

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ЗА ФИЗИЧКУ ХЕМИЈУ

Драгица М. Милосављевић

Примена хроматографских и спектроскопских
метода за анализу антиоксидативних компоненти
у плодовима 25 сорти јагода
(*Fragaria spp.*)

Докторска дисертација

Београд, 2025.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Dragica M. Milosavljević

Application of chromatographic and spectroscopic
methods for the analysis of antioxidant components
in the fruits of 25 strawberry cultivars
(*Fragaria spp.*)

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025.

Ментори:

др Милош Мојовић, редовни професор
Универзитет у Београду, Факултет за физичку хемију

др Јелена Драгишић Максимовић, научни саветник
Универзитет у Београду, Институт за мултидисциплинарна истраживања

Чланови комисије:

1. др Јасмина Димитрић Марковић, редовни професор,
Универзитет у Београду, Факултет за физичку хемију
2. др Душан Димић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Факултет за физичку хемију
3. др Ђура Накарада, виши научни сарадник
Универзитет у Београду, Факултет за физичку хемију
4. др Јасминка Миливојевић, редовни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Датум одбране докторске дисертације: _____

ЗАХВАЛНИЦА

Ова докторска дисертација је урађена на Институту за мултидисциплинарна истраживања – Универзитета у Београду, на Одсеку за науке о живим системима. ЕПР експерименти су урађени на Факултету за физичку хемију – Универзитета у Београду у оквиру Центра за физичку хемију биолошких система BioScope.

Захваљујем се својим менторима **др Милошу Мојовићу**, редовном професору Факултета за физичку хемију, и **др Јелени Драгишић Максимовић**, научном саветнику Института за мултидисциплинарна истраживања, на помоћи, сарадњи и подршци пруженим приликом израде ове дисертације. Драго ми је да сам имала прилике да учим од вас.

Највећу захвалност дугујем **др Јелени Драгишић Максимовић** која је у мени препознала сарадника када то нико није и пружила прилику да учим од најбољих. Њена неизмерна подршка, разумевање и пријатељски савети помогли су ми да пребродим све проблеме и изазове које сам имала пред собом.

Др Вуку Максимовићу, научном саветнику Института за мултидисциплинарна истраживања – Универзитета у Београду неизмерно сам захвална на сарадњи при извођењу HPLC експеримената који су део ове дисертације, као и помоћи и знању које ми је пружио. Стрпљењем, љубазношћу и искреним саветима пуно ми је помогао у савладавању препрека како током експеримената, тако и у животу.

Др Јасминки Миливојевић, редовном професору Пољопривредног факултета – Универзитета у Београду захваљујем се на доброј сарадњи и обезбеђивању узорака јагода, као и на учешћу у Комисији за преглед, оцену и одбрану ове докторске дисертације. Хвала јој на многим корисним сугестијама и посвећеном времену.

Редовном професору Пољопривредног факултета – Универзитета у Београду, **др Илију Бекићу** захваљујем се на помоћи и подршци при писању публикације и уступању математичког модела који је ову дисертацију заокружио и дао јој квалитетан закључак.

Др Драгосаву Мутавџићу, вишем научном сараднику Института за мултидисциплинарна истраживања захваљујем се на помоћи при извођењу спектрофлуориметријских мерења и статистичкој обради података. Хвала му на посвећеном времену и жељи да подели знање.

Део експеримената је урађен на Техничком универзитету у Фрајбергу (Немачка), на Институту за аналитичку хемију, па самим тим дугујем посебну захвалности **др Карли Вогт** и **др Јану Зуберу** на одвојеном времену и изузетној сарадњи.

Др Ђури Накаради, научном сараднику Факултета за физичку хемију – Универзитета у Београду дугујем велику захвалност за помоћ приликом извођења ЕПР експеримената. Дугогодишње познанство прерасло је у лепу научну сарадњу и пријатељство.

Спектрофлуориметријска мерења су рађена на Институту за мултидисциплинарна истраживања и не би била могућа без сарадње са **др Ксенијом Радотић Хаџи-Манић**, научног саветника Института за мултидисциплинарна истраживања. Хвала на посвећеном времену током експеримента и писању наше прве заједничке публикације.

Др Мирни Јовановић, научном сараднику и **др Јелени Бркљачић**, научном саветнику Одељења за биохемију, Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитета у Београду, дугујем захвалност за *in vitro* истраживања на ћелијским културама која су допринела квалитету ове докторске дисертације.

Велику захвалност дугујем и колегама са Института за мултидисциплинарна истраживања на колегијалности.

Свом супругу Миодрагу дугујем захвалност за сву његову посвећеност мени и сину Илији, стрпљење, мотивацију, духовитост, ослонац и љубав. Свекру и свекрви хвала за помоћ кад год је потребно и љубави коју ми пружају.

Мојој породици, оцу, мајци и браћи, захваљујем се на немерљивој моралној и материјалној подршци коју су ми пружили током школовања. Велико разумевање, стрпљење и одрицање које су уложили изградили су добру и квалитетну особу. Хвала за потпору у свакодневном животу и времену да увек прискоче у помоћ кад год је требало. Родитељима посвећујем ову дисертацију као поклон за 52 године заједничког живота.

Аутор

Наслов докторске дисертације:

Примена хроматографских и спектроскопских метода за анализу антиоксидативних компоненти у плодовима 25 сорти јагоде (*Fragaria spp.*)

Резиме:

Повећање свести потрошача о здравој исхрани у савременом животу подстакло је бројне научне студије о нутритивним и лековитим својствима воћа, које поред лепог изгледа и укуса, треба да садржи биоактивне компоненте значајне за превенцију различитих болести и очување здравља људи. У оквиру ове докторске дисертације експериментално су анализирани примарни и секундарни метаболити у плодовима 25 одабраних сорти јагоде, а затим је применом статистичких и математичких модела изведено поређење одређених биоактивних и нутритивних компоненти по сортама како би се извршило њихово рангирање и дала потенцијална препорука за гајење одабраних сорти произвођачима, али и за конзумирање крајњим потрошачима. Овакав иновативни приступ, поред традиционалне квантитативне анализе примарних метаболита, обухвата и математички модел за одређивање укупног индекса квалитета (*TQI*), који може да се користи као поуздан алат за рангирање перспективних сорти. Упоредном анализом експерименталних резултата спектрофотометрије, спектрофлуориметрије, *HPLC-MS*, *HPLC-DAD*, *HPLC-PAD*, *EPR* спектроскопије и имицинга, *FT-ICR-MS* и *MS* имицинга унапређених статистичком обрадом података и мултиваријантном анализом, попуњен је недостатак детаљнијег профилисања биоактивних једињења присутних у плодовима различитих сорти јагоде који тренутно постоји у литератури. Тиме је омогућено упоређивање и рангирање 25 сорти јагоде према садржају биоактивних и нутритивних компоненти, њиховој интеракцији са ензимским системом плода и поуздано предвиђање одржања биоактивног потенцијала, чиме се одређује и прихватљивост плодова испитиваних сорти са аспекта хранљиве и здравствено промотивне вредности. У ширем смислу, резултати ове докторске дисертације профилишу употребу одређених аналитичких метода за испитивање физичко-хемијских особина плода у циљу фаворизовања сорти које показују супериорност у погледу нутритивних и антиоксидативних својстава плодова.

Кључне речи: Јагоде, *HPLC*, спектроскопија, *FT-ICR-MS*, *TQI*, оксидативни стрес, *EPR*, антиоксиданси

Научна област: Физичка хемија – спектрохемија, Физичка хемија – биофизичка хемија

Ужа научна област: биофизичка хемија, спектрохемија

УДК број: 577.35(043.3)

Title of doctoral dissertation:

Application of chromatographic and spectroscopic methods for the analysis of antioxidant components in the fruits of 25 strawberry (*Fragaria spp.*) cultivars

Abstract

The increase in consumer awareness of healthy eating in modern life has encouraged numerous scientific studies on the nutritional and medicinal properties of fruits, which, in addition to their beautiful appearance and taste, should contain bioactive components important for the prevention of various diseases and the preservation of human health. As part of this doctoral dissertation, primary and secondary metabolites in the fruits of 25 selected strawberry cultivars were experimentally analyzed, and then, using statistical and mathematical models, a comparison of certain bioactive and nutritional components by cultivars was performed to rank them and provide potential recommendations for the cultivation of selected cultivars to producers, but also for consumption by end consumers. This innovative approach, in addition to the traditional quantitative analysis of primary metabolites, also includes a mathematical model for determining the total quality index (TQI), which can be used as a reliable tool for ranking promising cultivars. Comparative analysis of experimental results of spectrophotometry, spectrofluorimetry, HPLC-MS, HPLC-DAD, HPLC-PAD, EPR spectroscopy and imaging, FT-ICR-MS, and MS imaging enhanced by statistical data processing and multivariate analysis, filled the gap in the literature of a more detailed profiling of bioactive compounds present in the fruits of different strawberry cultivars. This enabled the comparison and ranking of 25 strawberry cultivars according to the content of bioactive and nutritional components, their interaction with the enzyme system of the fruit and reliable prediction of the maintenance of bioactive potential, which also determines the acceptability of the fruits of the tested cultivars from the aspect of nutritional and health-promoting value. In a broader sense, the results of this doctoral dissertation profile the use of certain analytical methods for examining the physicochemical properties of fruit to favor cultivars that demonstrate superiority in terms of nutritional and antioxidant properties of fruits.

Keywords: Strawberry, HPLC, spectroscopy, FT-ICR-MS, TQI, oxidative stress, EPR, antioxidant

Scientific field: Physical chemistry – Spectrochemistry, Physical chemistry – Biophysical chemistry

Scientific subfield: Biophysical chemistry, Spectrochemistry

UDC number: 577.35(043.3)

САДРЖАЈ

1	УВОД	1
2	Преглед литературе	3
2.1	МОГУЋНОСТ ПРИМЕНЕ ФИЗИЧКОХЕМИЈСКИХ ИНСТРУМЕНТАЛНИХ МЕТОДА У АНАЛИЗИ ПЛОДОВА ЈАГОДЕ 3	
2.2	ОКСИДАТИВНИ СТРЕС И АНТИОКСИДАТИВНИ ПОТЕНЦИЈАЛ ПЛОДОВА ЈАГОДЕ	5
2.3	ПОДЕЛА И ЗНАЧАЈ ПОЛИФЕНОЛА	9
2.3.1	Фенолне киселине	10
2.3.2	Флавоноиди	12
2.3.3	Флаван-3-оли	13
2.3.4	Флавоноли	13
2.3.5	Антоцијанини	14
2.4	ПРЕДМЕТ ДИСЕРТАЦИЈЕ	16
2.5	ЦИЉ ДИСЕРТАЦИЈЕ	17
3	Материјал и методе	18
3.1	УЗОРЦИ ПЛОДОВА ЈАГОДА	18
3.1.1	Једнородне сорте јагоде	18
3.1.1.1	Привредно значајне једнородне конзумне сорте јагоде	19
3.1.1.2	Перспективне једнородне конзумне сорте јагоде	22
3.1.2	Сталнорађајуће (ремонтантне) сорте јагоде	25
3.2	ПРИПРЕМА ЕКСТРАКТА ПЛОДОВА ЈАГОДЕ	27
3.2.1	Метанолни екстракти за анализе на спектрофотометру, спектрофлуориметру, HPLC -у и ЕПР-у	27
3.2.2	Пуферски екстракти за испитивања активности ензима	27
3.2.3	Екстракти за ESI-FT-ICR-MS анализу	27
3.3	ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ МЕТОДЕ, ИНСТРУМЕНТИ И УСЛОВИ СНИМАЊА	27
3.3.1	Течна хроматографија под високим притиском спрегнута са масеним спектрометром (HPLC-MS), детектором са низом диода (HPLC-DAD) и електрохемијским детектором (HPLC-ECD)	28
3.3.1.1	Детекција	29
3.3.1.1.1	Пулсна амперометријска детекција (Pulsed Amperometrical Detection)	29
3.3.1.1.2	Детектор са низом диода (photodiode array detection, PDA, или diode array detector, DAD)	30
3.3.1.1.3	Масена спектрометрија (МС)	31
3.3.1.1.4	ESI	31
3.3.1.1.5	Квадрупол	32
3.3.2	Фуријеова трансформација – јон резонантна циклотронска масена спектрометрија (Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, FT ICR MS)	34
3.3.2.1	Припрема узорака и услови снимања	34
3.3.3	Електронска парамагнетна резонантна спектроскопија (EPR спектроскопија)	34
3.3.3.1	Спин-трап техника или техника хватања спинова	36
3.3.3.1.1	Коришћени инструмент и услови	36
3.3.3.2	ЛИПОЗОМИ	37
3.3.3.2.1	Поступак припреме липозома	37
3.3.3.2.2	Синтеза липозома са екстрактима плодова јагоде	37
3.3.3.3	EPR имицинг	39
3.3.4	Имицинг масена спектрометрија (Mass Spectrometry Imaging, MSI)	39
3.3.4.1	Припрема узорака и услови снимања	40

3.3.5	Ултраљубичаста и видљива спектроскопија	41
3.3.5.1	Коришћени инструменти.....	42
3.3.5.2	Одређивање садржаја укупних фенола (TPC – Total Phenolic Content).....	42
3.3.5.2.1	Припрема компоненти за одређивање TPC	42
3.3.5.2.2	Процедура за одређивање TPC	42
3.3.5.3	Одређивање укупног антиоксидативног капацитета (TAC – Total Antioxidant Capacity)	43
3.3.5.3.1	Припрема компоненти за одређивање TAC	43
3.3.5.3.2	Процедура за одређивање TAC	43
3.3.5.4	Одређивање садржаја укупних антоцијанина (Total Anthocyanin Content – TACY).....	43
3.3.5.4.1	Припрема компоненти потребних за одређивање садржаја укупних антоцијанина	44
3.3.5.4.2	Процедура за одређивање садржаја укупних антоцијанина.....	44
3.3.5.5	Одређивање концентрације протеина	44
3.3.5.5.1	Припрема компоненти за одређивање укупне концентрације протеина	45
3.3.5.5.2	Процедура за одређивање концентрације протеина	45
3.3.5.6	Одређивање активности ензима пероксидазе (POD)	45
3.3.5.6.1	Припрема компоненти за одређивање активности пероксидаза	46
3.3.5.6.2	Процедура за одређивање активности пероксидаза	46
3.3.5.7	Одређивање активности ензима полифенолоксидазе (PPO).....	47
3.3.5.7.1	Припрема компоненти за одређивање активности полифенолоксидазе (PPO).....	48
3.3.5.7.2	Процедура за одређивање активности полифенолоксидазе (PPO).....	48
3.3.6	Изоелектрично фокусирање (IEF)	48
3.3.6.1	Припрема гела и услови	48
3.3.7	Анализа садржаја растворљиве суве материје (soluble solids content – SSC) и укупних киселина (total acid – TA).....	49
3.3.8	Одређивање концентрације витамина Ц.....	50
3.3.9	Спектрофлуориметрија	50
3.3.9.1	Коришћени инструмент и услови	51
3.3.10	Израчунавање укупног индекса квалитета (total quality index – TQI)	51
3.3.11	Ефекат метанолних екстраката испитиваних сорти јагода на 3T3-F442A адипоците гајене у култури	52
3.3.11.1	Ћелијска култура	52
3.3.11.2	Вијабилност 3T3-F442A ћелија у култури након третмана метанолним екстрактима одабраних сорти јагода	52
3.3.11.3	Диференцијација адипоцита и третман са метанолним екстрактима одабраних сорти јагода	53
3.3.11.4	Припрема укупних ћелијских екстраката 3T3-F442A адипоцита за имуноблот анализу	53
3.3.11.5	Денатуришућа електрофореза и детекција протеина имуноблотом.....	53
4	Резултати и дискусија	55
4.1	ХРОМАТОГРАФСКЕ МЕТОДЕ	55
4.1.1	Детекција шећера из екстраката плодова јагоде помоћу HPLC-PAD.....	55
4.1.2	Детекција органских киселина из екстраката јагода помоћу HPLC-PAD	58
4.1.2.1	Квантификација појединачних фенола.....	62
4.2	УКУПНИ ИНДЕКС КВАЛИТЕТА (TQI) – ОДАБИР СОРТИ ЗА ДАЉУ АНАЛИЗУ.....	73
4.3	ФУРИЈЕОВА ТРАНСФОРМАЦИЈА – ЈОН РЕЗОНАНТНА ЦИКЛОТРОНСКА МАСЕНА СПЕКТРОМЕТРИЈА, (FT ICR MS)	74
4.4	EPR.....	86
4.4.1.1	Липозоми	88

4.5	СПЕКТРОФОТОМЕТРИЈСКА МЕРЕЊА АНТИОКСИДАТИВНИХ КОМПОНЕНТИ У ПЛОДУ ЈАГОДЕ	90
4.6	ИЗОЕЛЕКТРИЧНО ФОКУСИРАЊЕ	96
4.7	РЕФЛЕКТОМЕТРИЈСКА АНАЛИЗА ВИТАМИНА Ц	97
4.8	АНАЛИЗА САДРЖАЈА РАСТВОРЉИВЕ СУВЕ МАТЕРИЈЕ И УКУПНИХ КИСЕЛИНА	98
4.9	СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЈСКА МЕРЕЊА.....	99
4.10	ИМИЦИНГ МАСЕНА СПЕКТРОМЕТРИЈА (IMS)	101
4.11	ЕПР ИМИЦИНГ (ЕПРИ)	105
4.12	УКУПНИ ИНДЕКС КВАЛИТЕТА (TQI) КОРИШЋЕЊЕМ СВИХ ИЗМЕРЕНИХ ПАРАМЕТАРА	106
4.13	ЕФЕКАТ МЕТАНОЛНИХ ЕКСТРАКТА ИСПИТИВАНИХ СОРТИ ЈАГОДА НА ЗТЗ-F442А АДИПОЦИТЕ ГАЈЕНЕ У КУЛТУРИ.....	108
5	ЗАКЉУЧАК	112
6	ЛИТЕРАТУРА	115
7	биографија	134
7.1	НАУЧНИ РАДОВИ У КОЈИМА СУ ПУБЛИКОВАНИ РЕЗУЛТАТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ	135
8	Изјава о ауторству	136
8.1	ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДА	137
8.2	ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ	138

1 УВОД

Хроматографске и спектроскопске методе имају велику улогу у анализи сложених биљних система, хране и контроли квалитета исте. Ове методе имају битну улогу у безбедности, аутентичности и квалитету прехранбених производа. Хроматографске технике, попут течне хроматографије и гасне хроматографије, имају одличну моћ раздвајања и идентификације индивидуалних компоненти, омогућавајући тако детекцију различитих класа једињења у сложеним системима. Осим тога карактерише их и висока осетљивост, селективност и ефикасност, што их чини незаменљивим у анализи материјала биљног порекла. У ту сврху се често користе и спектроскопске методе: ултраљубичаста-видљива (UV/Vis) спектроскопија, масена спектрометрија, електронска парамагнетна резонантна спектроскопија (EPR), инфрацрвена спектроскопија и нуклеарна магнетна резонантна спектроскопија. Ове технике пружају значајан увид у хемијски састав, структурне карактеристике и функционална својства компоненти испитиваног објекта. Предности ових метода су недеструктивна анализа, брза детекција и минимални захтеви за припрему узорка. Такође, примена хеометријских метода за анализу података добијених хроматографским и спектроскопским мерењима омогућава издвајање значајних информација из сложених скупова података, олакшава препознавање образаца и квантитативну анализу испитиваних узорака. Статистичке методе, мултиваријантна анализа и математички модели помажу у интерпретацији хроматографских и спектроскопских података, омогућавајући поуздану класификацију, предвиђање и процену квалитета експерименталног објекта. Комбиновањем различитих техника у оквиру ове докторске дисертације омогућен је мултидисциплинарни приступ у истраживањима плодова 25 сорти јагоде које су селекционисане у различитим иностраним оплемењивачким центрима.

Јагода (*Fragaria spp.*) је економски важна врста воћака чија производња континуирано расте на светском нивоу. Међу јагодастим воћем, баштенска јагода (*Fragaria x ananassa* Duch., фамилија *Rosaceae*) је најраспрострањеније и најчешће конзумирано воће у свету, чија је производња у сталном порасту последњих деценија. Према званичним статистичким подацима укупна производња јагоде у свету у 2023. години износи 10.485.454,06 тона. Највећи произвођачи су Кина (4.216.716,9 тона), Сједињене Америчке државе (1.250.100 тона) и Египат (731.144,93 тона). Највећи европски произвођачи јагоде су Турска (728.112 тона), Шпанија (329.280 тона), Русија (261.168,09 тона) и Пољска (194.500 тона). Производња јагоде у Србији је значајно нижа са укупним приносима у 2023. години од 23.703,89 тона, због чега је Србија сврстана у земље са ниско интензивном производњом ("FAOSTAT," 2025).

Јагода је воће са ниским калоријским индексом богато дијеталним влакнима, али са малом количином масти и протеина. Хемијски састав плода јагоде (кога чине: шећери, органске киселине и фенолна једињења) може бити веома променљив у зависности од сорте, еколошких услова локалитета, мера неге, фазе зрелости, времена бербе и услова складиштења. Посебно је важно истаћи да јагода представља неклимактерично воће, што значи да плодови не дозревају након бербе и да се њихов хемијски састав не може побољшати.

Плод јагоде је богат извор великог броја хранљивих једињења попут шећера, витамина и минерала, као и биоактивних једињења секундарног метаболизма, попут флавоноида (антоцијанина, флавонола и флаван-3-ола) и фенолних киселина. Укус зрелог плода јагоде превасходно зависи од односа укупног састава шећера и органских киселина који представља индикатор зрелости плода дефинисан као „прихватљивост плода од стране потрошача“ (Cordenunsi et al., 2002). Са друге стране, секундарни метаболити доприносе пре свега боји, али и укусу, мирису и горчини, и сматрају се главним једињењима са антиоксидативним и/или другим здравствено корисним деловањем.

Слободни радикали могу проузроковати различита патолошка стања у организму, од поремећаја ћелијских функција до оштећења саме ћелије (Halliwell, 1994). Организам се против слободних радикала може борити својим одбрамбеним механизмима или уносом природних антиоксиданаса путем хране. Благовторно дејство јагода на људско здравље

приписано је високом садржају полифенолних једињења, која имају изражена антибактеријска, антиинфламаторна, антиалергијска, антимулагена, антивирусна и антиканцерогена дејства (Harborne and Williams, 2000; Havsteen, 1983).

Полифенолна једињења имају изражену антиоксидативну активност, првенствено као резултат њихове способности да буду донори атома водоника и уклањају слободне радикале (стабилне органске, реактивне врсте кисеоника-ROS, реактивне врсте азота-RNS), као и способности да учествују у очувању ћелијске мембране у процесу липидне пероксидације (Zhu et al., 2013). Метаболизам слободнорадикалских реакција је изузетно важан у одређивању биоактивног потенцијала плода, а такође и у дефинисању рока трајања и могућности дуготрајног транспорта као битних економских параметара.

Због сложеног састава плода јагоде, потребно је пронаћи једноставне и прецизне методе за њихову детаљну квалитативну и квантитативну анализу. До сада су спроведена бројна спектрофотометријска истраживања како би се испитале варијације у укупном садржају фенола у плоду јагоде, углавном коришћењем *Folin-Ciocalteu* теста (Dragišić Maksimović et al., 2015; Panico et al., 2009; Patras et al., 2009; Zheng et al., 2007). Метода избора за идентификацију и квантификацију појединачних фенола је углавном течна хроматографија високих перформанси (*HPLC*). (Aaby et al., 2012; Ariza et al., 2018; Bae et al., 2015; Buendía et al., 2010; Kajdzanoska et al., 2011). С обзиром да нека фенолна једињења имају способност флуоресценције покушана су и спектрофлуориметријска мерења (Milosavljević et al., 2020; Trivittayasil et al., 2017; Włodarska et al., 2016; Zhu et al., 2009). Због своје високе селективности и осетљивости, спектрофлуориметрија се препоручује као добра подршка апсорпционим спектроскопским техникама за квантификацију фенолних једињења у воћу. Овом методом могу се детектовати флуоресцентна једињења присутна у траговима. Спектрофлуориметрија у комбинацији са мултиваријантном регресионом анализом коришћена је за скрининг антиоксидативног капацитета кафе, екстракта пеперминта, пасте од парадајза (Orzel et al., 2015; Orzel and Daszykowski, 2014), као и сока од јабуке (Włodarska et al., 2016). Литературни подаци о коришћењу ове технике за детекцију фенолних једињења у плодовима јагода су у експанзији последњих година (Sikorska et al., 2022, 2020; Wulf et al., 2008). Такође, спектроскопска метода електронске парамагнетне резонанције (*EPR*) може се успешно примењивати за одређивање присуства и способности уклањања радикала у намирницама богатим фенолним једињењима (Brezová et al., 2009; Kostka et al., 2020; Osorio et al., 2011). Због свега наведеног, предмет рада ове докторске дисертације била је квалитативна и квантитативна анализа примарних и секундарних метаболита у плоду различитих сорти јагода методом течне хроматографије (спрегнуте са амперометријским детектором, *UV/Vis* детекцијом и масеном спектрометријом), спектрофлуориметријско испитивање профила секундарних метаболита услед њихове способности аутофлуоресценције, испитивање антиоксидативне активности одабраних сорти помоћу *EPR* спектроскопије и спектрофотометрије, визуелизација поменутих једињења помоћу високо селективних метода (*MS* имиџинг, *EPR* имиџинг), а затим поређење одређених нутритивних параметара у различитим сортама помоћу статистичких и математичких модела како би се извршило рангирање сорти и дала њихова потенцијална препорука произвођачима за шире гајење, али и крајњим потрошачима за конзумирање. Тиме резултати докторске дисертације добијају на применљивости ван оквира основних истраживања, чиме се прати стратегија научног и технолошког развоја Републике Србије са циљем позиционирања здраве хране, а посебно са аспекта промоције њене производње и конзумације. С обзиром да су у литератури ретка свеобухватна истраживања са овако напредним спрегнутим техникама које су важне за идентификацију, квантификацију и праћење метаболита у узорцима одабраних сорти јагоде, резултати ове докторске дисертације имају посебан научни значај и доприносе истраживачкој иновативности.

2 ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1 МОГУЋНОСТ ПРИМЕНЕ ФИЗИЧКОХЕМИЈСКИХ ИНСТРУМЕНТАЛНИХ МЕТОДА У АНАЛИЗИ ПЛОДОВА ЈАГОДЕ

Савремен и „здрав“ начин живота је наметнуо да се параметри нутритивног квалитета плода јагоде и његове антиоксидативне карактеристике сматрају врло битним у процесу селекције нових сорти са израженим здравствено корисним ефектима. *Tulipani* и сарадници (*Tulipani et al.*, 2008) предлажу да параметар „укупни феноли“ може послужити као хемијски маркер за антиоксидативни капацитет плода, због чега би га требало користити у оплемењивачким програмима.

Универзални циљеви оплемењивања су стварање сорти са следећим особинама:

- добрим квалитетом плода високог антиоксидативног капацитета (одличан укус, изражена арома и висок садржај растворљиве суве материје, фенолних једињења и витамина)
- високим приносима,
- израженом отпорношћу према болестима, штеточинама и неповољним условима средине (падавине, суша, ниске и високе температуре, алкалност земљишта),
- добром складишном и транспортном способношћу, и
- погодне за различите видове прераде, али и за употребу у свежем стању.

За (био)хемијску карактеризацију новостворених сорти јагоде неопходно је применити савремене физичкохемијске инструменталне технике. Напредне хроматографске технике као што је течна хроматографија високих перформанси (*HPLC*) у комбинацији са различитим детекторима, омогућава раздвајање сложене смеше једињења у плодовима јагоде, као и њихову детекцију због високе осетљивости и селективности детектора. Такође, спектроскопске методе, као углавном брже, јефтиније, а самим тим и приступачније, су добра потпора хроматографским техникама у испитивању сложених вишекомпонентних система.

HPLC је од стране специјалног комитета Међународне уније за чисту и примењену хемију (*International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC*) дефинисана као метода која се првенствено користи за раздвајање компонената узорка, при чему су компоненте распоређене између две фазе, стационарне (непокретне) и мобилне (покретне). Стационарна фаза може бити чврста (колона), течна - нанета као танак слој или филм на одговарајући чврст носач или у виду гела. Мобилна фаза је течност. *HPLC* је брза, осетљива, флексибилна метода високе резолуције. Омогућава прецизну и тачну анализу компликованих смеша, али лако детектује и мале количине једињења. Због тога, може се користити у различитим истраживањима (биохемија, фармација, биологија, животна средина). Ова метода захтева мале количине узорака који се припремају у одговарајућем растварачу (зависи од поларности узорка), а за најбоље резултате раздвајања узорак је најбоље екстраховати у мобилној фази. *HPLC* је популаран алат за квантитативну анализу јер може прецизно и доследно да мери концентрације анализата од интереса.

Претходна истраживања су показала да су фенолна једињења главни биоактивни састојци одговорни за антиоксидативна својства плодова јагоде и најлакше и најчешће се детектују помоћу *HPLC* детектора са низом диода (*DAD*). Полифеноли снажно апсорбују светлост у *UV* региону, али и одређена једињења због своје структуре могу да имају апсорпцију у видљивом опсегу. Квантификација фенолних компоненти у плодовима јагоде помоћу *HPLC/DAD*, описана је у бројним публикацијама (*Aaby et al.*, 2012; *Bordonaba et al.*, 2011; *Cesa et al.*, 2017; *Da Silva et al.*, 2007; *Fernández-Lara et al.*, 2015; *Milosavljević et al.*, 2022, 2020). Комбинација са масеном спектрометријом, у позитивном и негативном моду јонизације, даје информације о молекуларној маси и фрагментацији анализата. Ово је нарочито важно ако је аналит у ниским концентрацијама или долази до промена укупног профила услед модификације анализираних једињења.

Такође, хроматографске методе се користе и за квантификацију шећера и органских киселина у јагодастом воћу и то употребом различитих детектора (*DAD*, електрохемијским детектором итд.).

Као најефикаснији метод за испитивање антирадикалске активности плодова јагоде, због своје високе осетљивости, селективности и могућности прецизне квалитативне и квантитативне анализе, користи се електронска парамагнетна резонантна (*EPR*) спектроскопија. Једина је аналитичка техника која може специфично детектовати слободнорадикалске врсте и тако директно одредити антиоксидативну активност испитиваног узорка. Ова спектроскопска метода је заснована на резонантној апсорпцији микроталасног зрачења од стране парамагнетних молекула који се налазе у спољашњем магнетном пољу. *EPR* има велику примену у биологији, медицини и хемији због могућности директног праћења сигнала радикалских врста. *EPR* техника која користи спинске хватаче („спин-трап“) је веома специфична и омогућава разликовање различитих краткоживећих врста слободних радикала, где сваки адукт има карактеристичне *EPR* спектре (Savić and Moјović, 2012). На тај начин може се испитивати активност екстракта плодова јагоде у уклањању хидроксилног, супероксид-анјон радикала и азот-моноксид радикала. Пошто је као растварач за екстракцију плодова јагода био метанол, а сам метанол је токсичан за живе ћелије, како би се пронашао начин да искористљивост буде што већа, али и неки од могућих начина за циљану дистрибуцију корисних компоненти, развијена је метода интеграције екстракта јагода у зид липозома, а затим испитивана њихова антиоксидативна активност уз помоћ *EPR*-а (Nakarada et al., 2022).

Спектрофотометријска квантификација различитих једињења је метода која се најчешће користи за процену садржаја биоактивних једињења, као и за праћење активности различитих ензима у воћу. Полифеноли су због својих биохемијских и молекуларних својстава, тј. способности фенолног прстена да апсорбује *UV* светлост, веома погодни за квантификацију *UV-ViS* спектрофотометријом. Такође, *UV-ViS* спектри неких фенолних једињења (нпр. црвени антоцијанини или жути флавоноли) могу да пруже драгоцене информације о електронским прелазима који се јављају унутар хидроксилних група фенолних молекула. Неколико метода је оптимизовано за различите подкласе фенолних једињења (*Folin–Ciocalteu*, *pH* диференцијална метода), што омогућава ефикасну процену укупног садржаја фенолних једињења коришћењем једноставних *UV-ViS* спектрофотометријских метода.

С обзиром да фенолна једињења имају способност флуоресценције, као скрининг метода за њихову детекцију може се користити спектрофлуориметрија, а у комбинацији са хроматографијом и за њихову квантификацију. Побуђивањем ових једињења светлошћу одређеног интензитета и таласне дужине, долази до побуђивања, при чему се молекула ослобађа дела енергије кроз вибрационо и ротационо кретање, а светлост мање енергије емитује. Молекули из узорка са способношћу флуоресценције након апсорпције упадног зрачења из *UV-Vis* дела спектра добија одређену енергију, па прелази из основног у побуђено електронско стање. Приликом враћања у основно електронско стање молекула предаје постепено енергију у међусобним сударима са околином и емитује енергију у виду фотона. Током секвенце екситације/емисије могу се мерити и апсорбована и емитована светлост, при чему већи интензитет емисије одговара вишој концентрацији анализата. Главна предност ове методе је велика осетљивост и селективност, брзина, али и то што је недеструктивна и лака за извођење. Такође, модерни спектрофлуориметри могу да снимају 3D спектре односно екситационо-емисионе матрице (ЕЕМ), које се могу користити за квантификацију фенолних једињења поређењем са референтним подацима. Сваки узорак који се снима посматра се као матрица, сваки ред у матрици података садржи податке за један узорак и свака колона одговара специфичној комбинацији таласне дужине побуде и емисије (Christensen et al., 2006).

Статистичке мултиваријантне методе могу се користити да би се олакшала интерпретација података када је потребно анализирати велики број променљивих. Мултиваријантна метода анализе главних компоненти (*PCA*) се примењује да би се смањио

број димензија оригиналних система података (Boggia et al., 2013; Flores et al., 2015; Fraige et al., 2014; Liu et al., 2010).

Детаљи о свакој коришћеној методи у овој докторској дисертацији описани су у одељку „материјал и методе“.

Комбиновање савремених аналитичких метода у овој докторској дисертацији представља напредни приступ истраживању који има за циљ детаљну анализу антиоксидативних компоненти у плодовима различитих сорти јагоде. У савременој литератури до сада нису на овај начин обједињени физичкохемијски параметри у циљу праћења метаболичко-структуралних промена плода јагоде након бербе. Потенцијална контрола наведених механизма може допринети узгоју квалитетнијих и економски исплативијих сорти јагоде, чиме се прати стратегија научног и технолошког развоја Републике Србије са циљем промовисања функционалне хране, посебно са аспекта њене производње и конзумације.

2.2 ОКСИДАТИВНИ СТРЕС И АНТИОКСИДАТИВНИ ПОТЕНЦИЈАЛ ПЛОДОВА ЈАГОДЕ

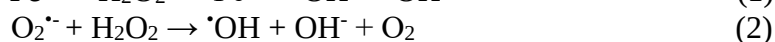
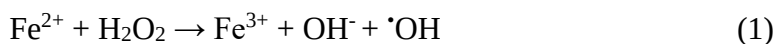
Sies је још 1985. године први употребио термин оксидативни стрес да објасни неравнотежу између прооксидантних молекула (слободних радикала) и антиоксиданаса (Sies, 1985). У структури атома и молекула електрони су обично удружени у парове, сваки пар се креће унутар дефинисаног простора (атомска или молекулска орбитала). Електрони у сваком пару имају супротне спинове (Halliwell, 2003). Слободни радикали су нестабилни атоми, атомске групе или молекули који имају најмање један неспарен електрон, због кога су високо реактивни, а њихова активност доводи до нежељених каскадних хемијских процеса (Halliwell, 2003; Sies, 1985). Најједноставнији слободни радикал је атом водоника (са једним протоном и једним електроном), али су у биолошким системима најчешће присутни радикали који садрже кисеоник, азот, сумпор и хлор (Halliwell, 2003). У литератури се термин „слободни радикал“ користи за опис како реактивних кисеоничних и азотних врста, тако и за сродне реактивне врсте које доводе до формирања слободних радикала или за врсте које настају као резултат слободно-радикалских реакција. Време полуживота ових краткоживећих врста се мери мили, микро или наносекундама (Devasagayam et al., 2004).

Најчешћи слободни радикали са неспареним електроном на кисеонику су хидроксилни радикал ($\cdot\text{OH}$) и супероксид-анјон радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Термин реактивне врсте кисеоника се користи и за неке нерадикалске деривате кисеоника као што су водоник-пероксид (H_2O_2), синглетни кисеоник ($^1\text{O}_2$) и хипохлораста киселина (HOCl). Они нису слободни радикали, али пријављено је да стварају слободне радикале кроз различите хемијске реакције у многим случајевима (Gilgun-Sherki et al., 2001). Од свих поменутих, хидроксилни радикал је најреактивнији, али пошто има кратко време полуживота, његово је дејство углавном у непосредној близини његовог настанка (Sakihama et al., 2002). Може довести до липидне пероксидације, узроковати прекид у структури ДНК и оксидовати сваки органски молекул са којим дође у контакт.

Реактивне азотне врсте (RNS) такође представљају збирни појам који подразумева радикале као што су: азот-моноксид ($\cdot\text{NO}$), пероксинитрит ($\text{ONOOO}^{\cdot-}$), нитроксил (HNO), нитрозонијум катјон (NO^+), S-нитрозотиоли (RSNO , R је угљоводонични остатак) и виши оксиди азота. Ови радикали се често сврставају и у реактивне кисеоничне и у реактивне азотне врсте.

Слободни радикали имају веома важну улогу у настанку живота и биолошкој еволуцији, имају улогу у успостављању или одржавању хомеостазе на ћелијском нивоу и као сигнални молекули (McCord, 2000). Константно се стварају у људском телу при нормалним метаболичким процесима. У митохондријама, у тзв. електронском транспортом ланцу, одвија се редукција кисеоника до воде, посредством ензима цитохром оксидазе и неопходна је у

процесу комуникације између ћелијских органела и транскрипције гена (Krzyminiewski et al., 2009; McCord, 2000; Poulsen et al., 1998). Међутим, мали проценат кисеоника бива искоришћен за формирање реактивних кисеоничних врста (Halliwell et al., 2015). Први радикал који настаје у овом трансферу електрона на молекулски кисеоник је супероксид-анјон, који даље може да формира водоник-пероксид, хидроксилни радикал и синглетни кисеоник. У реакцији ензима супероксид дисмутазе и супероксид-анјона настаје водоник-пероксид, који је најмање реактивна кисеонична врста, стабилан на физиолошким *pH* вредностима, у одсуству јона метала. Водоник-пероксид лако дифундује кроз биолошке мембране, али у Фентоновој (1) и Хабер-Вајсовој (2) реакцији може да формира хидроксилни радикал (Sies et al., 2017):



Супероксидни-анјон радикал у реакцији са азот-моноксидом формира пероксинитрит (ONOO^-), који у реакцији са H^+ такође може да произведе хидроксилни радикал и азот-диоксид ($\cdot\text{NO}_2$):



Пероксинитрит изазива оштећење ткива (цитотоксичност), а формира се углавном на местима захваћеним инфламацијом. Може да учествује у развоју неких дегенеративних болести, али и да оштети нуклеинске базе у ДНК ланцу. Веома лако дифундује кроз ћелијске мембране (Sies et al., 2017).

Азот-моноксид ($\cdot\text{NO}$) настаје у ткивима под дејством азот-оксид синтазе. Има улогу сигналног молекула у организму, посебно на кардиоваскуларном нивоу. Међутим, проблем настаје при патолошким стањима када је ниво азот-оксида повећан и тада постаје високо реактиван. Може да оштећује околно ткиво или да формира већ поменути цитотоксични пероксинитрит (Martínez and Andriantsitohaina, 2009).

Осим при оптималним метаболичким условима, слободни радикали могу настати и под утицајем различитих егзогених и ендогених фактора. Зрачења високе енергије, атмосферско загађење, употреба лекова, изложеност хемикалијама у домаћинству и индустрији су само неки од спољашњих фактора који могу утицати на стварање ових реактивних врста (Halliwell, 2003; Krzyminiewski et al., 2009). Ендогени фактори могу бити нпр. мобилизација кисеоника у циљу елиминације патогена или у сврху ћелијске сигнализације, али и ензимске реакције оксидације супстрата (Davies, 2016).

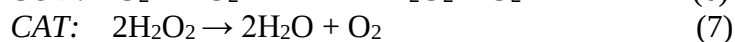
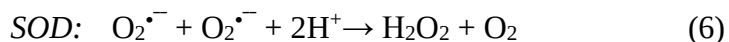
Производња слободних радикала у биљкама вероватно има кључну улогу у процесима прилагођавања ћелијског зида и омогућава раст биљака (Su et al., 2024).

Живи организми поседују механизме за борбу против слободних радикала, али у оптималним условима они не представљају претњу за његово функционисање. Прекомерно стварање слободних радикала нарушава равнотежу између њиховог стварања и елиминације. Тада слободни радикали узрокују структурне и функционалне модификације макромолекула (ДНК, протеина и липида). Овакво стање нарушене равнотеже се назива оксидативни стрес (Gilgun-Sherki et al., 2001; Pham-Huy et al., 2008) који доводи до многих хроничних болести као што су атеросклероза, кардиоваскуларне болести, инфаркт миокарда, канцер, дијабетес, реуматoidни артритис, хронична инфламација, мождани удар и септички шок, старење и друге дегенеративне болести код људи (Fang et al., 2002; Fridovich, 1999).

Антиоксиданси су супстанце са способношћу да се, и у ниској концентрацији у односу на супстрат, супротставе штетним ефектима прооксиданаса. (Halliwell et al., 2015). Због њихове често недовољне производње у организму, углавном морају да буду допуњене спољним изворима што показује колико је битна превенција путем хране или суплемената у борби против оксидативног стреса (Yu, 1994). Антиоксиданси превентивно заустављају

прооксидансе или смањују њихово формирање, регулишући њихов ниво, али и поправљају штету коју су прооксиданси нанели (Devasagayam et al., 2004).

Антиоксидативни систем одбране се грубо може поделити на ензимски и неензимски. Ензимски обухвата ензиме као што су пероксидазе, глутатион пероксидазе, каталазе и супероксид дисмутаза. Прва три елиминишу водоник-пероксид из организма, чиме се спречава даље формирање хидроксилног радикала против кога нема директне ензимске заштите (Yu, 1994). Супероксид дисмутаза (*SOD*) и каталаза (*CAT*) спадају у најефикасније антиоксидативне ензиме и њиховим комбинованим деловањем се $\bullet\text{O}_2^-$ и H_2O_2 преводе у H_2O и O_2 :



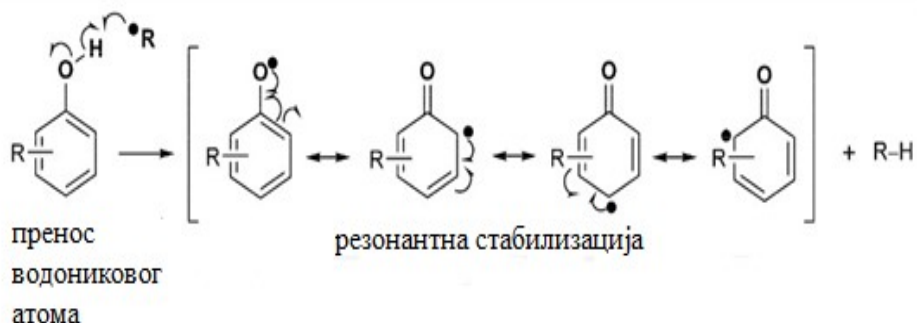
Неензимски систем одбране обухвата примарне и секундарне метаболите које биљке саме производе, а људи их исхраном уносе у организам. Најпознатији такви антиоксиданси су аскорбинска киселина, токоферол, полифенолна једињења и други (Paciolla et al., 2019).

Треба напоменути да антиоксиданси спречавају оксидативни стрес тако што контролишу ниво слободних радикала, а не елиминишу их. Њихова потпуна елиминација довела би до поремећаја у нормалном функционисању организма због већ поменутих значајних физиолошких функција (Vollaard et al., 2005). Различита ефикасност међу антиоксидансима може се објаснити разликама у њиховим хемијским структурама (Tirzitis and Bartosz, 2010).

Постоји много научних радова о методама које се користе за одређивање антиоксидативне активности природних производа и додатака исхрани (Dávalos et al., 2003; Milosavljević et al., 2022, 2020). Једна од најчешћих је помоћу 2,2'-азинобис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонске киселине) (*ABTS*) (Dragišić Maksimović et al., 2015; Milosavljević et al., 2020). Ово једињење у реакцији са јаким оксидационим средствима даје *ABTS*^{•+} радикал који даје растворима плаво-зелену боју, па се може детектовати *UV-Vis* спектроскопијом, али и *EPR* спектроскопијом. Друга, такође честа метода одређивања антиоксидативног потенцијала у узорцима хране је уз коришћење 1,1-дифенил-2-пикрилхидразила (*DPPH*), који је стабилни органски радикал, па се може употребити за одређивање *EPR* спектроскопијом, али и *UV-Vis* спектроскопијом, јер раствор *DPPH* након прихватања атома водоника од донора губи карактеристичну тамнољубичасту боју (Nakarada et al., 2021; Shalaby and Shanab, 2013).

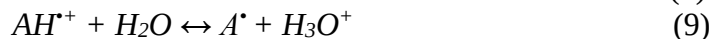
У данашње време је свест потрошача о утицају уноса воћа на опште здравље у сталном порасту. Стога је конзумација јагодастог воћа, посебно јагода, које представљају 40% од укупне потрошње јагодастог воћа у свету (S. H. Häkkinen et al., 1999), показана као добар дијететски извор у људској исхрани због својих корисних здравствених својстава (Cosme et al., 2022), а истовремено веома популарна међу потрошачима због јединствене комбинације атрактивног изгледа, изузетног укуса и повољне хранљиве вредности (Enomoto et al., 2018). Једна чинија свежих јагода у тежини од 165 грама има само 53 килокалорија и садржи чак 160% дневних потреба за витамином Ц (Albregts and Howard, 1980). Баштенска јагода (*Fragaria x ananassa* Duch.) је добар извор минерала и есенцијалних витамина (Giampieri et al., 2013), као и фенолних једињења који су значајне активне биолошке компоненте (Aaby et al., 2012). Феноли се истичу широким спектром бенефита за биљку, али и друге организме. Доказано је да имају заштитну функцију за биљку тако што спречавају инфекцију ткива бактеријама, гљивицама и вирусима (функција фитоалексина), штите од превелике дозе ултраљубичастог зрачења, прекомерне транспирације или неког другог неповољног фактора животне средине (Mitra, 2020). Овај широки спектар функција секундарних метаболита са фенолном структуром је директни резултат значајне метаболичке реактивности фенолне групе (Evans, 2009). Сматра се да фенолна једињења најбоље испољавају своју заштитну антиоксидативну улогу директном неутрализацијом слободних радикала. Таква реакција

укључује два могућа механизма: механизам преноса атома водоника (*hydrogen atom transfer – HAT*) и механизам преноса једног електрона (*single-electron transfer – SET*). У првом случају, преносом водониковог атома, сам молекул фенола постаје слободни радикал (слика 1.). Стабилност и даља реактивност тако насталих радикала директно зависи од структуре самог



Слика 1. Формирање и резонантна стабилизација фенокси радикала.
Преузето и прилагођено из (Kostić et al. 2023)

молекула, односно могућности формирања интрамолекуларних водоничних веза и електронске делокализације. *SET* механизам описује случајеве у којима антиоксиданс делује као донор електрона, преносећи га на реактивну хемијску врсту, чиме се та врста редукује и губи свој потенцијал да делује као радикал. Фенолно једињење (*AH*) као антиоксиданс преноси један електрон на слободни радикал (*R•*). Радикал-катјонско антиоксидативно једињење (*AH^{•+}*) које настаје се затим депротонује кроз интеракцију са водом. Резултат *SET* реакције је исти као код *HAT* у смислу уклањања радикала, али вероватно настаје антиоксидативни радикал са дужим животним веком *AH^{•+}*, као и делокализованим и распоређеним електроном на ароматичном прстену (Craft et al., 2012).



Такође, сматра се да феноли делују и као секундарни антиоксиданси због своје способности да се вежу за потенцијално прооксидативне јоне метала (Rice-Evans et al., 1996).

Садржај фенолних компоненти у плодовима јагоде може да варира у зависности од сорте, еколошких услова локалитета, фазе зрелости плода, пољопривредне праксе и услова складиштења (Di Vittori et al., 2018; Krüger et al., 2012; Tomić et al., 2021). Постоји много студија које испитују антиоксидативна својства плодова јагоде указујући да су за то одговорна полифенолна једињења којима су богати (Guo et al., 2003; Meyers et al., 2003; Sun et al., 2002; Wang et al., 1996). Најзначајнији удео у антиоксидативном капацитету потиче од флавоноида, класе једињења која су подељена у неколико подгрупа: флаволи, флавоноли, флаванони, флаванолни, флаванолни или катехини, антоцијанини и халкони (Panche et al., 2016). Најзаступљенији су антоцијанини који су одговорни за боју плода јагоде (Romeyer et al., 1983), а поред тога имају и јака антиоксидативна својства (Wang et al., 1997). Најзаступљенији антоцијанин у плоду јагоде је пеларгонидин-3-*O*-глукозид (Hong and Wrolstad, 1990; Mazza, 2017; Milosavljević et al., 2020). Флавоноли штите воће од штетног *UV* зрачења и патогена (Shirley, 1996). Поред улоге у биохемијским сигналним путевима њихово антиоксидативно дејство је важно за велики број физиолошких и патолошких процеса. Флаван-3-оли или „флаванолни“ представљају подгрупу флавоноида којих има у изобиљу у спољашњим ткивима воћа, а моћни су антиоксиданси (Nile and Park, 2014). Главни флаван-3-ол у јагодама је катехин, али и флавоноли попут деривата кверцетина и кампферола (Fernandes et al., 2012; Milosavljević et al., 2020). За ове две подгрупе се показало да имају антиоксидативна и антиканцерогена својства (Bors and Saran, 1987; Das, 1994; Wang et al., 1996).

Деривати хидроксицинамичне киселине (са кумароил глукозом) имају битну улогу у тамњењу плода током сазревања (Romeyer et al., 1983). У заштити од оксидативног оштећења учествују и различити ензими који припадају оксидазама. Њихова повећана активност у свежим јагодама може изазвати губитак боје и текстуре и стварање смеђих пигмената, што значајно утиче на смањење квалитета плода (Chisari et al., 2007; Romeyer et al., 1983).

Пероксидазе (*POD*, *EC* 1.11.1.7) као поткласа оксидоредуктаза, катализују оксидацију различитих секундарних метаболита користећи реактивне врсте кисеоника преко три основна циклуса: 1) у пероксидативном циклусу као резултат оксидације настаје феноксил радикал, 2) у оксидативном циклусу производи се водоник-пероксид (H_2O_2), 3) у хидроксилном циклусу настаје веома реактивни хидроксилни радикал ($\cdot OH$) (Chen and Schopfer, 1999). Стога су ови ензими укључени у широк спектар физиолошких процеса који су тесно повезани са секундарним метаболизмом (лигнификација, суберинизација, антиоксидативне реакције). Са друге стране, ензими полифенол оксидазе (*PPO*, *EC* 1.14.18.1) катализују реакције оксидације *o*-дифенола до *o*-дихинона, структура карактеристичних за више типова секундарних метаболита. Оба поменута ензима су одговорна за тзв. „ензимско тамњење“ плодова које доводи до брзе деградације нутритивних и структурних компонената, што драстично скраћује рок трајања и прихватљивост од стране потрошача (Chen and Schopfer, 1999; Wesche-Ebeling and Montgomery, 1990).

Nakala и сарадници су квантификовали високе концентрације аскорбинске киселине, калијума, магнезијума, гвожђа, цинка и калцијума у плоду јагоде (Nakala et al., 2003). Аскорбинска киселина (витамин Ц) има много улога, између осталог може деловати и као редуционо средство, повећавајући ефекте оксидаза редуковањем σ -хинона у σ -дифеноле (Bors and Saran, 1987), што указује да делује и као антиоксиданс спречавајући оштећења хелијских структура изазваних слободним радикалима (Das, 1994).

2.3 ПОДЕЛА И ЗНАЧАЈ ПОЛИФЕНОЛА

Полифеноли су највећа и најчешће истраживана група метаболита у биљном ткиву која обухвата више од 8000 молекула (González-Sarrías et al., 2020). Сви они имају заједнички биосинтетски пут (шикиматни/фенилпропаноидни пут) (Sharma et al., 2019a), али већина мономерних облика фенолних једињења нису крајњи производи фенолног метаболизма већ учествују у формирању сложенијих олигомерних и полимерних структура. Ова једињења спадају у секундарне метаболите биљака, а с обзиром на велику разноврсност биљних фенола, њихова класификација је веома комплексна. Као велика група разноврсних молекула фенолна једињења имају једну заједничку карактеристику, а то је присуство једног (прости феноли) или више (полифеноли) хидроксилних супституената, везаних директно за један или више ароматичних или бензенових прстенова (Šamec et al., 2021). Према дужини угљениковог ланца, основна подела дата је у табели 1 (Robards et al., 1999). Полифеноли се могу класификовати као флавоноиди или не-флавоноиди у зависности од броја фенолних јединица унутар њихове молекуларне структуре, супституентских група и веза између фенолних јединица (Oluwole et al., 2022). У биљкама фенолна једињења могу бити присутна као слободни облици, али се чешће налазе у коњугованим облицима са једним или више остатака шећера повезаних β -гликозидним везама са хидроксилном групом (*O*-гликозиди) или са атомом угљеника из ароматичног прстена (*C*-гликозиди). Везани шећери могу бити моносахариди, дисахариди или пак олигосахариди (Tomás-Barberán et al., 2020).

Табела 1. Подела фенолних једињења према дужини угљениковог ланца. Преузето и прилагођено из (Robards et al., 1999)

Основни скелет	Класа	Пример
C6	Једноставни феноли Бензохинони	Катехол, хидрохинон, резорцинол
C6-C1	Фенолне киселине	<i>p</i> -Хидроксибензоева, салицилна киселина
C6-C2	Фенилсирћетне киселине	<i>p</i> -Хидроксифенилсирћетна киселина
C6-C3	Фенилпропени	Еугенол, миристицин
	Кумарини	Умбелиферон, ескулетин, скополин
	Хромони	Еугенин
C6-C4	Нафтохинони	Југлон
C6-C1-C6	Ксантони	Мангостин, мангиферин
C6-C2-C6	Стилбени	Ресвератрол
	Антрахинони	Емодин, хризофанол, реин
C6-C3-C6	Флавоноиди Флаволи	Синенсетин, нобилетин Изосиненситин, тангеретин, диосмин
	Флавоноли	Кверцетин, кампферол
	Флавонол гликозиди	Рутин
	Флаваноли	Дихидроксикверцетин и дихидроксикампферол гликозиди
	Флаванони	Хесперидин, наригенин
	Флаванон гликозиди	Неохесперидин, нарирутин, наригин, ериоцитрин
	Антоцијанини	Гликозиди пеларгонидина, пеонидина, делфинидина, петунидина, цијанидина
	Флаваноли (катехини)	(+)-катехин, (-)-епикатехин, (+)-галокатехин, (-)-епигалокатехин
	Халкони	Флорицин, арбутин, халконаригенин
(C6-C3)₂	Лигнини	Пинорезинол
(C6-C3-C6)₂	Бифлаоноиди	Агатисфлавои

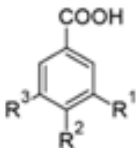
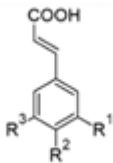
Полифенолна једињења се често сматрају групом молекула са израженом биолошком активношћу, па се у биолошким студијама углавном мери укупан садржај полифенола као маркер биолошке активности. Међутим, структура полифенола значајно утиче на њихову активност, па самим тим и на улогу у биолошким процесима, чиме је регулисано њихово учешће у одговорима биљака на стрес.

2.3.1 Фенолне киселине

Карбоксилна група везана за бензенов прстен је главна карактеристика свих фенолних киселина. Ретко се налазе у слободном облику и често су повезани етарским, ацетатним или естарским везама са структурним компонентама биљне ћелије (целулоза, протеини, лигнин), другим мањим органским молекулима (као нпр. глукоза или винска киселина), али и другим већим полифенолима (флавоноиди) или терпенима (Andreasen et al., 2000; Lam et al., 2001). У зависности од структуре, фенолне киселине се могу поделити у две класе: деривати бензоеве

киселине (хидроксibenзоева киселина, C6–C1 структура) и деривати циметне киселине (хидроксицинамична киселина, C6–C3 структура) (табела 2) (Goleniowski et al., 2013).

Табела 2. Структура најчешћих фенолних киселина. Преузето и прилагођено (Šamec et al., 2021)

 Хидроксibenзоева				 Хидроксицинамична			
	R^1	R^2	R^3		R^1	R^2	R^3
Бензоева	H	H	H	Цинамична	H	H	H
Гална	OH	OH	OH	Кафеинска	OH	OH	H
Протокатехин	OH	OH	H	<i>p</i> -кумаринска	H	OH	H
<i>p</i> -хидроксibenзоева	H	OH	H	Ферулинска	OCH ₃	OH	H
Ванилинска	OCH ₃	OH	H	Синапинска	OCH ₃	OH	OCH ₃

Хидроксibenзоеве киселине (*HBA*) су деривати бензоеве киселине као што је *p* – хидроксibenзоева од које даље могу настати салицилна, гална, ванилинска и различите варијације дихидробензоеве киселине (*2,3-DHBA*; *2,5-DHBA*; *3,4-DHBA*; *3,5-DHBA*). Варијације у структурама *HBA* су резултат хидроксилација и метилација ароматичног прстена у њиховој структури (Macheix et al., 1990). Неке једноставније *HBA* се могу формирати од интермедијера у раној фази шикиматног пута, укључујући и галну киселину, која је изведена из дехидрошикиматне киселине. Механизми и сви ензими који су укључени у биосинтезу *HBA* и њихових деривата још увек нису у потпуности познати (Goleniowski et al., 2013).

Хидроксицинамичне киселине (*HCA*) подразумевају *p*–кумаринску, кафеинску, ферулинску и синапинску киселину и њихове естерификоване/етерификоване коњуigate (нпр. хлорогенску киселину). Коњуиговани облици *HCA* су естри хидроксилних киселина, као што су хининска, шикиминска и винска киселина, као и њихови деривати шећера (Naczk, 2003).

Формирање кафеинске, ферулинске, 5-хидроксиферулинске и синапинске киселине (из *p*-кумаринске киселине) захтева хидроксилацију и метилацију. Додавање друге хидроксилне групе на *p*-кумаринску киселину катализују ензими монофенол моно-оксигеназе (Lattanzio, 2013; Naczk, 2003). Метилација кафеинске киселине доводи до стварања ферулинске киселине која је заједно са *p*-кумаринском прекурсор лигнина (Goleniowski et al., 2013). Лигнин је важан природни полимер који штити биљке од стреса изазваног спољашњим утицајима (Zhou et al., 2018). С обзиром да јагоде спадају у биљке са лигнификованим органима, улога фенолног метаболизма у одговору на стрес је од изузетне важности (Dragišić Maksimović et al., 2013).

Фенолне киселине пореклом из биљака су моћни антиоксиданси који могу посредовати у уклањању штетних реактивних врста кисеоника, а у биљкама се могу стварати и под утицајем различитих абиотичких стресора (температура, наночестице, пестициди) (Bistgani et al., 2019; Chen et al., 2019). Активација биљног антиоксидативног система настаје као резултат стимулације биосинтетског пута фенилпропаноида, узрокујући синтезу фенолних киселина (Al-Ghamdi and Elansary, 2018; Bistgani et al., 2019) као што су кафеинска, цинамилмалинска, гална, ферулинска и ванилинска киселина (Ben-Abdallah et al., 2019; Bistgani et al., 2019). Акумулација ендогених фенолних киселина, као механизам толеранције биљака на абиотски стрес, забележена је код многих биљних врста, укључујући и воће (Mahdavi et al., 2015; Sharma et al., 2019b, 2016; Wang et al., 2019).

Антиоксидативни капацитет фенолних киселина и њихових деривата је углавном повезана са бројем хидроксилних група. Изомери монохидроксibenзоеве киселине *p*- и *σ*-*HBA*

показују позитивно наелектрисање на својој карбоксилној групи, док код мета изомера овог наелектрисања нема, што резултира много лакшом оксидацијом *m*-HBA.

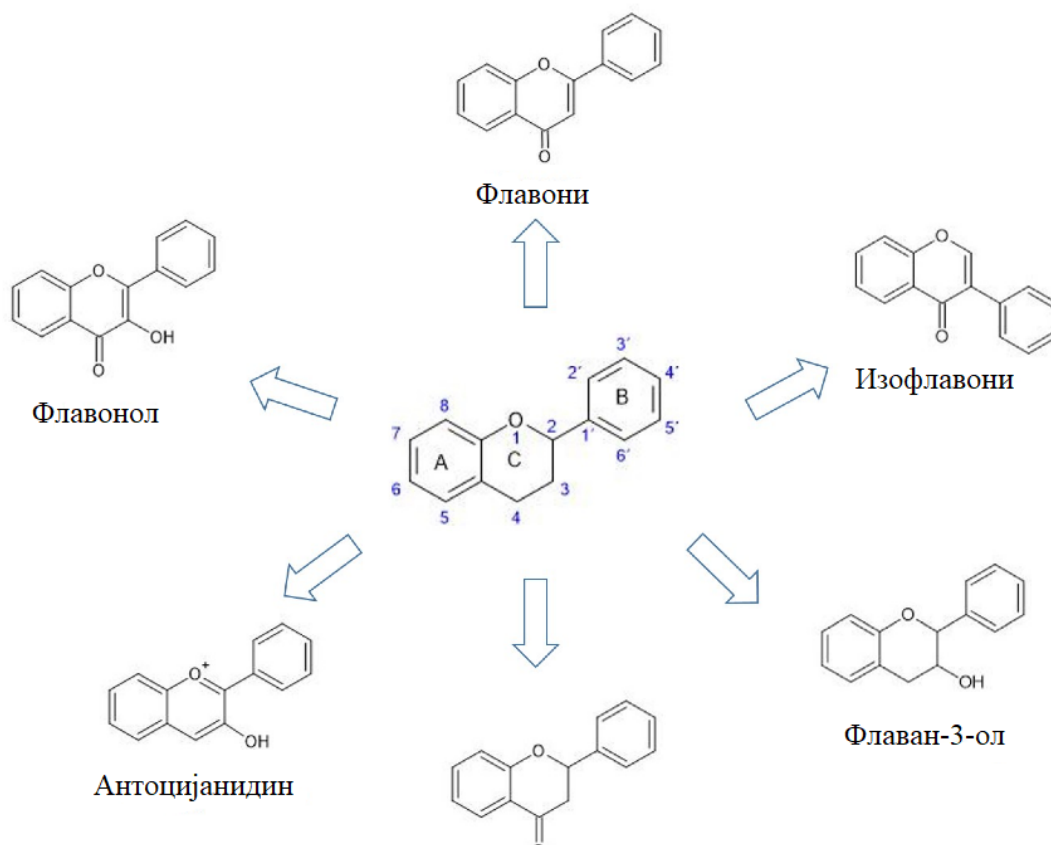
Биолошке активности елагинске киселине се истражују од касних 1990-их. Примећено је да је ова киселина вишеструки функционални антиоксиданс (Ríos et al., 2018). Хидроксилне групе и лактонске структуре у елагинској киселини су богате водоничним везама и могу деловати као акцептори електрона и донори водоника са способношћу да прихвате електроне са различитих супстрата. Стога, елагинска киселина може да делује као примарни антиоксиданс (директним уклањањем слободних радикала) и као секундарни антиоксиданс (индиректним путем, нпр. хелацијом метала, разградњом водоник-пероксида и деактивацијом синглетног кисеоника) (Ríos et al., 2018).

Елагинска киселина, заједно са галном киселином, је супституент полифенолних биомолекула који се називају хидролизабилни танини (Buzzini et al., 2008). Ова једињења хидролизују слабе киселине и могу се поделити на елагитанине и галотанине, који дају елагинску и галну киселину и одговарајуће шећере након хидролизе (Smeriglio et al., 2017). Ова једињења штите биљке од патогена, штетних инсеката и других биљоједа (Buzzini et al., 2008), али синтетишу се у биљкама и као одговор на утицај суше, UV-B зрачења и атмосферског загађења (Furlan et al., 2011). Ове ефекте остварују тако што се танини везују за протеине, делују као антиоксиданси или прооксиданси и хелирају гвожђе и друге метале (Peter Constabel et al., 2014).

Танини садрже σ -дихидроксил супституијске групе и могу хелирати метале и помоћи у заштити биљака од токсичности тешких метала, а поседују и алелопатски ефекат (позитивно утичу на раст, развој и размножавање других организама) (Peter Constabel et al., 2014).

2.3.2 Флавоноиди

Флавоноиди су најчешће проучавана група полифенола и до сада је откривено више од 6000 ових једињења са различитим структурама (Panche et al., 2016). Флавоноиди су једна од



Слика 2. Структура флавоноида. Преузето и прилагођено (Šamec et al., 2021)

најкарактеристичнијих класа фенолних једињења широко распрострањених у биљном царству. Разликују се по централном хетероцикличном пиранском прстену (C прстен), који чине срце флаванске структуре (слика 2) и подељени су у различите подкласе у зависности од тога за који угљеник C прстена је везан B прстен, као и од статуса засићења и оксидације C прстена.

Флавоноиди у којима је B прстен на позицији 3 C прстена називају се изофлавоноиди, док се они у којима је B прстен везан на позицији 2 могу даље поделити на основу структурних карактеристика C прстена у неколико подгрупа: флавоноли, флавоноли, флаванони, флаванони, флаванони (флаван-3-оли) или катехини, антоцијанидини и халкони.

Флавоноиди могу бити присутни у биљкама у слободном облику, али су чешће деривати који се синтетишу у процесима гликозидације, пренилације, ацетилације, метилације и полимеризације, што дефинише и њихову биоактивност (Wen et al., 2017). Основна структура флавоноида је агликон, али се јављају и као гликозиди, и то најчешће као O-гликозиди, а ређе као C-гликозиди (Rauter et al., 2008), па се гликозидна веза обично налази на позицијама 3 или 7 (Kumar and Pandey, 2013). Модификацијом може се додати олигосахаридна или чак полисахаридна група. Гликозидација побољшава растворљивост, биодистрибуцију и метаболизам омогућавајући лакши пролаз флавоноида кроз ћелијске мембране (Kytidou et al., 2020).

Количина, структура, положај и укупан удео шећера у флавоноидима играју важну улогу у дефинисању њихове антиоксидативне активности. С једне стране, агликон су снажнији антиоксиданси од одговарајућих гликозида, али са друге стране, све већи степен полимеризације повећава антиоксидативну ефикасност процијанидина. Дакле, димери и тримери процијанидина су ефикаснији антиоксиданси од мономерних флавоноида, док је активност тетрамера (тј. олигомера) била око четири пута већа од активности претходних фракција (Vennat et al., 1994). Као што су већ истраживачи утврдили, већина слободних флавонола су ефикасни антиоксиданси и у воденој и у липидној фази, али повећање броја хидроксилних група на B прстену има тенденцију повећања антиоксидативне активности (Williamson et al., 1999).

2.3.3 Флаван-3-оли

Флаван-3-оли имају хидроксилну групу везану за C3 атом основне флаван структуре (не садржи кето групу у C прстену). Настају од флаванона помоћу дихидрофлавонол-4-редуктазе, која врши редукцију атома C4 у пиранском прстену. Овој подгрупи припадају катехин, епикатехин и њихови гликозиди. Имају способност регулације антиоксидативних ензима и уклањање слободних радикала па су познате као добри антиоксиданси (Babu and Liu, n.d.). Биолошка улога флаван-3-ола је да штите биљку од микроба, гљива, инсеката и биљоједа (Aron and Kennedy, 2008). Катехин садржи већи број хидроксилних група него што је то код гликозилованих флавонола, што указује да је хидроксилација итекако важна за антиоксидативни одговор. Повећање антиоксидативне активности је уочено код димера и тримера (епо)-катехина, док је тетрамер показао смањену антиоксидативну активност.

2.3.4 Флавоноли

Флавоноли су једињења која се синтетишу из флавононола помоћу флавонол синтазе, која катализује оксидацију C2 и C3 атома. Такође, имају оксидовани C4 атом (кетонска група), хидроксилну групу везану за C3 атом и двоструку везу између C2 и C3 атома. Најчешће проучавана једињења која припадају овој подгрупи су кверцетин, кампферол и мирицетин.

Кверцетин и кампферол се разликују међу собом само по степену хидроксилације на B прстену, па је тако кверцетин дихидроксид, а кампферол је монохидроксид. Примећено је да што је већи ниво хидроксилације већа је и антиоксидативна активност самог једињења (Agati et al., 201

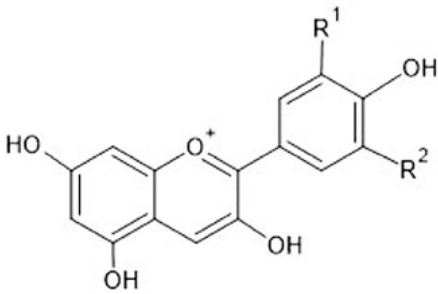
Arphalo, 1997), те њихов садржај дефинише и степен отпорности биљке на различите врсте стресора из спољашње средине (*UV* зрачење, температуру и сл.).

2.3.5 Антоцијанини

Антоцијанини су гликозилована полифенолна једињења која представљају подгрупу флавоноида, а и највећу групу пигмената у биљном царству (Guo et al., 2008; Liu et al., 2018). То су вакуоларни пигменти растворљиви у води који се јављају у готово свим ткивима виших биљака, углавном у црвеној, љубичастој или плавој боји, у зависности од *pH* вредности.

Антоцијанини су настали спајањем шећера са молекулом антоцијанидина (агликонске структуре). Шећери који се најчешће везују за антоцијанидине су глюкоза, галактоза, рамноза, арабиноза, ксилоза и глукуронска киселина, и то као 3-гликозиди и 3,5-дигликозиди. Ређе се јављају 3-дигликозиди и 3-дигликозиди-5-моногликозиди (Celli et al., 2019).

Генерално, структура антоцијанина састоји се од три главна дела (бензил прстенова *A* и *B*, *C*-6 и једног хетероцикличног бензопиранског *C* прстена) и три *R* групе (*-H*, *-OH*, *-OCH₃*) (Pervaiz et al., 2017). До сад је идентификовано више од 600 различитих антоцијанина, а подељени су у шест категорија (слика 3.), и то према положају хидроксилних и метоксил група на језгру флавана (пеларгонидин, цијанидин, делфинидин, пеонидин, петунидин и малвидин) (Smeriglio et al., 2016; Tahara, 2007).

	Антоцијанидин	R¹	R²
	Пеларгонидин	H	H
	Цијанидин	OH	H
	Пеонидин	OCH ₃	H
	Делфинидин	OH	OH
	Петунидин	OCH ₃	OH
	Малвидин	OCH ₃	OCH ₃

Слика 3. Структура доминантних антоцијанидина. Преузето и прилагођено (Šamec et al., 2021)

За структурну разноликост антоцијанина одговорна су два ензима: флавоноид-3'-хидроксилаза и флавоноид-3',5'-хидроксилаза које врше хидроксилацију дихидрокампферола до дихидрокверцетина (Liu et al., 2018). Овако настали дихидрофлавонол даље се редукује уз помоћ дихидрофлавонол-4-редуктазе у безбојне леукоантоцијанидине (леукоцијанидин, леукопеларгонидин и леукоделфинидин). Затим, антоцијанидин синтаза катализује синтезу обојених антоцијанидина. За даље везивање шећера или ацил група за антоцијанидине одговорни су ензими из група глюкозилтрансфераза (флавоноид-3-*O*-глюкозилтрансфераза) и ацилтрансфераза (Liu et al., 2018).

Антоцијанини имају улогу у развоју биљака и отпорности биљака на биотички (напад патогена) и абиотички стрес (суша, *UV* зрачење, недостатак хранљивих материја) (Liu et al., 2018). Студије су показале да имају важну улогу у абиотичком стресу (Costa-Broseta et al., 2018; Dong et al., 2019; Shen et al., 2019), због свог антиоксидативног дејства, јер су фотопротектори, али и учествују у хелијској сигнализацији (Kovnich et al., 2015; Van Den Ende and El-Esawe, 2014). Уочено је да антоцијанини имају капацитет уклањања *ROS*-а до четири пута јачи од аналога витамина Е и Ц, због њихове високе реактивности као донора протона и електрона, способности да стабилизују и делокализују неспарене електроне и способности да хелирају јоне прелазних метала (Osorio et al., 2011).

Молекул антоцијанина има велику реактивност, електропозитиван је тј. дефицитаран у електронима па подлеже деловању нуклеофилних једињења. Антоцијанини подлежу

електрохемијској оксидацији. Кисеоник у хетероцикличном прстену антоцијанина има позитивно наелектрисање, па се зато у киселој средини понашају као катјони који граде соли са киселинама, док су у алкалној средини анјони који граде соли са базама. Као што је већ речено сви антоцијанидини садрже 3,5,7-трихидрокси-флавилијум-јон. Боја антоцијанина и антоцијанидина је последица ексцитације молекула светлошћу видљивог дела спектра. Колико лако ће се молекул побудити зависи од покретљивости електрона у структури. Антоцијанини поседују много двоструких веза које се врло лако побуђују. На промену, односно тамњење боје утиче и пораст супституције молекула. На промену боје антоцијанина утичу и промена pH , стварање металних комплекса и копигментација. На стабилност антоцијанина могу утицати шећери који су везани гликозидним везама и/или киселине које ацилују шећер, већ споменути pH , температура, светлост, присуство метала, кисеоника итд.

Антоцијанини су црвене боје у киселој средини, а плави у базној средини, док су на pH 4.5 безбојни. Ова особина антоцијанина искоришћења за њихово одређивање pH – диференцијалном методом.

Дакле, полифеноли су биоактивне супстанце које играју кључну улогу у одбрани биљака од стреса из спољашње средине.

2.4 ПРЕДМЕТ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Предмет истраживања ове докторске дисертације био је биохемијска и биофизичка карактеризација биоактивних компоненти у плодовима 25 одабраних једнородних и сталнорађајућих сорти јагоде (*Fragaria spp.*) применом различитих хроматографских и спектроскопских метода у циљу идентификације најперспективнијих сорти према садржају биоактивних једињења и изабраних нутритивних компоненти. Од укупно 25 испитиваних сорти јагоде, 12 су већ постале привредно значајне сорте ('Clery', 'Alba', 'Joly', 'Aprika', 'Asia', 'Sibilla', 'Roxana', 'Arosa', 'Rumba', 'Irma', 'Albion', 'Capri'). Преосталих 13 сорти ('Lycia', 'Vivaldi', 'Premy', 'Jeny', 'Garda', 'Laetitia', 'Quicky', 'Sandra', 'Lofty', 'Arianna', 'Tea', 'Nadja', 'Federica') су новије селекције створене у различитим оплемењивачким центрима, које се сматрају перспективним сортама и неке од њих се још увек налазе у фази тестирања.

Јагоде су богат извор великог броја хранљивих једињења попут шећера, витамина и минерала, као и биоактивних једињења секундарног метаболизма, попут флавоноида, антоцијанина и фенолних киселина. За квалитет плода од изузетне важности садржај и однос више класа примарних метаболита. Са друге стране, секундарни метаболити доприносе пре свега боји, али и укусу, мирису и горчини, и сматрају се водећим једињењима са антиоксидативним и/или другим здравствено корисним деловањем (Chen and Schopfer, 1999; Cordenunsi et al., 2002; Zhu et al., 2013). Стога је предмет ове докторске дисертације била квалитативна и квантитативна анализа примарних и секундарних метаболита у плоду јагоде методом течне хроматографије спрегнуте са масеном спектрометријом, док се профил секундарних метаболита додатно анализирао спектрофлуориметријом услед њихове способности аутофлуоресценције. Такође, полифенолна једињења имају изражену антиоксидативну активност, првенствено као резултат њихове способности да буду донори атома водоника и да уклањају слободне радикале (стабилне органске, ROS, RNS), али могу и да учествују у очувању ћелијске мембране у процесу липидне пероксидације (Dragišić Maksimović et al., 2017). Метаболизам слободнорадикалских реакција је изузетно важан у одређивању биоактивног потенцијала плода, а такође и у дефинисању рока трајања и могућности дуготрајног транспорта, као битних економских параметара. Истовремено, антирадикалска активност антиоксидативних ензима (пероксидаза и полифенол оксидаза) је изузетно важна за дефинисање квалитета плода јагоде. Пероксидазе, као подкласа оксидоредуктаза, катализују оксидацију различитих супстрата користећи реактивне врсте кисеоника. Укључене су у широк спектар физиолошких процеса који су тесно повезани са секундарним метаболизмом (лигнификација, суберинизација, антиоксидативне реакције) (Giampieri et al., 2012a). Са друге стране, ензими полифенол оксидазе катализују реакције оксидације *o*-дифенола до *o*-дихинона, структурама карактеристичним за више типова секундарних метаболита. Оба поменута ензима су одговорна за „ензиматско тамњење“ плодова које доводи до брзе деградације нутритивних и структурних компонената, што драстично скраћује рок трајања и прихватљивост од стране потрошача. Сходно томе је као битан елемент истраживања, укључено и спектрофотометријско одређивање специфичне активности пероксидаза и полифенол оксидаза, у циљу дефинисања ензимски контролисаних механизма који утичу на квалитет плода. Визуелизација њихових изоформи на гелу је изведена техником изоелектричног фокусирања, а посебна улога одређених изоформи је окарактерисана повезивањем са претходно публикованим подацима.

Јагода спада у значајне дијетарне врсте богате антоцијанинима одговорним за јарко црвену боју плода, али и за антиоксидативну функцију која произилази из њихове структуре. Са тим у вези је антирадикалска активност екстракта плодова јагоде, која је такође предмет биофизичких истраживања ове докторске дисертације и испитивана је *EPR* спектроскопијом, а резултати су повезани са спектрофотометријским есејима.

Коначно, с обзиром да је анализирано укупно 25 сорти јагоде, предмет рада дисертације је био и праћење и поређење физичких особина плода, као и сензорних и нутритивних параметара, како би се извршило рангирање сорти и дала потенцијална препорука

произвођачима за гајење оних сорти које се истичу по нутритивним и антиоксидативним својствима, што је од велике важности и за крајње потрошаче. Тиме резултати докторске дисертације добијају на применљивости ван оквира основних истраживања са циљем промовисања производње и конзумације здраве хране.

2.5 ЦИЉ ДИСЕРТАЦИЈЕ

У оквиру ове докторске дисертације дефинисана су три основна циља истраживања:

1) анализа биохемијског састава зрелих плодова различитих сорти јагоде и упоредна анализа антиоксидативних компоненти у плодовима: садржај укупних фенола и антоцијанина, укупне антиоксидативне активности, концентрација протеина, специфичне активности антиоксидативних ензима, квалитативна и квантитативна анализа примарних и секундарних метаболита,

2) биофизички мониторинг слободнорадикалских реакција које дефинишу очување структуре плода и присуства биоактивних компоненти: уклањање хидроксилног, супероксид-анјон и азот-моноксид радикала, као и детекција стабилних органских радикала и липидне пероксидације, и

3) статистичка и математичка анализа података у циљу рангирања испитиваних сорти ради одабира најперспективнијих у смислу нутритивног и сензоричког квалитета плода, али и са аспекта здравствене корисности.

Научни задаци у оквиру првог и другог циља су остварени кроз употребу савремених експерименталних метода из области физичке хемије, хемије, биологије и биохемије, као и знања из области хортикултуре, биотехнологије, медицинске биохемије и технологије хране, чиме је постигнут мултидисциплинарни приступ у овим истраживањима. Трећи научни задатак је реализован кроз примену статистичких метода употребом модерних софтвера за тестирање резултата експерименталних мерења.

3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1 УЗОРЦИ ПЛОДОВА ЈАГОДА

Од укупно 25 одабраних сорти јагоде које су испитиване у овој докторској дисертацији, 22 сорте спадају у једнородне ('Clery', 'Alba', 'Joly', 'Aprika', 'Asia', 'Arosa', 'Roxana', 'Jeny', 'Laetitia', 'Garda', 'Lycia', 'Premy', 'Sibilla', 'Quicky', 'Federica', 'Lofty', 'Tea', 'Mila', 'Arianna', 'Sandra', 'Vivaldi', и 'Rumba') док свега три сорте спадају у сталнорађајуће ('Albion', 'Capri', и 'Irma').

Све сорте су гајене на огледној парцели која се налази у општини Шид, Република Србија (са координатама географске ширине и дужине 45°07' N, 19°13' E). Регион општине Шид је карактеристичан по умерено-континенталној клими, са средњом годишњом температуром ваздуха од 10,7 °C и средњом годишњом количином падавина од 650 mm. Земљиште је категорисано као песковита иловача (pH 6,8) са средњим до високим нивоом хранљивих материја. Саднице тестираних сорти јагоде су засађене у јулу месецу 2018. године у дворедном систему гајења на гредицама прекривеним црном полиетиленском фолијом са густином садње од 44 440 биљака по хектару. Примењено је наводњавање „кап по кап“, а фертигација је вршена у складу са захтевима јагоде за хранљивим елементима током различитих фенофаза и препорукама датим у публикацији Томић и сарадника (Tomić et al., 2018).

Узорци потпуно зрелих плодова сваке испитиване сорте су сакупљени у три понављања, 20 плодова по понављању (укупно 60 плодова по сорти) током друге бербе у првој години након садње (2019. године). После бербе плодови су чувани на -20 °C до лабораторијских анализа како би се спречило дејство фактора након бербе.

3.1.1 Једнородне сорте јагоде

У Републици Србији тренутно не постоји оплемењивачки програм у коме се селекционишу нове сорте јагоде, тако да се постојећи сортимент проширује искључиво увозом садница нових сорти створених у иностраним оплемењивачким програмима и њиховим увођењем у производне засаде и пласманом на домаће тржиште. Када се уводе нове сорте важно је подједнако задовољити интересе произвођача, потрошача и прерађивача. Неопходно је пратити измене сортимента и уводити нове, перспективне сорте различитог времена зрења, ради бољег и равномернијег снабдевања тржишта. Важан циљ оплемењивања представља стварање једнородних сорти различите епохе зрења (врло раног и врло позног времена зрења), као и стварање сталнорађајућих (ремонтантних) сорти које сукцесивно плоносе од маја до новембра чиме се продужава сезона гајења и пласмана свежих плодова, и постиже изузетно висока цена на тржишту.

Плодови једнородних сорти јагоде сазревају у току маја и јуна у нашој земљи. Ове сорте се деле на привредно значајне и перспективне.

Привредно значајне једнородне сорте јагоде могу се поделити на конзумне и индустријске сорте. Као експериментални материјал у овој докторској дисертацији коришћене су следеће конзумне сорте: 'Clery', 'Alba', 'Joly', 'Aprika', 'Asia', 'Sibilla', 'Roxana', 'Arosa' и 'Rumba'.

Из групе перспективних једнородних конзумних сорти јагоде испитиване су: 'Quicky', 'Lofty', 'Lycia', 'Arianna', 'Garda', 'Premy', 'Tea', 'Federica', 'Laetitia', 'Vivaldi', 'Sandra' и 'Nadja' (Milivojević, 2022, 2018).

У оквиру сталнорађајућих (ремонтантних) сорти испитивањима су обухваћене три сорте: 'Albion', 'Capri', и 'Irma'.

3.1.1.1 Привредно значајне једнородне конзумне сорте јагоде



Clery (КЛЕРИ)

Италијанска сорта која рано зри, већ у првој декади маја. Плод је средње крупан до крупан (просечне масе око 20 грама), издуженог конусног и правилног облика. Покожица плода је сјајне интензивно црвене боје, делимично отпорна при берби и транспорту. Плод је погодан за употребу у свежем стању због високог квалитета мяса и интензивне ароме (Milivojević, 2022).



Alba (АЛБА)

Италијанска сорта врло раног времена зрења (само 2 дана после сорте Клери). Плод је крупан (око 24 грама), издуженог конусног облика, светлоцрвене боје, пријатног и ароматичног укуса (Milivojević et al., 2015). Покожица плода је осетљива према штетном дејству кише.



Aprika (АПРИКА)

Италијанска сорта која зри средином маја, високе родности. Плод ове сорте је издуженог конусног облика, врло крупан (маса око 30 грама). Боја покожице је интензивно до наранџасто црвене боје постојана током зрења плодова, са израженим сјајем (Milivojević, 2022; Milivojević et al., 2015).



***Asia* (АЗИЈА)**

Италијанска сорта, прилагођена за јесењу производњу. Зрење плодова почиње између 15. и 20. маја. Високо је приносна сорта. Плод је крупан, тежине око 31 грам, прилично уједначен, веома лепог издуженог конусног облика, интензивно црвене боје (Milivojević, 2022; Milivojević et al., 2015). Пријатне ароме и одличног укуса.



***Sibilla* (СИБИЛА)**

Италијанска сорта средње позног времена зрења (почетак треће декаде маја). Високо је продуктивна сорта. Плод је крупан са просечном масом око 30 грама, конусног облика интензивно црвене боје. Месо плода је чврсто, врло пријатног укуса. Добро подноси транспорт и складиштење (Milivojević, 2022).



***Roxana* (РОКСАНА)**

Италијанска сорта која почиње да сазрева почетком треће декаде маја. Одликује се високим приносима. Плод је крупан (просечне масе око 28 грама), издужено конусан, понекад са израженим неравнинама, светло до наранџасто црвене боје (Milivojević, 2022). Месо је чврсто, наранџасто црвено, са слабо израженом унутрашњом шупљином. Укус плода је задовољавајући.



***Arosa* (АРОСА)**

Италијанска сорта, средње позног времена зрења (трећа декада маја). Високе је родности. Плод је врло крупан, масе преко 30 грама, конусног облика са затупастим врхом и интензивно црвене боје. Врло је пријатног укуса, погодна за индустријску прераду, али и за стону потрошњу (Milivojević, 2018).



***Rumba* (РУМБА)**

Сорта пореклом из Холандије, раног до средње раног времена зрења (середина маја). Плод је крупан, униформне величине, јарко црвене боје и веома сјајан, чак и након неколико дана складиштења. Плодови су веома сочни и укусни. Румба је отпорна према проузроковачима болести, а посебно према пепелници. Захваљујући израженој чврстоћи плода, показује отпорност на кишу.



***Jenu* (Цени)**

Сорта пореклом из Италије, раног времена зрења (почетак друге декаде маја). Плод је врло крупан (примарни плодови имају масу 38 грама), веома су издуженог конусног облика, са дугом дршком плода (Milivojević et al., 2015). Пријатне су ароме и одличног укуса. Покожица плода је светло црвене, скоро розикасте боје, због чега је ова сорта постала слабо прихватљива за потрошаче.

3.1.1.2 Перспективне једнородне конзумне сорте јагоде



Quicky (КВИКИ)

Новија италијанска сорта врло раног времена зрења (5 дана раније сазрева од сорте Клери). Високе је родности и изражене отпорности према болестима. Крупног је плода, просечне масе око 28 грама, издуженог конусног облика са затупастим врхом. Покожица плода је интензивно црвена. Месо плода је средње чврстоће, али и нешто лошијег укуса. Позитивно својство ове сорте је што се плодови могу брати у интервалу од 5 до 7 дана (Milivojević, 2022).



Lofty (ЛОФТИ)

Нова италијанска сорта раног зрења као и сорта Квики. Умерено је приносна и изражене отпорности према болестима. Плод је крупан, просечне масе око 26 грама, конусног облика. Покожица плода је интензивно црвена. Месо плода је оптималне чврстоће, веома ароматичног укуса (Milivojević, 2022). Продужен је интервал између берби (на 5 до 7 дана), као и код претходне сорте.



Lucia (ЛИЋИЈА)

Нова италијанска сорта средње раног времена зрења (сазрева између сорти Клери и Џоли). Поседује широк прозор бербе са могућношћу њеног извођења у интервалима од 3 до 6 дана. Веома је продуктивна сорта са добрим приносом, толерантна на болести. Плод је крупан, издуженог конусног облика, интензивно црвене боје. Месо плода је чврсто веома пријатног слаткастог укуса и ароматично. Поседује одличну складишну способност (Milivojević, 2022).



***Arianna* (АРИАНА)**

Нова италијанска сорта, раног времена зрења као и сорта Клери. Веома је продуктивна сорта са добрим приносом. У кишним вегетацијама показује осетљивост на труљење плодова, чиме се смањују комерцијални приноси. Плод је крупан, просечне масе око 27 грама, конусан, интензивно до светло црвене боје (Milivojević, 2022). Месо је чврсто, веома ароматично и укусно. Плод је погодан за свежу потрошњу и индустријску прераду.



***Garda* (ГАРДА)**

Нова италијанска сорта, раног до средњег времена зрења (почетком или средином друге декаде маја). Умерене је родности. Плод је крупан (просечне масе 24 грама), правилног конусног облика, веома чврст и компактан. Солидног је укуса са нешто блажом аромом. Има добру транспортабилност и складишну способност (Milivojević, 2018).



***Tea* (ТЕА)**

Нова италијанска сорта, средње позног времена зрења (почетак треће декаде маја), високе родности. Плод је веома крупан, просечне масе 32 грама, правилног конусног облика, интензивно црвене боје. Месо плода је чврсто, сочно и веома пријатног и слатког укуса (Milivojević, 2022).



***Federica* (ФЕДЕРИКА)**

Нова италијанска сорта позног времена зрења (крај маја). Лако прилагодљива на климатске услове и отпорна на кишу и патогене. Погодна је за органску производњу. Високе је родности. Врло крупног плода, просечне масе око 32 грама, правилног конусног облика, интензивно црвене боје (Milivojević, 2022). Месо плода је веома чврсто, осредњег укуса и ароме. Плод је одличне складишне способности.



***Sandra* (САНДРА)**

Нова италијанска сорта, средње родности, раног времена зрења. Плодови су средње крупни (просечне масе 20 грама), конусног облика и добре конзистенције (Milivojević et al., 2023). Покожица плода је интензивно црвене боје, израженог сјаја. Укус плода је веома слadak и пријатне ароме. Отпорна је на већину болести. Плод је погодан за индустријску прераду, али и за конзумацију у свежем стању.



***Vivaldi* (ВИВАЛДИ)**

Сорта пореклом из Холандије, средње раног времена зрења (половином маја). Високе је родности са плодовима средње величине. Плодови су атрактивног изгледа, конусног облика са високим сјајем и пријатном аромом. Потамне на вишим температурама током лета, тако да је гајење ове сорте најпогодније у раној сезони у пластеницима. Биљка је осетљива на већину болести јагоде.



***Nadja* (НАЂА)**

Нова италијанска сорта, веома раног времена зрења, средње продуктивности (Milivojević et al., 2023). Није подложна најчешћим гљивичним болестима. Погодна је за све типове земљишта. Плодови су крупни (маса 27,8 грама) и атрактивни, правилног, купасто-издуженог облика и интензивне веома јарко црвене боје. Месо плода је чврсто и доброг укуса.

3.1.2 Сталнорађајуће (ремонтантне) сорте јагоде

Сталнорађајуће или тзв. ремонтантне сорте јагода цветају и плодоносе у току већег дела вегетационог периода, просечно од маја до првих мразева у јесен.

Опlemeњивачки рад на стварању сталнорађајућих сорти је врло интензиван у многим земљама и до сада је створено много нових сорти, као што су: '*Irma*', '*Capri*', '*Albion*', '*Evita*', '*Everest*', '*Flamenco*', '*Elsinore*', '*Malga*', '*Xante*', '*Ania*', '*Selva*', '*Diamante*', '*Monterey*' и многе друге. Од свих набројаних само прве три су се изучавале у овој докторској дисертацији и већ су комерцијално заступљене у свету, а полако се шире и у нашој земљи.



***Irma* (ИРМА)**

Италијанска сорта која почиње да зри средином маја и зрење јој траје све до октобра. Високе је родности већ у првом периоду плодоношења. Плод ове сорте је врло крупан, просечне масе око 32 грама у пролећној берби (Milivojević, 2022). Конусног је облика, униформан и при врху зашиљен. Боја pokožице је интензивно црвена. Месо плода је црвене боје, средње чврстоће, лошијих органолептичких карактеристика у пролећној берби. Бољи укус плода и израженија арома се јављају у каснијим бербама.



***Albion* (АЛБИОН)**

Калифорнијска сорта, са врло раним почетком зрења (крај априла). Високе је родности већ у првом периоду плодоношења (Milivojević et al., 2015). Врло крупног је плода, просечне масе 27 грама, издужено конусног облика, интензивно црвене боје, врло пријатног укуса. Изражена чврстоћа плода чини ову сорту погодну за транспорт и складиштење (Milivojević, 2022).



***Capri* (КАПРИ)**

Италијанска сорта, врло раног времена зрења, високе родности и доброг квалитета плода. Зрење траје све до првих мразева. Гајење ове сорте може се побољшати вештачким осветљењем како би се добили већи приноси током другог периода плодоношења (Van Delm et al., 2016). Капри даје веома чврсте плодове, па се може брати у интервалима од 5 дана. Отпорна је на болести корена и плесни, као и на летње врућине. Погодна је за транспорт и складиштење. Плод је конусан, правилног облика, једнолично црвене боје и веома сјајне покожице. Укус плода је слadak са пријатном аромом.

3.2 ПРИПРЕМА ЕКСТРАКАТА ПЛОДОВА ЈАГОДЕ

Цели плодови јагоде пажљиво су одмрзнути, хомогенизовани помоћу авана и тучка у односу 1:3 (свежа маса плода:екстракциони медијум) и екстраховани у одговарајућем растварачу у зависности од типа анализа. Екстракти свих 25 сорти су припремљени у три понављања.

3.2.1 Метанолни екстракти за анализе на спектрофотометру, спектрофлуориметру, *HPLC* -у и *EPR*-у

За припрему метанолних екстраката коришћен је 80% метанол у односу 1:3 (1 g хомогенизованог плода и 3 ml 80% метанола). Након центрифугирања на $13,000 \times g$ 10 минута на 4 °C, добијени супернатант је коришћен за одређивање садржаја укупних фенола (*TPC* – *Total Phenolic Content*), укупних антоцијанина (*Total Anthocyanin Content* – *TAC*Y), укупног антиоксидативног капацитета (*TAC* – *Total Antioxidant Capacity*) и анализа на спектрофлуориметру. Ови екстракти су коришћени и за сва мерења на *HPLC* -у и *EPR*-у, након филтрирања кроз најлонске филтере са величином пора од 0.22 μm (*Ahlstrom-Munksjö*, *Falun AB*, Шведска).

3.2.2 Пуферски екстракти за испитивања активности ензима

Екстракти за одређивање концентрације протеина и активности ензима припремљени су у 50 mM калијум фосфатном пуферу *pH* 7 који садржи још и 4% (маса/запремина) поливинилпиролидин (*PVP*) и 0,1% *Triton X 100*. Након центрифугирања на $13,000 \times g$ 10 минута на 4 °C, супернатант је коришћен за спектрофотометријско одређивање концентрације протеина и активности ензима пероксидазе и полифенолоксидазе, као и за изоелектрично фокусирање. Пуферски екстракти су чувани на -80 °C до потребних анализа.

3.2.3 Екстракти за *ESI-FT-ICR-MS* анализу

Екстракти две одабране сорте јагоде ('*Aprika*' и '*Sandra*') припремљени су по модификованим методама датим у литератури (Kajdžanoska et al., 2011; La Barbera et al., 2017). По описаној процедури, 3 g хомогенизованог плода пребачено је у вијалу од ћилибарног стакла и додато је 6 ml растварача за екстракцију, који се састоји од 99% ацетона и 1% сирћетне киселине. Суспензија је подвргнута сонификацији у трајању од 15 минута у ултразвучном купатилу, како би се екстраховала сва органска једињења из плодова. За филтрирање суспензија коришћени су целулозни филтери (*VVR*, величина пора 1 μm), а филтрати су затим концентровани у воденом купатилу на 37 °C док се није постигла коначна запремина екстраката од 2 ml. Овакви екстракти су разблажени 20 пута коришћењем смеше растварача који се састојао од 80% метанола, 19% дихлорметана, 0,9% воде и 0,1% триетиламина за *ESI(-)* анализе или са мешом растварача који се састојао од 60% ацетона, 30% изопропанола и 10% воде (+ 1 mM NH_4COOCF_3) за *ESI(+)* анализе.

3.3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ МЕТОДЕ, ИНСТРУМЕНТИ И УСЛОВИ СНИМАЊА

У оквиру ове докторске дисертације коришћене су следеће експерименталне методе:

- течна хроматографија високих перформанси (или под високим притиском) спрегнута са масеним спектрометром (*HPLC-MS*), детектором са низом диода (*HPLC-DAD*) и електрохемијским детектором (*HPLC-ECD*),

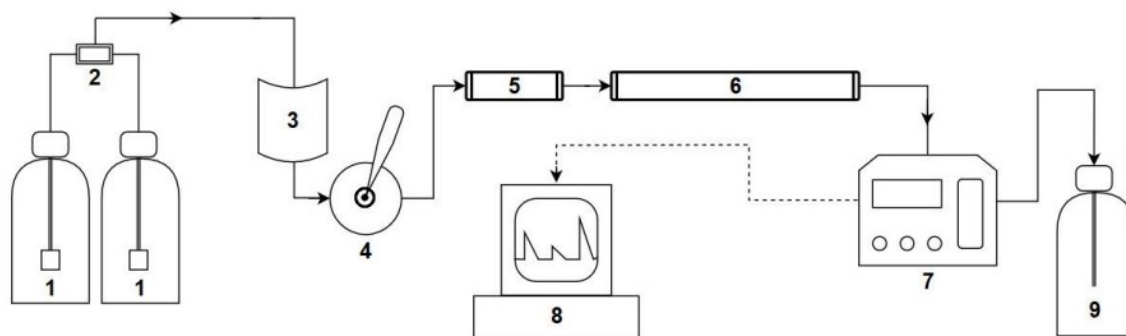
- јон циклотрон резонанција тандем масена спектрометрија – *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR-MS)*,
- електронска парамагнетна резонантна (*EPR*) спектроскопија,
- ултраљубичаста-видљива (*UV/Vis*) спектроскопија,
- спектрофлуориметрија,
- десорпција ласером из матрице (*MALDI*) и
- изоелектрично фокусирање, *SDS-PAGE* електрофореза и *Western blot* анализа експресије протеина.
- статистичке методе, мултиваријантна анализа и математички модели за одређивање укупног индекса квалитета плода

3.3.1 Течна хроматографија под високим притиском спрегнута са масеним спектрометром (*HPLC-MS*), детектором са низом диода (*HPLC-DAD*) и електрохемијским детектором (*HPLC-ECD*)

У овој докторској дисертацији коришћене су различите *HPLC* методе раздвајања једињења присутних у плоду јагоде као брзе и довољно ефикасне за идентификацију највећег броја потенцијалних компоненти. Ради поуздане детекције ниских концентрација компоненти у спрези са *HPLC* техникама су коришћене и три методе: *UV-Vis* фотометрија (*Photo Diode Array – PDA*), пулсна амперометријска детекција (*Pulsed Amperometric Detection – PAD*) и масена спектрометрија (*Mass spectrometry – MS*), у зависности од коришћених детектора.

Сва хроматографска мерења су изведена у три понављања.

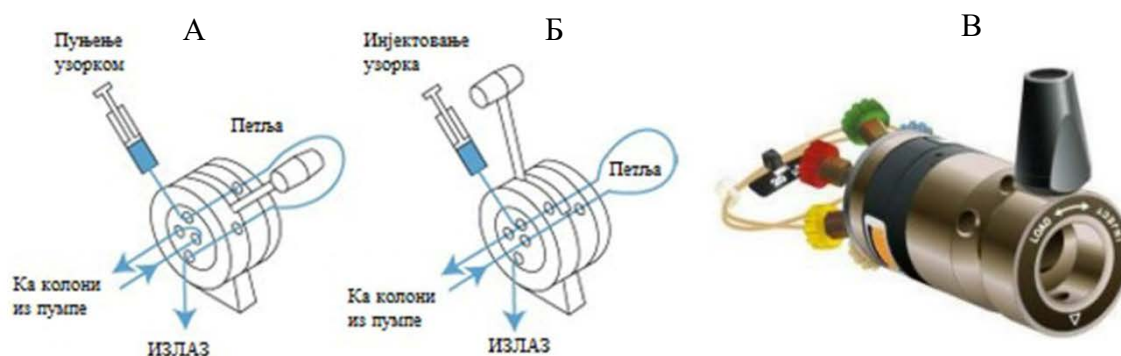
Основна карактеристика *HPLC*-а је врло висок радни притисак, од 20 до 300 бара, под којим се врши раздвајање анализата на колони. Сви независни делови су под командом управљачког софтвера омогућавајући строгу контролу услова специфичних за одређену анализу. Шема *HPLC* система је приказана на слици 4.



Слика 4. Шема *HPLC* система

1 – систем за снабдевање мобилном фазом; 2 – дегасер; 3 – пумпе; 4 – аутоматски инјектор-аутосемплер или ручни инјектор; 5 – предколоне; 6 – колоне; 7 – детектор; 8 – софтвер; 9 – систем за прикупљање отпада

Аутоматски инјектори-аутосемплери се користе за аутоматизовано инјектирање великог броја узорак. Користе се и **ручни инјектори** који омогућавају уношење прецизне запремине узорка на колону. Запремина инјектирања се креће у распону од 5 до 500 μl . Ручни инјектор се састоји од вентила са шест отвора, ротора, петље за узорке и отвора за иглу (слика 5). Раствор узорка убацује се у петљу помоћу шприца и игле, а узорак се затим инјектира у колону пребацивањем вентила у одговарајући положај (Dong, 2005; Rasmussen et al., 2005).



Слика 5. Шема вентила са петљом за узорковање у *HPLC*.

А – положај за пуњење; Б – положај за ињектовање; В – типични *HPLC* ручни ињектор.
Преузето и прилагођено (Šojić Merkulov et al., 2021)

У *јоноизмењивачкој хроматографији* компоненте се раздвајају између мобилне фазе која је течна и чврсте стационарне фазе која је измењивач јона тј. нерастворни материјал који садржи лабилно везане јоне који се могу реверзибилно и у еквивалентним количинама мењати са другим јонима из раствора. Могу бити природни или синтетски, неорганског или органског порекла. Највише су распрострањени органског порекла док се минерални најмање користе у хроматографији. Јоноизмењивачке смоле по типу активне групе могу бити катјонске или анјонске. Такође, смоле се деле на јаке и слабе по капацитету, који представља максималан број везаних честица мобилне фазе по јединици тежине јоноизмењивача. Код јаких јоноизмењивача капацитет је мање зависан од *pH* јер и при *pH* вредностима које су значајно мање или веће од оптималне тачке криве титрације измењивача (када је капацитет колоне највећи) смола и даље садржи довољно слободних активних група за прихватање молекула анализираних супстанци. За добро раздвајање малих молекула као што су органске киселине, сем електростатичких, велику улогу имају и силе адсорпције које се јављају на површини и унутар куглица које чине стационарну фазу. Тако се смоле разликују и по величини и умрежености куглица које чине паковање колоне. У основи, најбоље раздвајање се постиже на малим и добро умреженим куглицама полистирена, али се ове величине ($\varnothing$ куглице од 0,5 до 10 μm) морају прилагођавати молекулима које раздвајамо.

У *реверзно фазној хроматографији* мобилна фаза је поларнија од стационарне. Мобилна фаза је углавном смеша поларних растварача (на пример, вода, метанол, ацетонитрил и др), док је стационарна често угљоводоник. Због тога прво се елуира најполарнија компонента, а самим подешавањем поларности мобилне фазе продужава се време елуирања компоненти са колоне.

Дужина и пречник колоне представљају основне параметре неопходне за брзо и ефикасно раздвајање анализата. Са обзиром на међусобну сличност у величини и наелектрисању, за раздвајање молекула малих органских киселина, алдехида или кетона се користе дугачке аналитичке колоне велике моћи раздвајања, али са нешто дужим временом потребним за анализу. Због велике моћи раздвајања, на овим колонама је могуће симултано раздвојити органске киселине, полихидроксилне алкоhole и моносахариде. Најчешћи тип детекције поменутих молекула је *UV* детекцијом, али користе се и неке осетљивије методе, као што су електрохемијска и кондуктометријска детекција.

3.3.1.1 Детекција

3.3.1.1.1 Пулсна амперометријска детекција (*Pulsed Amperometrical Detection*)

У овој докторској дисертацији за детектовање угљених хидрата коришћена је анјонска јоноизмењивачка хроматографија повезана са пулсном електрохемијском детекцијом шећера (*High Performance Anion Exchange – Pulsed Amperometrical Detection*). Шећери се раздвајају на

колони у облику анјона, чија се количина одређује пулсном електрохемијском детекцијом на златној радној електроди. Смисао примене пулса промене потенцијала на површини електроде је уклањање оксида злата који је настао оксидацијом шећера током анализе. *HPLC-PAD* је врло селективна аналитичка метода за анализу угљених хидрата због специфичних услова детекције при којима се угљени хидрати за најмање један ред величине лакше оксидују од осталих компоненти у узорку на датим условима. Уз наведено, неутралне компоненте се заједно са катјонима елуирају врло брзо, практично без задржавања на колони. Тиме се постиже додатна селективност, јер иако се неке од њих и могу детектовати, њихов брз силазак са колоне их уклања из региона хроматограма где се налазе испитивани аналити.

Основне карактеристике *PAD* методе су: висока осетљивост и селективност у детекцији моносахарида, брза и једноставна сепарација аналита изократском елуцијом, мала количина материјала потребног за анализу и лако одржавање ћелије у односу на стандардне електрохемијске методе, јер се употребом пулса површина златне радне електроде током рада стално одржава чистом, док водонична референтна електрода не захтева посебно одржавање.

3.3.1.1.1.1 Коришћени инструмент и услови за анализу шећера

За анализу шећера коришћен је *Waters Breeze* систем (*Waters, Milford, MA, USA*) који се састоји од 1525 бинарних пумпи, термостата и 717+ аутосемплера повезаних са *Waters 2465* електрохемијским детектором. Детектор поседује 3 mm златну радну электроду и водоничну референтну электроду. Раздвајање шећера извршено је помоћу колоне *CarboPac PA1 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)* величине 250 × 4 mm, која је опремљена одговарајућом *CarboPac PA1* предколоном, на константној температури од 30 ° C и брзином протока од 1,0 ml/min. Као мобилна фаза коришћен је 200 mM натријум хидроксид, који је припремљен растварањем 10,5 ml 50% v/v раствора натријум хидроксида са малим уделом карбоната (*J.T. Baker, Deventer, Holandija*) у дејонизованој води која је претходно вакуумски дегазирана, до коначне запремине од 1 L.

Сигнали су детектовани у импулсном режиму у року од 150 ms од времена интеграције. Коришћен је следећи таласни облик: $E1 = +0,15 \text{ V}$ за 400 ms; $E2 = +0,75 \text{ V}$ за 200 ms; $E3 = -0,8 \text{ V}$ за 200 ms. Временски оквир филтера је био 0,2 s, са опсегом од 1 μA за пуну скалу mV. За прикупљање података и спектралну процену пикова коришћен је *Waters Empower 2 Software (Waters, Milford, MA, USA)*. Резултати су изражени као грам специфичног шећера на 100 грама свеже масе (g/100 g FW).

3.3.1.1.2 Детектор са низом диода (*photodiode array detection, PDA, или diode array detector, DAD*)

Детектори са низом диода (фотодиодни низ детектори) су *UV* спектрофотометријски детектори који омогућавају снимање целог спектра за приближно 1 s са резолуцијом од око 1 nm или мање. Овај детектор бележи апсорпцију светлости на различитим таласним дужинама и тако се спектрални подаци за хроматографски пик сакупљају и чувају онако како се пикови појављују на крају колоне. Састоји се од великог броја фотодиода и врши снимање спектра у одређеном распону таласних дужина у *UV/VIS* области, а апсорбанција се снима у зависности од времена задржавања и таласне дужине (Talhaoui et al., 2014). Светлост из деутеријумске лампе сочивом се усмерава тако да цео сноп светлости може да прође кроз ћелију детектора до дифракционе решетке. Тако је узорак под утицајем светлости свих таласних дужина које долазе из деутеријумске лампе. Од дифракционе решетке светло пада на низ диода. Свака диода у низу даје карактеристични сигнал који се бележи на рачунару. Спектар узорка се добија из криве која повезује апсорпцију са таласном дужином (Reuhs, 2017).

3.3.1.1.2.1 Коришћени инструмент и услови за анализу органских киселина

За анализу органских киселина коришћен је *Waters Breeze* систем (*Waters, Milford, MA, USA*) који се састоји од 1525 бинарних пумпи, термостата и 717+ аутосемплера повезаних са *Waters 2996* детектором подешеним на 210 nm. За раздвајање коришћена је колона *Supelco C-*

610H (300 × 7,8 mm) (Sigma-Aldrich, Barcelona, Шпанија) са одговарајућом претколоном, која је посебно припремљена за анализу органских киселина. Као мобилна фаза за изократско елуирање коришћена је 0,1% фосфорна киселина (H₃PO₄) са протоком од 0,5 ml/min и температури колоне од 40 °C. Раздвајање је вршено реверзно-фазном хроматографијом са једноставном изократском елуцијом и са минималном припремом узорка. Детекција је вршена помоћу детектора са низом диода на таласној дужини од 210 nm, на којој фосфорна киселина не апсорбује UV светлост, а карбоксилне групе, као главне функционалне групе органских киселина апсорбују UV светлост у опсегу од 200 до 210 nm.

За прикупљање података и спектралну процену пикова коришћен је *Waters Empower 2 Software* (Waters, Milford, MA, USA). Резултати су изражени као милиграм специфичне органске киселине на грам свежје масе (mg g⁻¹ FW) и микрограм специфичне органске киселине на грам свежје масе (μg g⁻¹ FW).

3.3.1.1.3 Масена спектрометрија (МС)

Масена спектрометрија је аналитичка техника која може да пружи и квалитативне (структура) и квантитативне (концентрација или молекулска маса) информације о молекулима анализата након њихове конверзије у јоне. МС анализатори су врло осетљиви и имају распрострањену примену у детекцији једињења која су присутна у врло ниским концентрацијама у сложеним узорцима. Ови анализатори су високо селективни при идентификацији анализата, помоћу молекулске масе једињења. Селективност масеног спектрометра зависи од резолуције (моћ раздвајања, *R*, дефинише се као „најмања разлика маса, које се још увек може раздвојити“), опсега молекулских маса и брзине снимања спектра. Одабир инструмента зависи од захтева анализе. Молекули од интереса се прво јонизују када настају позитивно или негативно наелектрисане врсте. У масеном анализатору, деловањем магнетног и/или електричног поља, јони испитиваних анализата раздвајају се према односу *m/z*. Јони затим путују кроз анализатор масе и стижу до различитих делова детектора у складу са њиховим односом маса/наелектрисање (*m/z*). Након што јони дођу у контакт са детектором, компјутерски систем генерише сигнале и снима их. Рачунар графички приказује сигнале као масени спектар који показује релативну количину сигнала према њиховом *m/z* односу (Ho et al., 2003). Масени спектар се добија мерењем струја које потичу од јона раздвојених према *m/z* вредностима тј. зависност јонске струје од *m/z* вредности. Интензитет јонске струје у масеном спектру изражава се (у %) у односу на интензитет основног јона који износи 100%.

Да би формиран јони на путу од јонског извора до детектора избегли сударе са другим честицама, систем се налази под високим вакуумом. Неконтролисани судари могли би да изазову даље реакције јона, а добијали би се неадекватни масени спектри због неконтролисаних интерференција.

Када молекули анализата прелазе у јоне може доћи и до фрагментације молекула на два или већи број фрагмената. Фрагментација је пожељна јер појава фрагмената у спектру указује на то од којих је функционалних група састављен испитивани молекул. Испитивањем појединих фрагмената може се добити структура молекула. Најчешће се молекул фрагментира на различите начине док мањи део остаје у облику молекулског јона и у спектру даје сигнал са највећом вредношћу масе.

Молекули узорка преводе се у јоне помоћу јонског извора. Најчешће се користе јонизација електронима (*Electrospray ionization – ESI*), хемијска јонизација (*Chemical ionization – CI*), бомбардовање брзим атомима (*Fast Atom Bombardment – FAB*), јонизација потпомогнута ласерском десорпцијом из матрикса (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – MALDI*) и др.

3.3.1.1.4 ESI

Електроспреј јонизација (*ESI*) се назива „меком јонизацијом“ јер долази до врло мало фрагментација. Течност која садржи анализите од интереса распршује се електроспејом у фини

аеросол (Pozniak and Cole, 2007). *ESI* користи електричну енергију да би помогао превођењу јона из раствора у гасовиту фазу пре него што се подвргну анализи масене спектрометрије. Тако се јонске врсте у раствору могу анализирати осетљивом *ESI-MS* методом. Неутрална једињења се такође могу конвертовати у јонски облик у раствору или у гасној фази протонацијом или катјонизацијом (нпр. метала) и стога се могу проучавати помоћу *ESI-MS*. Генерисање јона тече у три фазе: распршивање (небулизација), наелектрисање, десолватација и испаравање јона. Превођење јона из раствора у гасну фазу помоћу *ESI* подразумева распршивање финих наелектрисаних капљица, које је праћено испаравањем растварача и избацивањем јона из високо наелектрисане капиларе, која је под високим напоном (нпр. 2,5 – 6,0 кV) у односу на зид околне коморе. Генерише се магла високо наелектрисаних капљица истог поларитета као и напон капиларне цеви. Примена гаса за распршивање (нпр. азота), који се креће око елуираног раствора узорка, омогућава већу брзину протока узорка (Ho et al., 2003).

Елуент са колоне се распршује у fine капљице помоћу распршивача (небулизатора). Игла небулизатора односно млазница је уземљена, а око ње је постављена полуцилиндрична електрода под високим напоном. Висок напон између игле и електроде формира јако електрично поље које доводи до дисперзије елуата у аеросол високонаелектрисани електроспреј капљица. Уз помоћ повишене температуре *ESI*-извора и/или струје гаса (азота), наелектрисане капљице се континуирано смањују уз истовремено испаравање растварача, што доводи до повећања површинске густине наелектрисања и смањења величине капљице (тренутак када одбојне електростатичке (*Coulomb*-ове) силе надвлађају кохезионе (површински напон) и дође до тзв. Кулоновске експлозије односно разбијање на мање капљице). Пошто формирање јона прати испаравање растварача, типични растварачи за *ESI* припремају се мешањем воде са испарљивим органским једињењима (нпр. метанол или ацетонитрил) (Olumee et al., 1998). Коначно, јачина електричног поља унутар наелектрисане капљице достиже критичну тачку у којој је кинетички и енергетски могуће да се јони на површини капљица избаце у гасовиту фазу. Јони у гасовитој фази су привучени од стране супротно наелектрисаног улаза у капилару и прослеђују се даље у масени спектрометар. Поларитет капиларе одређује који ће јони бити узорковани – код позитивне јонизације (енглески *Positive Ionization, PI*) улаз у капилару је негативно наелектрисан и привлачи катјоне, док у негативном моду (енглески *Negative Ionization, NI*) обрнуто. Позитиван мод је погодан за одређивање амина, амида, пептида итд. Негативан мод је погодан за одређивање карбоксилних и сулфонских киселина, фенола, коњугованих метаболита.

3.3.1.1.5 Квадрупол

Квадруполни анализатор масе је најчешће коришћен у лабораторијама због погодних димензија, високе ефикасности трансмисије (број јона који стигне до детектора), велике брзине снимања спектра, умереног вакуума и ниске цене, иако спада у анализаторе ниске резолуције. На путу јона кроз магнетно или електрично поље, на њихово кретање утиче њихов m/z однос, што је уједно и главни принцип раздвајања јона у *MS*. Систем се састоји од четири међусобно паралелне електроде на једнакој удаљености. Основни потенцијал две суседне електроде је истог интензитета, али различитог наелектрисања. Док пролазе кроз анализатор, јони се филтрирају на основу m/z вредности, тако да само поједини јони бивају пропуштени, јер имају стабилну путању (у правцу z -осе са осцилаторним кретањем у xy равни), док остали бивају разелектрисани на електродама. Снимање масеног спектра изводи се променом једносмерне и наизменичне компоненте напона, при њиховом константном односу. Потенцијал радио фреквенције одбија или преноси јоне на основу m/z вредности, фокусирајући их наизменично у различитим равнима. За време прве половине радиофреквентног циклуса, горња и доња електрода су позитивно, а лева и десна негативно наелектрисане. Овакав распоред наелектрисања потискује позитивне јоне у хоризонталну раван. У другој половини циклуса поларизованост је обрнута, па се јони фокусирају у вертикалној равни. Електрично поље квадрупола наставља да се мења на исти начин па настаје

тродимензионални талас кретања јона. Када се изаберу одговарајућа радио фреквенција и потенцијал, анализатор пропушта јоне већег односа m/z до детектора, док јони мањег m/z односа бивају привучени ка електродама. Запис који се добије је масени спектар и представља график зависности интензитета струје појединачних јона (*abundance*) од m/z вредности. Из њега се добијају информације који су јони присутни у узорку, како су настали поједини јони и у којим се међусобним односима налазе концентрације тих јона. Врсте јона које масени спектар уобичајено садржи су: молекулски јони (чија маса представља молекулску масу једињења која се испитује), фрагментни јони (настају услед раскидања појединих веза у молекулском јону), преуређени јони (настају премештањем једног или групе атома из једног јона у други) и метастабилни јони (њихови пикови су развучени и слабог интензитета).

Уобичајена је пракса да се највећи сигнал узима као 100% јачине интензитета, а сви остали сигнали се изражавају као његов проценат. Фрагментација протонованих или депронованих молекулских јона генерисаних из *ESI* извора је генерално ограничена, а масени спектри су релативно једноставни.

Молекул може да се фрагментира на различите начине док један део остане цео и у спектру даје сигнал са највећом вредношћу масе. Због тога, структурне информације се могу добити преко специфичних фрагментационих реакција, тј. модом за праћење изабраног фрагмента (енглески, *Selected Reaction Monitoring, SRM*), или модом за праћење вишеструке фрагментације (*Multiple Reaction Monitoring, MRM*), или модом праћења одабраних јона (*Selected Ion Recording, SIR*). Масени спектри различитих једињења су специфични па омогућавају идентификацију са великим степеном поверења.

Поређењем масених спектра изолованих компоненти са масеним спектрима чистих једињења врши се идентификација непознатих компоненти смеше. У случају анализе једноставних смеша и добрих поклапања добијених масених спектра са литературним подацима, масени спектар је довољан за идентификацију једињења присутних у смеси. Међутим, код анализа сложених смеша које садрже компоненте са сличним ретенционим временима и где је слабија резолуција, добијени масени спектри могу бити итекако различити од литературних података и тада је неопходно користити и ретенционе параметре за идентификацију компоненти смеше. Комбинација података о ретенционим параметрима и литературни подаци доводе до идентификације непознатог једињења недвосмислено.

3.3.1.1.5.1 Коришћени инструмент и услови за анализу појединачних фенола

За анализу појединачних фенола коришћен је *Waters Breeze* систем (*Waters, Milford, MA, USA*) који се састоји од 1525 бинарних пумпи, термостата и 717+ аутосемплера повезаних са *Waters 2996* детектором и *EMD 1000* сингл-квадрупол детектором са *ESI* извором (*Waters, Milford, MA, USA*). За одвајање је коришћена *Symmetry C-18 RP* колона ($150\text{ mm} \times 4,6\text{ mm}$) која је напуњена честицама величине $5\text{ }\mu\text{m}$ (*Waters, Milford, MA, USA*) са одговарајућом предколоном. Бинарни градијент мобилних фаза А (0,1% мравља киселина) и Б (ацетонитрил) коришћен је при протоку од 1 ml у минути, са следећим профилем градијента: у првих 20 минута од 10 до 20% из Б; следећих 10 минута линеарно расте до 40% Б, након чега се враћа 15 минута до почетних 10% Б и додатних 5 минута времена за успостављање равнотеже. Након колоне коришћен је раздвајач протока (*ASI, Richmond, CA, USA*) са односом раздвајања 5/1, да би се добио оптималан доток мобилне фазе за *ESI*. За детекцију различитих класа фенолних метаболита *DAD* детектор је намештен на 254, 315, и 510 nm. За *LC-MS (Liquid chromatography-mass spectrometry)* анализу антоцијанина коришћен је позитивни *ESI* режим скенирања са следећим параметрима: напон капиларе 3,5 kV, напон конуса +35 V, а напони екстрактора и радио фреквенције (*RF*) сочива су били 3,0 и 0,2 V. За квантификацију метаболита, када је било потребно, хроматограми су снимљени у *SIR* моду. Температура извора била је 120 °C, а температура десолватације била је 360 °C, са протоком гаса азота од 500 l/h. За прикупљање података и спектралну процену пикова коришћен је *Waters Empower 2 Software* (*Waters, Milford, MA, USA*).

3.3.2 Фуријеова трансформација – јон резонантна циклотронска масена спектрометрија (*Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, FT ICR MS*)

Фуријеова трансформација – јон резонантна циклотронска масена спектрометрија (*Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, FT ICR MS*) је метода ултрависоке резолуције која често укључује и електроспреј јонизацију за идентификацију једињења на молекулском нивоу (Roth et al., 2015). *FT ICR MS* идентификује једињења тако што „заробљава“ јоне у у кружној путањи у магнетном пољу и детектује однос јонске масе и наелектрисања (Marshall et al., 2002). *ESI* је погодан као недеструктиван извор јона (Roth et al., 2015). Ултрависока прецизност и резолуција одређивања масе, као и њена недеструктивна природа омогућава *FT ICR MS* детекцију и на хиљаде једињења по узорку (Marshall et al., 2002; Nebbioso and Piccolo, 2013; Roth et al., 2015). Резултати се приказују у поједностављеним дијаграмима атомских односа, као што су на пример Ван Кревел дијаграми (Roth et al., 2015). Висока моћ резолуције и тачност мерења масе погодују за даље откривање нових просторних детаља уз помоћ *MALDI* анализе.

3.3.2.1 Припрема узорака и услови снимања

За испитивање екстракта плодова јагода овом методом одабране су две репрезентативне сорте, '*Sandra*' као позитиван екстрем у погледу индекса квалитета плода и '*Aprika*' као просечна сорта по свим испитиваним параметрима. *ESI* извор је радио у режиму позитивних и негативних јона, користећи следеће параметре: капиларни напон +2800 V (*ESI(-)*)/-3000 V (*ESI(+)*), крајњи помак -500 V, притисак спреја 1,0 bar, проток гаса 4,0 L/min, температура гаса 300 °C и проток убризгавања 10 μ L/min. Масени спектри су добијени у опсегу маса (*m/z*) од 153,52 до 2000,00 Da, акумулације 256 скена. Добијени подаци били су резолуције 8 милиона пиксела (8MP), моћ раздвајања била је $R = 800,000$ при $m/z = 400$ Da, а коришћена је маса *Q1* од 170 Da.

Калибрација, одабир пикова и додељивање молекулске формуле урађени су уз помоћ *Bruker Daltonics* софтвера *DataAnalysis 5.0* (SR 1). Сигнали на масеном спектру који су узимани у обзир су имали однос сигнал-шум ≥ 5 . Калибрација је рађена у два корака. У првом, постојеће калибрационе листе су коришћене за интерну калибрацију. Из ових масених спектара су даље израчунате молекулске формуле и добијене листе молекулских формула које су се користиле за развијање нове калибрационе листе која садржи молекулске јоне који су специфични за анализиране узорке јагода. Однос сигнал/шум нових пикова био је ≥ 10 .

3.3.3 Електронска парамагнетна резонантна спектроскопија (*EPR* спектроскопија)

EPR је спектроскопска метода која се користи за изучавање парамагнетних система тј. супстанци који садрже неспарене електроне. Заснована је на мерењу апсорпције микроталасног зрачења које одговара енергијским прелазима неспареног електрона између различитих спинских енергијских нивоа када се изложи дејству магнетног поља. Долази до интеракције између електромагнетног зрачења и магнетних момената, а код *EPR*-а магнетни моменти потичу од електрона (Brynda, 2010; Weil and Bolton, 2007). До апсорпције микроталасног зрачења долази при посебним комбинацијама фреквенције микроталаса и јачине магнетног поља, које зависе од природе сваког парамагнетика. Мерењем се могу добити значајне структурне и кинетичке информације испитиваног система (Jackson and Hargreaves, 2008). Директно праћење сигнала радикалских врста у сложеним системима попут ћелија и узорака ткива је нешто због чега *EPR* има велику примену у биологији, медицини и хемији.

Најчешће коришћене технике снимања спектра су технике спинских обележивача (пробе) и спинских замки (спин-трап).

Уобичајено је да грађење везе прати спаривање електрона, па је тако спин целог молекула једнак нули. Парамагнетици немају спарени електрон, па његово угаоно кретање ствара магнетно поље, тако да се електрон понаша као магнет (Rosen and Finkelstein, 1985). У природи су молекули ретко парамагнетици, па је често потребно вештачки произвести хемијске врсте са неспареним електронима. Они се називају спински обележивачи или спинске пробе.

Изглед *EPR* спектра који се добија не зависи само од неспарених електрона, већ и од њихове интеракције са околином. Значајни параметри за карактеризацију *EPR* спектра су положај апсорпционих максимума, њихов број и интензитет, узајамни однос њихових интензитета и међусобно растојање, њихов облик и ширина. Ови параметри указују на структуру посматране хемијске врсте, начин на који она интерагује са околином и процесима којима подлеже током анализе. Осим својства узорка, на облик *EPR* спектра може да се утиче и варирањем параметара уређаја.

EPR сигнал детектује се *EPR* спектрометром. Најважнији делови овог уређаја су клистрон, изолатор, ослабљивач, дирекциони куплер, резонаторски простор, детектор, појачивач сигнала и рачунар који бележи сигнале. Све наведене компоненте чине микроталасни мост. Све су смештене у заштитну металну кутију која се поставља на уздигнуту подлогу. Из моста излази таласовод на чијем дну се налази резонатор. У наставку биће објашњена улога сваке компоненте.

- Клистрон је извор микроталасног зрачења. То је вакуумска цев способна да производи микроталасне осцилације у уској области фреквенција, које могу да се регулишу механичким подешавањем или променом напона струје. Снага извора микроталаса који раде у *X*-области је обично око 400 mW, али радна снага током експеримента је 200 mW, јер је потребна константна снага зрачења (Dikanov and Crofts, 2006).

- Даље на свом путу микроталаси стижу до изолатора који пропушта микроталасну енергију до узорка, али успорава њен повратак ка извору.

- Након проласка кроз изолатор микроталаси стижу до ослабљивача који прилагођава јачину микроталаса који долазе до узорка.

- Затим, микроталаси стижу до дирекционог куплера који усмерава микроталасе према резонаторском простору, али и да рефлектовану енергију усмери према детектору. Преостало микроталасно зрачење које се рефлектује са детектора враћа се у циркулатор који га усмерава у таласовод где се претвара у топлоту и осигурава да се зрачење не враћа према извору.

- Резонатор је најважнији део *EPR* инструмента јер се у њега поставља узорак. За различиту област микроталасног зрачења користе се различити резонатори. Налази се испод микроталасног моста тако да пролази између два пола електромагнета. У унутрашњости резонатора може се формирати серија стојећих микроталаса, а резонатор издваја и појачава сигнал микроталаса тачно одређене фреквенције. Фреквенција микроталасног зрачења извора може се подешавати (тјуновати) у ограниченом опсегу фреквенција, што је битно због тога што услов за резонанцију испуњава при различитим фреквенцијама зрачења у зависности шта се налази у резонатору тј. да ли је празан или садржи кивету са узорком (Hoff, 1989; Weil and Bolton, 2007).

За мерења на *EPR* спектрометру углавном се користе цилиндричне кварцне кивете које немају утицаја на *EPR* сигнал. У кивету се постави узорак, а затим кивета постави у резонаторски простор и то у региону где је компонента зрачења магнетног поља максимална, а електрична компонента минимална. Течни узорци се уносе у кварцне капиларе или тефлонска црева, које се постављају у кварцну кивету. Могу се анализирати и чврсти узорци који се постављају у специјалне носаче (Hagen, 2008).

Као резултат снимања добија се сигнал који је у форми ху графика првог извода апсорпционог спектра. На *x*-оси је представљено магнетно поље, док је на *y*-оси представљен интезитет струје детектора.

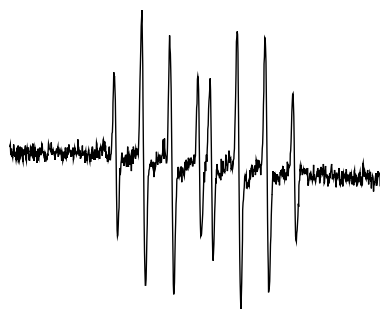
3.3.3.1 Спин-трап техника или техника хватања спинова

Стабилност радикалских врста представља главни изазов у изучавању биолошких система *EPR* спектроскопијом. Неке врсте, као већ поменути хидроксилни радикал, реагују са околином толико брзо да их је тешко или немогуће детектовати. Неке радикалске врсте су присутне у ниским концентрацијама, док у неким биолошким системима долази до истовремене продукције више радикалских врста (Moјović et al., 2005).

Техника спинских замки или спин-трап техника се заснива на томе да дијамагнетне супстанце реагују са радикалима формирајући адукте који су стабилнији од радикала од којих су настали (Weil and Bolton, 2007).

Спектри спинских адуката дају информацију о количини радикала присутних у испитиваном узорку, али могу помоћи и у идентификацији врсте радикала (Villamena, 2016).

Једињења која се најчешће користе као спин-трапови садрже нитронску групу. Оваква једињења са слободним радикалом формирају производ који је и сам слободни радикал, али стабилнији и дужег живота, па омогућава лакше детектовање *EPR* спектроскопијом. Техника спин-трапа се посебно користи у испитивању оксидативног стреса јер постоји могућност идентификације и квантификације краткоживећих радикала као што су хидроксил-радикал, супероксид-анјон радикал итд. *EPR* неактивна, стабилна врста у реакцији са радикалском врстом даје спински адукт, једињење које је *EPR* активно и са дефинисаним *EPR* спектром (Rosen and Finkelstein, 1985). Најпознатије спинске замке су 5,5-диметил-1-пиридин-*N*-оксид (*DMPO*), 5-(диетоксифосфорил)-5-метил-1-пиридин-*N*-оксид (*DEPMPO*), 5-карбоксил-5-метил-1-пиридин-*N*-оксид (*CMPO*), 5-*tert*-бутоксикарбонил-5-метил-1-пиридин-*N*-оксид (*BMPO*) итд. (Hagen, 2008). *DEPMPO* са хидроксилним радикалима формира стабилне адукте који имају специфичан *EPR* сигнал (Слика 6).



Слика 6. Специфичан сигнал $\cdot\text{OH}$ детектован помоћу спинског хватача *DEPMPO* са којим формира стабилан комплекс дајући тзв. *DEPMPO-OH* адукт

3.3.3.1.1 Коришћени инструмент и услови

За испитивање антиоксидативне активности екстраката плодова јагоде са циљем уклањања хидроксилног радикала ($\cdot\text{OH}$), супероксид-анјон радикала, радикала азот монооксида и *DPPH* слободних радикала, коришћена је *EPR* спектроскопија. Сви *EPR* спектри снимљени су коришћењем *Bruker ELEXSYS-II E540* ЕПР спектрометра и при следећим условима: центар поља 3500 G, снага микроталаса 10 mV, фреквенција микроталаса 9,85 GHz, модулациона фреквенција 100 kHz, модулациона амплитуда 1 G, 5 акумулација.

Техником спинских замки испитивана је ефикасност екстраката плодова јагоде у уклањању хидроксилног радикала ($\cdot\text{OH}$) (Nakarada et al., 2020; Savić and Moјović, 2012). Реакциона смеша за Фентонову реакцију којом се генерише $\cdot\text{OH}$ радикал састојала се од 25 μL дејонизоване воде, 1 μL метанолног екстракта јагоде (разблаженог 10 пута), 2 μL H_2O_2 (коначне концентрације 0,35 mM) и 1 μL спинске замке *DEPMPO* (коначне концентрације 3,5 mM). Да би се реакција започела, реакционом раствору је додато 1 μL FeSO_4 (коначне концентрације 0,15 mM), раствор одмах пребачен у тефлонску цев пречника 1 mm и затим су снимљени *EPR* спектри. *EPR* спектар је сниман 2 минута након мешања експерименталног раствора тј. иницирања Фентонове реакције.

За детекцију антиоксидативне активности екстраката плодова јагоде у циљу уклањања супероксид-анјон радикала коришћена је реакциона смеша састављена од 22,7 μL 100 mM

фосфатног пуфера (pH 7,2), 1 μL метанолног екстракта јагоде (разблаженог 10 пута), 2,5 μl *DTPA* (диетилентриаминпентасирћетна киселина, коначне концентрације 20 μM), 1 μl *DEPMPO* (коначне концентрације 3,5 mM), 1,8 μl ксантина (коначне концентрације 0,41 mM). У тако припремљен узорак додат је 1 μl ксантин оксидазе који је затим брзо пребачен у тефлонску цев пречника 1 mm и одмах је снимљен EPR спектар.

За анализу антиоксидативне активности екстракта плодова јагоде у редукцији $^{\bullet}NO$ радикала коришћена је следећа смеша: 18 μl дејонизоване воде, 1 μl метанолног екстракта јагоде, 3 μl $FeSO_4$, 3 μl *DTCS* (*N*-(дитиокарбокси)саркозин, диамонијумова со) и 5 μl натријум-нитропрусида. Узорак је одмах пребачен у тефлонско црево пречника 1 mm и након 2 минута је снимљен EPR спектар.

Интеракција свеже припремљеног раствора DPPH са антиоксидативним компонентама из јагоде проучавана је мерењем интензитета DPPH EPR сигнала и тако што је 28 μl метанола помешано са 1 μL 3,2 mM DPPH и додат је 1 μl метанолног екстракта плодова јагоде. Смеша је пребачена у тефлонску цев пречника 1 mm и затим су снимљени EPR спектри (Nakarada et al., 2021). У свим експериментима за сваки тест понаособ припремљени су и бланк узорци ради добијања контролних сигнала.

3.3.3.2 ЛИПОЗОМИ

Ћелијске мембране су фосфолипидни двослоји за које су везани (на површини или инкорпорирани) различити молекули попут протеина, шећера или других мањих молекула. Фосфолипиди могу спонтано да се организују у сферичне двослојне везикуле, тзв. липозоме. На том феномену је заснована производња синтетичких липозома који су први почели да се употребљавају у терапеутске сврхе, као „наносистеми“ за таргетирану биодистрибуцију лекова и биомолекула (Bulbake et al., 2017). Предност употребе липозома у које се интегришу биоактивне супстанце од интереса је у контролисаној биодистрибуцији чиме је омогућено таргетирано дејство терапеутика (Chemin et al., 2010; Decker et al., 2013; Flaten et al., 2013).

Липозоми могу бити величине од неколико нанометара до неколико микрометара, могу да садрже различити број липидних двослоја и могу имати различит састав и наелектрисање (Bulbake et al., 2017; Uhumwangho and Okor, 2009). Попут природних, састоје се најчешће од фосфолипида и то неутралног фосфатидилхолина, фосфатидинске киселине која је негативно наелектрисана, фосфатидилглицерола, фосфатидилсерина и фосфатидилетаноламина (Jesorka and Orwar, 2008).

3.3.3.2.1 Поступак припреме липозома

Припрема липозома је базирана на процедури формирања танког липидног филма на зиду стакленог балона растварањем липидних компоненти у лако испарљивом растварачу, а затим упаравањем под вакуумом. Хидратацијом овако направљеног филма долази до формирања ламеларних структура, које се при мешању кидају и поново формирају, а том приликом се хидрофобне ивице окрећу ка унутрашњости формирајући липозоме (Mozafari, 2010).

Овако припремљеним липозомима је тешко контролисати димензије, па је липозоме пожељно правити екструзијом кроз мембране одговарајућих димензија (Akbarzadeh et al., 2013).

3.3.3.2.2 Синтеза липозома са екстрактима плодова јагоде

По претходним EPR мерењима одабране су две репрезентативне сорте. Метанолни екстракти две одабране сорте јагоде ('Tea' и 'Aprika') уграђени су у мембрану 1,2-дипалмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин (*DPPC*) липозома. Прво је растворено 2,5 mg *DPPC* у смеси хлороформа и метанола (у запреминском односу 4:1, v/v) у ротационом балону са округлим

дном, а затим је додато 250 μl метанолног екстракта јагоде. Растварач је полако упарен на собној температури коришћењем ротационог вакуумског упаривача. Танки филм који је формиран на зидовима балона је постепено хидратисан са по 250 μl дејонизоване воде до укупне запремине од 2 ml. Након сваког постепеног додавања воде балон је интензивно мешан коришћењем вортекса по 3 минута, а затим сонификован 3 минута у ултразвучном леденом купатилу. Затим је добијена суспензија подвргнута финалној соникацији 20 минута у ултразвучном купатилу. Да би се побољшао квалитет липозома тј. добили липозоми једнаких димензија и боље стабилности, рађена је екструзија суспензије кроз мембрану од 100 nm употребом *Avanti Mini-Extruder* сета (*Avanti polar lipids, USA*) и шприцева марке *Hamilton* запремине 1 ml. Екструзија је једноставан процес пропуштања мултиламеларних липозома кроз филтер/мембрану са порама дефинисаних димензија (у овом случају 100 nm), а све у циљу добијања суспензије липозома чији просечни пречник одговара пречнику пора филтера/мембране (Lapinski et al., 2007). Физиолошки значајан опсег димензија је од 30 до 200 nm (Alves et al., 2013) јер ткива боље пропуштају липозоме ових димензија, а истовремено се и спорије уклањају из организма што је важно, на пример, код одложеног терапеутског дејства лекова који су уграђени у липозоме (Kraft et al., 2014). Екструзија је урађена тако да је суспензија липозома пропуштена кроз мембрану 21 пут, са том разликом да је након последњег проласка задржана у почетном шприцу (Hinna et al., 2016). Липозоми су затим концентровани до запремине од 250 μl коришћењем вакуум концентратора.

Да би се одредила величина и стабилност липозома коришћена је техника динамичког расејања светлости (*dynamic light scattering, DLS*) (Phelps, 1977) помоћу *Malvern Zetasizer Nano ZS90* анализатора. Узорак који чини 750 μl суспензије липозома пребачен је у кивету за једнократну употребу, озрачен ласерским снопом, а интензитет зрачења који се одбијао од површине липозома је мерен под датим углом (мерен је однос величина/зета-потенцијал). Светлосни зрак је расејан групом честица, а угао расејања светлости је обрнуто пропорционалан величини честице (што је мања величина честице, то је већи угао расејања светлости), односно веће честице се крећу спорије од оних мањих димензија (Thomas et al., 2017). Резултати *DLS* мерења су показала да је величина липозома који садрже екстракте јагода између 65 и 69 nm, а вредност зета потенцијала је била -6 mV. То је указало на униформну дистрибуцију и релативну стабилност направљених липозома.

Смањење интензитета *EPR* сигнала DPPH радикала и висина сигнала DEPMPO/ОН адукта мерени су 2 минута након мешања експерименталног раствора и суспензије липозома који садржи екстракте јагоде. Антирадикалска активност израчуната је коришћењем следеће формуле:

$$\Delta h = \frac{h_i - h_x}{h_i} \times 100 \quad (\%) \quad (11)$$

где је h_i интензитет контролног сигнала (липозома без екстракта), док је h_x интензитет сигнала липозома који садрже екстракт јагоде.

Контролни *DPPC* липозоми су припремљени по истом поступку, само без додавања екстракта јагоде (Nakarada et al., 2022, 2020).

EPR техника спинских замки коришћена је да би се снимиле краткоживеће врсте слободних радикала које се генеришу директно у суспензији липозома, као и да се проучава њихова интеракција са липозомима. Сви *EPR* спектри снимљени су коришћењем *Bruker ELEXSYS-II E540* ЕПР спектрометра и при следећим условима: центар поља 3500 G, снага микроталаса 10 mV, фреквенција микроталаса 9,85 GHz, модулациона фреквенција 100 kHz, модулациона амплитуда 1 G, 5 акумулација.

Да би се проучавала интеракција хидроксилних радикала са антиоксидативним једињењима из екстракта јагода у липозомима, мерен је интензитет *EPR* сигнала DEPMPO/ОН адукта, тако што је 26 μl суспензије липозома помешано са 2 μl 5 mM H_2O_2 и 1 μl 100 mM

DEPMPO. Након додавања 1 μl 5 mM FeSO_4 смеша је пребачена у тефлонску цев пречника 1 mm и затим су снимљени *EPR* спектри (Moјović et al., 2005).

Интеракција DPPH слободних радикала са антиоксидативним компонентама из јагоде проучавана је мерењем интензитета *EPR* сигнала DPPH-а и то тако што је у 26 μl суспензије липозома додато 3 μl дејонизоване воде и 1 μl 3,2 mM DPPH. Након трансфера смеше у тефлонску цев пречника 1 mm, снимљени су *EPR* спектри.

Контролни експерименти су рађени под истим процедурама са дејонизованом водом уместо раствора липозома.

3.3.3.3 *EPR* имицинг

За 2D *EPR* снимање, цео плод јагоде је инкубиран у редокс осетљивој, мембрански пропустљивој аминоксил спин проби (10 mM 3-*carbamoyl proxyl*, 3CP) (Dragišić Maksimović et al., 2021). Након 20 минута инкубације, цео плод је стављен у шупљину резонатора да би се визуелизовао *in vivo* распоред аминоксил спин-пробе у различитим ткивима овог воћа. 2D *EPR* снимање вршено је у *L*-области, при следећим условима: снага микроталаса 10 mV, јачина градијента 15 G cm^{-1} , модулациона фреквенција 30 kHz, модулациона амплитуда 1 G.

Ендогене реактивне кисеоничне врсте (ROS) реагују са нитроксидом, редукују га у спински неактивни хидроксиламин што доводи до смањења интензитета сигнала. Стопа смањења интензитета *EPR* сигнала спинског обележивача је мера редокс статуса ткива плода. Интензитет сигнала означен је бојама које су дефинисане арбитарним *EPRI* јединицама: црвена одговара високом интензитету *EPRI* сигнала ($70 \cdot 10^9$), док зелена и плава означавају низак интензитет *EPRI* сигнала ($10 \cdot 10^9$).

3.3.4 Имицинг масена спектрометрија (*Mass Spectrometry Imaging, MSI*)

MSI је веома осетљива, брза и селективна техника за визуализацију просторне дистрибуције молекула. Омогућава идентификацију и локализацију елемената и молекула директно са делова ткива, појединачних ћелија и других биолошких структура, што је важно за детаљно разумевање биолошких процеса до суб-ћелијског нивоа. Упркос чињеници да се *MSI* генерално сматра квалитативном методом, сигнал генерисан овом техником је пропорционалан релативној количини анализата, па је могућа и квантификација. Као главна предност се истиче могућност истовремене детекције и идентификације великог броја познатих и непознатих једињења јер је маса анализата универзални параметар (Winograd, 2015).

Данас је *MSI* претежно *ex vivo* техника хистологије ткива која се користи у патологији и не нуди *in vivo* дијагностичке могућности као што то чине *MRI* (магнетна резонанца) или *PET* (позитронска емисиона томографија). Међутим, успешно се користи као комплементарна техника *in vivo* имицингу за валидацију молекуларне прерасподеле или деградације биомолекула или испоруке лекова у различитим стадијумима болести. Ниједна техника снимања није способна да обезбеди одговарајућу комбинацију молекуларних и анатомских информација у одговарајућој просторној и временској резолуцији и биолошком стању.

Код *MSI* је неопходна десорпција и јонизација молекула са површине узорка који се истражује. Принцип у *MSI* је следећи: аналит се преводи у гасно агрегатно стање ласерским зрачењем или високоенергетским јонским сноповима. Постоји неколико начина добијања слике. Најчешће је то уз помоћ ласерске или јонске микросонде (микронских или субмикронских димензија), која секвенцијално анализира низ изолованих тачака, док се снап микросонде скенира преко површине узорка. Реконструкција имицинга добија се након дводимензионалних *MS* мерења на пресеку узорка. Појединачни масени спектри се добијају за сваку тачку и чувају дигитално. Посебно дизајниран софтвер омогућава одабир сигнала анализата из низа масених спектра и приказује интензитет сигнала за сваку појединачну тачку у 2D низу. Интензитет сигнала је приказан у скали боја, стварајући тако мапу дистрибуције

аналита (Cillero-Pastor and Heeren, 2014; Gessel et al., 2014). Добијање хемијског имиџинга уз помоћ *MS* подразумева често сложене кораке, од саме припреме узорака па све до крајњег резултата који се добија.

MSI је првобитно развијен за дијагностичке примене у медицинским и биомедицинским областима. Међутим, данас почиње да игра важну улогу у квалитету и безбедности хране. *MSI* је нова техника која се може користити за истовремено испитивање садржаја и просторне дистрибуције метаболита, без потребе за скупим антителима, бојењем или компликованом и дуготрајном дериватизацијом, претконцентрацијом, и пречишћавањем узорака (Enomoto, 2021a, 2021b; Enomoto et al., 2020, 2018; Wang et al., 2021).

Карактеризација биомаркера у матриксу јагоде генерално је могућа на два начина: издвајањем различитих биомолекула из плода јагоде анализом екстраката плодова користећи електроспреј јонизацију (*ESI*) или ласерску десорпцију/јонизацију уз помоћ матрикса (*MALDI*) за генерисање јона чиме је могуће проучавати укупан састав поларних и мање поларних биомаркера (Abou-Dib et al., 2022; Hertzog et al., 2017; Liu et al., 2017).

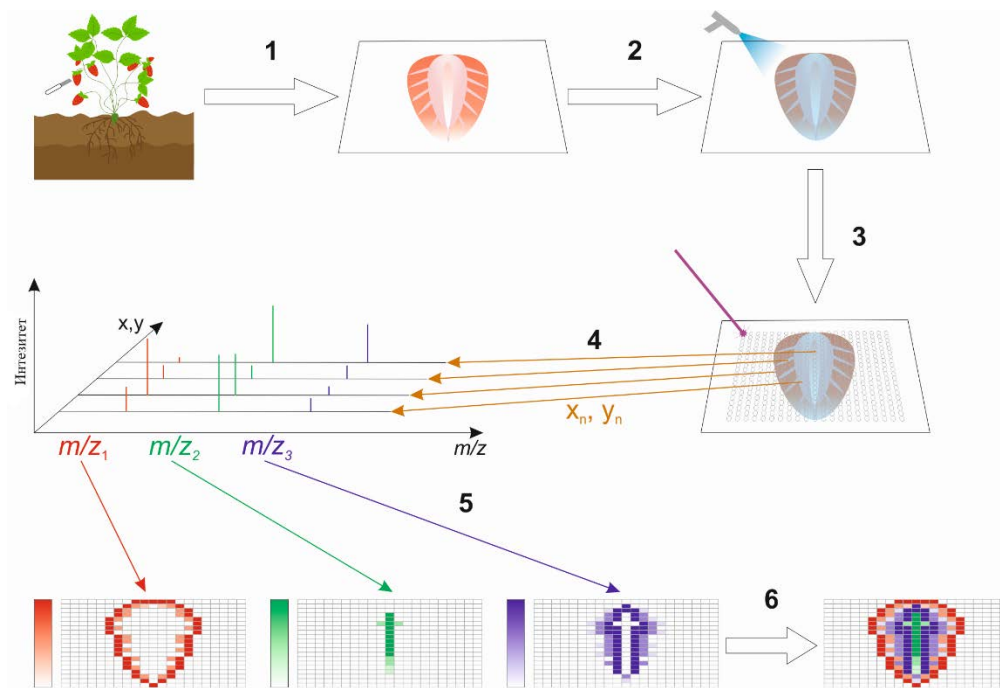
Испитивање просторне дистрибуције једињења овим техникама је отежано услед компликованих процедура припреме узорака за анализе. Међутим, просторна дистрибуција биомаркера у ткиву плода може се окарактерисати применом *MSI*, који омогућава тренутну детекцију једињења у деловима ткива избегавајући процедуре екстракције, раздвајања, пречишћавања или обележавања (Arnaud et al., 2020; Bhandari et al., 2015; Boughton et al., 2016; Perez et al., 2019; Qin et al., 2018; Yoshimura and Zaima, 2020). У ту сврху се генеришу микро пресеци ткива, обично уз помоћ криомикротома. Након тога, ови узорци ткива се прекривају фотоактивним матриксом, који је неопходан за производњу јона биополимера и молекула биомаркера у процесу *MALDI*. Током *MSI* анализе, узорак ткива обложен матриксом је равномерно подељен на тачке и на свакој тачки снима се масени спектар. Из ових резултата масеног спектра могу се генерисати мапе дистрибуције органских једињења што омогућава верификацију молекула у различитим деловима плода.

Уочени интезитет је представљен логаритамски и означен тачкама у боји (плава означава низак интезитет, жута средњи, а црвена висок интезитет). Такође, класе супстанци су означене бројевима и бојама. *ESI*(-) подаци су дати у горњем реду, док су, *ESI*(+) подаци дати у доњем реду. Једињења која нису сврстана ни у једну класу припадају другим класама које нису евалуиране.

3.3.4.1 Припрема узорака и услови снимања

Пресеци смрзнутих јагода дебљине од 80 μm припремани су уз помоћ криомикротома (*Leica CM 1950*). Затим су пресеци пренесени директно на стаклену плочицу која је обложена индијум-калај-оксидом (*ITO: indium tin oxide*). Као *MALDI* матрикс употребљена је 2,5-дихидроксибензојева киселина (*2,5-dihydroxybenzoic acid-DHB*) растворена у ацетону ($c = 30 \text{ g/L}$). Апликација матрикса урађена је уз помоћ *ICP* небулизатора (*Burgener Peek Mira Mist*): притисак спреја од 1 бара, проток матрикс раствора 300 $\mu\text{L/min}$, нанесено је пет слојева матрикса, 5 секунди прскања по слоју, 10 минута сушења по слоју. Скенирање је рађено уз помоћ *Epson Perfection V500 Photo* са резолуцијом слика од 4800 *dpi*. Анализа *MS* имиџинга попречних и лонгитудиналних пресека јагода са *FT-ICR MS* рађена је у позитивном моду $m/z = 153 - 2000 \text{ Da}$ и резолуције 2 *M*. Анализа добијених података вршена уз помоћ специјално прилагођеног *MATLAB* програма (слика 7).

MS експерименти урађени су на уређају 15 *T solariX FT-ICR-MS* (*Bruker Daltonics*) опремљеном са *ESI* извором и ласером *Smart Beam II* (*Nd:YAG* ласер троструке фреквенције, $\lambda = 355 \text{ nm}$, трајање пулса 3 *ps*, енергија пулса 500 μJ , снаге 170 *kW*, просечне снаге 1.5 *W*) за *MALDI-MS* анализе.



Слика 7. Шематски приказ припреме узорака за MS имидинг

1 – припрема пресека смрзнутих плодова јагоде и пренос на стаклену ITO-плочицу; 2 – апликација MALDI матрикса уз помоћ ICP небулизатора; 3 – просторна анализа MS имидинга; 4 – MS евалуација сваке анализиране тачке; 5 – визуализација дистрибуције одабраних односа масе и наелектрисања (m/z) дуж узорака ткива; 6 – комбинација образаца дистрибуције вишеструких m/z .

3.3.5 Ултраљубичаста и видљива спектроскопија

Ултраљубичаста-видљива (UV/Vis, *ultraviolet-visible*) спектроскопија проучава електромагнетно зрачење таласних дужина од 200 до 800 nm. Опсег од 200-400 nm је познат као блиска ултраљубичаста област, а опсег од 400-800 nm је видљива област (Aleixandre-Tudo et al., 2018). Ова метода се назива и електронска спектроскопија, јер зрачење у наведеној области таласних дужина апсорбују електрони. Током апсорпције зрачења одговарајуће таласне дужине, електрони прелазе из стања ниже енергије (тзв. основно стање) у стање више енергије (тзв. побуђено стање). Разлика енергија између ова два стања је апсорбована енергија. У скоро свим молекулама, електрони могу апсорбовати зрачење различитих енергија због постојања већег броја побуђених стања. Интензитет апсорпције светлости дефинисан је помоћу Ламбер-Беровог закона (*Lambert-Beer*). Што је већи број молекула који могу апсорбовати светлост дате таласне дужине, то ће бити већи интензитет пика на апсорпционом спектру (Aleixandre-Tudo et al., 2018). Функционалне групе и везе у молекулу које имају способност апсорпције ултраљубичастог и видљивог зрачења зову се хромофоре (Harvey, 2000). Ако су за хромофоре директно везане засићене групе са слободним електронским паровима (-OH, -NH₂, -SH, -Cl), долази до померања апсорпције ка већим таласним дужинама, па се такве групе зову ауксохроме (Aleixandre-Tudo et al., 2018).

UV/Vis спектроскопија се често користи у лабораторијској пракси јер је релативно једноставна и економски приступачна. Ова спектроскопска метода је погодна за квантитативну анализу која се заснива на већ поменутом Ламбер-Беровом закону, односно линеарној зависности апсорбанције од концентрације анализата, када се непозната концентрација датог анализата једноставно читава са калибрационе праве одговарајућег стандардног једињења. Поред тога, овом методом се могу одређивати и константе брзине и равнотеже хемијских реакција, константе дисоцијације, као и кинетика ензимских реакција

(Maria Porcu, 2018). Недостаци ове методе могу бити ти што је могуће проучавати само једињења која апсорбују светлост у UV или видљивом делу спектра, која су у течном стању, а добијени резултати у великој мери зависе од pH, температуре и присуства нечистоћа.

3.3.5.1 Коришћени инструменти

У овој дисертацији је UV/Vis спектроскопија коришћена како би се одредили садржаји укупних фенолних једињења, укупних антоцијанина, укупан антиоксидативни капацитет једињења који се налазе у плодовима јагоде, концентрације протеина, али и активност ензима пероксидазе и полифенол оксидазе. Укупни садржај фенола, антоцијанина и концентрација протеина снимани су на *Multiskan® Spectrum UV/Vis* спектрофотометру (*Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland*), док је активност ензима (пероксидазе и полифенол оксидазе) и укупна антиоксидативна активност одређивана на *Shimadzu* спектрофотометру (*UV-2501 PC 21, Kyoto, Japan*).

3.3.5.2 Одређивање садржаја укупних фенола (TPC – *Total Phenolic Content*)

Укупни садржај фенола у екстракту јагода одређиван је помоћу *Folin–Ciocalteu* реагенса по методи прилагођеној за мерење у микротитар плочама (Maksimović and Živanović, 2012). Овај метод се сада користи рутински у многим лабораторијама за одређивање садржаја укупних фенола преко одређивања редукционог капацитета антиоксиданса (фенола) и заснован је на хемијској редукцији *Folin–Ciocalteu* реагенса, који је мешавина оксида волфрама и молибдена (Singleton and Rossi, 1965). Производ редукције ових металних оксида је плаве боје чији је максимум апсорпције на 724 nm. Интензитет апсорбоване светлости на тој таласној дужини је пропорционалан концентрацији фенола (Waterhouse, 2002). Као стандард за израду калибрационе криве користи се гална киселина (0–340 µg GA/ml), па се резултати анализа представљају преко еквивалената галне киселине.

3.3.5.2.1 Припрема компоненти за одређивање TPC

А) Припрема раствора галне киселине (GA) за стандардну криву. GA се припрема у концентрацијама 0,1, 0,5, 1, 1,5 и 2 mM серијским разблаживањем раствора највише концентрације (2 mM стандардног раствора) који је припремљен у 80% метанола.

Б) *Folin–Ciocalteu* реагенс. 0,25 N раствора припремљен је тако што је 12,5 ml 2 N *Folin–Ciocalteu* реагенса растворено у 100 ml дејонизоване воде. Инкубира се 5 минута на собној температури заштићен од светлости, уз константно мешање на магнетној мешалици.

В) 0,2 M раствор натријум карбоната је припремљен растварањем 0,572 грама $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ (M_w 286.14 g/mol) у 10 ml воде.

3.3.5.2.2 Процедура за одређивање TPC

У 475 µl 0,25 N *Folin–Ciocalteu* раствора дода се 50 µl стандарда GA, 50 µl воде (коришћена је као слепа проба или „blank“) или 50 µl узорка. Инкубира се 3 минута на собној температури, а затим се додаје по 475 µl 0,2 M раствора натријум-карбоната и инкубира 60 минута на собној температури.

Због економичности и смањења отпада за спектрофотометријска мерења коришћене су микроплоче са 96 места. У сваки базенчић стављено је по 200 µl инкубираног раствора и очитана је апсорбанца на 724 nm. За израчунавање концентрација укупних фенола у узорцима метанолних екстраката плодова јагоде коришћена је једначина стандардне праве, а резултати су изражени као mg еквивалента галне киселине по граму свеже масе плода (mg GA equiv g⁻¹ FW).

3.3.5.3 Одређивање укупног антиоксидативног капацитета (*TAC – Total Antioxidant Capacity*)

Укупна антиоксидативна активност одређена је тзв. *ABTS* (2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) методом (Arnao et al., 1999). Ова колориметријска метода се заснива на праћењу редукције претходно генерисаног, зелено обојеног *ABTS* радикал катјона (*ABTS*^{•+}) до безбојног неутралног облика. *ABTS*^{•+} се редукује у присуству антиоксиданата из узорка, као што су аскорбат или феноли, који донирају водоник, што доводи до смањења апсорбанције.

Генерисање интензивно зелено обојеног *ABTS* катјона могуће је са водоник-пероксидом у присуству пероксидазе из рена (*horse radish peroxidase – HRP*), која олакшава реакцију.

3.3.5.3.1 Припрема компоненти за одређивање *TAC*

Реакциона смеша за одређивање *TAC* садржи 2 mM *ABTS*, 15 μM водоник-пероксида и 0,25 μM раствор пероксидазе из рена у 50 mM калијум-фосфатном пуферу (*pH* 7,5) и припрема се на следећи начин:

А) 50 mM калијум-фосфатни пуфер је припремљен растварањем 0,23 g калијум-дихидрогенфосфата (KH_2PO_4 , *Mw* 136,09 g/mol) и 0,58 g дикалијум-хидрогенфосфата (K_2HPO_4 , *Mw* 174,18 g/mol) у 100 ml дејонизоване воде. Вредност *pH* до 7,5 подешавана је 1M раствором калијум-хидроксида (KOH). Фосфатни пуфер је припремљен непосредно пре употребе и држан је на +4° C.

Б) 2 mM *ABTS* је припремљен растварањем 0,11 g *ABTS* (*Mw* 548,68 g/mol) у 100 ml претходно припремљеног калијум-фосфатног пуфера. До мерења је чуван на +4° C, заштићен од светлости.

В) Раствор 15 μM водоник-пероксида припремљен је растварањем 1 μl 30% водоник-пероксида и 999 μl дејонизоване воде. До мерења је чуван на +4° C, заштићен од светлости.

Г) 0,25 μM раствор пероксидазе из рена (*HRP*, тип II) је припремљена растварањем 1,125 mg *HRP* у 1 ml воде. До мерења је чувана на +4° C, заштићен од светлости.

Д) За израду стандардне праве коришћен је сет раствора *L* – аскорбинске киселине (*AA*) концентрације од 0,1 до 0,8 mM. Прво је припремљен концентровани раствор (0,8 mM стандардног раствора) растварањем 0,014 g *AA* (*Mw* 176,1 g/mol) у 100 ml воде, а затим је његовим серијским разблаживањем добијен сет раствора концентрација 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 mM.

3.3.5.3.2 Процедура за одређивање *TAC*

За мерење апсорбанције је коришћена кивета од 1 ml, а реакциона смеша се састојала од 980 μl раствора *ABTS* у пуферу, 1,55 μl водоник-пероксида и 10 μl *HRP*. Реакција је праћена на таласној дужини од 730 nm на 25 °C током 5 минута. Када се формирао *ABTS* катјон радикал и сигнал постао стабилан, додато је по 10 μl сваког стандарда или по 10 μl метанолног екстракта јагода. Смањење апсорбанције је последица редукције *ABTS*-катион-радикала, а разлика апсорбанције је мера антиоксидативне активности стандарда, тј. узорка. Квантификација је вршена помоћу једначине стандардне криве, а резултати су изражени као милиграм еквивалента *AA* по граму свеже масе јагоде (mg *AA* equiv g⁻¹ FW).

3.3.5.4 Одређивање садржаја укупних антоцијанина (*Total Anthocyanin Content – TACY*)

Антоцијанини у раствору подлежу реверзibilним структурним промена са променом *pH* вредности, што за последицу има упадљиву промену апсорпционих спектра. Ова особина антоцијанина је искоришћена за њихово спектрофотометријско одређивање *pH* диференцијалном методом. На *pH* 1 јавља се црвено обојени флавилијум јон, а на *pH* 4.5 безбојна хемиацетална база. *pH* – диференцијална метода се заснива на овој трансформацији и омогућава брзо и тачно мерење укупних антоцијанина чак и у присуству полимеризованих

и деградираних пигмената, као и у присуству других ометајућих компоненти. Након екстракције антоцијанина, метанолни екстракт се разблажи са пуфером калијум-хлорида (pH 1) и ацетатним пуфером (pH 4,5).

3.3.5.4.1 Припрема компоненти потребних за одређивање садржаја укупних антоцијанина

За одређивање садржаја укупних антоцијанина припремљено је:

А) 0,025 М калијум-хлоридни пуфер, pH 1 и растварањем 1,86 g KCl у 980 ml дејонизоване воде.

Б) 0,4 М натријум-ацетатни пуфер pH 4,5. растварањем 54,43 g $CH_3CO_2Na \cdot 3H_2O$ у 960 ml дејонизоване воде.

Подешавање pH до вредности 1 и 4,5 вршено је концентрованом хлороводоничном киселином (HCl). При сваком мерењу пуфери су припремани свежи у потребној пропорционално мањој запремини.

3.3.5.4.2 Процедура за одређивање садржаја укупних антоцијанина

За спектрофотометријска мерења коришћене су микротитар плоче са 96 бунара са равним дном. У сваки бунарчић стављено је по 200 μ l пуфера и 2 μ l узорка.

Апсорбација је мерена на две таласне дужине, λ_{max} = 510 nm и на λ = 700 nm (ради корекције) а квантификација се врши по следећој формули:

$$A = (A_{\lambda_{max}} - A_{700})_{pH\ 1} - (A_{\lambda_{max}} - A_{700})_{pH\ 4,5} \quad (12)$$

Из добијене вредности апсорбације рачуна се концентрација антоцијанина по следећој формули:

$$C \text{ (mg/100 g FW)} = \frac{A \times Mw \times DF \times 1000}{(\epsilon \times 1)} \quad (13)$$

где је A – добијена вредност апсорбанце, Mw – молекулска маса, DF – фактор разблажења, а ϵ – моларна апсорптивност. Молекулска маса и моларна апсорптивност одговарају предоминантном антоцијанину у узорку, који је у случају јагода пеларгонидин-3-*O*-глукозид (ϵ = 17 330 Lmol⁻¹cm⁻¹). Резултати су изражени у mg еквивалента пеларгонидин-3-*O*-глукозида на 100 грама свеже масе јагоде (mg P-3-G equiv 100 g⁻¹ FW).

3.3.5.5 Одређивање концентрације протеина

Концентрација укупних протеина одређивана је Брадфордним есејом (*Bradford total protein assay*) (Bradford, 1976). То је колориметријски протеински тест, заснован на везивању боје *Coomassie brilliant blue G-250* за бочне групе аминокиселина аргинина, триптофана, тирозина, хистидина и фенилаланина. Везивањем анјонске боје долази до брзог померања максимума апсорпције боје, од 465 nm до 595 nm (Garrett et al., 2013). *Coomassie brilliant blue G-250* боја постоји у три облика: анјонском (плаве боје), неутралном (зелене боје) и катјонском (црвене боје). У киселим условима, црвени облик боје се претвара у плави облик, везујући се за протеин који се испитује. Ако нема протеина за везивање, раствор ће остати црвен. Формирање комплекса могуће је због хидрофобних интеракција и електростатичких сила између боје и протеина (Ninfa et al., 2010). Повећање апсорбације на 595 nm је пропорционално количини везане боје, а тиме и количини (концентрацији) протеина присутног у узорку (Kruger, 2009). За разлику од других протеинских тестова, Брадфорд протеински тест је мање подложен интерференцији различитих хемијских једињења као што су натријум, калијум, или чак угљени хидрати попут сахарозе, који могу бити присутни у узорцима из којих се одређују протеини. Међутим, висока концентрација пуфера ће изазвати

лажно повећану концентрацију протеина услед исцрпљивања слободних протона из раствора коњугованом базом из пуфера, те стога треба користити пуфере нижих концентрација.

Предност методе је у њеној једноставности извођења и припреме реагенса и узорака. Везивање боје и протеина се одвија веома брзо (за највише 2 минута), а комплекс је стабилан око сат времена (Bradford, 1976).

3.3.5.5.1 Припрема компоненти за одређивање укупне концентрације протеина

За одређивање садржаја укупних протеина припремљено је:

А) 50 mM калијум-фосфатни пуфер *pH* 7 – протокол је исти као и код припреме пуфере за ТАС

Б) Стандардни раствори говеђег серум албумина (*Bovine serum albumin – BSA*). Припремљене су серије раствора стандарда следећих концентрација: 100, 250, 500, 750, 1000 µg/ml у пуферу. Концентровани раствор („шток“) припремљен је растварањем 3 mg *BSA* у 3 ml пуфера. Даљим његовим разблаживањем добијене су ниже концентрације стандарда. Стандарди су наносени у дупликату и приликом израчунавања коришћена је њихова средња вредност.

В) комерцијално доступан *Bradford* – ов реагенс (*Merck KGaA, Darmstadt, Germany*). Потребна количина реагенса је по 200 µl за сваки узорак, стандарде и слепу пробу.

3.3.5.5.2 Процедура за одређивање концентрације протеина

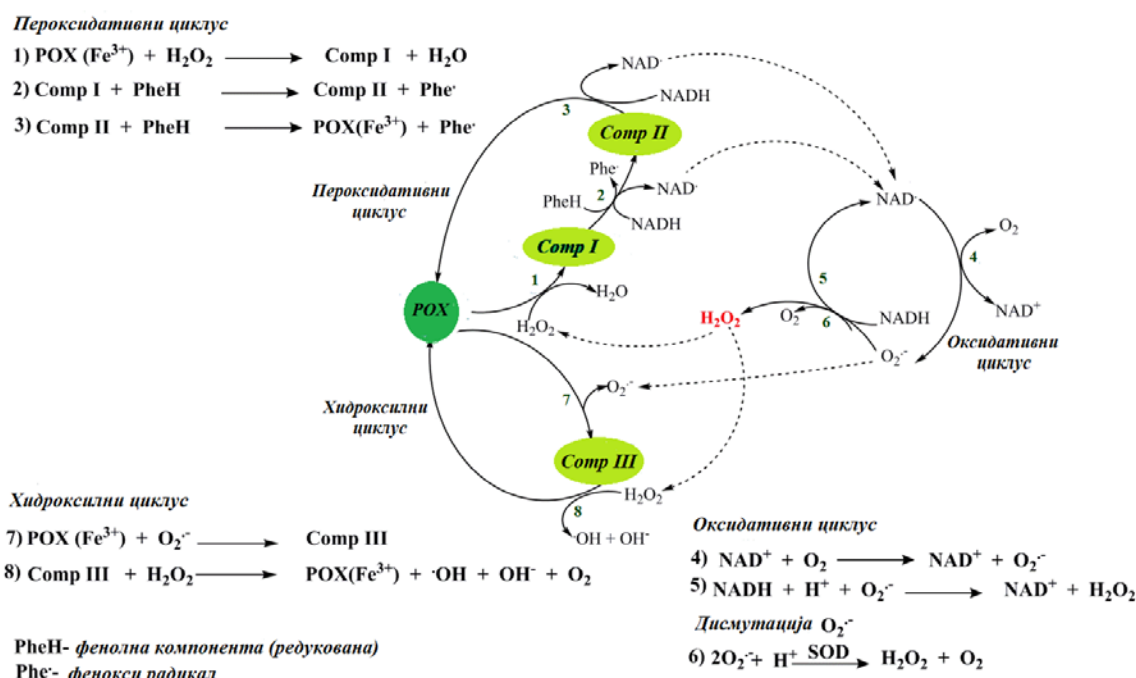
За спектрофотометријска мерења коришћене су микротитар плоче са 96 места. У сваки базенчић стављено је по 200 µl *Bradford*–овог реагенса, а затим додато по 10 µl *BSA* стандарда, узорака и следеће пробе. Апсорбанца је читавана на 595 nm. Од добијених апсорбанци за растворе стандарда креирана је калибрациона крива, а затим је концентрација протеина прерачуната преко једначине калибрационе криве. Резултати су изражени у mg протеина по ml екстракционог раствора.

3.3.5.6 Одређивање активности ензима пероксидазе (POD)

Пероксидазе су класа ензима који се могу наћи у животињским и биљним ткивима, али и код микроорганизама. Пероксидазе биљака су суперфамилија протеина подељених у три различите класе (Passardi et al., 2005):

- 1) Класа *I* су интрацелуларне пероксидазе (*EC* 1.11.1.5/6/11) које обухватају цитохром Ц пероксидазе и аскорбат пероксидазе;
- 2) Класа *II* су екстрацелуларне пероксидазе гљива (*EC* 1.11.1.13/14) које обухватају лигнин пероксидазе и манган пероксидазе;
- 3) Класа *III* су екстрацелуларне пероксидазе биљака (*EC* 1.11.1.7).

Биљне пероксидазе класе *III* (*POD*, *EC* 1.11.1.7) су гликозиловани хемопротеини и неспецифична су подкласа оксидоредуктаза која катализује оксидацију различитих супстрата, као што су феноли, ароматични амини, индоли и сулфонати, користећи водоник-пероксид као оксидант (Veljović Jovanović et al., 2018). Осим тога *POD* у оксидативном циклусу у присуству редуктаната (*NADH* или фенола) могу произвести водоник-пероксид, док у хидроксилном циклусу настаје веома реактивни хидроксилни радикал (слика 8.).



Слика 8. Преузето и прилагођено (Chen and Schopfer, 1999; Liskay et al., 2003)

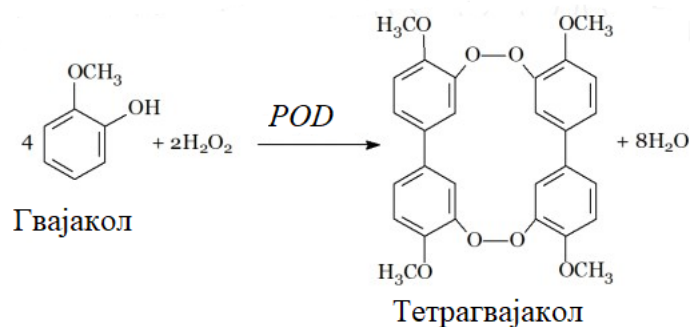
Пероксидазе су укључене у широк спектар физиолошких процеса биљака у свим фазама развоја биљака (нпр. лигнификација, суберинизација, катаболизам ауксина, антиоксидативне реакције) (Passardi et al., 2006, 2005, 2004; Veljović Jovanović et al., 2018; Welinder et al., 2002). Велики је број изоензима пероксидаза у биљкама и могу да се разликују по молекулској маси, стабилности на одређеној температури и pH , специфичности за супстрат, као и физиолошкој улози (Onsa et al., 2004; Passardi et al., 2006, 2005; Veljović Jovanović et al., 2018; Welinder et al., 2002). Ови ензими локализовани су интрацелуларно (у вакуолама и цитоплазми) и ванћелијски у апопласту (Dragišić Maksimović et al., 2014) и ћелијском зиду (Ferrerres et al., 2011; Kukavica et al., 2012; Takahama, 2004). Такође, детектоване су и у биљним мембранама, пероксизомима, митохондријама и гранулираном ендоплазматичном ретикулуму (Mika and Lühje, 2003).

3.3.5.6.1 Припрема компоненти за одређивање активности пероксидаза

- 50 mM калијум-фосфатни пуфер pH 6 – већ описано у поглављу 3.3.5.3.1
- 10 mM водоник-пероксид
- 0,25% (v/v) гвајакол

3.3.5.6.2 Процедура за одређивање активности пероксидаза

Испитивања активности ензима пероксидазе су вршена помоћу гвајакола као донора водоника према методи описаној у литератури (Hammerschmidt et al., 1982). То је колориметријски тест где се прати формирање тетрагвајакола ($\epsilon = 25,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) оксидовањем гвајакола од стране пероксидаза у присуству водоник-пероксида као супстрата на 470 nm (слика 9). Реакциона смеша се састојала од 0,25% (v/v) гвајакола и 10 mM водоник-пероксида у 50 mM калијум фосфатом пуферу (pH 6).



Слика 9. Преузето и прилагођено (Radulescu et al., 2019)

У кивету од 1 ml стављено је 970 μl пуфера са гвајаколом по 20 μl екстракта јагоде и 10 μl водоник-пероксида. Активност ензима је затим израчуната помоћу следеће формуле:

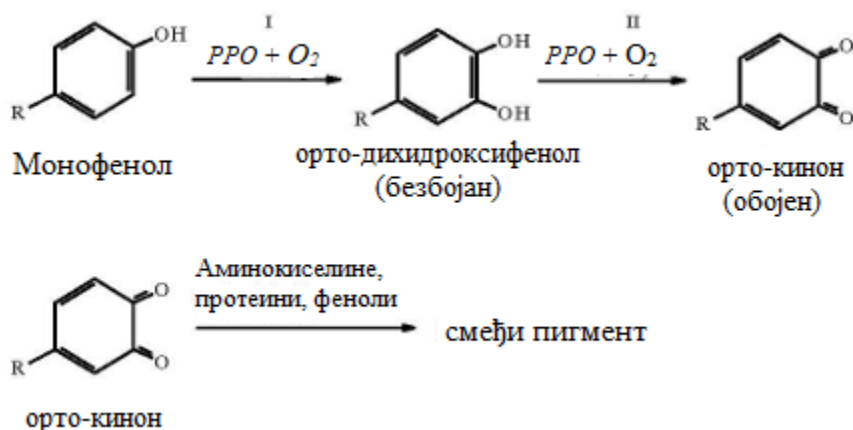
$$A_{akt} (\text{U/ ml}) = \frac{V_{uk} \times \Delta A}{V_e \times 25,5} \times 4 \quad (14)$$

где је V_{uk} – укупна запремина реакционе смесе, ΔA – промена апсорбанце, V_e – запремина узорка, 25,5 – екстинциони коефицијент тетрагвајакола на 470 nm ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

Јединица активности ензима (U) је дефинисана као количина ензима која оксидује један микромол (μM) супстрата по минути на 25 °C. Специфична активност пероксидазе се изражава у јединицама по милиграму укупних протеина ($\text{U mg}^{-1} \text{prot.}$).

3.3.5.7 Одређивање активности ензима полифенолоксидазе (PPO)

Полифенол оксидазе спадају у групу металоензима који садрже јоне бакра у активном центру, а локализоване су у пластидима здравог биљног ткива, у неактивној форми (Vaughn and Duke, 1984). Користећи кисеоник као косупстрат, катализују хидроксилацију монофенола до орто-дифенола, а потом оксидацију орто-дифенола у орто-хиноне, који затим могу реаговати међусобно или са аминима, тиолима или фенолима. При том настају обојена једињења меланини реакцијама ензимског тамњења или меланизације (Kruger and American Association of Cereal Chemists, 1987).



Слика 10. Реакција меланизације

До реакције меланизације долази при механичким оштећењима биљног ткива (нпр. инфекција или повреда настала приликом резивања воћа или манипулацијом плодовима). што доводи до оштећења пластида и тада долази до активације PPO које реагују са фенолним једињењима која су просторно изолована у вакуолама биљних ћелија. На интензитет ове реакције утиче степен активности ензима, количина супстрата, количина кисеоника,

температура, pH и време трајања реакције. Ензимско тамњење након почетне фазе у којој учествују ензими, прелази у неензимско при чему долази до секундарних реакција што утиче на промену боје плодова. Ове реакције су веома сложене и могу да узрокују промену мириса, укуса, боје, текстуре и ароме плода.

3.3.5.7.1 Припрема компоненти за одређивање активности полифенолоксидазе (PPO).

А) 100 mM калијум-фосфатни пуфер pH 6,5 – у 100 ml дејонизоване воде растворено је 1,16 g дикалијум хидроген фосфата и 0,46 g калијум дихидроген фосфата. Вредност pH подешавана је са 1M раствором калијум хидроксида (KOH).

Б) 40 mM пирокатехол

3.3.5.7.2 Процедура за одређивање активности полифенолоксидазе (PPO)

Активност ензима полифенолоксидазе из екстракта плодова јагоде одређена је спектрофотометријски на 410 nm, а реакциона смеша се састојала од 100 mM калијум-фосфатног пуфера (pH 6,5) и 40 mM пирокатехола. Јединица активности ензима (U) дефинисана је као промена апсорбанце за 0,001 по минути у 1 ml реакционе смеше, а специфична активност PPO је изражена у јединицама по милиграму укупних протеина ($U\ mg^{-1}\ prot.$).

3.3.6 Изоелектрично фокусирање (IEF)

Изоелектрично фокусирање је техника раздвајања протеина на гелу по разликама у њиховој изоелектричној тачки (pI). То је врста зонске електрофорезе која користи предност чињенице да је укупно наелектрисање на молекулу од интереса функција pH околине. Протеини се у присуству pH градијента крећу због свог наелектрисања све док не дођу до зоне са вредношћу pH при којој немају нето наелектрисање тј. до своје изоелектричне тачке pI . Протеини ће зато достићи равнотежно „нулто“ стање и фокусирати се у уске зоне. Овом техником могуће је раздвојити компоненте чије се pI вредности разликују за свега 0,02 pH јединице.

Најчешћи начин постизања pH градијента за изоелектрично фокусирање је уградња нискомолекуларних амфотерних молекула у полиакриламидни гел, у процесу званом предфокусирање. Под дејством електричног поља амфолити, који су насумично распоређени у гелу, почињу да се крећу према једној од електрода, зависно од свог наелектрисања. Њихов пут према електроди се зауставља када им нето наелектрисање буде једнако нули и на том месту се концентришу у уској зони. Када се заврши концентрисање амфолита постиже се равнотежно стање и у гелу се успоставља pH градијент. Када се након завршеног предфокусирања протеини нанесу на гел долази до миграције протеина до места на коме се pH поклапа са њиховом изоелектричном тачком. Узорак се код изоелектричног фокусирања може нанети било где на гелу јер ће молекули са истом pI вредности увек путовати ка истој позицији.

3.3.6.1 Припрема гела и услови

Изоелектрично фокусирање пероксидазних изоензима примењено је на пуферским екстрактима 12 репрезентативних сорти јагоде. Коришћен је 7,5% полиакриламидни гел дебљине 1 mm који је садржао: воду, 30% акриламида, 50% глицерола, 3% раствора амфолита (pH 3-9), APS и TEMED. pH градијент је био у распону од 3,5 до 10 и раздвајање је вршено помоћу LKB 2117 Multiphor II, LKB Instruments Ltd., South Croydon, Surrey, U.K. Након полимеризације гела, која уобичајено траје око 45 минута, извршено је предфокусирање од 30 минута при следећим условима: 2000 V, 50 mA и 10 W. Затим је на гел нанета запремина екстракта јагоде која је садржала по 10 μg протеина. Након тога, извршено је фокусирање у трајању од 150 минута при следећим условима: 2000 V, 50 mA и 15 W. Након испирања гела дестилованом водом, бојење гела је извршено 10% метанолним раствором α – нафтола и 0,03%

водоник-пероксида у 50 mM калијум-фосфатном пуферу pH 6,5 током 10 минута на температури од 25 °C (Dragišić Maksimović et al., 2021).

3.3.7 Анализа садржаја растворљиве суве материје (*soluble solids content – SSC*) и укупних киселина (*total acid – TA*)

Најважније компоненте хемијског састава воћа су: вода, угљени хидрати, киселине, витамини, протеини, минералне материје, пектин. Вода може да буде присутна од 65% (као нпр. у авокаду) до 93% (на пример, у дињама и јагодама) и неопходна је за одвијање метаболизма у свим ћелијама биљака. Тако висок садржај воде смањује енергетску, али пружа високу физиолошку вредност, јер су нутритивно вредне супстанце воћа водени раствори. После воде, најзаступљенији састојци су угљени хидрати, који заједно са киселинама представљају основну компоненту за укус воћа. Јагоде са задовољавајућим сензорним карактеристикама често имају висок садржај шећера и релативно низак садржај органских киселина.

Под појмом растворљиве суве материје подразумевају се растворљиве (шећери, киселине и др.) и нерастворљиве материје (скроб, целулоза, хемицелулоза, протопектин и др.).

Садржај растворљиве суве материје у овој докторској дисертацији је одређен помоћу дигиталног рефрактометра (*Pocket PAL-1, Atago, Japan*) и очитани резултати су изражени у процентима.

Рефрактометрија је метода за мерење индекса преламања, што је једна од карактеристика супстанце. Индекс преламања омогућава одређивање других карактеристика које имају велику практичну примену - густина медијума, садржај нечистоћа, концентрација раствора и квалитет. Метода се заснива на феномену преламања светлости на граници две средине, у којима се светлост простира различитим брзинама. Принцип рада уређаја заснива се на мерењу критичног угла (угла укупне унутрашње рефлексије) и израчунавању индекса преламања, применом Шнеловог закона. Индекс преламања супстанце, мера је брзине светлости кроз супстанцу и дефинисан је као однос брзине светлости у супстанци и брзине светлости у вакууму. Брзина светлости кроз медијум зависи од таласне дужине светлости, али такође је и функција температуре. Повећање температуре обично доводи до смањења густине и светлост путује брже кроз медијум ниже густине. Што значи да се индекс преламања смањује са повећањем температуре.

Мерење индекса преламања је једноставна и корисна метода за одређивање концентрације супстанци и њихових карактеристика. Често се користи у истраживачким и индустријским лабораторијама, како за контролу квалитета тако и за развој производа. Такође се користи за проучавање фармацеутских производа, анализу хране (укључујући контролу квалитета меда), процену парфема и мириса, пића и лекова.

Brix, или проценат (%) шећера, је међународно призната скала, која повезује концентрацију сахарозе у води на 20 °C са индексом преламања раствора. Већина прехранбених производа је сложенија од раствора сахарозе; многи други растворљиви састојци могу допринети укупном индексу преламања. Уопштеније, рефрактометри се користе за мерење индекса преламања чистих супстанци (течности) као јединствене карактеристике или се користе за мерење концентрације једне супстанце растворене у другој. Рефрактометрија је стога идеална техника за контролу квалитета у многим индустријама. Најчешћа употреба рефрактометара је у индустрији хране и пића где се садржај растворених чврстих материја у течним прехранбеним производима.

Укупне киселине (*TA*) су мерене дигиталном биретом, а за титрацију узорка је коришћен 0,1 М NaOH до крајње тачке титрације. *TA* је изражена као проценат еквивалената јабучне киселине.

Индекс укуса (*Taste index*) се дефинише као однос растворљивих сувих материја (*SSC*) и укупних киселина (*TA*) и користи се за процену укуса воћа, а зависи од степена зрелости плода. Што је већа његова вредност то је укус плода слађи и обрнуто (Wongkhot et al., 2012).

3.3.8 Одређивање концентрације витамина Ц

Нутритивно најважнија киселина присутна у воћу је *L*-аскорбинска киселина, односно витамин Ц. Воће је, заједно са поврћем, главни извор овог витамина у људској исхрани. Концентрација *L*-аскорбинске киселине може да варира између 2 и 30 mg на 100 g код јабука и крушака, до преко 1000 mg на 100 g код шипурка и појединих сорти трешње. Међутим, већина воћа, укључујући цитрусе, има вредности од 30-100 mg на 100 g (Kalt et al., 1999).

Витамин Ц је у овој докторској дисертацији квантификован коришћењем сета рефлектометра (*Merck RKflek*, *Merck KGaA*, *Nemačka*) пратећи препоруке литературе (Pantelidis et al., 2007). Резултати су изражени као mg аскорбинске киселине на 100 g свежe масе (mg 100g⁻¹ FW).

Рефлектометрија је недеструктивна аналитичка техника која користи рефлексију светлости од површина и интерфејса за мерење карактеристика као што су интензитет боје, дебљина филма и индекс преламања.

Као и код других фотометара, главни елементи рефлектометара укључују извор светлости, обично дуговечне лед диоде специфичних таласних дужина које су фокусиране на површину узорка преко система сочива, а рефлектована светлост се мери детекторима.

Рефлектометри су често дизајнирани да мере физичке карактеристике површина као што су промене боје на тест траци. У овом приступу, узорак се може ставити на тест траку и његова вредност се може упоредити са одговарајућим контролама и стандардима. Разлика у интензитету између емитоване и рефлектоване светлости омогућава квантитативно одређивање концентрације специфичних анализата.

Рефлектометрија се обично користи у индустријским апликацијама као брза, осетљива метода за квантификацију широког спектра органских и неорганских параметара у води, храни, пићима и узорцима животне средине, као и друге различите употребе као што су површинска анализа грађевинских материјала и квантификација боје коже.

3.3.9 Спектрофлуориметрија

Флуоресцентна спектроскопија (спектрофлуориметрија) је специфична и осетљива метода којом се анализира флуоресценција узорка. Овом методом мери се интензитет емитованог зрачења узорка у функцији таласне дужине емитоване светлости. Молекул узорка након апсорпције упадног зрачења из *UV-Vis* дела спектра добија одређену енергију, па прелази из основног у побуђено електронско стање. Након апсорпције светлости могу се јавити две врсте радијационе деактивације молекула: флуоресценција и фосфоресценција. Разлика између њих је у различитом механизму настанка и времену трајања. Флуоресценција се завршава одмах после престанка побуђивања, док фосфоресценција се не завршава након уклањања извора побуђивања и може трајати и по неколико минута или дуже. Приликом враћања у основно електронско стање молекул емитује електромагнетно зрачење веће таласне дужине од оног којем је изложен. У већини случајева емитована светлост има дужу таласну дужину и самим тим нижу енергију од апсорбованог зрачења. Флуоресценција се може користити у квантитативној и квалитативној анализи супстанци. Изузетно је високе осетљивости, и то од 10 до 1000 пута веће него спектрофотометријске методе. На основу зависности интензитета флуоресценције у функцији концентрације супстанце може се одредити непозната концентрација те супстанце у испитиваном узорку.

Принцип рада спектрофлуориметра је следећи: ксенонска лампа производи снап светлости који пада на ексцитациони монохроматор који раздваја светлост по таласним дужинама. Затим, долази до интеракције зрачења са узорком. Одговарајући филтери емитовано зрачење узорка усмеравају на фотомултипликаторски детектор који записује интензитета зрачења за различите таласне дужине, чиме се добија емисиони спектар узорка тј. интензитет флуоресценције у функцији таласних дужина.

3.3.9.1 Коришћени инструмент и услови

Спектри флуоресценције узорака јагода снимљени су коришћењем *Fluorolog FL3-221* спектрофлуориметра (*Jobin Yvon Horiba*, Париз, Француска). Као извор светлости овај апарат има ксенонску лампу 450 W и фотомултипликатор. За мерење је коришћена кивета од 1 ml, са оптичким путем од 10 mm у конфигурацији под правим углом. Емисиони спектар екстракта се састоји од две или више спектралних компоненти, које указују на присуство различитих флуорофора. За сваки узорак (укупно 12) извршено је мерење серије емисионих спектра на различитим таласним дужинама да би се одредио број и емисиони профили спектралних компоненти. На овај начин добијене су матрице екситације-емисије (ЕЕМ) које су даље анализиране мултиваријантном анализом. Опсег екситационих спектра био је 340–382 nm, док су опсези снимљених емисионих спектра били 399–750 и 400–600 nm. Време интеграције било је 0,1 s, померај таласне дужине у мерењима екситације је био 3 nm, а емисије 1 nm. Ширина отвора за пропуштање побудне и емитоване светлости („slit“) била је 2 nm.

За анализу флуоресцентних спектра коришћена је метода мултиваријациона резолуција кривих-наизменични најмањи квадрати (*Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares*, *MCR-ALS*). *MCR* метод је примењен на екситационо-емисионе матрице које су конструисане за сваки узорак.

3.3.10 Израчунавање укупног индекса квалитета (*total quality index – TQI*)

Укупни индекс квалитета (*TQI*), као нови математички модел, коришћен је за поређење свих појединачних параметара (без обзира на јединице у којима су изражени) одређених у узорцима плодова јагоде како би се добила јединствена квантитативна оцена, као индикатор укупног квалитета воћа.

Укупни индекс квалитета је израчунат како бисмо одредили сорте које се издвајају по квалитетима „слаткоће“, од којих смо изабрали две репрезентативне сорте за даљу анализу помоћу *ESI-FT-ICR-MS* и *IMS*.

Све карактеристике квалитета подељене су у две групе, у складу са претходним истраживањима (Bersani, 2007; Djekic et al., 2017). Четири органске киселине (лимонска, јабучна, шикимична и фумарна) обрађене су применом једначине број 1 које каже „што је ближе циљној вредности, бољи је квалитет“, и представљено је једначином 15:

$$QI = \left| \frac{2 \times (x_i - T)}{x_{max} - x_{min}} \right| \quad (15)$$

Три друга параметра (глукоза, фруктоза, сахароза) обрађена су применом правила број 2 које подразумева „што је већа вредност, бољи је квалитет“, и представљено је једначином 16:

$$QI = \frac{|x_{max} - x_i|}{x_{max} - x_{min}} \quad (16)$$

За обе једначине важи следеће:

QI – индекс квалитета за одређену карактеристику квалитета; x_i – измерена вредност у подскупу вредности; *T* – циљна вредност (просечна вредност у подскупу вредности); x_{max} – максимална вредност у подскупу вредности; x_{min} – минимална вредност у подскупу вредности.

Након израчунавања свих *QI*-а и разматрања свих индекса као вектора $QI = (QI_1, QI_2, \dots, QI_N) \in R^N$ (Horn and Johnson, 2017). Укупан индекс квалитета (*TQI*) је израчунат помоћу следеће једначине:

$$TQI = \sqrt{\sum_{j=1}^N (QI_j)^2} \quad (17)$$

Правило за тумачење израчунатог *TQI* је „што је нижа вредност, то је бољи индекс укупног квалитета“ (Djekic et al., 2018).

Међутим, затим смо уврстили и остале измерене параметре и израчунавање је ишло следећим током. По истом принципу, све карактеристике квалитета подељене су у две групе (Bersani, 2007; Djekic et al., 2017). Правило број 1 „што је ближе циљној вредности, бољи је квалитет“ следили су четири органске киселине (лимонска, јабучна, шикимична и фумарна) и обрађене већ поменутом једначином (15). Сви остали параметри (*taste index*, *sweetness index*, *Quercetine glucouronide*; *Kaempferol-3-acetylglucoside*; *Kaempferol-3-glucoside*; *Kaempferol-3-glucouronide*; *Kaempferol-3-coumaroyl glucoside*; *Ellagic acid deoxyhexoside*, *p-Coumaroyl glucose*; *Ellagic acid*; *p-Coumaric acid*; *Catehin*; *Pelargonidin 3-glucoside*; *Pelargonidin 3-rutinoside*; *Pelargonidin-3-acetylglucoside*; *Pelargonidin 3-malonylglucoside*; *Cyanidin 3-glucosid*; *TPC*; *TACU*; *Vitamin C*; *POD*; Протеини; *PPO*; $\text{OH}^{\cdot}$ (%); *DPPH* (%); $\text{O}_2^{\cdot-}$ (%); *NO* (%)) следили су правило број 2 „што је већа вредност, бољи је квалитет“ и обрађени једначином (16). Након свих израчунавања израчунат је *TQI* где је опет важило правило „што је нижа вредност, бољи је укупан индекс квалитета“.

3.3.11 Ефекат метанолних екстраката испитиваних сорти јагода на 3ТЗ-F442А адипоците гајене у култури

Адипозно односно масно ткиво је посебна врста везивног ткива којег једну трећину чине зреле масне ћелије (адипоцити), док преостале две трећине масног ткива чине мале мезенхималне стем ћелије (*MSC*), Т регулаторне ћелије, ендотелијалне прекурсорске ћелије, ћелије имунског система (макрофаги) и преадипоцити у различитим стадијумима развоја. Због способности пролиферације и диференцијације преадипоцита, током процеса адипогенезе од њих настају зрели адипоцити. Адипоцити се групишу и одређеним регионима тела и заједно са другим ћелијским типовима формирају депое масног ткива (Symonds et al., 2012).

Због богатог састава полифенолима која је доказана различитим методама хтели смо да испитамо ефеката метанолних екстраката одабраних сорти јагода ('*Aprika*', '*Sandra*', '*Quicky*') на диференцијацију преадипоцита и метаболичке параметре адипоцита.

3.3.11.1 Ћелијска култура

Мишији преадипоцити 3ТЗ-F442А (00070654, *ATCC*, *USA*) узгајани су у *Dulbecco's Modified Eagle's* медијуму (*DMEM*) (*DMEM-HXA*, *Capricorn*, *Germany*), са 10% серума фетуса говечета (*fetal bovine serum*, *FBS*) (*FBS-11A*, *Capricorn*, *Germany*) и 1% раствором пеницилина/стрептомицина (*PS-B*, *Capricorn*, *Germany*). Ћелије су узгајане у инкубатору у условима влажне атмосфере, на 37°C са 5% CO_2 .

3.3.11.2 Вијабилност 3ТЗ-F442А ћелија у култури након третмана метанолним екстрактима одабраних сорти јагода

Метаболичка активност живих ћелија је мерена *MTT* (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенил тетразолиум бромид) (*MTT*, *M2128*, *Sigma-Aldrich*, *Germany*) тестом (*PMID*: 6606682). У вијабилним ћелијама активан је ензим сукцинат-дехидрогеназа који је саставни део митохондријалног респираторног ланца. Ензим редукује жуту тетразолијумову со - *MTT* (3-(4,5-диметилтиазоил-2)-2,5-дифенилтетразолијум бромид) до формазана који је пурпурно љубичасте боје и таложи се. Ћелије су лизиране додатком диметилсулфоксида у коме се формазан раствара. Максимум апсорбанце формазана је на 570 nm, а интензитет љубичасте боје је директно пропорционалан броју живих ћелија.

Преадипоцити су засејани у микротитар плоче са 96 бунара са равним дном, при густини од 3000 ћелија по бунару. Након 24 часа, ћелије су третиране растућим концентрацијама метанолног екстракта јагода (у опсегу од 10 – 500 $\mu\text{g/ml}$) током 72 сата. Након истека инкубације медијум који садржи *MTT* у концентрацији 0,2 mg/ml је додат у сваки

бунар. После инкубације (3 сата, на 37°C, 5% CO₂), медијум који садржи *MTT* је уклоњен и 100 µL диметил сулфоксида је одмах додато у сваки бунар. Апсорбанца је мерена на 570 nm, са корекцијом на 690 nm, спектрофотометром *Synergy H1 (Agilent, USA)*. Промена у расту ћелија у односу на нетретиране - контролне ћелије (ћелије које су расле у медијуму коме није додат екстракт јагода) израчуната је коришћењем софтвера *GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., USA)*.

3.3.11.3 Диференцијација адипоцита и третман са метанолним екстрактима одабраних сорти јагода

Ћелије су засејане у полистиренске плоче са 6 бунара (100 000 ћелија по бунару). Када су ћелије постигле 90% конфлуентности, започета је диференцијација. Медијум за диференцијацију се састојао од *DMEM* који је садржао 10 µg/ml инсулина (*I0516, Sigma, Germany*), 10% *FBS* и 1% пеницилина/стрептомицина. Запремина медијума је била 2 ml по бунару, а медијум се мењао свака 2-3 дана. Ћелије су диференциране 14 дана и третиране током 14 дана диференцијације са 25 µg/ml метанолног екстракта одабраних сорти јагода или раствором шећера (глюкоза и фруктоза) чија концентрација одговара измереној концентрацији шећера у јагодама, да би се додатно разлучио ефекат шећера присутних у екстрактима од ефекта полифенола, антиоксиданаса и осталих једињења којима се приписују благотворна својства јагода.

3.3.11.4 Припрема укупних ћелијских екстраката *3T3-F442A* адипоцита за имуноблот анализу

Након третмана, припремљени су укупни ћелијски екстракти адипоцита, који су коришћени за даљу анализу нивоа циљних протеина. Укратко, медијум је уклоњен из бунара и ћелије су испране охлађеним фосфатним пуфером (1,5 mM K₂HPO₄, 6,5 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 0,14 NaCl, pH 7,2). Додат је пуфер за екстракцију (62,5 mM *Tris* pH 6,8, 2% SDS, 10% глицерол, 50 mM дитиотреитол, инхибитори фосфатаза и протеаза) (80 µL по бунару), ћелије су остругане и садржај је пребачен у епандорф од 2 ml. Узорци су затим сонификовани три пута по 10 секунди са паузама од 5 секунди, (1 A, 50/60 Hz, 30% амплитуде) ултразвучним процесором (*Heilsher Ultrasound Processor, UP100H, DL*). Хомогенати су центрифугирани 20 минута на 20 000 × g, 4° C (*5804R, Eppendorf, DL*), а добијени супернатанти су пребачени у нове тубе, замрзнути и чувани на -80 °C до употребе. Концентрација протеина у укупним ћелијским екстрактима је одређена спектрофотометријски (*NanoDrop, Avantor, VWR, USA*).

3.3.11.5 Денатуришућа електрофореза и детекција протеина имуноблотом

Протеини ћелијских екстраката су раздвојени на основу разлика у молекулским масама денатуришућом електрофорезом на 8% или 10% полиакриламидном гелу. На гел за раздвајање протеина (8% или 10% акриламид/0,27% бисакриламид, 0,1% SDS, 0,375 M *Tris*, pH 8,8) наслојен је гел за сабијање протеина (3% акриламид/0,27% бисакриламид, 0,1% SDS, 0,125 M *Tris*, pH 6,8). Полимеризација гелова је омогућена додавањем 0,05% амонијумперсулфата и 0.033% *TEMED (N,N,N',N'-Tetrametylethylenediamin)*. Пуфер за резервоаре се састојао од 0,192 M глицина, 0,1% SDS и 0,025 M *Tris*, pH 8,3.

Узорци за електрофорезу су припремљени кувањем (5 минута, 95° C) укупних ћелијских екстраката са редукујућим пуфером за припрему узорака (125 mM *Tris*, pH 6,8 који садржи 20% (t/z) глицерол, 4% (t/z) SDS и 10% β меркаптоетанол), након чега су наношени на гел и раздвајани при константном напону од 120 V. Пренос протеина из гелова на поливинилиден дифлуоридну мембрану (*Amersham Hybond PVDF 0.45 µm, Cytiva*) одвијао се преко ноћи при константној струји од 135 mA по гелу на 4 °C, у 25 mM *Tris* пуферу, pH 8,3, који садржи 192 mM глицин и 20% (t/z) метанол. Након трансфера мембране су бојене 1% раствором боје *Ponceau S* у 5% сирћетној киселини како би се проверила ефикасност трансфера. Места на мембранама која нису заузета протеинима, блокирана су инкубацијом 1

сат на собној температури у фосфатном пуферу (1,5 mM KH_2PO_4 , 6,5 mM Na_2HPO_4 , 2,7 mM KCl , 0,14 NaCl , pH 7,2) који је садржао 5% одмашћено млеко. Мембране су затим инкубирани са одговарајућим примарним антителима преко ноћи на 4 °C. За детекцију испитиваних протеина коришћена су следећа антитела у наведеним разблажењима направљеним у фосфатном пуферу који садржи 5% одмашћено млеко: *phospho-AMPK-Thr172* (1:500, *Cell Signaling*, 2535S), *anti-AMPK1/2* (1:500, *Santa Cruz Biotechnology*, sc-25792), *anti-GLUT4* (1:500, *Cell Signaling*, 2213S), *anti-PPAR γ* (1:500, *Santa Cruz Biotechnology*, sc-7273), *anti-SIRT1* (1:500, *Santa Cruz*, sc-15404), *anti-ACC* (1:300, *Cell Signaling*, 3676S) и *anti- β -actin* (1:10000, *Abcam*, ab8227). После испирања (6 пута 5 мин) у фосфатном пуферу који је садржавао 0,1% Tween 20, мембране су инкубирани (90 мин на собној температури) са одговарајућим секундарним антителима спрегнутим са пероксидазом из рена (*ab97046* и *ab6721*, *Abcam*). Након инкубације мембране су испране фосфатним пуфером који је садржавао 0,1% Tween 20, а затим фосфатним пуфером. Имунореактивне протеинске траке су детектоване хемилуминисцентном (ECL) методом коришћењем *iBright CL1500* (*Thermo Fisher Scientific*, USA), а квантитативна анализа је извршена помоћу *iBright* софтвера. β -актин је коришћен за сваки узорак као контрола једнаког наношења узорака на гел. Након детекције везана антитела уклоњена су са мембрана уз коришћење 0,2 М NaOH . Мембране су поново блокиране и цео поступак је поновљен са следећим антителом.

4 РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

С обзиром да је предмет истраживања докторске дисертације биохемијска и биофизичка карактеризација биоактивних компоненти плода различитих сорти јагоде, анализирани су примарни и секундарни метаболити помоћу различитих хроматографских и спектроскопских метода.

4.1 ХРОМАТОГРАФСКЕ МЕТОДЕ

Квалитативна и квантитативна анализа примарних (пре свега шећера и органских киселина) и секундарних (полифеноли) метаболита из екстракта плодова заснива се на савременим техникама раздвајања, као што су течна хроматографија и/или масена спектрометрија. За идентификацију и квантификацију метаболита у овој докторској дисертацији коришћена је течна хроматографија високих перформанси у комбинацији са пулсном амперометријском детекцијом и детектором са низом диода (**HPLC-PAD** и **HPLC-DAD**), затим Фуријеова трансформација – јон резонантна циклотронска масена спектрометрија (**FT-ICR-MS**) и Имицинг масена спектрометрија (**MSI**), а за визуелизацију је коришћена ласерска десорпција/јонизација уз помоћ матрикса (**MALDI**).

4.1.1 Детекција шећера из екстракта плодова јагоде помоћу **HPLC-PAD**

Шећери су важна класа једињења неопходна за метаболизам, структурну биологију и производњу енергије у ћелијама. Осим тога они су, заједно са органским киселинама, главни показатељи квалитета и укуса плода јагоде (Azodanlou et al., 2003), који су, уз боју, важни атрибути за прихватање код потрошача. Преовлађујући „слатки“ метаболити у плоду јагоде су глукоза, фруктоза и сахароза, док су главни „кисели“ метаболити органске киселине, пре свега лимунска и јабучна киселина (Giampieri et al., 2012b). Укус јагоде је регулисан уравнотеженим односом између шећера и органских киселина (Mikulic-Petkovsek et al., 2012). Након прве визуелне процене потрошача спољних особина, одлука за поновну конзумацију заснива се на укусу дефинисаном интерним параметрима квалитета као што су однос шећера и киселина и концентрације биоактивних једињења.

Угљени хидрати из екстракта плодова јагоде су идентификовани и квантификовани коришћењем анјонске јоноизмењивачке хроматографије повезане са пулсном амперометријском детекцијом (**HPLC-PAD**). **HPLC-PAD** је врло селективна аналитичка метода за анализу угљених хидрата због специфичних услова детекције при којима се угљени хидрати за најмање један ред величине лакше оксидују од осталих компоненти у узорку при датим условима. Неутралне компоненте се заједно са катјонима елуирају врло брзо, практично без задржавања на колони. Тиме се постиже додатна селективност, јер њихов брз силазак са колоне их уклања из региона хроматограма где се налазе испитивани аналити. Струја електролизе се мери на радној електроди под пулсним електрохемијским потенцијалом и пропорционална је концентрацији оксидованог/редукованог аналита.

Угљени хидрати су слабе киселине са pK_a вредностима између 12 и 14. Сходно томе, могу бити потпуно или делимично јонизовани у базним условима са $pH > 12$. Због ових захтевних услова, само полимерне колоне за анјонску измену су погодне за анализу угљених хидрата. Једна таква је *CarboPac PA1* (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) која је коришћена за раздвајање шећера у узорцима јагода. Ова анјонска измењивачка колона високих перформанси је специјално прилагођена за квантитативну и квалитативну анализу моно- и дисахарида из узорака врло различитог порекла. Механизам раздвајања представља анјонска јоноизмењивачка хроматографија, при којој долази до конкуренције OH^- јона мобилне фазе са анјонским облицима у којима се налазе моносахариди на високим pH вредностима. Наиме, по

препоруци произвођача за елуцију са *CarboPac* колоном се користи искључиво NaOH у концентрацијама од 16 до 200 mM, а вредности ретенционих времена се налазе у обрнутој пропорцији са концентрацијом NaOH. Из наведеног следи да већа концентрација NaOH омогућава брже анализе, уз слабију резолуцију анализираних компоненти. Оптимална концентрација мобилне фазе се добија емпиријски, пуштањем меша стандарда моносахарида на различитим концентрацијама NaOH. Концентрација коришћене мобилне фазе при квантификацији шећера у плодовима јагоде је била 200 mM. Посебну сметњу у раду са *CarboPac* колонама представља појава натријум карбоната, као неизбежне последице реакције NaOH из мобилне фазе са CO₂ из ваздуха. Јони карбоната се врло лако везују за активне групе на колони, смањујући број слободних места за везивање анјона шећера чиме се значајно скраћују ретенциона времена уз додатне губитке на резолуцији. Стога је потребно да се судови са мобилном фазом држе добро затворени пожељно у атмосфери хелијума, што сем уклањања мехурића спречава и појаву карбонатних јона у раствору.

Овај тип детекције је осетљив и високо селективан за електроактивне врсте, пошто пулсна амперометрија детектује само једињења која садрже функционалне групе које су окисоване при напону детекције који се користи. Током оксидативних и редуктивних корака, златна радна електрода се регенерише, а процес се обично понавља сваких пола секунде. Ово обезбеђује стабилне и поновљиве услове детекције. Многе интерферирајуће врсте не могу се окисовати или редуковати, тако да се не детектују. Са оптимизованим поставкама пулса PAD може бити веома специфичан за угљене хидрате.

Након развоја и оптимизације методе анализирани су екстракти плодова 25 сорти јагоде.

Идентификована и квантификована су три главна растворљива шећера: глукоза, фруктоза и сахароза, при чему је фруктоза квантитативно најзаступљенија (табела 3), што је у складу са литературним подацима (Crespo et al., 2010; Kafkas et al., 2007).

Табела 3. Садржај појединачних шећера (g/100 g свежe масе) и индекс сласти (SI)

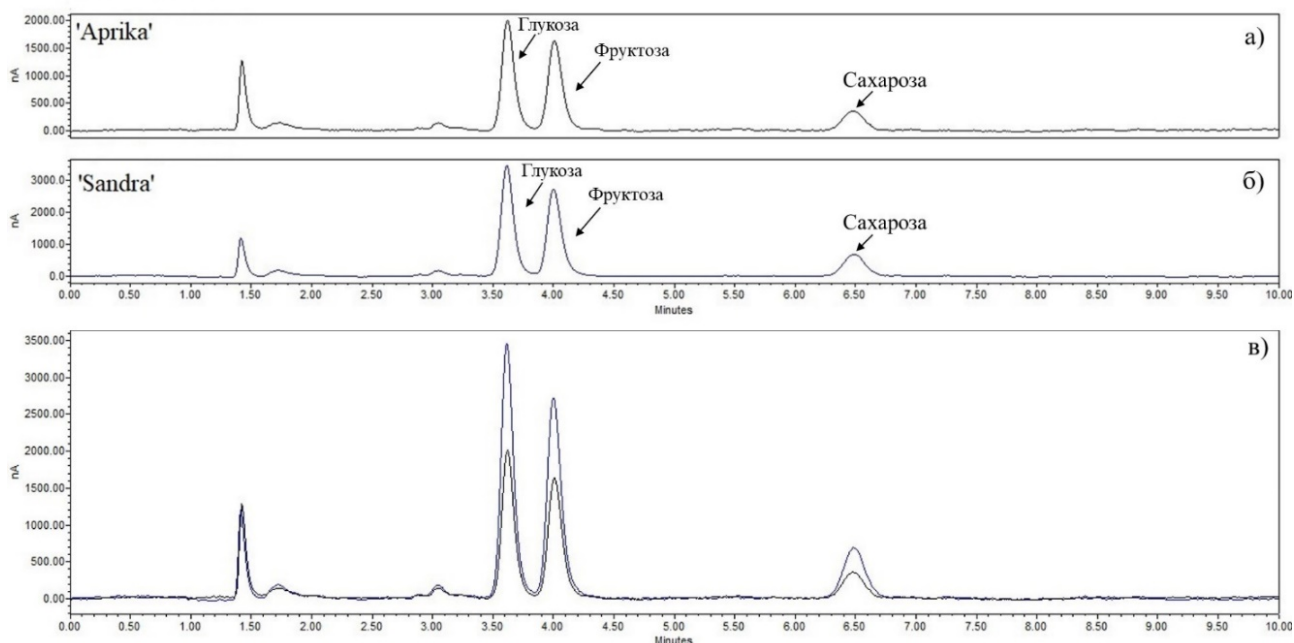
Сорте	Глукоза	Фруктоза	Сахароза	SI
<i>Roxana</i>	1,73 ± 0,20 j	1,99 ± 0,34 h	n.d.	6,29 ± 0,96 l
<i>Arosa</i>	3,20 ± 0,32 b,c	3,65 ± 0,33 b,c,d	n.d.	11,58 ± 0,91 c,d,e,f,g
<i>Joly</i>	2,58 ± 0,21 c,d,e	2,72 ± 0,14 c,d,e,f	0,40 ± 0,02 f	10,23 ± 0,72 e,f,g,h,i,j
<i>Asia</i>	2,12 ± 0,12 g,h,i,j	2,44 ± 0,25 f,g,h	n.d.	7,73 ± 0,70 j,k,l
<i>Alba</i>	2,64 ± 0,33 c,d,e,f,g,h	2,97 ± 0,41 c,d,e,f	n.d.	9,54 ± 1,27 f,g,h,i,j,k
<i>Aprika</i>	2,70 ± 0,31 c,d,e,f,g	2,89 ± 0,53 c,d,e,f	0,78 ± 0,15 e	8,46 ± 0,09 i,j,k,l
<i>Sibilla</i>	2,17 ± 0,33 f,g,h,i,j	2,49 ± 0,23 f,g,h	0,80 ± 0,07 e	8,70 ± 0,83 h,i,j,k,l
<i>Garda</i>	2,08 ± 0,08 h,i,j	2,50 ± 0,17 f,g,h	n.d.	7,84 ± 0,46 i,j,k,l
<i>Lycia</i>	2,25 ± 0,26 e,f,g,h,i,j	2,39 ± 0,28 f,g,h	n.d.	7,75 ± 0,89 j,k,l
<i>Jeny</i>	4,34 ± 0,31 a	4,68 ± 0,40 a	n.d.	15,11 ± 0,81 a,b
<i>Laetitia</i>	3,52 ± 0,26 b	4,19 ± 0,46 b	n.d.	11,54 ± 1,33 c,d,e,f,g
<i>Albion</i>	2,62 ± 0,39 c,d,e,f,g,h	2,89 ± 0,48 c,d,e,f	n.d.	9,26 ± 0,36 g,h,i,j,k
<i>Capri</i>	4,84 ± 0,37 a	5,31 ± 0,38 a	n.d.	9,65 ± 0,89 f,g,h,i,j,k
<i>Clery</i>	2,22 ± 0,10 e,f,g,h,i,j	2,50 ± 0,24 f,g,h	n.d.	7,97 ± 0,66 i,j,k,l
<i>Premy</i>	2,69 ± 0,37 c,d,e,f,g,h	2,86 ± 0,36 d,e,f	0,82 ± 0,08 e	10,36 ± 1,10 e,f,g,h,i
<i>Rumba</i>	4,60 ± 0,22 a	4,79 ± 0,32 a	0,21 ± 0,06 f	15,91 ± 0,88 a
<i>Vivaldi</i>	1,95 ± 0,21 i,j	2,26 ± 0,25 g,h	n.d.	7,22 ± 0,89 k,l
<i>Irma</i>	3,18 ± 0,16 b,c,d	3,41 ± 0,09 b,c,d,e,f	n.d.	11,02 ± 0,35 d,e,f,g,h
<i>Quicky</i>	2,11 ± 0,10 g,h,i,j	2,32 ± 0,11 f,g,h	1,48 ± 0,13 c	9,44 ± 0,53 f,g,h,i,j,k
<i>Nadja</i>	2,63 ± 0,12 c,d,e,f,g,h	2,82 ± 0,12 d,e,f,g	2,11 ± 0,01 b	11,97 ± 0,42 c,d,e,f
<i>Federica</i>	2,77 ± 0,10 c,d,e,f,g	2,93 ± 0,12 c,d,e,f	3,12 ± 0,05 a	13,73 ± 0,44 a,b,c
<i>Arianna</i>	3,14 ± 0,22 b,c,d	3,53 ± 0,24 b,c,d	1,42 ± 0,09 c,d	13,18 ± 1,04 b,c,d
<i>Lofty</i>	2,52 ± 0,04 d,e,f,g,h,i	2,69 ± 0,01 e,f,g,h	1,16 ± 0,09 d	10,28 ± 0,23 e,f,g,h,i,j
<i>Tea</i>	2,91 ± 0,20 c,d	3,27 ± 0,21 b,c,d	1,65 ± 0,15 c	12,68 ± 0,88 c,d,e
<i>Sandra</i>	3,45 ± 0,14 b	3,72 ± 0,25 b,c	2,25 ± 0,18 b	15,04 ± 0,97 a,b

Подаци су представљени као средње вредности ($n = 3$) ± стандардна грешка. Вредности у колонама обележене са различитим словима су статистички различите ($p < 0,05$), што је утврђено Duncan-овим тестом поређења. n.d. није детектовано

У поређењу са претходно поменутих истраживањима, где се ниво фруктозе кретао у распону од 1,6–4,3 g/100 g свежe масе и глукозе 1,3–2,6 g/100 g свежe масе, садржај ових шећера је био сличан или значајно већи код већег броја испитиваних сорти. По садржају фруктозе и глукозе истицале су се сорте '*Capri*', '*Rumba*' и '*Jeny*', док је по садржају сахарозе доминирала '*Federica*'.

Код свих 25 сорти редуccionи шећери (глукоза и фруктоза) су били садржани у готово једнаким концентрацијама, док су концентрације сахарозе биле значајно ниже, што указује да је у појединим узорцима, током чувања узорака, дошло до њене хемијске или ензимске хидролизе. Утврђено је да је повећање активности инвертазе, ензима везаног за ћелијски зид одговорног за хидролизу сахарозе до глукозе и фруктозе, обрнуто пропорционално концентрацији сахарозе (Kader et al., 1993). Исти аутори су уочили драстично смањење садржаја сахарозе у плодовима боровнице током складиштења на -30 °C, те се претпоставља да је то случај и са нашим узорцима који су чувани у замрзивачу на -20 °C.

Хроматограми шећера приказани на слици 11 илуструју репрезентативне узорке две сорте јагоде.



Слика 11. Репрезентативни хроматограми шећера две сорте јагоде:

а) хроматограм шећера сорте 'Aprika', б) хроматограм шећера сорте 'Sandra', в) преклопљени хроматограми шећера сорти 'Aprika' и 'Sandra'

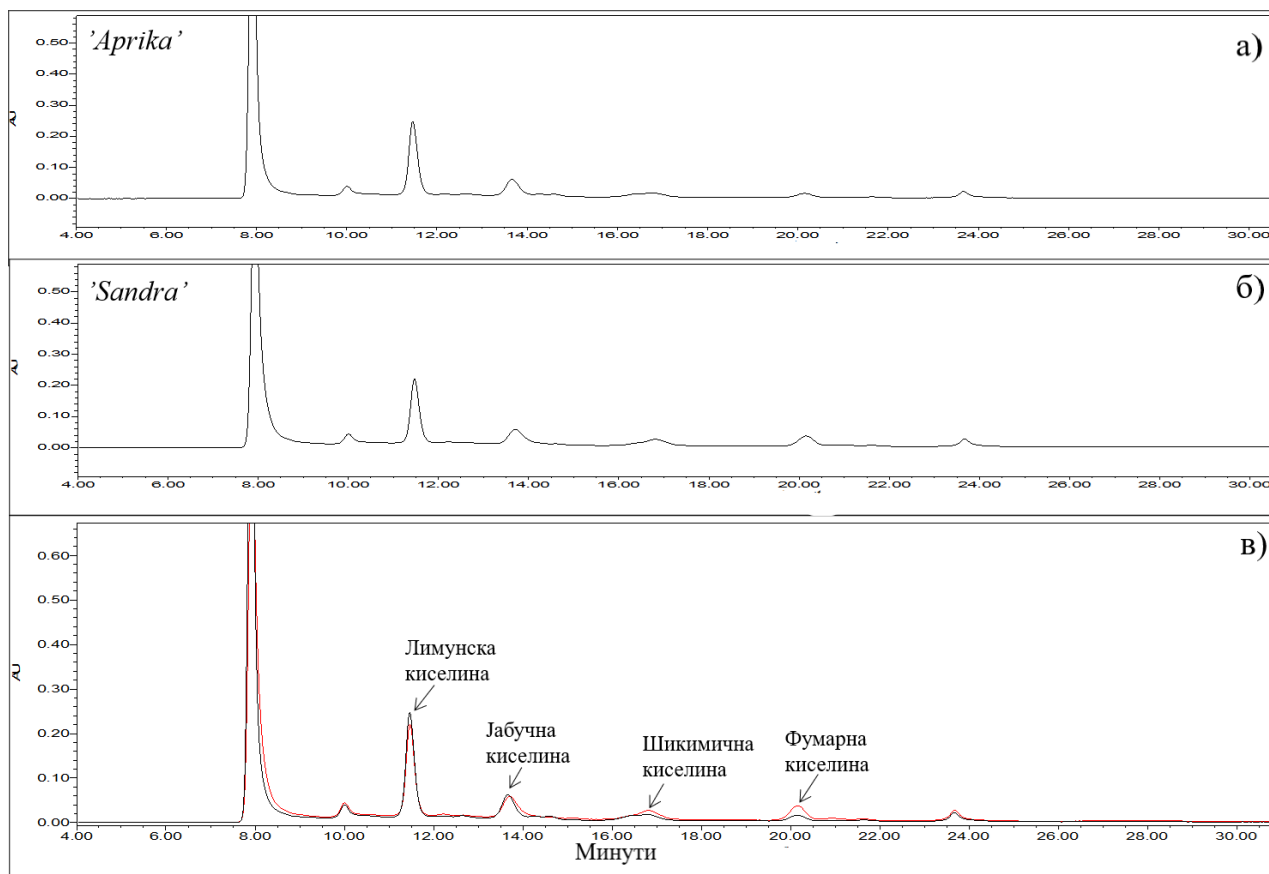
Сладак укус, као унутрашња особина квалитета свежег воћа, је пожељан атрибут који се обично регулише садржајем шећера и њиховим међусобним односом (Magwaza and Opara, 2015). Тако је показано да плод, иако има идентични укупни садржај шећера, уколико садржи више фруктозе или сахарозе има слађи укус од плода са високим садржајем глукозе. Да би се квантификовала слаткоћа, након одређивања појединачних шећера неким од метода може се одредити индекс сласти (*sweetness index – SI*), где се поред садржаја сваког појединачног шећера, мора узети у обзир и моларна концентрација сваког шећера (Crespo et al., 2010), а израчунавање се изводи по следећој формули:

$$\text{индекс сласти} = (\text{глукоза} \times 1) + (\text{фруктоза} \times 2,3) + (\text{сахароза} \times 1,35) \quad (18)$$

Индекс сласти (табела 3) је био највећи у сортама 'Rumba', а затим следе сорте 'Jeny' и 'Sandra'. Ако би се вршило рангирање сорти по индексу слаткоће образац би био сличан као и када би се вршило рангирање сорти према садржају фруктозе и глукозе, што само потврђује да су моносахариди важни индикатори укуса. Сходно томе, на укус се може утицати управљањем условима пре бербе кроз промене у респираторном метаболизму, у коме су глукоза и фруктоза главни супстрати.

4.1.2 Детекција органских киселина из екстракта јагода помоћу HPLC-PAD

Поред шећера, разноврсност и концентрација органских киселина играју важну улогу у органолептичким својствима јагоде (Basson et al., 2010; Liu et al., 2016; Milosavljević et al., 2021). Течна хроматографија високих перформанси спојена са детектором са низом диода (HPLC-DAD) се обично користи за анализу појединачних органских киселина, јер се показала као прецизна и осетљива метода за ту сврху.



Слика 12. Репрезентативни хроматограми органских киселина две сорте јагоде.

а) хроматограм органских киселина сорте 'Aprika', б) хроматограм органских киселина сорте 'Sandra', в) преклопљени хроматограми органских киселина сорти 'Aprika' и 'Sandra'

У многим истраживањима, лимунска киселина је идентификована као главна органска киселина у плодовима јагоде без обзира на сорту или услове гајења (Basson et al., 2010; Kafkas et al., 2007; Liu et al., 2016; Milosavljević et al., 2021). У испитиваним плодовима јагоде, поред лимунске киселине, јабучна киселина је такође била веома заступљена, док су шикимична и фумарна киселина квантификоване у траговима (табела 4).

Табела 4. Садржај појединачних органских киселина у екстрактима плодова јагоде (концентрације лимунске и јабучне киселине су изражене у mg/g свежје масе, док су концентрације шикимичне и фумарне киселине изражене у $\mu\text{g/g}$ свежје масе)

Сорте	Лимунска киселина	Јабучна киселина	Шикимична киселина	Фумарна киселина	Однос цитрата и малата (<i>Citrate-to-Malate Ratio</i>)
Roxana	4,42 $\pm$ 1,07 <i>e,f,g,h</i>	3,02 $\pm$ 0,20 <i>b,c</i>	18,75 $\pm$ 0,42 <i>b,c</i>	7,70 $\pm$ 0,62 <i>d,e</i>	1,47
Arosa	4,48 $\pm$ 0,37 <i>e,f,g,h</i>	1,85 $\pm$ 0,15 <i>f,g,h,i</i>	17,00 $\pm$ 0,46 <i>c,d</i>	8,25 $\pm$ 0,26 <i>c,d,e</i>	2,43
Joly	4,86 $\pm$ 0,59 <i>c,d,e</i>	2,34 $\pm$ 0,32 <i>d,e,f,g</i>	19,84 $\pm$ 0,65 <i>a,b</i>	6,34 $\pm$ 0,31 <i>e,f</i>	2,10
Asia	3,52 $\pm$ 0,42 <i>g,h,i</i>	1,69 $\pm$ 0,17 <i>g,h,i</i>	18,65 $\pm$ 0,74 <i>b,c</i>	7,25 $\pm$ 0,38 <i>d,e,f</i>	2,08
Alba	4,21 $\pm$ 0,64 <i>e,f,g,h</i>	2,80 $\pm$ 0,45 <i>b,c,d,e</i>	18,00 $\pm$ 1,52 <i>b,c,d</i>	8,60 $\pm$ 0,57 <i>b,c,d</i>	1,50
Aprika	3,60 $\pm$ 0,27 <i>g,h,i</i>	2,33 $\pm$ 0,31 <i>d,e,f,g</i>	10,50 $\pm$ 0,68 <i>i</i>	9,30 $\pm$ 0,42 <i>b,c</i>	1,53
Sibilla	6,24 $\pm$ 0,31 <i>a</i>	2,70 $\pm$ 0,31 <i>b,c,d,e,f</i>	16,43 $\pm$ 0,31 <i>d,e</i>	13,05 $\pm$ 0,31 <i>a</i>	2,38
Garda	3,08 $\pm$ 0,31 <i>j</i>	2,62 $\pm$ 0,24 <i>c,d,e,f,g</i>	19,30 $\pm$ 0,74 <i>b</i>	7,80 $\pm$ 0,15 <i>c,d,e,f</i>	1,18
Lycia	3,45 $\pm$ 0,21 <i>h,i,j</i>	1,73 $\pm$ 0,16 <i>g,h,i</i>	12,70 $\pm$ 0,11 <i>g,h</i>	6,00 $\pm$ 0,15 <i>e,f</i>	2,00
Jeny	4,81 $\pm$ 0,51 <i>c,d,e</i>	2,93 $\pm$ 0,21 <i>b,c,d</i>	21,55 $\pm$ 1,56 <i>a</i>	6,50 $\pm$ 0,43 <i>d,e</i>	1,65
Laetitia	6,86 $\pm$ 0,43 <i>a</i>	2,76 $\pm$ 0,13 <i>c,d,e,f</i>	16,40 $\pm$ 0,64 <i>d,e</i>	8,30 $\pm$ 0,74 <i>c,d,e</i>	2,49
Albion	5,12 $\pm$ 0,33 <i>b,c</i>	2,88 $\pm$ 0,01 <i>c,d,e,f</i>	17,81 $\pm$ 1,17 <i>c,d</i>	8,78 $\pm$ 0,57 <i>b,c,d</i>	1,79
Capri	5,44 $\pm$ 0,37 <i>b</i>	3,73 $\pm$ 0,15 <i>a</i>	27,00 $\pm$ 1,48 <i>a</i>	8,48 $\pm$ 0,32 <i>c,d,e</i>	1,41
Clery	3,69 $\pm$ 0,11 <i>g,h,i</i>	2,06 $\pm$ 0,10 <i>e,f,g,h</i>	17,20 $\pm$ 0,61 <i>c,d</i>	7,80 $\pm$ 0,26 <i>c,d,e,f</i>	1,80
Premy	4,96 $\pm$ 0,72 <i>c,d</i>	2,84 $\pm$ 0,45 <i>b,c,d,e</i>	14,85 $\pm$ 1,17 <i>f,g</i>	11,45 $\pm$ 0,31 <i>a</i>	1,75
Rumba	5,93 $\pm$ 0,30	3,58 $\pm$ 0,17	15,35 $\pm$ 0,71	9,60 $\pm$ 0,30	1,65

	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>e,f,g</i>	<i>b</i>	
Vivaldi	5,68± 0,08	2,63± 0,24	15,50± 0,95	9,35± 0,31	2,17
	<i>b</i>	<i>c,d,e,f,g</i>	<i>d,e,f</i>	<i>b,c</i>	
Irma	4,14± 0,09	1,92± 0,12	12,49± 0,54	9,49± 0,43	2,14
	<i>f,g,h</i>	<i>e,f,g,h,i</i>	<i>g,h</i>	<i>b</i>	
Quicky	4,56 ±0,03	1,59 ±0,01	1,95 ± 0,53	6,10 ± 0,42	2,88
	<i>e,f,g</i>	<i>h,i</i>	<i>l</i>	<i>e,f</i>	
Nadja	3,61 ± 0,11	3,14 ± 0,11	6,10 ± 0,11	7,40 ± 0,11	1,15
	<i>g,h,i</i>	<i>a,b</i>	<i>j</i>	<i>d,e,f</i>	
Federica	4,60 ± 0,37	2,32 ± 0,01	7,75 ± 0,11	11,45 ± 0,53	2,00
	<i>e,f</i>	<i>d,e,f,g</i>	<i>i,j</i>	<i>a</i>	
Arianna	4,51 ± 0,15	1,87 ± 0,10	5,60 ± 0,00	6,00 ± 0,11	2,20
	<i>e,f,g,h</i>	<i>f,g,h,i</i>	<i>j,k</i>	<i>e,f</i>	
Lofty	4,66 ± 0,11	1,50 ± 0,02	3,70 ± 0,42	7,50 ± 0,09	3,11
	<i>e</i>	<i>h,i</i>	<i>k</i>	<i>d,e,f</i>	
Tea	4,01 ± 0,09	1,47 ± 0,03	5,00 ± 0,53	4,70 ± 0,21	2,83
	<i>f,g,h</i>	<i>i</i>	<i>k</i>	<i>g</i>	
Sandra	3,59 ± 0,36	1,60 ± 0,11	5,70 ± 0,23	8,70 ± 0,11	2,19
	<i>g,h,i</i>	<i>g,h,i</i>	<i>j,k</i>	<i>b,c,d</i>	

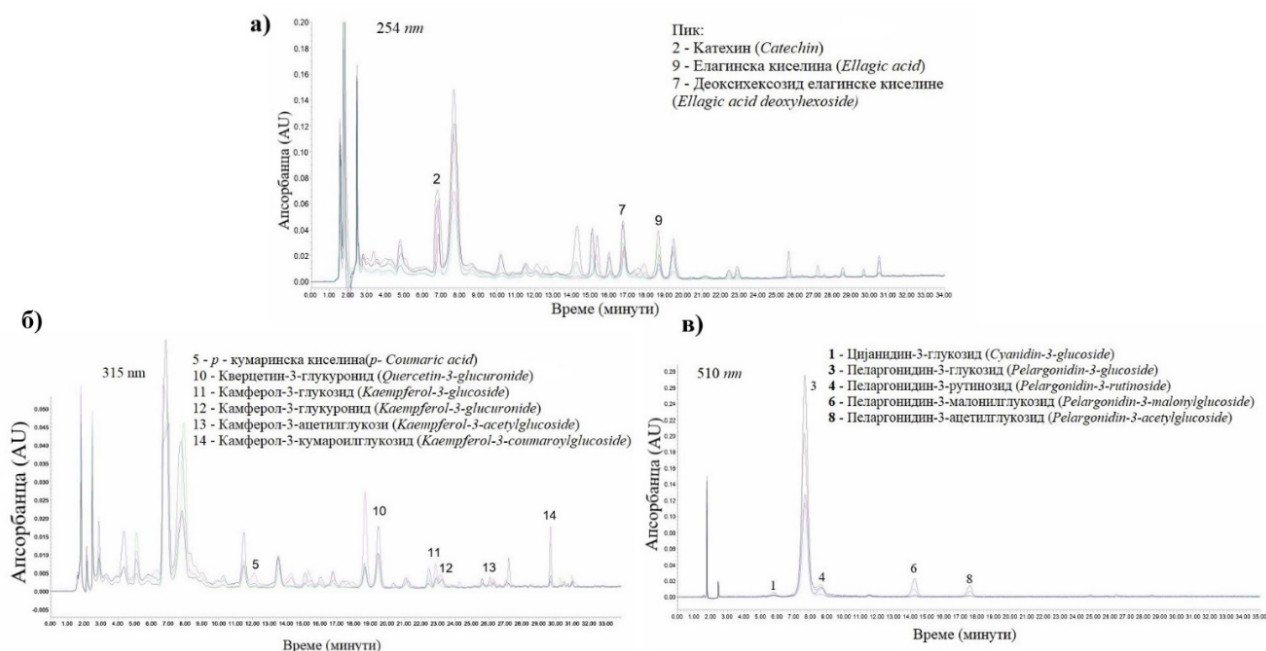
Подаци су представљени као средње вредности ($n = 3$) ± стандардна грешка. Вредности у колонама обележене са различитим словима су статистички различите ($p < 0,05$), што је утврђено *Duncan*-овим тестом поређења. *n.d.* није детектовано

Одређене вредности лимунске киселине у испитиваним плодовима биле су у распону од 3–7 mg/g свежје масе, што је у складу са литературно пријављеним вредностима за друге сорте јагоде (Basson et al., 2010; Liu et al., 2016; Ornelas-Paz et al., 2013). По садржају лимунске киселине водеће сорте су 'Laetitia', 'Sibilla' и 'Rumba', а по садржају јабучне киселине 'Capri' и 'Rumba'. Садржај шикимичне киселине био је висок у сортама 'Capri', 'Jeny' и 'Joly', док су 'Sibilla', 'Premy' и 'Federica' биле богате фумарном киселином. Узимајући у обзир да су за укус првенствено одговорне лимунска и јабучна киселина, при чему лимунска киселина доприноси оштром киселом укусу воћа, а јабучна киселина освежавајућем киселом укусу (Rubico and McDaniel, 1992), уравнотежен састав обе органске киселине дефинише перцепцију киселости и опорости у плоду јагоде.

Концентрација цитрата и малата у плоду је резултат интеракције њиховог метаболизма и депоновања у вакуолама. Термодинамички услови и *pH* вакуоле су повољнији за транспорт цитрата него малата из цитосола у вакуолу (Etienne et al., 2013). Због тога, промене у садржају цитрата и малата у плоду могу настати због разлика у вакуоларном транспорту и/или услед конверзије малата у цитрат кроз циклус трикарбоксилних киселина (Кребсов циклус). Те промене се могу квантификовати праћењем односа цитрата и малата (*Citrate-to-Malate Ratio*). Као што је приказано у табели 4, однос цитрата и малата у свих 25 испитиваних сорти био је у распону од 1,2–3,1, што је у складу са литературним подацима за различите сорте јагоде (Basson et al., 2010). Највеће вредности су забележене у сортама 'Lofty', 'Quicky' и 'Tea', што указује на то да се у плодовима ових сорти малат конвертује у цитрат већом брзином.

4.1.2.1 Квантификација појединачних фенола

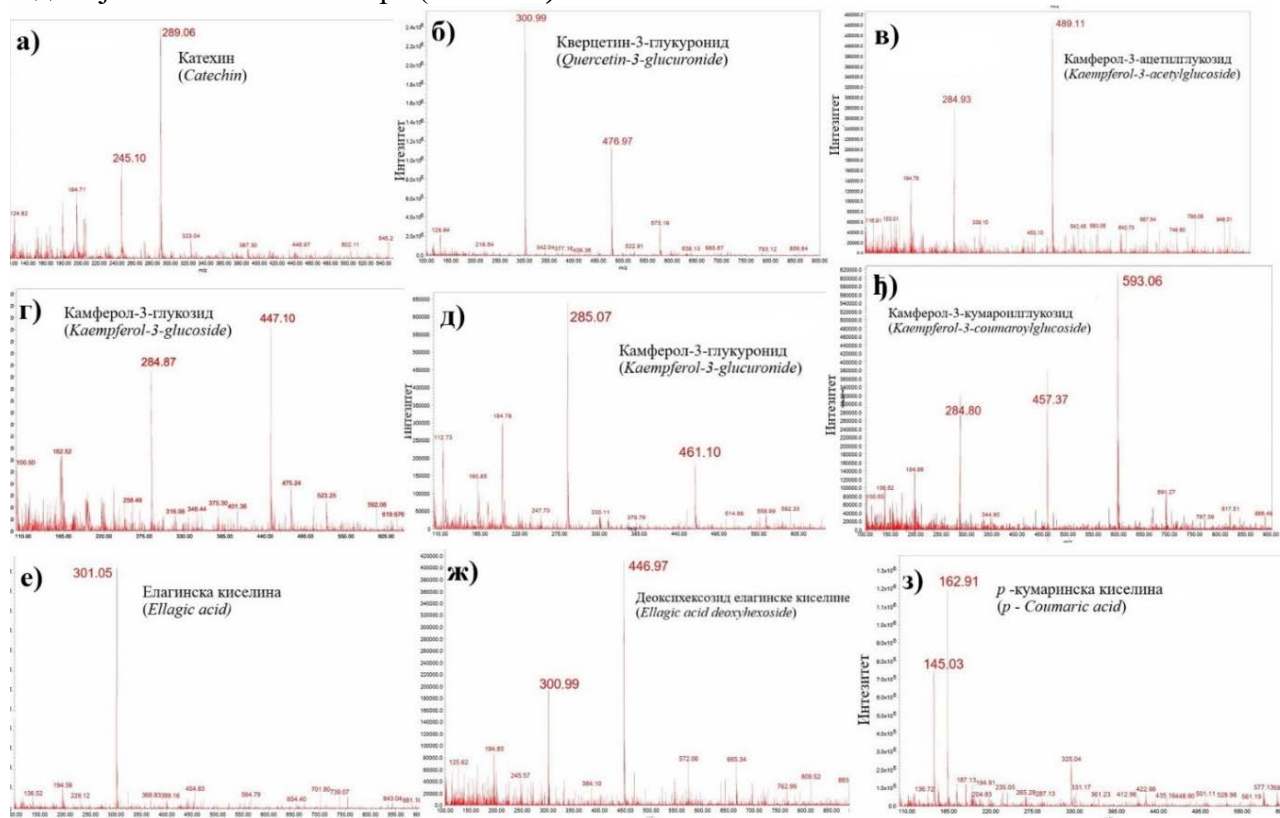
Течна хроматографија високих перформанси (*HPLC*) се показала као најприкладнија метода за раздвајање и квантификацију фенолних једињења због њихове структурне специфичности, јер омогућава анализу са високом прецизношћу, селективношћу и у релативно кратком времену (слика 13).



Слика 6. Репрезентативни хроматограми појединачних фенола добијени *DAD* детекцијом: а) хроматограми детектованих фенола на 254 nm; б) хроматограми детектованих фенола на 315 nm; в) хроматограми детектованих антоцијанина на 510 nm.

Идентификација ових једињења је у нашим истраживањима извршена поређењем ретенционих времена и *UV* спектра апсорпције са комерцијалним стандардима и

литературним подацима. Спајање *HPLC-MS* са техникама јонизације, као што је јонизација електроспрејом (*ESI*), погодна је техника за идентификацију појединачних фенола у јагодама и добијање масених спектра (слика 14).



Слика 7. Масени спектри појединачних фенола у јагодама:

а) масени спектар катехина; б) масени спектар кверцетин-3-глукуронида; в) масени спектар кампферол-3-ацетилглукозида; г) масени спектар кампферол-3-глукозида; д) масени спектар кампферол-3-глукуронида; е) масени спектар елагинске киселине; ж) масени спектар деоксихексозида елагинске киселине; з) масени спектар *p*-кумаринске киселине.

Фитофеноли су важне антиоксидативне компоненте у воћу и поврћу и на тај начин имају благотворно дејство на здравље. Међу овом великом групом једињења, која се уносе храном, су фенолне киселине, флавоноиди, али и антоцијанини (као битна подкласа која даје јарко црвену боју плоду јагоде) (Pineli et al., 2011).

Четири подгрупе фенолних једињења које се сматрају главним секундарним метаболитима у јагодама, идентификоване су и квантификоване помоћу *HPLC* методе у овој докторској дисертацији. У табелама 5 - 7 су приказане идентификоване подгрупе фенолних једињења: антоцијанини, фенолне киселине и њихови деривати, као и флавоноли и флаван-3-оли, према редоследу.

Доминантан антоцијанин у плодовима јагоде према литературним подацима је пеларгонидин-3-*O*-глукозид (Crescente-Campo et al., 2012), који је такође измерен као преовлађујући облик и у сортама јагоде које су биле предмет ове докторске дисертације. Највиша вредност је измерена код сорти 'Joly' (492,70 µg/g свежје масе), 'Asia' (487,08 µg/g свежје масе) и 'Quicky' (433,96 µg/g свежје масе). Његов ациловани облик, пеларгонидин-3-*O*-ацетилглукозид измерен је у неким сортама, али највиша концентрација је била измерена у сорти 'Asia' (8,30 µg *P*-3-*G* *Equiv.*/g свежје масе). У јагодама је такође детектован и пеларгонидин-3-*O*-рутинозид (Buendía et al., 2010) чија је концентрација у сортама испитиваним у овој докторској дисертацији била највиша код сорти 'Laetitia' (31,10 µg *P*-3-*G* *Equiv.*/g свежје масе), 'Nadja' (27,40 µg *P*-3-*G* *Equiv.*/g свежје масе) и 'Roxana' (23,80 µg *P*-3-*G* *Equiv.*/g свежје масе). Концентрација пеларгонидин-3-*O*-малонилглукозида била је највиша у

сорт 'Joly' (156,58 $\mu\text{g P-3-G Equiv.}/\text{g}$ свеже масе), док је његова концентрација у свим преосталим сортама била у распону од 1,60 до 54,89 $\mu\text{g P-3-G Equiv.}/\text{g}$ свеже масе).

Концентрација цијанидин-3-*O*-глукозида је била у распону од 1,03 до 10,60 $\mu\text{g/g}$ свеже масе. Највиша концентрација је измерена у сортама *Federica* (10,60 $\mu\text{g/g}$ свеже масе) и *Albion* (9,50 $\mu\text{g/g}$ свеже масе), док је најнижа концентрација детектована код сорте *Rumba* (1,03 $\mu\text{g/g}$ свеже масе).

Табела 5. Садржај антоцијанина у екстрактима плодова јагоде изражен у $\mu\text{g/g}$ свеже масе (FW)

Сорте	Пеларгонидин-3-О- глюкозид	Пеларгонидин-3-О- ацетилглюкозид (P-3-G Equiv.)	Пеларгонидин-3-О- рутинозид (P-3-G Equiv.)	Пеларгонидин-3-О- малонилглюкозид (P-3-G Equiv.)	Цијанидин-3-О- глюкозид
Roxana	264,27 $\pm$ 21,64 <i>f,g,h</i>	5,20 $\pm$ 0,82 <i>b</i>	23,80 $\pm$ 2,12 <i>a,b</i>	1,90 $\pm$ 0,85 <i>i,j</i>	3,20 $\pm$ 0,57 <i>b,c,d,e,f,g,h</i>
Arosa	230,88 $\pm$ 36,62 <i>d,e,f,g</i>	3,03 $\pm$ 0,00 <i>c</i>	20,35 $\pm$ 9,83 <i>c,d,e,f</i>	39,15 $\pm$ 0,21 <i>c,d,e</i>	1,60 $\pm$ 0,28 <i>h</i>
Joly	492,70 $\pm$ 12,09 <i>a,b</i>	<i>n.d.</i>	17,60 $\pm$ 0,28 <i>c,d,e</i>	156,58 $\pm$ 3,82 <i>a</i>	2,55 $\pm$ 0,21 <i>e,f,g,h</i>
Asia	487,08 $\pm$ 24,33 <i>a</i>	8,30 $\pm$ 0,66 <i>a</i>	22,33 $\pm$ 1,63 <i>b,c</i>	2,10 $\pm$ 0,21 <i>i,j</i>	1,45 $\pm$ 0,21 <i>h</i>
Alba	218,78 $\pm$ 8,63 <i>h,i,j</i>	0,67 $\pm$ 0,14 <i>e</i>	12,63 $\pm$ 1,81 <i>e,f,g,h</i>	39,40 $\pm$ 1,27 <i>b,c</i>	3,95 $\pm$ 0,64 <i>b,c,d,e,f,g,h</i>
Jeny	81,14 $\pm$ 7,57 <i>k</i>	<i>n.d.</i>	0,10 $\pm$ 0,00 <i>l</i>	22,95 $\pm$ 0,21 <i>e,f,g</i>	2,65 $\pm$ 0,92 <i>e,f,g,h</i>
Laetitia	357,81 $\pm$ 27,65 <i>b,c,d,e,f</i>	0,33 $\pm$ 0,06 <i>e</i>	31,10 $\pm$ 1,98 <i>a</i>	37,50 $\pm$ 0,21 <i>b,c,d</i>	3,20 $\pm$ 0,28 <i>d,e,f,g,h</i>
Garda	191,63 $\pm$ 14,07 <i>j</i>	0,27 $\pm$ 0,00 <i>e</i>	22,80 $\pm$ 0,14 <i>b,c,d</i>	44,80 $\pm$ 3,18 <i>b</i>	4,67 $\pm$ 0,67 <i>b,c,d,e,f</i>
Lycia	206,35 $\pm$ 17,23 <i>i,j</i>	0,40 $\pm$ 0,07 <i>e</i>	10,69 $\pm$ 0,21 <i>e,f,g,h</i>	38,90 $\pm$ 2,76 <i>b,c</i>	5,42 $\pm$ 1,19 <i>b,c,d,e,f,g</i>
Premy	190,57 $\pm$ 8,51 <i>i,j</i>	<i>n.d.</i>	13,07 $\pm$ 0,40 <i>e,f,g,h</i>	12,27 $\pm$ 0,49 <i>f,g,h,i,j</i>	5,60 $\pm$ 0,20 <i>b,c</i>
Sibilla	171,44 $\pm$ 7,13 <i>j</i>	0,27 $\pm$ 0,06 <i>e</i>	11,29 $\pm$ 0,98 <i>e,f,g,h,i</i>	12,20 $\pm$ 0,14 <i>f,g,h,i,j</i>	2,52 $\pm$ 0,79 <i>f,g,h</i>
Vivaldi	301,44 $\pm$ 10,89 <i>e,f,g,h</i>	0,50 $\pm$ 0,07 <i>e</i>	10,83 $\pm$ 1,19 <i>e,f,g,h,i,j</i>	24,53 $\pm$ 0,85 <i>d,e,f</i>	4,95 $\pm$ 0,79 <i>b,c,d,e</i>
Rumba	222,20 $\pm$ 36,43 <i>h,i,j</i>	0,13 $\pm$ 0,06 <i>e</i>	12,51 $\pm$ 0,79 <i>e,f,g,h</i>	34,87 $\pm$ 3,75 <i>b,c,d</i>	1,03 $\pm$ 0,00 <i>h</i>
Clery	42,00 $\pm$ 6,25 <i>l</i>	<i>n.d.</i>	3,36 $\pm$ 0,59 <i>k</i>	3,00 $\pm$ 0,49 <i>h,i,j</i>	6,16 $\pm$ 0,40 <i>b</i>
Aprika	182,36 $\pm$ 1,98 <i>i,j</i>	<i>n.d.</i>	15,12 $\pm$ 2,91 <i>c,d,e,f,g</i>	12,37 $\pm$ 0,35 <i>f,g,h,i,j</i>	6,58 $\pm$ 1,78 <i>b</i>
Quicky	433,96 $\pm$ 8,91 <i>a,b,c</i>	2,40 $\pm$ 0,42 <i>c,d</i>	12,60 $\pm$ 2,12 <i>e,f,g,h</i>	20,40 $\pm$ 1,30 <i>e,f,g</i>	3,10 $\pm$ 0,21 <i>c,d,e,f,g,h</i>
Federica	343,77 $\pm$ 34,15 <i>c,d,e,f,g</i>	6,10 $\pm$ 0,21 <i>b</i>	5,25 $\pm$ 1,91 <i>j,k,l</i>	2,40 $\pm$ 0,85 <i>i,j</i>	10,60 $\pm$ 1,91 <i>a</i>

Lofty	301,47 ± 8,91 <i>e,f,g,h</i>	<i>n.d.</i>	17,40 ± 1,27 <i>c,d,e,f</i>	12,20 ± 1,13 <i>f,g,h,i,j</i>	1,20 ± 0,21 <i>h</i>
Tea	276,97 ± 3,82 <i>g,h,i</i>	3,00 ± 0,42 <i>c</i>	19,00 ± 1,91 <i>c,d,e</i>	<i>n.d.</i>	3,40 ± 0,46 <i>b,c,d,e,f,g,h</i>
Nadja	334,77 ± 1,48 <i>d,e,f,g</i>	<i>n.d.</i>	27,40 ± 0,85 <i>a,b</i>	11,90 ± 0,28 <i>f,g,h,i,j</i>	4,30 ± 0,46 <i>b,c,d,e,f,g</i>
Arianna	424,76 ± 8,10 <i>a,b,c,d</i>	0,70 ± 0,00 <i>e</i>	8,25 ± 2,12 <i>h,i,j,k,l</i>	15,17 ± 0,67 <i>e,f,g,h,i</i>	2,40 ± 0,85 <i>g,h</i>
Sandra	395,36 ± 7,65 <i>b,c,d,e</i>	<i>n.d.</i>	4,50 ± 0,79 <i>i,j,k,l</i>	16,96 ± 0,42 <i>e,f,g,h</i>	5,90 ± 0,42 <i>b,c</i>
Albion	257,62 ± 54,65 <i>e,f,g,h</i>	0,90 ± 0,35 <i>e</i>	23,20 ± 7,07 <i>c,d,e,f</i>	54,89 ± 15,70 <i>b</i>	9,50 ± 0,99 <i>a</i>
Capri	199,03 ± 5,73 <i>h,i,j</i>	1,80 ± 0,14 <i>c,d</i>	12,50 ± 0,57 <i>d,e,f,g,h</i>	7,20 ± 1,70 <i>g,h,i,j</i>	3,80 ± 0,17 <i>b,c,d,e,f,g,h</i>
Irma	202,43 ± 4,60 <i>h,i,j</i>	1,75 ± 0,07 <i>c,d</i>	9,75 ± 0,92 <i>g,h,i,j,k</i>	1,60 ± 0,42 <i>i,j</i>	4,20 ± 0,28 <i>b,c,d,e</i>

Подаци су представљени као средње вредности ($n = 3$) ± стандардна грешка. Вредности у колонама обележене са различитим словима су статистички различите ($p < 0,05$), што је утврђено *Duncan*-овим тестом поређења. Ознаке у заградама (пеларгонидин-3-глюкозидни еквиваленти (*P-3-G Equiv.*) су аналогне микрограмима одговарајућих еквивалената антоцијанина по граму свеже масе;

n.d. није детектовано.

Деривати хидроксициметне киселине су важна класа полифенолних једињења која потичу из путева мевалонат-шикимат биосинтезе у биљкама, а такође служе као прекурсорски молекули за флавоноиде и антоцијанине (Alam et al., 2016). Елагинска и *p*-кумаринска киселина, су препознате као типични фенолни састојци црвеног и/или жућкастог бобичастог воћа из породице *Rosaceae*, којој припадају и јагоде (Määttä-Riihinen et al., 2004; Seeram et al., 2006). Као што је познато из литературе, јагоде садрже пуно елагинске и *p*-кумаринске киселине чинећи око 85% њихових укупних фенола (Cordenunsi et al., 2002; S. Häkkinen et al., 1999). Елагинска киселина је фенолно једињење лактонског типа, растворљиво у води, углавном присутно у вакуолама биљних ћелија у слободним и многим различитим ковалентно везаним облицима (Williner et al., 2003). Везани облик преовлађује у већини биљака, али се слободна форма ослобађа током хидролизе која се јавља у гастроинтестиналном тракту човека у физиолошким условима, чиме се омогућава искоришћавање елагинске киселине биљног порекла за благотворно дејство на здравље људи (Muthukumaran et al., 2017). Према *HPLC* анализи, елагинска киселина је била доминантна фенолна киселина, чији садржај се креће у распону од 9,60 до 30,95 $\mu\text{g/g}$ свеже масе (табела 6.), док су највеће концентрације и елагинске киселине и деоксихексозида елагинске киселине детектоване у сортама '*Joly*' (33,40 $\mu\text{g/g}$) и '*Laetitia*' (30,95 $\mu\text{g/g}$), што је у сагласности са литературним подацима (S. H. Häkkinen et al., 1999). Утврђено је да је концентрација елагинске киселине у потпуно зрелим плодовима сорти јагоде које се узгајају у Турској између 1,1 и 5,2 $\mu\text{g/g}$ (Kosar et al., 2004a). С обзиром на то да се смањење садржаја елагинске киселине између зелене и потпуно зреле фазе плода јагоде кретало од 2,8 до 8,5 пута (Williner et al., 2003), њена већа концентрација код неких испитиваних сорти потврђује могућу благу презrelu фазу плода.

Садржај *p*-кумаринске киселине се кретао у распону између 1,20 и 11,37 $\mu\text{g/g}$ свеже масе, што одговара подацима из литературе (Häkkinen and Tögtöpen, 2000). Једноставно фенолно једињење као што је *p*-кумаринска киселина, припада овој важној групи фенолних киселина. У литератури је *p*-кумаринска киселина идентификована као главна хидроксициметна киселина у фази зрелости плода четири сорте јагоде и то у опсегу концентрација од 4,2–20,7 $\mu\text{g/g}$ (Kosar et al., 2004b). У нашем истраживању детектоване концентрације *p*-кумаринске киселине биле су у истом опсегу, а највеће код сорти '*Vivaldi*' (11,37 $\mu\text{g/g}$ свеже масе) и '*Rumba*' (11,37 $\mu\text{g/g}$ свеже масе), док су код појединих сорти концентрације биле и значајно ниже (табела 6.), што можда указује на могућност благе непотпуне зрелости наших плодова. Кумароил глукоза је важан дериват присутан у значајним количинама у плодовима јагоде, али са значајним варијацијама између тестираних сорти. Највеће вредности су детектоване у сорти '*Asia*' (302,17 $\mu\text{g CA Equiv/g}$ свеже масе), затим у '*Laetitia*' (252,72 $\mu\text{g CA Equiv/g}$ свеже масе), док су скоро 10 пута мање количине детектоване код сорте '*Federica*' (35,76 $\mu\text{g CA Equiv/g}$ свеже масе).

Табела 6. Садржај фенолних киселина и њихових деривата у екстрактима плодова јагоде изражен у $\mu\text{g/g}$ свеже масе (*FW*)

Сорте	Елагинска киселина	Деоксихексоид елагинске киселине (<i>EA Equiv.</i>)	<i>p</i> -кумаринска киселина	<i>p</i> -кумароил глюкоза (<i>CA Equiv.</i>)
Roxana	18,60 $\pm$ 0,71 <i>c,d,e,f,g</i>	15,18 $\pm$ 0,85 <i>e,f</i>	1,87 $\pm$ 0,40 <i>h,i,j</i>	122,37 $\pm$ 11,54 <i>d,e,f</i>
Arosa	13,90 $\pm$ 6,08 <i>b,c,d,e,f</i>	21,35 $\pm$ 3,04 <i>b,c,d</i>	2,87 $\pm$ 0,51 <i>f,g,h</i>	96,23 $\pm$ 9,42 <i>f,g</i>
Joly	33,40 $\pm$ 4,81 <i>b,c,d</i>	34,23 $\pm$ 4,31 <i>a</i>	1,55 $\pm$ 0,07 <i>i,j</i>	182,97 $\pm$ 15,77 <i>c</i>
Asia	30,60 $\pm$ 1,61 <i>a,b,c</i>	21,51 $\pm$ 0,42 <i>b,c,d</i>	4,27 $\pm$ 0,40 <i>e,f</i>	302,17 $\pm$ 1,65 <i>a</i>
Alba	13,33 $\pm$ 0,25 <i>e,f,g</i>	7,29 $\pm$ 0,26 <i>g,h</i>	4,25 $\pm$ 0,21 <i>e,f</i>	135,35 $\pm$ 3,06 <i>c,d,e</i>
Jeny	18,15 $\pm$ 2,33 <i>b,c,d,e,f</i>	16,95 $\pm$ 0,14 <i>d,e</i>	4,10 $\pm$ 0,71 <i>e,f</i>	112,54 $\pm$ 20,72 <i>e,f</i>
Laetitia	30,95 $\pm$ 6,72 <i>a</i>	23,58 $\pm$ 0,92 <i>b</i>	3,80 $\pm$ 0,71 <i>f,g</i>	252,72 $\pm$ 28,25 <i>b</i>
Garda	7,90 $\pm$ 0,44 <i>g,h</i>	9,39 $\pm$ 0,42 <i>g</i>	2,05 $\pm$ 0,21 <i>h,i,j</i>	164,49 $\pm$ 3,77 <i>c</i>
Lycia	13,73 $\pm$ 0,00 <i>c,d,e,f,g</i>	17,13 $\pm$ 0,49 <i>c,d,e</i>	3,53 $\pm$ 0,64 <i>f,g,h</i>	135,35 $\pm$ 14,83 <i>c,d,e</i>
Premy	10,58 $\pm$ 0,59 <i>f,g</i>	6,86 $\pm$ 1,55 <i>g,h</i>	6,57 $\pm$ 0,93 <i>c,d,e</i>	67,59 $\pm$ 0,28 <i>h,i,j</i>
Sibilla	10,61 $\pm$ 0,72 <i>f,g</i>	3,40 $\pm$ 0,95 <i>h</i>	6,17 $\pm$ 0,67 <i>d,e</i>	65,94 $\pm$ 1,91 <i>h,i,j</i>
Vivaldi	12,63 $\pm$ 0,59 <i>e,f,g</i>	2,83 $\pm$ 0,55 <i>h</i>	11,37 $\pm$ 0,78 <i>a</i>	111,72 $\pm$ 2,83 <i>e,f</i>
Rumba	14,48 $\pm$ 1,53 <i>e,f,g</i>	2,96 $\pm$ 0,81 <i>h</i>	11,37 $\pm$ 1,20 <i>a</i>	63,33 $\pm$ 3,69 <i>h,i,j</i>
Clery	31,23 $\pm$ 3,14 <i>a,b</i>	3,20 $\pm$ 0,52 <i>h</i>	1,20 $\pm$ 0,14 <i>j</i>	75,03 $\pm$ 3,32 <i>g,h,i</i>
Aprika	11,95 $\pm$ 1,18 <i>e,f,g</i>	6,76 $\pm$ 1,34 <i>g,h</i>	6,60 $\pm$ 0,07 <i>c,d,e</i>	65,94 $\pm$ 2,76 <i>h,i,j</i>
Quicky	14,45 $\pm$ 0,78 <i>c,d,e,f,g</i>	3,00 $\pm$ 0,80 <i>h</i>	8,53 $\pm$ 0,35 <i>b</i>	55,79 $\pm$ 6,79 <i>j,k</i>
Federica	5,55 $\pm$ 0,64 <i>h</i>	1,70 $\pm$ 0,61 <i>h</i>	7,50 $\pm$ 0,71 <i>c,d</i>	35,76 $\pm$ 4,21 <i>l</i>
Lofty	21,10 $\pm$ 2,12 <i>d,e,f,g</i>	2,13 $\pm$ 0,25 <i>h</i>	5,83 $\pm$ 0,23 <i>d,e</i>	41,96 $\pm$ 2,80 <i>k,l</i>
Tea	11,55 $\pm$ 0,07 <i>e,f,g</i>	1,27 $\pm$ 0,15 <i>h</i>	5,73 $\pm$ 0,40 <i>d,e</i>	86,79 $\pm$ 1,41 <i>g,h</i>
Nadja	9,60 $\pm$ 1,48 <i>g</i>	1,83 $\pm$ 0,06 <i>h</i>	6,43 $\pm$ 0,21 <i>c,d,e</i>	73,04 $\pm$ 1,34 <i>g,h,i</i>
Arianna	9,90 $\pm$ 0,49 <i>f,g</i>	2,13 $\pm$ 0,29 <i>h</i>	8,73 $\pm$ 0,38 <i>b</i>	74,34 $\pm$ 1,06 <i>g,h,i</i>
Sandra	14,70 $\pm$ 2,12 <i>e,f,g</i>	1,73 $\pm$ 0,06 <i>h</i>	8,10 $\pm$ 0,14 <i>b,c</i>	61,34 $\pm$ 0,92 <i>i,j,k</i>
Albion	18,15 $\pm$ 0,07 <i>c,d,e,f,g</i>	10,72 $\pm$ 0,21 <i>f,g</i>	1,23 $\pm$ 0,29 <i>j</i>	73,92 $\pm$ 10,36 <i>g,h,i</i>
Capri	22,80 $\pm$ 3,11 <i>b,c,d,e</i>	22,84 $\pm$ 0,07 <i>b,c</i>	6,00 $\pm$ 0,85 <i>d,e</i>	171,48 $\pm$ 11,30 <i>c</i>
Irma	9,55 $\pm$ 2,76 <i>f,g</i>	9,66 $\pm$ 1,06 <i>g</i>	2,93 $\pm$ 0,06 <i>f,g,h</i>	220,92 $\pm$ 20,48 <i>b</i>

Подаци су представљени као средње вредности ($n = 3$) $\pm$ стандардна грешка. Вредности у колонама обележене са различитим словима су статистички различите ($p < 0,05$), што је утврђено *Duncan*-овим тестом поређења. Ознаке у заградама су аналогне микрограмима одговарајућих еквивалената фенолних киселина по граму свеже масе. (*EA equiv.*, еквивалент елагинске киселине; *CA equiv.*, еквивалент *p*-кумаринске киселине); *n.d.*, није детектовано

У погледу њихове биолошке активности и утицаја на потрошача, профил фенолних једињења може бити важан параметар квалитета плода.

Флавоноли су најчешћа и највећа подгрупа флавоноида у воћу. Деривати кверцетина и кампферола, по литератури, су најзаступљенији флавоноли у јагоди, што је био случај и код наших сорти. Код свих 25 испитиваних сорти јагоде детектовано је укупно пет флавонола (табела 7), од којих је само једно једињење изведено из кверцетина, а четири из кампферола (Buendía et al., 2010; Fernandes et al., 2012; Seeram et al., 2006). Највише вредности катехина измерене су у сортама 'Asia' (76,73 µg/g), 'Joly' (75,92 µg/g) и 'Quicky' (54,89 µg/g). Чини се да су катехини најмоћнији флавоноиди за заштиту од реактивних врста кисеоника (Panche et al., 2016), који такође имају добру антибактеријску, антивирусну и антифунгалну активност. Конститутивне концентрације катехина се мењају током развоја плода, највеће су у младим (зеленим) плодовима како би се ограничио раст гљивица у овој осетљивој фази, претпостављајући да је биосинтеза флаванола веома активна у овој развојној фази. Смањење концентрације катехина у касној фази зрења одговара слабој активности флаванолног пута у овој фази (Puhl and Treutter, 2008).

Кампферол-3-глукозид, кампферол-3-глукуронид и кампферол-3-кумароилглукоза били су доминантни у сорти 'Nadja' (127,09, 294,50, 108,57 µg *Kaempferol Equiv/g* свежје масе, по редоследу). Највиша вредност кверцетин-3-глукуронида измерена је у сортама 'Tea' (76,29 µg *Quercetin Equiv/g* свежје масе), 'Lofty' (73,74 µg *Quercetin Equiv/g* свежје масе) и 'Nadja' (50,73 µg *Quercetin Equiv/g* свежје масе), док је код сорте 'Clery' измерена најнижа вредност (2,59 µg *Quercetin Equiv/g* свежје масе).

У једињењима кампферола заступљени су различити облици шећера: ацетилглукозиди, глукозиди, глукурониди и кумароилглукозиди. Сорта 'Lofty' је била доминантна у погледу садржаја кампферол-3-ацетилглукозида (20,38 µg *Kaempferol Equiv/g* свежје масе), затим следе сорте 'Federica', 'Quicky', 'Tea' и 'Nadja' (15,40, 16,80, 16,80 и 10,29 µg *Kaempferol Equiv/g* свежје масе, по редоследу), док су остале сорте показале значајно ниже вредности. Просечне средње вредности већине сорти су у складу са претходно публикованим подацима о садржају кампферол-3-глукозида (10–70 µg/g) и кампферол-3-кумарилглукозида (10–40 µg/g) у јагоди (S. H. Häkkinen et al., 1999).

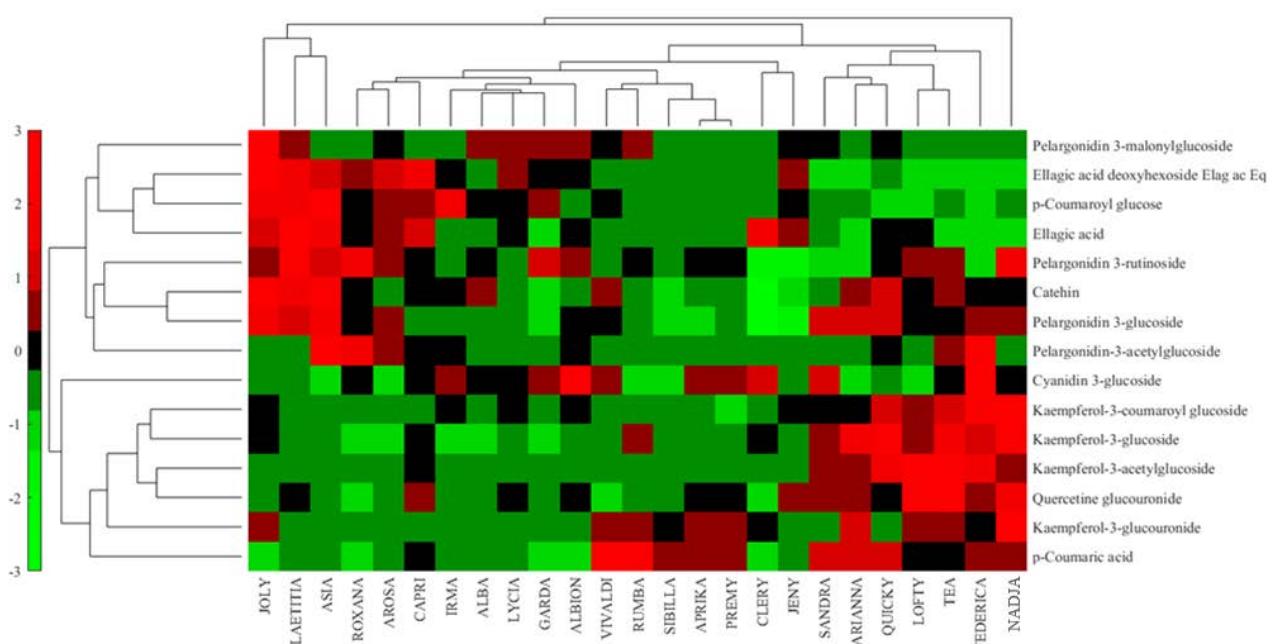
Табела 7. Садржај флаванола и флаван-3-ола у екстрактима плодова јагоде изражен у $\mu\text{g/g}$ свеже масе (FW)

Сорте	Катехин	Кверцетин-3- глукуронид (<i>Querc Equiv.</i>)	Кампферол-3- ацетилглукозид (<i>Kaempf Equiv.</i>)	Кампферол-3- глукозид (<i>Kaempf Equiv.</i>)	Кампферол-3- глукуронид (<i>Kaempf Equiv.</i>)	Кампферол-3- кумароилглукоза (<i>Kaempf Equiv.</i>)
Roxana	43,56 $\pm$ 3,82 <i>d,e,f,g</i>	5,95 $\pm$ 0,21 <i>i,j</i>	1,15 $\pm$ 0,07 <i>f,g</i>	6,34 $\pm$ 0,56 <i>l</i>	3,32 $\pm$ 0,20 <i>h</i>	20,83 $\pm$ 4,42 <i>e,f</i>
Arosa	35,69 $\pm$ 3,85 <i>g,h,i,j</i>	15,30 $\pm$ 3,68 <i>g</i>	1,20 $\pm$ 0,17 <i>f,g</i>	5,94 $\pm$ 1,56 <i>l</i>	18,26 $\pm$ 1,93 <i>f</i>	10,61 $\pm$ 0,28 <i>g,h</i>
Joly	75,92 $\pm$ 1,62 <i>a</i>	11,60 $\pm$ 1,31 <i>h,i</i>	1,80 $\pm$ 0,14 <i>e,f</i>	42,08 $\pm$ 0,25 <i>e,f</i>	77,97 $\pm$ 4,98 <i>c</i>	30,56 $\pm$ 1,32 <i>d</i>
Asia	76,73 $\pm$ 3,78 <i>a</i>	8,77 $\pm$ 0,47 <i>h,i</i>	1,67 $\pm$ 1,07 <i>e,f</i>	16,09 $\pm$ 0,49 <i>h,i</i>	3,66 $\pm$ 0,40 <i>h,i</i>	9,33 $\pm$ 0,23 <i>h</i>
Alba	52,27 $\pm$ 6,35 <i>c,d</i>	11,05 $\pm$ 1,06 <i>h</i>	1,40 $\pm$ 0,30 <i>f,g</i>	13,14 $\pm$ 0,10 <i>i,j</i>	9,59 $\pm$ 0,09 <i>g</i>	14,51 $\pm$ 2,70 <i>g</i>
Jeny	22,10 $\pm$ 0,84 <i>j</i>	40,25 $\pm$ 1,77 <i>d</i>	1,25 $\pm$ 0,07 <i>f,g</i>	20,50 $\pm$ 3,27 <i>g,h</i>	14,53 $\pm$ 0,71 <i>f,g</i>	21,48 $\pm$ 6,61 <i>e,f</i>
Laetitia	66,56 $\pm$ 2,96 <i>b</i>	23,50 $\pm$ 1,98 <i>f</i>	1,57 $\pm$ 0,15 <i>e,f</i>	28,58 $\pm$ 0,13 <i>g</i>	15,83 $\pm$ 0,83 <i>f,g</i>	20,97 $\pm$ 5,65 <i>e,f</i>
Garda	27,44 $\pm$ 1,34 <i>i,j</i>	11,95 $\pm$ 1,48 <i>h</i>	1,80 $\pm$ 0,42 <i>e,f</i>	3,95 $\pm$ 0,21 <i>l</i>	8,22 $\pm$ 0,62 <i>g,h</i>	9,76 $\pm$ 2,23 <i>h</i>
Lycia	30,92 $\pm$ 1,59 <i>h,i,j,k</i>	19,81 $\pm$ 2,37 <i>f,g</i>	0,94 $\pm$ 0,07 <i>g,h</i>	19,76 $\pm$ 2,85 <i>g,h</i>	7,76 $\pm$ 0,56 <i>g</i>	48,03 $\pm$ 2,39 <i>c</i>
Premy	29,77 $\pm$ 0,76 <i>h,i,j</i>	19,49 $\pm$ 2,96 <i>f,g</i>	2,44 $\pm$ 0,28 <i>e</i>	16,23 $\pm$ 2,88 <i>h,i</i>	73,05 $\pm$ 0,95 <i>c</i>	3,22 $\pm$ 0,22 <i>i</i>
Sibilla	27,31 $\pm$ 1,53 <i>i,j</i>	20,39 $\pm$ 1,80 <i>f,g</i>	1,46 $\pm$ 0,49 <i>f,g</i>	17,86 $\pm$ 0,21 <i>h,i</i>	44,00 $\pm$ 2,88 <i>e</i>	3,49 $\pm$ 0,20 <i>i</i>
Vivaldi	50,72 $\pm$ 1,83 <i>c,d</i>	6,12 $\pm$ 2,04 <i>i,j</i>	1,36 $\pm$ 0,12 <i>f,g</i>	19,22 $\pm$ 0,76 <i>g,h</i>	67,81 $\pm$ 3,01 <i>c,d</i>	3,92 $\pm$ 0,65 <i>i</i>
Rumba	36,60 $\pm$ 4,37 <i>g,h,i,j</i>	8,02 $\pm$ 1,02 <i>h</i>	0,80 $\pm$ 0,11 <i>h</i>	51,30 $\pm$ 5,25 <i>e</i>	72,56 $\pm$ 3,76 <i>c</i>	4,41 $\pm$ 0,22 <i>i</i>
Clery	6,95 $\pm$ 0,22 <i>k</i>	2,59 $\pm$ 0,49 <i>j</i>	1,70 $\pm$ 0,40 <i>e,f,g</i>	47,51 $\pm$ 1,52 <i>e,f</i>	48,28 $\pm$ 2,10 <i>d,e</i>	3,42 $\pm$ 0,24 <i>i</i>
Aprika	28,98 $\pm$ 0,44 <i>i,j</i>	15,90 $\pm$ 0,54 <i>h</i>	0,94 $\pm$ 0,08 <i>g,h</i>	12,95 $\pm$ 1,16 <i>i,j</i>	64,78 $\pm$ 2,02 <i>c</i>	4,12 $\pm$ 0,65 <i>i</i>
Quicky	54,89 $\pm$ 3,96 <i>c</i>	19,33 $\pm$ 0,84 <i>f,g</i>	16,86 $\pm$ 5,21 <i>b</i>	77,86 $\pm$ 0,39 <i>c,d</i>	20,05 $\pm$ 3,37 <i>f</i>	32,94 $\pm$ 9,10 <i>d</i>

Federica	43,33 ± 3,24 <i>d,e,f,g</i>	31,36 ± 5,51 <i>e</i>	15,40 ± 2,13 <i>b</i>	80,12 ± 17,55 <i>b,c</i>	37,14 ± 0,10 <i>e</i>	99,31 ± 7,37 <i>b</i>
Lofty	37,60 ± 0,44 <i>g,h,i,j</i>	73,74 ± 0,64 <i>b</i>	20,38 ± 1,52 <i>a</i>	48,09 ± 1,61 <i>e,f</i>	60,16 ± 4,66 <i>c,d</i>	27,10 ± 9,34 <i>d,e</i>
Tea	48,11 ± 1,51 <i>c,d,e</i>	76,29 ± 0,28 <i>a</i>	13,86 ± 2,16 <i>b,c</i>	63,36 ± 16,45 <i>d,e</i>	81,31 ± 3,13 <i>c</i>	98,94 ± 17,75 <i>b</i>
Nadja	39,61 ± 1,07 <i>f,g,h,i</i>	50,73 ± 4,60 <i>c</i>	10,29 ± 2,01 <i>c,d</i>	127,09 ± 27,73 <i>a</i>	294,50 ± 5,39 <i>a</i>	108,57 ± 51,59 <i>a</i>
Arianna	51,89 ± 0,31 <i>c,d</i>	29,66 ± 0,07 <i>e,f</i>	6,15 ± 0,27 <i>d</i>	83,58 ± 2,48 <i>b,c</i>	100,09 ± 14,54 <i>b</i>	26,34 ± 12,21 <i>d,e</i>
Sandra	31,33 ± 1,27 <i>h,i,j,k</i>	34,00 ± 1,06 <i>e</i>	7,92 ± 0,50 <i>d</i>	79,56 ± 37,99 <i>b,c</i>	9,07 ± 1,47 <i>g</i>	41,26 ± 13,03 <i>c</i>
Albion	32,73 ± 5,85 <i>h,i,j</i>	18,90 ± 0,92 <i>f,g</i>	1,35 ± 0,07 <i>f,g</i>	20,18 ± 1,94 <i>g,h</i>	14,07 ± 3,46 <i>f,g</i>	30,05 ± 6,22 <i>d</i>
Capri	41,23 ± 2,41 <i>e,f,g,h</i>	33,50 ± 0,42 <i>e,f</i>	6,44 ± 3,04 <i>d</i>	51,58 ± 0,47 <i>e</i>	1,62 ± 0,43 <i>j</i>	11,88 ± 2,37 <i>g,h</i>
Irma	37,28 ± 1,17 <i>g,h,i,j</i>	11,95 ± 0,78 <i>h,i</i>	1,65 ± 0,07 <i>e,f</i>	11,14 ± 0,58 <i>j</i>	5,36 ± 0,29 <i>h</i>	37,65 ± 5,09 <i>c,d</i>

Подаци су представљени као средње вредности ($n = 3$) ± стандардна грешка. Вредности у колонама обележене са различитим словима су статистички различите ($p < 0,05$), што је утврђено *Duncan*-овим тестом поређења. Ознаке у заградама су аналогне микрограмима одговарајућих еквивалената фенолних компоненти по граму свеже масе. (*Querc equiv*, еквивалент кверцетина; *Kaempf equiv*, еквивалент кампферола).

Да би се добио бољи увид у сличности између сорти у садржају фенолних једињења, направљен је кластерграм или *heatmap* на основу концентрације фенолних компоненти одређених *HPLC* анализом (слика 15). Различите сорте јагоде су распоређене у колоне на кластерграму, док су појединачна фенолна једињења детектована у овим сортама распоређена у редове. На тај начин су фенолна једињења идентификована у екстрактима јагода груписана у два главна кластера. Према скали боја, кластерграм је показао да су сорте '*Laetitia*' и '*Asia*', иако припадају другој подгрупи истог кластера, биле најсличније сорти '*Joly*', са највећим садржајем већине фенолних једињења, укључујући доминантно једињење пеларгонидин-3-глукозид. У оквиру другог кластера, од осталих је издвојена сорта '*Nadja*'. Дендрограм је показао сличности у фенолном саставу између сорти '*Asia*' и '*Laetitia*', '*Clery*' и '*Jeny*', '*Arosa*' и '*Roxana*', '*Lofty*' и '*Tea*', '*Vivaldi*' и '*Rumba*'. Такође, две последње поменуте сорте показале су сличност са сортама '*Premy*', '*Aprika*' и '*Sibilla*'. Дендрограм појединих фенолних једињења показао је позитивну корелацију између пеларгонидин-3-глукозида и катехина, кампферол-3-кумароилглукозе и кампферол-3-глукозида, деоксихексозида елагинске киселине и *p*-кумароил глукозе, као и кампферол-3-ацетилглукозида и кверцетин глукуронида.



Слика 8. Кластерграм генерисан хијерархијским груписањем концентрација појединачних фенолних једињења квантификованих помоћу *HPLC* (распоређени у редове) у различитим сортама јагоде (распоређене у колоне). Подаци су стандардизовани за све сорте за свако фенолно једињење, тако да је средња вредност 0, а стандардна девијација 1. Према скали боја, светло црвена боја представља висок садржај једињења, црна боја одговара вредности око просека, а зелена боја означава ниже вредности садржаја фенола. Леви кластер дендрограма представља корелацију појединачних фенолних једињења у одређеној сорти, док горњи дендрограм приказује сличност сорти у погледу фенолног састава.

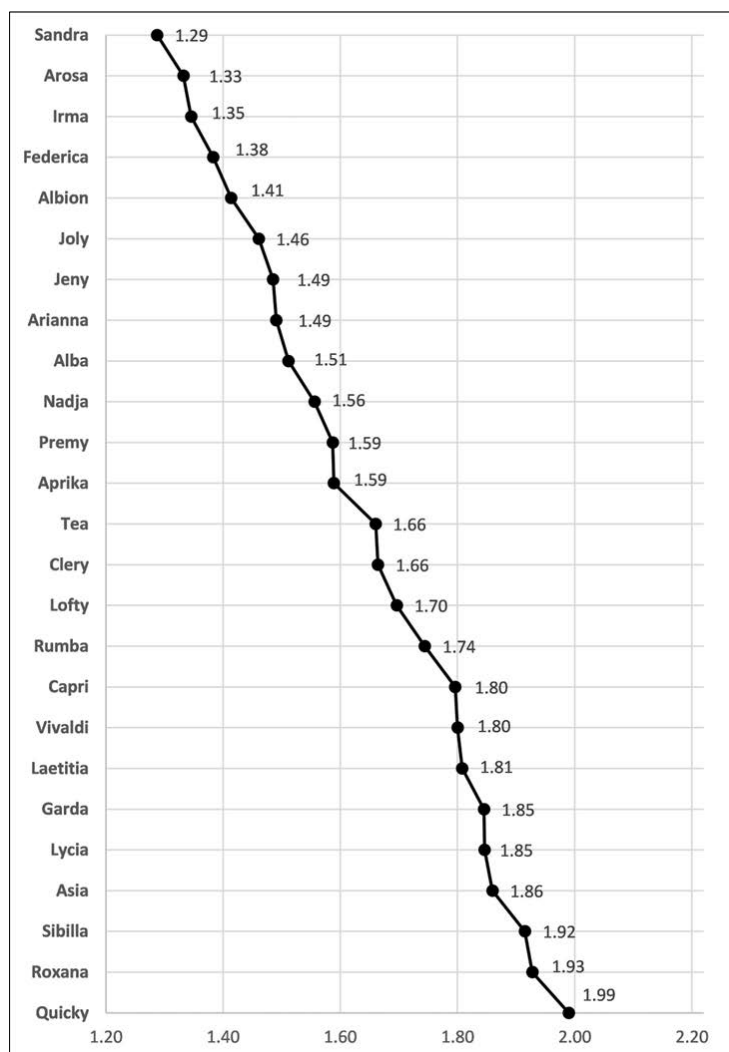
Структура, положај и укупан број делова шећера у флавоноидима играју важну улогу у дефинисању њихове антиоксидативне активности. Основна структура флавоноида је агликон, али се јављају и као гликозиди, а гликозидна веза се обично налази на позицијама 3 или 7 (Kumar and Pandey, 2013). Иако су агликонии снажнији антиоксиданси од одговарајућих гликозида, примећено је да већи степен полимеризације повећава антиоксидативну ефикасност процијанидина. Као што је поменуто у претходном поглављу, димери и тримери процијанидина су ефикаснији антиоксиданси од мономерних флавоноида, док је активност тетрамера (тј. олигомера) била око четири пута већа од активности претходних фракција (Vennat et al., 1994). Образац гликозилације испитиваних сорти показао је да је 92,23%

антоцијанина представљено као базични гликозиди, док се 7,77% појавило у ацилованом облику. Другачији образац, са 44,94% гликозида и 55,06% ацилованог облика, примећен је код деривата фенола, док је само 11,69% квантификованих фенолних једињења било у недеривативном, слободном облику.

Добијени профили флавоноидних гликозида свих испитиваних сорти указују на различите шећерне групе: гликозиде, ацетилгликозиде, рутинозиде, малонилгликозиде, глукурониде и кумароилгликозиде. Укупно, 87,79% антоцијанина представљено је као гликозиди, 7,34% као малонилгликозиди, 4,44% као рутинозиди и само 0,43% као ацетилгликозиди. Код деривата фенола, образац гликозилације је био другачији, где се 53,50% њих јавља као кумароилгликозид, 26,08% као глукуронид, 15,14% као гликозид, 3,71% као деоксихексозид и 1,56% као ацетилгликозид.

4.2 УКУПНИ ИНДЕКС КВАЛИТЕТА (*TQI*) – ОДАБИР СОРТИ ЗА ДАЉУ АНАЛИЗУ

Да би биле одабране репрезентативне сорте за даљу анализу путем *FT ICR MS*, а затим и *MSI* и *MALDI*, приступили смо одређивању укупног индекса квалитета (*TQI*) (Djekic et al., 2018). То је нови математички модел који омогућава упоређивање квантитативно одређених појединачних параметара квалитета плодова јагоде, без обзира на њихове јединице, у циљу добијања једне вредности као показатеља укупног квалитета плода. Укупни индекс квалитета за све шећере и органске киселине које су квантификоване у свих 25 сорти помоћу *HPLC* анализе приказан је на слици 15. Најбољу *TQI* оцену од свих сорти је имала '*Sandra*' (1,29), а затим '*Arosa*' (1,33) и '*Irma*' (1,35). Најлошије рангирана је била '*Quicky*' (1,99), а затим сорте '*Roxana*' (1,93) и '*Sibilla*' (1,92). *TQI* је показао да се вредности за укупни квалитет плода разликују између различитих сорти јагоде, те да се '*Sandra*' може сматрати најбољом сортом у смислу свеукупног квалитета плода.



Слика 16. Укупни индекс квалитета за шећере и органске киселине из екстракта плодова 25 сорти јагоде квантификованих помоћу *HPLC*.

На основу резултата укупног индекса квалитета, за даљу анализу плодова јагоде уз помоћ *FT-ICR-MS* и *MSI* определили смо се за следеће две репрезентативне сорте: '*Sandra*' као позитиван екстрем и '*Aprika*' као просечна сорта према резултату *TQI* анализе.

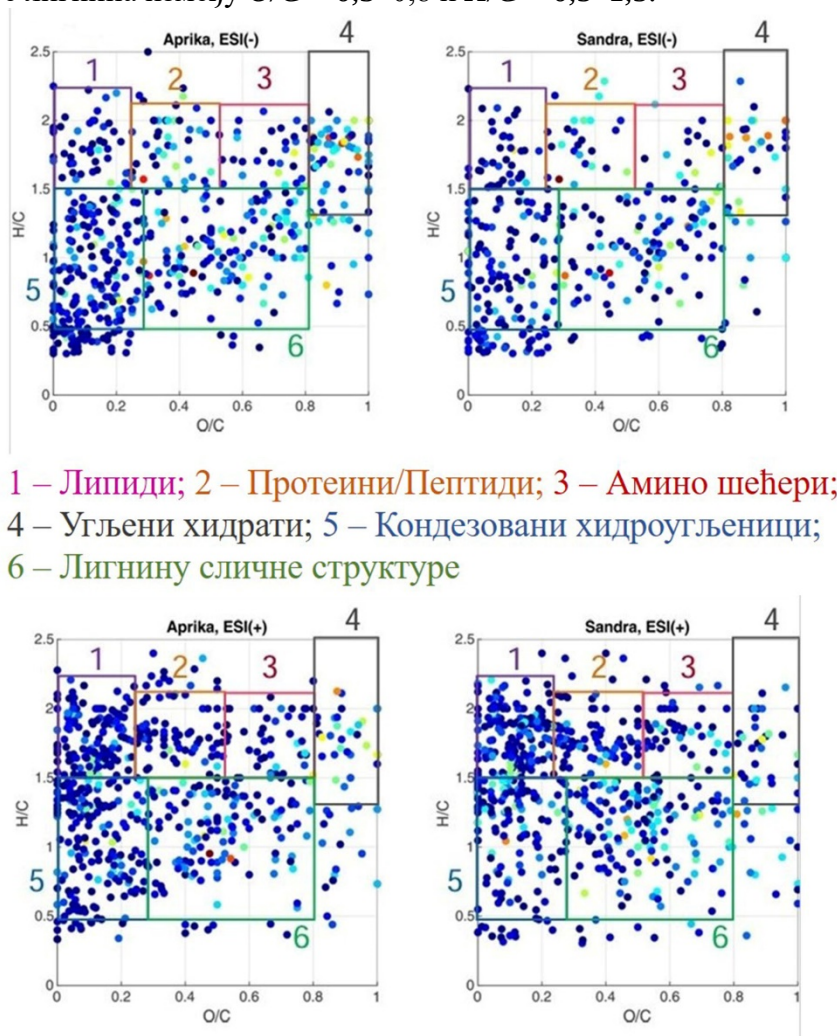
4.3 ФУРИЈЕОВА ТРАНСФОРМАЦИЈА – ЈОН РЕЗОНАНТНА ЦИКЛОТРОНСКА МАСЕНА СПЕКТРОМЕТРИЈА, (*FT ICR MS*)

Ради лакшег проучавања састава екстракта одабраних сорти јагоде ('*Aprika*' и '*Sandra*'), користе се ван Кревеленови (*Dirk Willem van Krevelen* (1914-2001) дијаграми, који показују визуелну разноврсност једињења и класа једињења које јагоде садрже (слика 16). Да би се добио овакав визуелни приказ, *O/C* однос као и *H/C* однос се израчунава за сваку молекулску формулу, а сваки молекул је представљен у овом дијаграму као једна тачка. Специфични *O/C* и *H/C* региони могу се повезати са различитим класама једињења као што су липиди, шећери, пептиди, лигнини, и др. како би се дефинисао састав комплексног узорка.

Према претходно поменутих ауторима (*Rivas-Ubach et al., 2018*), у ван Кревеленовом графикану се могу наћи:

1. липиди између $O/C = 0-0,3$ и $H/C = 1,6-2,3$,
2. пептиди/протеини између $O/C = 0,3-0,5$ и $H/C = 1,5-2,1$,
3. аминокиселине $O/C = 0,5-0,8$ и $H/C = 1,5-2,1$,
4. угљени хидрати $O/C = 0,8-1,3$ и $H/C = 1,4-2,4$

5. кондензовани угљоводоници имају ниже вредности у O/C и налазе се у региону 0–0,3, а заузимају сличан H/C регион као и структуре сличне лигнину,
6. структуре лигнина између $O/C = 0,3–0,8$ и $H/C = 0,5–1,5$.

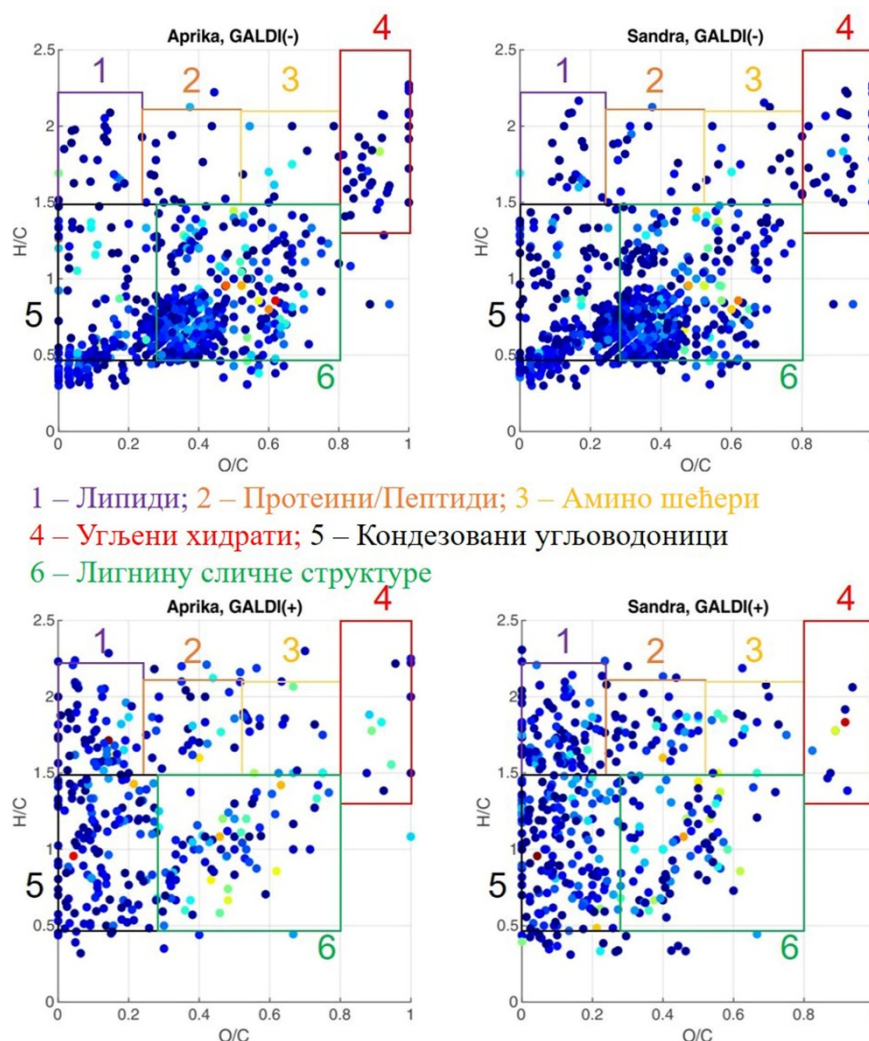


Слика 17. Ван Кревеленови дијаграми добијени помоћу *ESI-FT-ICR-MS* анализе података из екстракта две одабране сорте јагода 'Aprika' и 'Sandra'.

Као што се види на слици 17, може се претпоставити да је у екстрактима јагода присутно свих шест класа наведених једињења. *ESI(+)* првенствено детектује молекуле као што су липиди, пептиди/протеини и аминок шећери. Насупрот томе, чини се да је *ESI(-)* погоднија за јонизацију угљених хидрата, пошто је више тачака видљиво у овом делу дијаграма и то у региону $O/C = 0,8–1,3$ и $H/C = 1,4–2,4$.

Затим су екстракти двеју одабраних сорти јагода ('Aprika' и 'Sandra') анализирани помоћу *GALDI(-)*- и *GALDI(+)-FT-ICR-MS*. (слика 17.)

Поново су на исти начин дефинисане класе једињења. Уочени интезитет је представљен логаритамски и означен тачкама у боји (плава означава низак интезитет, жута средњи интезитет, а црвена висок интезитет). Такође, класе супстанци су означене бројевима и бојама. Једињења која нису сврстана ни у једну од поменутих класа нису евалуирана. За добијање визуелног приказа, O/C однос као и H/C однос је израчунат за сваку додељену молекулску формулу и сваки молекул представљен у дијаграму као једна тачка карактеристичне боје. Специфични O/C и H/C региони повезани су са различитим класама једињења као што су липиди, шећери, пептиди, лигнини, итд. како би се утврдио састав комплексног узорка.



Слика 18. Ван Кревеленови дијаграми добијени помоћу *GALDI-FT-ICR-MS* анализе података из екстракта две одабране сорте јагоде 'Aprika' и 'Sandra'.

На слици 18. се види да *GALDI* може да детектује свих шест класа поменутих једињења који су присутни у екстрактима јагоде. *GALDI(+)* мод првенствено детектује молекуле као што су липиди, пептиди/протеини и кондезовани угљоводоници, док је *GALDI(-)* мод погоднији за јонизацију кондезованих угљоводоника и лигнину сличних структура, пошто је више тачака видљиво у овом делу дијаграма и то у региону $O/C = 0-0,8$ и $H/C = 0,3-1,5$.

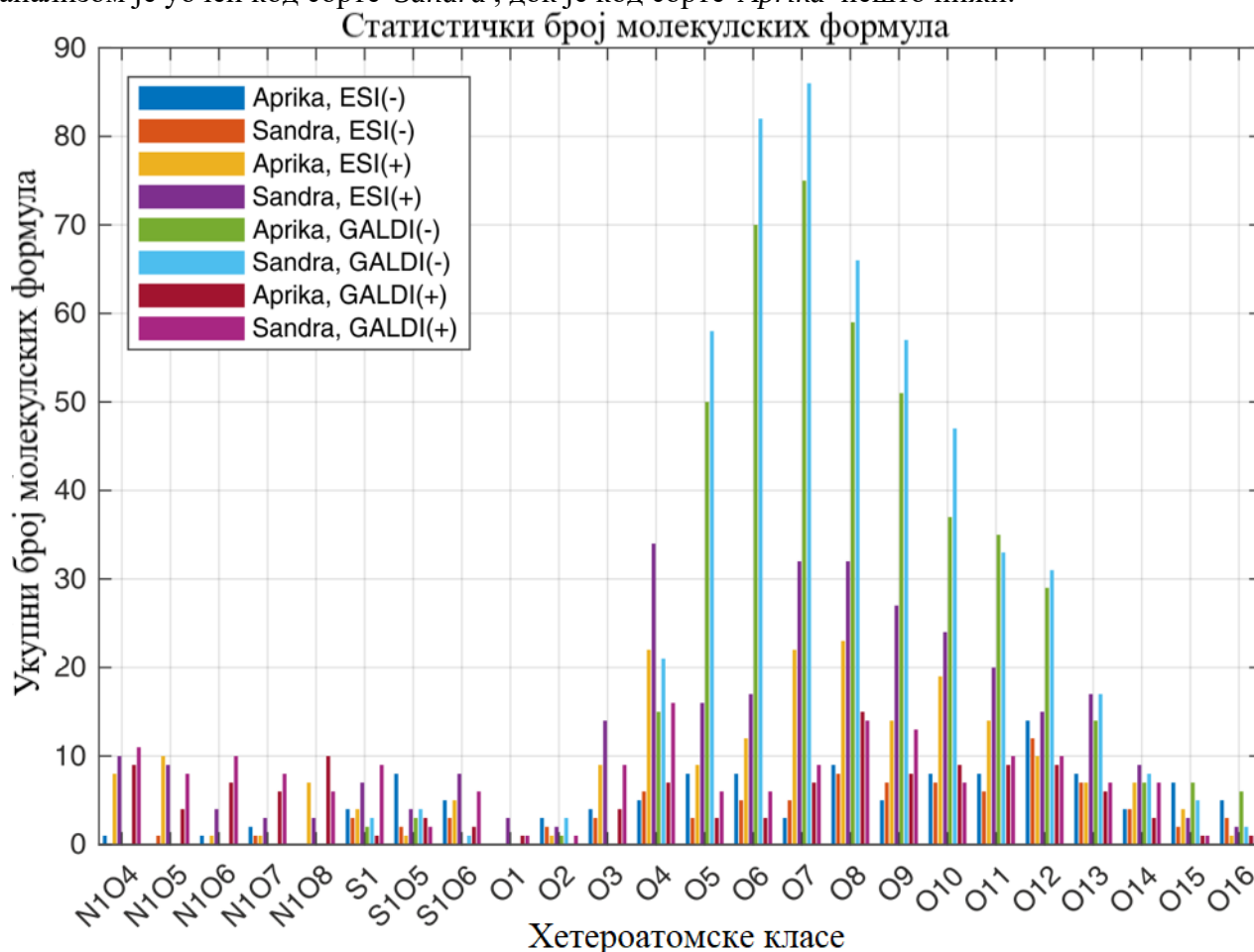
На основу приказаног, може се закључити да се липидне и пептидне структуре лакше детектују са *ESI(+)* и *GALDI(+)* методом. Амино шећери и угљени хидрати се потенцијално могу детектовати уз помоћ *ESI(+)*, *ESI(-)* и *GALDI(-)*, док кондезовани угљоводоници се лакше детектују *ESI(+)*, *ESI(-)* и *GALDI(+)*. Структуре сличне лигнину (полифенолна једињења) се детектују у највећим количинама применом *GALDI(-)* методе.

Проучавањем ових дијаграма можемо доћи до закључка да је већина детектованих јона приписана липидима, угљеним хидратима, структурама сличним лигнину и кондезованим угљоводоницима, што значи да су органске киселине, шећери и полифенолна једињења у значајној мери присутни у обе сорте јагоде.

Како би се сазнало више о молекулима и класама једињења који су присутни у екстрактима испитиваних сорти јагоде подаци са масеног спектра су даље испитивани груписањем додељених молекулских формула у хетероатомске класе, на основу броја азота, кисеоника и/или сумпора. Ове групе хетероатомских једињења су затим процењене према укупном броју додељених молекулских формула и релативној заступљености различитих хетероатомских класа. Релативна заступљеност је у овом случају збир вредности интензитета

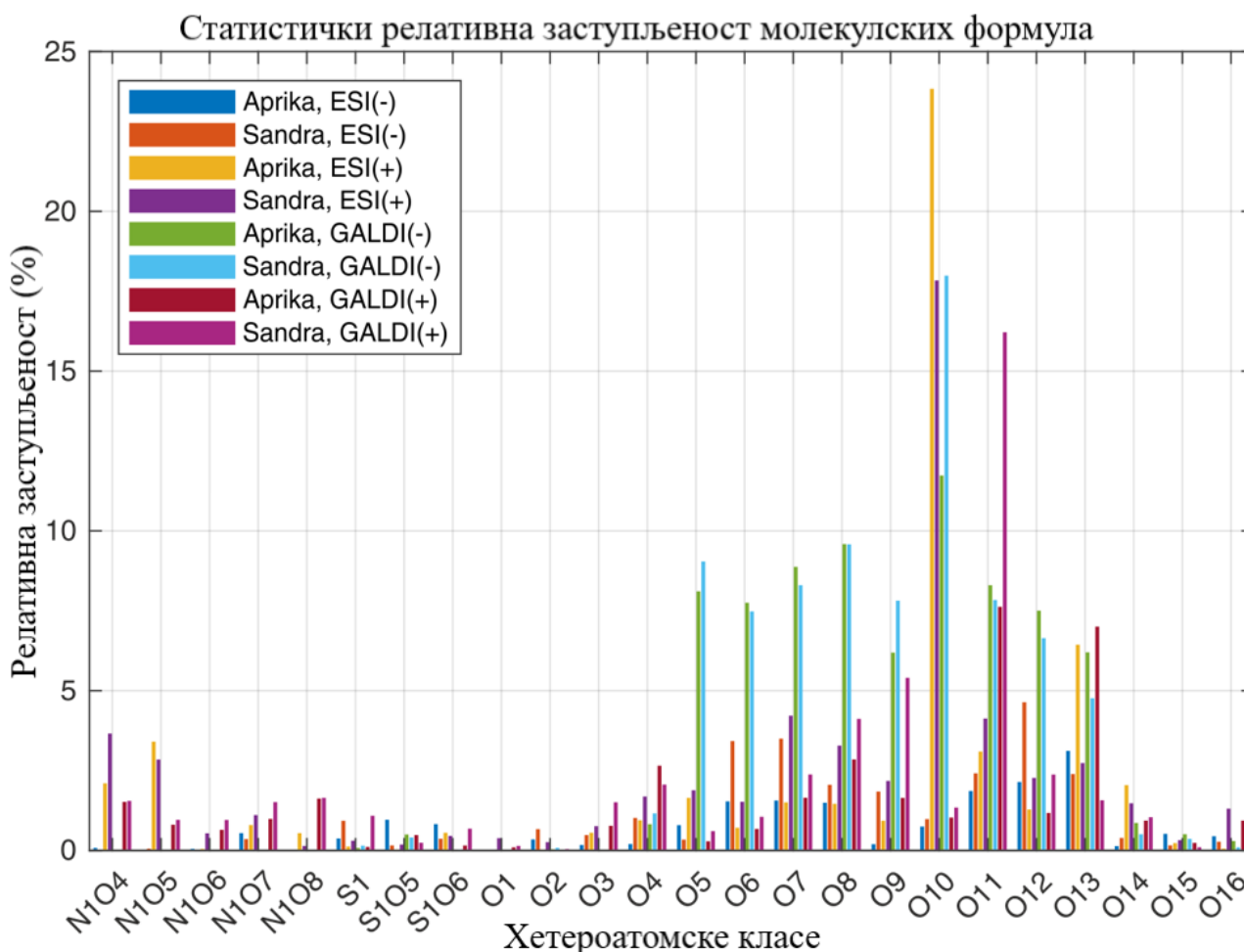
за све јоне, који су додељени одређеној хетероатомској класи што представља семи-квантитативну оцену.

На слици 19. је визуелно представљена процена за групе једињења N_1O_4 – N_1O_8 , S_1 , S_1O_5 – S_1O_6 и O_1 – O_{16} , које су имале највећи број додељених молекулских формула. Из графикана је очигледно да је највећи број молекулских формула из приказаних класа једињења приписан *ESI(+)-FT-ICR-MS* скупу података за сорту 'Sandra', иако су и код сорте 'Aprika' у сличном опсегу. Међутим, у случају *ESI(-)-FT-ICR-MS* нешто веће вредности се јављају код сорте 'Aprika'. Такође, највећи број молекулских формула одређених *GALDI(-)-FT-ICR-MS* анализом је уочен код сорте 'Sandra', док је код сорте 'Aprika' нешто нижи.



Слика 19. Поређење додељеног броја молекуларних формула са *FT-ICR-MS* подацима за екстракте репрезентативних сорти јагоде 'Aprika' и 'Sandra' за хетерогене класе једињења.

Релативна заступљеност (слика 20.) је слична за оба екстракта јагоде за сваку од хетероатомских класа. Из дијаграма се такође види да већина једињења припада хетероатомским класама које садрже кисеоник O_1 – O_{16} . Према литературним подацима ова једињења припадају органским киселинама, шећерима и фенолним једињењима (Enomoto, 2021a, 2021b; Enomoto et al., 2020, 2018; Kajdzanoska et al., 2011; La Barbera et al., 2017; Milosavljević et al., 2021, 2022; Rivas-Ubach et al., 2018; Wang et al., 2021).



Слика 20. Поређење релативне заступљености хетероатомских класа са *FT-ICR-MS* подацима за екстракте репрезентативних сорти јагоде 'Aprika' и 'Sandra' за хетерогене класе једињења.

Хетероатомске класе S_1O_5 и S_1O_6 могу се приписати киселинама који садрже сумпор. Једињења хетероатомских класа N_1O_4 – N_1O_8 су углавном измерена уз помоћ *ESI(+)-FT-ICR-MS* код обе сорте. Када се погледају Ван Кревеленови дијаграми, ови молекули вероватно одговарају пептидима/протеинима и аминок шећерима.

Након тога, помоћу добијених скупова података за оба екстракта извршена је структурна карактеризација различитих молекула у различитим хетероатомским класама, коришћењем *nC-DBE* дијаграма. Ови дијаграми се користе за визуелизацију броја угљеника (*nC*) у односу на еквивалент двоструке везе (*DBE*) сваке хетероатомске класе. И *nC* и *DBE* се добијају коришћењем молекулске формуле којој је додељен јон.

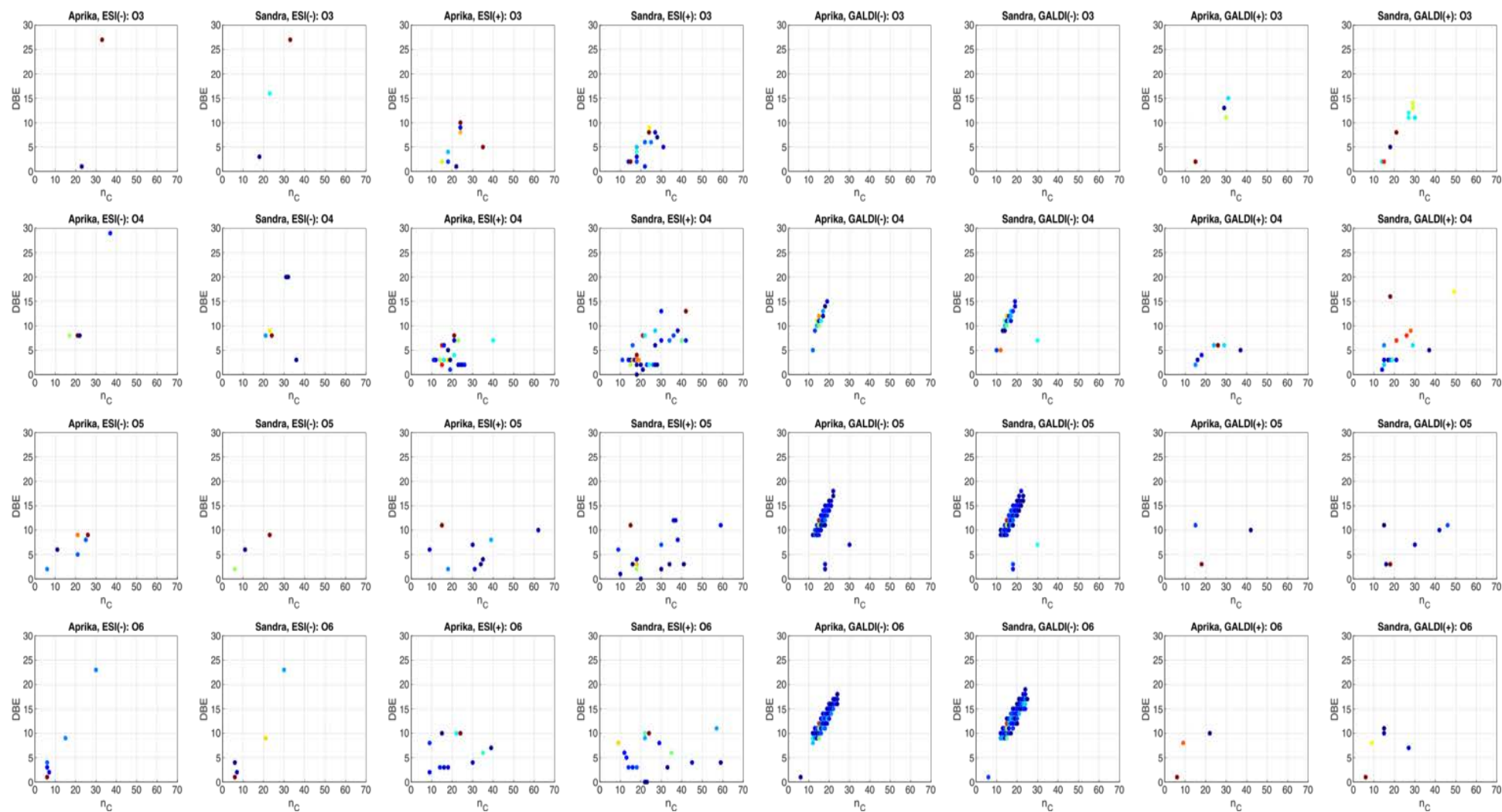
$$DBE = \frac{2c+2-h+n}{2} \quad (19)$$

Број додељених атома угљеника даје вредност *nC*, док се *DBE* може израчунати према броју додељених атома угљеника (*c*), водоника (*h*) и азота (*n*). *DBE* одговара броју двоструких веза и циклуса који су присутни у структури молекула. Вредност *nC* се користи за процену степена алкилације класе једињења (Liu et al., 2017). *nC-DBE* дијаграми за хетероатомске класе O_3 – O_6 , O_7 – O_{10} , O_{10} – O_{14} , N_1O_4 – N_1O_8 , као и $S_1 + S_1O_5$ – S_1O_6 су приказани на слици 20, 21 22, 23 и 24.

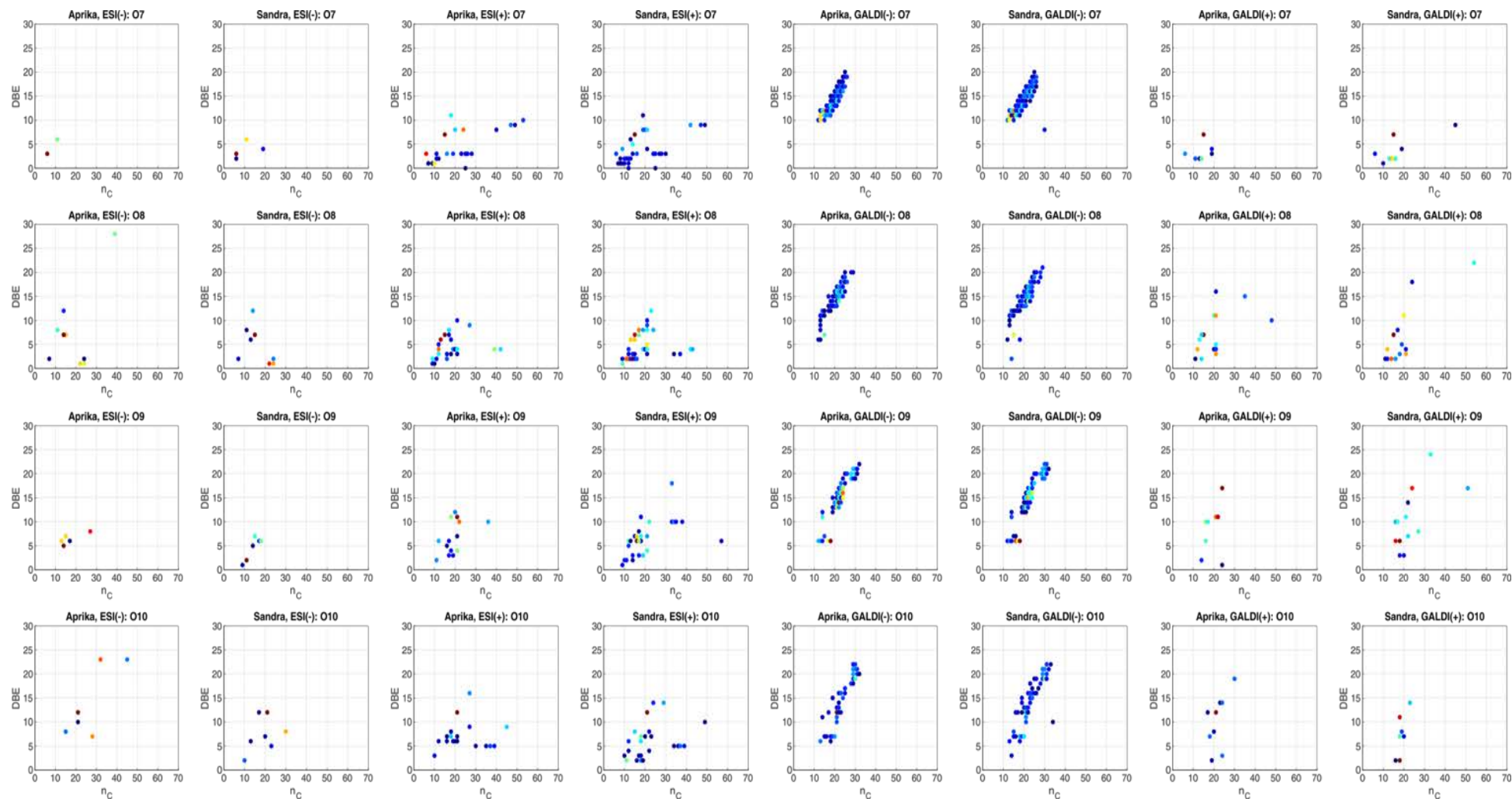
Из ових дијаграма се може видети да су углавном неароматични молекули са вишеструким хидрокси, карбонил, алдехидним, карбокси или естарским групама потенцијално присутни у хетероатомским класама O_1 – O_{16} , пошто већина једињења поседује

DBE вредности ≤ 5 . Органске киселине, попут оксокарбоксилних киселина (O_3 , $DBE = 2$), дикарбоксилних киселина (O_4 , $DBE = 2$), трикарбоксилних киселина (O_6 , $DBE = 3$), тетракарбоксилних киселина (O_8 , $DBE = 4$), пентакарбоксилних киселина (O_{10} , $DBE = 5$) и хексакарбоксилних киселина (O_{12} , $DBE = 6$), са вредностима nC између 11 и 43, могу бити присутни у испитиваним екстрактима плодова јагоде. Молекули који имају више вредности *DBE* и више кисеоника могу одговарати аналогним структурама са додатним функционалним групама које такође садрже кисеоник (као што је нпр. хидрокси група).

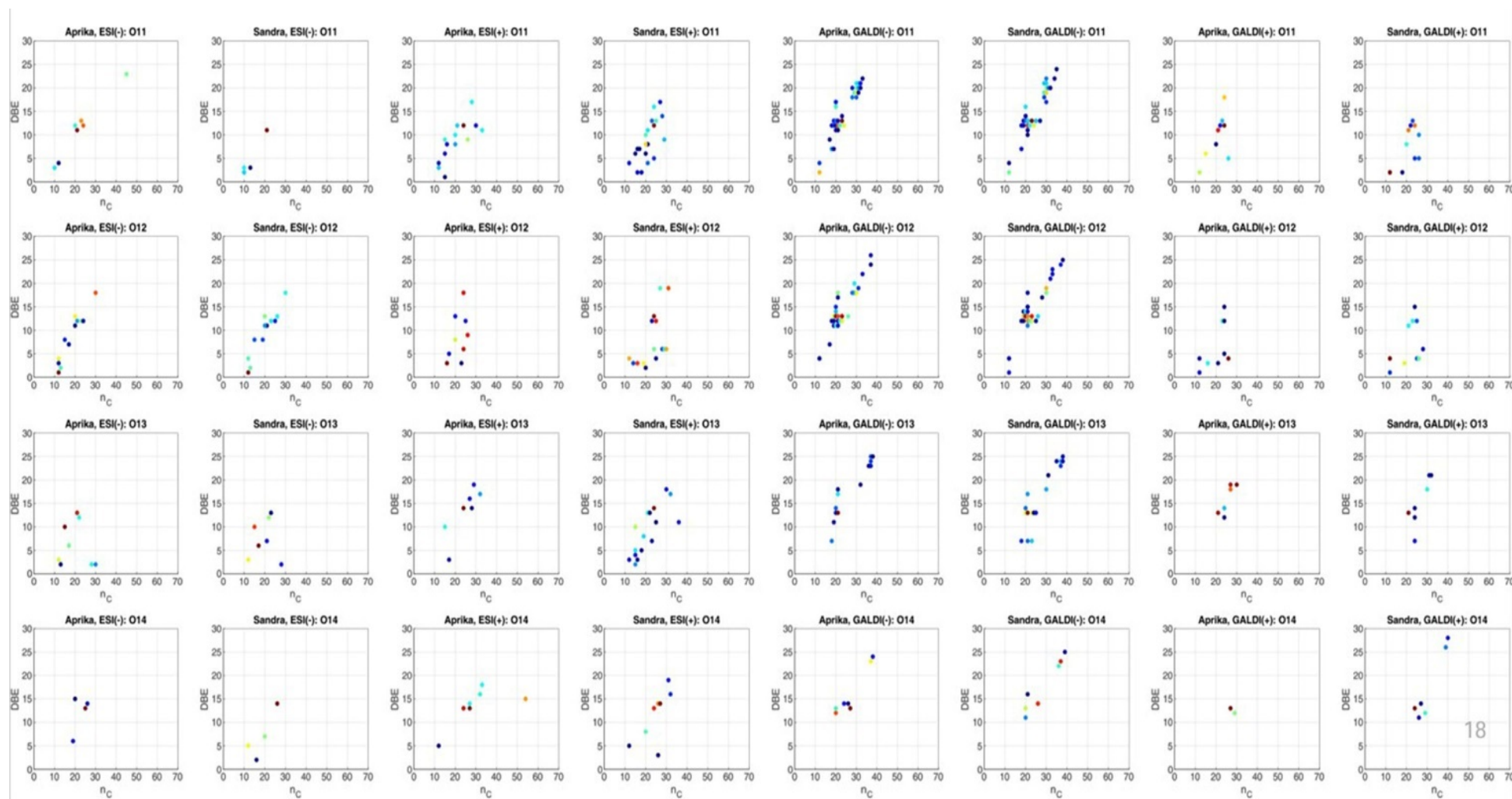
Липидне и угљенохидратне структуре са $nC \leq 40$ и $DBE \leq 5$ се могу представити према nC -*DBE* дијаграмима као једињења класа O_3 – O_{14} за обе испитиване сорте јагоде (слике 21, 22, 23).



Слика 21. nC -DBE дијаграм хетероатомских класа једињења O_3 – O_6 за екстракте репрезентативних сорти јагоде 'Aprika' и 'Sandra' које су анализирале помоћу $ESI(-)$ -FT-ICR-MS и $ESI(+)$ -FT-ICR-MS. Интензитет је представљен логаритамски и означен бојом (плава: ниски интензитет, жута: средњи интензитет, црвена: високи интензитет). У једном реду су дати $ESI(-)$ и $ESI(+)$ подаци за једну класу једињења за обе испитиване сорте.



Слика 22. n_C -DBE дијаграм хетероатомских класа O_7 – O_{10} за екстракте репрезентативних сорти јагода 'Aprika' и 'Sandra' које су анализиране помоћу $ESI(-)$ -FT-ICR-MS и $ESI(+)$ -FT-ICR-MS. Интензитет је представљен логаритамски и означен бојом (плава: ниски интензитет, жута: средњи интензитет, црвена: високи интензитет). У једном реду су дати $ESI(-)$ и $ESI(+)$ подаци за једну класу једињења за обе испитиване сорте.



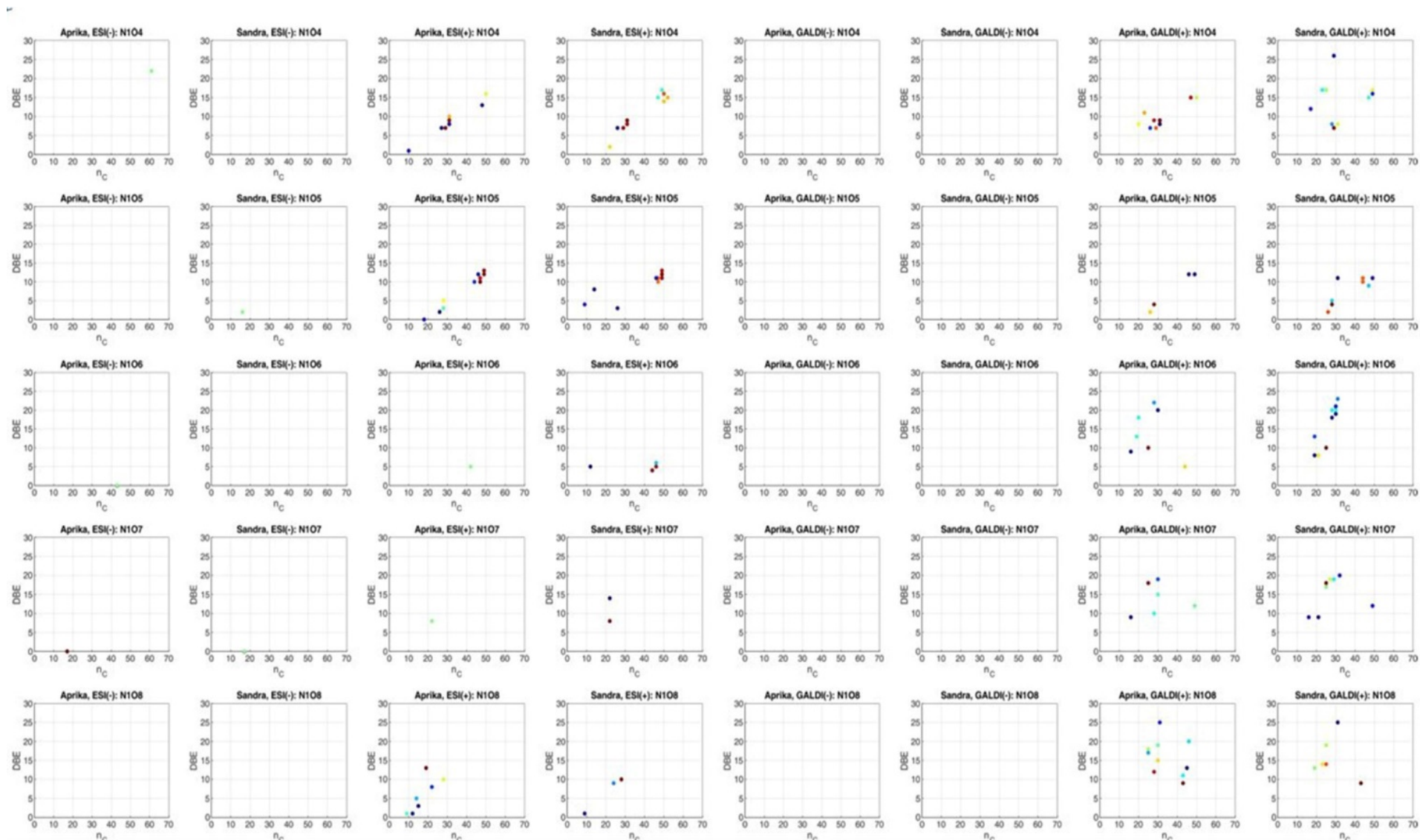
Слика 23. nC -DBE дијаграм хетероатомских класа O_{10} – O_{14} за екстракте репрезентативних сорти јагода 'Aprika' и 'Sandra' које су анализирани помоћу $ESI(-)$ -FT-ICR-MS и $ESI(+)$ -FT-ICR-MS. Интензитет је представљен логаритамски и означен бојом (плава: ниски интензитет, жута: средњи интензитет, црвена: високи интензитет). У једном реду су дати $ESI(-)$ и $ESI(+)$ подаци за једну класу једињења за обе испитиване сорте.

Према *nC-DBE* дијаграмима може се претпоставити да су у испитиваним екстрактима јагода присутни моносахариди, дисахариди и трисахариди, као молекули са великим бројем кисеоника ($O \leq 18$), али и малим бројем угљеника ($nC \leq 18$) и ниским вредностима *DBE* ($DBE \leq 3$). Такође, према дијаграмима ароматични молекули, као што су полифенолна једињења, представљени су класом једињења O_6-O_{16} ($DBE \geq 4$). (Enomoto, 2021a; Enomoto et al., 2020, 2018; Kajdžanoska et al., 2011; La Barbera et al., 2017; Milosavljević et al., 2022; Wang et al., 2021).

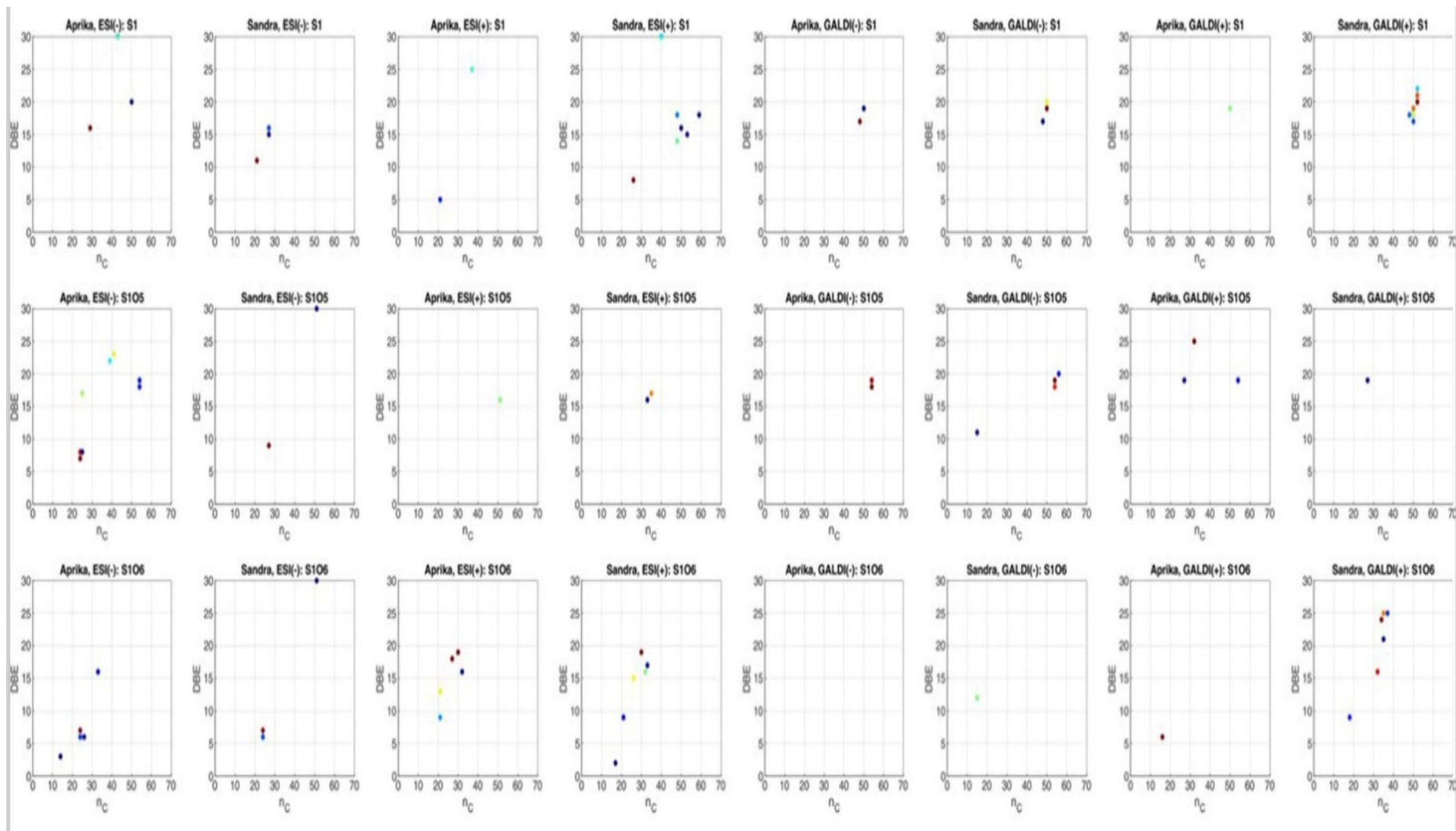
Једињења која садрже азот и кисеоник поседују релативно високе вредности *DBE* ($DBE \leq 17$), које вероватно одговарају ароматичним и аминокиселинским молекулима (слика 24).

Са друге стране, само мале количине једињења која садрже сумпор, али и сумпор/кисеоник су присутни у *nC-DBE* дијаграмима који представљају класе једињења S_1 и $S_1O_5-S_1O_6$. Већина ових једињења има *DBE* вредности ≥ 5 , а које се могу приписати ароматичним сулфонатима и сулфонским киселинама (слика 25.), посебно код сорте 'Sandra' (што се може видети код хетероатомских класа S_1 и $S_1O_5-S_1O_6$, $DBE \leq 23$).

Дакле, може се приметити да незасићена и потенцијално ароматична једињења која садрже азот у аминокиселинској групи се могу детектовати помоћу *ESI(+)* и *GALDI(+)* анализа (што се може видети код хетероатомских класа $N_1O_4-N_1O_8$, $DBE \leq 25$).



Слика 24. n_C -DBE дијаграм хетероатомских класа N_1O_4 – N_1O_8 за екстракте репрезентативних сорти јагоде 'Aprika' и 'Sandra' које су анализирале помоћу ESI(-)-FT-ICR-MS и ESI(+)-FT-ICR-MS. Интензитет је представљен логаритамски и означен бојом (плава: ниски интензитет, жута: средњи интензитет, црвена: високи интензитет). У једном реду су дати ESI(-) и ESI(+) подаци за једну класу једињења за обе испитиване сорте.



Слика 25. nC -DBE дијаграм хетероатомских класа $S_1 + S_1O_5 - S_1O_6$ за екстракте репрезентативних сорти јагоде 'Aprika' и 'Sandra' које су анализирале помоћу $ESI(-)$ -FT-ICR-MS и $ESI(+)$ -FT-ICR-MS. Интензитет је представљен логаритамски и означен бојом (плава: ниски интензитет, жута: средњи интензитет, црвена: високи интензитет). У једном реду су дати $ESI(-)$ и $ESI(+)$ подаци за једну класу једињења за обе испитиване сорте.

4.4 EPR

Реактивне врсте кисеоника (ROS) се производе током нормалног раста и метаболизма биљака (Pham-Huy et al., 2008). У биљном ткиву, укључујући и зрело воће, митохондрије представљају главни извор слободних радикала (Pirker et al., 2002). У ниским концентрацијама, ROS су кључни регулатори многих физиолошких процеса у биљкама као што су раст и развој, ћелијски циклус, програмирана ћелијска смрт, хормонска сигнализација и одговори на биотички и абиотички стрес (Enomoto, 2021a, 2021b; Enomoto et al., 2018). У вишим концентрацијама, ROS могу да изазову оштећења мембране, протеина, хлорофила и нуклеинских киселина (Rice-Evans et al., 1991). Међутим, биљке су развиле различите одбрамбене механизме, засноване на ензимским и неензимским антиоксидативним метаболичким процесима који претварају ROS у мање штетне производе, чиме се одржава и њихова хомеостаза. Код различитих врста воћака је установљен висок ниво антиоксидативних молекула у плодовима, што је потврђено истраживањима у којима се и показало да се повећање антиоксидативног капацитета крвног серума код људи јавља након конзумирања јагода (Cao et al., 1998). Природни антиоксиданси, укључујући витамине А, Ц и Е, каротеноиде и фенолна једињења, могу ефикасно уклонити слободне радикале (Pineli et al., 2011). Такође, уочено је да антоцијанини имају и до четири пута јачи капацитет уклањања ROS-а од аналога витамина Е и Ц, због њихове високе реактивности као донора протона и електрона, способности да стабилизују и делокализују неспарене електроне и способности да хелирају јоне прелазних метала (Osorio et al., 2011). Због свега овог, стално расте интересовање за истраживање природних антиоксиданата из биљног материјала. За одређивање антиоксидативног капацитета различитих намирница могу се користити различите аналитичке методе, али једна од успешнијих техника за утврђивање варијација у антиоксидативним капацитетима плодова различитих сорти јагоде је електронска парамагнетна резонантна (EPR) спектроскопија.

Због могућности директног праћења сигнала радикалских врста, EPR је успешно примењена за одређивање активности уклањања радикала индиферентних намирница богатих фенолним једињењима (Kostka et al., 2020; Osorio et al., 2011). EPR спин-трапинг техника је веома специфична метода која омогућава идентификацију и квантификацију краткоживећих слободних радикала, при чему сваки даје карактеристичне EPR спектре одговарајућих спин-адуката (Savić and Moјović, 2012). Спин-трап DEPMPO (5-(диетоксифосфорил)-5-метил-1-пирилин-N-оксид) који је коришћен у овој докторској дисертацији, има високу осетљивост, адукти (производи) су стабилни и има велику способност разликовања различитих врста заробљених радикала (Bačić and Moјović, 2005). Иако је EPR метода незамењива за добијање специфичног сигнала одређеног радикала, објављено је само неколико радова о мерењу активности уклањања слободних радикала плодова јагоде помоћу EPR-а, од којих је већину публиковала наша група (Dragišić Maksimović et al., 2015; Giampieri et al., 2012b; Milosavljević et al., 2022; Nakarada et al., 2022).

За проучавање кинетике редукције сигнала DEPMPO/OH спин-адукта од стране метанолних екстраката јагода, $\cdot\text{OH}$ радикал је генерисан у Фентоновој реакцији (Savić and Moјović, 2012). Такође је праћена редукција сигнала DEPMPO/OOH спин-адукта ($\cdot\text{O}_2^-$) који је генерисан у присуству хипоксантина/ксантин-оксидазе и спих-трапа DEPMPO (Frejaviille et al., 1995). У циљу проучавања утицаја екстраката јагоде на редукцију $\cdot\text{NO}$ радикала, као генератор $\cdot\text{NO}$ радикала коришћен је натријум нитропрусид, а као спин-трап употребљен је комплекс гвожђе-N-(дитиокарбокси)саркозин ($\text{Fe}(\text{DTCS})_2$). Редукција EPR сигнала израчуната је коришћењем следеће формуле:

$$\Delta h = \frac{h_i - h_x}{h_i} \times 100 \quad (\%) \quad (20)$$

где h_i представља интензитет сигнала контроле, док h_x представља интензитет сигнала испитиваног узорка.

Као што је приказано у табели 8. екстракти јагоде су изазвали смањење интензитета *EPR* сигнала *DEPMPO/OH* спин-адукта због конкуренције за хидроксилни радикал између агенса за хватање спина и антиоксиданата присутних у екстракту. Највећу активност у уклањању $\bullet\text{O}_2^-$ радикала показала је сорта '*Roxana*' (71,32%), а најмању '*Clery*' (22,70%). Све тестиране сорте јагоде су показале високе активности уклањања $\bullet\text{OH}$ радикала (93–96%). Што се тиче активности у уклањању радикала азот монооксида, највећу активност је имала сорта '*Tea*' (63,44%), а најмању сорта '*Jeny*' (12,04%).

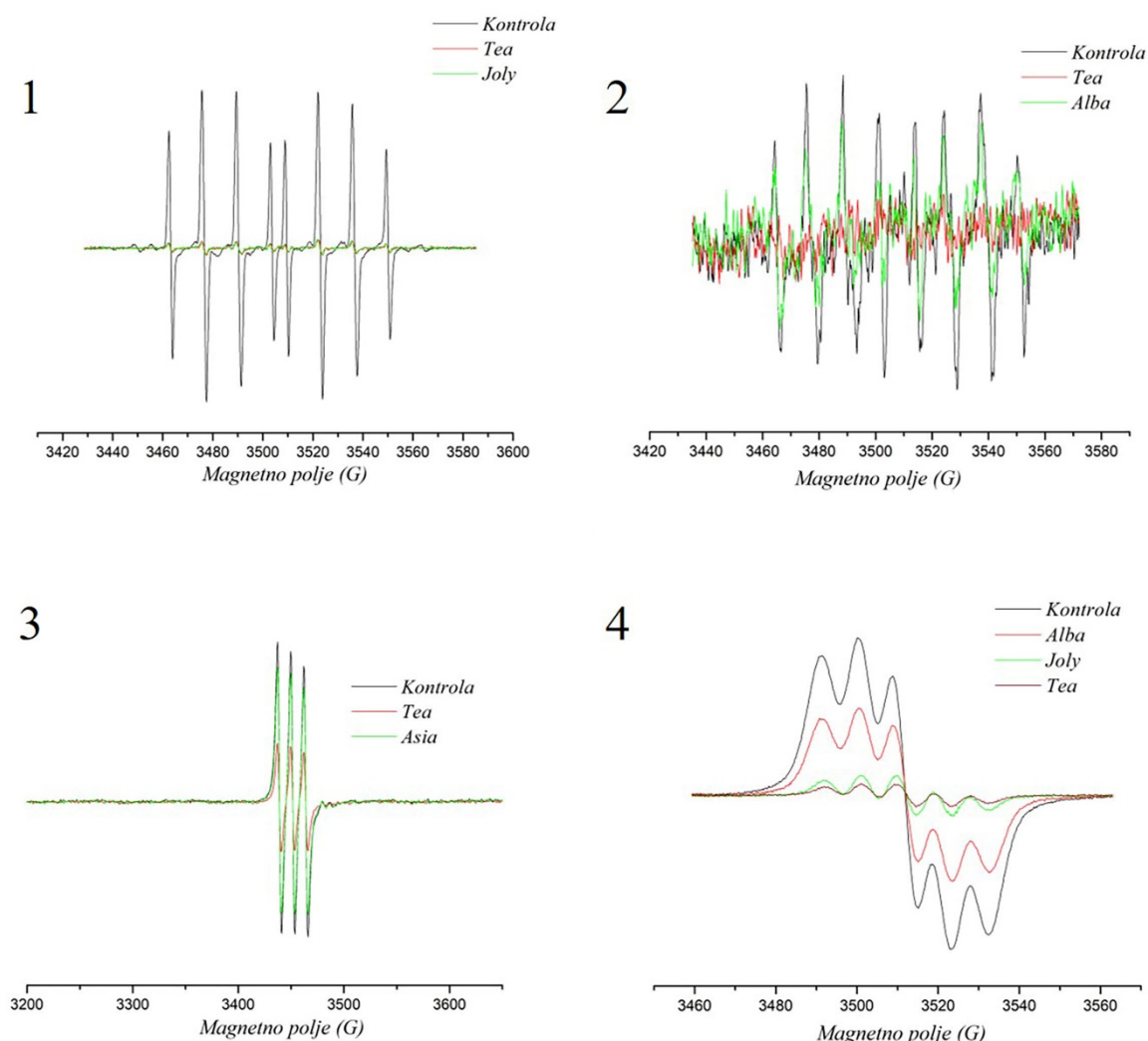
Табела 8. Антирадикалска активност екстраката плодова 25 сорти јагоде одређена *EPR* спин-трап техником изражена у процентима

Сорте	O_2^- %	$\bullet\text{OH}$ %	$\bullet\text{NO}$ %	DPPH %
<i>Roxana</i>	71.32	93.85	40.17	54.16
<i>Arosa</i>	35.35	95.53	49.84	61.42
<i>Joly</i>	27.52	94.71	62.32	70.36
<i>Asia</i>	42.86	94.78	15.36	62.75
<i>Alba</i>	26.65	94.71	34.02	46.39
<i>Jeny</i>	46.94	94.90	12.04	61.20
<i>Laetitia</i>	49.77	94.82	12.52	68.32
<i>Garda</i>	48.76	95.31	47.40	47.71
<i>Lycia</i>	50.58	94.71	33.61	56.98
<i>Premy</i>	58.33	94.04	25.47	71.61
<i>Sibilla</i>	55.26	94.63	62.05	61.56
<i>Vivaldi</i>	58.44	95.27	41.80	65.11
<i>Rumba</i>	34.93	94.23	54.90	62.89
<i>Clery</i>	22.70	94.37	44.03	68.13
<i>Aprika</i>	46.38	93.63	61.15	63.95
<i>Quicky</i>	34.58	93.74	25.52	62.89
<i>Federica</i>	42.05	93.67	59.72	59.71
<i>Lofty</i>	65.87	94.67	43.26	66.79
<i>Tea</i>	86.13	94.97	63.44	78.88
<i>Nadja</i>	23.79	94.34	60.82	53.00
<i>Arianna</i>	40.20	93.52	52.54	48.60
<i>Sandra</i>	55.33	94.04	53.25	63.98
<i>Albion</i>	35.42	94.71	54.03	59.06
<i>Capri</i>	56.37	94.49	55.06	58.63
<i>Irma</i>	57.60	94.00	38.17	58.77

На слици 26 приказан је интензитет *EPR* сигнала *DEPMPO/OH* адукта генерисаног *in vitro* Фентоновом реакцијом (1), интензитет сигнала *DEPMPO/OOH* спин-адукта који је генерисан у присуству хипоксантина/ксантин-оксидазе и спих-трапа *DEPMPO* (2) и интензитет сигнала $\bullet\text{NO}$ радикала који је генерисан помоћу натријум-нитропрусид и спин-трапа $\text{Fe}(\text{DTCS})_2$ (3). Примећује се да је сигнал у сва три случаја био значајно већи у контроли у поређењу са екстрактом јагоде, што указује на јаку антирадикалску активност екстраката. Пошто је ткиво плода јагоде веома сложен систем, неколико фактора има одлучујућу улогу у различитим активностима уклањања фенола, као што су број и конфигурација хидроксилних група, гликозидне групе, присуство и 2,3-двоструке везе и 4-оксо група, процес естерификације итд. (Moazzen et al., 2022). У тако сложеном медијуму, тешко је дефинисати хемију која стоји иза антиоксидативних активности фенолних једињења. Стога би спин-трапинг метода могла пружити корисне информације о повезаности структуре фенолних

једињења, и њихове антиоксидативне активности, као и њиховој биолошкој важности у екстрактима плодова испитиваних сорти јагоде.

DPPH је слободни радикал који се обично користи у EPR анализама за мерење способности антиоксиданаса у биљкама да елиминишу слободно-радикалске врсте. Антиоксидативни потенцијал екстракта јагоде изражава се као смањење концентрације DPPH радикала (слика 26 (4)). Ово је упоредно приказано у табели 6, где већи проценат указује на већу способност уклањања DPPH. Тако су сорте 'Tea', 'Premy' и 'Joly' биле високо потентне сорте (преко 70%), слично њима и 'Laetitia' (68,32%), док су 'Alba', 'Garda' и 'Arianna' биле сорте са ниском антирадикалском активношћу (испод 50%).



Слика 26. Репрезентативни EPR спектри: (1) DEPMPO/OH адукта генерисаног *in vitro* Фентоновом реакцијом; (2) DEPMPO/OOH спин-адукта који је генерисан у присуству хипоксантина/ксантин-оксидазе и спин-трапа DEPMPO; (3) $\cdot\text{NO}$ радикала који је генерисан помоћу натријум-нитроприсида и спин-трапа $\text{Fe}(\text{DTCS})_2$; (4) спектри DPPH.

4.4.1.1 Липозоми

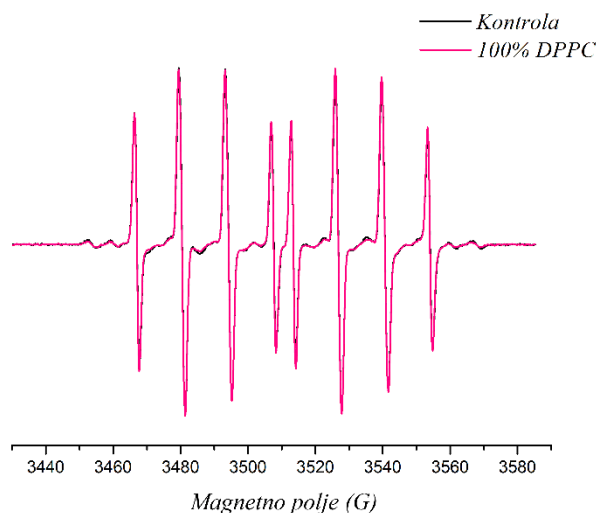
Битан корак у испитивању биолошке активности компонената из биљака је процедура екстракције, која има огроман утицај на резултате анализа. У литератури су различити растварачи и њихове мешавине, као и различите технике екстракције, коришћени за добијање биолошки активних једињења из екстракта јагоде. Подаци у претходно објављеним студијама указују да екстракти припремљени у 80% метанолу садрже велики број једињења одговорних

за антиоксидативну активност (Garcia-Viguera et al., 1998; Karaaslan et al., 2018). Међутим, метанол је познат по својој високој токсичности (количина од 30 ml је фатална за човека изазивајући смрт или трајно слепило), па екстракти метанола нису погодни за примену код човека било у фармацеутским или козметичким формулацијама. С друге стране, много молекула са антиоксидативним деловањем који се екстрахују у метанолу имају ниску растворљивост у води што отежава проучавање њихове антиоксидативне активности према биолошки релевантним радикалима.

EPR је једина експериментална техника способна за директну детекцију радикала јер има високу селективност и добијени резултати не зависе од оптичких карактеристика супстанци. Током редокс анализе, биолошки релевантни слободни радикали, као што су $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$ и $\cdot\text{NO}$, често морају да се генеришу коришћењем воде као растварача. Присуство органских растварача у генераторским системима доводи до појаве радикала на бази угљеника као артефаката током интеракције са реактивним врстама кисеоника, што озбиљно доводи у питање поузданост анализе, као и добијених резултата.

Да би се превазишао проблем применљивости метанолних екстракта јагоде у проучавању њихове антирадикалске активности, екстракти две репрезентативне сорте јагоде '*Tea*' и '*Aprika*' су уграђени у мембрану 1,2-дипалмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (*DPPC*) липозома. Наведене сорте су одабране као најбоље по свим претходно измереним активностима уклањања радикала. Антирадикалска активност ових липозома проучавана је према $\cdot\text{OH}$ и *DPFH* радикалима како би се утврдио потенцијал екстракта плодова јагоде у уклањању радикала, али и проценило да ли липиди са мембрана липозома утичу на добијене резултате.

У циљу провере да добијени резултати потичу само од антиоксидативних једињења добијених из јагоде уграђених у липозоме, а не од *DPPC*, изведени су контролни експерименти коришћењем 100% *DPPC* липозома (припремљених по истом поступку који је описан у претходном поглављу, али без екстракта јагода). Ови експерименти нису показали смањење *EPR* сигнала, напротив на слици 27. се види да се сигнали контроле и 100% *DPPC* липозома потпуно преклапају.

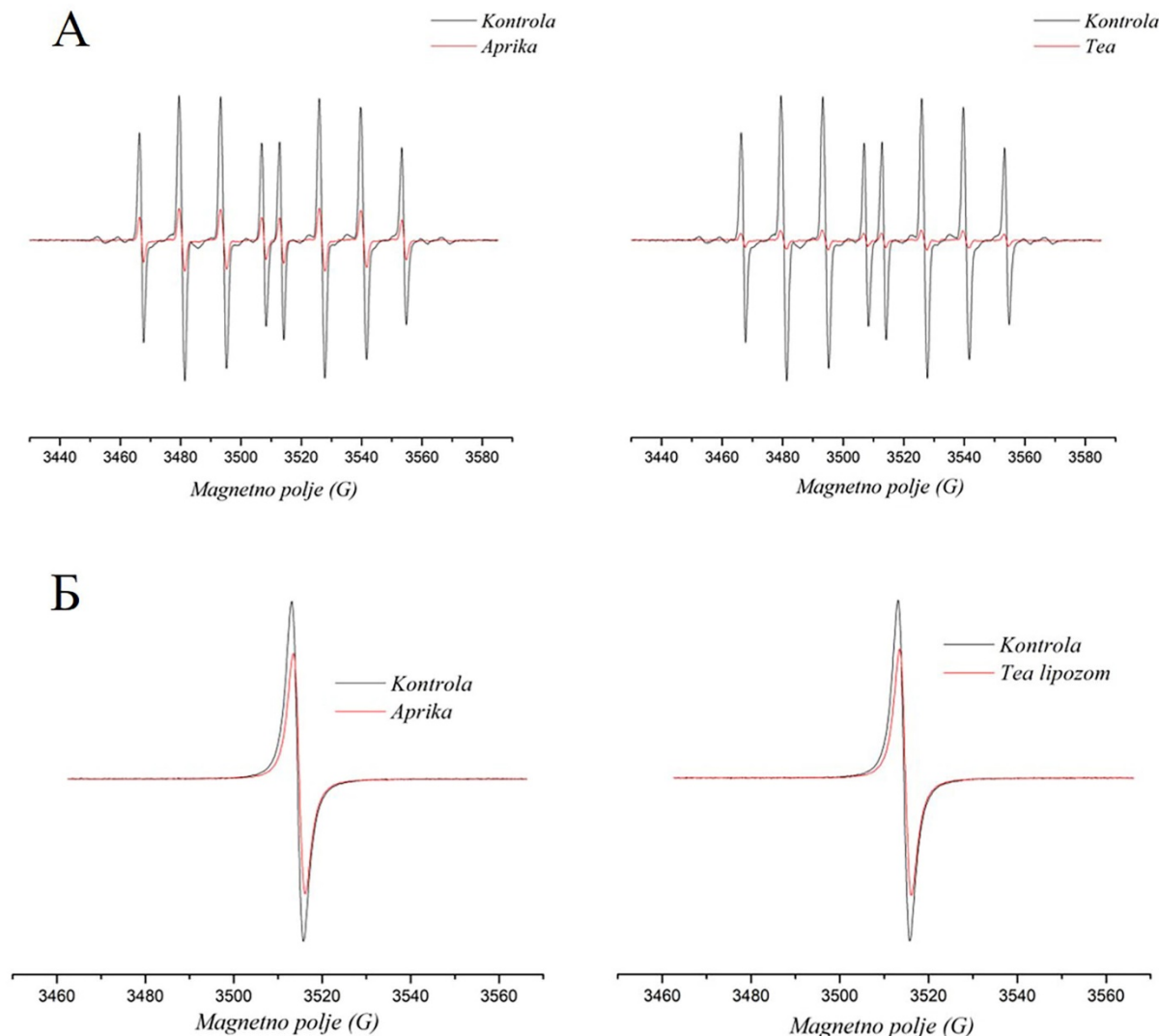


Слика 27. *EPR* спектар контролног експеримента коришћењем 100% *DPPC* липозома.

Антирадикалска активност липозома према $\cdot\text{OH}$ била је 92,65% за липозоме који садрже екстракт сорте '*Tea*' и 78% за липозоме који садрже екстракт сорте '*Aprika*'. Антирадикалска активност липозома према *DPFH* радикалу била је 30,10% за липозоме са екстрактом сорте '*Tea*' и 16,26% за липозоме са екстрактом сорте '*Aprika*'. Овакви резултати показују да липозоми који садрже екстракте јагода имају прилично јак антиоксидативни капацитет и да

реагују селективније са $\cdot\text{OH}$ него са DPPH радикалима. Такође, липозоми који садрже екстракте сорте јагоде 'Tea' показали су јачу антирадикалску активност у односу на сорту 'Aprika' (слика 28.).

За разлику од $\cdot\text{OH}$ радикала који су битни у многим физиолошким процесима, DPPH радикали немају биолошку важност, али се рутински врло често користе за тестирање антиоксидативног потенцијала биљних екстраката.



Слика 9. EPR спектри (A) DEPMPO/OH адукта генерисаног *in vitro* Фентоновом реакцијом; (Б) спектри DPPH радикала

4.5 СПЕКТРОФОТОМЕТРИЈСКА МЕРЕЊА АНТИОКСИДАТИВНИХ КОМПОНЕНТИ У ПЛОДУ ЈАГОДЕ

Укупни антиоксидативни капацитети јагодастог воћа, утврђени хемијским анализама, генерално варирају међу сортама (Pirker et al., 2002). С обзиром да таква једињења представљају важне компоненте у исхрани, постоји интересовање за манипулацију њиховим садржајем у плодовима како би се дизајнирала храна која има „оптималне здравствене ефекте“. Међутим, састав биљних ткива није одређен само њиховом генетиком, већ и стресови животне средине (абиотички и биотички) могу имати велики утицај на садржај молекула антиоксиданаса.

Повећана потрошња висококвалитетних плодова јагоде повезана је са развојем свести модерног потрошача о сензорним особинама и садржају биоактивних једињења. Као што већ поменути шећери и органске киселине имају утицаја на сензорна и нутритивна својства плодова, тако и концентрација и састав фенолних једињења значајно утичу на органолептичке и нутритивне особине плода јагоде, истовремено доприносећи и здравственим предностима. Бројне раније студије које су биле фокусиране на истраживање сорти богатих полифенолима, су пријавиле варијације у садржају фенолних једињења међу различитим сортама јагоде. Поред богатог фенолног састава, студије показују и да је садржај витамина Ц ефикасан саучесник у оксидативној хомеостазии плода јагоде (S. H. Häkkinen et al., 1999; Häkkinen and Törrönen, 2000), тако да сорте које су богате овим функционалним састојцима треба промовисати као добре за људско здравље.

Као што је у претходном поглављу описано, у овој докторској дисертацији смо мерили укупни садржај фенолних једињења (TPC), укупни садржај антоцијанина (TACY) и укупну антиоксидативну активност (TAC) у метанолним екстрактима плодова јагоде помоћу UV-VIS спектрофотометрије (Табела 9).

Табела 9. Укупни садржај фенола (TPC), антоцијанина (TACY) и укупна антиоксидативна активност (TAC) у екстрактима плодова јагоде

Сорте	TPC (mg eq GA g ⁻¹ FW)	TACY (mg eq Pg-3-G 100g ⁻¹ FW)	TAC (mg AsA eq g ⁻¹ FW)
<i>Roxana</i>	0,49 ± 0,04 g,h	15,89 ± 0,23 g,h	2,34 ± 0,17 d,e,f
<i>Arosa</i>	0,71 ± 0,02 e,f,g,h	11,05 ± 0,16 h,i,j,k	2,54 ± 0,54 d,e
<i>Joly</i>	0,88 ± 0,09 b,c,d,e	22,14 ± 0,68 b,c,d,e,f	2,27 ± 0,02 d,e,f,g
<i>Asia</i>	0,66 ± 0,00 d,e,f,g,h	15,70 ± 1,62 g,h	2,77 ± 0,49 d
<i>Alba</i>	0,49 ± 0,03 h	7,90 ± 1,93 j,k,l	1,47 ± 0,01 g
<i>Jeny</i>	0,50 ± 0,12 f,g,h	3,08 ± 0,41 l	1,71 ± 0,06 f,g
<i>Laetitia</i>	1,07 ± 0,03 b,c	15,83 ± 1,22 f,g,h	3,99 ± 0,31 c
<i>Garda</i>	0,54 ± 0,03 f,g,h	6,79 ± 0,36 i,j,k,l	1,71 ± 0,04 f,g
<i>Lycia</i>	1,28 ± 0,08 a,b	8,23 ± 0,16 i,j,k,l	1,93 ± 0,06 e,f,g
<i>Premy</i>	1,53 ± 0,25 a	12,08 ± 2,48 h,i	4,42 ± 0,23 b,c
<i>Sibilla</i>	1,33 ± 0,15 a	8,66 ± 0,64 i,j,k	4,34 ± 0,27 b,c
<i>Vivaldi</i>	1,37 ± 0,03 a	24,92 ± 1,91 a,b,c	4,41 ± 0,21 b,c
<i>Rumba</i>	1,40 ± 0,10 a	19,46 ± 3,25 d,e,f,g	4,49 ± 0,26 b,c
<i>Clery</i>	0,81 ± 0,05 c,d,e,f	8,88 ± 0,51 i,j,k	4,51 ± 0,07 b,c
<i>Aprika</i>	1,41 ± 0,10 a	11,44 ± 0,26 h,i,j	4,19 ± 0,29 c
<i>Quicky</i>	1,15 ± 0,06 b	22,56 ± 0,60 b,c,d	4,62 ± 0,18 a,b,c
<i>Federica</i>	0,89 ± 0,11 b,c,d,e	18,95 ± 0,78 c,d,e,f	4,68 ± 1,07 a,b,c
<i>Lofty</i>	0,93 ± 0,08 b,c,d	23,81 ± 0,50 b,c,d	4,17 ± 0,64 c
<i>Tea</i>	0,76 ± 0,02 d,e,f,g	18,47 ± 0,69 e,f,g	4,62 ± 0,36 a,b,c
<i>Nadja</i>	0,77 ± 0,04 d,e,f,g	20,97 ± 0,20 c,d,e	5,16 ± 0,94 a,b
<i>Arianna</i>	0,90 ± 0,03 b,c,d,e	26,05 ± 0,53 a,b	5,39 ± 0,95 a
<i>Sandra</i>	0,87 ± 0,03 b,c,d,e	30,60 ± 0,15 a	4,83 ± 0,46 a,b,c
<i>Albion</i>	0,71 ± 0,01 e,f,g,h	11,18 ± 1,00 h,i,j	2,41 ± 0,00 d,e,f
<i>Capri</i>	0,69 ± 0,05 d,e,f,g,h	5,86 ± 0,26 k,l	2,33 ± 0,01 d,e,f
<i>Irma</i>	0,46 ± 0,01 h	9,11 ± 0,41 i,j,k	1,84 ± 0,01 e,f,g

Подаци су представљени као средње вредности ($n = 3$) ± стандардна грешка. Вредности унутар колоне са различитим малим словима се значајно разликују ($p < 0,05$), што је утврђено *Duncan*-овим тестом поређења.

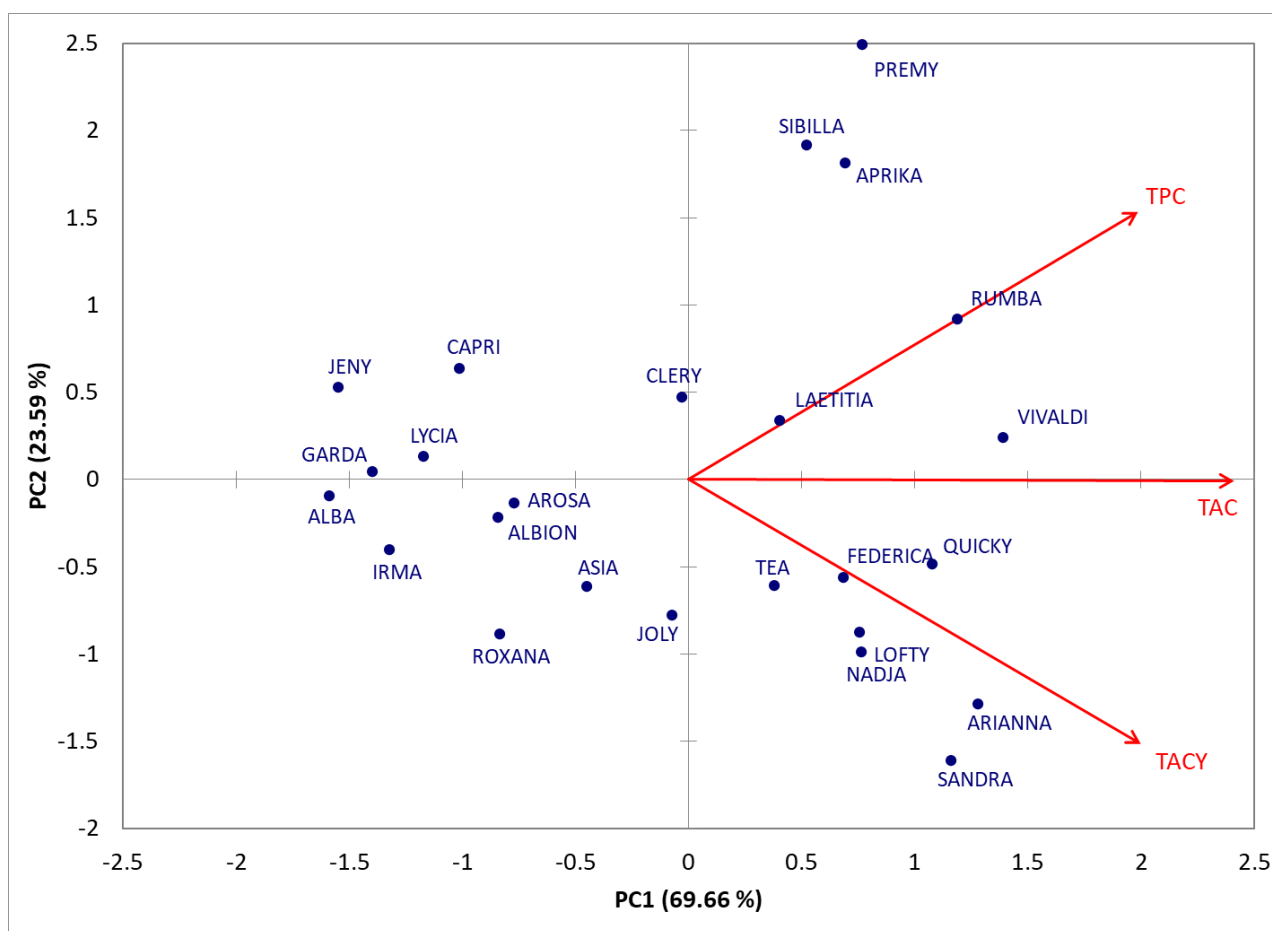
Гална киселина (GA), пеларгонидин–3–глукозид (Pg-3-G), аскорбинска киселина (AsA).

TPC екстракта јагоде варирао је од 0,46 до 1,53 mg eq GA g⁻¹ свежe масе. Сорте 'Premy', 'Aprika', 'Rumba', 'Vivaldi' и 'Sibilla' биле су доминантне у садржају TPC (1,53, 1,41, 1,40, 1,37 и 1,33 mg eq GA g⁻¹ свежe масе, по редоследу), док су 'Irma', 'Alba', 'Roxana' и 'Jeny' имали најнижи TPC (0,46, 0,49, 0,49 и 0,50 mg eq GA g⁻¹ свежe масе, по редоследу). Литературни подаци показују да су плодови јагоде добар извор TPC, са пријављеним вредностима које су у складу са нашим резултатима (Kosar et al., 2004b).

Плодови јагоде се карактеришу високим садржајем антоцијанина (Aaby et al., 2012). Укупни садржај антоцијанина (TACУ) био је највиши у сорти 'Sandra' са вредношћу од 30,60 mg eq Pg-3-G 100g⁻¹ свежe масе, затим у сорти 'Arianna' и 'Vivaldi' (26,05 и 24,92 mg eq Pg-3-G 100g⁻¹ свежe масе, по редоследу). Ови резултати су упоредиви са садржајем антоцијанина који су пронађени у литератури у различитим сортама јагоде. Најнижа TACУ вредност забележена је у сорти 'Jeny' и износи 3,08 mg eq Pg-3-G 100g⁻¹ свежe масе. Вредности су биле нешто ниже у поређењу са литературним подацима за исту врсту (Aaby et al., 2005). Група аутора (Fernandes et al., 2012) наводи да дистрибуција пигмената антоцијанина у плодном ткиву различитих сорти јагоде није подједнака, што се огледа и у разликама у визуелној спољашњој боји плода. Фактори животне средине који утичу на синтезу антоцијанина (нпр. светлост, температура, агрономске праксе, састав земљишта, стрес, фаза зрелости и услови складиштења) и аналитички параметри (нпр. растварачи, методологија и температура екстракције) могу допринети уоченим разликама између студија. Чак и једна сорта може да се разликује у садржају антоцијанина за 30% између две сезоне (Milivojevic et al., 2023).

Највиша вредност укупне антиоксидативне активности (TAC) измерена је код сорте 'Arianna' (5,39 mg AsA eq g⁻¹ свежe масе), затим следе 'Nadja', 'Sandra' и 'Tea' (5,16, 4,83, 4,62 mg AsA eq g⁻¹ свежe масе, по редоследу). Најнижа измерена вредност 1,47 mg AsA, eq g⁻¹ свежe масе је код сорте 'Alba'. Показано је да антиоксидативни капацитет у јагодама може бити 2-11 пута већи у поређењу са другим врстама гајеног воћа (Scalzo et al., 2005; Wang et al., 1996) и да такође постоје разлике међу сортама.

За проучавање и визуелизацију корелације између TPC и TAC, као и између TACУ и TAC, и сличности између неких сорти јагоде коришћена је анализа главних компоненти (PCA). Ова анализа је спроведена на корелационој матрици и приказана је на слици 29.

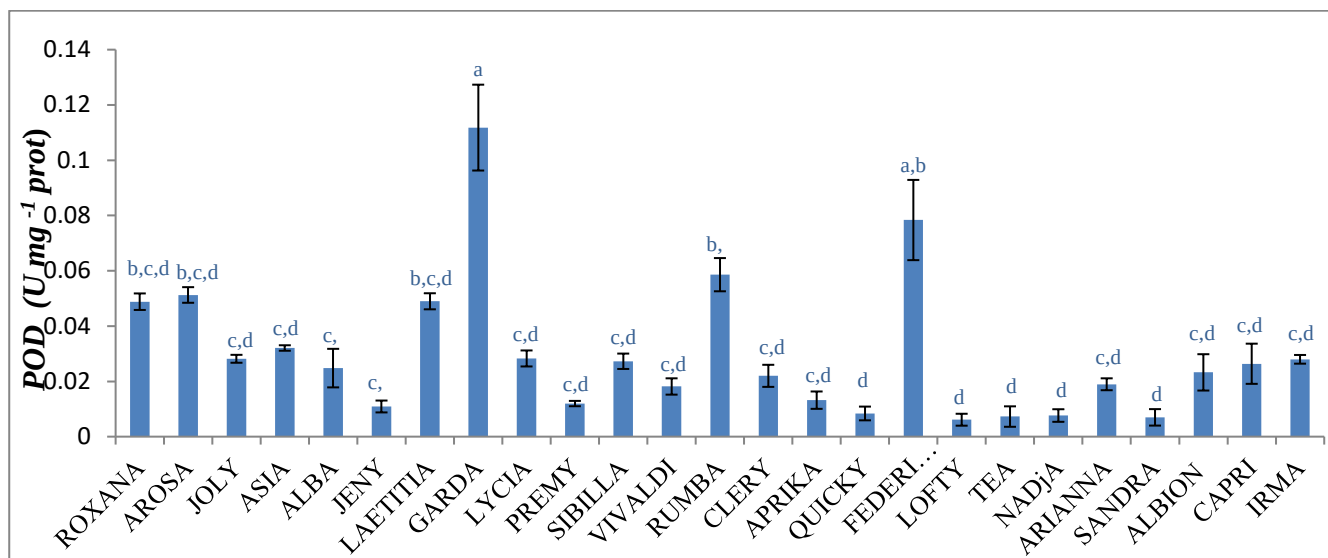


Слика 10. Анализа главних компоненти (PCA)

PCA је примењена на читав скуп просечних вредности, где прва главна компонента носи 69,66% од укупне варијансе (PC1), а друга компонента (PC2) носи 23,59%. Користећи измерене вредности за TPC, TAC и TACY за свих 25 сорти јагоде, TAC је био у доброј корелацији са TPC плода ($R = 0,65$), док су TAC и TACY били у сличној корелацији ($R = 0,66$). Иако је објављено да је антиоксидативна активност јагоде делимично повезана са садржајем антоцијанина (Rice-Evans et al., 1996; Wang et al., 1997) јер су подложнији променама током складиштења (Dragišić Maksimović et al., 2015; Kalt et al., 1999), анализа главних компоненти код наших сорти је показала да на укупну антиоксидативну активност плода јагоде подједнако утичу и TPC и TACY. Уочава се и интеркултиварска варијација у садржају TPC и TACY. Сва три параметра се налазе на десној страни PCA плота и у позитивној су корелацији. Груписане сорте 'Laetitia', 'Rumba', 'Aprika', 'Sibilla', 'Premy' и 'Vivaldi' показују да њихов допринос укупној антиоксидативној активности зависи од TPC. Код сорти 'Tea', 'Federica', 'Quicky', 'Lofty', 'Nadja', 'Arianna' и 'Sandra' допринос антиоксидативној активности зависи од TACY. Друге сорте јагоде ('Capri', 'Jeny', 'Lycia', 'Garda', 'Irma', 'Alba', 'Arosa', 'Albion', 'Asia', 'Roxana', 'Joly' и 'Clery') су позициониране на левој страни PCA-а, показујући да њихове TPC и TACY вредности нису у корелацији са укупном антиоксидативном активношћу, што вероватно указује да други метаболити са антиоксидативном активношћу (као што су аскорбинска киселина, витамин Е, каротеноиди, итд.) могу допринети њиховом антиоксидативном капацитету. Такође, може се уочити да укупном антиоксидативном капацитету највише доприносе TPC и TACY код већине једнородних сорти јагоде, док код сталнорађајућих учествују и неки други метаболити.

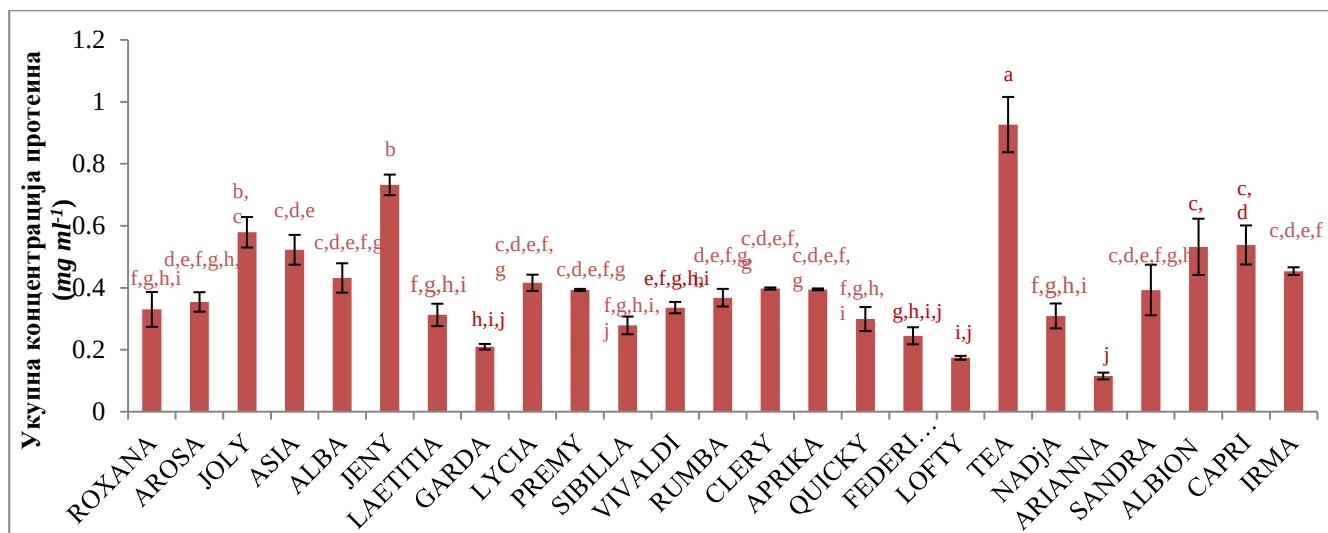
Антиоксидативни одбрамбени механизми у плодовима јагода укључују не само неензимске компоненте, као што су феноли или аскорбинска киселина, него и енземе као што је класа фенол оксидаза у које спадају пероксидазе и полифенол оксидазе.

Пероксидазе су ензими који оксидују различите супstrate користећи H_2O_2 и тако спречавају прекомерну акумулацију H_2O_2 који настаје у метаболичким процесима или у условима стреса. Пероксидазе се сматрају „ензимима стреса“ и ниво њихове активности се користи као индекс за процену интензитета стреса. Физиолошка улога пероксидаза се приписује оксидацији фенола, укључујући биосинтезу лигнина (López-Serrano and Barceló, 1995). С обзиром да плод јагоде карактерише процес лигнификације, испитали смо специфичне *POD* активности у плодовима свих тестираних сорти (слика 30.).



Слика 30. Специфична активност пероксидаза (*POD*, U mg⁻¹ prot) у екстрактима плодова јагоде. Подаци су представљени као средње вредности ($n = 3$) ± стандардна грешка. Барови обележени различитим словима су статистички значајно различити ($p < 0,05$), као што је утврђено *Duncan*-овим упоредним тестом.

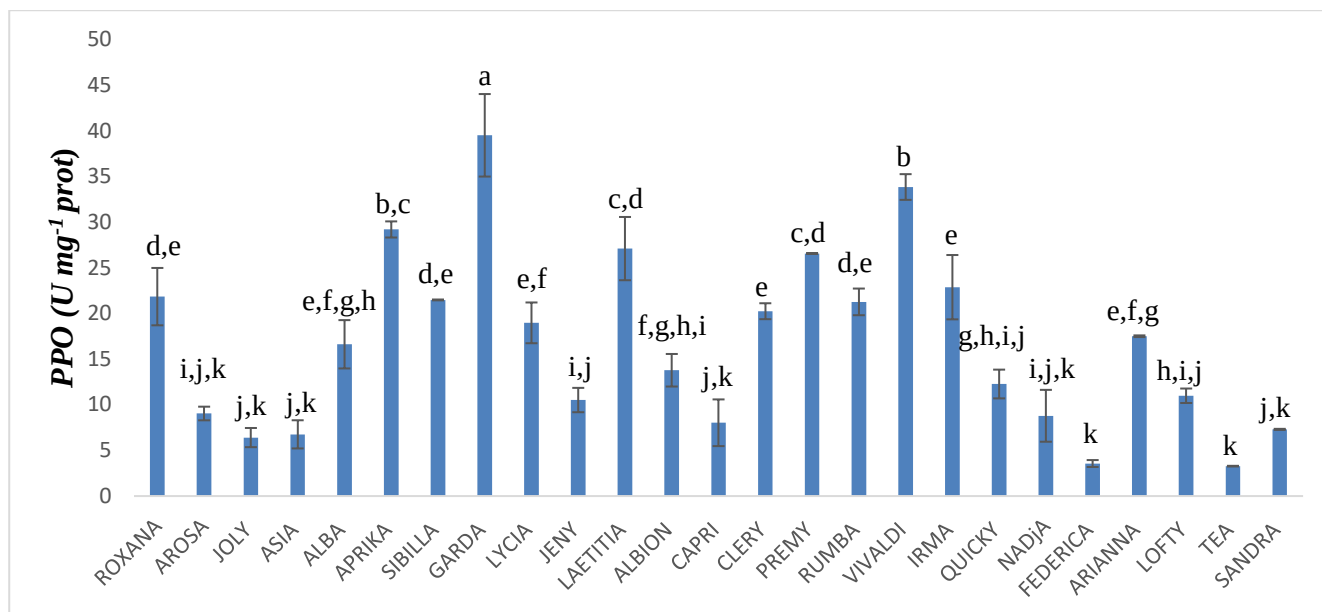
Њихове специфичне активности биле су највеће у сортама '*Garda*', '*Federica*' и '*Rumba*' (0,11, 0,08 и 0,06 U mg⁻¹ протеина, према редоследу). Образац специфичне *POD* активности није пратио образац укупног садржаја протеина (слика 31.). Без обзира на веома високе укупне концентрације протеина, '*Tea*', '*Jeny*' и '*Joly*' су имали ниске вредности *POD* (0,007, 0,01 и 0,03 U mg⁻¹ протеина, по редоследу). У оскудним литературним подацима о активностима ензима у плодовима јагоде, специфичне *POD* активности су представљене у различитим јединицама (U mg⁻¹ свеже масе, nkat g⁻¹ свеже масе), тако да нису упоредиве са нашим резултатима (Chisari et al., 2007; López-Serrano and Barceló, 2001). Поред тога, природне ниске активности *POD* у плодовима јагоде додатно су угрожене поступком екстракције и манипулације током припреме узорка; тако је у неким студијама вршено пречишћавање ензима да би се добиле максималне специфичне *POD* активности (Civello et al., 1995), које из тог разлога значајно превазилазе наше вредности. С друге стране, у литератури је показано да су специфичне *POD* активности у другом свежем воћном материјалу веће код неких врста, као што је малина (1–2 U mg⁻¹ протеина) (Kozłowska et al., 2001) или значајно ниже као код лубенице (0,003 U mg⁻¹ протеина) (Menon and Ramana Rao, 2012).



Слика 31. Укупна концентрација протеина (mg ml^{-1}) у екстрактима плодова јагоде. Подаци су представљени као средње вредности ($n = 3$) $\pm$ стандардна грешка. Барови обележени различитим словима су статистички значајно различити ($p < 0,05$), као што је утврђено *Duncan*-овим упоредним тестом.

Као што је већ речено, воће и поврће садржи широк спектар фенолних једињења. Међутим, само мали део њих служи као супстрат за *PPO*. Супстрати у реакцијама ензимског тамњења су монофеноли, односно дифеноли са хидроксилним групама у орто односно у пара положају. Полифенол оксидаза је ензим широке специфичности за супстрат. Према литературним подацима као природни супстрати ових ензима су катехин, епикатехин, хлорогена киселина (Rocha and Moraes, 2001), 3,4-дихидроксифенилаланин (*DOPA*) и тирозин, естри циметне киселине, деривати кафеинске киселине итд. (Holderbaum et al., 2010; Macheix et al., 1990).

Већи садржаји, посебно катехина или проантоцијанидина, манифестују се опорошћу код воћа (Mosel and Herrmann, 1974). Специфичне активности *PPO* измерене у екстрактима јагода биле су највеће у сорти '*Garda*' ($39,51 \text{ U mg}^{-1}$ протеина), затим у сорти '*Vivaldi*' ($33,85 \text{ U mg}^{-1}$ протеина), а најнижа вредност измерена је у сортама '*Tea*' ($3,28 \text{ U mg}^{-1}$ протеина) и '*Federica*' ($3,56 \text{ U mg}^{-1}$ протеина). Високе концентрације ових ензима у сорти '*Garda*' могу објаснити зашто су нивои полифенолних једињења доста ниски, али и какве су могућности њених плодова за дуже складиштење (слика 32.).

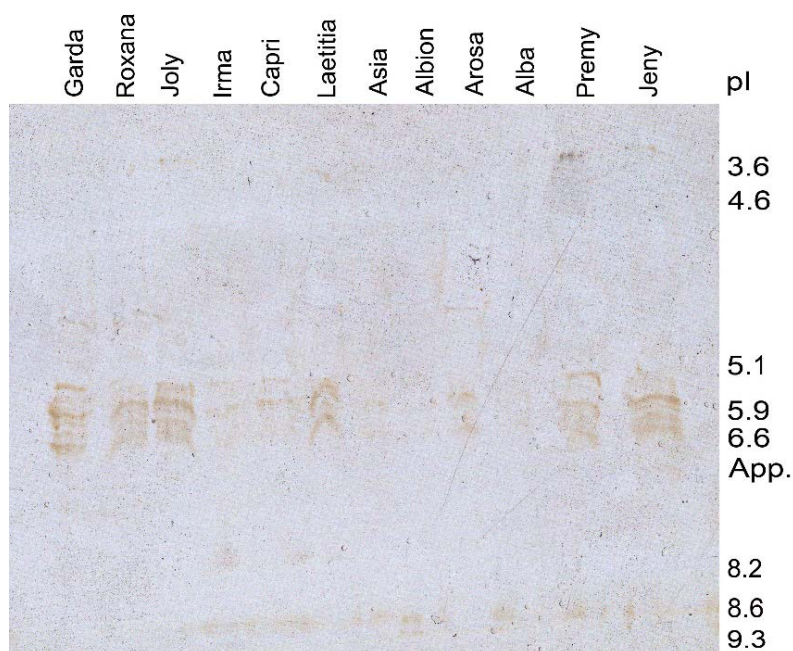


Слика 32. Специфична активност полифенол оксидаза (PPO , $U\ mg^{-1}\ prot$) у екстрактима плодова јагоде. Подаци су представљени као средње вредности ($n = 3$) $\pm$ стандардна грешка. Барови обележени различитим словима су статистички значајно различити ($p < 0,05$), као што је утврђено *Duncan*-овим упоредним тестом.

4.6 ИЗОЕЛЕКТРИЧНО ФОКУСИРАЊЕ

Пероксидазе које се налазе у вишим биљкама укључују изоензиме са базним, неутралним или киселим изоелектричним тачкама. У плодовима јагодастог воћа детектовани су растворљиви изоензими са веома различитим изоелектричним тачкама који имају различите улоге у процесу зрења, пре свега везано за пластичност ћелијског зида или разградњу антоцијана (González et al., 2000, 1999). Изоелектрично фокусирање пуферског екстракта 12 сорти јагоде није показало разлике у профилу изоензима између сорти (слика 33.).

Визуализоване су две траке изоензима: кисели изоензими са pI 5.9 и базни изоензими са pI 8.6. Доказано је да кисела изоформа има улогу у лигнификацији, а плодови јагоде се карактеришу лигнификованим ткивом, док су базне изоформе углавном екстрацелуларне и локализоване претежно у вакуолама, одакле се лако укључују у процесе заштите од стреса (Dragišić Maksimović et al., 2017; Wink, 1989).



Слика 33. Пероксидазне изоформе из екстракта плодова 12 сорти јагоде

4.7 РЕФЛЕКТОМЕТРИЈСКА АНАЛИЗА ВИТАМИНА Ц

Поређење тестираних сорти јагоде показало је да је максимална вредност садржаја витамина Ц (табела 10.) забележена код сорте '*Laetitia*' (56,32 mg/100g свежe масе), уз високе вредности код сорти '*Arosa*' и '*Garda*' (55,17 и 54,57 mg/100g свежe масе, по редоследу), док је код сорте '*Sibilla*' измерена најнижа вредност (32,27 mg/100g свежe масе). Објављене просечне вредности витамина Ц у плодовима јагоде у литератури (Dragišić Maksimović et al., 2015; Urün et al., 2021) су знатно ниже од оних у нашем истраживању, што указује да је већина тестираних новоуведених сорти одличан извор витамина Ц. Узимајући у обзир његова антиоксидативна и метаболичка својства (Kafkas et al., 2007), витамин Ц је, поред фенолних једињења, важан показатељ квалитета плода. Ово показује да у оквиру врста рода *Fragaria*, на укупан садржај и промене укупних фенола, антоцијанина и витамина Ц снажно утиче сорта, много више него услови средине (Milivojević et al., 2013). Због тога се сорте богате овим компонентама могу препоручити као важни извори здравствено корисних једињења.

Табела 10. Садржај витамина Ц у плодовима 25 испитиваних сорти јагоде

Сорте	Витамин Ц (mg/100g FW)
<i>Roxana</i>	52,80 ± 0,00 <i>b</i>
<i>Arosa</i>	55,17 ± 0,98 <i>a,b</i>
<i>Joly</i>	42,83 ± 1,27 <i>d</i>
<i>Asia</i>	42,83 ± 1,27 <i>d</i>
<i>Alba</i>	42,80 ± 1,04 <i>d</i>
<i>Jeny</i>	39,82 ± 0,42 <i>d</i>
<i>Laetitia</i>	56,32 ± 1,87 <i>a</i>
<i>Garda</i>	54,57 ± 1,53 <i>a,b</i>
<i>Lycia</i>	42,20 ± 0,85 <i>d</i>
<i>Premy</i>	34,17 ± 1,65 <i>e,f</i>
<i>Sibilla</i>	32,27 ± 0,49 <i>f</i>
<i>Vivaldi</i>	46,70 ± 0,92 <i>c</i>
<i>Rumba</i>	49,07 ± 1,20 <i>c</i>
<i>Clery</i>	46,33 ± 1,27 <i>c</i>
<i>Aprika</i>	34,90 ± 0,52 <i>e,f</i>
<i>Quicky</i>	36,27 ± 0,67 <i>e</i>
<i>Federica</i>	35,80 ± 0,52 <i>e,f</i>
<i>Lofty</i>	33,93 ± 1,10 <i>e,f</i>
<i>Tea</i>	35,20 ± 0,00 <i>e,f</i>
<i>Nadja</i>	34,60 ± 1,04 <i>e,f</i>
<i>Arianna</i>	35,80 ± 0,52 <i>e,f</i>
<i>Sandra</i>	36,57 ± 0,75 <i>e</i>
<i>Albion</i>	48,10 ± 2,08 <i>c</i>
<i>Capri</i>	41,04 ± 2,01 <i>d</i>
<i>Irma</i>	42,23 ± 1,20 <i>d</i>

Подаци су представљени као средње вредности ($n = 3$) ± стандардна грешка. Вредности унутар колоне са различитим малим словима се значајно разликују ($p < 0,05$), што је утврђено *Duncan*-овим тестом поређења.

4.8 АНАЛИЗА САДРЖАЈА РАСТВОРЉИВЕ СУВЕ МАТЕРИЈЕ И УКУПНИХ КИСЕЛИНА

Прихватљивост плодова јагоде од стране потрошача у великој мери зависи од слатког укуса овог воћа, који је често у корелацији са високим садржајем растворљиве суве материје (SSC). Минимални садржај SSC од 7% и максимални садржај *TA* (укупних киселина) од 0,8% се сматра препорученим стандардом за прихватљив укус плодова јагоде (Dragišić Maksimović et al., 2015).

У нашем истраживању значајно највишу вредност SSC је имала сорта '*Lofty*' (10,07 %), а најнижу сорта '*Irma*' (6,27 %), док је сорта '*Arosa*' показала најнижи садржај укупних киселина (0,39 %), а код сорте '*Aprika*' је регистрована највиша вредност (0,80%) (табела 11.).

Табела 11. Садржај растворљиве суве материје, укупних киселина и индекса укуса у плодовима 25 испитиваних сорти јагоде

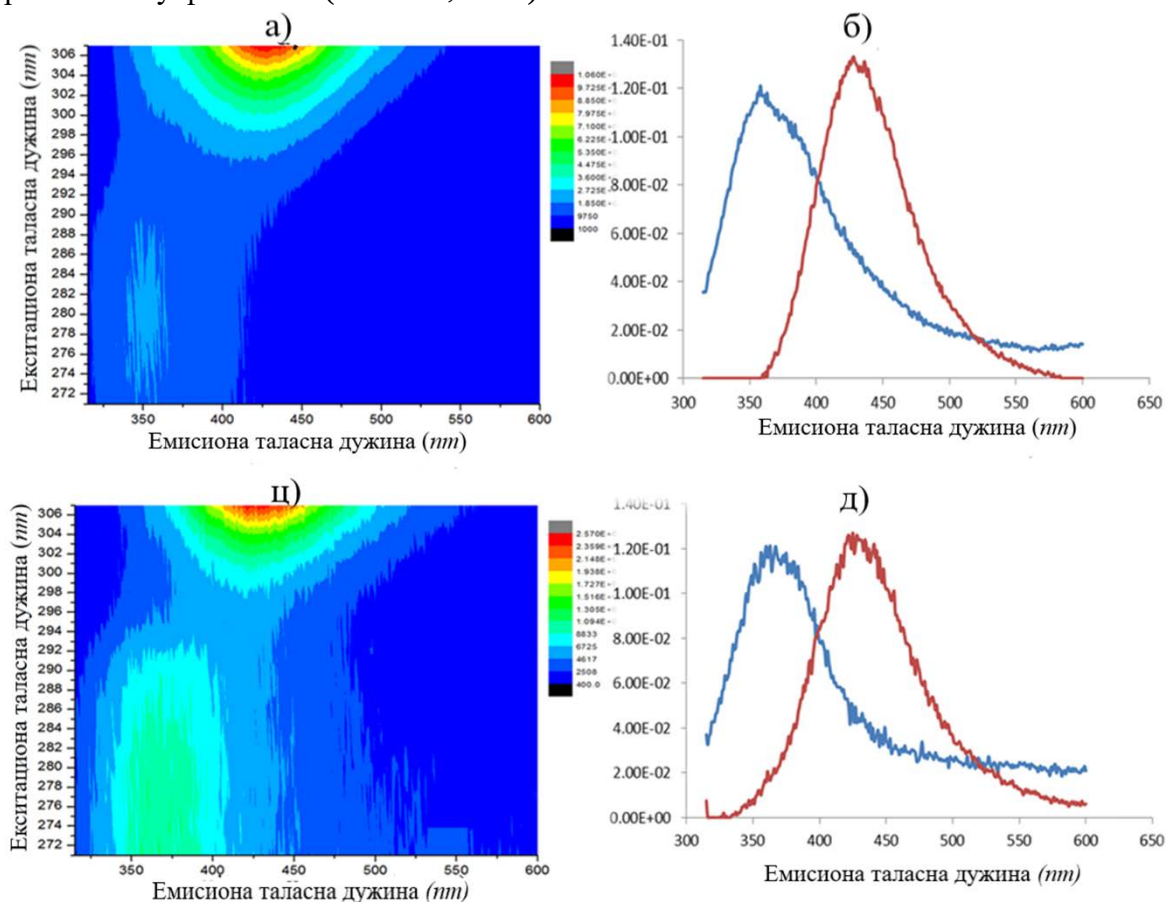
Сорте	Растворљива сува материја (SSC) %	Укупне киселине (TA) %	Индекс укуса (SSC/TA)
<i>Roxana</i>	7,67	0,65	11,80
<i>Arosa</i>	6,67	0,39	17,26
<i>Joly</i>	8,13	0,57	14,28
<i>Asia</i>	7,57	0,45	16,83
<i>Alba</i>	7,27	0,71	10,19
<i>Jeny</i>	8,33	0,56	14,89
<i>Laetitia</i>	7,92	0,54	14,81
<i>Garda</i>	6,53	0,47	14,00
<i>Lycia</i>	9,73	0,61	15,88
<i>Premy</i>	8,75	0,79	11,13
<i>Sibilla</i>	9,53	0,74	12,98
<i>Vivaldi</i>	8,80	0,72	12,30
<i>Rumba</i>	9,53	0,64	14,90
<i>Clery</i>	7,43	0,55	13,60
<i>Aprika</i>	8,87	0,80	11,13
<i>Quicky</i>	9,33	0,65	14,44
<i>Federica</i>	9,83	0,69	14,32
<i>Lofty</i>	10,07	0,64	15,81
<i>Tea</i>	9,97	0,52	19,29
<i>Nadja</i>	9,40	0,63	15,00
<i>Arianna</i>	9,40	0,64	14,69
<i>Sandra</i>	9,93	0,63	15,85
<i>Albion</i>	7,13	0,60	11,90
<i>Capri</i>	7,10	0,44	16,02
<i>Irma</i>	6,27	0,42	14,94

Имајући у виду да прихватљив укус плодова јагоде подразумева максималан садржај укупних киселина од 0,8% и/или најнижи садржај растворљиве суве материје од 7% (Dragišić Maksimović et al., 2015), све тестиране сорте се могу сматрати погодним за препоруку потрошачима и произвођачима. Такође, вредности SSC/TA за све сорте проучаване у овој дисертацији су биле у опсегу од 11-18, што указује на њихов слатки воћни укус који се сматра прихватљивим за потрошаче према литературним подацима (Pelayo-Zaldívar et al., 2005).

4.9 СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЈСКА МЕРЕЊА

У прелиминарним истраживањима, при избору метода за одабир најперспективније сорте на основу садржаја специфичних фенолних компоненти одабрана је за спектрофлуориметрију у комбинацији са мултиваријантном анализом за обраду података. Снимање је извршено на 12 репрезентативних сорти јагоде и уочено је да сви контурни графици екситационо-емисионих матрица имају два карактеристична региона флуоресценције која могу настати из два различита типа флуорофора. Једињења која природно постоје у плоду јагоде, а која флуоресцирају, као што су феноли, антоцијанини и флавоноиди, могу се детектовати овом методом и то са различитим интензитетима у односу на сорту. На слици 34 (а и ц) приказане су репрезентативне контурне мапе екситације-емисије за измерене

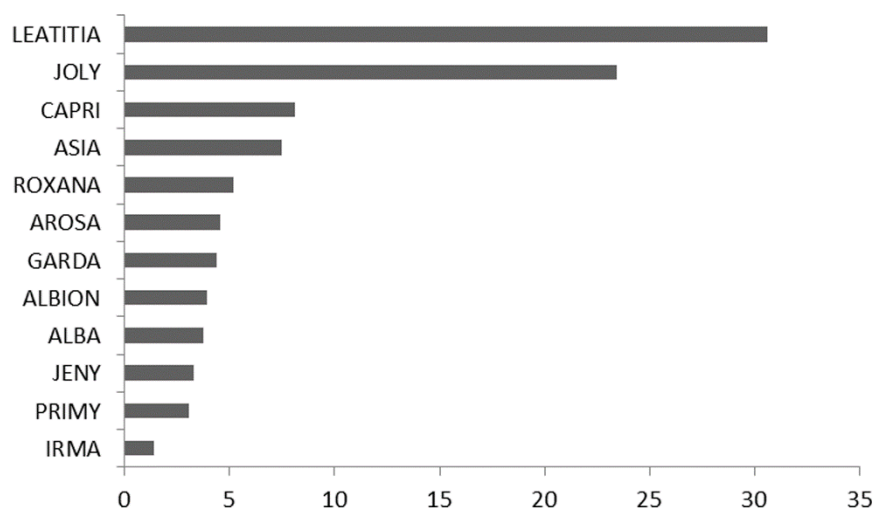
метанолне екстракте две сорте јагода ('*Laetitia*' и '*Asia*'). Добијене су две оптималне компоненте (слика 34 б и д), што указује на присуство два главна типа флуорофора у обе сорте. Доњи спектрални регион таласне дужине и одговарајућа спектрална компонента са максимумом на 300-450 nm приписани су антоцијаниним и флавоноидима. Спектрални регион веће таласне дужине и одговарајућа спектрална компонента са максимумом на 350-550 nm приписани су фенолима (Lai et al., 2007).



Слика 34. Контурни графици ЕЕМ добијени снимањем на спектрофлуориметру у спектралном подручју карактеристичном за антоцијанине и фенолне компоненте а) '*Laetitia*' ц) '*Asia*'; б) и д) профили емисије одговарајућих сорти добијени МСР анализом.

Поређењем снимљених интензитета визуелно, у сорти '*Laetitia*' (слика 34а), присуство антоцијанина је доминантно у односу на позицију пика интензитета сорте '*Asia*' (слика 34ц), где се спектри прогресивно померају ка фенолима, али је присуство антоцијанина и даље било детектовано.

На слици 35. приказан је однос емисионих спектралних компоненти антоцијанина и фенола за 12 сорти јагоде. Спектрални однос за сорте '*Laetitia*' и '*Joly*' показао је највеће вредности у поређењу са другим сортама, што је у складу са резултатима добијеним другим аналитичким методама.

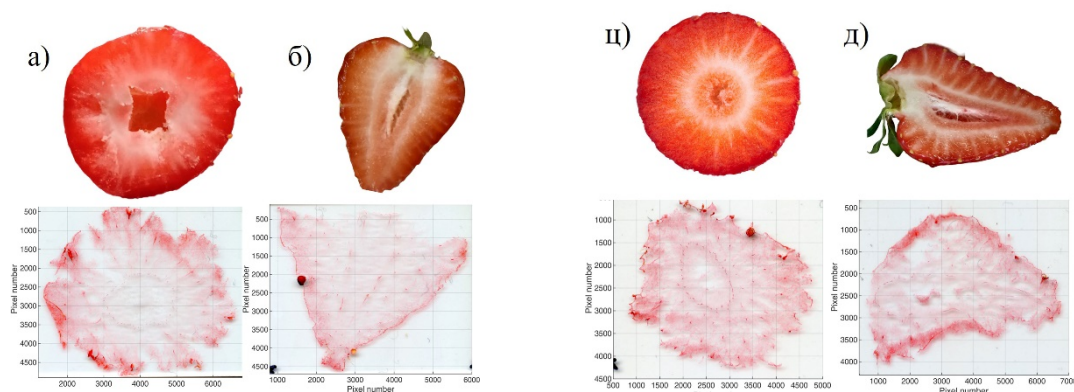


Слика 35. Спектрални односи антоцијанини/феноли у 12 сорти јагоде добијени спектрофлуорометријом.

На основу доследности у слагању резултата са оним добијеним другим методама, спектрофлуорометрија у комбинацији са *MCR-ALS* анализом може се користити за брзи скрининг секундарних метаболита у плодовима различитих врста и сорти воћака, као и за процену односа антоцијанини/феноли у њима.

4.10 ИМИЦИНГ МАСЕНА СПЕКТРОМЕТРИЈА (*IMS*)

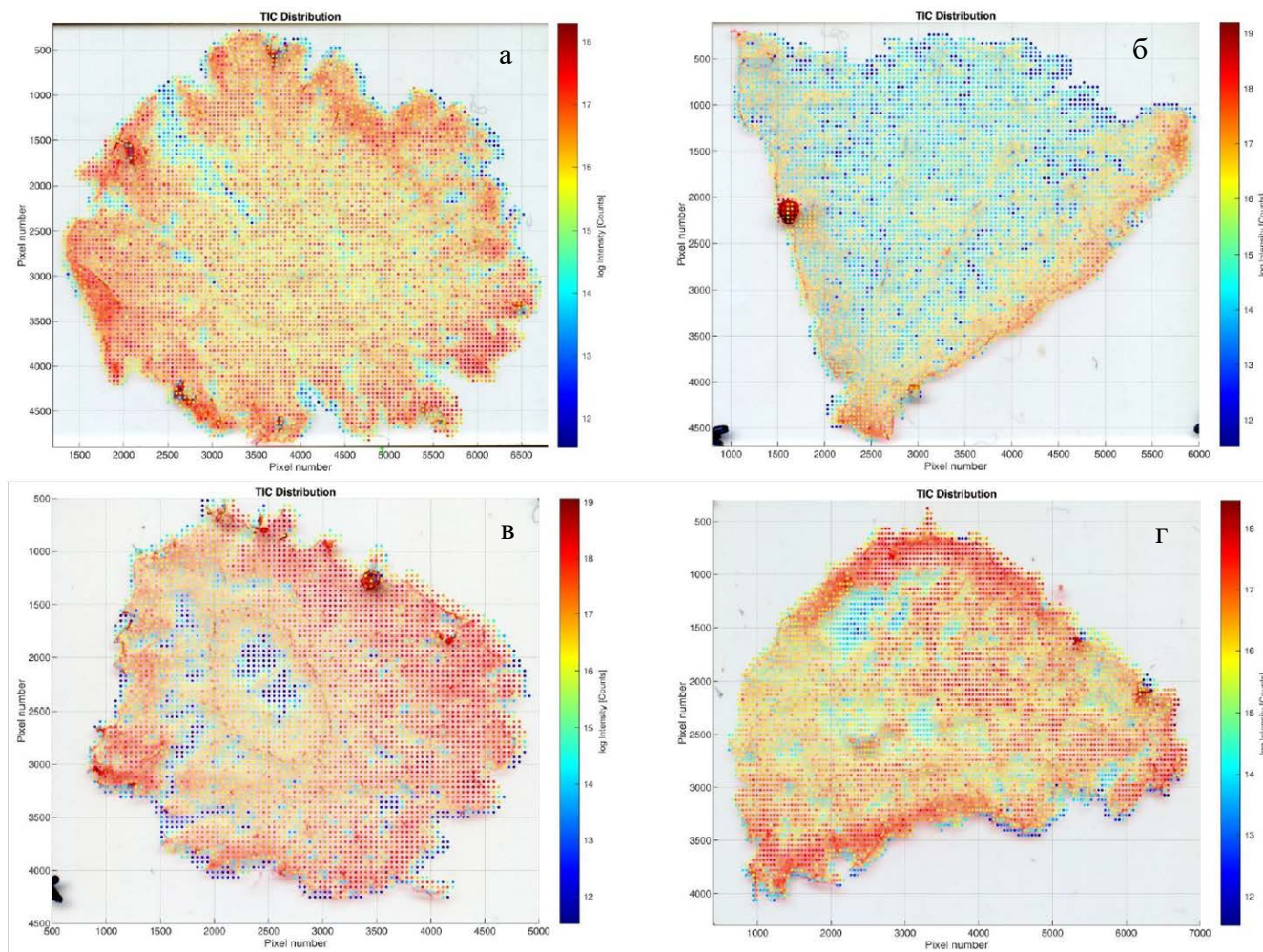
У поглављу о материјалу и методама је већ споменуто да су припремљени попречни и уздужни пресеци две сорте јагоде у циљу визуелизације просторне дистрибуције шећера, органских киселина и полифенолних једињења. Током *MSI* анализе, узорак пресека јагоде се снима и добија масени спектар за сваку тачку. Из оваквих резултата масених спектра могу се добити мапе дистрибуције органских једињења које омогућавају верификацију молекула у различитим биљним ткивима (Enomoto, 2021a, 2021b; Enomoto et al., 2020, 2018; Wang et al., 2021). Сlike микропресека плодова јагоде за две репрезентативне сорте ('*Sandra*' и '*Aprika*') су приказане на слици 36.



Слика 36. Микропресеци плодова јагоде две репрезентативне сорте ('*Aprika*' и '*Sandra*') а) попречни пресек плода сорте '*Aprika*'; б) уздужни пресек плода сорте '*Aprika*'; ц) попречни пресек плода сорте '*Sandra*'; д) уздужни пресек плода сорте '*Sandra*'.

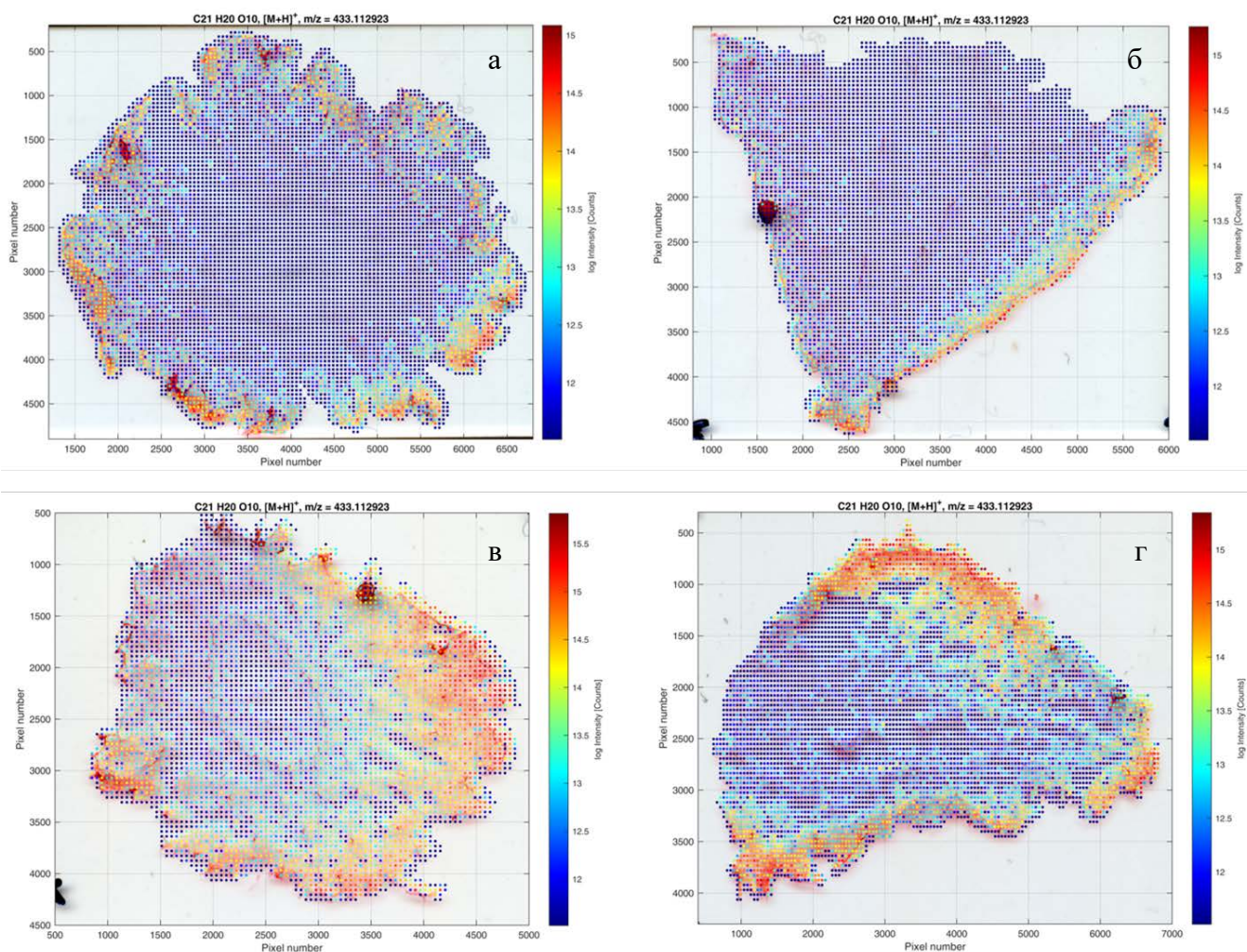
Да бисмо могли да илуструјемо општу дистрибуцију свих биомаркерских једињења јонизованих и откривених током снимања *MSI*, препоручљиво је проценити укупну јонску

струју (*TIC*). *TIC* представља универзални сигнал који генеришу сви детектовани јони. Ово је приказано на слици 37. за обе репрезентативне сорте јагоде.



Слика 37. Укупна јонска струја (*TIC*) за сорте '*Aprika*' (слике а и б) и сорте '*Sandra*' (слике в и г).

Уз помоћ *MSI* снимања, уздужни и попречни пресек плода јагоде (слика 32) су показали да се у ткиву плода јавља већа концентрација биомаркера, посебно у спољашњем црвеном делу. Ово постаје јасније када се детаљније погледа образац дистрибуције појединачних молекула биомаркера. Као што је приказано на слици 38., молекуларни јон са m/z од 433,112923 *Da*, који има молекулску формулу $C_{21}H_{20}O_{10}$, детектован је као $[M]^+$ јон у *MSI* анализи снимања. Ово једињење је вероватно пеларгонидин-3-*O*-глукозид, који спада у антоцијанине који су одговорни за црвену боју јагоде, али и бројна антиоксидативна својства. Уочени интензитет овог једињења је представљен логаритамски и представљен скалом у боји.

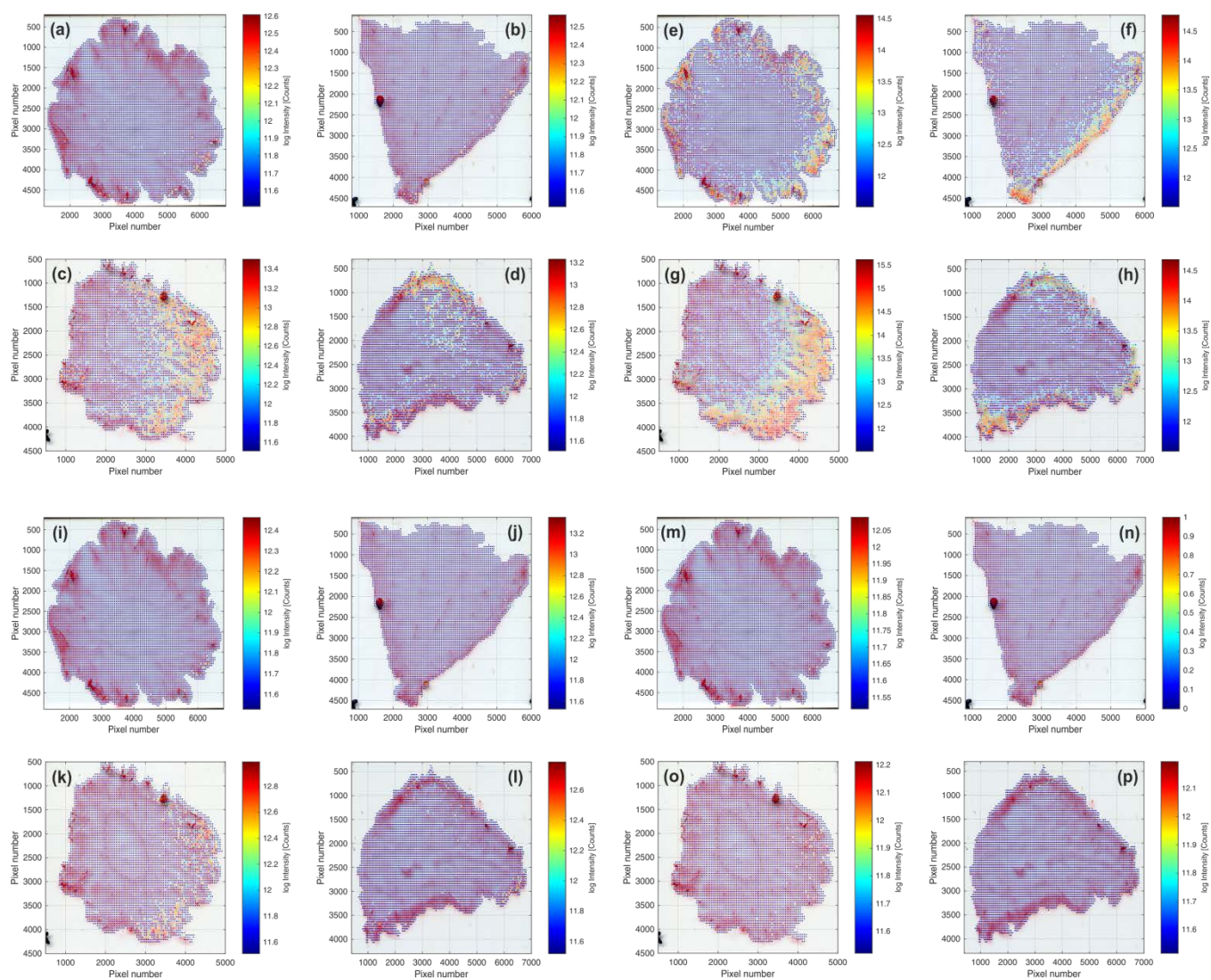


Слика 38. Образац дистрибуције пеларгонидин-3-О-глукозида за сорте 'Aprika' (слике а и б) и сорте 'Sandra' (слике в и г).

Поред различитих антоцијанина, детектовани су молекули биомаркера других класа једињења, као што су органске киселине (нпр. лимунска киселина) или шећери (нпр. хексоза, сахароза и малтотриоза).

Образац дистрибуције три потенцијална молекулска јона шећера и једног јона органске киселине приказан је на слици 39. Уочени интензитет је представљен логаритамски и представљен скалом у боји. Као што је представљено на слици 39 а–д, по молекулској формули може се претпоставити да се ради о молекулу хексозе (глукоза или фруктоза), на слици 39 е–h приказан је потенцијално молекул дисахарида (сахарозе), на слици 39 i–l потенцијално молекул трисахарида (малтотриозе), а на слици 39 m–p потенцијално молекул трикарбоксилне киселине (лимунска киселина). Сви молекули су детектовани у позитивном моду као $[M + K]^+$ током MSI анализе, што се може приписати природно високом садржају калијума у јагодама (Wang et al., 2021). Јони $[M + H]^+$ и $[M + Na]^+$ ових једињења такође су детектовани у свим анализама, али у много мањој мери.

Подаци са масеног спектра за сорту 'Sandra' показали су већи број тачака за аналит од интереса у поређењу са подацима за сорту 'Aprika'. Овакав образац дистрибуције моносахарида и дисахарида међу сортама одговара индексу сласти (табела 3.) који је био значајно виши код сорте 'Sandra' у односу на сорту 'Aprika'.

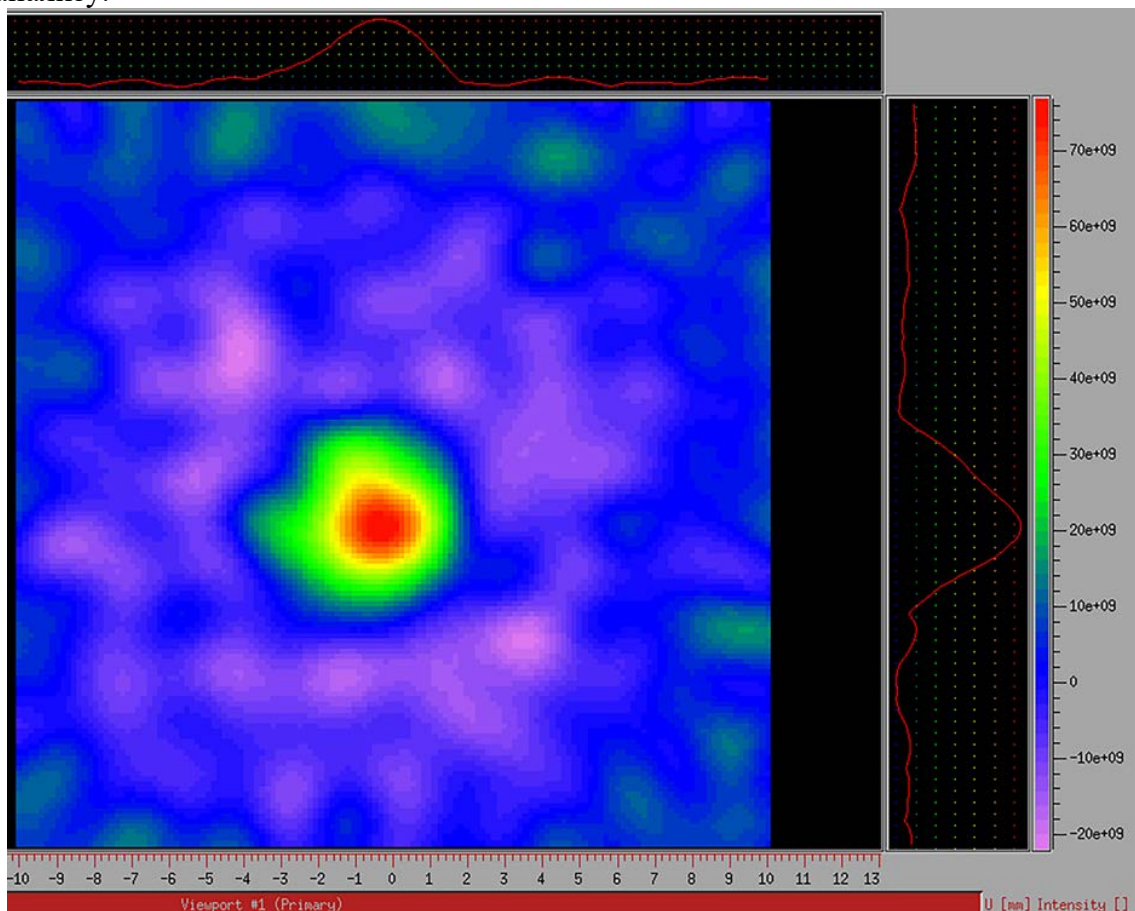


Слика 39. Просторна дистрибуција биомаркера одређена IMS анализом: (a,b) $C_6H_{12}O_6$ ($[M + K]^+$, $m/z = 219.026546$ Da) код сорте 'Sandra' и (c,d) код сорте 'Aprika'; (e,f) $C_{12}H_{22}O_{11}$ ($[M + K]^+$, $m/z = 381.079369$ Da) код сорте 'Sandra' и (g,h) код сорте 'Aprika'; (i,j) $C_{18}H_{32}O_{16}$ ($[M + K]^+$, $m/z = 543.132193$ Da) код сорте 'Sandra' и (k,l) код сорте 'Aprika'; (m,n) $C_6H_8O_7$ ($[M + K]^+$, $m/z = 230.990161$ Da) код сорте 'Sandra', и (o,p) код сорте 'Aprika'.

4.11 ЕПР ИМИЦИНГ (ЕПРИ)

Од 1944. године када је откривен феномен парамагнетне резонанције, употреба електронске парамагнетне резонанантне спектроскопије (*EPR*) је стално напредовала у областима хемије, биологије и физике. Међутим, употреба *in vivo EPR* снимања у биомедицинске сврхе је била релативно скромна и мање истражена у односу на сличне методе пре свега због техничких проблема који су се превазишли развојем довољно осетљивих спектрометара који раде у нискофреквентном опсегу, обично између 200 MHz и 1,5 GHz, као и развој дектора и парамагнетних једињења погодних за *in vivo* студије (Gallez and Swartz, 2004). Сходно томе, компактнији узорци, попут биљака и малих животиња, су прикладнији за примену *EPRI* (Dragišić Maksimović et al., 2021).

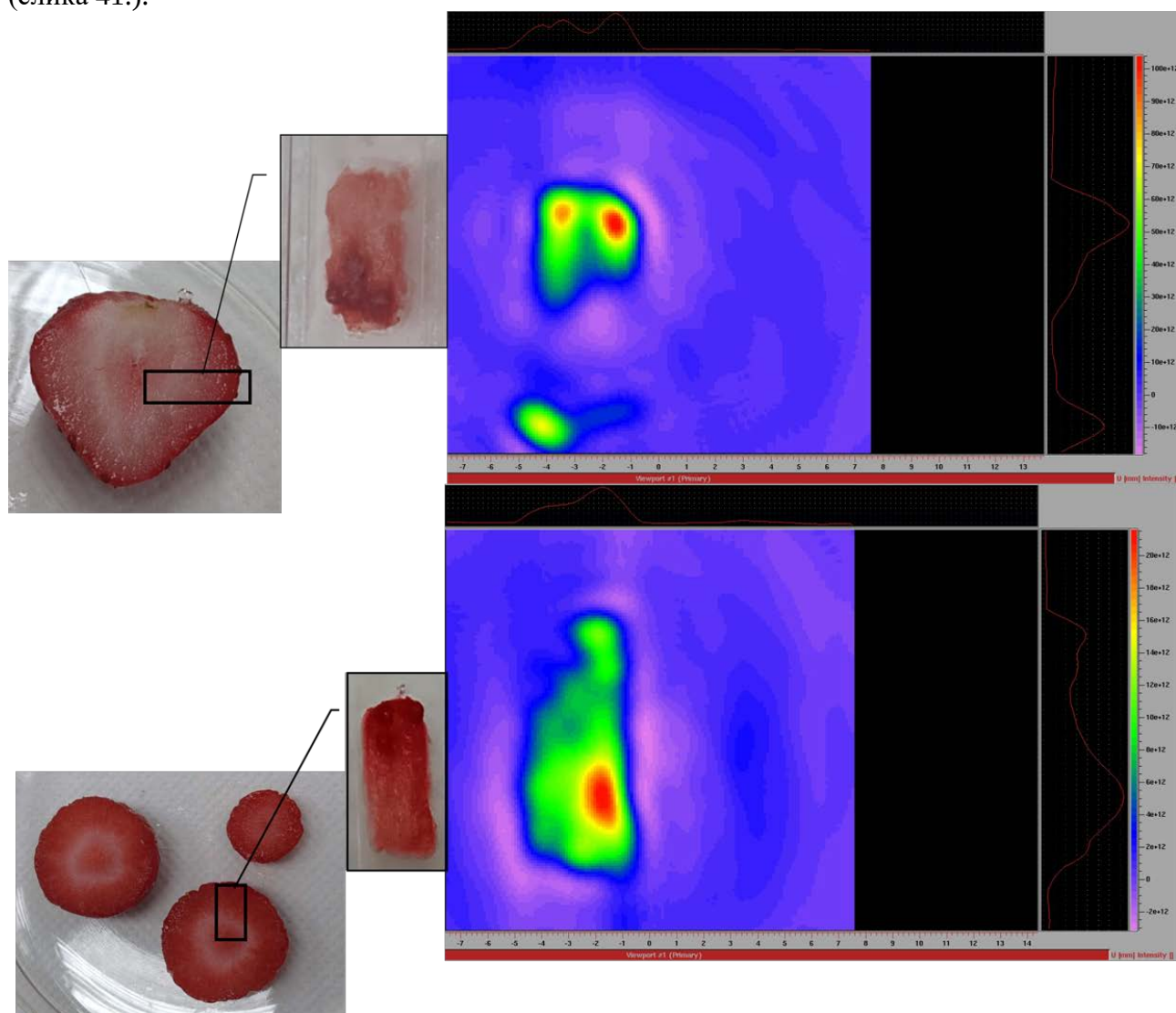
С обзиром да се ацилација пеларгонидина дешава углавном у ахенијама плода јагоде (Yoshida and Tamura, 2005), то је био мотив за истраживање ткивне дистрибуције антиоксидативног потенцијала антоцијанина у плоду јагоде помоћу 2D *EPR* снимања (Dragišić Maksimović et al., 2021). Према скали боја датој на слици 40. где црвена представља ниже, а плава више вредности редукције спин-пробе, добијени градијент интезитета *EPR* сигнала слободних радикала дуж пресека свежег плода јагоде је потврдио да су антоцијанини заједно са другим антиоксидансима углавном присутни на површини плода, што је само потврдило *MSI* анализу.



Слика 40. Дводимензионална *EPR* слика Y-Z пресека свежег ткива плода јагоде. Визуелизација антиоксидативног капацитета плода јагоде 'Sandra' испитиваног преко редукције спин-пробе 3-карбамоил проксил (3CP).

Након целог плода јагоде, детаљније је испитиван антиоксидативни капацитет појединих делова ткива плода, направљени су парцијални пресеци плода две репрезентативне

сортe јагоде и снимано је по истим условима. На основу скале боја показано је да су антиоксиданси попут антоцијанина и других полифенола углавном присутни у црвеном површинском делу плода, док су у средишњем светлом делу присутни у знатно мањој мери (слика 41.).



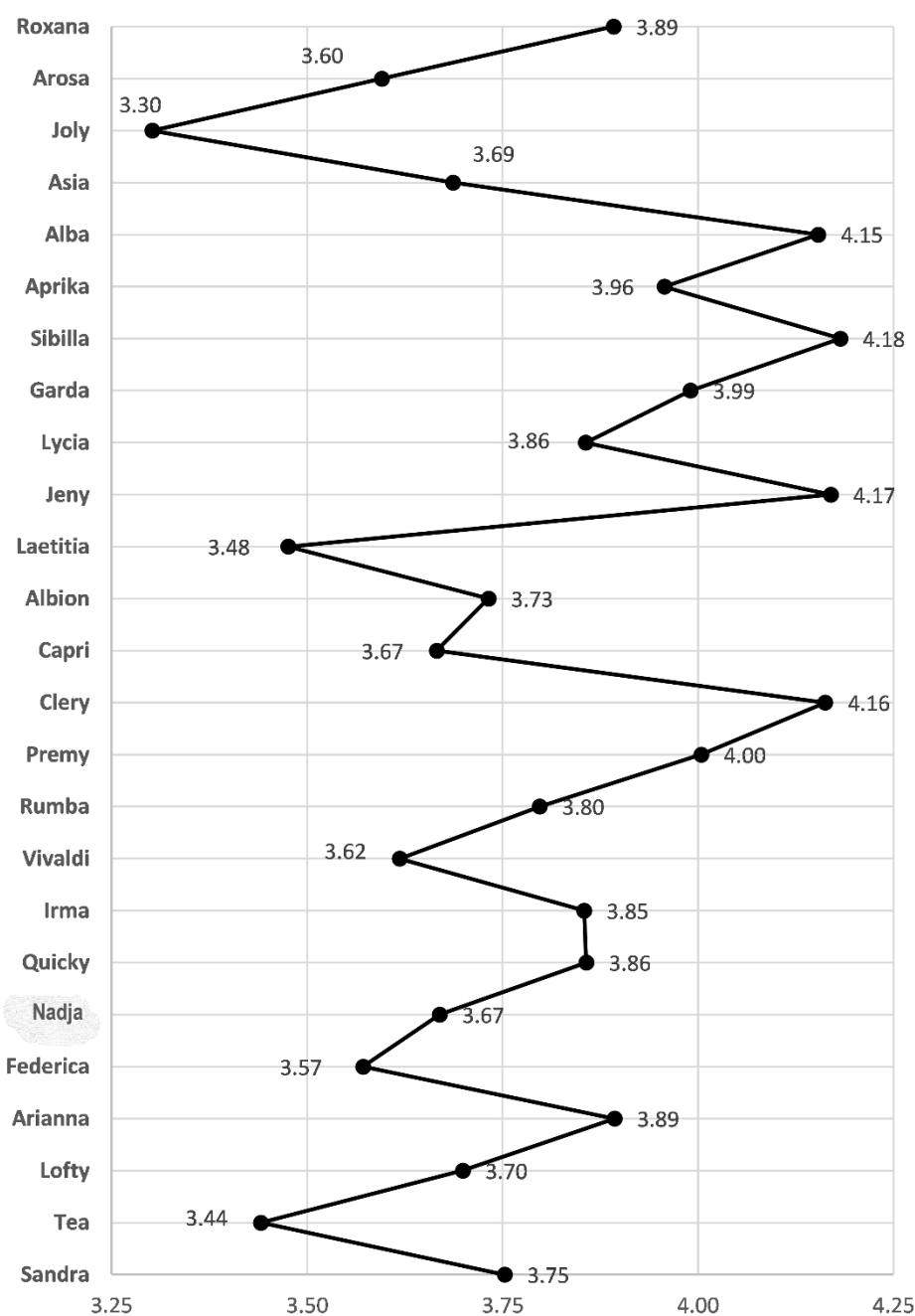
Слика 41. Визуелизација антиоксидативног капацитета појединих делова свежег ткива плода две репрезентативне сорте јагоде ('Sandra' и 'Aprika') испитиваног преко редукције спин-пробе 3-карбамоил проксил (ЗСР).

4.12 УКУПНИ ИНДЕКС КВАЛИТЕТА (TQI) КОРИШЋЕЊЕМ СВИХ ИЗМЕРЕНИХ ПАРАМЕТАРА

Укупни индекс квалитета, као што је већ описано у поглављу Материјал и методе, је поуздан нови математички модел који омогућава упоређивање квантитативно одређених појединачних параметара плодова јагоде, без обзира на њихове јединице изражавања, у циљу добијања јединствене вредности као оцене за укупан квалитет воћа. Након квантификовања свих испитиваних параметара израчунат је и TQI према правилу „што је нижа вредност, бољи је укупан индекс квалитета“ (Djekić et al., 2018).

Слика 41. приказује резултате TQI за 25 испитиваних сорти јагоде. Најбољу TQI вредност је имала сорта 'Joly' (3,30), затим 'Tea' (3,44) и 'Laetitia' (3,48). Међутим, најлошија вредност TQI добијена је за сорте 'Sibilla' (4,18), 'Jeny' (4,17) и 'Clery' (4,16). Ово је само потврда

квалитета плода јагоде сорте '*Joly*', која је и поред великог броја новоуведених сорти и даље остаје привредно значајна у нашој земљи са одличним избалансираним хемијским саставом плода.



Слика 42. Укупни индекс квалитета плода за 25 испитиваних сорти јагоде

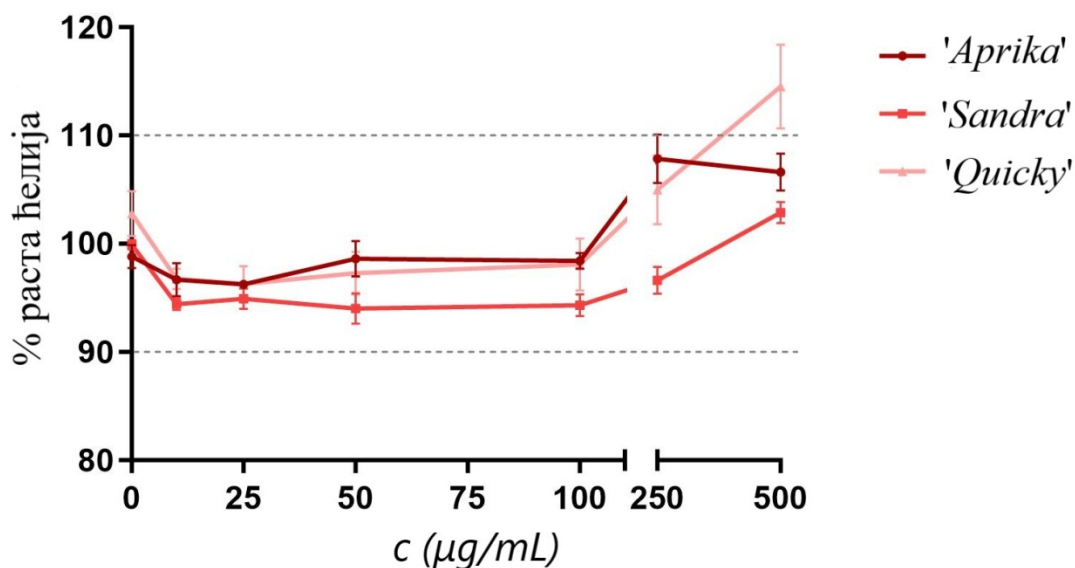
4.13 ЕФЕКАТ МЕТАНОЛНИХ ЕКСТРАКАТА ИСПИТИВАНИХ СОРТИ ЈАГОДА НА 3T3-F442A АДИПОЦИТЕ ГАЈЕНЕ У КУЛТУРИ

Према Међународној федерацији за дијабетес, до 783 милиона људи широм света (једна од осам одраслих особа) патиће од дијабетеса типа 2 до 2045. Преко 90% људи са дијабетесом има дијабетес типа 2, који је вођен социо-економским, демографским, еколошким и генетским факторима. Кључни фактори који доприносе порасту дијабетеса типа 2 укључују: брзи начин живота у градовима, смањење нивоа физичке активности и повећану преваленцу прекомерне тежине и гојазности.

Гојазност карактерише хипертрофија адипоцита и развој метаболичке инфламације у масном ткиву. Комбинација нефункционалних адипоцита, проинфламаторно и прооксидативно стање доприносе развоју инсулинске резистенције. AMPK (5' *adenosine monophosphate-activated protein kinase*) је кључни регулатор енергетског статуса, који бива активиран када је однос ATP-а према ADP-у низак. AMPK је киназа која фосфорилацијом серина и треонина циљних протеина регулише њихову активност у зависности од енергетских потреба, тако што супримира анаболичке путеве између осталог и липогенезу, у циљу смањења потрошње ATP-а, а стимулише катаболичке путеве у циљу стварања ATP-а. Скорија истраживања указују на значајну улогу AMPK у регулацији метаболизма липида и шећера у масном ткиву, и у модулацији инфламаторног одговора (Bijland et al., 2013). Показано је да полифеноли као што су ресвератол, епигалокатехин галат, кверцетин, берберин и остали могу да активирају AMPK (Xu et al., 2023). GLUT4 (транспортер глукозе типа 4) је инсулином регулисан транспортер глукозе који се налази у масном ткиву и пругастим мишићима (Huang and Czech, 2007). На површини ћелије, GLUT4 дозвољава олакшану дифузију глукозе из циркулације низ њен градијент концентрације у мишиће и адипоците. Адипоцити користе глукозу за липогенезу и складиште енергију у облику капљица липида. Када адипоцити нису у стању да апсорбују глукозу, развија се хронично стање хипергликемије са тешким здравственим последицама. Литературни подаци показују да храна богата полифенолима побољшава осетљивост на инсулин, при чему је главни идентификовани циљ AMPK, један од кључних сензора интрацелуларне енергије (Viollet, 2009; Zhao et al., 2018). Последњих деценија, научни докази су показали везу између повећане конзумације воћа и поврћа, посебно јагодастог воћа, и смањене инциденце дијабетеса типа 2. У бројним студијама је објављено да јагодасто воће, попут јагода, може смањити маркере кардиометаболичког ризика и побољшати маркере метаболичког синдрома код људи, опет због богатог састава овог воћа у бројним антиоксидативним једињењима. Према неколико *in vitro* студија и студија на животињама, полифеноли могу позитивно утицати на метаболизам глукозе и периферно преузимање глукозе у ткивима осетљивим на инсулин повећањем транслокације и активности GLUT4 и смањењем оксидативног стреса и инфламације (Raquette et al., 2017). Дијететски полифеноли су недавно предложени као активатори AMPK сигналног пута, а ова чињеница би могла објаснити везу између конзумирања хране богате полифенолима, превенције болести и успоравања прогресије старења (Giampieri et al., 2017). На пример, *in vivo* студија на пацовима је истакла да је унос јагоде повећао за 16,9% – 55,9% активности антиоксидативних ензима (GPx - *Glutathione peroxidases*, GR - *Glutathione reductase*, SOD - *Superoxide dismutase* и CAT - *Catalase*), биомасу и функционалност митохондрија, и смањио 17,8% нивоа ROS и до 47,4% оштећења биомаркера липида у плазми, биомаркера ДНК. Полифеноли из јагоде су предложени као активатори сигналног пута протеин киназе активирани АМП (АМПК). Ово би могло објаснити везу између конзумирања хране богате полифенолима и успоравања напредовања оксидативног стреса и старења (Par et al., 2021).

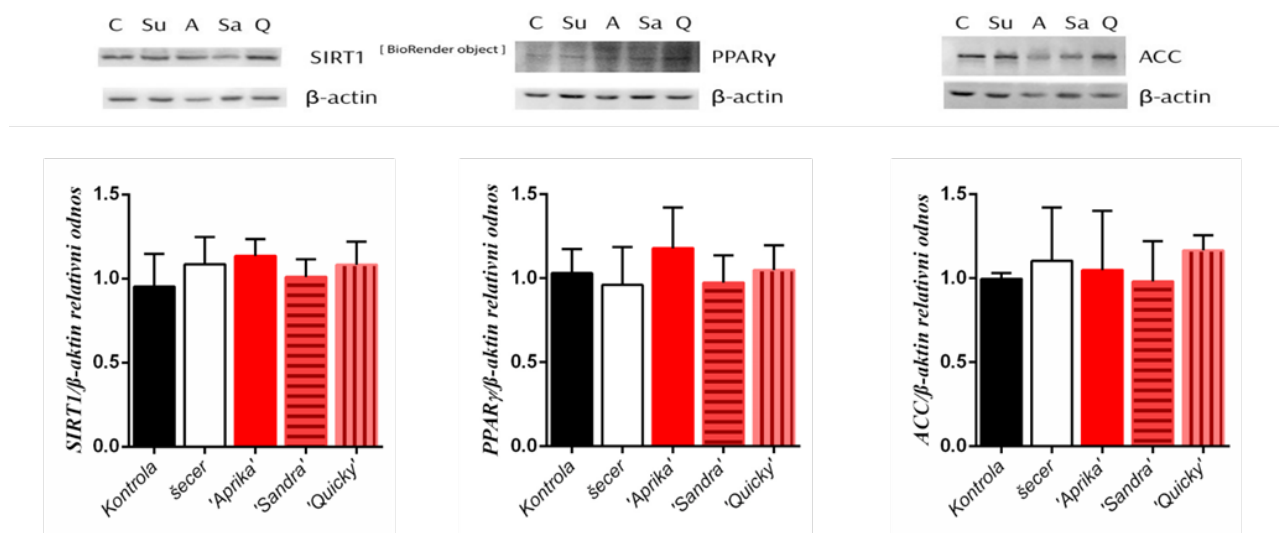
У овој докторској дисертацији истраживан је *in vitro* ефекат метанолних екстраката три сорте јагоде 'Aprika', 'Sandra' и 'Quicky' на метаболизам глукозе у 3T3-F442A адипоцитима. Имајући у виду укупни индекс квалитета за квантификоване шећере и органске киселине, за даља испитивања смо одабрали сорте 'Sandra' као позитивног екстрема, 'Aprika' као просечну

сорту и 'Quicky', као најлошије рангирану сорту по резултату укупног индекса квалитета. Резултати показују да ниједна од испитаних сорти није утицала на вијабилност ћелија након 72-часовног третмана екстрактима (слика 43.).



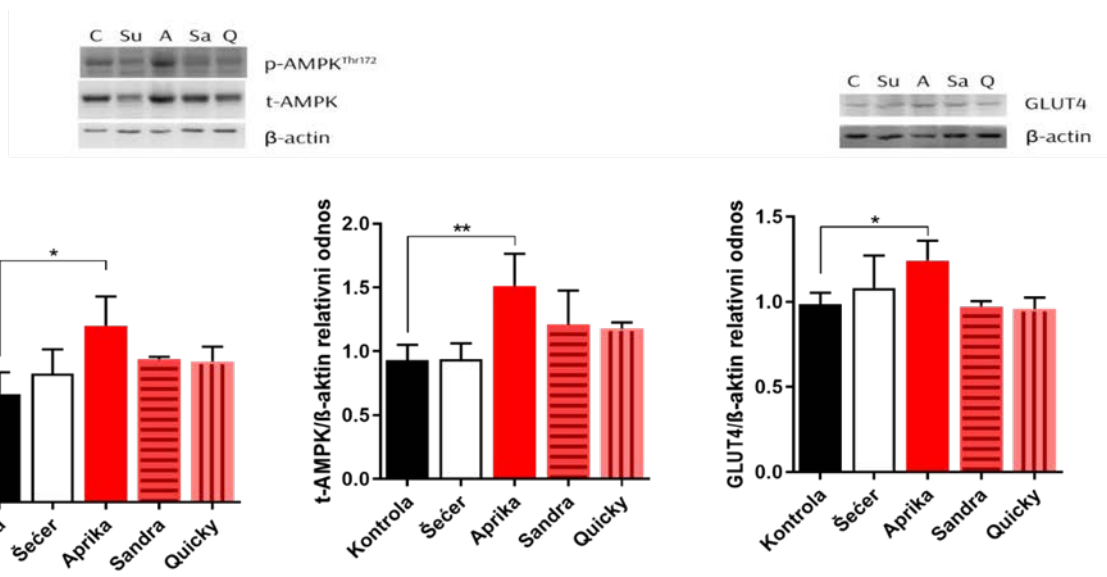
Слика 43. Вијабилност 3T3-F442A ћелија у култури након третмана метанолним екстрактима одабраних сорти јагоде.

Величина масног ткива је одређена, како бројем тако и запремином адипоцита (Spalding et al., 2008). Број адипоцита се може повећати након пролиферације преадипоцита и њихове диференцијације у адипоците. У овој студији није запажен утицај екстраката одабраних сорти јагоде на диференцијацију адипоцита. У складу са тим, нису запажене промене у протеинском нивоу главног регулатора диференцијације адипоцита – протеина *PPARγ* (енг. Peroxisome proliferator-activated receptor γ). Иако је показано да активација *PPARγ* може да поспеши диференцијацију преадипоцита у адипоците (Moseti et al., 2016) наши резултати показују да након 14 дана третмана екстрактима није дошло до промена у односу на контролни узорак, нити у односу на ћелије третиране раствором шећера који одговара измереној концентрацији шећера у јагодама. Такође, нису запажене промене у нивоу протеина Сиртуин 1 (eng. *Sirt 1 - silent mating type information regulation 2 homolog 1*), за који је показано да инхибира диференцијацију 3T3-L1 ћелија (Picard et al., 2004) (слика 44.).



Слика 44. Графички приказ утицаја метанолних екстракта јагоде на експресију протеина укључених у адипогенезу и *de novo* липогенезу. На графику су приказани релативни нивои протеина *Sirt 1*, *PPARγ* и *ACC* у укупним ћелијским екстрактима 3T3-F442A адипоцита, одређени методом имуноблота. Приказани су репрезентативни блотови. β Актин је служио као контрола једнаког наношења узорка. Резултати приказују средњу вредност ± СЕМ.

Ензим ацетилкоензим А карбоксилаза (енг. *Acetyl-CoA carboxylase (ACC)*), катализује први корак у биосинтези масних киселина. Непромењен ниво протеина *ACC* указује да екстракти одабраних сорти јагоде нису значајно утицали на синтезу масних киселина. *AMPK* је кључни регулатор енергетског статуса ћелије. Након третмана метанолним екстрактом сорте 'Aprika', али не и преостале две, запажен је повећан ниво укупног *AMPK* у диференцираним адипоцитима. Истовремено је забележен и пораст фосфорилације *AMPK* на треонину -*Thr172*. *AMPK* се фосфорилацијом треонина на позицији 172 активира. Активирани *AMPK* између осталог, инхибира синтезу масних киселина, а активира унос глукозе у ћелије. *GLUT4* је инсулином регулисан транспортер глукозе. Мерење релативног нивоа протеина *GLUT4* а у диференцираним адипоцитима показује да је 'Aprika', али не и друге две сорте, значајно повећала ниво *GLUT4*, чиме се повећава унос глукозе. Иако активација *AMPK* у ћелији може довести до инхибиције липогенезе, наши резултати су показали да екстракти јагоде нису значајно утицали на синтезу масних киселина будући да је ниво ензима ацетилкоензим А карбоксилазе (енг. *ACC acetyl-CoA-carboxylase*), остао непромењен (слика 45.).



Слика 45. Графички приказ утицаја метанолних екстракта јагоде на експресију *pAMPK-Thr¹⁷²*, *AMPK* и *GLUT4*. На графику су приказани релативни нивои протеина *pAMPK-Thr¹⁷²*, *AMPK* и *GLUT4* у укупним ћелијским екстрактима *3T3-F442A* адипоцита, одређени методом имуноблота. Приказани су репрезентативни блотови. β Актин је служио као контрола једнаког наношења узорка. Резултати су приказани као средња вредност $\pm$ СЕМ. Звездицама је означена статистички значајна разлика у односу на Контролни узорак. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Метанолни екстракт плода јагоде сорте 'Aprika', као што је анализа садржаја укупних фенола (TPC) показала, у поређењу са остале две сорте има висок садржај фенола што може допринети запаженом позитивном ефекту на преузимање глукозе, највероватније кроз активацију AMPK-зависног механизма преноса глукозе уз помоћ GLUT4. На основу резултата добијених на ћелијама гајеним у култури одабрали смо плодове сорте 'Aprika' и испитали антидиабетогена својства на анималном моделу. У прилог резултатима добијеним на ћелијама гајеним у култури (Jovanović et al., 2023), говоре и наша прелиминарна истраживања на анималном моделу гојазности изазване храном са високим садржајем масти. Наши прелиминарни резултати показују да конзумирање оброка од лиофилизованог плода јагоде (*Fragaria ananassa* Duch., сорта 'Aprika') позитивно утиче на метаболизам глукозе, метаболизам липида, инфламаторни и редокс статус у јетри и висцералном масном ткиву. Резултати показују да узимање оброка од лиофилизованог плода јагоде упоредо са узимањем хране са високим садржајем масти одлаже или ублажава појаву метаболичких поремећаја изазваних масном храном. Наиме, мишеви соја *C57BL/6* су 8 недеља били подвргнути промењеном режиму исхране који је подразумевао унос хране са 60% масти. Након 8 недеља, храна богата мастима је довела до појаве гојазности и системске инсулинске резистенције. Увођење здравог оброка од лиофилованих јагода довео је до побољшања параметара осетљивости на инсулин (Jovanović et al., 2024) и до повећања антиоксидативног капацитета јетре у моделу гојазности (Brkljačić et al., 2024), што би се могло повезати са високим садржајем полифенола и антиоксиданаса у плоду сорте 'Aprika'. Такође, храна богата мастима је довела до хипертрофије висцералног масног ткива и инфламације у масном ткиву, као и поремећаја у сигналном путу инсулина у јетри и скелетном мишићу. Увођење оброка од јагода је ублажило штетне ефекте масне хране, побољшало осетљивост на инсулин у јетри и мишићима и ублажило инфламацију у масном ткиву (Brkljačić et al., 2024).

Даља испитивања у овом смеру допринеће разумевању молекулских механизма који леже у основи благотворних ефеката оброка од јагода.

5 ЗАКЉУЧАК

У оквиру ове докторске дисертације експериментално су анализирани примарни и секундарни метаболити у плодовима 25 одабраних сорти јагоде, а затим применом статистичких метода и математичког модела су упоређени одређени биоактивни и нутритивни параметри по сортама, како би се извршило њихово рангирање и дала потенцијална препорука за гајење и конзумирање сорти са испољеним супериорним својствима. У току овог истраживања, од 25 испитиваних сорти јагоде, 12 су постале привредно значајне и комерцијално гајене сорте. Пошто квалитет плода јагоде представља врло комплексно својство јер зависи од физичких и хемијских атрибута који одређују и саму прихватљивост од стране потрошача, интересантно је истаћи да је сорта '*Jeny*' у току израде ове докторске дисертације потиснута из сортимента због бледо ружичасте боје плода која је са визуелног аспекта потрошачима неприхватљива.

Хемијски састав плодова постаје важан критеријум селекције и одабира сорти у производњи јагоде и један је од главних услова пласмана плодова на тржишту дефинисаних на основу ставова потрошача. Ово упоредно истраживање коришћењем модерних аналитичких техника је показало да се профили шећера и органских киселина у плодовима јагоде разликују међу сортама, што би могло бити од највеће важности у избору и промоцији најпогоднијих сорти у погледу слаткоће и нутритивног квалитета плода. У плодовима сваке од 25 испитиваних сорти јагоде помоћу *HPLC-PAD* су идентификована и квантификована три главна растворљива шећера: глукоза, фруктоза и сахароза, при чему је фруктоза квантитативно најзаступљенија. Садржај глукозе и фруктозе је био значајно већи код већине испитиваних сорти у односу на литературне податке. По садржају фруктозе и глукозе истицале су се сорте '*Capri*', '*Rumba*' и '*Jeny*', док је по садржају сахарозе доминирала '*Federica*'. Такође, индекс сласти плода је био највећи у сортама '*Rumba*', '*Jeny*' и '*Sandra*', што указује да је садржај моносахарида важан индикатор укуса воћа. Међутим, укус је регулисан уравнотеженим односом шећера и органских киселина. Органске киселине су одређиване коришћењем *HPLC-DAD* и утврђено је да су лимунска и јабучна киселина доминантно заступљене. По садржају лимунске киселине истичу се '*Laetitia*', '*Sibilla*' и '*Rumba*', док се по садржају јабучне киселине истичу '*Capri*' и '*Rumba*'.

HPLC-DAD се показала као најприкладнија за раздвајање и квантификацију фенолних једињења због њихове структурне сличности и разноликости, а *HPLC-MS* за идентификацију појединачних фенола у јагодама. Пеларгонидин-3-О-глукозид, је доминантан антоцијанин у плодовима јагоде и највиша вредност је измерена код сорти '*Joly*', '*Asia*' и '*Quicky*'. Код сорте '*Joly*' измерено је и највише пеларгонидин-3-О-малонилглукозида и елагинске киселине. Највише вредности катехина, као најмоћнијег флавоноида за заштиту од реактивних врста кисеоника, измерене су у сортама '*Asia*', '*Joly*' и '*Quicky*'.

Камферол-3-глукозид, камферол-3-глукуронид и камферол-3-кумароилглукоза били су доминантни у плодовима сорте '*Nadja*'. Највиша вредност кверцетин-3-глукуронид-а измерена је у сортама '*Tea*', '*Lofty*' и '*Nadja*', док је код сорте '*Clery*' измерена најнижа вредност.

Према кластерграму, сорте '*Laetitia*' и '*Asia*' су најсличније сорти '*Joly*', док се од свих сорти издваја сорта '*Nadja*'. Остале испитиване сорте по фенолном саставу су међусобно сличне.

Дендрограм појединих фенолних једињења показао је да су пеларгонидин-3-О-глукозид и катехин, камферол-3-кумароилглукоза и камферол-3-глукозид, деоксихексозид елагинске киселине и *p*-кумароил глукоза и камферол-3-ацетилглукозид и кверветин глукуронид у позитивној корелацији, што значи да ће порастом садржаја једне компоненте расти и садржај друге испитиване компоненте. Такође, интеракције појединачних фенолних једињења су под снажним утицајем сорте. С обзиром, да су то једињења са израженом антиоксидативном активношћу значајна су и због њихове здравствене корисности након конзумације.

С друге стране, детаљне студије *FT-ICR-MS* пружају нове информације о метаболичкој дистрибуцији плода јагоде, што је изузетно важно за разумевање физиолошких процеса у плодовима, посебно описујући структуре које дефинишу укус, а самим тим и квалитет плода.

Висок садржај фенолних једињења у тестираним сортама представља основу за даље истраживање антиоксидативних активности испитиваних сорти јагоде. Највећу активност у уклањању $O_2^{\cdot -}$ радикала показала је сорта '*Roxana*', а најмању '*Clery*'. Све тестиране сорте јагоде су показале високе активности у уклањањању $\cdot OH$ радикала, док је у уклањању радикала азот монооксида највећу активност имала сорта '*Tea*', а најмању сорта '*Jeny*'.

Липозоми су важне наноструктуре погодне за проучавање антиоксидативне активности различитих хидрофобних и хидрофилних молекула. У овој докторској дисертацији примењена је метода уградње биолошки активних једињења из метанолних екстраката две нове сорте јагоде у синтетисане липозоме, за процену њихове антиоксидативне активности према $\cdot OH$ и $DPHN$ радикалима. Липозоми добијени коришћењем екстракта јагоде '*Tea*' у метанолу су смањили *EPR* сигнал *DEPMPO/OH* адукта за 92,65%, док је стопа редукције била 78,00% применом метанолног екстракта сорте '*Aprika*'. Израчунато смањење *DPHN* сигнала износи 30,10% за сорту '*Tea*' и 16,26% за сорту '*Aprika*'. Ови резултати указују на снажну и селективну антирадикалну активност липозома који садрже антиоксидативна једињења добијена од јагоде. Резултати су показали значајан потенцијал инкапсулације антиоксидативних једињења добијених из јагоде у липозоме и њихову обећавајућу могућност употребе у фармацеутској и козметичкој индустрији.

Укупан садржај фенола, антоцијанина и ниво антиоксидативне активности су под снажним утицајем сорте. Компаративна спектрофотометријска истраживања различитих сорти јагоде показала су да су високе вредности свих наведених параметара регистроване код сорти '*Laetitia*', '*Joly*', '*Arianna*', '*Tea*' и '*Nadja*'. Ове сорте су се разликовале од осталих у садржају биоактивних једињења. *PCA* анализа код испитиваних сорти је показала да на укупну антиоксидативну активност подједнако утичу и *TPC* и *TACU* плода јагоде, али и да укупном антиоксидативном капацитету највише доприносе *TPC* и *TACU* код већине једнородних сорти јагоде, а неки други метаболити код сталнорастућих сорти.

Вредности садржаја витамина Ц код већине испитиваних сорти су високе, што указује да је већина тестираних сорти добар извор овог витамина.

Спектрофлуорометрија у комбинацији са *MCR-ALS* потврдила је постојање две главне флуорофоре у јагодама. Пошто је то много бржи метод у поређењу са хроматографским техникама, може се препоручити за брзи скрининг секундарних метаболита.

Значај интеркултиварских варијација у профилима примарних метаболита и фенолним профилима треба узети у обзир у технологији оплемењивања како би се обезбедио избор перспективних сорти са побољшаним нутритивним особинама и високим антиоксидативним капацитетом. Произвођачи и оплемењивачи се могу уверити да поред традиционалне детаљне, квантитативне анализе примарних метаболита, математички модел (*TQI*) може да се користи као поуздан алат за рангирање перспективних сорти.

Употреба *FT-ICR-MS* и *EPR* имицинг технологија у мапирању дистрибуције примарних и секундарних метаболита може бити од велике помоћи у откривању састава и функције ових једињења, која се природно синтетишу у плоду јагоде. Ове две методе су показале да се у ткиву плода јавља већа концентрација биомаркера, посебно у спољашњем црвеном делу. Воће богато фитонутријентима, поред изгледа и укуса, може задовољити све веће захтеве потрошача који се односе и на здравствено-промотивне ефекте конзумирања воћа као „функционалне хране“. Стога, научне студије о испитивању нутритивних и биоактивних компоненти у воћу постају све значајније.

Упоредном анализом експерименталних резултата спектрофотометрије, спектрофлуориметрије, *HPLC-MS*, *HPLC-DAD*, *HPLC-PAD*, *EPR* спектроскопије и имицинга, *FT-ICR-MS* и *MS* имицинга унапређених статистичком обрадом података и мултиваријантном анализом, допринело се детаљнијем профилисању биоактивних једињења присутних у плодовима различитих сорти јагоде, о чему постоји недовољно података у постојећој

литератури. Тиме је омогућено упоређивање и рангирање интродукованих сорти јагоде према садржају биоактивних и нутритивних компоненти, њиховој интеракцији са ензимским системом плода и поузданог предвиђања одржања биоактивног потенцијала и прихватљивости плодова различитих сорти од стране потрошача. У ширем смислу, резултати ове докторске дисертације профилишу употребу одређених аналитичких метода за испитивање физичко-хемијских особина плода у циљу фаворизовања сорти које поседују високу нутритивну и антиоксидативну вредност.

6 ЛІТЕРАТУРА

- Aaby, Kjersti, Sebastian Mazur, Arnfinn Nes, и Grete Skrede. 2012. „Phenolic Compounds in Strawberry (*Fragaria x Ananassa* Duch.) Fruits: Composition in 27 Cultivars and Changes during Ripening“. *Food Chemistry* 132 (1): 86–97.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.037>.
- Aaby, K., Skrede, G., Wrolstad, R.E., 2005. Phenolic Composition and Antioxidant Activities in Flesh and Achenes of Strawberries (*Fragaria ananassa*). *J. Agric. Food Chem.* 53, 4032–4040. <https://doi.org/10.1021/jf048001o>
- Abou-Dib, A., Aubriet, F., Hertzog, J., Vernex-Loiset, L., Schramm, S., Carré, V., 2022. Next Challenges for the Comprehensive Molecular Characterization of Complex Organic Mixtures in the Field of Sustainable Energy. *Molecules* 27, 8889.
<https://doi.org/10.3390/molecules27248889>
- Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., Tattini, M., 2013. Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry, Plant Phenolics: biosynthesis, genetics, and ecophysiology* 72, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.03.014>
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., Nejati-Koshki, K., 2013. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett* 8, 102. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>
- Alam, M.A., Subhan, N., Hossain, H., Hossain, M., Reza, H.M., Rahman, M.M., Ullah, M.O., 2016. Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutr Metab (Lond)* 13, 27.
<https://doi.org/10.1186/s12986-016-0080-3>
- Albregts, E.E., Howard, C.M., 1980. Accumulation of Nutrients by Strawberry Plants and Fruit Grown in Annual Hill Culture1. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 105, 386–388. <https://doi.org/10.21273/JASHS.105.3.386>
- Aleixandre-Tudo, J.L., Toit, W. du, Aleixandre-Tudo, J.L., Toit, W. du, 2018. The Role of UV-Visible Spectroscopy for Phenolic Compounds Quantification in Winemaking, in: *Frontiers and New Trends in the Science of Fermented Food and Beverages*. IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.79550>
- Al-Ghamdi, A.A., Elansary, H.O., 2018. Synergetic effects of 5-aminolevulinic acid and *Ascophyllum nodosum* seaweed extracts on *Asparagus* phenolics and stress related genes under saline irrigation. *Plant Physiol Biochem* 129, 273–284.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.06.008>
- Alves, N.J., Cusick, W., Stefanick, J.F., Ashley, J.D., Handlogten, M.W., Bilgicer, B., 2013. Functionalized liposome purification via Liposome Extruder Purification (LEP). *Analyst* 138, 4746–4751. <https://doi.org/10.1039/C3AN00680H>
- Andreasen, M.F., Christensen, L.P., Meyer, A.S., Hansen, A., 2000. Content of phenolic acids and ferulic acid dehydrodimers in 17 rye (*Secale cereale* L.) varieties. *J Agric Food Chem* 48, 2837–2842. <https://doi.org/10.1021/jf991266w>
- Aphalo, P., 1997. The effect of UV-B radiation on UV-absorbing secondary metabolites in birch seedlings grown under simulated forest soil conditions. *New Phytologist*.
- Ariza, M.T., Reboredo-Rodríguez, P., Cervantes, L., Soria, C., Martínez-Ferri, E., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Battino, M., Simal-Gándara, J., 2018. Bioaccessibility and potential bioavailability of phenolic compounds from achenes as a new target for strawberry breeding programs. *Food Chem* 248, 155–165.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.105>

- Arnao, M.B., Cano, A., Acosta, M., 1999. Methods to Measure the Antioxidant Activity in Plant Material. A Comparative Discussion. *Free Radical Research* 31, 89–96.
<https://doi.org/10.1080/10715769900301371>
- Arnaud, B., Durand, S., Fanuel, M., Guillon, F., Méchin, V., Rogniaux, H., 2020. Imaging Study by Mass Spectrometry of the Spatial Variation of Cellulose and Hemicellulose Structures in Corn Stalks. *J. Agric. Food Chem.* 68, 4042–4050. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07579>
- Aron, P.M., Kennedy, J.A., 2008. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research* 52, 79–104. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700137>
- Azodanlou, R., Darbellay, C., Luisier, J.-L., Villettaz, J.-C., Amadò, R., 2003. Quality Assessment of Strawberries (*Fragaria* Species). *J. Agric. Food Chem.* 51, 715–721.
<https://doi.org/10.1021/jf0200467>
- Babu, P.V.A., Liu, D., n.d. Green Tea Catechins and Cardiovascular Health: An Update. *Current Medicinal Chemistry* 15, 1840–1850.
- Bačić, G., Mojović, M., 2005. EPR Spin Trapping of Oxygen Radicals in Plants: A Methodological Overview. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1048, 230–243.
<https://doi.org/10.1196/annals.1342.021>
- Bae, I.K., Ham, H.M., Jeong, M.H., Kim, D.H., Kim, H.J., 2015. Simultaneous determination of 15 phenolic compounds and caffeine in teas and mate using RP-HPLC/UV detection: Method development and optimization of extraction process. *Food Chemistry* 172, 469–475.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.050>
- Basson, C.E., Groenewald, J.-H., Kossmann, J., Cronjé, C., Bauer, R., 2010. Sugar and acid-related quality attributes and enzyme activities in strawberry fruits: Invertase is the main sucrose hydrolysing enzyme. *Food Chemistry* 121, 1156–1162.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.064>
- Ben-Abdallah, S., Zorrig, W., Amyot, L., Renaud, J., Hannoufa, A., Lachâal, M., Karray-Bouraoui, N., 2019. Potential production of polyphenols, carotenoids and glycoalkaloids in *Solanum villosum* Mill. under salt stress. *Biologia* 74, 309–324. <https://doi.org/10.2478/s11756-018-00166-y>
- Bersani, E., 2007. Total Quality Indexes for Extra-Virgin Olive Oils. *Journal of Food Quality*.
- Bhandari, D.R., Wang, Q., Friedt, W., Spengler, B., Gottwald, S., Römpf, A., 2015. High resolution mass spectrometry imaging of plant tissues: towards a plant metabolite atlas. *Analyst* 140, 7696–7709. <https://doi.org/10.1039/C5AN01065A>
- Bijland, S., Mancini, S.J., Salt, I.P., 2013. Role of AMP-activated protein kinase in adipose tissue metabolism and inflammation. *Clinical Science* 124, 491–507.
<https://doi.org/10.1042/CS20120536>
- Bistgani, Z.E., Hashemi, M., DaCosta, M., Craker, L., Maggi, F., Morshedloo, M.R., 2019. Effect of salinity stress on the physiological characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis* Celak. *Industrial Crops and Products* 135, 311–320. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.055>
- Boggia, R., Casolino, M.C., Hysenaj, V., Oliveri, P., Zunin, P., 2013. A screening method based on UV–Visible spectroscopy and multivariate analysis to assess addition of filler juices and water to pomegranate juices. *Food Chemistry, Special Issue: Food Quality Evaluation* 140, 735–741. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.020>
- Bordonaba, J.G., Crespo, P., Terry, L.A., 2011. A new acetonitrile-free mobile phase for HPLC-DAD determination of individual anthocyanins in blackcurrant and strawberry fruits: A comparison and validation study. *Food Chemistry* 129, 1265–1273.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.114>
- Bors, W., Saran, M., 1987. Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radic Res Commun* 2, 289–294. <https://doi.org/10.3109/10715768709065294>
- Boughton, B.A., Thinagaran, D., Sarabia, D., Bacic, A., Roessner, U., 2016. Mass spectrometry imaging for plant biology: a review. *Phytochem Rev* 15, 445–488.
<https://doi.org/10.1007/s11101-015-9440-2>

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brezová, V., Šlebodová, A., Staško, A., 2009. Coffee as a source of antioxidants: An EPR study. *Food Chemistry* 114, 859–868. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.025>
- Brkljačić, J., Jovanović, M., Teofilović, A., Mičić, B., Vratarić, M., Milosavljević, D., Dragišić Maksimović, J., Maksimović, V., Milivojević, J., Đorđević, A., 2024. Dietary supplementation with liophilised strawberry improves insulin sensitivity and redox status in mouse model of diet induced obesity. Book of abstracts: 2nd B&H Symposium of Laboratory Geneticists and Molecular Biologists (with International Participation); 2024 May 10-11; Banja Luka, Bosnia and Herzegovina 38.
- Brynda, M., 2010. Introduction to Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy, in: Jue, T. (Ed.), *Biomedical Applications of Biophysics, Handbook of Modern Biophysics*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 59–98. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-233-9_3
- Buendía, B., Gil, M.I., Tudela, J.A., Gady, A.L., Medina, J.J., Soria, C., López, J.M., Tomás-Barberán, F.A., 2010. HPLC-MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. *J Agric Food Chem* 58, 3916–3926. <https://doi.org/10.1021/jf9030597>
- Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N., Khan, W., 2017. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics* 9, 12. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>
- Buzzini, P., Arapitsas, P., Goretti, M., Branda, E., Turchetti, B., Pinelli, P., Ieri, F., Romani, A., 2008. Antimicrobial and antiviral activity of hydrolysable tannins. *Mini Rev Med Chem* 8, 1179–1187. <https://doi.org/10.2174/138955708786140990>
- Cao, G., Russell, R.M., Lischner, N., Prior, R.L., 1998. Serum Antioxidant Capacity Is Increased by Consumption of Strawberries, Spinach, Red Wine or Vitamin C in Elderly Women. *The Journal of Nutrition* 128, 2383–2390. <https://doi.org/10.1093/jn/128.12.2383>
- Celli, G.B., Tan, C., Selig, M.J., 2019. Anthocyanidins and Anthocyanins, in: Melton, L., Shahidi, F., Varelis, P. (Eds.), *Encyclopedia of Food Chemistry*. Academic Press, Oxford, pp. 218–223. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21780-0>
- Cesa, S., Carradori, S., Bellagamba, G., Locatelli, M., Casadei, M.A., Masci, A., Paolicelli, P., 2017. Evaluation of processing effects on anthocyanin content and colour modifications of blueberry (*Vaccinium* spp.) extracts: Comparison between HPLC-DAD and CIELAB analyses. *Food Chemistry* 232, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.153>
- Chemin, C., Péan, J.-M., Pape, A.L., Delbos, J.-M., German-Fattal, M., Wüthrich, P., Couvreur, P., 2010. Biodistribution and anticancer activity of a new vinca alkaloid encapsulated into long-circulating liposomes. *Journal of Liposome Research* 20, 62–72. <https://doi.org/10.3109/08982100903103888>
- Chen, S.X., Schopfer, P., 1999. Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *Eur J Biochem* 260, 726–735. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00199.x>
- Chen, Z., Ma, Y., Yang, R., Gu, Z., Wang, P., 2019. Effects of exogenous Ca²⁺ on phenolic accumulation and physiological changes in germinated wheat (*Triticum aestivum* L.) under UV-B radiation. *Food Chem* 288, 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.131>
- Chisari, M., Barbagallo, R.N., Spagna, G., 2007. Characterization of Polyphenol Oxidase and Peroxidase and Influence on Browning of Cold Stored Strawberry Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 55, 3469–3476. <https://doi.org/10.1021/jf063402k>
- Christensen, J., Nørsgaard, L., Bro, R., Engelsens, S.B., 2006. Multivariate Autofluorescence of Intact Food Systems. *Chem. Rev.* 106, 1979–1994. <https://doi.org/10.1021/cr050019q>
- Cillero-Pastor, B., Heeren, R.M.A., 2014. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Imaging for Peptide and Protein Analyses: A Critical Review of On-Tissue Digestion. *J. Proteome Res.* 13, 325–335. <https://doi.org/10.1021/pr400743a>

- Civello, P.M., Martinez, G.A., Chaves, A.R., Anon, M.C., 1995. Peroxidase from Strawberry Fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): Partial Purification and Determination of Some Properties. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2596–2601. <https://doi.org/10.1021/jf00058a008>
- Cordenunsi, B.R., Oliveira Do Nascimento, J.R., Genovese, M.I., Lajolo, F.M., 2002. Influence of Cultivar on Quality Parameters and Chemical Composition of Strawberry Fruits Grown in Brazil. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2581–2586. <https://doi.org/10.1021/jf011421i>
- Cosme, F., Pinto, T., Aires, A., Morais, M.C., Bacelar, E., Anjos, R., Ferreira-Cardoso, J., Oliveira, I., Vilela, A., Gonçalves, B., 2022. Red Fruits Composition and Their Health Benefits—A Review. *Foods* 11, 644. <https://doi.org/10.3390/foods11050644>
- Costa-Broseta, Á., Perea-Resa, C., Castillo, M.-C., Ruíz, M.F., Salinas, J., León, J., 2018. Nitric Oxide Controls Constitutive Freezing Tolerance in Arabidopsis by Attenuating the Levels of Osmoprotectants, Stress-Related Hormones and Anthocyanins. *Sci Rep* 8, 9268. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27668-8>
- Craft, B.D., Kerrihard, A.L., Amarowicz, R., Pegg, R.B., 2012. Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11, 148–173. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00173.x>
- Crecente-Campo, J., Nunes-Damaceno, M., Romero-Rodríguez, M.A., Vázquez-Odériz, M.L., 2012. Color, anthocyanin pigment, ascorbic acid and total phenolic compound determination in organic versus conventional strawberries (*Fragaria* × *ananassa* Duch, cv Selva). *Journal of Food Composition and Analysis* 28, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.07.004>
- Crespo, P., Bordonaba, J.G., Terry, L.A., Carlen, C., 2010. Characterisation of major taste and health-related compounds of four strawberry genotypes grown at different Swiss production sites. *Food Chemistry* 122, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.010>
- Da Silva, F.L., Escribano-Bailón, M.T., Pérez Alonso, J.J., Rivas-Gonzalo, J.C., Santos-Buelga, C., 2007. Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT - Food Science and Technology* 40, 374–382. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.018>
- Das, D.K., 1994. Naturally occurring flavonoids: structure, chemistry, and high-performance liquid chromatography methods for separation and characterization. *Methods Enzymol* 234, 410–420. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)34111-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)34111-7)
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., 2003. Commercial Dietary Antioxidant Supplements Assayed for Their Antioxidant Activity by Different Methodologies. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2512–2519. <https://doi.org/10.1021/jf021030j>
- Davies, M.J., 2016. Detection and characterisation of radicals using electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping and related methods. *Methods* 109, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.05.013>
- Decker, C., Steiniger, F., Fahr, A., 2013. Transfer of a lipophilic drug (temoporfin) between small unilamellar liposomes and human plasma proteins: influence of membrane composition on vesicle integrity and release characteristics. *Journal of Liposome Research* 23, 154–165. <https://doi.org/10.3109/08982104.2013.770017>
- Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Bloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., Lele, R.D., 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 52, 794–804.
- Di Vittori, L., Mazzoni, L., Battino, M., Mezzetti, B., 2018. Pre-harvest factors influencing the quality of berries. *Scientia Horticulturae* 233, 310–322. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.058>
- Dikanov, S.A., Crofts, A.R., 2006. ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY, in: Vij, D.R. (Ed.), *Handbook of Applied Solid State Spectroscopy*. Springer US, Boston, MA, pp. 97–149. https://doi.org/10.1007/0-387-37590-2_3
- Djekic, I., Tomic, N., Bourdoux, S., Spilimbergo, S., Smigic, N., Udovicki, B., Hofland, G., Devlieghere, F., Rajkovic, A., 2018. Comparison of three types of drying (supercritical CO₂, air and freeze) on the quality of dried apple – Quality index approach. *LWT* 94, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.029>

- Djekic, I., Vunduk, J., Tomašević, I., Kozarski, M., Petrovic, P., Niksic, M., Pudja, P., Klaus, A., 2017. Total quality index of *Agaricus bisporus* mushrooms packed in modified atmosphere. *J Sci Food Agric* 97, 3013–3021. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8142>
- Dong, M.W., 2005. 3 - HPLC Instrumentation in Pharmaceutical Analysis: Status, Advances, and Trends, in: Ahuja, S., Dong, M.W. (Eds.), *Separation Science and Technology, Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. Academic Press, pp. 47–75. [https://doi.org/10.1016/S0149-6395\(05\)80047-9](https://doi.org/10.1016/S0149-6395(05)80047-9)
- Dong, T., Han, R., Yu, J., Zhu, M., Zhang, Y., Gong, Y., Li, Z., 2019. Anthocyanins accumulation and molecular analysis of correlated genes by metabolome and transcriptome in green and purple asparaguses (*Asparagus officinalis*, L.). *Food Chemistry* 271, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.120>
- Dragišić Maksimović, J., Mojović, M., Vučinić, Ž., Maksimović, V., 2021. Spatial distribution of apoplastic antioxidative constituents in maize root. *Physiologia Plantarum* 173, 818–828. <https://doi.org/10.1111/ppl.13476>
- Dragišić Maksimović, J., Poledica, M., Mutavdžić, D., Mojović, M., Radivojević, D., Milivojević, J., 2015. Variation in Nutritional Quality and Chemical Composition of Fresh Strawberry Fruit: Combined Effect of Cultivar and Storage. *Plant Foods Hum Nutr* 70, 77–84. <https://doi.org/10.1007/s11130-014-0464-3>
- Dragišić Maksimović, J.J., Milivojević, J.M., Poledica, M.M., Nikolić, M.D., Maksimović, V.M., 2013. Profiling antioxidant activity of two primocane fruiting red raspberry cultivars (Autumn bliss and Polka). *Journal of Food Composition and Analysis* 31, 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.05.008>
- Dragišić Maksimović, J.J., Poledica, M.M., Radivojević, D.D., Milivojević, J.M., 2017. Enzymatic Profile of 'Willamette' Raspberry Leaf and Fruit Affected by Prohexadione-Ca and Young Canes Removal Treatments. *J. Agric. Food Chem.* 65, 5034–5040. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00638>
- Dragišić Maksimović, J.J., Živanović, B.D., Maksimović, V.M., Mojović, M.D., Nikolic, M.T., Vučinić, Ž.B., 2014. Filter strip as a method of choice for apoplastic fluid extraction from maize roots. *Plant Science* 223, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.03.009>
- Enomoto, H., 2021a. Adhesive film applications help to prepare strawberry fruit sections for desorption electrospray ionization-mass spectrometry imaging. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 85, 1341–1347. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbab033>
- Enomoto, H., 2021b. Unique distribution of ellagitannins in ripe strawberry fruit revealed by mass spectrometry imaging. *Current Research in Food Science* 4, 821–828. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.11.006>
- Enomoto, H., Kotani, M., Ohmura, T., 2020. Novel Blotting Method for Mass Spectrometry Imaging of Metabolites in Strawberry Fruit by Desorption/Ionization Using Through Hole Alumina Membrane. *Foods* 9, 408. <https://doi.org/10.3390/foods9040408>
- Enomoto, H., Sato, K., Miyamoto, K., Ohtsuka, A., Yamane, H., 2018. Distribution Analysis of Anthocyanins, Sugars, and Organic Acids in Strawberry Fruits Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Imaging Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* 66, 4958–4965. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00853>
- Etienne, A., Génard, M., Lobit, P., Mbeguié-A-Mbéguié, D., Bugaud, C., 2013. What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. *Journal of Experimental Botany* 64, 1451–1469. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert035>
- Evans, W.C., 2009. Trease and Evans pharmacognosy, 16th ed. ed. Saunders/Elsevier, Edinburgh New York.
- Fang, Y.-Z., Yang, S., Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18, 872–879. [https://doi.org/10.1016/s0899-9007\(02\)00916-4](https://doi.org/10.1016/s0899-9007(02)00916-4)
- FAOSTAT [WWW Document], 2025. URL <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (accessed 3.17.25).

- Fernandes, V.C., Domingues, V.F., de Freitas, V., Delerue-Matos, C., Mateus, N., 2012. Strawberries from integrated pest management and organic farming: phenolic composition and antioxidant properties. *Food Chem* 134, 1926–1931. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.130>
- Fernández-Lara, R., Gordillo, B., Rodríguez-Pulido, F.J., Lourdes González-Miret, M., Del Villar-Martínez, A.A., Dávila-Ortiz, G., Heredia, F.J., 2015. Assessment of the differences in the phenolic composition and color characteristics of new strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivars by HPLC–MS and Imaging Tristimulus Colorimetry. *Food Research International* 76, 645–653. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.038>
- Ferreres, F., Figueiredo, R., Bettencourt, S., Carqueijeiro, I., Oliveira, J., Gil-Izquierdo, A., Pereira, D.M., Valentão, P., Andrade, P.B., Duarte, P., Barceló, A.R., Sottomayor, M., 2011. Identification of phenolic compounds in isolated vacuoles of the medicinal plant *Catharanthus roseus* and their interaction with vacuolar class III peroxidase: an H₂O₂ affair? *Journal of Experimental Botany* 62, 2841–2854. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq458>
- Flaten, G.E., Chang, T.-T., Phillips, W.T., Brandl, M., Bao, A., Goins, B., 2013. Liposomal formulations of poorly soluble camptothecin: drug retention and biodistribution. *Journal of Liposome Research* 23, 70–81. <https://doi.org/10.3109/08982104.2012.742537>
- Flores, G., Wu, S.-B., Negrin, A., Kennelly, E.J., 2015. Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. *Food Chemistry* 170, 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.076>
- Fraige, K., Pereira-Filho, E.R., Carrilho, E., 2014. Fingerprinting of anthocyanins from grapes produced in Brazil using HPLC–DAD–MS and exploratory analysis by principal component analysis. *Food Chemistry* 145, 395–403. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.066>
- Frejaville, C., Karoui, H., Tuccio, B., Moigne, F.L., Culcasi, M., Pietri, S., Lauricella, R., Tordo, P., 1995. 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide: A New Efficient Phosphorylated Nitron for the in Vitro and in Vivo Spin Trapping of Oxygen-Centered Radicals. *J. Med. Chem.* 38, 258–265. <https://doi.org/10.1021/jm00002a007>
- Fridovich, I., 1999. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* 893, 13–18. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07814.x>
- Furlan, C.M., Motta, L., Santos, D., 2011. Tannins: What do they represent in plant life?, in: *Tannins: Types, Foods Containing, and Nutrition*. pp. 251–263.
- Gallez, B., Swartz, H.M., 2004. In vivo EPR: when, how and why? *NMR in Biomedicine* 17, 223–225. <https://doi.org/10.1002/nbm.913>
- García-Viguera, C., Zafrilla, P., Tomás-Barberán, F.A., 1998. The use of acetone as an extraction solvent for anthocyanins from strawberry fruit. *Phytochemical Analysis* 9, 274–277. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(199811/12\)9:6<274::AID-PCA416>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(199811/12)9:6<274::AID-PCA416>3.0.CO;2-G)
- Garrett, R.H., Grisham, C.M., Sabat, M., 2013. *Biochemistry*, 5. ed., internat. ed. ed. Brooks-Cole, Cengage Learning, Pacific Grove, Calif.
- Gessel, M.M., Norris, J.L., Caprioli, R.M., 2014. MALDI imaging mass spectrometry: Spatial molecular analysis to enable a new age of discovery. *Journal of Proteomics* 107, 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.021>
- Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J.M., Cordero, M.D., Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T.Y., Afrin, S., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M., Astolfi, P., Rubini, C., Zizzi, A., Tulipani, S., Quiles, J.L., Mezzetti, B., Battino, M., 2017. Strawberry consumption improves aging-associated impairments, mitochondrial biogenesis and functionality through the AMP-activated protein kinase signaling cascade. *Food Chemistry* 234, 464–471. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.017>
- Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J.M., Mazzoni, L., Romandini, S., Bompadre, S., Diamanti, J., Capocasa, F., Mezzetti, B., Quiles, J.L., Ferreira, M.S., Tulipani, S., Battino, M., 2013. The potential impact of strawberry on human health. *Nat Prod Res* 27, 448–455. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.706294>

- Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J.M., Quiles, J.L., Mezzetti, B., Battino, M., 2012a. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition* 28, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.009>
- Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J.M., Quiles, J.L., Mezzetti, B., Battino, M., 2012b. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition* 28, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.009>
- Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., Offen, D., 2001. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 40, 959–975. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(01\)00019-3](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(01)00019-3)
- Goleniowski, M., Bonfill, M., Cusido, R., Palazón, J., 2013. Phenolic Acids, in: Ramawat, K.G., Mérillon, J.-M. (Eds.), *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1951–1973. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_64
- González, E.M., De Ancos, B., Cano, M.P., 2000. Partial Characterization of Peroxidase and Polyphenol Oxidase Activities in Blackberry Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5459–5464. <https://doi.org/10.1021/jf000169w>
- González, E.M., De Ancos, B., Cano, M.P., 1999. Partial Characterization of Polyphenol Oxidase Activity in Raspberry Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4068–4072. <https://doi.org/10.1021/jf981325q>
- González-Sarrías, A., Tomás-Barberán, F.A., García-Villalba, R., 2020. Structural Diversity of Polyphenols and Distribution in Foods, in: *Dietary Polyphenols*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–29. <https://doi.org/10.1002/9781119563754.ch1>
- Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., Jiang, Y., 2003. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research* 23, 1719–1726. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2003.08.005>
- Guo, J., Han, W., Wang, M., 2008. Ultraviolet and environmental stresses involved in the induction and regulation of anthocyanin biosynthesis: A review. *African Journal of Biotechnology* 7.
- Hagen, W.R., 2008. *Biomolecular EPR Spectroscopy*, 0 ed. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420059588>
- Hakala, M., Lapveteläinen, A., Huopalahti, R., Kallio, H., Tahvonen, R., 2003. Effects of varieties and cultivation conditions on the composition of strawberries. *Journal of Food Composition and Analysis* 16, 67–80. [https://doi.org/10.1016/S0889-1575\(02\)00165-5](https://doi.org/10.1016/S0889-1575(02)00165-5)
- Häkinen, S., Heinonen, M., Kärenlampi, S., Mykkänen, H., Ruuskanen, J., Törrönen, R., 1999. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International* 32, 345–353. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00095-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00095-2)
- Häkinen, S.H., Kärenlampi, S.O., Heinonen, I.M., Mykkänen, H.M., Törrönen, A.R., 1999. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J Agric Food Chem* 47, 2274–2279. <https://doi.org/10.1021/jf9811065>
- Häkinen, S.H., Törrönen, A.R., 2000. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International* 33, 517–524. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00086-7)
- Halliwell, B., 2003. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease, in: John Wiley & Sons, Ltd (Ed.), *eLS. Wiley*. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0002269>
- Halliwell, B., 1994. Free Radicals and Antioxidants: a Personal View. *Nutrition Reviews* 52, 253–265. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1994.tb01453.x>
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Fifth Edition, Fifth Edition. ed. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Hammerschmidt, R., Nuckles, E.M., Kuć, J., 1982. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological Plant Pathology* 20, 73–82. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(82\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0048-4059(82)90025-X)
- Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481–504. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1)

- Harvey, D., 2000. Modern analytical chemistry. McGraw-Hill, Boston.
- Havsteen, B., 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology* 32, 1141–1148. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(83\)90262-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(83)90262-9)
- Hertzog, J., Carré, V., Le Brech, Y., Mackay, C.L., Dufour, A., Mašek, O., Aubriet, F., 2017. Combination of electrospray ionization, atmospheric pressure photoionization and laser desorption ionization Fourier transform ion cyclotronic resonance mass spectrometry for the investigation of complex mixtures – Application to the petroleomic analysis of bio-oils. *Analytica Chimica Acta* 969, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.03.022>
- Hinna, A., Steiniger, F., Hupfeld, S., Stein, P., Kuntsche, J., Brandl, M., 2016. Filter-extruded liposomes revisited: a study into size distributions and morphologies in relation to lipid-composition and process parameters. *Journal of Liposome Research* 26, 11–20. <https://doi.org/10.3109/08982104.2015.1022556>
- Ho, C., Lam, C., Chan, M., Cheung, R., Law, L., Lit, L., Ng, K., Suen, M., Tai, H., 2003. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin Biochem Rev* 24, 3–12.
- Hoff, ARNOLD J., 1989. CHAPTER 18 - OPTICALLY-DETECTED MAGNETIC RESONANCE OF TRIPLET STATES, in: Hoff, A. J. (Ed.), *Advanced EPR*. Elsevier, Amsterdam, pp. 633–684. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-88050-5.50023-9>
- Holderbaum, D.F., Kon, T., Kudo, T., Guerra, M.P., 2010. Enzymatic Browning, Polyphenol Oxidase Activity, and Polyphenols in Four Apple Cultivars: Dynamics during Fruit Development. *HortScience* 45, 1150–1154. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.8.1150>
- Hong, V., Wrolstad, R.E., 1990. Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 38, 708–715. <https://doi.org/10.1021/jf00093a026>
- Horn, R.A., Johnson, C.R., 2017. Matrix analysis, Second edition, corrected reprint. ed. Cambridge University Press, New York, NY.
- Huang, S., Czech, M.P., 2007. The GLUT4 Glucose Transporter. *Cell Metabolism* 5, 237–252. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.03.006>
- Jackson, S.D., Hargreaves, J.S.J., 2008. Metal Oxide Catalysis, 2 Volume Set. John Wiley & Sons.
- Jesorka, A., Orwar, O., 2008. Liposomes: Technologies and Analytical Applications. *Annual Review of Analytical Chemistry* 1, 801–832. <https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.112747>
- Jovanović, M., Milosavljević, D., Dragišić Maksimović, J., Maksimović, V., Milivojević, J.M., Djordjevic, A., Brkljacic, J., 2023. Methanol extract of strawberry cultivar “Aprika” increases glucose uptake in 3T3-F442A adipocytes. *Belgrade: Faculty of Chemistry* 131–132.
- Jovanović, M., Teofilović, A., Milosavljević, D., Dragišić Maksimović, J., Maksimović, V., Milivojević, J.M., Djordjević, A., Brkljačić, J., 2024. Strawberry cultivar “Aprika” increases insulin sensitivity in high-fat diet obesity mice model. *Book of abstracts: The 3rd International UNIFood Conference: UNIFood2024 Conference; 2024 Jun 28-29; Belgrade, Serbia* 74.
- Kader, F., Rovel, B., Metche, M., 1993. Role of Invertase in Sugar Content in Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum*, L.). *LWT - Food Science and Technology* 26, 593–595. <https://doi.org/10.1006/fstl.1993.1114>
- Kafkas, E., Koşar, M., Paydaş, S., Kafkas, S., Başer, K.H.C., 2007. Quality characteristics of strawberry genotypes at different maturation stages. *Food Chemistry* 100, 1229–1236. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.005>
- Kajdžanoska, M., Petreska, J., Stefova, M., 2011. Comparison of different extraction solvent mixtures for characterization of phenolic compounds in strawberries. *J Agric Food Chem* 59, 5272–5278. <https://doi.org/10.1021/jf2007826>

- Kalt, W., Forney, C.F., Martin, A., Prior, R.L., 1999. Antioxidant Capacity, Vitamin C, Phenolics, and Anthocyanins after Fresh Storage of Small Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4638–4644. <https://doi.org/10.1021/jf990266t>
- Karaaslan, N.M., Karaaslan, M.G., Ates, B., 2018. Effects of Some Extraction Solvents on the Antioxidant Properties of Strawberry Fruit. *International Journal of Pure and Applied Sciences* 4, 102–109. <https://doi.org/10.29132/ijpas.354885>
- Kosar, M., Kafkas, E., Paydas, S., Baser, K.H.C., 2004a. Phenolic Composition of Strawberry Genotypes at Different Maturation Stages. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1586–1589. <https://doi.org/10.1021/jf035093t>
- Kosar, M., Kafkas, E., Paydas, S., Baser, K.H.C., 2004b. Phenolic Composition of Strawberry Genotypes at Different Maturation Stages. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1586–1589. <https://doi.org/10.1021/jf035093t>
- Kostka, T., Ostberg-Potthoff, J.J., Briviba, K., Matsugo, S., Winterhalter, P., Esatbeyoglu, T., 2020. Pomegranate (*Punica granatum* L.) Extract and Its Anthocyanin and Copigment Fractions—Free Radical Scavenging Activity and Influence on Cellular Oxidative Stress. *Foods* 9, 1617. <https://doi.org/10.3390/foods9111617>
- Kovinich, N., Kanyan, G., Chanoca, A., Otegui, M.S., Grotewold, E., 2015. Abiotic stresses induce different localizations of anthocyanins in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior* 10, e1027850. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1027850>
- Kozłowska, M., Fryder, K., Wolko, B., 2001. Peroxidase involvement in the defense response of red raspberry to *Didymella applanata* (Niessl/Sacc.). *Acta Physiol Plant* 23, 303–310. <https://doi.org/10.1007/s11738-001-0037-6>
- Kraft, J.C., Freeling, J.P., Wang, Ziyao., Ho, R.J.Y., 2014. Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 103, 29–52. <https://doi.org/10.1002/jps.23773>
- Krüger, E., Josuttis, M., Nestby, R., Toldam-Andersen, T.B., Carlen, C., Mezzetti, B., 2012. Influence of growing conditions at different latitudes of Europe on strawberry growth performance, yield and quality. *Journal of Berry Research* 2, 143–157. <https://doi.org/10.3233/JBR-2012-036>
- Kruger, J.E., American Association of Cereal Chemists (Eds.), 1987. Enzymes and their role in cereal technology, AACC monograph series. American Assoc. of Cereal Chemists, St. Paul, Minn.
- Kruger, N.J., 2009. The Bradford Method For Protein Quantitation, in: Walker, J.M. (Ed.), *The Protein Protocols Handbook*, Springer Protocols Handbooks. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 17–24. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_4
- Krzyminiewski, R., Kruczynski, Z., Stepień, A., Dobosz, B., 2009. Spin traps in the detection of free radicals in the blood of patients with ischemia. *Polish Journal of Medical Physics and Engineering* 15, 47–54. <https://doi.org/10.2478/v10013-009-0005-9>
- Kukavica, B.M., Veljović-Jovanović, S.D., Menckhoff, L., Lühje, S., 2012. Cell wall-bound cationic and anionic class III isoperoxidases of pea root: biochemical characterization and function in root growth. *Journal of Experimental Botany* 63, 4631–4645. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers139>
- Kumar, S., Pandey, A.K., 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* 2013, e162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Kytidou, K., Artola, M., Overkleeft, H.S., Aerts, J.M.F.G., 2020. Plant Glycosides and Glycosidases: A Treasure-Trove for Therapeutics. *Frontiers in Plant Science* 11.
- La Barbera, G., Capriotti, A.L., Cavaliere, C., Piovesana, S., Samperi, R., Zenezini Chiozzi, R., Laganà, A., 2017. Comprehensive polyphenol profiling of a strawberry extract (*Fragaria × ananassa*) by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 409, 2127–2142. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0159-8>

- Lai, A., Santangelo, E., Soressi, G.P., Fantoni, R., 2007. Analysis of the main secondary metabolites produced in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) epicarp tissue during fruit ripening using fluorescence techniques. *Postharvest Biology and Technology* 43, 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.09.016>
- Lam, T.B., Kadoya, K., Iiyama, K., 2001. Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and p-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the beta-position, in grass cell walls. *Phytochemistry* 57, 987–992. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(01\)00052-8](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(01)00052-8)
- Lapinski, M.M., Castro-Forero, A., Greiner, A.J., Ofoli, R.Y., Blanchard, G.J., 2007. Comparison of Liposomes Formed by Sonication and Extrusion: Rotational and Translational Diffusion of an Embedded Chromophore. *Langmuir* 23, 11677–11683. <https://doi.org/10.1021/la7020963>
- Lattanzio, V., 2013. Phenolic compounds. *Natural Products* 1543–1580.
- Liszkay, A., Kenk, B., Schopfer, P., 2003. Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta* 217, 658–667. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1028-1>
- Liu, F., Fan, M., Wei, X., Zong, Z., 2017. Application of mass spectrometry in the characterization of chemicals in coal-derived liquids. *Mass Spectrometry Reviews* 36, 543–579. <https://doi.org/10.1002/mas.21504>
- Liu, L., Ji, M., Chen, M., Sun, M., Fu, X., Li, L., Gao, D., Zhu, C., 2016. The flavor and nutritional characteristic of four strawberry varieties cultured in soilless system. *Food Science & Nutrition* 4, 858–868. <https://doi.org/10.1002/fsn3.346>
- Liu, Y., Sun, X., Ouyang, A., 2010. Nondestructive measurement of soluble solid content of navel orange fruit by visible–NIR spectrometric technique with PLSR and PCA-BPNN. *LWT - Food Science and Technology* 43, 602–607. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.10.008>
- Liu, Y., Tikunov, Y., Schouten, R.E., Marcelis, L.F.M., Visser, R.G.F., Bovy, A., 2018. Anthocyanin Biosynthesis and Degradation Mechanisms in Solanaceous Vegetables: A Review. *Frontiers in Chemistry* 6.
- López-Serrano, M., Barceló, A.R., 2001. Histochemical Localization and Developmental Expression of Peroxidase and Polyphenol Oxidase in Strawberries. *JASHS* 126, 27–32. <https://doi.org/10.21273/JASHS.126.1.27>
- López-Serrano, M., Barceló, A.R., 1995. Peroxidase in unripe and processing-ripe strawberries. *Food Chemistry* 52, 157–160. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)P4197-N](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)P4197-N)
- Määttä-Riihinen, K.R., Kamal-Eldin, A., Törrönen, A.R., 2004. Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Berries of *Fragaria* and *Rubus* Species (Family Rosaceae). *J. Agric. Food Chem.* 52, 6178–6187. <https://doi.org/10.1021/jf049450r>
- Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Billot, J., 1990. *Fruit phenolics*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Magwaza, L.S., Opara, U.L., 2015. Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products—A review. *Scientia Horticulturae* 184, 179–192. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.01.001>
- Mahdavi, V., Farimani, M.M., Fathi, F., Ghassempour, A., 2015. A targeted metabolomics approach toward understanding metabolic variations in rice under pesticide stress. *Anal Biochem* 478, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.02.021>
- Maksimović, J.J.D., Živanović, B.D., 2012. Quantification of the Antioxidant Activity in Salt-Stressed Tissues, in: Shabala, S., Cuin, T.A. (Eds.), *Plant Salt Tolerance: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 237–250. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-986-0_16
- Maria Porcu, O., 2018. The Importance of UV-Vis Spectroscopy: Application in Food Products Characterization. *SJFN* 1. <https://doi.org/10.32474/sjfn.2018.01.000111>
- Marshall, A.G., Hendrickson, C.L., Shi, S.D.-H., 2002. Peer Reviewed: Scaling MS Plateaus with High-Resolution FT-ICRMS. *Anal. Chem.* 74, 252 A–259 A. <https://doi.org/10.1021/ac022010j>

- Martínez, M.C., Andriantsitohaina, R., 2009. Reactive Nitrogen Species: Molecular Mechanisms and Potential Significance in Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling* 11, 669–702. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1993>
- Mazza, G., 2017. *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains*. CRC Press, Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/9781351069700>
- McCord, J.M., 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 108, 652–659. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(00\)00412-5](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(00)00412-5)
- Menon, Dr.S., Ramana Rao, T.V., 2012. Enzyme activities during the development and ripening of watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb) Matsum. & Nakai) fruit, *International Journal of Plant Developmental Biology* - 6(1): 21-26., 2012 (USA). *Journal of Plant Developmental Biology* 6, 21–26.
- Meyers, K.J., Watkins, C.B., Pritts, M.P., Liu, R.H., 2003. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *J Agric Food Chem* 51, 6887–6892. <https://doi.org/10.1021/jf034506n>
- Mika, A., Lüthje, S., 2003. Properties of Guaiacol Peroxidase Activities Isolated from Corn Root Plasma Membranes. *Plant Physiology* 132, 1489–1498. <https://doi.org/10.1104/pp.103.020396>
- Mikulic-Petkovsek, M., Schmitzer, V., Slatnar, A., Stampar, F., Veberic, R., 2012. Composition of Sugars, Organic Acids, and Total Phenolics in 25 Wild or Cultivated Berry Species. *Journal of Food Science* 77. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02896.x>
- Milivojevic, J., Radivojevic, D., Milosavljevic, D., Maksimovic, V., Dragisic-Maksimovic, J., 2023. Comparison of field performance and fruit quality among newly released Italian June-bearing strawberry cultivars. *J Agric Sci BGD* 68, 201–215. <https://doi.org/10.2298/JAS2302201M>
- Milivojević, J., Rakonjac, V., Akšić, M.F., Pristov, J.B., Maksimović, V., 2013. Classification and fingerprinting of different berries based on biochemical profiling and antioxidant capacity. *Pesq. agropec. bras.* 48, 1285–1294. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000900013>
- Milivojević, J.M., 2022. Posebno voćarstvo 3 - Jagodaste voćke drugo dopunjeno izdanje, drugo dopunjeno izdanje. ed. Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun; AgroNET-Centar za obrazovanje i istraživanja, Beograd-Zemun.
- Milivojević, J.M., 2018. Posebno voćarstvo 3 - jagodaste voćke - prvo izdanje. ed. Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, Beograd.
- Milosavljević, D., Maksimović, V., Milivojević, J., Dragišić Maksimović, J., 2021. A comparison of major taste- and health-related compounds among newly released Italian strawberry cultivars. *Acta Hort.* 841–848. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1309.120>
- Milosavljević, D.M., Maksimović, V.M., Milivojević, J.M., Nakarada, Đ.J., Mojović, M.D., Dragišić Maksimović, J.J., 2022. Rich in Phenolics—Strong Antioxidant Fruit? Comparative Study of 25 Strawberry Cultivars. *Plants* 11, 3566. <https://doi.org/10.3390/plants11243566>
- Milosavljević, D.M., Mutavdžić, D.R., Radotić, K., Milivojević, J.M., Maksimović, V.M., Dragišić Maksimović, J.J., 2020. Phenolic Profiling of 12 Strawberry Cultivars Using Different Spectroscopic Methods. *J. Agric. Food Chem.* 68, 4346–4354. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07331>
- Mitra, A.K., 2020. Antioxidants: A Masterpiece of Mother Nature to Prevent Illness. *Journal of Chemical Reviews* 2, 243–256. <https://doi.org/10.22034/jcr.2020.112730>
- Moazzen, A., Öztinen, N., Ak-Sakalli, E., Koşar, M., 2022. Structure-antiradical activity relationships of 25 natural antioxidant phenolic compounds from different classes. *Heliyon* 8, e10467. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10467>
- Mojovic, M., Spasojevic, I., Vuletic, M., Vucinic, Z., Bacic, G., 2005. An EPR spin-probe and spin-trap study of the free radicals produced by plant plasma membranes. *J Serb Chem Soc* 70, 177–186. <https://doi.org/10.2298/JSC0502177M>

- Mojović, M., Vuletić, M., Bačić, G.G., 2005. Detection of Oxygen-Centered Radicals Using EPR Spin-Trap DEPMPO: The Effect of Oxygen. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1048, 471–475. <https://doi.org/10.1196/annals.1342.069>
- Mosel, H.-D., Herrmann, K., 1974. The phenolics of fruits: III. The contents of catechins and hydroxycinnamic acids in pome and stone fruits. *Z Lebensm Unters Forch* 154, 6–11. <https://doi.org/10.1007/BF01122886>
- Moseti, D., Regassa, A., Kim, W.-K., 2016. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *IJMS* 17, 124. <https://doi.org/10.3390/ijms17010124>
- Mozafari, M.R., 2010. Nanoliposomes: Preparation and Analysis, in: Weissig, V. (Ed.), *Liposomes: Methods and Protocols*, Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers, *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 29–50. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-360-2_2
- Muthukumaran, S., Tranchant, C., Shi, J., Ye, X., Xue, S.J., 2017. Ellagic acid in strawberry (*Fragaria* spp.): Biological, technological, stability, and human health aspects. *Food Quality and Safety* 1, 227–252. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx023>
- Naczek, F.S., Marian, 2003. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/9780203508732>
- Nakarada, Đ., Marković, S., Popović, M., Dimitrijević, M., Rakić, A., Mojović, M., 2021. Redox properties of grape wine skin extracts from the Šumadija region: An electron paramagnetic resonance study. *Hosp Pharm Int Multi J* 8, 1004–1013. <https://doi.org/10.5937/hpimj2101004N>
- Nakarada, Đ., Milosavljević, D., Milivojević, J., Maksimović, J.D., Mojović, M., 2022. ANTIRADICAL ACTIVITY OF NEW STRAWBERRY CULTIVAR EXTRACTS INCORPORATED INTO LIPOSOMES – AN EPR STUDY. *PHYSICAL CHEMISTRY*.
- Nakarada, Đ., Pejin, B., Tommonaro, G., Mojović, M., 2020. Liposomal integration method for assessing antioxidative activity of water insoluble compounds towards biologically relevant free radicals: example of avarol. *Journal of Liposome Research* 30, 218–226. <https://doi.org/10.1080/08982104.2019.1625378>
- Nebbioso, A., Piccolo, A., 2013. Molecular characterization of dissolved organic matter (DOM): a critical review. *Anal Bioanal Chem* 405, 109–124. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6363-2>
- Nile, S.H., Park, S.W., 2014. Edible berries: bioactive components and their effect on human health. *Nutrition* 30, 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.04.007>
- Ninfa, A.J., Ballou, D.P., Benore, M., 2010. *Fundamental laboratory approaches for biochemistry and biotechnology*, 2. ed. ed. Wiley, Hoboken, NJ.
- Olumee, Z., Callahan, J.H., Vertes, A., 1998. Droplet Dynamics Changes in Electrostatic Sprays of Methanol–Water Mixtures. *J. Phys. Chem. A* 102, 9154–9160. <https://doi.org/10.1021/jp982027z>
- Oluwole, O., Fernando, W., Lumanlan, J., Ademuyiwa, O., Jayasena, V., 2022. Role of phenolic acid, tannins, stilbenes, lignans and flavonoids in human health – a review. *International Journal of Food Science & Technology* 57. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15936>
- Onsa, G.H., bin Saari, N., Selamat, J., Bakar, J., 2004. Purification and characterization of membrane-bound peroxidases from *Metroxylon sagu*. *Food Chemistry* 85, 365–376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.013>
- Ornelas-Paz, J. de J., Yahia, E.M., Ramírez-Bustamante, N., Pérez-Martínez, J.D., Escalante-Minakata, M. del P., Ibarra-Junquera, V., Acosta-Muñiz, C., Guerrero-Prieto, V., Ochoa-Reyes, E., 2013. Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. *Food Chemistry* 138, 372–381. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.006>
- Orzel, J., Daszykowski, M., 2014. A rapid validation of the antioxidant capacity of food commodities based on their fluorescence excitation emission spectra as applicable to coffee

- and peppermint extracts. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 137, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2014.06.014>
- Orzel, J., Stanimirova, I., Czarnik-Matusewicz, B., Daszykowski, M., 2015. Prediction of the hydrophilic antioxidant capacity of tomato pastes from the IR and fluorescence excitation–emission spectra of extracts and intact samples. *Talanta* 138, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.01.026>
- Osorio, C., Carriazo, J.G., Almanza, O., 2011. Antioxidant activity of corozo (*Bactris guineensis*) fruit by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Eur Food Res Technol* 233, 103–108. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1499-4>
- Paciolla, C., Fortunato, S., Dipierro, N., Paradiso, A., De Leonardis, S., Mastropasqua, L., de Pinto, M.C., 2019. Vitamin C in Plants: From Functions to Biofortification. *Antioxidants* (Basel) 8, 519. <https://doi.org/10.3390/antiox8110519>
- Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R., 2016. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci* 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Panico, A.M., Garufi, F., Nitto, S., Di Mauro, R., Longhitano, R.C., Magrì, G., Catalfo, A., Serrentino, M.E., De Guidi, G., 2009. Antioxidant activity and phenolic content of strawberry genotypes from *Fragaria x ananassa*. *Pharmaceutical Biology* 47, 203–208. <https://doi.org/10.1080/13880200802462337>
- Pantelidis, G., Vasilakakis, M., Manganaris, G., Diamantidis, G., 2007. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry* 102, 777–783. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.021>
- Pap, N., Fidelis, M., Azevedo, L., do Carmo, M.A.V., Wang, D., Mocan, A., Pereira, E.P.R., Xavier-Santos, D., Sant’Ana, A.S., Yang, B., Granato, D., 2021. Berry polyphenols and human health: evidence of antioxidant, anti-inflammatory, microbiota modulation, and cell-protecting effects. *Current Opinion in Food Science* 42, 167–186. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.06.003>
- Paquette, M., Medina Larqué, A.S., Weisnagel, S.J., Desjardins, Y., Marois, J., Pilon, G., Dudonné, S., Marette, A., Jacques, H., 2017. Strawberry and cranberry polyphenols improve insulin sensitivity in insulin-resistant, non-diabetic adults: a parallel, double-blind, controlled and randomised clinical trial. *Br J Nutr* 117, 519–531. <https://doi.org/10.1017/S0007114517000393>
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., Dunand, C., 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep* 24, 255–265. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0972-6>
- Passardi, F., Penel, C., Dunand, C., 2004. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science* 9, 534–540. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.09.002>
- Passardi, F., Tognolli, M., De Meyer, M., Penel, C., Dunand, C., 2006. Two cell wall associated peroxidases from *Arabidopsis* influence root elongation. *Planta* 223, 965–974. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0153-4>
- Patras, A., Brunton, N.P., Da Pieve, S., Butler, F., 2009. Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 10, 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.12.004>
- Pelayo-Zaldívar, C., Ebeler, S.E., Kader, A.A., 2005. CULTIVAR AND HARVEST DATE EFFECTS ON FLAVOR AND OTHER QUALITY ATTRIBUTES OF CALIFORNIA STRAWBERRIES. *Journal of Food Quality* 28, 78–97. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2005.00005.x>
- Perez, C.J., Bagga, A.K., Prova, S.S., Yousefi Taemeh, M., Ifa, D.R., 2019. Review and perspectives on the applications of mass spectrometry imaging under ambient conditions. *Rapid Comm Mass Spectrometry* 33, 27–53. <https://doi.org/10.1002/rcm.8145>

- Pervaiz, T., Songtao, J., Faghihi, F., Haider, M.S., Fang, J., 2017. Naturally Occurring Anthocyanin, Structure, Functions and Biosynthetic Pathway in Fruit Plants. *J Plant Biochem Physiol* 05. <https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000187>
- Peter Constabel, C., Yoshida, K., Walker, V., 2014. Diverse Ecological Roles of Plant Tannins: Plant Defense and Beyond, in: *Recent Advances in Polyphenol Research*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 115–142. <https://doi.org/10.1002/9781118329634.ch5>
- Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C., 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci* 4, 89–96.
- Phelps, C. f., 1977. Dynamic light scattering, with application to chemistry, biology and physics: B. J. Berne & R. Pecora. Pp. 376. John Wiley 1976. £14.00 or \$27.00. *Biochemical Education* 5, 22–22. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(77\)90025-5](https://doi.org/10.1016/0307-4412(77)90025-5)
- Picard, F., Kurtev, M., Chung, N., Topark-Ngarm, A., Senawong, T., Machado De Oliveira, R., Leid, M., McBurney, M.W., Guarente, L., 2004. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ . *Nature* 429, 771–776. <https://doi.org/10.1038/nature02583>
- Pineli, L. de L. de O., Moretti, C.L., dos Santos, M.S., Campos, A.B., Brasileiro, A.V., Córdova, A.C., Chiarello, M.D., 2011. Antioxidants and other chemical and physical characteristics of two strawberry cultivars at different ripeness stages. *Journal of Food Composition and Analysis* 24, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.05.004>
- Pirker, K.F., Goodman, B.A., Pascual, E.C., Kiefer, S., Soja, G., Reichenauer, T.G., 2002. Free radicals in the fruit of three strawberry cultivars exposed to drought stress in the field. *Plant Physiology and Biochemistry, Free radicals and oxidative stress in plants: A new insight* 40, 709–717. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01412-2](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01412-2)
- Poulsen, H.E., Prieme, H., Loft, S., 1998. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *Eur J Cancer Prev* 7, 9–16.
- Pozniak, B.P., Cole, R.B., 2007. Current measurements within the electrospray emitter. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18, 737–748. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2006.11.012>
- Puhl, I., Treutter, D., 2008. Ontogenetic variation of catechin biosynthesis as basis for infection and quiescence of *Botrytis cinerea* in developing strawberry fruits. *J Plant Dis Prot* 115, 247–251. <https://doi.org/10.1007/BF03356272>
- Qin, L., Zhang, Y., Liu, Y., He, H., Han, M., Li, Y., Zeng, M., Wang, X., 2018. Recent advances in matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) for *in situ* analysis of endogenous molecules in plants. *Phytochemical Analysis* 29, 351–364. <https://doi.org/10.1002/pca.2759>
- Radulescu, C., Buruleanu, L.C., Georgescu, A.A., Dulama, I.D., Radulescu, C., Buruleanu, L.C., Georgescu, A.A., Dulama, I.D., 2019. Correlation between Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidants in Several Edible Mushrooms Species, in: *Food Engineering*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82578>
- Rasmussen, H.T., Li, W., Redlich, D., Ilias Jimidar, M., 2005. 6 HPLC method development, in: *Separation Science and Technology*. Elsevier, pp. 145–190. [https://doi.org/10.1016/S0149-6395\(05\)80050-9](https://doi.org/10.1016/S0149-6395(05)80050-9)
- Rauter, A.P., Lopes, R.G., Martins, A., 2008. ChemInform Abstract: C-Glycosylflavonoids: Identification, Bioactivity and Synthesis. *ChemInform* 39. <https://doi.org/10.1002/chin.200842261>
- Reuhs, B.L., 2017. High-Performance Liquid Chromatography, in: Nielsen, S.S. (Ed.), *Food Analysis, Food Science Text Series*. Springer International Publishing, Cham, pp. 213–226. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_13
- Rice-Evans, C., Diplock, A.T., Symons, M.C.R., 1991. *Techniques in free radical research, Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Elsevier, Amsterdam.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20, 933–956. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)

- Ríos, J.-L., Giner, R.M., Marín, M., Recio, M.C., 2018. A Pharmacological Update of Ellagic Acid. *Planta Med* 84, 1068–1093. <https://doi.org/10.1055/a-0633-9492>
- Rivas-Ubach, A., Liu, Y., Bianchi, T.S., Tolić, N., Jansson, C., Paša-Tolić, L., 2018. Moving beyond the van Krevelen Diagram: A New Stoichiometric Approach for Compound Classification in Organisms. *Anal. Chem.* 90, 6152–6160. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00529>
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W., 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* 66, 401–436. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00093-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00093-X)
- Rocha, A.M.C.N., Morais, A.M.M.B., 2001. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from ‘Jonagored’ apple. *Food Control* 12, 85–90. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(00\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(00)00026-8)
- Romeyer, F.M., Macheix, J.J., Goiffon, J.J., Reminiac, C.C., Sapis, J.C., 1983. Browning capacity of grapes. 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. *J. Agric. Food Chem.* 31, 346–349. <https://doi.org/10.1021/jf00116a040>
- Rosen, G.M., Finkelstein, E., 1985. Use of spin traps in biological systems. *Advances in Free Radical Biology & Medicine* 1, 345–375. [https://doi.org/10.1016/8755-9668\(85\)90012-2](https://doi.org/10.1016/8755-9668(85)90012-2)
- Roth, V.-N., Dittmar, T., Gaupp, R., Gleixner, G., 2015. The Molecular Composition of Dissolved Organic Matter in Forest Soils as a Function of pH and Temperature. *PLOS ONE* 10, e0119188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119188>
- Rubico, S.M., McDaniel, M.R., 1992. Sensory evaluation of acids by free-choice profiling. *Chemical Senses* 17, 273–289. <https://doi.org/10.1093/chemse/17.3.273>
- Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., Yamasaki, H., 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177, 67–80. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00196-8](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00196-8)
- Šamec, D., Karalića, E., Šola, I., Vujčić Bok, V., Salopek-Sondi, B., 2021. The Role of Polyphenols in Abiotic Stress Response: The Influence of Molecular Structure. *Plants* 10, 118. <https://doi.org/10.3390/plants10010118>
- Savić, A.G., Mojović, M., 2012. Free Radicals Identification from the Complex EPR Signals by Applying Higher Order Statistics. *Anal. Chem.* 84, 3398–3402. <https://doi.org/10.1021/ac300200y>
- Scalzo, J., Politi, A., Pellegrini, N., Mezzetti, B., Battino, M., 2005. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition* 21, 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2004.03.025>
- Seeram, N.P., Lee, R., Scheuller, H.S., Heber, D., 2006. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. *Food Chemistry* 97, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.047>
- Shalaby, E., Shanab, S., 2013. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Marine Sciences* 42, 556–564.
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., Zheng, B., 2019a. Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules* 24, 2452. <https://doi.org/10.3390/molecules24132452>
- Sharma, A., Thakur, S., Kumar, V., Kanwar, M.K., Kesavan, A.K., Thukral, A.K., Bhardwaj, R., Alam, P., Ahmad, P., 2016. Pre-sowing Seed Treatment with 24-Epibrassinolide Ameliorates Pesticide Stress in *Brassica juncea* L. through the Modulation of Stress Markers. *Frontiers in Plant Science* 7.
- Sharma, A., Yuan, H., Kumar, V., Ramakrishnan, M., Kohli, S.K., Kaur, R., Thukral, A.K., Bhardwaj, R., Zheng, B., 2019b. Castasterone attenuates insecticide induced phytotoxicity in mustard. *Ecotoxicol Environ Saf* 179, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.120>

- Shen, J., Zhang, D., Zhou, L., Zhang, X., Liao, J., Duan, Y., Wen, B., Ma, Y., Wang, Y., Fang, W., Zhu, X., 2019. Transcriptomic and metabolomic profiling of *Camellia sinensis* L. cv. 'Suchazao' exposed to temperature stresses reveals modification in protein synthesis and photosynthetic and anthocyanin biosynthetic pathways. *Tree Physiology* 39, 1583–1599. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpz059>
- Shirley, B.W., 1996. Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. *Trends in Plant Science* 1, 377–382. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(96\)80312-8](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(96)80312-8)
- Sies, H., 1985. Oxidative Stress: Introductory Remarks, in: *Oxidative Stress*. Elsevier, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-642760-8.50005-3>
- Sies, H., Berndt, C., Jones, D.P., 2017. Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry* 86, 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
- Sikorska, E., Nowak, P., Pawlak-Lemańska, K., Sikorski, M., 2022. Characterization and Classification of Direct and Commercial Strawberry Beverages Using Absorbance–Transmission and Fluorescence Excitation–Emission Matrix Technique. *Foods* 11, 2143. <https://doi.org/10.3390/foods11142143>
- Sikorska, E., Włodarska, K., Khmelinskii, I., 2020. Application of multidimensional and conventional fluorescence techniques for classification of beverages originating from various berry fruit. *Methods Appl. Fluoresc.* 8, 015006. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab6367>
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic.* 16, 144–158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocchio, E., Trombetta, D., 2017. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *Br J Pharmacol* 174, 1244–1262. <https://doi.org/10.1111/bph.13630>
- Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocchio, E., Trombetta, D., 2016. Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins. *Phytotherapy Research* 30, 1265–1286. <https://doi.org/10.1002/ptr.5642>
- Šojić Merkulov, D., Abramović, B., Armaković, S., Finčur, N., 2021. HROMATOGRAFSKE metode analize. Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Novi Sad.
- Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Näslund, E., Britton, T., Concha, H., Hassan, M., Rydén, M., Frisén, J., Arner, P., 2008. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453, 783–787. <https://doi.org/10.1038/nature06902>
- Su, J., Liu, Y., Han, F., Gao, F., Gan, F., Huang, K., Li, Z., 2024. ROS, an Important Plant Growth Regulator in Root Growth and Development: Functional Genes and Mechanism. *Biology* 13, 1033. <https://doi.org/10.3390/biology13121033>
- Sun, J., Chu, Y.-F., Wu, X., Liu, R.H., 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem* 50, 7449–7454. <https://doi.org/10.1021/jf0207530>
- Symonds, M.E., Pope, M., Budge, H., 2012. Adipose tissue development during early life: novel insights into energy balance from small and large mammals. *Proc. Nutr. Soc.* 71, 363–370. <https://doi.org/10.1017/S0029665112000584>
- Tahara, S., 2007. A Journey of Twenty-Five Years through the Ecological Biochemistry of Flavonoids. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71, 1387–1404. <https://doi.org/10.1271/bbb.70028>
- Takahama, U., 2004. Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: Physiological significance of the oxidation reactions. *Phytochemistry Reviews* 3, 207–219. <https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000047805.08470.e3>
- Talhaoui, N., Gómez-Caravaca, A.M., León, L., De la Rosa, R., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2014. Determination of phenolic compounds of 'Sikitita' olive leaves by

- HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents ‘Arbequina’ and ‘Picual’ olive leaves. *LWT - Food Science and Technology* 58, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.014>
- Thomas, S., Thomas, R., Zachariah, A.K., Mishra, R.K. (Eds.), 2017. Thermal and rheological measurement techniques for nanomaterials characterization, *Micro and Nano Technologies*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands ; Cambridge, MA.
- Tirzitis, G., Bartosz, G., 2010. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochim Pol* 57, 139–142.
- Tomás-Barberán, F.A., González-Sarriás, A., García-Villalba, R. (Eds.), 2020. Dietary Polyphenols: Their Metabolism and Health Effects, 1st ed. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119563754>
- Tomić, J., Pešaković, M., Karaklajić-Stajić, Ž., Paunović, S.M., Milinković, M., Rilak, B., 2021. Quality assessment of strawberry cultivars grown in western Serbia. *Acta Hort.* 955–962. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1309.136>
- Tomić, J., Pešaković, M., Milivojević, J., Karaklajić-Stajić, Ž., 2018. How to improve strawberry productivity, nutrients composition, and beneficial rhizosphere microflora by biofertilization and mineral fertilization? *Journal of Plant Nutrition* 41, 2009–2021. <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1482912>
- Trivittayasil, V., Kameya, H., Shoji, T., Tsuta, M., Kokawa, M., Sugiyama, J., 2017. Simultaneous estimation of scavenging capacities of peach extract for multiple reactive oxygen species by fluorescence fingerprint method. *Food Chem* 232, 523–530. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.011>
- Tulipani, S., Mezzetti, B., Capocasa, F., Bompadre, S., Beekwilder, J., de Vos, C.H.R., Capanoglu, E., Bovy, A., Battino, M., 2008. Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes. *J Agric Food Chem* 56, 696–704. <https://doi.org/10.1021/jf0719959>
- Uhumwangho, M., Okor, R., 2009. Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: a review. *Journal of Medicine and Biomedical Research* 4. <https://doi.org/10.4314/jmbr.v4i1.10663>
- Urün, I., Attar, S.H., Sönmez, D.A., Gündeşli, M.A., Ercişli, S., Kafkas, N.E., Bandić, L.M., Duralija, B., 2021. Comparison of Polyphenol, Sugar, Organic Acid, Volatile Compounds, and Antioxidant Capacity of Commercially Grown Strawberry Cultivars in Turkey. *Plants* 10, 1654. <https://doi.org/10.3390/plants10081654>
- Van Delm, T., Melis, P., Stoffels, K., Baets, W., 2016. The effect of long-day treatment on runners and inflorescences on everbearing strawberry cultivar ‘Capri.’ *Acta Hort.* 285–290. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1117.46>
- Van Den Ende, W., El-Esawe, S.K., 2014. Sucrose signaling pathways leading to fructan and anthocyanin accumulation: A dual function in abiotic and biotic stress responses? *Environmental and Experimental Botany* 108, 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.017>
- Vaughn, K.C., Duke, S.O., 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiologia Plantarum* 60, 106–112. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1984.tb04258.x>
- Veljović Jovanović, S., Kukavica, B., Vidović, M., Morina, F., Menckhoff, L., 2018. Class III Peroxidases: Functions, Localization and Redox Regulation of Isoenzymes, in: Gupta, D.K., Palma, J.M., Corpas, F.J. (Eds.), *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*. Springer International Publishing, Cham, pp. 269–300. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75088-0_13
- Vennat, B., Bos, M., Pourrat, A., Bastide, P., 1994. Procyanidins from Tormentil : Fractionation and Study of the Anti-radical Activity towards Superoxide Anion. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 17, 1613–1615. <https://doi.org/10.1248/bpb.17.1613>
- Villamena, F.A., 2016. Reactive species detection in biology: from fluorescence to electron paramagnetic resonance spectroscopy. Elsevier, Amsterdam.
- Viollet, B., 2009. Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front Biosci* Volume, 3380. <https://doi.org/10.2741/3460>

- Vollaard, N.B.J., Shearman, J.P., Cooper, C.E., 2005. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Med* 35, 1045–1062. <https://doi.org/10.2165/00007256-200535120-00004>
- Wang, H., Cao, G., Prior, R.L., 1997. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 45, 304–309. <https://doi.org/10.1021/jf960421t>
- Wang, H., Cao, G., Prior, R.L., 1996. Total Antioxidant Capacity of Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 44, 701–705. <https://doi.org/10.1021/jf950579y>
- Wang, J., Yang, E., Chaurand, P., Raghavan, V., 2021. Visualizing the distribution of strawberry plant metabolites at different maturity stages by MALDI-TOF imaging mass spectrometry. *Food Chemistry* 345, 128838. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128838>
- Wang, L., Shan, T., Xie, B., Ling, C., Shao, S., Jin, P., Zheng, Y., 2019. Glycine betaine reduces chilling injury in peach fruit by enhancing phenolic and sugar metabolisms. *Food Chem* 272, 530–538. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.085>
- Waterhouse, A.L., 2002. Determination of Total Phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* 6, I1.1.1–I1.1.8. <https://doi.org/10.1002/0471142913.fai0101s06>
- Weil, J.A., Bolton, J.R., 2007. *Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications*, 2nd ed. ed. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J.
- Welinder, K.G., Justesen, A.F., Kjærsgård, I.V.H., Jensen, R.B., Rasmussen, S.K., Jespersen, H.M., Duroux, L., 2002. Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry* 269, 6063–6081. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03311.x>
- Wen, L., Jiang, Y., Yang, J., Zhao, Y., Tian, M., Yang, B., 2017. Structure, bioactivity, and synthesis of methylated flavonoids. *Ann N Y Acad Sci* 1398, 120–129. <https://doi.org/10.1111/nyas.13350>
- Wesche-Ebeling, P., Montgomery, M.W., 1990. Strawberry Polyphenoloxidase: Purification and Characterization. *Journal of Food Science* 55, 1315–1319. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb03924.x>
- Williamson, G., Plumb, G.W., Garcia-Conesa, M.T., 1999. Glycosylation, Esterification, and Polymerization of Flavonoids and Hydroxycinnamates: Effects on Antioxidant Properties, in: Gross, G.G., Hemingway, R.W., Yoshida, T., Branham, S.J. (Eds.), *Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology, Basic Life Sciences*. Springer US, Boston, MA, pp. 483–494. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4139-4_26
- Williner, M.R., Pirovani, M.E., Güemes, D.R., 2003. Ellagic acid content in strawberries of different cultivars and ripening stages. *J Sci Food Agric* 83, 842–845. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1422>
- Wink, P.D.M., 1989. Cellular and Subcellular Localization of Peroxidase Isoenzymes in Plants and Cell Suspension Cultures from *Lupinus polyphyllus*. *Zeitschrift für Naturforschung C*.
- Winograd, N., 2015. Imaging Mass Spectrometry on the Nanoscale with Cluster Ion Beams. *Anal. Chem.* 87, 328–333. <https://doi.org/10.1021/ac503650p>
- Włodarska, K., Pawlak-Lemańska, K., Khmelinskii, I., Sikorska, E., 2016. Explorative study of apple juice fluorescence in relation to antioxidant properties. *Food Chem* 210, 593–599. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.007>
- Wongkhot, A., Rattanapanone, N., Chanasut, U., 2012. BrimA, Total Acidity and Total Soluble Solids Correlate to Total Carotenoid Content as Indicators of the Ripening Process of Six Thai Mango Fruit Cultivars 11.
- Wulf, J.S., Rühmann, S., Rego, I., Puhl, I., Treutter, D., Zude, M., 2008. Nondestructive application of laser-induced fluorescence spectroscopy for quantitative analyses of phenolic compounds in strawberry fruits (*Fragaria x ananassa*). *J Agric Food Chem* 56, 2875–2882. <https://doi.org/10.1021/jf072495i>
- Xu, W., Luo, Y., Yin, J., Huang, M., Luo, F., 2023. Targeting AMPK signaling by polyphenols: a novel strategy for tackling aging. *Food Funct.* 14, 56–73. <https://doi.org/10.1039/D2FO02688K>

- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Matsumoto, H., 2001. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiol* 125, 199–208. <https://doi.org/10.1104/pp.125.1.199>
- Yoshida, Y., Tamura, H., 2005. Variation in Concentration and Composition of Anthocyanins among Strawberry Cultivars. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 74, 36–41. <https://doi.org/10.2503/jjshs.74.36>
- Yoshimura, Y., Zaima, N., 2020. Application of Mass Spectrometry Imaging for Visualizing Food Components. *Foods* 9, 575. <https://doi.org/10.3390/foods9050575>
- Yu, B.P., 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74, 139–162. <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.1.139>
- Zhao, L., Zou, T., Gomez, N.A., Wang, B., Zhu, M.-J., Du, M., 2018. Raspberry alleviates obesity-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) α 1. *Nutr & Diabetes* 8, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41387-018-0049-6>
- Zheng, Y., Wang, S.Y., Wang, C.Y., Zheng, W., 2007. Changes in strawberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity in response to high oxygen treatments. *LWT* 40, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.08.013>
- Zhou, P., Li, Q., Liu, G., Xu, N., Yang, Y., Zeng, W., Chen, A., Wang, S., 2018. Integrated analysis of transcriptomic and metabolomic data reveals critical metabolic pathways involved in polyphenol biosynthesis in *Nicotiana tabacum* under chilling stress. *Funct Plant Biol* 46, 30–43. <https://doi.org/10.1071/FP18099>
- Zhu, D., Ji, B., Eum, H.L., Zude, M., 2009. Evaluation of the non-enzymatic browning in thermally processed apple juice by front-face fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry* 113, 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.009>
- Zhu, Q., Qian, Y., Zheng, Z.-P., Lo, C., Chen, F., Wang, M., 2013. Natural polyphenols alleviated lipid peroxidation-induced modification on BSA. *Journal of Functional Foods* 5, 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.11.006>

7 БИОГРАФИЈА

Драгица Милосављевић завршила је 2006. године средњу школу за фармацеутског техничара као ђак генерације.

Дипломирала је на интегрисаним академским студијама на Фармацеутском факултету, Универзитета у Београду 2014. године и стекла звање магистар фармације-медицински биохемичар.

У септембру 2015. године била је учесник Школе хроматографије и масене спектрометрије у Истраживачкој станици Петница.

Докторске студије уписала је 2016. године на Факултету за физичку хемију, Универзитета у Београду. Докторска дисертација вођена је под менторством др Милоша Мојовића, редовног професора Факултета за физичку хемију и др Јелене Драгишић Максимовић, научног саветника, Института за мултидисциплинарна истраживања.

У новембру 2021. године дипломирала је на Интегрисаним академским студијама-Фармација на Фармацеутском факултету, Нови Сад и стекла звање магистар фармације.

На институту за мултидисциплинарна истраживања усавршавала се од 2016. године. Од децембра 2018. године запослена је на одсеку Наука о живим системима, Института за мултидисциплинарна истраживања, Универзитета у Београду.

У свом досадашњем научном раду бавила се проучавањем биохемијске и биофизичке карактеризације биоактивних компоненти јагодастог воћа применом различитих хроматографских и спектроскопских метода. Први аутор је на три рада који су објављени у часописима са међународном рецензијом, од којих је један публикован у међународном часопису изузетних вредности (M21a) са импакт фактором 5.279, а два рада су публикована у врхунским међународним часописима (M21). Коаутор је на још неколико радова који су објављени у часописима са међународном рецензијом. Била је учесник на више међународних и домаћих конференција.

7.1 НАУЧНИ РАДОВИ У КОЈИМА СУ ПУБЛИКОВАНИ РЕЗУЛТАТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Категорија M21a, рад у међународном часопису изузетних вредности:

Milosavljević, Dragica., Mutavdžić, Dragosav., Radotić, Ksenija., Milivojević, Jasminka., Maksimović, Vuk., Dragišić Maksimović, Jelena. 2020. Phenolic profiling of 12 strawberry cultivars using different spectroscopic methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 68 (15): 4346-4354

(<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07331>)

IF2020: 5.279; Multidisciplinary 5/58

Категорија M21, рад у врхунском међународном часопису:

Milosavljević Dragica, Maksimović Vuk, Milivojević Jasminka, Nakarada Đura, Mojović Miloš, Dragišić Maksimović Jelena. 2022. Rich in Phenolics—Strong Antioxidant Fruit? Comparative Study of 25 Strawberry Cultivars. Plants. 11, 3566

(<https://doi.org/10.3390/plants11243566>)

IF 2022: 4.8; Plant Sciences 43/239

Milosavljević Dragica, Maksimovic Vuk, Milivojevic Jasminka, Djekic Ilija, Wolf Bianca, Zuber Jan, Vogt Carla, Dragisic-Maksimovic Jelena. (2023). Sugars and Organic Acids in 25 Strawberry Cultivars: Qualitative and Quantitative Evaluation. Plants, 12(12), 2238–2238.

(<https://doi.org/10.3390/plants12122238>)

IF 2022: 4.8; Plant Sciences 43/239

Категорија M24, рад у националном часопису међународног значаја:

Milivojević Jasminka, Radivojević Dragan, **Milosavljević Dragica**, Maksimović Vuk, Dragišić Maksimović Jelena. (2023) Comparison of field performance and fruit quality among newly released Italian June-bearing strawberry cultivars. Journal of Agricultural Sciences 68: 201-215.

8 ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Потписани-а Драгица Милосављевић

број индекса 316/2016

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Примена хроматографских и спектроскопских метода за анализу антиоксидативних компоненти у плодовима 25 сорти јагода (*Fragaria spp.*)

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда



У Београду, 09.05.2025

8.1 ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДА

Име и презиме аутора Драгица Милосављевић

Број индекса 316/2016

Студијски програм Докторске академске студије-Физичка хемија

Наслов рада Примена хроматографских и спектроскопских метода за анализу антиоксидативних компоненти у плодовима 25 сорти јагода (*Fragaria spp.*)

Ментор др Милош Мојовић, редовни професор,
Универзитет у Београду, Факултет за физичку хемију

др Јелена Драгишић Максимовић, научни саветник,
Универзитет у Београду, Институт за мултидисциплинарна истраживања

Потписани/а Драгица Милосављевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 09.05.2025

Потпис докторанда



8.2 ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Примена хроматографских и спектроскопских метода за анализу антиоксидативних компоненти у плодовима 25 сорти јагода (*Fragaria spp.*)

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- ☒ 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 09.05.2025

Потпис докторанда



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.