

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Ines Kurečić

Stabilnost glukozinolata tijekom procesiranja

završni rad

Osijek, 2014.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Završni rad

STABILNOST GLUKOZINOLATA TIJEKOM PROCESIRANJA

Nastavni predmet

Kemija hrane

Predmetni nastavnik: izv. prof. dr. sc. Mirela Kopjar

Student/ica: Ines Kurečić (MB: 3474/11)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mirela Kopjar

Predano (datum):

Pregledano (datum):

Ocjena:

Potpis mentora:

STABILNOST GLUKOZINOLATA TIJEKOM PROCESIRANJA

Glukozinolati su sekundarni biljni metaboliti β -tioglukozidne strukture koji hrani biljnog podrijetla daju aromu, miris i okus. Smatraju se fitokemikalijama što znači da mogu predstavljati prevenciju ljudskom organizmu od različitih bolesti, a naročito kod pojave karcinoma. Glavni izvor glukozinolata u ljudskoj prehrani su biljke iz porodice *Brassicaceae* u koju pripadaju kupus, brokula, cvjetača, repa, kelj, hren. Glukozinolati su fiziološki neaktivni i kemijski stabilni i tek njihovom razgradnjom djelovanjem enzima mirozinaze dolazi do oslobađanja raznovrsnih hlapljivih spojeva (izotiocijanata, tiocijanata, nitrila). U radu će biti opisana struktura, biodostupnost glukozinolata kao i njihov sadržaj u biljkama, njihovo oslobađanje enzimskom ili neenzimskom razgradnjom, stabilnost tijekom procesiranja te pozitivno djelovanje na ljudsko zdravlje. Osim što njihov unos ima pozitivan učinak na ljudski organizam, glukozinolati i njihovi razgradni spojevi mogu imati i antinutritivno djelovanje.

Ključne riječi: glukozinolati, mirozinaza, razgradni produkti, stabilnost tijekom procesiranja

STABILITY OF GLUCOSINOLATES DURING PROCESSING

Glucosinolates are plant secondary metabolites of β -thioglucoside structure that are responsible for flavor, aroma and taste of foods of plant origin. They are considered phytochemicals which means that they can protect the human body from various diseases, especially with the onset of cancer. The main sources of glucosinolates in the human diet are plants from the family *Brassicaceae*, like cabbage, broccoli, cauliflower, beets, savoy cabbage, horseradish. Glucosinolates are physiologically inert and chemically stable. Activation of the enzyme myrosinase leads to the formation of various volatile compounds (isothiocyanates, thiocyanate, nitrile). This paper deals with structure, bioavailability of glucosinolates and their content in plants, their release by enzymatic or non-enzymatic degradation, stability during processing and positive effect on human health. Next to positive effect on the human body, glucosinolates and their degradation compounds may have antinutritive activity.

Key words: glucosinolates, myrosinase, degradation products, stability during processing

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. GLAVNI DIO.....	2
2.1. Struktura glukozinolata	2
2.2. Sadržaj glukozinolata u biljkama	4
2.3. Hidroliza glukozinolata	6
2.4. Biološka aktivnost glukozinolata	8
2.4.1. Antikancerogeno djelovanje.....	8
2.4.2. Antioksidacijsko djelovanje	9
2.4.3. Toksičnost i antinutritivan učinak glukozinolata	10
2.5. Biodostupnost glukozinolata	11
2.6. Glukozinolati i aroma	13
2.7. Utjecaj procesiranja na sadržaj glukozinolata	14
2.8. Modeliranje utjecaja procesiranja na glukozinolate	22
3. ZAKLJUČAK.....	23
4. LITERATURA.....	24

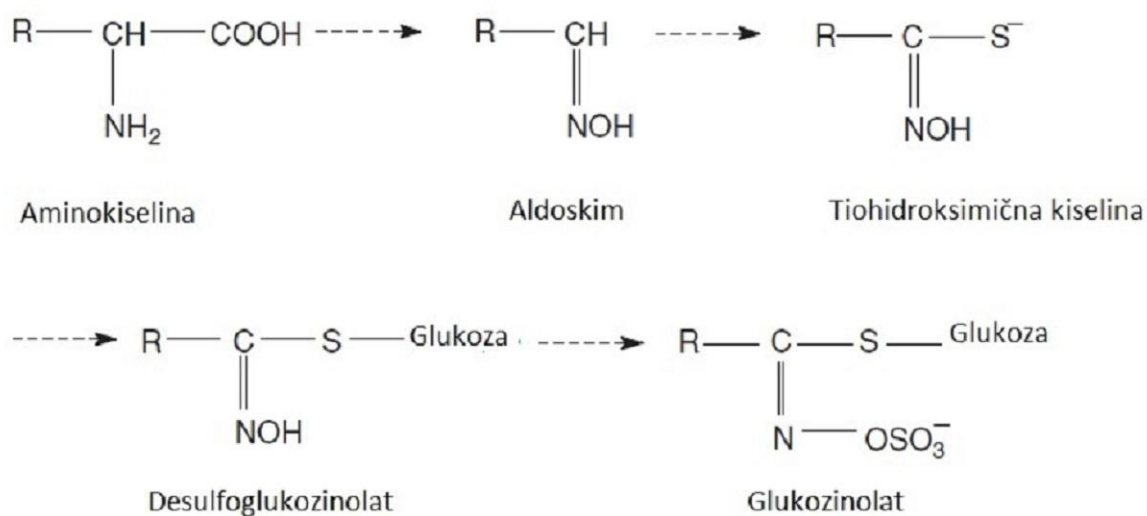
1. UVOD

Posljednjih dvadesetak godina intenzivno se istražuje povoljan biološki utjecaj fitokemikalija na zdravlje ljudi. Fitokemikalije su biološki aktivni sekundarni metaboliti koji hrani biljnog podrijetla daju boju, aromu, miris i okus, prirodnu toksičnost na štetnike i izrazito povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje. Glukozinolati se smatraju fitokemikalijama jer su sekundarni metaboliti biljaka. Pronađeni su u 16 botaničkih porodica reda *Capparales*, a najveće količine su pronađene u porodici *Brassicaceae* u koju ubrajamo kupus, brokulu, cvjetaču, prokulicu, repu, rotkvice (Verkerk i Dekker, 2008.). Raznolikost ovih spojeva pokazana je činjenicom da su vrlo toksični za neke insekte stoga se mogu smatrati prirodnim pesticidima, no usprkos tome neki ih insekti poput lisne uši mogu koristiti za polaganje svojih jajašca (Verkerk i Dekker, 2008.). Trenutno je poznato 120 različitih glukozinolata od kojih je samo ograničeni broj istraživanih. Danas su dostupne velike količine podataka o razinama glukozinolata koja varira i uvelike može ovisiti o sorti, uvjetima uzgoja, klimi, organskoj praksi. Sami glukozinolati su kemijski stabilni i biološki neaktivni. Međutim, oštećenjem tkiva djelovanjem štetnika, preradom hrane ili žvakanjem dolazi do kontakta s enzimom mirozinazom što u konačnici dovodi do hidrolize odnosno glukozinolati se pretvaraju u razne razgradne produkte kao što su izotiocijanati, nitrili, tiocijanati (Verkerk, 2009.).

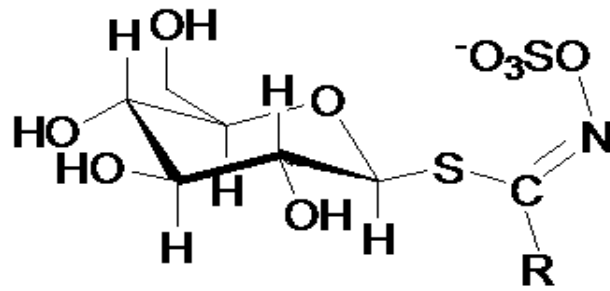
2. GLAVNI DIO

2.1. Struktura glukozinolata

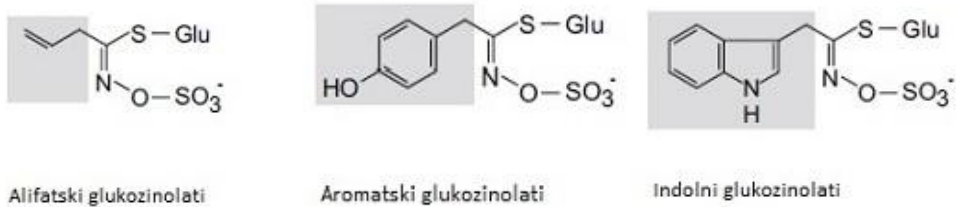
Glukozinolati su grupa organskih aniona koji se iz biljaka izoliraju kao kalijeve i natrijeve soli (Zekić, 2008.). Po kemijskoj strukturi glukozinolati su β -tioglukozid-*N*-hidroksisulfati kod kojih je glukoza i sulfatna skupina vezana na aglikon koji se sintetizira iz aminokiselina i njihovih analoga (Fahey, 2001.). Bočni lanac kod glukozinolata je promjenjiv, određen je aminokiselinom, a po njemu se glukozinolati međusobno razlikuju. **Slika 1.** prikazuje sintezu glukozinolata. Opća struktura glukozinolata je prikazana na **Slici 2.** Obzirom na bočni lanac, glukozinolati se mogu podijeliti na alifatske, aromatske i heterocikličke (indolne) glukozinolate (**Slika 3**). Osim podjele s obzirom na aminokiselinu koja je vezana na bočni lanac, glukozinolati se mogu razlikovati i prema supstituentima na glukonskom dijelu npr. cimetni, benzoilni (Zekić, 2013.).



Slika 1 Pojednostavljena shema sinteze glukozinolata (Verkerk i Dekker, 2008.)



Slika 2 Opća struktura glukozinolata (Zekić, 2008.)



Slika 3 Podjela glukozinolata ovisno o bočnom lancu (Travers-Martin i sur., 2008.)

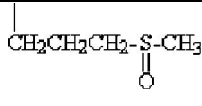
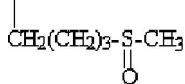
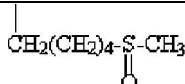

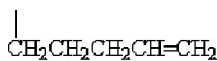
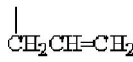
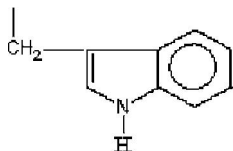
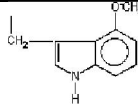
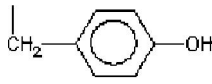
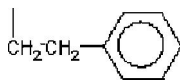
2.2. Sadržaj glukozinolata u biljkama

Glukozinolati se nalaze isključivo u kultiviranim/križonosnim biljkama, dominantni su u oko 16 botaničkih obitelji reda *Capparales* (Verkerk i Dekker, 2008.). Razina odnosno koncentracija i vrsta ukupnih glukozinolata ovisi o različitim uvjetima kao što su način uzgoja, klimatski uvjeti, agronomska praksa, prisutnost štetnika, starost biljke ali i o sorti. Obično jedna biljka sadrži do četiri (najčešće dva do pet) različita glukozinolata, dok se čak 15 različitih glukozinolata mogu naći u istoj biljci. U najvećoj koncentraciji nalaze se u sjemenu (Verkerk i Dekker, 2008.). Spomenuto je da sve vrste glukozinolata ne možemo pronaći u svakom vrstu povrća. U **Tablici 1** prikazana je količina prisutnih glukozinolata u najčešće konzumiranom povrću iz porodice *Brassicaceae*.

Tablica 1 Količina glukozinolata u povrću iz porodice *Brassicaceae* (McNaughton i Marks, 2003.)

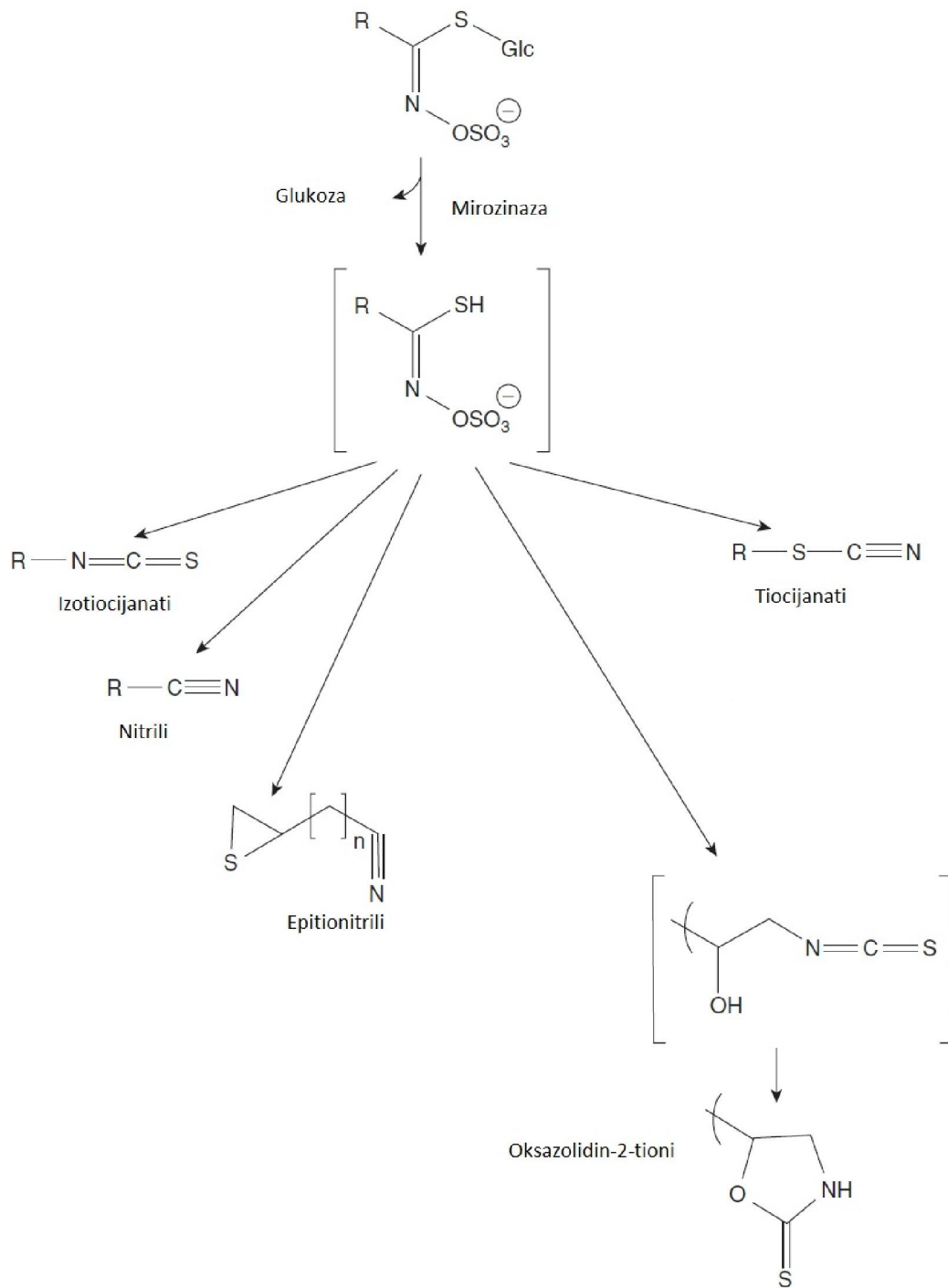
Povrće iz porodice <i>Brassicaceae</i>	Količina glukozinolata (mg/100g)
Kupus	42,7 - 108,9
Kupus, crveni	26,5 - 76,5
Kupus, kineski	17,3 - 54,8
Brokula	19,3 - 127,5
Kelj	59,5 - 209,9
Kelj, pupčar	80,1 - 445,5
Hren	106,1
Repa	20,4 - 140,5
Cvjetača	11,7 - 78,6
Gorušica	118,1 - 544,5

Tablica 2 Najuobičajeniji glukozinolati i njihove strukture (Moreno i sur., 2006.)

Trivijalno ime	Sustavna nomenklatura bočnog lanca	Struktura
Alifatski glukozinolati		
Glukoiberin	3-metilsulfinilpropil	
Glukorafanin	4-metilsulfinilbutil	
Glukoalizin	5-metilsulfinilbutil	
Glukonapin	3-butenil	
Glukobrasikanapin	4-pentenil	
Sinigrin	2-propenil	
Indolni glukozinolati		
4-Hidroksiglukobrasicin	4-hidroksiindol-3-ilmetil	
Glukobrasicin	indol-3-ilmetil	
4-Metoksiglukobrasicin	4-metoksiindol-3-ilmetil	
Aromatski glukozinolati		
Glukosinalbin	4-hidroksibenzil	
Glukonasturtin	2-feniletil	

2.3. Hidroliza glukozinolata

Mirozinaza je trivijalan naziv za enzim β -tioglukozidglukohidrolaza (EC 3.2.1.147) ili skupinu enzima koju su odgovorni za hidrolizu glukozinolata. Sve biljke koje sadrže glukozinolate sadrže i enzim mirozinazu ali se enzim nalazi u tvorevinama odvojenim od glukozinolata. Mirozinaza je široko rasprostranjena, a nalazi se u stanicama sjemena, listovima i korijenu. Oštećenjem biljke, bilo mehaničkim putem (npr. sjeckanjem, žvakanjem) ili uzrokovano nametnicima, enzim i supstrat dolaze u dodir i tada slijedi hidroliza (Verkerk i Dekker, 2008.). Svako procesiranje djelovanjem mirozinaze ili zbog nekih drugih kemijskih reakcija vodi ka hidrolizi glukozinolata. Prilikom kuhanja povrća, enzim mirozinaza se inaktivira ali svejedno dolazi do termičke razgradnje gdje se izgubi 30 - 60% glukozinolata (Verhoeven i sur., 1997.). U reakciji hidrolize dolazi do cijepanje tioglukozidne veze odnosno do pucanja veze između sumpora i glukoze u molekuli glukozinolaza te stoga dolazi do oslobodjenja glukoze, sulfata i aglikona. Aglikon je nestabilan produkt hidrolize glukozinolata koji eliminira sulfat Lossen pregradnjom. Pregradnjom aglikona nastaju različiti razgradni produkti (Zekić, 2008.). Nastali razgradni produkti koji značajno doprinose tipičnom okusu i mirisu povrća prikazani su na **Slici 4** (Verkerk i Dekker, 2008.). Smatra se da dobiveni razgradni produkti kao i sami glukozinolati pokazuju antioksidacijsko pa čak i antikancerogeno djelovanje, također mogu djelovati obrambeno prema napadu brojnih štetnika na samu biljku. Najpoznatiji biološki aktivni spojevi koji nastaju enzimskom hidrolizom glukozinolata su izotiocijanati i indoli. Struktura dobivenih produkta ovisi o različitim čimbenicima kao što su struktura bočnog lanca glukozinolata, uvjetima hidrolize i prisutstvu kofaktora, te posebice o pH vrijednosti (Zekić, 2008.). Pri pH 5 - 7 obično nastaju reaktivni, mirisni i hlapljivi izotiocijanati, dok kod pH < 4 odnosno u kiselim uvjetima nastaju nitrili. Većina produkata hidrolize su stabilni osim glukozinolata koji sadrže β -hidroksilirani bočni lanac (Holst i Williamson, 2004.).



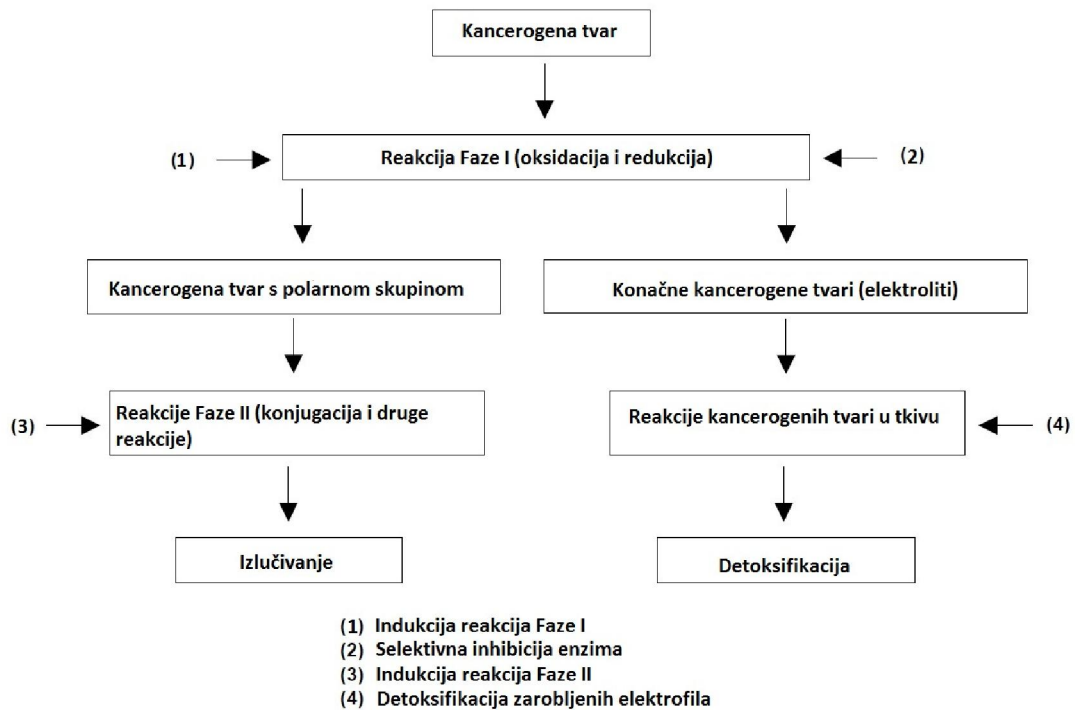
Slika 4 Opća shema hidrolize glukozinolata i strukture glavnih produkata (Verkerk i Dekker, 2008.)

2.4. Biološka aktivnost glukozinolata

Budući da postoji velik broj različitih glukozinolata postoje i različiti putovi hidrolize što znači da se širok raspon proizvoda hidrolize može naći u različitim izvorima hrane. Poznato je da potrošnja voća i povrća vodi i vodila je ka promicanju zdravlja. Zaštitni učinak kupusnjača protiv raka dijelom proizlazi iz visokog sadržaja glukozinolata koje ono sadrži. Prisutnost glukozinolata u kupusnjačama znatno ih razlikuje od drugih vrsta povrća jer oni imaju blagotvoran učinak na ljudsko zdravlje zbog svojih nutritivnih, antibakterijskih, antikancerogenih svojstava.

2.4.1. Antikancerogeno djelovanje

Tijekom proteklih 20 godina istaknuto je da konzumiranjem voća i povrća posebice povrća iz porodice *Brassicaceae* dolazi do smanjenja pojave karcinoma za otprilike 50% (Fahey, 2001.). Mehanizam preventivnog djelovanja razgradnih produkata glukozinolata još nije u potpunosti razjašnjen ali istraživanja pokazuju da razgradni produkti modificiraju aktivnost enzima Faze I i Faze II (**Slika 5**). Ovi enzimi inhibiraju rast stanica tumora i stimuliraju apoptozu, programiranu staničnu smrt, ali važnija činjenica je da pokazuju prvu obrambenu liniju ljudskog organizma od kancerogenih tvari (Zekić, 2013.). Enzimi Faze I povećavaju reaktivnost tvari topljivih u vodi tako da stvaraju toksičnije molekule od polaznih molekula, oni reakcijama oksidacije i redukcije mijenjaju prokancerogene molekule, a rezultat je nastanak vrlo reaktivnih intermedijera koji vrlo lako oštećuju DNK, RNK i proteine (Juge i sur., 2007.). Enzimi Faze II povećavaju topljivost u vodi i stimuliraju izlučivanje štetnih molekula iz tijela. Oni djeluju na način da reakcijama konjugacije konvertiraju kancerogene tvari s ligandima. Razgradni produkti glukozinolata povećavaju aktivnost enzima Faze II. Procesi kancerogeneze koji su regulirani enzimima Faze I i Faze II, uglavnom se odvijaju u jetri i mukozi crijeva.



Slika 5 Mehanizam metabolizma kancerogenih tvari (Das i sur., 2000.)

2.4.2. Antioksidacijsko djelovanje

Vitamin C, vitamin E, polifenoli i karotenoidi smatraju se izravnim antioksidansima jer oni neutraliziraju slobodne radikale prije nego što mogu naštetiti stanicima. Glukozinolati i njihovi razgradni produkti pripadaju u skupinu indirektnih antioksidansa jer oni modificiraju aktivnost kancerogenih tvari tako što utječu na aktivnost enzima metabolizma (Enzimi Faze I i II) i ne blokiraju slobodne radikale direktno (Holst i Williamson, 2004.). Izotiocijanati kao razgradni produkti mirozinaze smatraju snažnim elektrofilima zbog reaktivnosti centralnog ugljikovog atoma $N=C=S$ koji brzo reagira sa sumpornim, dušikovim i kisikovim nukleofilima (Zekić, 2013.).

2.4.3. Toksičnost i antinutritivan učinak glukozinolata

U početku, glukozinolati su istraživani zbog svojih potencijalno štetnih učinaka. Mnogo je pozornosti posvećeno uklanjanju glukozinolata iz hrane i hrane za životinje kontroliranim uzgojem i preradom biljnog materijala. Kada se govori o hrani za životinje poznato je da hrana koja sadrži velike količine uljane repice također i sadrži visoku razinu glukozinolata što u konačnici može rezultirati toksičnim učinkom na štitnjaču i jetru kao i na usporen rast životinja. Štetni učinci glukozinolata veći su kod nepreživača, dok su preživači općenito otporniji i tolerantniji na veće količine glukozinolata. Također je naglašena činjenica da su mlađe životinje više osjetljivije od starijih životinja i da su različite životinjske vrste u različitoj mjeri podložni osjetljivosti na glukozinolate. Tako posebice treba voditi računa o ishrani svinja jer kod njih može doći do povećanja štitnjače i manjeg preživljavanja u odnosu na zečeve, perad i ribu (Tripathi i Mishra, 2008.). U konačnici sami glukozinolati nisu odgovorni za štetni učinak na zdravlje ljudi, no njihovi razgradni produkti jesu. Toksični utjecaj se može pripisati izotiocijanatima koji mogu ometati dostupnost joda, zatim nitrilima koji imaju utjecaj na funkciju jetra i bubrega i 5-vinil-oksazoldin-2-tionu koji je odgovoran za morfološke i fiziološke promjene štitnjače. Kako bi se spriječio nastanak razgradnih produkata pokušava se inaktivirati enzim mirozinaza kroz predtretman uljane repice prije same ekstrakcije. No, takva kontrola nastanka produkata je djelomična jer se razgradnja glukozinolata odvija i pomoću bakterijske tioglukozidaze koja se nalazi u probavnom traktu. U načelu možemo zaključiti da glukozinolati imaju i potencijalno toksičan i antinutritivan utjecaj na zdravlje (Verkerk, 2009.).

2.5. Biodostupnost glukozinolata

Za razumijevanje zaštitnog i antioksidativnog djelovanja neophodno je poznavanje biodostupnosti, transporta i metabolizma glukozinolata nakon konzumiranja povrća iz porodice *Brassicaceae*. Sve tvari da bi imale određenu aktivnost moraju biti apsorbirane u ljudskom tijelu te doći do ciljanog tkiva u aktivom obliku što znači da moraju biti biodostupne u tijelu. Brojni vanjski i unutarnji parametri utječu na oslobođenje iz matriksa hrane, apsorpciju, distribuciju metabolizam i izlučivanje bioaktivnih tvari kao što su glukozinolati i njihovi razgradni spojevi izotiocijanati, indoli i nitrili (Verkerk i sur., 2009.). Prvi važan korak za svaki spoj da bi bio dostupan je otpuštanje odnosno oslobađanje aktivne komponente i otapanje u kompleksnom matriksu hrane i probavnim sokovima. Kao što je naglašeno produkti hidrolize imaju važniji biološki utjecaj od samih glukozinolata. Većina glukozinolata su kemijski i toplinski vrlo stabilni stoga je hidroliza uglavnom enzimskom djelovanjem mirozinaze (Verkerk i sur., 2009.). Važna svojstva koja utječu na prihvaćanje povrća iz porodice *Brassicaceae* od strane potrošača su slatkoća, intenzitet arome (ljutina, gorčina) ali svakako i sadržaj samih glukozinolata koji utječu na diktiranje senzorskih karakteristika povrća. Dokazi upućuju da kada je mirozinaza prisutna u hrani, glukozinolati se brzo hidroliziraju u tankom crijevu čovjeka. Ako se mirozinaza deaktivira, npr. kuhanjem povrća prije konzumacije može se očekivati da će ionizirani glukozinolati doći do debelog crijeva gdje ih bakterijski enzimi mogu metabolizirati. Glukozinolati se razgrađuju pomoću mirozinaze iz povrća u tankom crijevu ili djelovanjem bakterijske mirozinaze u debelom crijevu, a metaboliti nastali razgradnjom se mogu prepoznati u ljudskom urinu 2 - 3 sata nakon konzumacije povrća iz porodice *Brassicaceae*. Tumačenje epidemioloških podataka i iskorištavanje povrća iz porodice *Brassicaceae* za ljudsko zdravlje zahtjeva razumijevanje kemije i metabolizma glukozinolata kroz cijeli lanac hrane od proizvodnje i prerade do potrošača. Kada govorimo o brokuli njezin kemoprotektivni utjecaj može se djelomično pripisati izotiocijanatima (produkti hidrolize glukozinolata). Kupus sadrži glukozinolat sinigrin koji se djelovanjem mirozinaze razgrađuje do alil-izotiocijanata. Konzumiranjem sirovog kupusa nastaje znatno veća količina izotiocijanata nego što nastaje kada se kupus kuha, iako i u tom slučaju nastaju izotiocijanati jer mikroflora debelog crijeva katalizira

razgradnju glukozinolata (Jeffery i sur., 2003.; Finley i sur.,2001.; Johnson i sur., 2002.; Moreno, 2006.).

2.6. Glukozinolati i aroma

Glukozinolati su bez mirisa, međutim oni su prekursori spojeva koji tijekom razgradnje daju specifičan miris i okus zeljastom povrću. Najrašireniji među njima su izotiocijanati poznati i kao „senf ulja“ (Kucza, 1996). Chin i sur. (1996.) uočili su da u svježem kupusu, alil-izotiocijanati nastaju iz glukozinolatnog prekursora, sinigrina, koji ima karakterističan miris sličan senfu i hrenu. Alil-izotiocijanati imaju gorak, prodoran okus i uzrokuju suzenje očiju (Buttery, 1976.). Izotiocijanati i nitrili imaju nizak prag, Buttery i njegovi suradnici izmjerili su količinu izotiocijanata i nitrila u kuhanom povrću porodice Brassicaceae i ona se kreće u rasponu od 2 do 482 ppb. Otpornost križonosnih vrsta povezana je sa hlapljivim promjenjivim izotiocijanatima u koje pripadaju 2-propenil, 3-butenil i 4-metiltio-3-butenil (Fenwick, 1983.). Od 1948. godine pretpostavljalo se da se glukozinolati razgrađuju u izotiocijanate, ali njihovu izolaciju i strukturu odredili su Friss i Kjaer (1966.) koristeći plinsku kromatografiju i masenu spektroskopiju. Zbog nestabilnosti izotiocijanate je bilo teško ekstrahirati u dovoljnoj količini kako bi bili definirani na kromatogramu. Za razliku od izotiocijanata, tiocijanat ion pronađen je u kupusnjačama koje imaju miris sličan češnjaku, nedostatak otpornosti i koji izaziva suzenje očiju (MacLeod, 1976.). Na nastanak nitrila pozitivno utječu kiseli uvjeti i to je veoma važno za fermentirano povrće kao što je kiseli kupus (Fenwick, 1983.). Na okus križonosnog bilja ne utječu samo razgradni produkti glukozinolata već i ne-glukozinolatni derivati. Cis-3-heksenol i trans-2-heksenol su sastavni spojevi koju su pronađeni u lišću kupusa. Poznati su i kao „alkohol listova“ i „aldehid listova“ jer su uobičajeni hlapljivi dijelovi arome u zelenim listovima. Alkoholi i aldehidi su spojevi koji nastaju kao proizvod oksidacije lipida (MacLeod, 1976.). Wallbank i sur. (1976.) uočili su da neoštećena rotkvica sadrži manje količine heksenil-acetata, dok su u oštećenom tkivu biljke pronađene veće količine.

2.7. Utjecaj procesiranja na sadržaj glukozinolata

Prethodno je spomenuto da voće i povrće ima pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje no ono bi se trebalo konzumirati u svježem stanju ili biti djelomično procesirano kako bi sačuvalo svoja bogata nutritivna svojstva jer pripremom hrane odnosno kuhanjem mijenjaju se nutritivna svojstva proizvoda. Pošto je procesiranje neophodno ono narušava integritet stanica i dovodi do degradacije glukozinolata (Dekker i sur., 2000.; Mosha i sur., 1995.; Sever i sur., 1997.). U ovom poglavlju biti će navedeni primjeri utjecaja nekih vrsta procesiranja na sadržaj glukozinolata u povrću.

Prije konzumiranja, povrće iz porodice *Brassicaceae* izloženo je različitim kulinarskim ili industrijskim načinima obrade. Proteklih nekoliko godina dokazano je da svako sjeckanje, kuhanje, prženje ima značajan utjecaj na sadržaj glukozinolata u povrću. Biljka se obično fizički ošteti žvakanjem, sjeckanjem, miješanjem, cijedenjem, kuhanjem, zamrzavanjem/odmrzavanjem, zagrijavanjem što dovodi do poremećaja unutar stanica odnosno do kontakta mirozinaze i glukozinolata pri čemu nastaju razgradni produkti.

Rezanjem i usitnjavanjem svježih biljnih tkiva stvaraju se optimalni uvjeti za mirozinazu i može se očekivati visoki stupanj hidrolize glukozinolata. Istraživanja su pokazala da se sadržaj glukozinolata u rezanom povrću nakon 6 sati stajanja pri sobnoj temperaturi smanjio za 75% kod prokulice, brokule i cvjetače i 65% kod zelenog kupusa. Međutim ukoliko je povrće izrezano u veće komade gubitak glukozinolata smanji se za 10 % (Song i Thornalley, 2007.). Također je bitno istaknuti da nakon rezanja i skladištenja kupusa i brokule na sobnoj temperaturi dolazi do smanjenja sadržaja alifatskih glukozinolata (npr. glukorafanin), ali i do povećanja sadržaja indol glukozinolata (Verkerk i sur., 2001.).

Skladištenjem povrća na **niskim temperaturama** u procesima hlađenja i zamrzavanja može se promijeniti metabolizam glukozinolata. Značajan gubitak može se dogoditi uslijed zamrzavanja i odmrzavanja. Zamrzavanje brokula je uobičajeni način procesiranja u prehrambenoj industriji, a kako bi se inaktivirali enzimi koji smanjuju kvalitetu proizvoda zamrzavanju prethodi blanširanje. **Tablica 3** prikazuje utjecaj blanširanja i zamrzavanja

brokule na -20 °C na koncentraciju glukozinolata kroz skladištenje od 90 dana . Sadržaj glukozinolata u brokuli se najbolje održao zamrzavanjem kojem je prethodilo blanširanje, no ukoliko je zamrzavanje provedeno bez blanširanja ili nekog drugog termičkog tretiranja vrlo brzo je nakon odmrzavanja došlo do razgradnje glukozinolata djelovanjem mirozinaze (Rodrigues i Rosa, 1999.; Rosa i sur., 1997.; Johnson, 2000.).

Tablica 3 Utjecaj skladištenja, blanširanja i zamrzavanja brokule na -20 °C na koncentraciju ($\mu\text{mol/g DW}$) glukozinolata (Rungapamestry i sur., 2008.)

Glukozinolati	Skladištenje (dani)			
	3	15	30	90
Glukoiberin	0,73	0,74	0,78	0,81
Glukorafanin	4,00	4,10	4,20	4,47
4-Hidroksiglukobrasicin	0,75	0,80	0,92	0,78
Glukobrasicin	5,03	4,97	5,10	5,16
4-Metoksiglukobrasicin	1,17	1,17	1,21	1,21
Neoglukobrasicin	1,30	1,37	0,95	1,18
Ukupni glukozinolati	13,95	13,97	14,03	14,48

DW: suha tvar

Fermentacija i kiseljenje su vrlo važni procesi kod obrade kupusa, a najčešće fermentirani proizvod iz porodice *Brassicaceae* je kiseli kupus. Do nedavno učinak fermentacije kupusa u tijeku hidrolize glukozinolata kao i sadržaj oslobođenih produkata nije bio poznat. Prvi podaci koji se odnose na sadržaj razgradnih produkata glukozinolata kod fermentacije kupusa objavljeni su 1980. godine. Tek u novije vrijeme pojavio se bolji uvid o sudbini glukozinolata tijekom fermentacije kupusa (Verkerk, 2009.). Nije bilo poznato da li se proces razgradnje glukozinolata tijekom fermentacije odvijao mikrobiološki, kemijski, enzimski ili je možda proizlazio iz navedenih interakcija. Također nije ni bilo poznato hoće li se hidroliza glukozinolata odvijati u biljnom tkivu ili se glukozinolati otpuštaju iz biljnog tkiva sa sokom koji se izlučuje tijekom početne faze fermentacije (Verkerk, 2009.). Eksperimentalni podaci pokazuju kako glukozinolati mogu hidrolizirati već u početnoj odnosno prvoj fazi fermentacije (Ciska i Pathak, 2004.). U prvoj fazi koja traje dva do tri

dana dolazi do intenzivne respiracije biljnog tkiva što dovodi do naglog ispuštanja ugljikovog dioksida i zakiseljavanja medija. Nakon četiri do pet dana prirodne fermentacije dolazi do postepenog smanjenja pH vrijednosti na 3,4 - 3,7. Takvi uvjeti su pogodni za djelovanje mirozinaze koja može uzrokovati djelomičnu ili potpunu enzimsku razgradnju. Također se u početnoj fazi fermentacije ne može isključiti i sudjelovanje mikrobne flore nespecifične za procese fermentacije kod degradacije glukozinolata (Palop i sur., 1995.). Tijekom spontane fermentacije rast i razvoj odgovarajuće bakterijske flore odvija se na kraju početne faze kada se sok izlučuje iz biljnih tkiva. Intenzitet difuzije i plazmolize ovisi o dodatku soli i temperaturi. Dokazano je da ova dva fizikalno-kemijska parametra imaju utjecaj na brzinu hidrolize glukozinolata (Verkerk, 2009.). Spontana fermentacija završava nakon sedam do deset dana. Ako se koriste cjepiva starter bakterija fermentacija se može skratiti i do tri dana (Tolonen i sur., 2004.). Nakon toga se degradacija glukozinolata može nastaviti uz pomoć bakterija mliječne kiseline (Palop i sur., 1995.). Vrste spojeva koji se oslobađaju tijekom hidrolize glukozinolata ovise o nizu faktora kao što su pH okoliša, prisutnost Fe^{+3} iona, specifičnih proteina ili prisutnosti askorbinske kiseline (Fenwick, 1983.; Preobrazhenskaya, 1993.). U pogledu literaturnih podataka, čini se da fermentacija olakšava hidrolizu glukozinolata u smjeru otpuštanja izotiocijanata (Ciska i sur., 2004., Tolonen i sur., 2002.).

Vrlo je važno istaknuti čimbenike koji određuju količinu razgradnih produkata glukozinolata u fermentiranom kupusu. Ključno pitanje za potrošače nije samo količina razgradnih produkata glukozinolata nakon fermentacije već i njihova stabilnost tijekom skladištenja fermentiranog kupusa. Očigledno je da sadržaj pojedinih razgradnih produkata hidrolize glukozinolata ovisi o pojedinačnom sadržaju glukozinolata u sirovini za fermentaciju. Ipak, način provedbe fermentacije može značajno utjecati na ukupnu količinu razgradnih produkata u konačnom proizvodu. Već u početnoj fazi fermentacije intenzivnog izlučivanja plinova može doći do gubitaka, pogotovo hlapljivih produkata kao što je sinigrin i glukonapina. Gubici ovih spojeva ovise o fizikalno-kemijskim parametrima u tijeku fermentacije. Sadržaj razgradnih produkata u prirodno fermentiranom kupusu je niži od sadržaja spojeva u fermentaciji koja je inicirana bakterijama ali razlike su statističke ne značajne. Tijekom skladištenja kupusa od 2 do 17 tjedana sadržaj izotiocijanata se postepeno smanjuje. Gubici pojedinih spojeva su različiti u rasponu od 15 do 90%. Kod

cijanata sadržaj 1-cijano-3-(metiltio)propana poraste dva puta između drugog i četvrtog tjedna. U slučaju alil cijanida i 1-cijano-3-(metilsulfinil)propana nakon početnog pada njihov se sadržaj u nastavku povećava (Tolonen i sur., 2002.; Ciska i sur. 2004.). Kako bi bili svjesni dobivanja konačnog proizvoda s visokim udjelom poželjnih spojeva za ljudsko zdravlje i s niskim sadržajem potencijalno toksičnih spojeva treba imati kontrolu nad svim fazama proizvodnje fermentiranog kupusa, od odabira sirove, preko fermentacije, proizvodnje i skladištenja konačnog proizvoda (Verkerk, 2009.).

Blanširanje povrća obično se provodi kako bi povrće dobilo nježniju strukturu, kako bi se smanjila odnosno zaustavila enzimska aktivnost i produžio rok trajanja. Blanširanje se obično primjenjuje kao pred tretman prije daljnje obrade sterilizacijom, dehidratacijom i zamrzavanjem. Kod rezanog kiselog kupusa blanširanjem pet minuta znatno se smanji razina ukupnih glukozinolata od 50 do 74% (Wennberg i sur., 2006.). Blanširanje je neophodno prije zamrzavanja, a ono utječe i na nastajanje izotiocijanata. Tretiranje dvije minute na temperaturi od 93 °C uzrokuje smanjenje sadržaja sulforafana za 47 - 65% , jer dolazi do izlaženja glukozinolata u vodu što dovodi do djelomične inaktivacije mirozinaze (Jones i sur., 2006.).

Kuhanje je proces koji ima najveći utjecaj na sadržaj glukozinolata i drugih fitokemikalija jer se tijekom kuhanja u vodi znatno smanjuje razina glukozinolata zbog toga što su glukozinolati i neki njihovi razgradni produkti topljivi u vodi i značajan dio spojeva se otapa u vodi prilikom kuhanja. Najvažniji procesi koji se odvijaju tijekom kuhanja povrća su inaktivacija mirozinaze, degradacija glukozinolata i njihovih razgradnih produkata zbog djelovanja topline, enzimska degradacija glukozinolata, gubitak kofaktora enzima (askorbinske kiseline, željeza), izlaženje glukozinolata i njihovih razgradnih produkata iz povrća u vodu za kuhanje (Dekker i sur., 2000.). Kuhanjem se smanjuje sadržaj glukozinolata od 30 do 60%, a ono ovisi o primijenjenoj metodi (konvencionalno kuhanje, kuhanje pod visokim tlakom, kuhanje mikrovalovima), vrsti povrća, vremenu kuhanja, omjeru povrće/voda, ali i o vrsti glukozinolata (Verkerk, 2009.). Nakon kuhanja 30 minuta sadržaj glukozinolata se smanjio i to 58% kod prokulica, 65% u zelenom kupusu, 75% u

cvjetači i 77% u brokuli (Song i Thornalley, 2007.). Bitno je naglasiti činjenicu da se kuhanjem na pari uzrokuje najmanji gubitak glukozinolata jer nema izravnog kontakta povrća s vodom (McNaughton i Marks, 2003.). U **Tablici 4** prikazan je sadržaj pojedinačnih glukozinolata u brokuli tijekom tretiranja različitim metodama.

Mikrovalno kuhanje (5 minuta, 1000 W) rezultira značajnim gubitkom ukupnih glukozinolata u brokuli, do čak 74% , dok se kod mikrovalnog kuhanja kupusa (8 minuta, 850 W) sadržaj sinigrina smanjio 8% (Rouzaud i sur., 2004.). Istraživanja na crvenom kupusu pokazala su da nakon obrade mikrovalovima sadržaj glukozinolata je i dalje ostao visok što se može pripisati povećanoj ekstrakciji glukozinolata toplinskom obradom (promjene u matriksu povrća) (Verkerk i Dekker, 2009.; Song i Thournalley, 2007.). U **Tablici 5** prikazano je kako različiti toplinski tretmani (blanširanje, kuhanje i konzerviranje) utječu na postotak glukozinolata u crvenom kupusu.

Tablica 4 Sadržaj pojedinačnih glukozinolata u borokuli kuhanjem različitim metodama (Yuan i sur., 2009.).

Tretmani	Alifatski glukozinolati ($\mu\text{mol/g DW}$)			Indolni glukozinolati ($\mu\text{mol/g DW}$)		
	PROG	IB	RAPH	GB	4-mtGB	NEO
Sirovo	0,43	2,20	13,6	4,10	0,41	2,23
Kuhano	0,23	1,01	8,30	1,52	0,19	1,03
Kuhano na pari	0,36	1,98	12,80	2,40	0,37	1,49
Kuhano mikrovalovima	0,20	1,15	5,10	1,80	0,20	1,16
Prženo	0,19	1,01	6,10	1,18	0,16	0,91

PROG: progoitrin; IB: glucoiberin; RAPH: glukorafanin; GB: glukobrasicin; 4-mtGB: 4-metoksiglukobrasicin; NEO: neoglukobrasicin; DW: suha tvar

Tijekom industrijske prerade povrća iz porodice *Brassicaceae*, termička obrada bitno utječe na razinu glukozinolata. Dokazano je da do degradacije glukozinolata dolazi na temperaturi iznad 100 °C. Indolni glukozinolati, 4-hidroksiglukobrasicin i 4-

metoksiglukobrasicin vrlo su osjetljivi i na temperaturi ispod 100 °C te dolazi do termičke razgradnje (Verkerk, 2009.).

Tablica 5 Utjecaj različitih toplinskih tretmana na udio glukozinolata u crvenom kupusu (Oerlemans i sur., 2006.)

	Početna koncentracija (μmol/100g)	Blanširanje (3 min, 95 °C) (%)	Kuhanje (40 min, 100 °C) (%)	Konzerviranje (40 min, 100 °C) (%)
Glukoiberin	14,8	100	94	18
Progoitrin	23,8	100	93	38
Sinigrin	14,7	100	91	12
Glukorafanin	48,2	100	90	15
Glukonapin	36,9	100	93	53
4-hidroksiglukobrasicin	1,9	93	26	3
Glukobrasicin	8,8	99	72	1
4-metoksiglukobrasicin	1,6	97	48	1
Ukupni alifatski glukozinolati	138,4	100	92	29
Ukupni indolni glukozinolati	12,34	98	62	2
Ukupni glukozinolati	150,8	100	89	27

Kao što je već spomenuto genetski uzgoj, fiziološki parametri, klimatski uvjeti (npr. zračenje, temperatura) utječu na sadržaj glukozinolata. Štoviše primjena određenih kemijskih sredstava također može utjecati na njihov sadržaj. Svi ovi faktori imaju utjecaja na sastav i sadržaj, a time imaju važnu ulogu u određivanju konačne razine glukozinolata prije i tijekom branja. Tijekom ispitivanja interakcija između genotipa i klimatskih uvjeta na sadržaj glukozinolata u brokuli i kineskom kupusu dokazano je da je učinak genotipa veći od učinka klimatskih uvjeta. Zapravo 60% alifatskih glukozinolata je regulirano genotipom dok se između 21 i 30% ukupnih indolnih glukozinolata može objasniti samo klimatskim uvjetima i genotipom klimatskih uvjeta (Brown i sur., 2002.). Osim toga ukupna i pojedinačna razina glukozinolata u jedanaest sorta brokula u pravilu je veća između kolovoza i siječnja u odnosu na razdoblje između travnja i srpnja (Rosa i sur., 2001.). Više razine glukozinolata također su nađene pri nižim temperaturama i kod

brokule i cvjetače (Schonhof i sur., 2004.). Međutim kod kupusa visoke temperature izazivaju stres prilikom razvoja glavice što dovodi do povećane razine glukozinolata (Radovich i sur., 2004.). Stoga možemo zaključiti da se biosinteza glukozinolata odvija kao odgovor na promjene temperatura. Različiti enzimi koji su uključeni u sintezu glukozinolata drugačije reagiraju na različite temperature i zračenja pa su oni odgovorni za mnogobrojne reakcije između glukozinolata (Verkerk, 2009.). Kod niskih količina oborina tijekom vegetacijskog razdoblja, sadržaj glukozinolata se povećava u većini kupusnjača kao na primjer kod prokulice, kelja, cvjetače, kupusa i korabe, a smanji se kod rotkvice. Kao što je već spomenuto vrlo je bitna činjenica da povrće nakon branja ostaje svježije što duže vremena. Dokazano je da su temperatura, vrijeme, vlaga i prisutnost plina vrlo važni parametri za održavanje kvalitete nakon branja. U tom pogledu transport, skladištenje i pakiranje su vrlo važni koraci od berbe do opskrbe potrošača. Međutim uvjeti tijekom transporta su u najviše slučajeva podešeni ka održanju vizualnih parametara svježine, boje i izgleda, a ne na zadržavanje visoke razine fitokemikalija (Verkerk, 2009.). Brokula je vrlo kvarljivo povrće i nakon branja dolazi do starenja biljke što uzrokuje gubitak klorofila, narušavanja stanične strukture, degradaciju makromolekula i mobilizaciju hranjivih tvari ubrzo nakon berbe (Ciska i sur., 2000.). Skladištenjem na niskim temperaturama usporavaju se procesi starenja biljke. Općenito sadržaj glukozinolata kod brokule se smanjuje nakon berbe i tijekom rukovanja, dok kupus i kelj pupčar imaju puno duži vijek trajanja. Bitno je naglasiti činjenicu da je visoka relativna vlažnosti presudan faktor u zadržavanju glukozinolata nakon berbe, pa se preporuča korištenje od 98 do 100% relativne vlažnosti (Verkerk, 2009.). Hidroliza glukozinolata se odvija tijekom branja i skladištenja sirovine pa se s ciljem zaštite glukozinolata koriste različiti postupci skladištenja povrća. Kontrolirana atmosfera je vrlo efikasna za zadržavanje kvalitete brokule i može produžiti njihov vijek trajanja za dvostruke duže (Toivonen i Forney, 2004.). Kako bi se produžio vijek trajanja i smanjio gubitak klorofila i askorbinske kiseline brokula se često skladišti u kontroliranoj atmosferi ili se pakira u različite folije (Hansen i sur., 1995.). Upravo su Hansen i sur. (1995.) ispitivali utjecaj različite atmosfere skladištenja, zraka i kombinacije 0,5% O₂ i 20% CO₂ tijekom sedam dana i utvrdili da je sadržaj glukozinolata u povrću bio veći za 42% i 21 %, nego u svježim brokulama. Idealna atmosfera za zadržavanje kvalitete brokula kada se one skladište na temperaturama od 0 do 5°C je 1 - 2% O₂ i 5 - 10% CO₂ (Jones i sur., 2006.). Kako ne bi

došlo do nastajanja nepoželjne i nekarakteristične arome vrlo je važno da sadržaj kisika ne padne ispod 1 % (Forney i sur., 1991.).

2.8. Modeliranje utjecaja procesiranja na glukozinolate

Matematički modeli za glukozinolate su napravljeni kako bi opisali učinak termičke obrade u vodenom okruženju poput kuhanja, konzerviranja, blanširanja. Termička obrada vodi ka gubitku glukozinolata pa se moraju uzeti u obzir različiti mehanizmi koji utječu na razinu glukozinolata tijekom ovih navedenih procesa:

- zagrijavanja vode za obradu,
- prijenos topline iz vode za preradu u povrće,
- termolize biljnih stanica, povećanje ekstrakcije glukozinolata,
- difuziju i ispiranje glukozinolaza iz matriksa povrća,
- difuziju i ispiranje mirozinaze iz matriksa povrća,
- difuziju i ispiranje enzimskih kofaktora iz matriksa povrća,
- enzimsku razgradnju glukozinolata nakon kontakta mirozinaze i glukozinolata,
- termičku razgradnju mirozinaze u povrću,
- termičku razgradnju mirozinaze u vodi za preradu,
- termička razgradnja glukozinolata u povrću i
- toplinska razgradnja glukozinolata u vodi za preradu.

Svi ovi pojedinačni mehanizmi mogu se opisati matematičkim jednadžbama s parametrima koji trebaju biti procijenjeni kao i ovisnost temperature. Količina parametara je prevelika da bi ih se sve točno procijenilo iz eksperimentalnog skupa podataka, osim ako su dostupni svi eksperimentalni podaci za različite uvijete. Stoga je potrebno pojednostaviti model zanemarivanjem određenih mehanizama za koje se očekuje da imaju samo mali učinak u početnoj fazi procesa prerade (Verkerk, 2009.).

3. ZAKLJUČAK

Glukozinolati su spojevi koji podliježu reakcijama degradacije prilikom djelovanja enzima i termičkog tretiranja, a njihov sadržaj ovisi o uvjetima pakiranja, skladištenja kao i o genetskim čimbenicima. Blaga toplinska obrada kao što je blanširanje ne utječe znatno na sadržaj glukozinolata, dok jača toplinska obrada poput kuhanja uzrokuje degradaciju samo indolnih glukozinolata. Teško je predvidjeti konačni unos glukozinolata u organizam zato što količina glukozinolata varira ovisno o svim koracima u proizvodnom lancu. Glukozinolati čine prepoznatljivu skupinu bioaktivnih spojeva koji čine vrlo važni obrambeni sustav kod biljaka ali i kod ljudi. Oni su kao i ostali prirodni spojevi važni u kontroli patogenih organizama i štetočina u poljoprivredi, a smatraju se netoksičnim i potpuno biorazgradivim spojevima. No kao najvažnija činjenica koja se nameće o glukozinolatima je da oni predstavljaju preventivu jer djeluju kao snažna kemopreventivna sredstva povećavajući apoptozu stanica tumora.

4. LITERATURA

- Das S, Tyagi AK, Kaur H: Cancer modulation by glucosinolates: A review. *Current Science* 79:1665-1671, 2000.
- Dekker M, Verkerk R, Jongen WMF: Predictive modelling of health aspects in the food production chain: a case study on glucosinolates in cabbage. *Trends in Food Science and Technology* 11:174-181, 2000.
- Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P: The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56:5-51, 2001.
- Fenwick GR, Heaney RK, Mullin WJ: Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *Critical Review of Food Science and Nutrition* 18:123-201, 1983.
- Finley JW, Ip C, Lisk DJ, Davis CD, Hintze KJ, Whanger PD: Cancer Protective Properties of High-Selenium Broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:2679-2683, 2001.
- Hansen H, Moller P, Sorensen H, deTrepo MC: Glucosinolate in Broccoli Stored Under Controlled Atmosphere. *Journal of American Society of Horticultural Science* 120:1069-1074, 1995.
- Holst B, Williamson G: A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *Natural Product Reports* 21:425-47, 2004.
- Jeffery EH, Brown AF, Kurilich AC, Keck AS, Matusheski N, Klein BP, Juvik JA, Variation in content of bioactive components in broccoli. *Journal of Food Composition and Analysis* 323-330, 2003.
- Jones RB, Faragher JD, Winkler S: A review of the influence of postharvest treatments on quality and glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea varitalica*) heads. *Postharvest Biology and Technology* 41:1-8, 2006.
- Johnson IT: Brassica vegetables and human health: glucosinolates in the food chain. *Acta Horticulturae* 539:39-44, 2000.
- Juge N, Mithena RF, Traka M: Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cellular and Molecular Life Science* 64:1105-1127, 2007.
- Kopjar M, Šubarić D, Piližota V: Glukozinolati: biodostupnost i utjecaj na zdravlje ljudi. *Hrana u zdravlju i bolesti* 22-35, 2012.

- Kuczka MM, Analysis of Flavor Precursors in Radish and Radish Color Extracts. Magisterski rad, 1996.
- McNaughton SA, Marks GC: Development of a food composition database for the estimation of dietary intakes of glucosinolates, the biologically active constituents of vegetables. *British Journal of Nutrition* 90:687–697, 2003.
- Moreno DA, Carvajal M, López-Berenguer C, García Viguera C: Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41:1508–1522, 2006.
- Mosha TC, Pace RC, Adeyeye S, Mtebe K, Laswai H: Proximate composition and mineral content of selected Tanzanian vegetables and the effect of traditional processing on the retention of ascorbic acid, riboflavin and thiamine. *Plant Foods in Human Nutrition* 48:235–245, 1995.
- Palop ML, Smiths JP, Brink B: Degradation of sinigrin by *Lactobacillus agilis* strain R16. *International Journal of Food Microbiology* 26:219–229, 1995.
- Rodrigues AS, Rosa EAS: Effect of Postharvest Treatments on the Level of Glucosinolates in Broccoli. *Journal of Science of Food and Agriculture* 79: 1028-1032, 1999.
- Rosa EAS, Heaney RK, Fenwick GR, Portas CAM: Glucosinolates in crop plants. *Horticulture Review* 19:99–215, 1997.
- Rouzaud G, Young SA, Duncan AJ: Hydrolysis of Glucosinolates to Isothiocyanates after Ingestion of Raw or Microwaved Cabbage by Human Volunteers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 13:125–131, 2004.
- Rungapamestry V, Duncan AJ, Fuller Z, Ratcliffe B: Influence of blanching and freezing broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) prior to storage and cooking on glucosinolate concentrations and myrosinase activity. *European Food Research and Technology* 227:37–44, 2008.
- Severi S, Bedogni G, Manzi AM, Poli M, Battistini N: Effects of cooking and storage methods on the micronutrient content of foods. *European Journal of Cancer Prevention* 6:S21–S24, 1997.
- Toivonen PMA, Forney C: Broccoli. U: The Commercial Storage of Fruits, Vegetables and Florist and Nursery Stock. USDA, ARS Agriculture Handbook, 2004.

- Travers-Martin N, Kuhlmann F, Müller C: Revised determination of free and complexed myrosinase activities in plant extracts. *Plant Physiology and Biochemistry* 46:506-516, 2008.
- Tripathi MK, Mishra AS: Glucosinolates in animal nutrition: A review. *Animal Feed Science and Technology* 132:1–27, 2007.
- Verkerk R, Dekker M: Glucosinolates. U: Bioactive compounds in Foods, Blackwell Publishing Ltd., 2008.
- Verkerk R, Dekker M, Jongen WMF: Post harvest increase of indolyl glucosinolates in response, to chopping and storage of brassica vegetables. *Journal of Science of Food and Agriculture* 81:953–95, 2001.
- Verkerk R, Schreiner M, Krumbein A, Ciska E, Holst B, Rowland I, De Schrijver R, Hansen M, Gerhäuser C, Mithen R, Dekker: Glucosinolates in Brassica vegetables: *Molecular Nutrition and Food Research* 53:S219 –S265, 2009.
- Verhoeven DTH, Verhagen H, Goldbohm RA, Van den Brandt PA, Van Poppel G: A review of mechanism underlying anti carcinogenicity by brassica vegetables. *Chemico-Biological Interactions* 103:79–129, 1997.
- Zekić M: Glukozinolati odabranih samoniklikih biljaka porodice Brassicaceae, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013.