraka odnosi na svježe, 5 uzoraka na liofilizirane i 5 uzoraka na konvencionalno sušene klice. U svim uzorcima određivan je sadržaj ukupne suhe tvari sušenjem, te su spektrofotometrijski određeni udjeli ukupnih fenola, ukupnih hidrokscimetnih kiselina i flavonola, ukupnih flavonoida, polimernih proantocijanidina te antioksidacijska aktivnost primjenom FRAP i ABTS metode.

### 4.1. REZULTATI ANALIZE SUHE TVARI

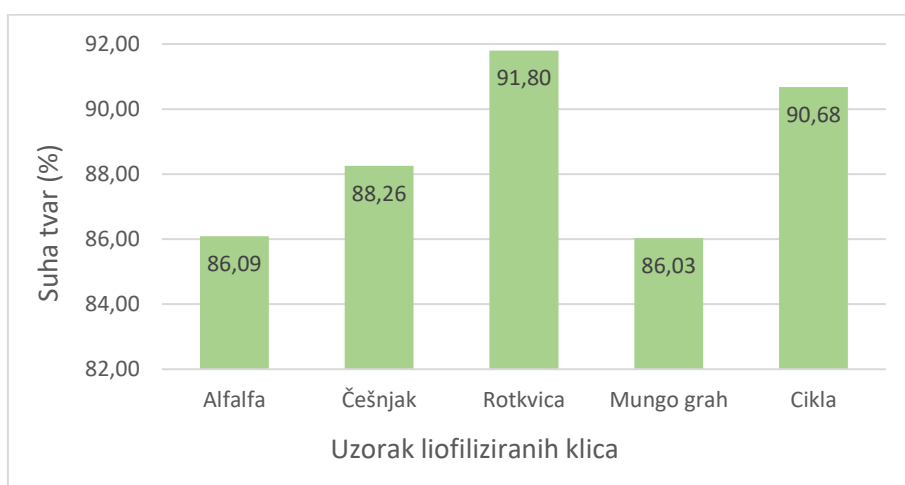
Rezultati analize sadržaja ukupne suhe tvari u svim uzorcima klica prikazani su grafički na slici 3. Iz rezultata je vidljivo da je sadržaj ukupne suhe tvari u uzorcima svježih klica imao najviše vrijednosti u rotkvici i ciklu koje iznose 11,40 i 10,96 %, dok mungo grah i alfalfa imaju najniže vrijednosti od 5,42 i 5,88 %. U uzorcima liofiliziranih klica, rotkvica i cikla ponovno imaju najviše vrijednosti suhe tvari, koje iznose 91,80 i 90,68 %, a najniže mungo grah i alfalfa koje iznose 86,03 i 86,09 %. U uzorcima sušenih klica, cikla i alfalfa postižu najviše vrijednosti koje iznose 94,14 i 94,09 %, a mungo grah najnižu koja iznosi 87,30 %. Iz ovih rezultata također se može vidjeti kako se liofiliziranjem i sušenjem, sadržaj suhe tvari u odnosu na uzorke u svježem obliku povećava, što odgovara procesu obrade uzoraka. Cikla i rotkvica su uzorci s konzistentno visokim, a mungo grah s najnižim vrijednostima suhe tvari u svim oblicima uzoraka. Alfalfa, iako ima niže vrijednosti suhe tvari u odnosu na ostale vrste klica u svježem i liofiliziranom obliku, sušenjem pokazuje znatan porast od čak 8 %.

U istraživanju Wojdyło i sur. (2020) mjerena je ukupna suha tvar u raznim vrstama svježih klica i mikrozelenja, uključujući rotkvicu, ciklu i mungo grah. U rotkvici je zabilježena vrijednost suhe tvari od 16,5 % u klicama i 5 % u mikrozelenju, a u ciklu 6,9 % u klicama i 5,5 % u mikrozelenju. Razlike u vrijednostima između klica i mikrozelenja posljedica su različitih uvjeta uzgoja, budući da mikrozelenje, kao tip klica, upija više vode i sprječava njezin gubitak što smanjuje njegovu vrijednost suhe tvari. Vrijednost ukupne suhe tvari u uzorku mungo graha mjerena je samo u klicama i iznosi 4,7 % što nije znatna razlika u odnosu na rezultate ovog istraživanja. Različiti uvjeti uzgoja, poput vremena klijanja, temperature, vlage i svjetlosti, su svakako moguć razlog zašto se vrijednosti suhe tvari rotkvice i cikle u usporedbi s vrijednostima ovog istraživanja razlikuju.

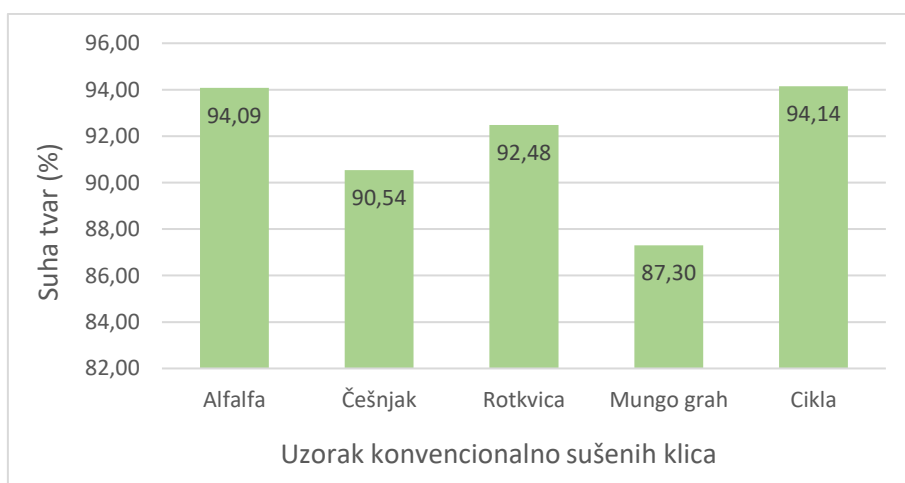
Na primjer, istraživanje Mastropasqua i sur. (2020) bavilo se utjecajem svjetlosnih uvjeta na nutritivni sastav klica rotkvice i mungo graha, uključujući ukupnu suhu tvar.



**A**



**B**



**C**

**Slika 3.** Grafički prikaz rezultata ukupne suhe tvari (%) u uzorcima svježih (A), liofiliziranih (B) i konvencionalno sušenih klica (C)

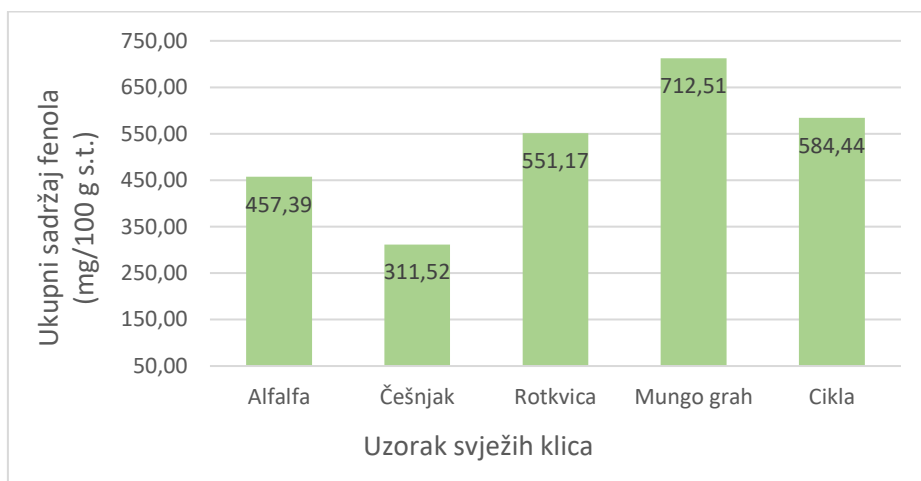
U rotkvici je vrijednost u uzorku uzgajanom u tami, koja iznosi približno 11 %, najbliža dobivenoj vrijednosti u ovom istraživanju, dok su u mungo grahu vrijednosti u svim uzorcima bile nešto više, od približno 12 do 17 %.

Iako trenutno nisu dostupna istraživanja koja se bave direktnim mjerenjem ukupne suhe tvari u konvencionalno sušenim ili liofiliziranim klicama korištenim u ovom radu, postoje neka istraživanja koja proučavaju ove postupke obrade s ciljem očuvanja nutritivnih i bioaktivnih svojstava klica, u kojima se spominje sadržaj vode u uzorcima. Prilikom konvencionalnog sušenja klica mungo graha, jedno je istraživanje ukazalo na smanjenje sadržaja vlage tijekom vremena sušenja što upućuje na povećanje udjela ukupne suhe tvari (Salehi, 2024).

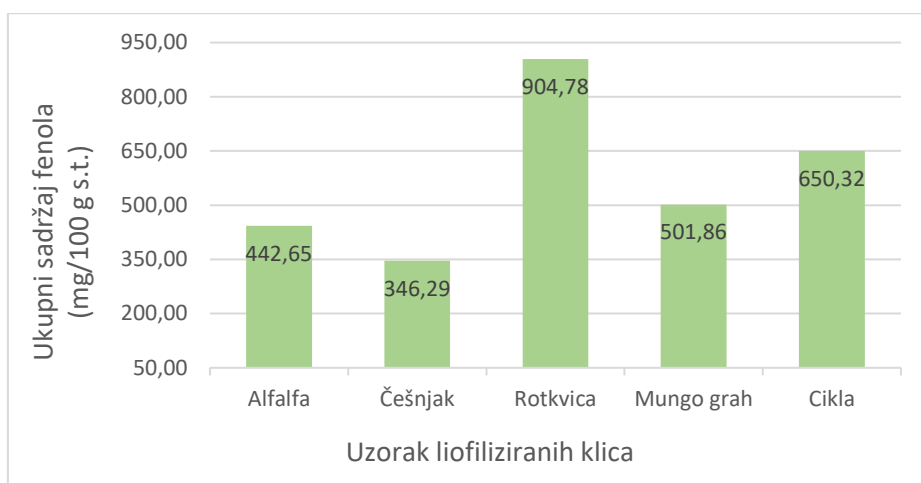
#### **4.2. REZULTATI ANALIZE SADRŽAJA UKUPNIH FENOLA**

Rezultati određivanja udjela ukupnih fenola u uzorcima klica prikazani su na slici 4. Rezultati pokazuju da je sadržaj ukupnih fenola (TPC) u uzorcima svježih klica najviši u uzorku mungo graha i iznosi 712,51 mg/100 g suhe tvari (s.t.) uzorka, dok je u uzorku češnjaka najniži i iznosi 311,52 mg/100 g s.t. U liofiliziranim uzorcima, udio TPC je najviši u rotkvici i iznosi 904,78 mg/100 g s.t., a najmanji ponovno u češnjaku i iznosi 346,29 mg/100 g s.t. U sušenim uzorcima, najviši udio TPC je u cikli (918,29 mg/100 g s.t.) i rotkvici (804,27 mg/100 g s.t.). Najmanji TPC ponovno je određen u klicama češnjaka, kojemu je vrijednost nakon sušenja snižena na 291,68 mg/100 g s.t. Obradivanje klica je u ponekim uzorcima dovelo do povećanja udjela TPC, dok je u nekima dovelo do sniženja. Primjerice, u rotkvici i cikli, liofiliziranjem i sušenjem se udio TPC znatno povećao u odnosu na svježije oblike, iako je za rotkvicu povoljnije bilo liofiliziranje, a za ciklu sušenje. U alfalfa i mungo grahu došlo je do smanjenja TPC, a u češnjaku do malog porasta tijekom liofilizacije (u odnosu na svježi uzorak), a potom do pada tijekom sušenja. Zaključno, u uzorcima s povećanjem TPC nakon obrade sušenjem, to povećanje je veće, nego što je pad u uzorcima u kojima se TPC smanjio.

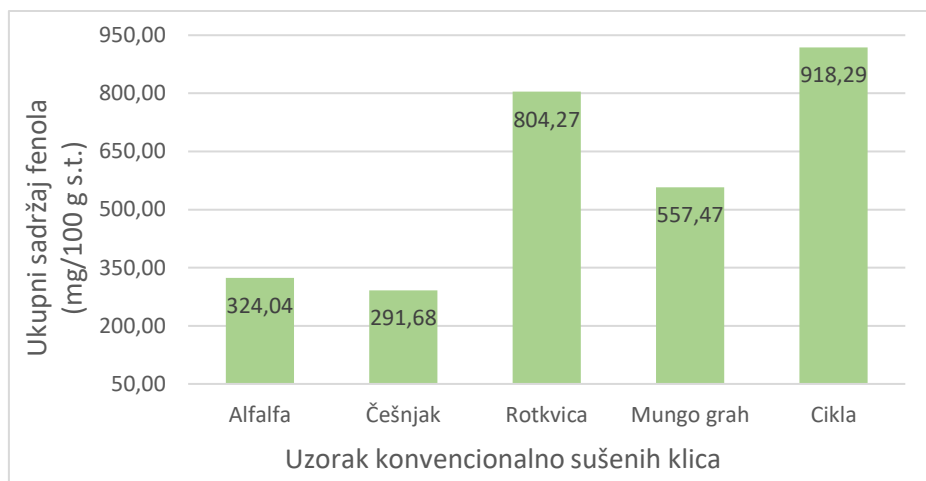
Francis i sur. (2022) su istraživali stabilnost TPC u svježim klicama alfalfa i rotkvice u ovisnosti o danima klijanja, pri čemu su dobili vrijednosti u rasponu od 150-550 mg/100 g s.t u alfalfa te 300-1000 mg/100 g s.t. u rotkvici. Rezultati u ovom istraživanju također se nalaze u tim rasponima i uglavnom odgovaraju vrijednostima između 3. i 5. dana klijanja. Mastropasqua i sur. (2020) u svježim klicama mungo graha uzgajanim pod različitim uvjetima svjetlosti odredili su vrijednosti TPC od približno 0,5 mg/g svježeg uzorka što je mala razlika u odnosu na ovo istraživanje. Naime, bez preračunavanja na s.t. uzorka, ta vrijednost iznosi 0,39 mg/g.



**A**



**B**



**C**

**Slika 4.** Grafički prikaz rezultata ukupnih fenola (mg/100 g s.t. (suhe tvari) uzorka) u uzorcima svježih (A), liofiliziranih (B) i konvencionalno sušenih klica (C)

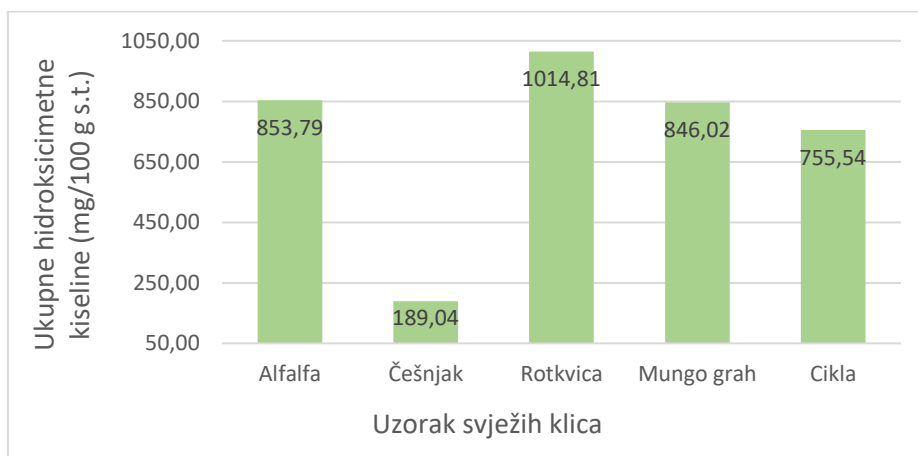
U istraživanju na mikrozelenju cikle, vrijednosti TPC u ovisnosti o danima klijanja bile su u rasponu od približno 650 do 900 mg/100 g s.t. što je neznatno više od vrijednosti u ovom

istraživanju (Acharya i sur., 2021). Neki radovi navode da procesi liofilizacije i sušenja u klicama mogu povećati sadržaj TPC jer su tijekom tih procesa fenolni spojevi bolje sačuvani od kemijskih promjena, no za svaku vrstu klica važno je odabrati odgovarajuću metodu i uvjete sušenja kako bi se njihova stabilnost očuvala (Dziki i sur., 2020). Kao razlog zašto su u nekim liofiliziranim uzorcima vrijednosti TPC bile više u odnosu na sušene uzorke, Coşkun i sur. (2024) navode višu temperaturu zbog koje dolazi do degradacije fenolnih spojeva. Ipak, u nekim sušenim uzorcima, kao što je to uzorak mungo graha, došlo je do povećanja TPC u odnosu na liofilizirane uzorke, zbog toga što je, kako sugeriraju Gan i sur. (2017b), pod djelovanjem više temperature došlo do stvaranja dodatnih spojeva što može biti odgovor na stres u biljnom materijalu.

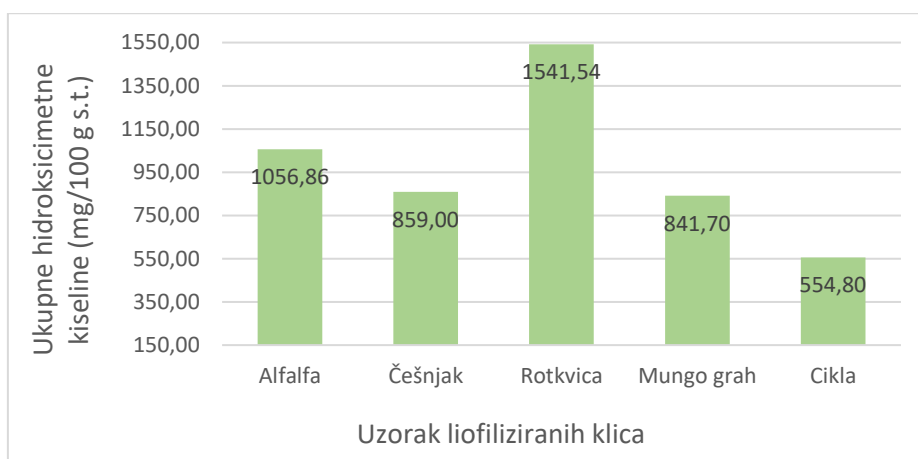
### **4.3. REZULTATI ANALIZE SADRŽAJA UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA I FLAVONOLA**

Rezultati određivanja udjela ukupnih hidrokscimetnih kiselina u uzorcima klica prikazani su grafički na slici 5. Iz rezultata se može očitati da je u uzorcima svježih klica, najviši udio ukupnih hidrokscimetnih kiselina (engl. *hydroxycinnamic acids, HCA*) u rotkvici i iznosi 1014,81 mg/100 g s.t., dok je najniži u češnjaku i iznosi 189,04 mg/100 g s.t. što je znatno niže u odnosu na ostale uzorke čiji raspon iznosi od 755 do 854 mg/100 g s.t. Liofilizacijom se udio HCA u klicama češnjaka znatno povisio i to na 859,00 mg/100 g s.t., dok su klice rotkvice zadržale najvišu vrijednost od 1541,54 mg/100 g s.t. S druge strane, u klicama cikla, ta je vrijednost najniža i snizila se na 554,80 g/100 g s.t. U klicama alfalfa vidljivo je nešto manje povišenje udjela HCA, a u klicama mungo graha nije došlo do znatne promjene. Sušenjem se udio HCA u svim uzorcima snizio u odnosu na liofilizirane uzorke pri čemu najviša vrijednost ostaje u rotkvici i iznosi 1126,84 mg/100 g s.t., a najniža u cikli i iznosi 513,53 mg/100 g s.t. Zaključno, može se istaknuti da su klice rotkvice najbogatiji, a klice češnjaka najslabiji izvor HCA te da se tretmanom liofilizacije najpovoljnije utječe na stabilnost HCA u gotovo svim uzorcima, osim u klicama cikla koje imaju najviše vrijednosti u svježem obliku.

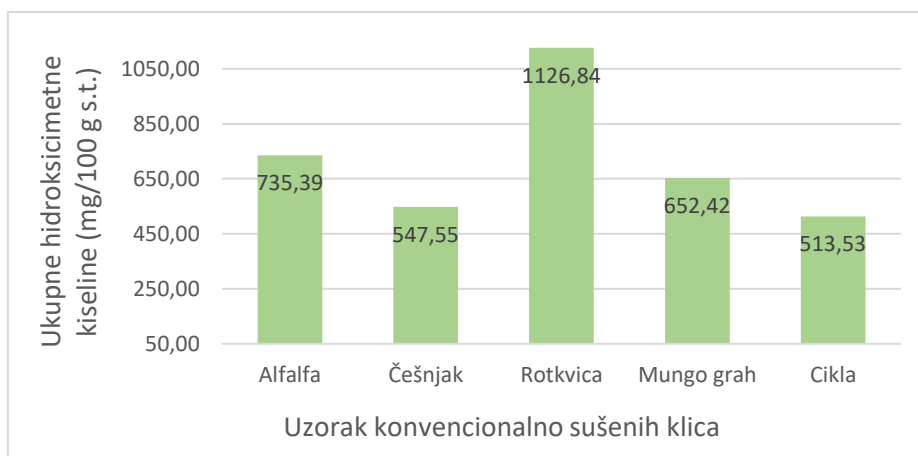
U istraživanju na klicama rotkvice, vrijednost ukupnih HCA iznosila je približno 1000 mg/100 g s.t. u svježem uzorku, što je u skladu s rezultatima ovog rada (Gagić, 2021). Dostupna literatura koja se bavi direktnim mjerenjem ukupnih HCA u ostalim klicama obuhvaćenih ovim istraživanjem je ograničena, no postoje istraživanja koja su se bavila analizom HCA metodom visokoučinkovite tekućinske kromatografije (engl. *high-performance liquid chromatography, HPLC*).



**A**



**B**



**C**

**Slika 5.** Grafički prikaz rezultata ukupnih hidroksicimetnih kiselina (mg/100 g s.t. uzorka) u uzorcima svježih (A), liofiliziranih (B) i konvencionalno sušenih klica (C)

Ovom metodom Stajčić i sur. (2024) su u uzorku cikle izmjerili vrijednost HCA od 313,9 mg/g, ali budući da su istraživane u sklopu određivanja fenolnih kiselina, te vrijednosti nije moguće usporediti s onima u ovom istraživanju. Također, metodom HPLC mogu se detektirati

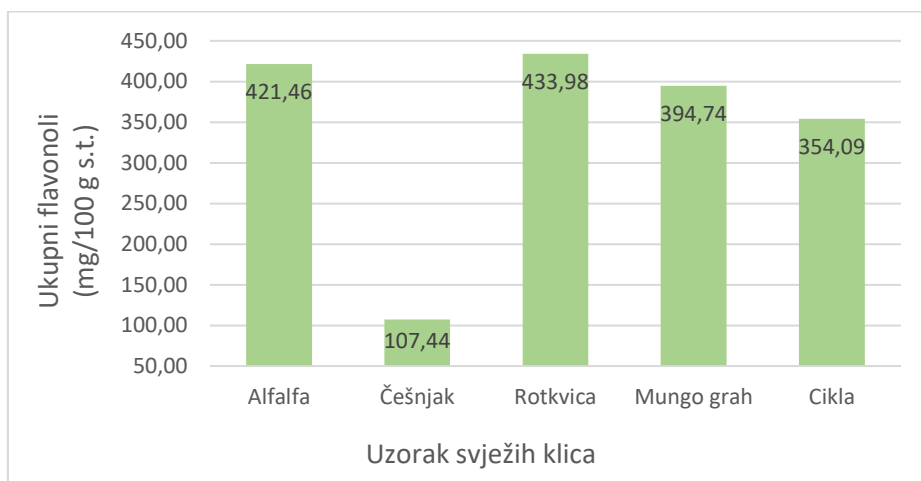
i kvantificirati specifični spojevi u uzorcima, stoga su u cikli identificirane sljedeće HCA: ferulinska, sinapinska, *p*-kumarinska i kafeinska kiselina. So i sur. (2023) detektirali su klorogensku kiselinu u klicama mungo graha i kafeinsku kiselinu u klicama rotkvice.

Prema dostupnoj literaturi koja obuhvaća istraživanja utjecaja različitih metoda sušenja na stabilnost HCA, studija na biljci pomoćnici je metodom HPLC pokazala povećanje udjela pojedinih derivata HCA u obrađenim u odnosu na svježe uzorke. Pronađeno je da neki derivati imaju veće koncentracije pri liofilizaciji, dok su drugi prisutniji nakon određenih metoda sušenja (Managa i sur., 2020). Liofilizacija je povoljnija metoda sušenja jer minimalno narušava fenolne spojeve, uključujući HCA, dok konvencionalno sušenje, iako jeftinije, može smanjiti njihov sadržaj. Pojedine HCA, poput kumarinske kiseline, osjetljive su na toplinu i oksidaciju te stoga podliježu degradaciji. Međutim, druge su stabilnije i otpornije, što im omogućuje očuvanje i bolju stabilnost tijekom sušenja (Schendel, 2019).

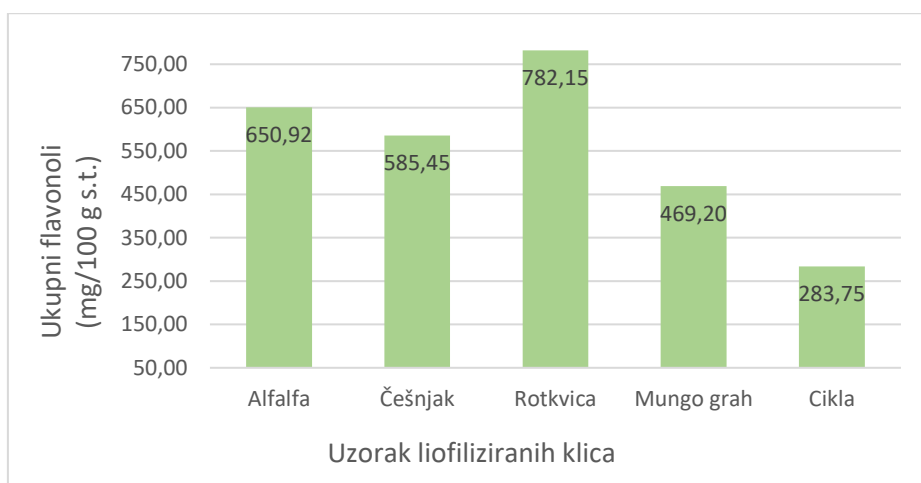
Rezultati određivanja udjela ukupnih flavonola u uzorcima klica prikazani su grafički na slici 6. Prema rezultatima je vidljivo da su vrijednosti ukupnih flavonola najviše u klicama rotkvice (433,98 mg/100 g s.t.) i alfalfa (421,46 mg/100 g s.t. uzorka), a najniža vrijednost utvrđena je u klicama češnjaka (107,44 mg/100 g s.t.). Liofilizacijom se sadržaj flavonola znatno povisuje u svim uzorcima, osim cikle gdje je najniži, pri čemu najviša vrijednost ostaje u rotkvici i iznosi 782,15 mg/100 g s.t. U cikli se vrijednost snizila na 283,75 mg/100 g s.t. Konvencionalno sušenje u odnosu na liofilizaciju pokazuje sniženje vrijednosti u svim uzorcima. Najviša vrijednost je pritom i dalje u klicama rotkvice, koje su najbogatiji izvor flavonola, i iznosi 581,16 mg/100 g s.t., dok za klice cikle ni ovaj tretman nije povoljan jer u tom uzorku njihova vrijednost ponovno najniža i iznosi 276,63 mg/100 g s.t.

Dostupna literatura u kojoj se mjerio sadržaj ukupnih flavonola spektrofotometrijskom metodom u klicama korištenim u ovom istraživanju također je ograničena. Janicki i sur. (2005) mjerili su sadržaj ukupnih flavonola u klicama alfalfa i rotkvice, no primijenili su metodu HPLC, koja je preciznija i omogućuje kvantifikaciju specifičnih flavonola. Zbog toga su njihovi rezultati znatno niži od rezultata dobivenih u ovom istraživanju. Spojevi iz skupine flavonola identificirani u obje vrste ovih klica bili su miricetin, morin, kvercetin i kempferol, pri čemu su koncentracije tih spojeva varirale ovisno o uvjetima klijanja.

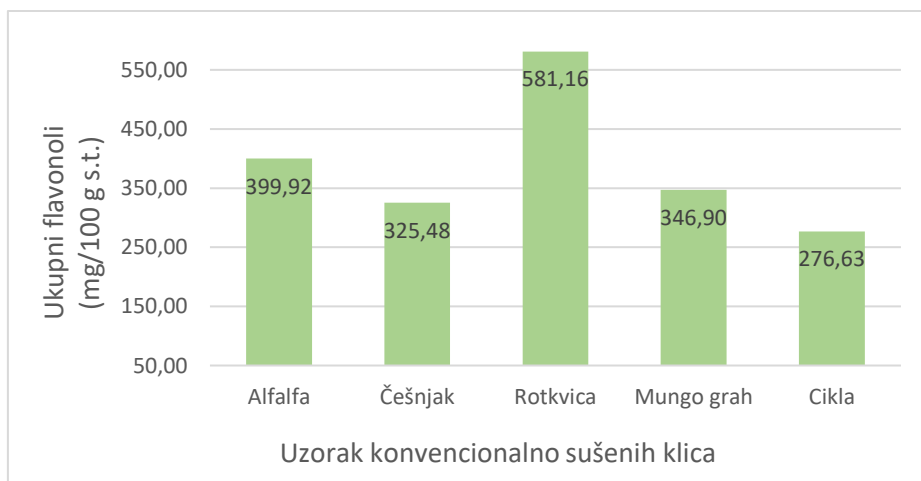
Obrada toplinom utječe, kako na sve fenolne spojeve, tako i na flavonole. U nekim slučajevima, previsoka temperatura može uzrokovati degradaciju fenolnih spojeva, dok umjerene temperature mogu uzrokovati oslobađanje vezanih fenola što povećava koncentraciju slobodnih i poboljšava bioaktivni sastav klica. Zato je važno optimizirati uvjete liofilizacije ili konvencionalnog sušenja tijekom obrade klica kako bi se osiguralo što bolje očuvanje fenolnih spojeva, uključujući flavonole (Buchner i sur., 2006).



**A**



**B**



**C**

**Slika 6.** Grafički prikaz rezultata ukupnih flavonola (mg/100 g s.t. uzorka) u uzorcima svježih (A), liofiliziranih (B) i konvencionalno sušenih klica (C)

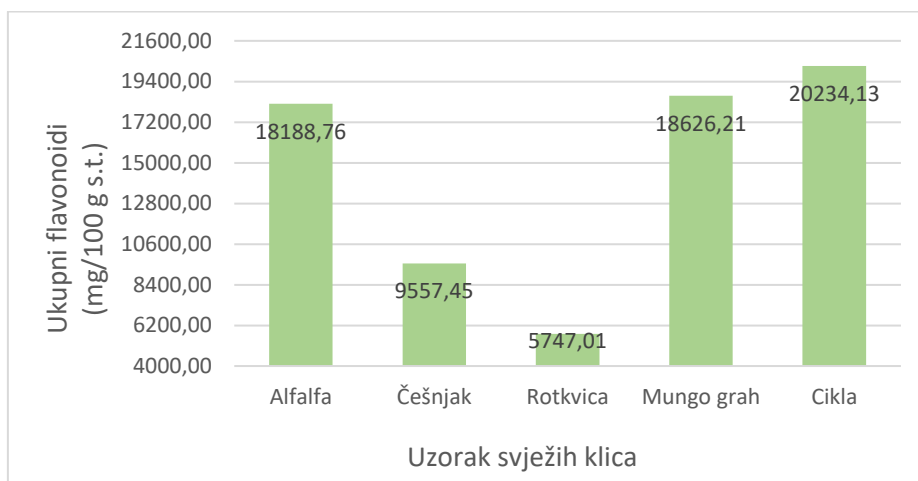


#### 4.4. REZULTATI ANALIZE SADRŽAJA UKUPNIH FLAVONOIDA

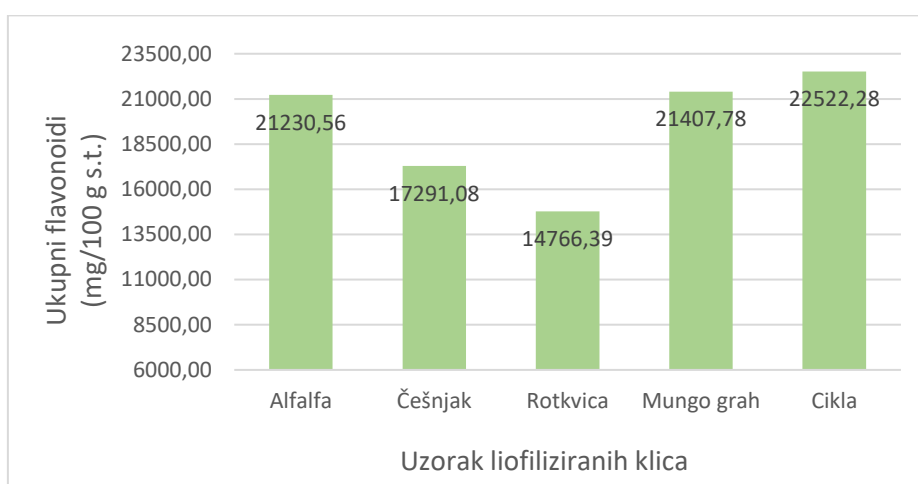
Rezultati određivanja sadržaja ukupnih flavonoida u uzorcima klica prikazani su grafički na slici 7. Iz rezultata je vidljivo da je u uzorcima svježih klica, najviša vrijednost udjela ukupnih flavonoida (FLA) u cikli i iznosi 20234,13 mg/100 g s.t., a nešto niže vrijednosti od 18626,21 i 18188,78 mg/100 g s.t. su u mungo grahu i alfalfa, dok je najniža u rotkvici i iznosi 5747,01 mg/100 g s.t. U liofiliziranim uzorcima primijećen je isti trend vrijednosti ukupnih FLA tako da ga prati najviša vrijednost u cikli i iznosi 22522,28 mg/100 g s.t., nešto niže vrijednosti od 21407,78 i 21230,56 mg/100 g s.t. u mungo grahu i alfalfa, a najniža u rotkvici i iznosi 14766,39 mg/100 g s.t. Osim toga, može se primijetiti kako se u svim liofiliziranim uzorcima vrijednost znatno povećava u odnosu na svježije uzorke. U sušenim uzorcima i dalje je prisutan isti trend vrijednosti po uzorcima tako da je najviša vrijednost udjela FLA u cikli i iznosi 15251,83 mg/100 g s.t., a najniža u rotkvici i iznosi 8728,38 mg/100 g s.t. U odnosu na liofilizirane uzorke, u konvencionalno sušenim uzorcima se sadržaj ukupnih FLA smanjio, a u svim uzorcima, osim rotkvice, je taj sadržaj niži i od svježih uzoraka.

U radu Gagić (2021) dobivena vrijednost sadržaja ukupnih FLA u uzorku rotkvice iznosi približno 60000 mg/100 g s.t. što je znatno više od vrijednosti u ovom istraživanju. Razlog tomu mogu biti različite vrijednosti valnih duljina korištenih u spektrofotometriji čime može doći do interferencije i drugih spojeva koji nisu dio skupine flavonoida (Chang i sur., 2002). Pajak i sur. (2014) su metodom HPLC identificirali kvercetin, kempferol, apigenin i luteolin u mungo grahu te kvercetin i kempferol u rotkvici. Unatoč razlikama, važno je istaknuti da klice općenito sadrže više flavonoida od sjemenki i, budući da predstavljaju većinu fenolnih spojeva u ljudskoj prehrani, važno je razumijeti kako klijanje utječe na njihov sadržaj i prisutnost u hrani (Francis i sur., 2022).

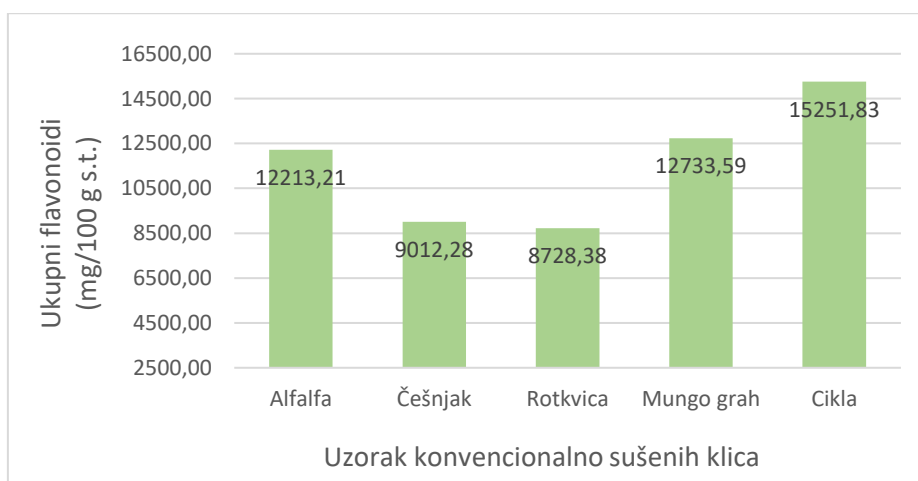
Na sastav flavonoida u klicama utječu uvjeti i metode sušenja koje bi trebalo pomno odabrati ukoliko se njihova koncentracija želi očuvati ili povećati. Visoka temperatura pokazala se u nekim istraživanjima degradirajućom za fenolne spojeve, posebno flavonoide koji su osjetljivi na toplinu (Castro i sur., 2024). Liofilizacija, kao postupak sušenja smrzavanjem, pokazala se u brojnim istraživanjima, uključujući i ovo, učinkovitom za očuvanje ovih spojeva, stoga ona predstavlja obećavajuću opciju za proizvodnju funkcionalne hrane na bazi klica kojom će se njihov unos putem hrane povećati (Castro i sur., 2024; Coşkun i sur., 2024).



**A**



**B**



**C**

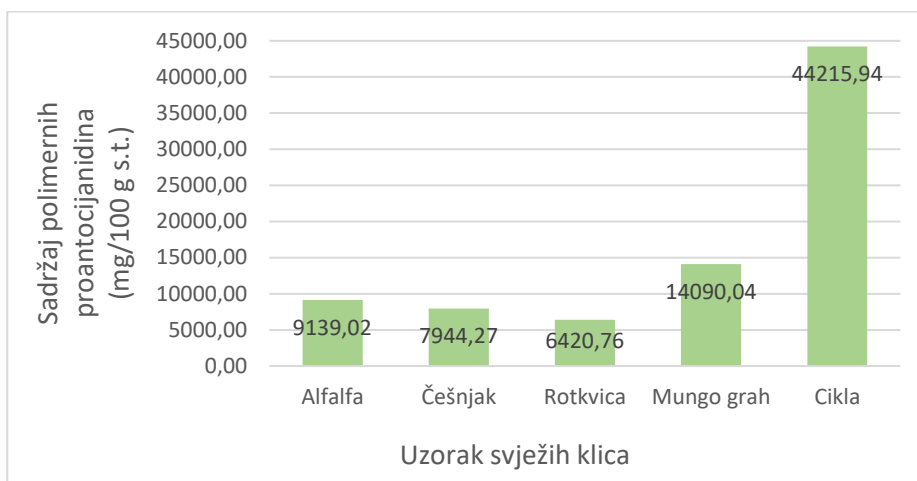
**Slika 7.** Grafički prikaz rezultata ukupnih flavonoida (mg/100 g s.t. uzorka) u uzorcima svježih (A), liofiliziranih (B) i konvencionalno sušenih klica (C)

#### 4.5. REZULTATI ANALIZE SADRŽAJA POLIMERNIH PROANTOCIJANIDINA

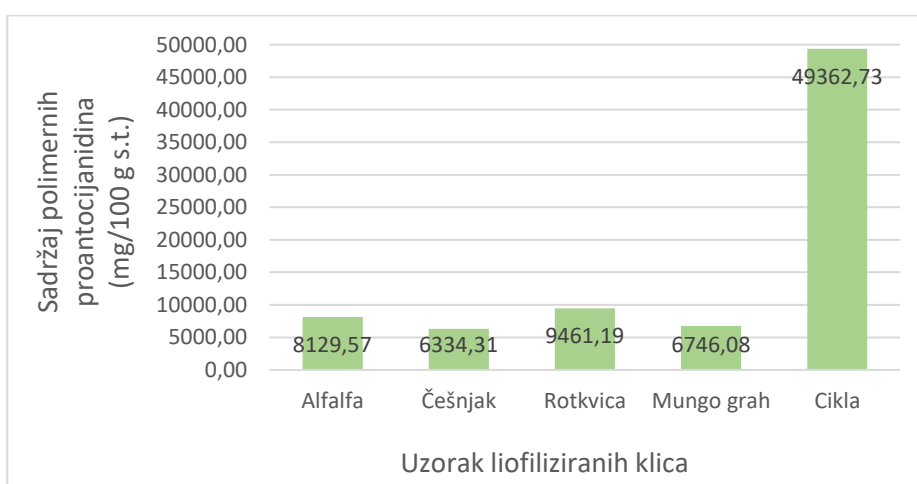
Rezultati određivanja udjela polimernih proantocijanidina u uzorcima klica prikazani su grafički na slici 8. Rezultati pokazuju da je u uzorcima svježih klica, sadržaj polimernih proantocijanidina najviši u uzorku cikle i iznosi 44215,94 mg/100 g s.t. što je znatno više od ostalih uzoraka čije su vrijednosti u rasponu od 6420,76 mg/100 g s.t. u rotkvici do 14090,04 mg/100 g s.t. u mungo grahu. U liofiliziranim uzorcima, uzorak cikle ponovno znatno premašuje ostale s vrijednosti od 49362,73 mg/100 g s.t. U ostalim uzorcima, najviša vrijednost je u rotkvici (9461,19 mg/s.t.), a najniža u češnjaku (6334,31 mg/100 g s.t.). Liofilizacijom se u klicama cikle i rotkvice, u odnosu na njihove svježe uzorke, povećao udio polimernih proantocijanidina, dok se u klicama alfalfa, češnjaka i mungo graha on snizio. Konvencionalnim sušenjem je u svim uzorcima došlo do znatnog sniženja sadržaja polimernih proantocijanidina u odnosu na liofilizirane uzorke pri čemu je najviša vrijednost ostala u cikli i iznosi 25961,02 mg/100 g s.t.

Iako ne postoje znanstvene publikacije koje su mjerile koncentraciju polimernih proantocijanidina u klicama korištenim u ovom istraživanju, određene studije su pratile utjecaj klijanja na njihov sastav. Primjerice Aktaş i sur. (2022) primijetili su da se koncentracija polimernih proantocijanidina, odnosno kondenziranih tanina, u klicama leće smanjuje s vremenom klijanja jer se tanini oslobađaju iz kompleksa s polifenolima, otapaju u vodi, a polifenoli zatim vežu s drugim organskim spojevima. S obzirom na to, može se zaključiti da je za postizanje što veće koncentracije polimernih proantocijanidina u klicama, važno prilagoditi uvjete klijanja za svaku vrstu klica što naglašava važnost ovakvih istraživanja. Molska i sur. (2022) su mjerili koncentraciju kondenziranih tanina u klicama heljde i utvrdili veće vrijednosti u odnosu na sjemenke. Također, u istraživanju su analizirane klice obogaćene probiotičkim kvascem što je rezultiralo povećanjem koncentracije ovih spojeva. Ovo istraživanje može pružiti novu perspektivu u razvoju funkcionalne hrane na bazi klica s dodatnim poboljšanjem bioaktivnog sastava.

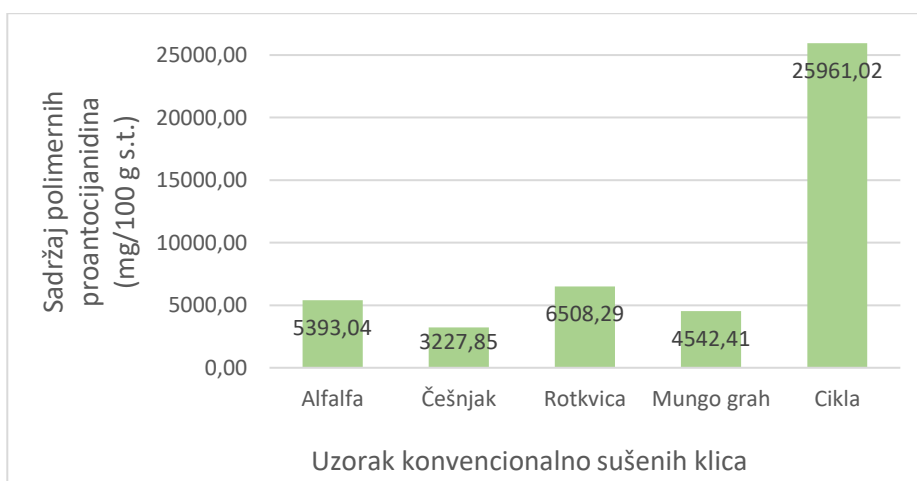
Zasada nije poznato ni kako tehnike sušenja točno utječu na sastav polimernih proantocijanidina u klicama, s obzirom na to da su ovi spojevi najmanje istraživani među polifenolnim spojevima. Budući da su poznati učinci tehnika sušenja na polifenole općenito, moguće je primijeniti sličnu teoriju i na polimerne proantocijanidine. Njihov sastav ovisi o biljnom materijalu i uvjetima klijanja, a jednako tako i o parametrima i načinima sušenja, stoga su potrebna dodatna istraživanja kako bi se ustanovili specifični učinci toplinske obrade na ove spojeve (Coşkun i sur., 2024).



**A**



**B**



**C**

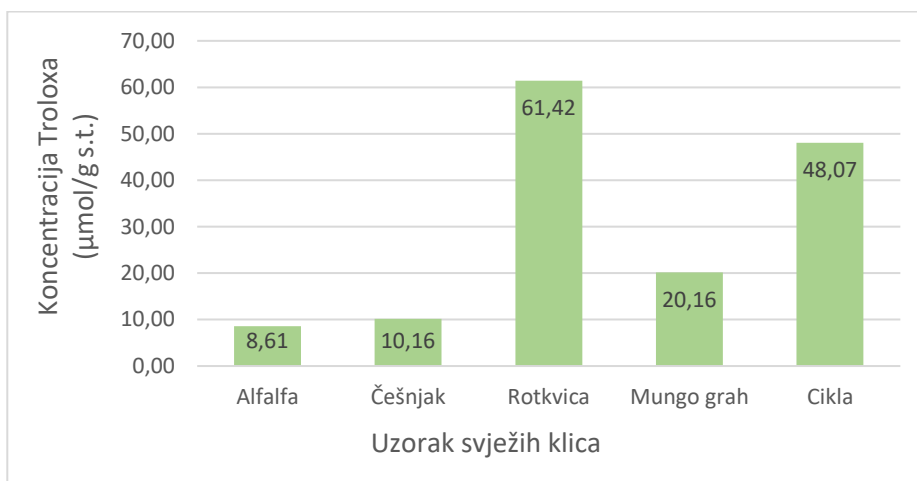
**Slika 8.** Grafički prikaz rezultata sadržaja polimernih proantocijanidina (mg/100 g s.t. uzorka) u uzorcima svježih (A), liofiliziranih (B) i konvencionalno sušenih klica (C)

#### **4.6. REZULTATI ANALIZE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI PRIMJENOM FRAP METODE**

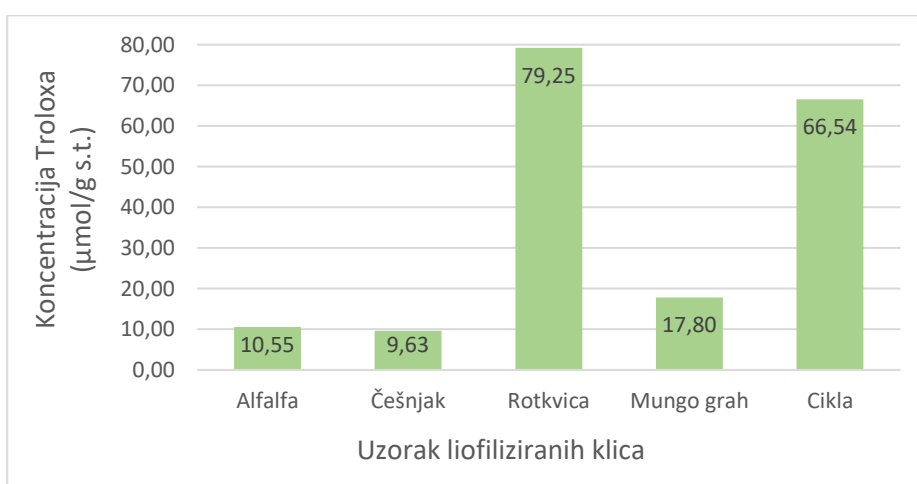
Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti u uzorcima klica pomoću FRAP metode prikazani su grafički na slici 9. Prema rezultatima, u svježim uzorcima, najviša antioksidacijska aktivnost zabilježena je u klicama rotkvice (61,42  $\mu\text{mol/g s.t.}$ ) i cikle (48,07  $\mu\text{mol/g s.t.}$ ), dok je najniža zabilježena u klicama alfalfa (8,61  $\mu\text{mol/g s.t.}$ ) i češnjaka (10,16  $\mu\text{mol/g s.t.}$ ). U liofiliziranim uzorcima, najvišu antioksidacijsku aktivnost pokazuju ponovno rotkvica (79,25  $\mu\text{mol/g s.t.}$ ) i cikla (66,54  $\mu\text{mol/g s.t.}$ ), a najnižu češnjak (9,63  $\mu\text{mol/g s.t.}$ ) i alfalfa (10,55  $\mu\text{mol/g s.t.}$ ). U konvencionalno sušenim uzorcima, cikla i rotkvica pokazuju najvišu antioksidacijsku aktivnost od 69,70 i 58,36  $\mu\text{mol/g s.t.}$ , a najnižu češnjak i alfalfa s vrijednostima od 8,12 i 8,84  $\mu\text{mol/g s.t.}$  Zaključno, najvišu antioksidacijsku aktivnost imaju klice rotkvice i cikle, a tretman liofilizacijom ili konvencionalnim sušenjem samo je u tim uzorcima pokazao djelovanje na antioksidacijsku aktivnost.

Muzykiewicz-Szymańska i sur. (2020) analizirali su antioksidacijsku aktivnost pomoću FRAP metode u klicama alfalfa, rotkvice, mungo graha i cikle pri čemu je analiza provedena pomoću ekstrakcije potpomognute ultrazvukom tako da dobivene vrijednosti nisu usporedive s vrijednostima u ovom istraživanju, no ono što se može usporediti je da su, od ova četiri uzorka, alfalfa i mungo grah pokazali najniže vrijednosti, a rotkvica i cikla najviše, što je u skladu s ovim istraživanjem. Klice koje pokazuju nižu antioksidacijsku aktivnost imaju manju koncentraciju spojeva s antioksidacijskom aktivnošću, odnosno polifenolnih, ali i drugih spojeva, primjerice pigmenta (npr. klorofila, karotena) i vitamina (Wojdyło i sur., 2020).

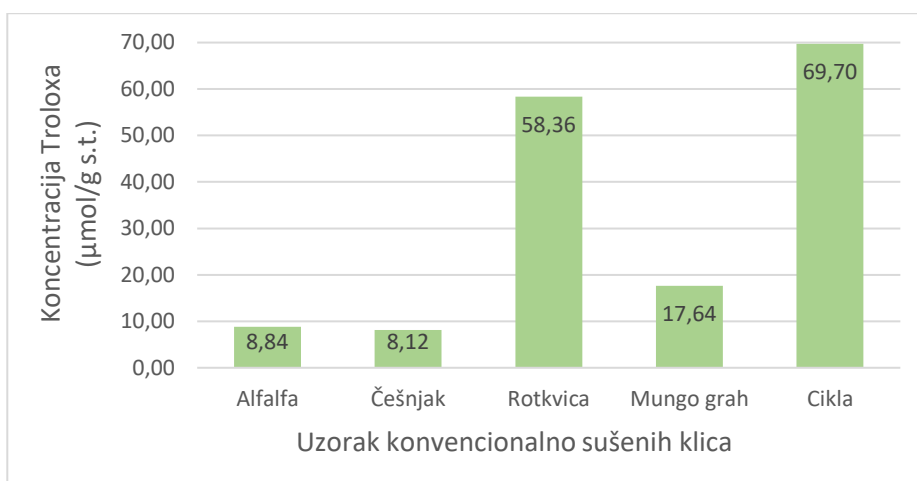
U liofiliziranim uzorcima rotkvice, cikle i mungo graha, Wojdyło i sur. (2020) dobili su znatno više vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u rotkvici i cikli, nego u mungo grahu što se poklapa s trendom u ovom istraživanju. Znanstvene publikacije o utjecaju tehnika sušenja na antioksidacijsku aktivnost u klicama pokazuju proturječne rezultate. Neki autori tvrde da se inaktivacijom enzima (npr. oksidaza) i razgradnjom struktura hrane pod povišenom temperaturom može povećati količina antioksidanasa, dok drugi bilježe njihov gubitak zbog oksidativnih procesa uslijed sušenja na toplini. Vjerojatno se javljaju oba učinka, ovisno o prisutnosti pojedinog spoja i njegovoj osjetljivosti na određenu temperaturu. Liofilizacija se, zahvaljujući niskim temperaturama, često pokazuje učinkovitijom u očuvanju antioksidanasa jer minimizira kemijske promjene (Mattioli i sur., 2019).



**A**



**B**



**C**

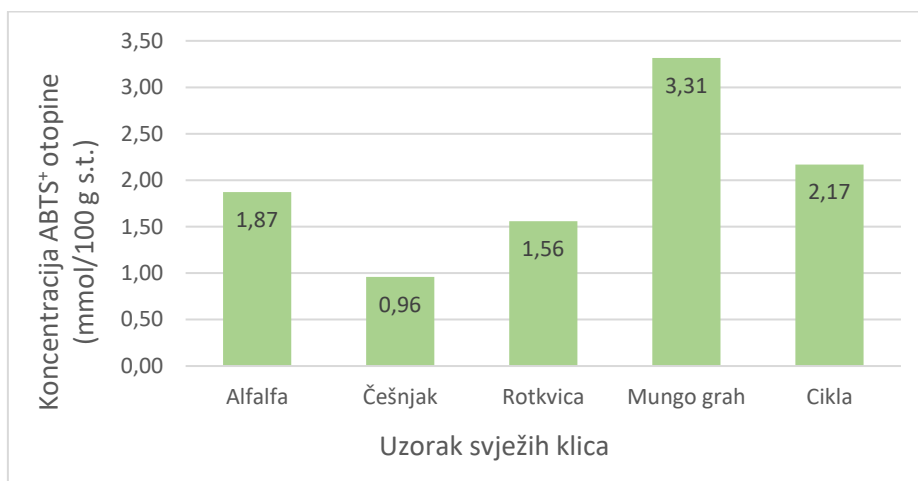
**Slika 9.** Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti izražene kao koncentracija Troloxa (µmol/g s.t. uzorka) u uzorcima svježih (A), liofiliziranih (B) i konvencionalno sušenih klica (C)

#### **4.7. REZULTATI ANALIZE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI PRIMJENOM ABTS METODE**

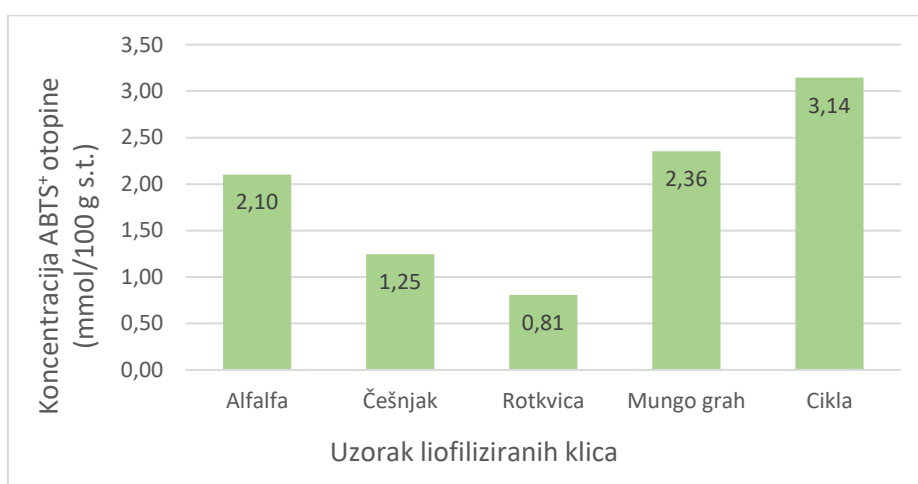
Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti u uzorcima klica pomoću ABTS metode prikazani su grafički na slici 10. Rezultati u uzorcima svježih klica pokazuju da najvišu antioksidacijsku aktivnost imaju klice mungo graha jer je u tom uzorku ABTS vrijednost najviša i iznosi 3,31 mmol/100 g s.t., a najnižu antioksidacijsku aktivnost imaju klice češnjaka s ABTS vrijednosti od 0,96 mmol/100 g s.t. U liofiliziranim uzorcima, najviša antioksidacijska aktivnost određena je u klicama cikle (3,14 mmol/100 g s.t.), a najniža u klicama rotkvice (0,81 mmol/100 g s.t.). Osim toga, klice cikle, češnjaka i alfalfa pokazuju više vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uslijed postupka liofilizacije, dok klice rotkvice i mungo graha pokazuju sniženje. U sušenim uzorcima, najviša antioksidacijska aktivnost je određena u uzorku klica cikle (3,47 mmol/100 g s.t.), a najniža u uzorku klica češnjaka (1,09 mmol/100 g s.t.). Konvencionalno sušenje se u klicama cikle i rotkvice pokazalo boljom metodom obrade, no u ostalim uzorcima to je bila liofilizacija. Klice mungo graha su uzorak s najvišom antioksidacijskom aktivnosti u svježem obliku, međutim, nakon oba tretmana sušenja, to su klice cikle.

Mnoge studije mjerile su ABTS vrijednost u ovim klicama, no u većini vrijednosti nisu izražene na isti način tako da ove vrijednosti nije moguće usporediti s prethodnim podacima. Ono što se može usporediti je da su vrijednosti u svježim klicama rotkvice obično veće nego u alfalfa, za razliku od ovog istraživanja (Liu i sur., 2022; Park i sur., 2019).

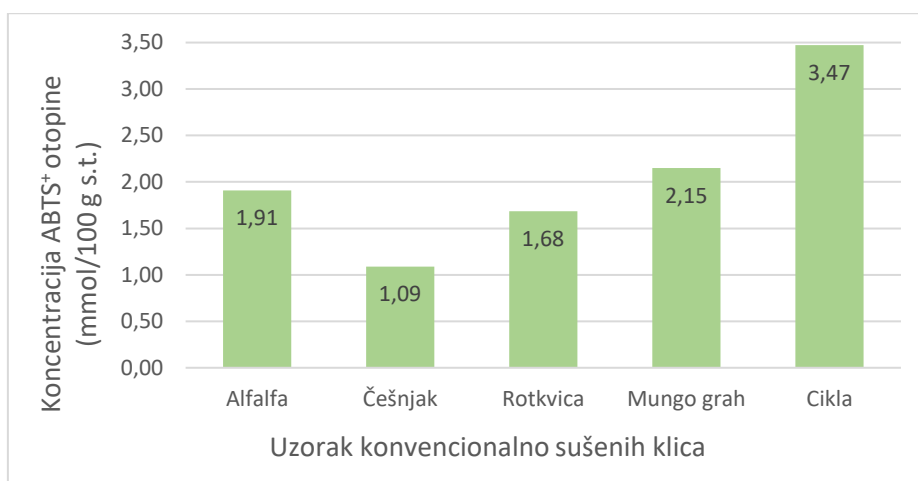
Muzykiewicz-Szymańska i sur. (2020) usporedili su ABTS vrijednosti u svježim u odnosu na konvencionalno sušene klice u klicama alfalfa, rotkvice, mungo graha i cikle. U nekim klicama (rotkvica i cikla), došlo je do sniženja antioksidacijske aktivnosti, dok je u drugima (alfalfa i mungo grah) došlo do povišenja, što se malo razlikuje od trenda u ovom istraživanju, vjerojatno zbog razlika u metodi ekstrakcije i uvjeta sušenja. Mnoga istraživanja navode liofilizaciju kao efektivniju metodu očuvanja antioksidacijskog kapaciteta zbog boljeg očuvanja fenolnih i drugih spojeva s antioksidacijskim svojstvima koji se degradiraju pri visokim temperaturama. Prema tome, uvjeti obrade moraju se prilagoditi ovisno o sastavu antioksidanasa u pojedinoj vrsti klica (Muzykiewicz-Szymańska i sur., 2020).



**A**



**B**



**C**

**Slika 10.** Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti izražene kao koncentracija ABTS<sup>+</sup> otopine (mmol/100 g s.t. uzorka) u uzorcima svježih (A), liofiliziranih (B) i konvencionalno sušenih klica (C)



## 5. ZAKLJUČCI

1. Analiza suhe tvari u različitim vrstama klica pokazala je da njezin udio ovisi o vrsti klica, a njeno povećanje tijekom klijanja rezultat je razgradnje makronutrijenata. Sušenje povećava sadržaj suhe tvari u klicama kao rezultat isparavanja vode, dok različite metode sušenja utječu na količinu suhe tvari, a samim time i na nutritivnu vrijednost klica.
2. Klice su općenito bogate polifenolima, no njihov sastav ovisi o pojedinoj vrsti klica, kao i o uvjetima klijanja. Rezultati analize TPC pokazali su u ponekim klicama povišenje vrijednosti obradom svježih klica, pri čemu je na njega najpovoljnije djelovala liofilizacija u klicama rotkvice i češnjaka, a konvencionalno sušenje u klicama cikle.
3. Analiza ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola pokazala je da su klice rotkvice najbogatiji izvor ovih spojeva. Liofilizacija se, u odnosu na konvencionalno sušenje, pokazala boljom metodom za očuvanje ovih spojeva u svim vrstama klica, osim cikle za koju se nijedna metoda nije pokazala učinkovitom.
4. Iz rezultata analize sadržaja ukupnih flavonoida i polimernih proantocijanidina može se zaključiti da su klice cikle najbogatiji izvor ovih spojeva te da se liofilizacija pokazala kao bolja metoda obrade, za razliku od konvencionalnog sušenja gdje je previsoka temperatura dovela do njihove degradacije i znatnog smanjenja koncentracije.
5. Analizom antioksidacijskog kapaciteta pomoću FRAP metode, najvišu antioksidacijsku aktivnost pokazale su klice rotkvice i cikle, dok su pomoću ABTS metode to pokazale klice mungo graha, u svježem stanju. Metodama sušenja se antioksidacijska aktivnost u klicama uglavnom povećava, osobito u cikli, a kao bolja metoda pokazala se liofilizacija.
6. Zbog visokog sadržaja bioaktivnih spojeva, posebice polifenola, klice su pokazale da imaju antioksidacijsku aktivnost što ih čini izvrsnim izborom u formulaciji funkcionalne hrane. Pri tome je važno izabrati odgovarajuću vrstu klica kao i metodu obrade kako bi se njihov bioaktivni i antioksidacijski potencijal maksimalno očuvao i povećao. Budući da uslijed liofilizacije dolazi do degradacije ovih spojeva u manjoj mjeri, ona se pokazala učinkovitijom metodom obrade klica.

## 6. LITERATURA

Abellán Á, Domínguez-Perles R, Moreno DA, García-Viguera C (2019) Sorting out the value of cruciferous sprouts as sources of bioactive compounds for nutrition and health. *Nutrients*. **11**, 1–22. <https://doi.org/10.3390/nu11020429>

Acharya J, Gautam S, Neupane P, Niroula A (2021) Pigments, ascorbic acid, and total polyphenols content and antioxidant capacities of beet (*Beta vulgaris*) microgreens during growth. *Int. J. Food Prop.* **24**, 1175–1186. <https://doi.org/10.1080/10942912.2021.1955924>

Adwas AA, Elkhoely AA, Kabel AM, Abdel-Rahman MN, Eissa AA (2016) Anti-cancer and cardioprotective effects of indol-3-carbinol in doxorubicin-treated mice. *J. Infect. Chemother.* **22**, 36–43. <http://doi.org/10.1016/j.jiac.2015.10.001>

Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Sci.* **196**, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014>

Agu RC, Chiba Y, Goodfellow V, MacKinlay J, Brosnan JM i sur. (2012) Effect of germination temperatures on proteolysis of the gluten-free grains rice and buckwheat during malting and mashing. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 10147–10154. <https://doi.org/10.1021/jf3028039>

Aktaş Ş, Kose ÖDE, Kardeş YM, Mut Z (2022) The effect of different germination times on some nutritional and anti-nutritional properties of green lentil sprouts. *Soil Studies*. **11**, 7–11. <https://doi.org/10.21657/topraksu.1003635>

Aloo SO, Ofosu FK, Kilonzi SM, Shabbir U, Oh DH (2021) Edible plant sprouts: Health benefits, trends, and opportunities for novel exploration. *Nutrients*. **13**, 2882. <https://doi.org/10.3390/nu13082882>

Anonymous 1 < <https://www.agroklub.com/sortna-lista/povrce/vrtni-borovnjak-kres-salata-205/> > Pristupljeno 15. kolovoza 2024.

Anonymous 2 <<https://www.kmetijaklepec.hr/products/brasno-od-prokljijale-psenice>> Pristupljeno 15. kolovoza 2024.

Aoki N, Scofield GN, Wang XD, Offler CE, Patrick JW, Furbank RT (2006) Pathway of sugar transport in germinating wheat seeds. *Plant Physiol.* **141**, 1255–1263. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082719>

Aziz A, Noreen S, Khalid W, Mubarik F, Khan Niazi M, Koraqi H i sur. (2022) Extraction of Bioactive Compounds from Different Vegetable Sprouts and Their Potential Role in the Formulation of Functional Foods against Various Disorders: A Literature-Based Review. *Molecules* **27**, 7320. <https://doi.org/10.3390/molecules27217320>

Baenas N, García-Viguera C, Moreno AD (2014) Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods. *Molecules*. **19**, 13541. <https://doi.org/10.3390/molecules190913541>

Basli A, Soulet S, Chaheer N, Mérillon J-M, Chibane M, Monti J-P, Richard T (2012) Wine polyphenols: Potential agents in neuroprotection. *Oxid. Med. Cell Longev.* 1–14. <https://doi.org/10.1155/2012/805762>

Bazaria B, Neeraj (2023) General overview of composition, use in human nutrition, process of sprouting, change in composition during sprouting, parameters affecting nutritional quality during sprouting, benefits of sprouts, nutritional values and food safety issues of Allium sprouts. U: Majid I, Kehinde BA, Dar B, Nanda V (ured.) *Advances in Plant Sprouts: Phytochemistry and Biofunctionalities*, Springer Nature, Švicarska, str. 403-415

Benincasa P, Falcinelli B, Lutts S, Stagnari F, Galieni A (2019) Sprouted grains: A comprehensive review. *Nutrients*. **11**, 421. <https://doi.org/10.3390/nu11020421>

Benzie IFF (1996) An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clin. Biochem.* **29**, 111-116. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(95\)02013-6](https://doi.org/10.1016/0009-9120(95)02013-6)

Bewley JD (1997) Seed germination and dormancy. *Plant Cell*. **9**, 1055–1066. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1055>

Boukid F, Prandi B, Buhler S, Sforza S (2017) Effectiveness of germination on protein hydrolysis as a way to reduce adverse reactions to wheat. *J. Agr. Food Chem.* **65**, 9854-9860. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03175>

Buchner N, Krumbein A, Rohn S, Kroh LW (2006) Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 3229-3235. <https://doi.org/10.1002/rcm.2720>

Bursać Kovačević D, Putnik P, Dragović-Uzelac V, Pedisić S, Režek Jambrak A, Herceg Z (2016) Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice. *Food Chem.* **190**, 317-323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.099>

Butler N (2021) What are the benefits of wheatgrass? – Medical News Today [https://www.medicalnewstoday.com/articles/320210#\\_noHeaderPrefixedContent](https://www.medicalnewstoday.com/articles/320210#_noHeaderPrefixedContent) Pristupljeno 16. kolovoza 2024.

Cáceres PJ, Martínez-Villaluenga C, Amigo L, Frias J (2014) Assessment on proximate composition, dietary fiber, phytic acid and protein hydrolysis of germinated Ecuadorian brown rice. *Plant Food. Hum. Nutr.* **69**, 261–267. <https://doi.org/10.1007/s11130-014-0433-x>

Castro AG, Ortiz F, Guzmán A, Hernández GH, Román-Gutiérrez AD (2024) Analysis of bioactive compounds in lyophilized aqueous extracts of barley sprouts. *J. Food Meas. Charact.* 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11694-024-02569-9>

Chang CC, Yang MH, Wen, HM, Chern JC (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food. Drug. Anal.* **10**, 178-182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>

Coşkun N, Sarıtaş S, Jaouhari Y, Bordiga M, Karav S (2024) The Impact of Freeze Drying on Bioactivity and Physical Properties of Food Products. *Appl. Sci.* **14**, 9183. <https://doi.org/10.3390/app14209183>

Das A, Sharangi AB (2022) Postharvest Care of Medicinal and Aromatic Plants: A Reservoir of Many Health Benefiting Constituents. U: Sharangi AB, Peter KV (ured.) Medicinal Plants, Apple Academic Press, New York, SAD, str. 387–407.

Djekić I, Velebit B, Pavlić B, Putnik P, Šojić Merkulov D, Bebek Markovinović A, Bursać Kovačević D (2023) Food Quality 4.0: Sustainable Food Manufacturing for the Twenty-First Century. *Food Eng. Rev.* **15**, 577–608. <https://doi.org/10.1007/s12393-023-09354-2>

Donkor ON, Stojanovska L, Ginn P, Ashton J, Vasiljevic T (2012) Germinated grains: Sources of bioactive compounds. *Food Chem.* **135**, 950–959. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.058>

Dziki D, Habza-Kowalska E, Gawlik-Dziki U, Miś A, Różyło R, Krzysiak Z, Hassoon WH (2020) Drying kinetics, grinding characteristics, and physicochemical properties of broccoli sprouts. *Processes.* **8**, 97. <https://doi.org/10.3390/pr8010097>

ESSA (2016) ESSA Hygiene Guideline for the Production of Sprouts and Seeds for Sprouting. Brussels, Belgija. [https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-12/biosafety\\_fh\\_guidance\\_essa\\_sprouts-and-seeds\\_en.pdf](https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-12/biosafety_fh_guidance_essa_sprouts-and-seeds_en.pdf) Pristupljeno 14. kolovoza 2024.

Faltermaier A, Zarnkow M, Becker T, Gastl M, Arendt EK (2015) Common wheat (*Triticum aestivum* L.): Evaluating microstructural changes during the malting process by using confocal laser scanning microscopy and scanning electron microscopy. *Eur. Food Res. Technol.* **241**, 239–252. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2450-x>

Francis H, Debs E, Koubaa M, Alrayess Z, Maroun RG, Louka N (2022) Sprouts use as functional foods. Optimization of germination of wheat (*Triticum aestivum* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), and radish (*Raphanus sativus* L.) seeds based on their nutritional content evolution. *Foods*. **11**, 1460. <https://doi.org/10.3390/foods11101460>

Gagić S (2021) Bioraspoloživost fenolnih spojeva i bioaktivnost klica kupusnjača u modelu ljudske probave *in vitro* (diplomski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Galieni A, Falcinelli B, Stagnari F, Datti A, Benincasa P (2020) Sprouts and Microgreens: Trends, Opportunities, and Horizons for Novel Research. *Nutrients*. **10**, 1424. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091424>

Gan RY, Lui WY, Chan CL, Corke H (2017b) Hot Air Drying Induces Browning and Enhances Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Mung Bean (*Vigna radiata* L.) Sprouts. *J. Food Process. Preserv.* **41**, 2–9. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12846>

Gan RY, Lui WY, Wang MF, Corke H, Sui ZQ (2016) Accumulation of solvent-soluble and solvent-insoluble antioxidant phenolics in edible bean sprouts: Implication of germination. *J. Funct. Foods*, **6**, 519–535. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v6i8.273>

Gan R-Y, Lui WY, Wu K, Chan CL, Dai SH, Sui ZQ, Corke H (2017a) Bioactive Compounds and Bioactivities of Germinated Edible Seeds and Sprouts: An Updated Review, *Trends Food Sci. Technol.* **59**, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.010>

Gawlik-Dziki U, Jezyna M, Swieca M, Dziki D, Baraniak B, Czyz J (2012) Effect of bioaccessibility of phenolic compounds on *in vitro* anticancer activity of broccoli sprouts. *Food Res. Int.* **49**, 469–476. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.010>

Gill CIR, Haldar S, Porter S, Matthews S, Sullivan S, Coulter J i sur. (2004) The Effect of Cruciferous and Leguminous Sprouts on Genotoxicity, *In Vitro* and *In Vivo*. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **13**, 1199–1205. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.1199.13.7>

Gill SK, Rossi M, Bajka B, Whelan K (2021) Dietary fibre in gastrointestinal health and disease.

*Nat. Rev. Gastro. Hepat.* **18**, 101–116. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00375-4>

Godswill AG, Somtochukwu IV, Ikechukwu AO, Kate EC (2020) Health Benefits of Micronutrients (Vitamins and Minerals) and their Associated Deficiency Diseases: A Systematic Review. *Int. J. Food Sci.* **3**, 1–32. <http://doi.org/10.47604/ijf.1024>

Graham IA (2008) Seed Storage Oil Mobilization. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 115–142. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092938>

Granato D, Barba FJ, Bursać Kovačević D, Lorenzo JM, Cruz AG, Putnik P (2020) Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annu. Rev. Food Sci T.* **11**, 1-26. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>

Grassi S, Cardone G, Bigagnoli D, Marti A (2018) Monitoring the sprouting process of wheat by non-conventional approaches. *J. Cereal Sci.* **83**, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.08.007>

Ha TJ, Lee MH, Seo WD, Baek IY, Kang JE, Lee JH (2017) Changes occurring in nutritional components (phytochemicals and free amino acid) of raw and sprouted seeds of white and black sesame (*Sesamum indicum* L.) and screening of their antioxidant activities. *Food Sci. Biotechnol.* **26**, 71–78. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0010-9>

Howard LR, Clark JR, Brownmiller C (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J. Sci. Food Agric.* **83**, 1238-1247. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1532>

Hübner F, Arendt EK (2013) Germination of cereal grains as a way to improve the nutritional value: A review. *Food Sci. Nutr.* **53**, 853–861. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.562060>

Hübner F, O'Neil T, Cashman KD, Arendt EK (2010) The influence of germination conditions on beta-glucan, dietary fibre and phytate during the germination of oats and barley. *Eur. Food Res. Technol.* **231**, 27–35. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1247-1>

Hung VP, Maeda T, Yamamoto S, Morita N (2012) Effects of germination on nutritional composition of waxy wheat. *J Sci Food Agric.* **92**, 667–672. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4628>

Ikram A, Saeed F, Afzaal M, Imran A, Niaz B, Tufail T i sur. (2021) Nutritional and end-use perspectives of sprouted grains: A comprehensive review. *Food Sci. Nutr.* **9**, 4617-4628. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2408>

Janicki B, Kupcewicz B, Napierała A, Mądzielewska A (2005) Effect of temperature and light (UV, IR) on flavonol content in radish and alfalfa sprouts. *Folia biol.* **53**, 121-125. <https://doi.org/10.3409/173491605775789272>

Jin F, Wu Q, Lu YF, Gong QH, Shi JS (2008) Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **600**, 78–82. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.10.005>

Katina K, Liukkonen K-H, Kaukovirta-Norja A, Adlercreutz H, Heinonen SM, Lampi AM i sur. (2007) Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. *J. Cereal Sci.* **46**, 348–355. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.07.006>

Koehler P, Hartmann G, Wieser H, Rychlik M (2007) Changes of folates, dietary fiber, and proteins in wheat as affected by germination. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 4678–4683. <https://doi.org/10.1021/jf0633037>

Kubicka E, Grabska J, Jedrychowski L, Czyz B (2000) Changes of specific activity of lipase and lipoxygenase during germination of wheat and barley. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **51**, 301.

Kumar V, Sinha AK, Makkar HPS, Becker K (2010) Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chem.* **120**, 945–959. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.052>

Kyriacou MC, Roupael Y, Di Gioia F, Kyriatzis A, Serio F, Renna M i sur. (2016) Micro-scale vegetable production and the rise of microgreens. *Trends Food Sci. Technol.* **57**, 103–115. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.005>

Lee YR, Kim JY, Woo KS, Hwang IG, Kim KH, Kim KJ i sur. (2007) Changes in the chemical and functional components of Korean rough rice before and after germination. *Food Sci. Biotechnol.* **16**, 1006–1010.

Lemmens E, De Brier N, Spiers Goos P, Smolders E, Delcour J (2018) The impact of wheat germination and hydrothermal processing on phytate hydrolysis and the distribution, speciation and bio-accessibility of Fe and Zn. U: Proceedings of the International Symposium Zinc, Leuven, Belgija, str. 5–7

Lemmens E, Moroni AV, Pagand J, Heirbaut P, Ritala A, Karlen Y i sur. (2019) Impact of cereal seed sprouting on its nutritional and technological properties: A critical review. *Food Sci. Food Saf.* **18**, 305–328. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12414>



Leonova S, Grimberg Å, Marttila S, Stymne S, Carlsson AS (2010) Mobilization of lipid reserves during germination of oat (*Avena sativa* L.), a cereal rich in endosperm oil. *J. Exp. Bot.* **61**, 3089–3099. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq141>

Liang J, Han BZ, Han L, Nout MJR, Hamer RJ (2007) Iron, zinc, and phytic acid content of selected rice varieties from China. *J. Sci. Food Agric.* **87**, 504–510. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2747>

Liu HK, Kang YF, Zhao XY, Liu YP, Zhang XW, Zhang SJ (2019) Effects of elicitation on bioactive compounds and biological activities of sprouts. *J. Funct. Foods* **53**, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.019>

Liu HY, Liu Y, Li MY, Ge YY, Geng F, He XQ, i sur. (2022) Antioxidant capacity, phytochemical profiles, and phenolic metabolomics of selected edible seeds and their sprouts. *Front. Nutr.* **9**, 1067597. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1067597>

Logan DC, Millar AH, Sweetlove LJ, Hill SA, Leaver CJ (2001) Mitochondrial biogenesis during germination in maize embryos. *Plant Physiol.* **125**, 662–672. <https://doi.org/10.1104/pp.125.2.662>

Lorenz K, D'Appolonia B (1980) Cereal sprouts: Composition, nutritive value, food applications. *Food Sci. Nutr.* **13**, 353–385. <https://doi.org/10.1080/10408398009527295>

Luana N, Rossana C, Curiel JA, Kaisa P, Marco G, Rizzello CG (2014) Manufacture and characterization of a yogurt-like beverage made with oat flakes fermented by selected lactic acid bacteria. *Int. J. Food. Microbiol.* **185**, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.05.004>

Maghoub SEO, Elhag SA (1998) Effect of milling, soaking, malting, heat-treatment and fermentation on phytate level of four Sudanese sorghum cultivars. *Food Chem.* **61**, 77–80. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00109-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00109-X)

Managa MG, Sultanbawa Y, Sivakumar D (2020) Effects of different drying methods on untargeted phenolic metabolites, and antioxidant activity in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. subsp. *chinensis*) and Nightshade (*Solanum retroflexum* Dun.). *Molecules.* **25**, 1326. <https://doi.org/10.3390/molecules25061326>

Maqbool Z, Khalid W, Mahum Khan A, Azmat M, Sehrish A i sur. (2023) Cereal sprout-based food products: Industrial application, novel extraction, consumer acceptance, antioxidant



potential, sensory evaluation, and health perspective. *Food Sci. Nutr.* **12**, 707-721. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3830>

Marengo M, Carpen A, Bonomi F, Casiraghi MC, Meroni E, Quaglia L i sur. (2017) Macromolecular and micronutrient profiles of sprouted chickpeas to be used for integrating cereal-based food. *Cereal Chem.* **94**, 82–88. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-04-16-0108-FI>

Marti A, Cardone G, Nicolodi A, Quaglia L, Pagani MA (2017) Sprouted wheat as an alternative to conventional flour improvers in bread-making. *LWT.* **80**, 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.028>

Marti A, Cardone G, Pagani MA, Casiraghi MC (2018) Flour from sprouted wheat as a new ingredient in bread-making. *LWT.* **89**, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.052>

Márton M, Mándoki Z, Csapo-Kiss ZS, Csapó J (2010) The role of sprouts in human nutrition: A review. *Acta Univ. Sapientiae.* **3**, 81-117.

Mastropasqua L, Dipierro N, Paciolla C (2020) Effects of darkness and light spectra on nutrients and pigments in radish, soybean, mung bean and pumpkin sprouts. *Antioxidants.* **9**, 558. <https://doi.org/10.3390/antiox9060558>

Mattioli S, Dal Bosco A, Castellini C, Falcinelli B, Sileoni V, Marconi O i sur. (2019) Effect of heat-and freeze-drying treatments on phytochemical content and fatty acid profile of alfalfa and flax sprouts. *J. Sci. Food Agr.* **99**, 4029-4035. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9630>

Merendino N, Molinari R, Costantini L, Mazzucato A, Pucci A, Bonafaccia F i sur. (2014) A new “functional” pasta containing tartary buckwheat sprouts as an ingredient improves the oxidative status and normalizes some blood pressure parameters in spontaneously hypertensive rats. *Food Funct.* **5**, 1017–1026. <https://doi.org/10.1039/C3FO60683J>

Mir SA, Shah MA, Mir MM (2017) Microgreens: Production, shelf life, and bioactive components. *Food Sci. Nutr.* **57**, 2730–2736. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1144557>

Miyahira RF, Lopes JdO, Antunes AEC (2021) The Use of Sprouts to Improve the Nutritional Value of Food Products: A Brief Review. *Plant Foods Hum. Nutr.* **76**, 143–152. <https://doi.org/10.1007/s11130-021-00888-6>

Mohammadi M, Nouri L, Mortazavian AM (2021) Development of a functional synbiotic beverage fortified with different cereal sprouts and prebiotics. *J. Food Sci. Tech.* **58**, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04887-4>

Molska M, Reguła J, Zielińska-Dawidziak M, Tomczak A, Świeca M (2022) Starch and protein analysis in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) sprouts enriched with probiotic yeast. *LWT*. **168**, 113903. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113903>

Moongngarm A, Saetung N (2010) Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice. *Food Chem.* **122**, 782–788. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.053>

Moreno DA, Perez-Balibrea S, Garcia-Viguera C (2006) Phytochemical quality and bioactivity of edible sprouts. *Nat. Prod. Commun.* **11**, 1037–1048. <https://doi.org/10.1177/1934578X0600101120>

Muzykiewicz-Szymańska A, Zielonka-Brzezicka J, Klimowicz A (2020) Antioxidant activity of various plant sprouts extracts depending on the processing method of plant material—an *in vitro* study. *Herba Pol.* **66**, 11-18. <https://doi.org/10.2478/hepo-2020-0006>

Nagarajan N, Morden A, Bischof D, King EA, Kosztowski M, Wick EC, Stein EM (2015) The role of fiber supplementation in the treatment of irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Gastroen. Hepat.* **27**, 1002–1010. <http://doi.org/10.1097/MEG.0000000000000425>

Nelson K, Stojanovska L, Vasiljevic T, Mathai M (2013) Germinated grains: A superior whole grain functional food? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **91**, 429–441. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2012-0351>

Nemzer B, Lin Y, Huang D (2019) Antioxidants in sprouts of grains. U: Feng H, Nemzer B, W. DeVries J (ured.) Sprouted grains. AACC International Press, str. 55–68

Noori N, Hamed H, Kargozari M, Shotorbani PM (2017) Investigation of potential prebiotic activity of rye sprout extract. *Food Biosci.* **19**, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.07.001>

Ohtsubo K, Suzuki K, Yasui Y, Kasumi T (2005) Bio-functional components in the processed pre-germinated brown rice by a twins crew extruder. *J. Food Compos. Anal.* **18**, 303–316. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.10.003>

Ozturk I, Sagdic O, Hayta M, Yetim H (2012) Alteration in  $\alpha$ -tocopherol, some minerals, and fatty acid contents of wheat through sprouting. *Chem. Nat. Comp.* **47**, 876–879. <https://doi.org/10.1007/s10600-012-0092-9>

Păcularu-Burada B, Cîrîc AI, Begea M (2024) Anti-Aging Effects of Flavonoids from Plant Extracts. *Foods*. **13**, 2441. <https://doi.org/10.3390/foods13152441>

Pajak P, Socha R, Gałkowska D, Rożnowski J, Fortuna T (2014) Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. *Food Chem*. **143**, 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.064>

Panche AN, Diwan AD, Chandra SR (2016) Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* **5**, 1-15. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>

Pant DC, Dave M, Tiwari AK (2013) Wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) Supplementation Promotes Longevity in *Drosophila melanogaster*. *Ann. Plant Sci.* **2**, 49–54.

Park H, Shin Y, Kim YJ (2019) Antioxidant contents and activities of twelve varieties of vegetable sprouts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **51**, 207-213. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2019.51.3.207>

Pathak A, Singh SP (2022) Study on the health benefit and utilization of sprouted grains for development of value-added food products: A review. *Ann. Phytomed*, **11**, 155-165.

Paucar-Menacho LM, Martínez-Villaluenga C, Dueñas M, Frias J, Peñas E (2018) Response surface optimisation of germination conditions to improve the accumulation of bioactive compounds and the antioxidant activity in quinoa. *Int J Food Sci Tech*. **53**, 516–524. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13623>

Plaza L, de Ancos B, Cano PM (2003) Nutritional and health-related compounds in sprouts and seeds of soybean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa*) treated by a new drying method. *Eur. Food Res. Technol.* **216**, 138–144. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0640-9>

Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka te obavljanja kemijskih i fizikalnih analiza radi kontrole kvalitete proizvoda od voća i povrća (1983) Službeni list SFRJ br. 29, (preuzeto u NN 53/91), Zagreb.

Profeta A, Siddiqui SA, Smetana S, Hossaini SM, Heinz V, Kircher C (2021) The impact of Corona pandemic on consumer's food consumption: Vulnerability of households with children and income losses and change in sustainable consumption behavior. *J. Consum. Prot. Food Saf.* **16**, 305-314. <https://doi.org/10.1007/s00003-021-01341-1>

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity

applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Roche A, Ross E, Walsh N, O'Donnell K, Williams A, Klapp M i sur. (2017) Representative literature on the phytonutrients category: Phenolic acids. *Food Sci. Nutr.* **57**, 1089–1096. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.865589>

Rusydi M, Noraliza CW, Azrina A, Zulkhairi A (2011) Nutritional changes in germinated legumes and rice varieties. *Int. Food Res. J.* **18**, 705–713.

Sahai V, Kumar V (2020) Anti-diabetic, hepatoprotective and antioxidant potential of *Brassica oleracea* sprouts. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **25**, 101623. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101623>

Salehi F (2024) Microwave pretreatment of sprouted mung beans before hot-air and infrared drying process. *IFT.* **11**, 182-196. <https://doi.org/10.22104/ift.2024.6635.2164>

Schendel RR (2019) Phenol content in sprouted grains. U: Feng H, Nemzer B, DeVries JW (ured.) Sprouted grains: Nutritional Value, Production, and Applications, AACC International Press, Cambridge, UK, str. 247-315. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811525-1.00010-5>

Schwan RF, Ramos CL (2019) Functional beverages from cereals. U: Grumezescu A, Holban AM (ured.) Functional and medicinal beverages, Academic Press. str. 351–379.

Scofield GN, Aoki N, Hirose T, Takano M, Jenkins CL, Furbank RT (2007) The role of the sucrose transporter, OsSUT1, in germination and early seedling growth and development of rice plants. *J. Exp. Bot.* **58**, 483–495. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl217>

Shingare SP, Thorat BN (2013) Fluidized bed drying of sprouted wheat (*Triticum aestivum*). *Int. J. Food Eng.* **10**, 29–37. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2012-0097>

So V, Poul P, Oeung S, Srey P, Mao K, Ung H i sur. (2023) Bioactive compounds, antioxidant activities, and HPLC analysis of nine edible sprouts in Cambodia. *Molecules.* **28**, 2874. <https://doi.org/10.3390/molecules28062874>

Sokrab AM, Ahmed IAM, Babiker EE (2012) Effect of germination on antinutritional factors, total, and extractable minerals of high and low phytate corn (*Zea mays* L.) genotypes. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* **11**, 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2012.02.002>

Stajčić S, Četković G, Tumbas Šaponjac V, Travičić V, Ilić P, Brunet S, Tomić A (2024)

Bioactive Compounds and the Antioxidant Activity of Selected Vegetable Microgreens: A Correlation Study. *Processes*. **12**, 1743. <https://doi.org/10.3390/pr12081743>

Sun BS, Ricardo-da-Silva JM, Spranger I (1998) Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4267-4274. <https://doi.org/10.1021/jf980366j>

Taylor JR, Novellie L, Liebenberg NV (1985) Protein body degradation in the starchy endosperm of germinating sorghum. *J. Exp. Bot.* **36**, 1287–1295. <https://doi.org/10.1093/jxb/36.8.1287>

Teixeira C, Nyman M, Andersson R, Alminger M (2016) Effects of variety and steeping conditions on some barley components associated with colonic health. *J. Sci. Food Agric.* **96**, 4821–4827. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7923>

Tian B, Xie B, Shi J, Wua J, Cai Y, Xu T, Xue S, Deng Q (2010) Physicochemical changes of oat seeds during germination. *Food Chem.* **119**, 1195–1200. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.035>

Üstündaş M, Yener HB, Helvacı ŞŞ (2018) Parameters Affecting Lycopene Extraction from Tomato Powder and Its Antioxidant Activity. *AUJST-A*. **1-19**, 454-467. <https://doi.org/10.18038/aubtda.363140>

Wojdyło A, Nowicka P, Tkacz K, Turkiewicz IP (2020) Sprouts vs. microgreens as novel functional foods: Variation of nutritional and phytochemical profiles and their in vitro bioactive properties. *Molecules*. **25**, 4648. <https://doi.org/10.3390/molecules25204648>

Xu Y, Szép S, Lu Z (2009) The antioxidant role of thiocyanate in the pathogenesis of cystic fibrosis and other inflammation-related diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 20515–20519. <https://doi.org/10.1073/pnas.091141210>

Yanaka A, Fahey JW, Fukumoto A, Nakayama M, Inoue S, Zhang S i sur. (2009) Dietary Sulforaphane-Rich Broccoli Sprouts Reduce Colonization and Attenuate Gastritis in *Helicobacter pylori*-Infected Mice and Humans. *Cancer Prev. Res.* **2**, 353–360. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-08-0192>

Youssef MKES, El-Fishawy FAEK, Ramadan ESAEN, Abd El-Rahman AM (2013) Nutritional assessment of barley, talbina and their germinated products. *Sci. J. Crop. Sci.* **2**, 8–19.

Yuan B, Danao M-GC, Stratton JE, Weier SA, Weller CL, Lu M (2018) High pressure processing (HPP) of aronia berry purée: Effects on physicochemical properties, microbial counts, bioactive

compounds, and antioxidant capacities. *Innov. Food Sci. Emerg.* **47**, 249-255.  
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.03.009>

Yudiono K, Kurniawati L (2018) Effect of sprouting on anthocyanin, antioxidant activity, color intensity and color attributes in purple sweet potatoes. *Food Res.* **2**, 171–176.  
[https://doi.org/10.26656/fr.2017.2\(2\).252](https://doi.org/10.26656/fr.2017.2(2).252)

Zagorska J, Rakcejeva T, Liepa M (2010) Quality characteristics of yoghurt enriched with wheat grain flakes. U: 1st UK International Functional Food Conference, Oxford, UK, str. 25-26.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Monika Štruml izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis