

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET



Đurđa D. Krstić

METABOLOMIČKA PROCENA AUTENTIČNOSTI SEMENA SAMONIKLOG I GAJENOG VOĆA

Doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY



Đurđa D.Krstić

METABOLOMIC AUTHENTICITY ASSESMENT OF WILD AND CULTIVATED FRUIT SEEDS

Doctoral dissertation

Belgrade, 2023

Mentor:

dr Jelena Trifković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

Članovi komisije:

dr Dušanka Milojković-Opsenica, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Milica Fotirić-Akšić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane:

U Beogradu, _____ 2023.

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za analitičku hemiju Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta, pod mentorstvom dr Jelene Trifković, vanrednog profesora Univerziteta Beogradu - Hemijskog fakulteta. Ovom prilikom joj se najiskrenije zahvaljujem na ukazanoj prilici, poverenju, strpljenju i razumevanju, kao i na nesebičnoj pomoći i zalaganju u svim fazama izrade i pisanja ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Dušanki Milojković-Opsenici, redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta, na ukazanom poverenju, kao i na stručnoj pomoći, korisnim savetima i sugestijama tokom izrade i pisanja ove doktorske disertacije, kao i tokom celokupnog rada.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Milici Fotirić-Akšić, vanrednom profesoru Univerziteta u Beogradu – Poljoprivrednog fakulteta, na lepoj saradnji tokom svih ovih godina i korisnim savetima koji su doprineli kvalitetu ove doktorske disertacije, kao i na nesebičnom prenošenju znanja iz oblasti voćarstva.

Veliko hvala svim dragim kolegama sa Katedre za analitičku hemiju na nesebičnoj podršci, pomoći i saradnji tokom svih ovih godina, a posebno na lepom druženju i iskrenom prijateljstvu.

Veliku zahvalnost dugujem kolegama sa Poljoprivrednog fakulteta prof. dr Mirjani Pešić, prof. dr Aleksandru Kostiću i Danijelu Milinčiću, na divnoj saradnji i druženju, kao i na nesebičnoj pomoći tokom izrade same doktorske disertacije.

Hvala mojim prijateljima Tijani, Kaći i Darku što su mi ulepšali studiranje i život, što su uvek bili tu i imali razumevanje i prave reči kad je teško.

Veliko hvala mom Stefanu, što je verovao u mene, bio mi oslonac i podrška tokom svih ovih godina.

Na kraju, želela bih da se zahvalim svojoj porodici na безусловnoj podršci, ljubavi i razumevanju, koje mi pružate svakog dana. Beskrajno hvala što ste krčili teške puteve, da bi moji koraci njima bili sigurni i neopterećeni.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem mojim roditeljima.

METABOLOMIČKA PROCENA AUTENTIČNOSTI SEMENA SAMONIKLOG I GAJENOG VOĆA

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije jeste ispitivanje fitohemijskog profila semena samoniklog i gajenog voća u cilju pronalaženja pouzdanih markera za njihovo razlikovanje, kao i definisanje njihovog biljnog porekla, ali i pronalaženje sorti odnosno genotipova sa najvišim sadržajem fitohemikalija.

Razvijene su nove i optimizovane postojeće savremene instrumentalne metode za određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava semena samoniklog i gajenog voća karakterističnog za područje Srbije (kupine, maline, jagode, ogrozda, aronije, borovnice, ribizle i godžija). Ciljanom analizom su izolovani i kvantitativno određeni šećeri, masne kiseline, metali i fenolna jedinjenja od interesa, dok je metaboličkom analizom „otiska prsta” lipida, masnih kiselina, fenola i proteina dobijen celokupan profil uzoraka, kao njihova jedinstvena karakteristika. Spektrofotometrijski je određen sadržaj ukupnih polifenola i sadržaj rastvorljivih proteina.

Rezultati su ukazali na prednost primene metaboličkog otiska prsta u proceni autentičnosti složenih metaboloma kakav je biljni materijal, u odnosu na ciljanu analizu ograničenog broja unapred definisanih jedinjenja. Definisani su šećeri, lipidi, masne kiseline, fenoli, proteini i elementi kao markeri biljnog porekla, koji su omogućili klasifikaciju uzoraka. Primenom naprednih hemometrijskih metoda je hemijski profil uzoraka semena voća iskorišćen za konstruisanje matematičkih modela koji bi se mogli koristiti za predviđanje porekla novih uzoraka na osnovu fitohemijskog sastava. Takođe, poznavanje kompletnog sastava metabolita dobijenog u ovoj studiji može pružiti bolju procenu genotipskih i fenotipskih razlika među vrstama i sortama voća, i može doprineti razvoju novih sorti sa željenim karakteristikama.

Ključne reči: HPTLC, LC-MS, GC-MS, HPAEC-PAD, ICP-OES/MS, SDS-PAGE, metabolički otisak prsta, ciljana analiza, multivarijantna analiza

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Analitička hemija

METABOLOMIC AUTHENTICITY ASSESMENT OF WILD AND CULTIVATED FRUIT SEEDS

The subject of this doctoral dissertation was to evaluate the phytochemical profile of wild and cultivated fruit seeds in order to find reliable markers for their differentiation, as well as to define their botanical origin, but also to find varieties or genotypes with the highest content of phytochemicals.

This work included the optimisation of existing and development of new modern instrumental methods for determination of the qualitative and quantitative composition of wild and cultivated fruit seeds, characteristic for different regions of Serbia (blackberry, raspberry, strawberry, gooseberry, chokeberry, blueberry, currant and goji berry). Content of sugars, fatty acids, metals and phenolic compounds of interest was determined using targeted approach, while the metabolic fingerprint analysis of lipids, fatty acids, phenols and proteins was used to get comprehensive profile of the samples, as their unique characteristics. The content of total phenolics and the content of soluble proteins were determined spectrophotometrically.

The results indicated that metabolic fingerprinting is a better approach for authenticity assessment of the complex natural matrix, compared to the targeted analysis of a limited number of pre-defined compounds. Sugars, fatty acids, phenols, proteins and elements were defined as markers of botanical origin, which enabled the classification of the samples. Obtained mathematical models indicated the ability to accurately predict the botanical origin of the samples and these models could be used in further classification of unknown samples. Complete knowledge of the chemical composition of fruit seeds can provide a better assessment of genotypic and phenotypic differences among fruit species and varieties, and can contribute to the selection of new varieties with desired characteristics.

Keywords: HPTLC, LC-MS, GC-MS, HPAEC-PAD, ICP-OES/MS, SDS-PAGE, metabolic fingerprinting, targeted analysis, multivariate analysis.

Scientific area: Chemistry

Field of Academic Expertise: Analytical Chemistry

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	2
2.1 Metabolomički pristup u proceni autentičnosti	2
2.2 Analitičke metode korišćene u metabolomičkoj studiji semena voća.....	3
2.2.1 Hromatografske tehnike	3
2.2.1.1 Visokoeфикасна tankoslojna hromatografija	4
2.2.1.2 Ultraefikasna tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom	4
2.2.1.3 Visokoeфикасна jonska hromatografija.....	5
2.2.1.4 Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom.....	6
2.2.2 Gel-elektroforeza	7
2.2.3 Ultraljubičasta/vidljiva spektrofotometrija	7
2.2.4 Indukovano spregnuta plazma sa optičkom emisionom spektroskopijom (ICP-OES) i sa masenom spektrometrijom (ICP-MS).....	8
2.3 Statistička obrada podataka	9
2.3.1 Kruskal-Valisov test.....	10
2.3.2 Analiza glavnih komponenata	10
2.3.3 Regresija metodom delimičnih najmanjih kvadrata sa diskriminantnim pristupom	11
2.3.4 Priprema slika hromatograma i elektroforegrama za hemometrijsku analizu.....	12
2.4 Gajeno i samoniklo voće	13
2.5 Morfologija, značaj i primena semena gajenog i samoniklog voća u metabolomičkoj studiji procene autentičnosti	14
2.6 Hemijski profil semena voća	15
2.6.1 Lipidi	16
2.6.2 Masne kiseline	17
2.6.3 Šećeri.....	18

2.6.4	Proteini	19
2.6.5	Fenolna jedinjenja.....	20
2.6.6	Elementalni sastav	21
3.	EKSPERIMENTALNI DEO	23
3.1	Uzorci semena voća	23
3.2	Hemikalije i materijali.....	26
3.3	Metode ekstrakcije fitohemikalija iz semena voća	28
3.4	Hemijska karakterizacija semena gajenog i samoniklog voća	29
3.4.1	Lipidni profil semena voća dobijen primenom visokoeфикаsne tankoslojne hromatografije	29
3.4.2	Profil masnih kiselina dobijen primenom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS).....	30
3.4.3	Analiza profila šećera primenom visokoeфикаsne jonske hromatografije	31
3.4.4	Određivanje sadržaja proteina i elektroforetski proteinski profil semena voća	32
3.4.4.1	Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja rastvorljivih proteina Bradfordovom metodom.....	32
3.4.4.2	Gel elektroforeza (SDS-PAGE).....	33
3.4.5	Određivanje polifenolnog profila uzoraka semena samoniklog i gajenog voća.....	33
3.4.5.1	Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih polifenola.....	33
3.4.5.2	HPTLC fenolni profil.....	34
3.4.5.3	Identifikacija fenolnih jedinjenja primenom masena spektrometrije UPLC-LTQ OrbiTrap MS	34
3.4.5.4	Kvantifikacija fenolnih jedinjenja primenom masene spektrometrije UPLC-DAD MS/MS.....	34
3.4.6	Analiza makroelemenata , mikroelemenata i elemenata u tragovima	37
3.4.7	Statistička obrada podataka	38

4.	REZULTATI I DISKUSIJA	40
4.1	Metabolomička procena autentičnosti semena voća	40
4.1.1	Lipidni profil	40
4.1.2	Profil masnih kiselina.....	47
4.1.2.1	Kvalitativna analiza masnih kiselina	48
4.1.2.2	Kvantitativni sadržaj masnih kiselina	53
4.1.3	Profil šećera.....	59
4.1.4	Proteinski profil	67
4.1.4.1	Određivanje sadržaja ukupnih rastvorljivih proteina.....	68
4.1.4.2	SDS-PAGE elektroforeza.....	70
4.1.5	Fenolni profil.....	84
4.1.5.1	Određivanje ukupnog sadržaja polifenola (TPC)	84
4.1.5.2	HPTLC fenolni profil.....	85
4.1.5.3	Identifikacija fenolnih jedinjenja primenom UPLC-LTQ OrbiTrap masene spektrometrije u uzorcima ekstrakata semena gajenog i samoniklog voća	92
4.1.5.4	Kvantitativna analiza fenolnih jedinjenja u uzorcima semena gajenog i samoniklog voća.....	96
4.1.6	Elementalni sastav	100
4.2	Uporedna studija korišćenih analitičkih tehnika za profilisanje metabolita i klasifikaciju uzoraka	107
5.	ZAKLJUČAK.....	116
6.	REFERENCE.....	119
7.	PRILOG	134

1. UVOD

Srbija je visoko pozicionirana u svetskoj proizvodnji i preradi jagodastog voća, zahvaljujući povoljnim prirodnim faktorima za njihov uzgoj.¹ Međutim, uočava se nedostatak pouzdanih podataka za utvrđivanje autentičnosti različitih biljnih vrsta koja bi predstavljala dodatnu vrednost ovim proizvodima. Geografsko i biljno poreklo su važni parametri kada se govori o kvalitetu i bezbednosti hrane pa je njihovo definisanje bitno za procenu autentičnosti.

Voće ima važnu ulogu u ishrani ljudi zahvaljujući visokom sadržaju vitamina, minerala, polisaharida, esencijalnih ulja i antioksidanasa. S obzirom na činjenicu da se seme jagodastog voća konzumira zajedno sa plodom, poznavanje njegovog sastava je bitno za potpunu karakterizaciju voća i procenu njegove nutritivne vrednosti. Pored nutritivne vrednosti, autentičnost proizvoda se danas smatra važnim parametrom kvaliteta, od suštinske važnosti za zaštitu potrošača, ali i samih proizvođača. Određivanje specifičnih markera porekla zahteva neprestano unapređivanje postojećih i razvoj novih metoda za ispitivanje hrane. Procena autentičnosti semena samoniklog i gajenog voća je vrlo složena s obzirom na to da hemijski sastav svih delova biljke, pa i semena, zavisi od velikog broja faktora kao što su sorta, uslovi uzgajanja (tip zemljišta, biotički i abiotički faktori), geografsko poreklo, vreme zrenja, uslovi branja i skladištenja voća. Metabolomička studija semena samoniklog i gajenog voća koja bi obuhvatila kompletnu analizu kvalitativnog i kvantitativnog hemijskog sastava ispitivanih biljnih vrsta do sada nije opisana u raspoloživoj literaturi. Analiziran je manji broj uzoraka, najčešće ploda ili proizvoda dobijenih tehnološkom preradom voća (sok, kompot, džem)^{2,3} i karakterizacija je vršena ispitivanjem određene klase jedinjenja.⁴

S druge strane, trenutno ne postoji sistematsko prikupljanje i korišćenje semena voća što je značajan gubitak biomase koja se potencijalno može iskoristiti kao izvor različitih metabolita.⁵ Na taj način se rasipaju dragoceni izvori fitohemikalija, potencijalni prirodni antioksidansi⁶, dodaci ishrani sa blagotvornim dejstvom na zdravlje, a istovremeno se stvara ozbiljan problem odlaganja industrijskog otpada, čija bi efikasnija upotreba donela veliku ekološku i ekonomsku dobit. Iz tog razloga poslednjih godina raste interesovanje istraživača⁷, proizvođača i države za efikasnijim korišćenjem poljoprivrednih i prehrambenih sporednih proizvoda koji bi mogli naći primenu kao aditivi u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji.

Naučni cilj ove disertacije je da se sistematskom analizom statistički značajnog broja uzoraka semena samoniklog i gajenog voća dobije jasna metabolomička slika i identifikuju specifični hemijski markeri koji se mogu koristiti kao indikatori biljnog porekla voća, kao i markeri za razlikovanje samoniklog i gajenog voća koje pripada istim biljnim vrstama. Ciljanom analizom se mogu izolovati i kvantitativno odrediti različite klase jedinjenja od interesa, dok se metaboličkom analizom „otiska prsta” dobija celokupan profil uzoraka, kao njihova jedinstvena karakteristika.⁸ Izuzetno velika količina podataka dobijena na ovaj način biće analizirana primenom naprednih hemometrijskih metoda. Na taj način bi hemijski profil uzoraka semena voća bio po prvi put iskorišćen za konstruisanje matematičkih modela koji bi mogli koristiti za predviđanje porekla novih uzoraka na osnovu njihovog fitohemijskog sastava. Takođe, potpuno poznavanje hemijskog sastava semena voća može doprineti boljem iskorišćenju prehrambeno-industrijskog otpada, njegovom primenom u hemijskoj, farmaceutskoj i industriji hrane.

2. OPŠTI DEO

2.1 Metabolomički pristup u proceni autentičnosti

Metabolomika je naučna oblast koja se bavi sistematskom identifikacijom i kvantifikacijom svih metabolita prisutnih u biološkim sistemima.⁹ U zadnjoj deceniji metabolomika je postala najčešće primenjivani pristup u mnogim oblastima nauke, uključujući medicinu, biologiju, genetiku, fitomedicinu, medicinsku hemiju.¹⁰⁻¹² Metaboliti su molekuli malih molekulskih masa, koji nastaju kao proizvodi metabolizma. Primarni metaboliti nastaju osnovnim metaboličkim procesima koji su uključeni u rast, razvoj i reprodukciju, retko su specifični i stoga se manje koriste u metabolomičkim studijama. Za razliku od njih, sekundarni metaboliti imaju ekološku i zaštitnu ulogu u uslovima biotičkog i abiotičkog stresa, specifični su za određene organizme i prikladni za metabolomička istraživanja. Kompletan skup metabolita u biološkom uzorku (ćeliji, tkivu, tkivnom ekstraktu ili biofluidu) se naziva metabolom. Metaboliti su krajnji proizvodi ćelijskih regulatornih procesa i njihova sinteza zavisi od odgovora biološkog sistema na genetske promene i na uticaj životne sredine. Metabolomika, stoga, nudi sveobuhvatan pogled na biohemijski status posmatranog organizma.¹³

Metabolomika je našla veliku primenu u taksonomiji biljaka („otisak prsta” različitih biljnih vrsta i genotipova), praćenju ponašanja specifičnih klasa metabolita u odnosu na primenjene spoljašnje hemijske ili fizičke faktore, interakciji biljaka sa životnom sredinom, praćenju procesa sazrevanja ploda, kao i kontroli kvaliteta i proceni autentičnosti.¹⁴⁻¹⁷ Analiza metaboloma nekog složenog biljnog materijala zahteva primenu sofisticiranih analitičkih i hemometrijskih tehnika, koje su unapređivane uporedo sa razvojem metabolomike. Ova oblast značajno je doprinela razumevanju fiziologije biljaka sa aspekta malih molekula, ali i omogućila da se reguliše rast i razvoj biljaka, poboljša njihov odgovor na stresne uslove i da se unapredi stvaranje novih kvalitetnijih sorti sa željenim karakteristikama (oplemenjivanje biljaka, genetski inženjering).¹⁸

Zbog sistematskog pristupa metabolomika se primenjuje i u proceni autentičnosti različitih prehrambenih proizvoda.¹⁹⁻²² Ispitivanje autentičnosti semena samoniklog i gajenog voća, koje je predmet istraživanja ove doktorske disertacije, je vrlo složeno s obzirom na to da hemijski sastav svih delova voća, pa i semena zavisi od velikog broja faktora kao što su sorta, uslovi uzgajanja (tip zemljišta, uslovi životne sredine i prisustvo bolesti i štetočina), geografsko poreklo, vreme zrenja, branje i skladištenja voća. Zbog visoke bioenergetske vrednosti, visoke cene i velike konkurencije na tržištu jagodasto voće i proizvodi njegove prerade su često podložni krivotvorenju. Krivotvorenje prehrambenih proizvoda radi ostvarivanja ekonomske dobiti ili nenamerno zbog pogrešne identifikacije vrsta, podrazumeva zamenu jagodastog voća visoke vrednosti sa manje vrednim i jeftinijim vrstama i pogrešno označavanje sadržaja proizvoda.²² Na ovaj način se smanjuje kvalitet proizvoda i zloupotrebljava poverenje potrošača. Iako je otkrivanje falsifikata teško, autentičnost i usklađenost sa deklaracijom su od posebnog značaja za zaštitu potrošača i proizvođača.

Metabolička studija se sastoji od niza koraka koji obuhvataju pripremu uzorka, ekstrakciju, derivatizaciju, odvajanje i detekciju metabolita, kao i obradu dobijenih podataka. Nisu uvek svi koraci neophodni, njihov izbor zavisi od metabolomičkog pristupa, vrste uzorka i korišćene instrumentalne tehnike za odvajanje i detekciju. Metabolomički pristupi koji se najčešće koriste za analizu metabolita u složenom biološkom matriksu su ciljana analiza i kompletna analiza metaboloma (metabolički otisak prsta i metabolomičko profilisanje).²³

Ciljana analiza je ograničena na metabolite koji su prethodno odabrani, što se može postići optimizacijom postupka ekstrakcije, korišćenjem različitih analitičkih metoda odvajanja ili odgovarajućim izborom načina detekcije jedinjenja od interesa.²³ Da bi se izvršila ciljana analiza potrebno je poznavati strukturu ispitivanih metabolita i imati razvijenu analitičku metodu za merenje njihove koncentracije u uzorku. Analitičke metode koje se koriste kod ove vrste analize su optimizovane i validovane da obezbede tačnost, preciznost, osetljivost i selektivnost. Može se koristiti za analizu ograničenog broja jedinjenja, za koje postoje dostupni referentni standardi, zbog

čega ima ograničenu primenu u identifikaciji novih metaboličkih markera ²⁴, za razliku od metode „otiska prsta” gde se mogu obraditi jako veliki setovi podataka koji potiču od metaboličkih signala.

Kompletna analiza metaboloma je analitički pristup koji razmatra celokupan profil uzorka, kao njegovu jedinstvenu karakteristiku, bez identifikacije pojedinačnih metabolita. Metabolički „otisak prsta” podrazumeva brzu, neciljanu metodu, za koju su potrebne male količine ispitivanog uzorka. Ima važnu ulogu u otkivanju novih bioaktivnih jedinjenja, kontoli kvaliteta biljnih preparata i prirodnih proizvoda, hemotaksonomskoj sistematici biljaka i proceni njihovog biljnog i geografskog porekla, kao i u proučavanju uticaja spoljašnjih faktora na metaboličke promene u organizmima.²⁵⁻²⁸ Identifikacija metabolita kod neciljane analize se najčešće vrši spektroskopskim tehnikama, kao što su masena spektrometrija visoke rezolucije i nuklearna magnetna rezonancija.²⁹

Ukoliko se analitički postupak fokusira na manji broj unapred definisanih metabolita, reč je o metaboličkom profilisanju. Ispitivani metaboliti pripadaju istoj klasi jedinjenja ili istim metaboličkim putevima.³⁰ U poređenju sa ciljanom analizom, metaboličko profilisanje uključuje širi spektar poznatih i nepoznatih metabolita i pruža semikvantitativne podatke dobijene računarskim putem, a ne apsolutno kvantitativne informacije.²⁹ Prednost ovog pristupa jeste generisanje kvantitativnih podataka iz dobijenih spektara, koji nisu zavisni od primenjene analitičke metode.³¹

2.2 Analitičke metode korišćene u metabolomičkoj studiji semena voća

Za razliku od tradicionalnih metoda biljne taksonomije zasnovanih na morfološkim i anatomskim karakteristikama, hemotaksonomija omogućava istovremenu analizu većeg broja uzoraka u kratkom vremenskom periodu, kao i veću osetljivost zahvaljujući naprednim analitičkim tehnikama, kojima se mogu detektovati i supstance prisutne u tragovima. Izbor tehnike zavisi od eksperimentalnog cilja i prirode uzorka koji se analizira. Paralelna primena više različitih analitičkih metoda omogućava kompletnu analizu kompleksnog metaboloma, kakav je biljni materijal.²³

Analitičke tehnike kao što su visokoeфикасна jonska hromatografija (eng. *High Performance Ion-Exchange Chromatography*, IC) sa elektrohemijском detekcijom, visokoeфикасна течна hromatografija (eng. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) ili ultraeфикасна течна hromatografija (eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC), gasna hromatografija (eng. *Gas Chromatography*, GC), indukovano spregnuta plazma (eng. *Inductively Coupled Plasma*, ICP) i kapilarna elektroforeza (eng. *Capillary Electrophoresis*, CE), spregnute sa spektroskopskim tehnikama detekcije kao što su masena spektrometrija (eng. *Mass Spectrometry*, MS), nuklearna magnetna rezonancija (eng. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) i bliska infracrvena spektroskopija (eng. *Near Infrared Spectroscopy*, NIR), se široko koriste za oba metabolomička pristupa, ciljanu i kompletnu analizu metabolita.³²⁻³⁵ Pored nabrojanih, visoko sofisticiranih tehnika, visokoeфикасна tankoslojna hromatografija (eng. *High-Performance Thin-Layer Chromatography*, HPTLC) takođe nalazi sve veću primenu u kontroli kvaliteta biljnih proizvoda i proceni njihove autentičnosti.³⁶

2.2.1 Hromatografske tehnike

Hromatografija je metoda odvajanja zasnovana na raspodeli ispitivanog analita između stacionarne i mobilne faze. Stacionarna faza može biti čvrst porozni adsorbens ili tanak sloj tečnosti nanet na inertni nosač ili zid kolone. Prema načinu smeštanja stacionarne faze razlikuje se planarna hromatografija (hromatografija na hartiji i tanksoljna hromatografija) i hromatografija u koloni. U toku hromatografskog procesa pokretna faza (gas ili tečnost) nosi sa sobom ispitivani analit prolazeći kroz stacionarnu fazu, pri čemu u zavisnosti od njegovog afiniteta dolazi do različitih interakcija sa stacionarnom, odnosno mobilom fazom, tj. njegove raspodele između ove dve faze. Razdvajanje ispitivanih komponenata je uslovljeno fizičko-hemijским procesima (adsorpcija, particija, jonska izmena, ekskluzija) koji se odigravaju na granici faza, a rezultat su interakcija koje se ostvaruju u hromatografskom sistemu, kao što su vodonične veze, jon-dipol, dipol-dipol, elektrostatičke i

hidrofobne interakcije (Van der Valsove sile) i razdvajanje na osnovu veličine i/ili oblika molekula (ekskluzija).³⁷

Kao sorbenti u tečnoj hromatografiji se koriste porozni materijali velike specifične površine sa uniformnim hemijskim karakteristikama (silika gel, aluminijum-oksidi, poliamid, celuloza) i hemijski modifikovani sorbenti. Silika gel i sorbenti dobijeni vezivanjem polarnih grupa (3-cijanopropil-, 3-aminopropil- i diol grupa) na njegovoj površini su najčešće korišćeni sorbenti u uslovima normalno-fazne hromatografije, dok su komercijalno dostupni sorbenti dimetil- (C-2), oktil- (C-8), dodecil- (C-12), oktadecil- (C-18) modifikovani silika gelovi u kombinaciji sa mobilnim fazama veće polarosti najčešće korišćeni reverzno-fazni sistemi.³⁸

2.2.1.1 Visokoefikasna tankoslojna hromatografija

Kod tankoslojne hromatografije stacionarna faza je tanak sloj sorbenta koji je smešten na čvrst nosač od stakla, plastike ili aluminijuma. Identifikacija zona kod tankoslojne hromatografije vrši se na osnovu retardacionog faktora (R_F), koji predstavlja odnos pređenog puta ispitivane komponente od polazne mrlje do centra hromatografske zone (a) i puta koji prelazi rastvarač od polazne mrlje do fronta rastvarača (b). Ukoliko ispitivana jedinjenja nisu obojena, primenjuju se fizičke, hemijske ili biološke metode vizuelizacije zona. Hemijske metode se izvode raspršivanjem ili uranjanjem hromatograma u rastvor reagensa za izazivanje, nakon čega zone od interesa postaju obojene ili fluorescentne.^{38,39}

Visokoefikasnu tankoslojnu hromatografiju u poređenju sa konvencionalnom tankoslojnom hromatografijom odlikuje manji prečnik čestica stacionarne faze (5-7 μm) što obezbeđuje bolji kontakt stacionarne i mobilne faze i samim tim veću rezoluciju odvajanja. Ova tehnika je konkurentna sa drugim hromatografskim metodama u pogledu tačnosti, preciznosti i reproduktivnosti. U odnosu na visokoefikasnu tečnu hromatografiju pokazala je niz prednosti: mala količina uzorka potrebna za analizu i njegoja jednostavna priprema; veća preciznost i tačnost usled mogućnosti istovremene analize većeg broja uzoraka pod istim hromatografskim uslovima; moguća je analiza analita u širokom opsegu koncentracija; mala osetljivost na nečistoće; isključen uticaj prethodnih analiza na ishod eksperimenta jer se za svaku analizu koristi novi sloj sorbenta; predstavlja zeleniju metodu zbog manjeg utroška rastvarača po uzorku; veliki izbor adsorbenasa i rastvarača za razvijanje; ekonomičnost i brzina izvođenja analize; dobijeni hromatogrami se mogu upotrebiti za UV/Vis i fluorescentnu detekciju, kao i za masenu spektrometriju i hemijsku derivatizaciju.^{39,40}

Razvoj i proizvodnja instrumenata i softvera pomoću kojih je HPTLC tehnika automatizovana, kao i mogućnost kombinacije sa naprednom hemometrijskom analizom podataka, povećali su interes za primenu ove metode u rutinskoj analizi složenih metaboloma u cilju kontrole kvaliteta i procene autentičnosti.^{36,41}

2.2.1.2 Ultraefikasna tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom

Razvoj visokoefikasnih stacionarnih faza, doveo je do poboljšanja performansi hromatografskog procesa u pogledu brzine, osetljivosti i rezolucije, i razvoja visokoefikasne tečne hromatografije. Kolone pakovane česticama malih dimenzija imaju veliku dodirnu površinu koja obezbeđuje bolje razdvajanje, ali zahteva protok mobilne faze pod znatno većim pritiskom. Iz tog razloga su razvijeni sistemi sa poboljšanom tehnologijom pumpi, autosemplera, ventila i kolona, koji mogu da rade na mnogo većim pritiscima od konvencionalnih visokoefikasnih tečnih sistema.⁴² Primena čestica dimenzija manjih od 2 μm , uz poboljšanu instrumentaciju, dovela je do razvoja ultraefikasne tečne hromatografije. UPLC tehnologija je našla veliku primenu u nauci i industriji jer omogućava veći broj analiza u kratkom vremenskom periodu, samim tim i manju potrošnju rastvarača, dok je efikasnost hromatografskog odvajanja povećana.

Nakon hromatografskog razdvajanja analizirani analit nošen mobilnom fazom stiže do detektora, gde se generiše električni signal proporcionalan određenoj osobini eluirane supstance (i mobilne faze). Detekcija zasnovana na masenoj spektrometriji je pored UV/Vis, fluorescentne i elektrohemijske detekcije, najčešće korišćena metoda za karakterizaciju složenih metabolita.³⁵ Metabolomička studija zasnovana na hibridnoj masenoj spektrometriji visoke rezolucije (*eng. High Resolution Mass Spectrometry* - HRMS, preciznost mase < 5 mg/L) je opsežna metoda koja ima za cilj da profiliše sve metabolite, uključujući i one nepoznate. Na taj način omogućava snimanje kompletnog spektra uzorka što daje bolji uvid u njegov sastav i zato je metoda izbora u ne ciljanoj metabolomičkoj analizi. Za razliku od nje, ciljana metabolomička studija zasnovana na masenoj spektrometriji sa tri analizatora - trostruki kvadrupol (*UPLC-DAD MS/MS*), omogućava relativnu ili apsolutnu kvantifikaciju malog broja tačno određenih metabolita uz upotrebu odgovarajućih standarda.⁴³

Analitičke tehnike spregnute sa masenom spektrometrijom koje se koriste za kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzoraka su izuzetno selektivne, osetljive i imaju visok potencijal za identifikaciju metabolita, ali istovremeno zahtevaju pripremu uzorka, koja može dovesti do izvesnih gubitaka metabolita, takođe sistem za uvođenje uzorka i korišćene tehnike jonizacije, mogu diskriminisati određene klase jedinjenja. Antignac i saradnici su dali pregled analitičkih izbora koje je potrebno napraviti u toku metabolomičke studije, ukazujući na činjenicu da koraci kao što su priprema uzorka, uvođenje uzorka, jonizacija, obrada i analiza podataka imaju direktan uticaj na dobijene rezultate i njihovu interpretaciju.⁴⁴ Stalne inovacije u MS tehnologijama, koje podrazumevaju proizvodnju hibridnih masenih instrumenata, unapređenje interfejsa, hromatografskog sistema kao i softvera za obradu podataka su znatno unapredile metabolomičke studije složenih matriksa.⁴⁴ Iz navedenih razloga i zbog kompleksnosti samog metaboloma, za kompletnu metabolomičku studiju najbolje je paralelno primeniti nekoliko analitičkih tehnika.

Ciljana *UPLC-DAD MS/MS* metodologija je korišćena za određivanje fenolnih jedinjenja, šećera, organskih i aminokiselina u uzorcima jagodastog voća i proizvodima njegove prerade. Kroz određivanje specifičnih jedinjenja koja pripadaju ovim klasama, moguće je identifikovati jedinstvene markere biljnog i geografskog porekla, čija se distribucija i varijabilnost koriste u proceni autentičnosti i kontroli kvaliteta voća.²² Analiza polifenola u biljnim uzorcima je složena zbog velike hemijske raznovrsnosti jedinjenja (od jednostavnih fenolnih kiselina do tanina) koja mogu biti prisutna u širokom opsegu koncentracija. Optimizacija postupka ekstrakcije uz prethodno uklanjanje ometajućih jedinjenja olakšava kasnije hromatografsko odvajanje i identifikaciju fenola. Nedostatak *UPLC-DAD MS/MS* metode je taj što se ne može koristiti za identifikaciju polifenola koji nisu unapred definisani, čime se ograničava broj jedinjenja koja mogu biti određena u složenom matriksu kakav je biljni materijal.⁴⁵ Primenom hibridne masene spektrometrije visoke rezolucije koja se sastoji od linearne jonske zamke i Orbitrap analizatora (LTQ Orbitrap MS) dobija se kompletan profil uzorka, kao jedinstveni otisak prsta koji se u kombinaciji sa hemometrijskom analizom može koristiti za karakterizaciju, klasifikaciju i autentifikaciju proizvoda. Zahvaljujući velikoj preciznosti mase, ova tehnika pravi jasnu razliku između određivanih supstanci i koeluiranih ometajućih komponenata. Identifikacija polifenolnih jedinjenja vrši se na osnovu karakterističnog fragmentacionog puta, tačne molekulske mase jona i retencionog vremena. Trenutno je metabolomika zasnovana na masenoj spektrometriji oblast koja se dinamično razvija sa velikim brojem publikacija.³¹

2.2.1.3 Visokoeffikasna jonska hromatografija

Sistemi koji se koriste za analizu šećera primenom tačne hromatografije su najčešće spregnuti sa UV/Vis, refraktometrijskim (zasnovan na merenju indeksa refrakcije – RI), konduktometrijskim i pulsno amperometrijskim detektorom (*eng. Pulse Amperometric Detection*, PAD). Visokoeffikasna anjonsko-izmenjivačka hromatografija visokih performansi (*eng. High Performance Anion Exchange Chromatography*, HPAEC) sa pulsnom amperometrijskom detekcijom, omogućava direktnu

kvantifikaciju nederivatizovanih ugljenih hidrata prisutnih u niskim koncentracijama, uz minimalnu pripremu uzorka. HPAE hromatografija koristi prednosti slabo kisele prirode ugljenih hidrata (pK_a 12-14) da bi postigla visokoselektivna odvajanja pri visokom pH vrednostima pomoću anjon-izmenjivačke stacionarne faze smeštene unutar kolone.⁴⁶ U alkalnim uslovima, ugljeni hidrati se u vidu deprotonovanih oksoanijona lako razdvajaju na polimernim anjon-izmenjivačkim kolonama funkcionalizovanim kvaternarnim amonijum-jedinjenjima (CarboPac®), gde je redosled eluiranja obrnuto proporcionalan pK_a vrednosti šećera. Eluiranje se najčešće vrši izokratski uz upotrebu od 10 mmol/L do 20 mmol/L rastvora natrijum-hidroksida kao mobilne faze, koja ne bi trebalo da sadrži ugljen-dioksid zbog naknadnog nastajanja karbonata.⁴⁷ Pulsna amperometrijska detekcija je zasnovana na merenju promene struje između radne i referentne elektrode, koja nastaje kao posledica elektrokatalitičke oksidacije šećera. Primenjeni potencijal se podešava tako da poveća odgovor ispitivanog analita, a ujedno smanji signal koji potiče od koeluirajućih jona. Razvoj stacionarnih faza na bazi polimera, koje su stabilne u širokom opsegu pH vrednosti i upotreba zlatne ili platinske radne elektrode, čija je površina sposobna da katalizuje elektrooksidaciju jedinjenja koja sadrže hidroksilnu grupu u baznim uslovima, omogućili su da ova tehnika postane vrlo selektivna i osetljiva za određivanje redukujućih i neredukujućih šećera, šećernih alkohola, oligosaharida, deoksišećera, amino-šećera, šećernih kiselina, itd.⁴⁸

Zbog mogućnosti razdvajanja složenih smeša ugljenih hidrata i kvantifikacije svih razdvojenih molekula sa visokom osetljivošću, HPAE-PAD je danas tehnika izbora za analizu šećera. Ova metoda se pokazala kao vrlo uspešna u analizi složenih uzoraka, kakav je med u kojem je prisutan veliki broj oligosaharida slične strukture, u relativno niskim koncentracijama. Na osnovu profila šećera može se odrediti poreklo proizvoda što je od velikog značaja u oblasti kontrole kvaliteta hrane.⁴⁷

2.2.1.4 Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom

Gasna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom (GC-MS) je pored prethodno opisane LC-MS, najčešće korišćena analitička tehnika za metaboličko profilisanje. Bez obzira da li se radi o ciljanoj analizi ili o metabolomičkom profilisanju, GC-MS je našla veliku primenu zahvaljujući svojoj robusnosti, odličnoj sposobnosti odvajanja, selektivnosti, osetljivosti, reproduktivnosti i velikom broju spektralnih baza podataka/biblioteka na osnovu kojih se može izvršiti identifikacija metabolita. Kao mobilna faza u gasnoj hromatografiji se koriste hemijski inertni gasovi kao što su helijum, azot, vodonik, i argon, čija mala viskoznost omogućava upotrebu dužih i efikasnijih kolona. Dva glavna načina jonizacije koja se koriste kod GC-MS su elektronska jonizacija (EI) i hemijska jonizacija (CI). Zbog veće dostupnosti spektralnih baza podataka/biblioteka koje odgovaraju GC-MS zasnovanom na EI, ona je danas metoda izbora za mnoge analitičare.⁴⁹ Gasna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom izbegava uobičajene probleme koji se javljaju kod tačne hromatografije, kao što je efekat matriksa i supresija jona koeluirajućim jedinjenjima, i na taj način postiže bolju rezoluciju. Međutim, GC-MS se može koristiti samo za razdvajanje i identifikaciju jedinjenja male molekulske mase (50–600 Da) i isparljivih jedinjenja. Za detekciju polarnih, termomolabilnih i neisparljivih metabolita, neophodna je odgovarajuća hemijska derivatizacija pre analize.⁵⁰ U metabolomičkim studijama ova metoda se najviše koristi za analizu malih polarnih molekula, kao što su organske kiseline, aminokiseline, masne kiseline, šećeri i šećerni alkoholi. Masne kiseline se zbog svoje polarnosti i male isparljivosti, pre analize prevode postupkom transesterifikacije u lakoisparljive metil-, etil- ili izopropil estre.⁵¹

Analiza isparljivih komponenata primenom GC-MS metode je našla široku primenu u karakterizaciji proizvoda, proceni njihovog kvaliteta i autentičnosti. Korišćena je za metaboličko profilisanje različitih sorti jagoda i procenu uticaja primenjenih agronomskih uslova na profil primarnih metabolita odabranih sorti jagode.⁵² Metabolički profil dobijen primenom ove metode u kombinaciji sa različitim hemometrijskim tehnikama korišćen je i za određivanje biljnog porekla različitih sorti maline, grožđa, jabuke, breskve, borovnice i citrusa i za karakterizaciju metaboličkih

promena u biljkama nakon biotičkog i abiotičkog stresa.^{53,54} Divlje i kultivisano jagodasto voće uspešno je razdvojeno na osnovu kvalitativnog sastava isparljivih jedinjenja, dok je sadržaj monoterpena korišćen kao indikator geografskog i biljnog porekla jagodastog voća i proizvoda dobijenih njegovom preradom.⁵⁵

2.2.2 Gel-elektroforeza

Elektroforeza je metoda razdvajanja makromolekula u električnom polju. SDS-PAGE koristi poliakrilamidni gel (*eng. Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, PAGE) kao podlogu i natrijum-dodecilsulfat (*eng. Sodium Dodecyl Sulfate*, SDS) kao anjonski deterdžent koji denaturiše proteine i pretvara ih u linearni niz. SDS može rastvoriti hidrofobne molekule i denaturisati sekundarne i nedisulfidno povezane tercijarne strukture proteina, zbog čega proteini rastvoreni u ovom deterdžentu imaju samo primarnu strukturu i negativno su naelektrisani pa će se pod dejstvom električnog polja kretati ka pozitivnoj elektrodi – anodi. Poliakrilamid formira gel matricu koja služi kao sito i usporava migraciju većih molekula u odnosu na manje molekule. Veća koncentracija akrilamida znači manju veličinu pora u matrici gela. Brzina kretanja proteina u električnom polju je određena veličinom pora gela, kao i naelektrisanjem, veličinom i oblikom proteina. Nakon određenog vremena, u zavisnosti od napona u matrici gela, dolazi do razdvajanja proteina, tako da manji proteini dalje putuju niz gel. Razdvajanje proteina pomoću SDS-PAGE metode može se koristiti za procenu relativne molekulske mase proteina, relativne količine proteina u uzorku, distribucije proteina u frakcijama i za prečišćavanje proteina.⁵⁶ Molekulska masa ispitivanih proteina se može odrediti na osnovu postojanja linearne zavisnosti između udaljenosti koju su prešli proteini i vrednosti logaritma njihove molekulske mase ili poređenjem njihove pokretljivosti sa pokretljivošću proteina markera koji imaju tačno definisane molekulske mase.

U poređenju sa prethodo opisanim hromatografskim tehnikama, elektroforetske tehnike su klasične metode razdvajanja jednostavno dizajnirane, isplative, pouzdane i osetljive za analizu proteinskih profila. Iz navedenih razloga se mogu koristiti u analizi prehrambenih proizvoda kao metode za otkrivanje falsifikata⁵⁵, potvrdu autentičnosti⁵⁷, procenu geografskog⁵⁸ i biljnog porekla⁵⁹⁻⁶². U kombinaciji sa naprednim hemometrijskim tehnikama elektroforeza je našla veliku primenu u proceni autentičnosti morske hrane, mlečnih i mesnih proizvoda, kao i u klasifikaciji biljnih vrsta kao što su različite sorte kinoa, citrusa i kikirikija.^{57, 61-64}

2.2.3 Ultraljubičasta/vidljiva spektrofotometrija

Ultraljubičasta/vidljiva (UV/Vis) spektroskopija je zasnovana na analiziranju elektromagnetnog zračenja koje se apsorbuje u vidljivom i ultraljubičastom delu spektra, u oblasti između 200 nm i 800 nm. Primenuje se u kvantitativnoj hemijskoj analizi za određivanje koncentracije ispitivane supstance, na osnovu činjenice da je molarna koncentracija nekog jedinjenja direktno proporcionalna njegovoj apsorpciji, koja proističe iz Lambert-Berovog (Lambert-Beer) zakona. Može se koristiti i za strukturna određivanja u kombinaciji sa drugim tehnikama. Strukturna analiza je ograničena na identifikaciju delova molekula koji poseduju hromofore i apsorbuju zračenje u navedenoj oblasti.⁶⁵

Spektrofotometar je uređaj koji se koristi u UV/Vis spektroskopiji za karakterizaciju supstanci i sastoji se iz svetlosnog izvora, disperzionog elementa i uređaja za detekciju, pojačanje, merenje i beleženje signala. Kao izvor vidljive svetlosti koriste se lampe sa volframom, dok se deuterijumska lampa upotrebljava za blisku ultraljubičastu oblast.⁶⁵ Disperzioni element ima ulogu da razloži polihromatsko zračenje na izabrane oblasti talasnih dužina koje odgovaraju maksimumu apsorpcije uzorka i u tu svrhu se koriste prizme i difrakcione rešetke. Kao detektor se mogu koristiti fotodiode ili fotomultiplikator, čija je uloga da interakciju između elektromagnetnog zračenja i uzorka prevedu u električni signal.

Fenolna jedinjenja apsorbuju u UV/Vis oblasti zbog prisustva aromatičnih prstenova, koji mogu biti supstituisani šećernim jedinicama, hidroksilnim i drugim grupama što dovodi do pomeranja apsorpcionih maksimuma ka manjim ili većim talasnim dužinama. Sadržaj ukupnih polifenola najčešće se određuje uz upotrebu Folin Čikalteu (*eng. Folin Ciocalteu reagens, FC*) reagensa (kompleks fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline) i galne kiseline kao standarda. FC test ima široku primenu za određivanje sadržaja fenola u poljoprivrednim, farmaceutskim i prehrambenim proizvodima. Međutim, brojna istraživanja ukazuju na neselektivnost ovog reagensa, koji može stupiti u reakciju i sa mnogim nefenolnim jedinjenjima, aminokiselinama, proteinima, nukleotidima, nezasićenim masnim kiselinama, tiolima, aminima, vitaminima, aldehidima, ketonima i neorganskim jonima, što može dovesti do pogrešne interpretacije rezultata.⁶⁶

Spektrofotometrijski se može odrediti i sadržaj proteina u ispitivanim uzorcima, pri čemu se najčešće koriste Bradfordova (Bradford), biuretska i Lovrijeva (Lowry) metoda. Metoda određivanja sadržaja proteina po Bradfordu je zasnovana na vezivanju anjonske boje Coomassie brilliant blue G250 na bočnim grupama specifičnih aminokiselina, pri čemu dolazi do pomeranja apsorpcionog maksimuma od 465 nm do 595 nm. Prednost ove kolorimetrijske metode je brzina, jednostavnost i osetljivost, dok je glavni nedostatak to što različiti proteini imaju različite apsorbancije, pa bi kao standard najbolje bilo koristiti prečišćeni protein od interesa, ali se umesto njega najčešće kao standard koristi komercijalni albumin goveđeg seruma (*eng. Bovin serum albumin, BSA*), zbog čega je interpretacija rezultata relativna.⁶⁷

2.2.4 Indukovano spregnuta plazma sa optičkom emisionom spektroskopijom (ICP-OES) i sa masenom spektrometrijom (ICP-MS)

Indukovano spregnuta plazma sa optičkom emisionom spektroskopijom (ICP-OES) i indukovanu spregnuta plazma sa masenom spektrometrijom (ICP-MS) su savremene tehnike za kvantitativnu analizu elementalnog sastava koje su našle veliku primenu u analizi zemljišta, stena, vode, bioloških uzoraka i biljnog materijala. Prednost navedenih tehnika je mogućnost simultane analize više od 70 elemenata u kratkom vremenskom periodu, širok dinamički opseg u kojem je analitička kriva linearna, velika osetljivost određivanja usled relativno dugog boravka čestica analita u plazmi i male količine rastvorenog analita potrebne za analizu. Sistem za uvođenje uzorka i njegovu atomizaciju i pobuđivanje su identični kod obe metode, dok je razlika u načinu detekcije. Rastvor analiziranog uzorka se pomoću raspršivača i komore za raspršivanje prevodi u fini aerosol u kojem su čestice analita odgovarajuće veličine i kao takav uvodi u plazmu. Komore za raspršivanje uzorka, kao i sam raspršivač, izrađene su od teflona ili kvarcnog stakla, i imaju ulogu u smanjenju primarnih čestica aerosola (na veličinu do 10 μm) i služe kao amortizeri turbulencija koje se javljaju prilikom generisanja aerosola. Plazma je visokojonizovan gas (argon) u celini elektroneutralan, koji se generiše u plazmeniku, na atmosferskom pritisku pod uticajem radiofrekventnog elektromagnetnog polja. Prilikom prolaska aerosola uzorka kroz plazmu dešavaju se brojne fizičke promene. Uzorak se prvenstveno desolvatiše i prelazi u čvrsto agregatno stanje, da bi daljim kretanjem kroz plazmu ispario, zatim dolazi do njegove atomizacije i na kraju se pobuđuje i prevodi u jone usled sudaranja sa elektronima argona.⁶⁸

Kod optičke emisije spektroskopije pobuđeni atomi i joni uzorka prilikom vraćanja na niži energetski nivo emituju zračenje karakterističnih talasnih dužina za svaki od prisutnih elemenata. Izmereni intenzitet emitovanog elektromagnetnog zračenja određene talasne dužine se koristi za kvantitativnu analizu, dok je kvalitativna analiza zasnovana na detekciji emisije linije specifične za dati element.⁶⁸ U slučaju ICP-MS metode formirani joni se preko intrefejs regiona usmeravaju do masenog analizatora. Intrefejs ima ulogu da konzistentno i efikasno transportuje nastale jone od plazme koja se generiše na atmosferskom pritisku, preko niza elektrostatičkih sočiva, do masenog analizatora koji radi pod visokim vakuumom. Najčešće korišćeni maseni analizatori su kvadrupol, magnetni sektori i TOF (*eng. time-of-flight*) i njihova uloga je da razdvoje jone na osnovu njihovog

odnosa mase i naelektrisanja, to jest da omogućuje samo jonima od interesa kojima odgovara zadati potencijal da stignu do detektora. Detektor obrazuje merljiv električni signal koji je proporcionalan broju jona koji u sekundi dospevaju do njega.⁶⁹

ICP-MS je visoko osetljiva metoda za multielementalnu kvantitativnu analizu sa niskim limitom detekcije izraženim u $\mu\text{g/kg}$ i ng/kg , dok je kod ICP-OES donja granica detekcije u opsegu od 1 do 100 $\mu\text{g/kg}$. Kada je element od interesa prisutan u niskim koncentracijama ICP-MS je metoda izbora, i može se koristiti za određivanje preko 90% elemenata iz periodnog sistema. Interpretacija masenih spektara je jednostavnija u poređenju sa optičkim spektrima i pruža mogućnost analize izotopa, zahvaljujući činjenici da se izotopi pojavljuju na različitom odnosu mase i naelektrisanja. Kao glavni nedostaci ICP-MS tehnike navode se različite fizičke i spektralne interferencije, kao i ometajući uticaj matriksa.⁷⁰

Sadržaj mikroelemenata i makroelemenata se može koristiti kao marker za procenu autentičnosti u pogledu geografskog i biljnog porekla, različitih vrsta voća i proizvoda njegove prerade, organske pšenice, ječma, pasulja, krompira, čajeve, lekovitog bilja i drugih proizvoda.⁷¹⁻⁷⁴

2.3 Statistička obrada podataka

U savremenoj analitičkoj praksi veliki značaj se pridaje odabiru statističke metode koja se koristi za prikupljanje, obradu, interpretaciju i prikazivanje podataka u različitim fazama hemijske analize. Primena savremenih softverskih paketa za statističku obradu podataka, olakšala je tumačenje, prikazivanje i razumevanje rezultata dobijenih u različitim naučnim istraživanjima. Deo statistike koji se bavi organizacijom, sažimanjem i opisivanjem prikupljenih podataka pomoću numeričkih i grafičkih prikaza naziva se deskriptivna statistika. Elementi deskriptivne statistike su mere centralne tendencije (aritmetička, geometrijska i harmonijska sredina, moda i medijana) i mere rasipanja (standardna devijacija, varijansa, interval varijacije, koeficijent varijacije, srednje apsolutno odstupanje i raspon rezultata).

U cilju izvođenja zaključaka o ispitivanoj populaciji, na osnovu podataka iz slučajnog uzorka, koristi se postupak provere određene pretpostavke o tačnoj vrednosti parametra u populaciji, koju nazivamo nulta hipoteza. Za proveru postavljene hipoteze koriste se parametrijski i neparametrijski testovi, kojima se tvđenje prihvata ili ne prihvata, uz definisani stepen verovatnoće.⁷⁵ Parametrijske metode su robusnije, zahtevaju manje podataka na osnovu kojih se izvodi pouzdan zaključak i imaju veću statističku moć. Uslov za korišćenje ovih metoda je normalna distribucija podataka koja prati Gausovu krivu. Parametrijski testovi upoređuju dva ili više setova podataka i zasnovani su na teoriji verovatnoće. Za razliku od njih, neparametrijski testovi ne postavljaju pretpostavke o distribuciji podataka, ali ni o obliku očekivane varijanse. Pogodni su za analizu malih setova podataka i nenumeričkih varijabli koje nisu kvantitativno merljive – *testovi ranga*. Većina ovih metoda se može primeniti na ordinalnim i nominalnim varijablama, ali su iz tog razloga manje precizne od parametrijskih metoda. Interpretacija rezultata neparametrijskih procedura je često kompleksnija u poređenju sa rezultatima analognih parametrijskih testova.⁷⁶ U okviru ove doktorske disertacije korišćen je Kruskal-Valisov test (*eng. Kruskal-Wallis test, KW*) kao neparametrijska alternativa analizi varijanse (ANOVA).

Univarijantna analiza je jednostavna za izvođenje, ali ne uzima u obzir međusobne odnose metabolita, zato je njena statistička moć ograničena. Metaboliti su međusobno povezani metaboličkim putevima i mogu biti u korelaciji sa drugim metabolitima u sistemu. Multivarijantne metode pored srednje vrednosti, koriste kovarijanse ili korelacije koje odražavaju obim odnosa između varijabli, za razliku od univarijantnih metoda koje se fokusiraju isključivo na srednju vrednost i varijansu pojedinačnih promenljivih.⁷⁷ Ova dva pristupa mogu pružiti komplementarne rezultate, ali ih treba tumačiti unutar statističkih okvira korišćene univarijantne ili multivarijantne metode. Univarijantne metode ipak imaju značajnu ulogu u analizi metabolomičkih podataka, jer multivarijantni modeli često mogu propustiti/maskirati značajne varijable pošto se svi metaboliti (i

odnosi metabolita) istovremeno ispituju. Promenljiva može biti beznačajna u multivarijantnom modelu, ali značajna u univarijantnom kontekstu.⁷⁸

Na osnovu specifičnog cilja analize i manipulacije podacima, većina metabolomičkih studija takođe može biti klasifikovana kao diskriminativna, informativna i/ili prediktivna. Diskriminativne analize su usmerene na pronalaženju sličnosti, odnosno razlika između populacija uzoraka bez nužnog kreiranja statističkih modela ili evaluacije mogućih puteva koji mogu da razjasne takve razlike. Diskriminacija se obično postiže upotrebom multivarijantnih metoda za prepoznavanje obrazaca ponašanja ispitivanih uzoraka kao što su analiza glavnih komponentata (*eng. Principal Component Analysis, PCA*) i hijerarhijska klusterska analiza (*eng. Hierarchical Cluster Analysis, HCA*). U slučaju prediktivnih metabolomičkih studija koriste se kategorijski definisane tehnike koje omogućavaju diskriminaciju uzoraka usled smanjenja dimenzionalnosti podataka uz istovremeno maksimiziranje korelacije između uzoraka, kao što su regresija metodom delimičnih najmanjih kvadrata (*eng. Partial Least Square, PLS*) i linearna diskriminantna analiza (*eng. Linear Discriminant Analysis, LDA*). Genetsko programiranje (GP) i mreža korelacija su dodatni diskriminatorni alati koji se mogu koristiti za poboljšanje osetljivosti i selektivnosti PLS modela.²³

2.3.1 Kruskal-Valisov test

Kruskal-Valisov test je neparametrijski test koji poredi medijane tri ili više setova podataka, kako bi utvrdili da li ispitivani uzorci potiču iz iste populacije. Primena KW testa podrazumeva rangiranje svih merenih vrednosti zajedno, pri čemu svaka vrednost, bez obzira kom setu podataka pripada, dobija odgovarajuću vrednost ranga, počevši od 1. Zatim se računa zbir rangova unutar svakog uzorka. Ova metoda ne zahteva izbacivanje spoljašnjih vrednosti koje značajno odstupaju od seta podataka, jer se rangiranjem podataka umanjuje njihov negativni efekat. Nulta hipoteza kod ovog testa pretpostavlja da ispitivani uzorci potiču iz iste populacije, odnosno da su aritmetičke sredine rangiranih vrednosti jednake. U slučaju odbacivanja nulte hipoteze, potrebno je utvrditi koji setovi podataka su odgovorni za statistički značajne razlike, i u tu svrhu se koriste različite *post hoc* metode.^{79,80}

2.3.2 Analiza glavnih komponentata

Analiza glavnih komponentata (PCA) omogućava bolje razumevanje i lakšu interpretaciju strukture rezultata naučnih istraživanja i zato je našla veliku primenu u mnogim oblastima kao što su fizika, hemija, biologija, medicina, psihologija i inženjerstvo.⁸¹ PCA je najčešće korišćena multivarijantna metoda za početnu obradu i tumačenje složenih podataka dobijenih u okviru metabolomičkih studija. Može se koristiti za analizu podataka dobijenih iz NMR ili MS spektara, tako što ih transformiše u prostor niže dimenzije, otkrivajući inherentnu strukturu podataka.⁸²

Analiza glavnih komponentata je matematički algoritam koji smanjuje dimenzionalnost podataka u cilju boljeg sagledavanja rezultata i utvrđivanja postojanja odgovarajućeg obrasca ponašanja ispitivanih uzoraka. Redukcija dimenzionalnosti podataka se postiže formiranjem novog koordinatnog sistema u kojem se identifikuju međusobno normalne latentne varijable (glavne komponente), duž kojih je najveći varijabilitet podataka. Na ovaj način, koristeći matematičku projekciju, originalni skup podataka koji se sastoji od velikog broja varijabli, se može predstaviti pomoću nekoliko glavnih komponentata, uz minimalan gubitak informacija sadržanih u prvobitnom setu podataka. Glavne komponente su linearne funkcije originalnog seta promenljivih, predstavljaju pravac maksimalne varijanse skorova i nisu međusobno korelisane.⁸³ Prva glavna komponenta (PC1) opisuje maksimalan varijabilitet među podacima i odražava rastojanje između objekata, dok je druga glavna komponenta (PC2) normalna u odnosu na nju i predstavlja sledeći najbolji pravac za aproksimaciju originalnih podataka. Sve dalje latentne varijable opisuju varijanse podataka koje nisu obuhvaćene sa prve dve komponente i normalne su u odnosu na njih. Glavne komponente koje nisu informativne, jer opisuju mali procenat varijanse podataka, se mogu zanemariti.⁸⁴

Skorovi se definišu kao projekcije vrednosti iz originalog seta podataka na glavne komponente. Grafik skorova omogućava vizuelizaciju strukture ispitivanog seta podataka, uočavanje grupisanja uzoraka na osnovu sličnosti i razlika, kao i uočavanje prisustva spoljašnjih vrednosti. Grafik vektora koeficijenata latentnih varijabli (*eng. loading vector*) prikazuje odnos latentnih varijabli i koristi se za identifikaciju onih varijabli koje najviše doprinose pozicioniranju ispitivanih uzoraka na grafiku skorova. PCA spada u kategorijski nedefinisane istraživačke metode i primenljiva je na bilo koji x - set promenljivih.

2.3.3 Regresija metodom delimičnih najmanjih kvadrata sa diskriminantnim pristupom

Modelovanje delimičnih najmanjih kvadrata (PLS) je tehnika zasnovana na pronalasku međusobno nezavisnih varijabli iz ulaznog seta podataka (x -matrice) koje opisuju što je moguće veći varijabilitet tih podataka, uz istovremenu visoku korelaciju sa y -matricom zavisnih varijabli. Kombinacija PLS regresije sa diskriminantnim pristupom (*eng. Partial Least Square Discriminant Analysis*, PLS-DA) je linearni model koji se obično koristi u svrhe klasifikacije uzoraka i odabira biomarkera u studijama kompleksnih metaboloma, kakav je biljni materijal. Ako postoji statistički značajna diskriminacija između posmatranih klasa uzoraka, optimizacija i provera diskriminatornih parametara modela se može izvršiti upotrebom kalibracionog i test seta podataka. Ukoliko ne postoji dostupan test set, za proveru modela se može koristiti metoda unakrsne validacije. Optimizacija modela, koja podrazumeva izbor optimalnog broja latentnih varijabli i procenu kvaliteta modela, uvek treba da se obavlja po principu dvostruke unakrsne validacije jer su tada procena kvaliteta modela i optimizacija nezavisne. Uzorci koji se koriste u konačnoj proceni modela se ne koriste u optimizaciji modela (kalibraciji) i obrnuto.⁸⁵

U PLS-DA modelima, odnos između metabolomičkih podataka i kategorijske varijable y je razvijen na takav način da se vrednosti kategorijskih promenljivih mogu predvideti za uzorke nepoznatog porekla na osnovu metabolomičkih podataka. Kategorijska varijabla y je vektor čija vrednost ukazuje na pripadnost svakog uzorka uključenog u studiju određenoj klasi. Koristeći informacije o pripadnosti uzoraka određenoj klasi, PLS-DA teži da poboljša razdvajanje dve ili više grupa uzoraka. PLS-DA se može smatrati nadziranom verzijom analize glavnih komponenta (PCA) u smislu da postiže smanjenje dimenzionalnosti podataka, ali uz upotrebu reprezentativnih grupa uzoraka, gde je za svaki uzorak tačno definisana pripadnost.⁸⁶

Sposobnost predikcije dobijenog modela se može proveriti na test setu podataka, ukoliko ulazni set podataka nije dovoljno veliki da se podeli na tri seta (kalibracioni, test i predikcioni set). Vrednosti projektovanih varijabli (*eng. Variable importance in the projection scores*, VIP) koje su veće od 1 se ocenjuju kao značajne za dobijanje odgovarajućeg modela, dok se varijable sa nižim vrednostima mogu zanemariti jer njihov uticaj na predikcionu sposobnost modela nije značajan.

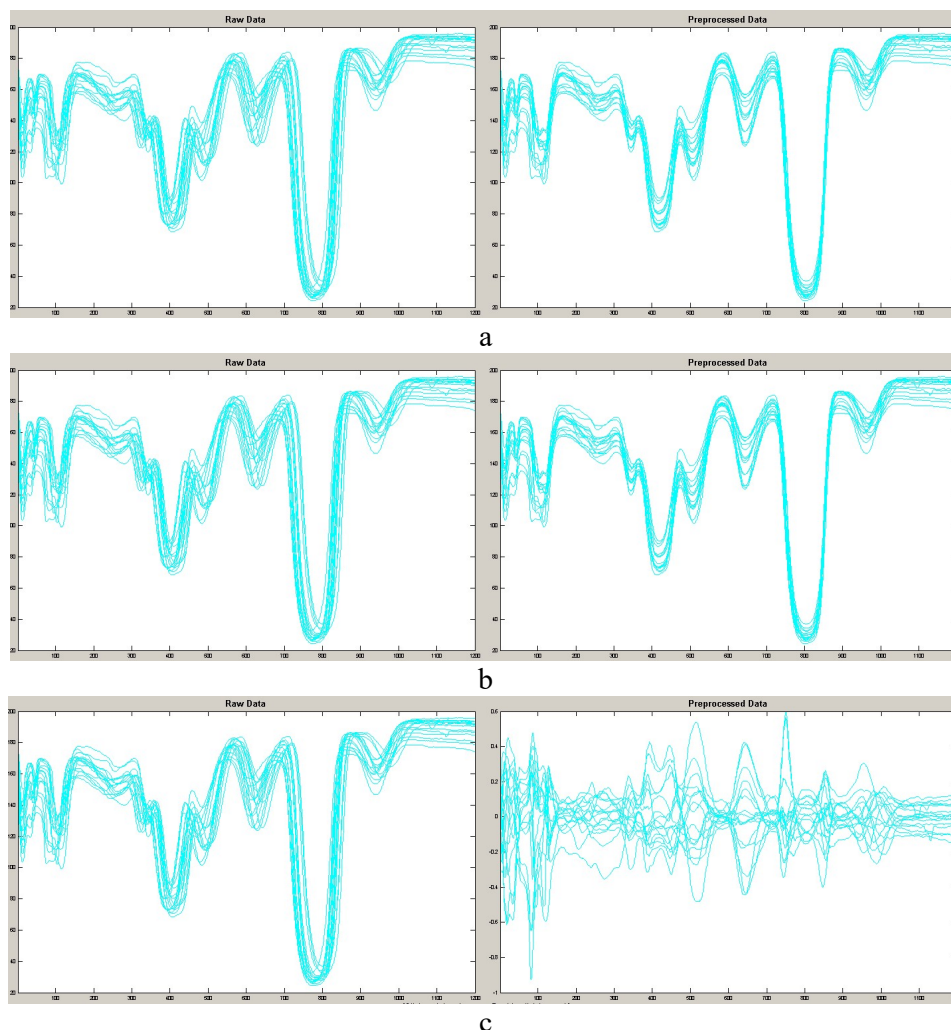
Klasifikaciona i predikciona sposobnost dobijenog modela se ocenjuju na osnovu sledećih parametara: (1) R^2_{cal} , koeficijent determinacije, odnosno ukupna varijansa zavisne promenljive y za kalibracioni set, R^2_{CV} , deo ukupne varijanse zavisne promenljive y koji je rezultat unakrsne validacije, R^2_{pred} , deo ukupne varijanse zavisne promenljive y koji je rezultat predikcije i (2) RMSEC (*Root Mean Square Errors of Calibration*), koren srednjeg kvadratnog odstupanja za kalibracioni set, RMSECV (*Root Mean Square Errors of Cross-Validation*), koren srednjeg kvadratnog odstupanja koje je rezultat unakrsne validacije i RMSEP (*Root Mean Square Errors of Prediction*), koren srednjeg kvadratnog odstupanja koje je rezultat predikcije.⁸⁷ Visoke vrednosti koeficijenata determinacije (R^2), vrednosti bliske jedinici, i niske vrednosti korena kvadratnog odstupanja (RMSE), sa što manjom međusobnom razlikom, ukazuju na visok kvalitet i predikcionu moć modela.

2.3.4 Priprema slika hromatograma i elektroforegrama za hemometrijsku analizu

Postoji nekoliko komercijalno dostupnih softvera koji se koriste prilikom obrade slike hromatograma/elektroforegrama, u JPEG ili TIFF formatu, i njenog prevođenja u matricu podataka koja se može upotrebiti u multivarijantnoj analizi, kao što su ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>), rTLC (<http://shinyapps.ernaehrung.uniessen.de/rtlc>) i JustTLC (<http://www.sweday.com/Products.aspx>). U okviru disertacije korišćen je ImageJ softverski paket, pa će o njemu biti više reči u daljem tekstu. ImageJ je besplatno dostupan program napisan u programskom jeziku Java, koji se koristi za obradu i manipulaciju digitalnih slika. Jednostavan je za upotrebu sa grafičkim okruženjem prilagođenim korisniku i može se koristiti za standardne geometrijske izmene slika kao što su sečenje, promena formata i rotacija, kao i za kompleksne izmene koje uključuju korekciju pozadine, filtriranje, poravnavanje i prevođenje u sivu skalu. Takođe, pruža mogućnost izvoza sirovih podataka, što je od posebnog značaja za dalju hemometrijsku analizu.⁸⁸ Primena ovog softvera za obradu slika hromatograma/elektroforegrama podrazumeva sledeće korake: (1) rotaciju slika hromatograma/elektroforegrama za 90°, (2) obeležavanje površine slike tako da obuhvati samo zone od interesa od startne mrlje do fronta rastvarača, (3) isecanje odgovarajućih hromatografskih ili gel traka za svaki ispitivani uzorak/standard, (4) podela slike kroz crveni, plavi i zeleni kanal u slučaju hromatograma gde su zone različite boje, odnosno prevođenje slike u sivu skalu u slučaju jednobojnih elektroforegrama, (5) crtanje profila koji predstavljaju zavisnost intenziteta zone u pikselima od rastojanja i eksportovanje podataka u Excel u cilju dalje obrade.

Primenom različitih filtera kao što su normiranje u odnosu na srednju vrednost, Gaussian, Wiener i median filter vrši se uklanjanje pozadine, smanjenje šuma, podešavanje bazne linije i korekcija pomeranja zona unutar ploče. Neke od ovih opcija su dostupne u okviru ImageJ softverskog paketa. Uklanjanje pozadine i korekcija bazne linije, koja može biti pomerena usled nehomogenog osvetljenja, su neophodni koraci u obradi slike i mogu se jednostavno izvesti u ImageJ programu primenom rolling ball filtera, čiji se prečnik podešava tako da se postigne zadovoljavajući kvalitet signala uz istovremeno sprečavanje gubitka značajnih informacija.⁸⁸ Za dalju obradu podataka koja prethodi multivarijantnoj analizi i podrazumeva poravnavanje, normiranje i centriranje podataka, koriste se algoritmi implementirani u softveru PLS ToolBox u okviru MATLAB paketa (**Slika 1**).

Pomeranje zona uzoraka unutar i/ili između ploča nastaje zbog neravnomernog zasićenja kade parama mobilne faze, neefikasnog sušenja nanetih zona, neujednačene vlažnosti i temperature, lokalnih promena stacionarne faze, instrumentalne nestabilnosti kao i zbog grešaka analitičara. Podaci se „poravnavaju” tako da signali koji potiču od istog jedinjenja nisu pomereni jedan u odnosu na drugi već su svedeni na istu R_F vrednost. U tu svrhu se najčešće koriste procedure poravnanja pikova (eng. *warping procedure*), kao što su korelacija optimizacije savijanja (eng. *Correlation Optimized Warping*, COW) i poravnanje signala (peak alignment) (**Slika 1a**). Normiranje podataka se primenjuje kako bi se uklonili neželjeni efekti nastali usled nejednakih količina uzoraka nanetih na stacionarnu fazu/gel, kao i da bi se vrednosti merene na različitim skalama podesile na zajedničku skalu. Normiranje nije obavezan korak i zato se preporučuje poređenje rezultata sa i bez normiranja. Najčešće korišćena tehnika za normiranje podataka je standardna normalna promenljiva (eng. *Standard Normal Variate*, SNV). Centriranjem svi podaci postaju jednako značajni, odnosno svode se na istu jedinicu. Normiranje podataka se može vršiti u odnosu na prosečan srednji intenzitet pika (mean centering) ili u odnosu na medijanu (median centering). Centriranje u odnosu na srednju vrednost je poželjna opcija u slučaju kada su sve varijable na kojima se zasniva klasifikacija, izražene u istim jedinicama (**Slika 1b/c**).^{87,89} Opcija autoskaliranja, koja podrazumeva svođenje podataka na jediničnu standardnu devijaciju i nultu aritmetičku sredinu, se koristi u slučaju kvantitativnih podataka (na primer sadržaj polifenola, šećera ili metala u ispitivanim uzorcima).



Slika 1. Obrada slika hromatograma: a) „poravnavanje” pikova (warping), b) centriranje pojedinačnog pika, c) centriranje pikova hromatograma.

2.4 Gajeno i samoniklo voće

Duga tradicija gajenja voća i povoljna klima u Srbiji omogućavaju veoma uspešnu i raznovrsnu proizvodnju. Optimalni prirodni uslovi u pojedinim regionima zemlje doprinose dobrim rezultatima u pogledu kvaliteta i prinosa za mnoge sorte voća. Shodno tome, voćarstvo je veoma važna grana poljoprivrede, koja čini oko 11% od ukupne poljoprivredne proizvodnje u našoj zemlji. Proizvodnja jagodastog voća za potrebe tržišta na ovim prostorima je počela tridesetih godina dvadesetog veka, dok je danas prema petogodišnjem izveštaju Republičkog zavoda za statistiku prinos maline 5020 t/ha, kupine 5582 t/ha, a ostalog jagodastog voća 3104 t/ha (<https://www.stat.gov.rs/>).¹

Jagodasto voće predstavlja raznoliku grupu voćaka, čiji su plodovi intenzivno obojeni (zeleni, žuti, narandžasti, crveni, ljubičasti, plavi ili skoro crni), meke konzistencije i malih dimenzija, zbog čega se nazivaju i „sitno voće”. Neke vrste jagodastog voća imaju plodove tipa bobice, zbirne koštunice, zbirne orašice ili sinkarpne koštunice, koji nastaje i od plodnika i razrastanjem cvetne lože. Bobice (borovnica, ribizla, ogrozd, godži) mogu biti izgrađene od jedne ili više karpela, sa tankom pokožicom mesnatim delom (mezokarpom) unutar koga se nalaze semena. Zbirna koštunica je prisutna kod maline i kupine, i nastala je srastanjem više koštunica na zajedničkoj cvetnoj loži. Kod maline se koštunice odvajaju od cvetne lože, a kod kupine se ne odvajaju. Kod jagode je zbirna

orašica i predstavlja skup velikog broja ahenija koje su utisnute na površini razrasle, sočne i jestive cvetne lože. Aronija ima plod tipa sinkarpne koštunice, kao kod jabučastih vrsta voćaka. Jagodasto voće, u koje se ubrajaju jagoda, kupina, malina (crna i crvena), ogrozd, aronija, borovnica, ribizla (crna, crvena i bela), ogrozd i aronija je predmet sve većeg broja istraživanja, zbog odličnog ukusa, niske kalorijske vrednosti i visokog sadržaja bioaktivnih jedinjenja.^{6,90}

Iako se sveže jagodasto voće kratko čuva, podložno je mehaničkim povredama i mikrobiološkim promenama, kao i isušivanju, njegova mala masa, zapremina i konzistencija čine ga veoma lakim za pakovanje, prodaju, kupovinu i upotrebu. Može se konzumirati u svežem obliku, ali se može i konzervirati u vidu sokova, sirupa, kompota, slatkog, džemova, mermelada, kandiranog voća, želea, pirea, likera i sladoleda.⁹¹ Jagodasto voće i proizvodi njegove prerade su dobar izvor dijetetskih vlakana, ugljenih hidrata, fenolnih jedinjenja, karotenoida, tanina, mineralnih supstanci, masnih kiselina i vitamina.⁹² Zbog navedenog nutritivnog sastava i potencijalnih zdravstvenih koristi, ovo voće se sve više upotrebljavaju kao funkcionalna hrana u prevenciji različitih hroničnih oboljenja.^{5,93}

Srbija predstavlja i dobar genofond divljih srodnika gajenih vrsta (samoniklo voće), sa preko sto divljih voćnih vrsta klasifikovanih u 15 porodica i 26 rodova.⁹⁴ Podatak da postoji više od sto različitih samoniklih vrsta voćaka klasifikovanih u veliki broj taksonomskih kategorija, ukazuje na njihovu genetsku i biološku različitost, koja je nastala kao posledica prilagodljivosti na brojne ekološke faktore. Divlje (autohtone) vrste se definišu kao vrste koje su prilagođene uslovima života na određenom geografskom području i njihovo prisustvo u tim regionima je rezultat samo prirodnih procesa, a ne delovanja ljudi. Iako su prilagođene uslovima životne sredine u kojoj rastu, klimatske promene i negativan trend u očuvanju životne sredine svakako imaju uticaj na njihov opstanak. Biotički i abiotički stres kojem su divlje vrste izložene dovode do njihove odbrambene hemijske adaptacije, podstičući potencijalno složeniji fitohemijski sastav divljeg voća u poređenju sa gajenim.⁹⁵ Različiti genotipovi samoniklih vrsta voćaka stvoreni u prirodnim uslovima su razvili brojne osobine koje su vrlo korisne za oplemenjivanje kultivisanih voćaka, kao što su otpornost na sušu, visoke temperature i mraz, otpornost prema patogenim izazivačima bolesti i štetočinama, lakša adaptacija na nepovoljne uslove zemljišta i redovan i kvalitetan prinos.⁹⁶

Zbog otpornosti prema bolestima i štetočinama, samonikle voćne vrste mogu se koristiti kao donori gena u oplemenjivanju voćaka i vinove loze. Određeni broj samoniklih srodnika gajenih vrsta voćaka bi mogao imati primenu i kao podloga za proizvodnju voća ili za plantažnu organsku ili konvencionalnu proizvodnju, malog ili velikog obima. Različite samonikle voćne vrste se mogu koristiti u pejzažnom projektovanju i hortikulturnoj proizvodnji kao ukrasne forme, pošumljavanju i popunjavanju goleti, prevenciji erozije, proizvodnji drveta, u pčelarstvu kao pčelinje paše i za druge namene.⁹⁶ Zahvaljujući sve većem interesovanju potrošača za prirodnim proizvodima, samoniklo voće bi moglo pored gajenog da se implementira u proizvodnju novih prehrambenih proizvoda, koji bi zadovoljili parametre funkcionalne hrane.

2.5 Morfologija, značaj i primena semena gajenog i samoniklog voća u metabolomičkoj studiji procene autentičnosti

Seme je primarni reproduktivni organ koji se razvija iz semenog zametka nakon oplodnje, a čija je uloga održavanje i rasprostiranje vrste. Osnovni delovi semena su semenjača, klica i hranljivo tkivo. Semenjača je spoljašnji omotač semena koji se formira iz intergumenata semenog zametka i pruža mehaničku i hemijsku zaštitu semena. Klica, odnosno embrion, predstavlja začetak nove biljke koji se nalazi u semenu, dok je hranljivo tkivo izvor rezervnih supstanci neophodnih u početnim fazama razvoja klice. Seme se može koristiti za proizvodnju generativnih podloga, kao i pri stvaranju novih sorti hibridizacijom.^{97,98} Važna funkcija semena je da deluje kao izvor energije i hranljivih supstanci za novu biljku, zbog čega ono ima vrlo složen fitohemijski sastav. Seme se obično nalazi

unutar mesnatog mezokarpa i konzumira se zajedno sa plodom, zbog čega je važna njegova potpuna hemijska karakterizacija.

S druge strane, velike količine semena voća dobijaju se svake godine iz prehrambene i poljoprivredne industrije kao neiskorišćeni otpad.⁹⁹ Efikasno korišćenje ovog nusproizvoda u preradi hrane moglo bi da reši problem odlaganja industrijskog otpada i ostvari potencijalni ekonomski profit. Ranija istraživanja su pokazala da ekstrakti komine maline mogu da povećaju stabilnost mesnih proizvoda usled dužeg skladištenja, tako što inhibiraju oksidaciju lipida, a istovremeno i obogaćuju proizvod bioaktivnim fitohemikalijama.⁹⁹ Lima i saradnici su pokazali da se brašno semenki džekfruta (*Artocarpus heterophyllus*) može koristiti kao zamena za komercijalno brašno u izradi peciva, zbog dobre termičke stabilnosti.¹⁰⁰ Koredu (Correddu) i saradnici su proučavali sadržaj fenolnih jedinjenja i antioksidativnu aktivnost semena i perikarpa bobica mirte (*Mirtus communis*), dobijenih kao otpad nakon proizvodnje likera od ove voćne vrste.¹⁰¹ Rezultati dobijeni u ovom istraživanju pokazali su da iskorišćene bobice mirte imaju visoku koncentraciju ugljenih hidrata, proteina i lipida, ukazujući da semenke imaju veći nivo hemiceluloze, celuloze i lipida od perikarpa i bobica. Lipidna frakcija je imala visoku koncentraciju polinezasićenih masnih kiselina, od kojih je linolna kiselina najvažnija masna kiselina u semenu. Najveća koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja i najveća antioksidativna aktivnost određene su takođe u semenu bobice. Ova studija je ukazala na važnost iskorišćenja nusproizvoda, koji mogu imati višestruku industrijsku primenu, kao funkcionalna hrana ili u formulacijama za stočnu hranu.¹⁰¹

Voćna komina (mešavina pulpe, kože, semena i stabljike) zaostala nakon proizvodnje pića od jabuke i jagodastog voća, stvara ozbiljne tehničke i ekološke probleme zbog lake kvarljivosti.¹⁰² Za rešavanje ovog problema preporučuje se upotreba komine i drugih otpadaka prerade voća za proizvodnju stočne hrane, kao potencijalni izvor biomase u proizvodnji biogoriva ili se može transformisati procesom kompostiranja u bio-đubrivo.¹⁰³ U većini slučajeva, otpad od prerade voća sadrži mnogo veće količine vrednih bioaktivnih jedinjenja od samog voćnog soka.¹⁰² Komina od jabuke i jagodastog voća se može koristiti kao aditiv u formulaciji pekarskih i mlečnih proizvoda u cilju obogaćivanja njihovog sadržaja prirodnim antioksidansima i dijetetskim vlaknima. Pored toga, prisustvo prirodnih pigmenata i isparljivih komponenata može poboljšati senzorna svojstva finalnog proizvoda.

Pored prehrambene industrije gde se može koristiti u proizvodnji prirodne funkcionalne hrane, aditiva za hranu i dijetetskih suplemenata, visoka biološka aktivnost semena jagodastog voća ukazuje i na njihovu potencijalnu upotrebu u kozmetičkim i farmaceutskim proizvodima.¹⁰⁴ Seme maline sadrži do 12,2% proteina, dok se sadržaj ulja kreće u opsegu 11 – 23%. Ova ulja (dobijena hladnim presovanjem, bez rafinisanja) imaju jedinstvene karakteristike i aromu, zbog čega su našla primenu u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji.^{105,106}

2.6 Hemijski profil semena voća

Seme gajenog i samoniklog voća ima jedinstven fitohemijski sastav koji nije dovoljno ispitan, jer se najveći deo dostupne literature odnosi na mesnati i sočan deo ploda. Seme voćaka akumulira velike količine hranljivih supstanci, poput šećera, proteina i lipida (primarnih metabolita), neophodnih za početni rast biljke, a dodatno proizvodi i specifične sekundarne metabolite. Seme jagodastog voća je bogato uljem, koje u poređenju sa drugim biljnim uljima ima visok sadržaj polinezasićenih masnih kiselina i povoljan odnos $n - 6/n - 3$ masnih kiselina.¹⁰⁷ Pored navedenih prednosti, seme ovog voća je dobar izvor karotenoida, vitamina i bioaktivnih fenolnih jedinjenja koja pokazuju antioksidativna svojstva. Seme se smatra i dobrim izvorom mineralnih elemenata, pre svega kalijuma, kalcijuma, magnezijuma, gvožđa, mangana, bakra i fosfora. Sva ova jedinjenja zajedno imaju sinergistički i multifunkcionalni efekat na ljudsko zdravlje.¹⁰⁸

Hemijski sastav voća određen je nizom faktora, kao što su biljno i geografsko poreklo, ishrana biljke, vreme berbe, način proizvodnje (gajeno i samoniklo) i uslovi životne sredine. Samonikle vrste

voćaka su za razliku od gajenih voćaka izložene većim biotičkim i abiotičkim stresovima, što dovodi do povećane sinteze fitohemikalija sa zaštitnom ulogom, zbog čega se smatra da imaju veću biološku vrednost.⁹⁵ Iz navedenih razloga, hemijski profil velikog broja samoniklih i gajenih voćnih vrsta je kompleksan, heterogen i zahtevan za analizu.

2.6.1 Lipidi

Lipidi su biomolekuli heterogene prirode sa različitim hemijskim strukturama i važnim biološkim ulogama u živim sistemima. Mogu se koristiti kao izvor energije prilikom razvoja biljke, imaju strukturnu i zaštitnu ulogu i učestvuju u prenosu nervnih impulsa. Seme predstavlja skladište lipida u biljkama (uglavnom u obliku triacilglicerola) koji su izvor energije za rast klice u procesu klijanja semena. Hidrolizom triacilglicerola se dobija energija potrebna za sintezu šećera, aminokiselina i ugljeničnih lanaca neophodnih za rast embriona. U poređenju sa ugljenim hidratima, oksidacijom lipida dobija se dvostruko veći sadržaj energije. Saharoza je regulatorni faktor u proučavanju mehanizma metabolizma lipida, jer se koristi i kao supstrat za biosintezu lipida u toku razvoja semena, a nastaje i kao krajnji proizvod razgradnje lipida.¹⁰⁹

Metabolizam lipida i njihov nivo u semenu tokom klijanja su određeni hidrolitičkim enzimima lipazama. Mobilizacija skladišnih lipida u procesu klijanja semena počinje hidrolizom estarskih veza triacilglicerida dejstvom lipaza, pri čemu nastaju slobodne masne kiseline i glicerol. Zatim dolazi do β -oksidacije masnih kiselina i formiranja acetil-koenzima A, nakon čega počinje gliksilatni ciklus koji je regulisan dejstvom pet enzima (citrat-sintaza, malat-sintaza, izocitrat-liaza, akonitaza i malat-dehidrogenaza). Nastali sukcinat se transportuje do mitohondrija gde se pretvara u malat putem Krebsovog ciklusa, dok se malat nakon transporta u citoplazmu, pretvara u oksaloacetat. Konačno, procesi glukoneogeneze i sinteze šećera predstavljaju oblik transporta ugljenika, posebno kod klijanja semena.¹⁰⁹

Klasifikacija lipida se može izvršiti na osnovu njihove polarnosti (polarni i nepolarni), porekla, fizičkih svojstava na sobnoj temperaturi (masti i ulja), složenosti njihove hemijske strukture (proste i složene) i na osnovu njihove funkcije u organizmu. U proste lipide se ubrajaju masti, ulja i voskovi, koji nastaju esterifikacijom alkohola sa masnim kiselinama. U zavisnosti od broja masnih kiselina vezanih za glicerol u mastima i uljima, razlikuju se mono-, di- i triacilgliceroli. Za razliku od prostih, složeni lipidi pored masnih kiselina i alkohola sadrže i ostatke fosforne kiseline (fosfolipidi) i šećernu jedinicu (glikolipidi).

Karakterizacija ulja izolovanog iz biljnog semena najčešće podrazumeva određivanje lipidnog profila u pogledu zastupljenosti određenih klasa nepolarnih (mono-, di-, triacilglicerola, slobodnih masnih kiselina i sterolestara) i polarnih lipida i njihovog masno-kiselinskog sastava. Ovako dobijeni lipidni profil se koristi kao osnova za nutritivnu procenu biljnog ulja.¹¹⁰

Triacilgliceroli su najzastupljeniji neutralni lipidi u ulju semena voća i njihova nutritivna vrednost je određena pozicionom distribucijom masnih kiselina. Razlike u sastavu masnih kiselina između proučavanih frakcija lipida mogu se pripisati različitim fazama biosinteze acilglicerola i polarnih lipida i faze biosinteze i akumulacije masnih kiselina. Polarni fosfolipidi se prvi sintetišu, a zatim se u sledećoj fazi akumuliraju triacilgliceroli. Prva fazu takođe karakteriše visoka koncentracija zasićenih masnih kiselina koje se akumuliraju u fosfolipidima, dok se u drugoj fazi sintetišu nezasićene masne kiseline koje se skladište prvenstveno u triacilglicerolima. Takođe, studije su pokazale da su membranski fosfolipidi podložniji oksidaciji u poređenju sa emulgovanim triacilglicerolima.¹¹⁰

Biljna ulja pored jedinstvenog profila masnih kiselina sadrže i specifične komponente u tragovima, kao što su fitosteroli, tokoferoli i karotenoidi, odgovorne za senzorna i antioksidativna svojstva ovih ulja. Fitosteroli dokazano smanjuju nivo holesterola kod ljudi i imaju antiinflamatorna, antivirusna i antikancerogena svojstva.¹¹¹ Sadržaj fitosterola u ulju semena jagodastog voća veći je

nego sadržaj fitosterola u ulju masline, soje i suncokreta. Profil fitosterola je jedinstven za određene biljne vrste, čak iako su proizvedene u različitim uslovima, što može biti koristan parametar za procenu njihove autentičnosti.⁷ Ranija istraživanja su pokazala da je udeo semena u svežim uzorcima jagodastog voća iz familije Rosaceae od 4,4% do 12,2%, dok sadržaj lipida ovog semena varira između 6,9% i 23,2% u odnosu na suhu masu uzoraka.¹¹²

2.6.2 Masne kiseline

Masne kiseline su gradivne jedinice lipida, koje nastaju sintezom iz acetilkoenzima A kao osnovnog supstrata. Najčešće sadrže paran broj atoma ugljenika i mogu biti zasićene i nezasićene. Zbog raznovrsnosti masnih kiselina, stepena nezasićenosti, geometrije i položaja dvostrukih veza, njihov sastav je važna karakteristika ulja i može se nazvati profilom masnih kiselina ili „otiskom prsta“ posmatranog ulja.¹¹³

Ulje semena jagodastog voća ima visok sadržaj polinezasićenih masnih kiselina, pri čemu su najzastupljenije linolna (C18:2, n-6) i α -linoleinska kiselina (C18:3, n-3). Ove polinezasićene masne kiseline zajedno sa mononezasićenim masnim kiselinama čine preko 90% ukupnih masnih kiselina u uljima semena jagodastog voća, sa mnogo povoljnijim n-6/n-3 odnosom u poređenju sa većinom uobičajeno konzumiranih biljnih ulja. Preporučeni odnos ovih masnih kiselina u ishrani je 4:1, i većina do sada ispitanih ulja semena gajenog i samoniklog voća zadovoljava ovaj uslov i mogu se koristiti kao dobra alternativa konvencionalnim biljnim uljima u proizvodnji funkcionalne hrane.^{7,112} Polinezasićene masne kiseline sa 18, 20 i 22 atoma ugljenika spadaju u esencijalne masne kiseline koje se ne mogu sintetisati u našem organizmu poznatim hemijskim putevima, ali su neophodne za njegovo normalno funkcionisanje i zato se moraju unositi putem ishrane. Dokazano je da njihovo konzumiranje smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti i reguliše metabolizam lipoproteina. Pored linolne (42–61%) i α -linoleinske kiseline (18–37%), u ulju semena kupine, maline, borovnice i jagode koja su bila predmet raznih studija, sledeća po zastupljenosti je mononezasićena oleinska kiselina, čiji sadržaj se kreće u opsegu od 15% do 21%. Za uzorke semena crne ribizle karakteristično je prisustvo γ -linolne kiseline (C18:3, n-6), čiji sadržaj se kreće u opsegu 15-20%. Visok sadržaj ove masne kiseline je negativno korelisan sa sadržajem α -linoleinske kiseline, ukazujući na kompetitivnu inhibiciju $\Delta 6$ i $\Delta 15$ desaturaza. Najzastupljenije zasićene masne kiseline u ulju semena jagodastog voća su palmitinska i stearinska.¹¹² Pored dominantnih masnih kiselina, u biljnim uljima su određene i palmitoleinska, 11-eikozenonska, 11,14-eikozenonska, laurinska, miristinska, margarinska, arahidinska i druge.¹¹⁰ Iako su prisutne u manjim količinama, značajno doprinose karakterizaciji različitih biljnih vrsta i definisanju njihovog jedinstvenog masno-kiselinskog profila, koji se može koristiti u proceni autentičnosti proizvoda nastalih preradom voća. Sastav masnih kiselina u semenu određene biljne vrste je jedinstven i konstantan, pa se može smatrati fenotipskim obeležjem genotipova. Ukoliko dođe do promene njihovog sastava, to može biti pokazatelj poremećaja metabolizma biljke.¹¹⁴ Razlike u sastavu masnih kiselina se mogu objasniti i geografskim poreklom, klimatskim uslovima, uslovima uzgoja, genetskim razlikama među vrstama, fazama zrelosti semena, kao i izborom metode ekstrakcije.

Ispitivanjem masno-kiselinskog profila gajenih i divljih borovnica, uočeno je da je sadržaj zasićenih masnih kiselina manji u divljim formama (7,32 - 8,37%) nego u gajenim (do 17,93%). Mononezasićene masne kiseline bile su uglavnom predstavljene oleinskom kiselinom i njihov sadržaj se nije značajno razlikovao između uzoraka gajenog i samoniklog voća. U slučaju polinezasićenih masnih kiselina najzastupljenije su bile linolna i linolenska kiselina, pri čemu je sadržaj linolenske kiseline bio veći kod uzoraka samoniklih genotipova, dok je sadržaj linolne kiseline bio veći u uzorcima gajene borovnice. Odnos zasićenih i nezasićenih masnih kiselina u uzorcima samoniklih genotipova se kretao u opsegu 0,098 – 0,11, dok je u gajenim borovnicama ovaj odnos kretao od 0,14 do 0,28.¹¹²

Sadržaj slobodnih masnih kiselina (*eng. free fatty acids*, FFA) u biljnim uljima se koristi kao prvi parameter procene njihovog kvaliteta. Ranije studije rađene na uljima semena jagodastog voća su pokazale da se sadržaj slobodnih masnih kiselina, izražen kao ekvivalenti oleinske kiseline u procentima, kreće u opsegu od 0,5 do 1,5%. Kako nema definisanih smernica za kategorizaciju novih ulja, koristi se postojeća kategorizacija kvaliteta za maslinovo ulje, prema kojoj se ulja izolovana iz semena jagodastog voća mogu svrstati u kategoriju ekstra devičanskih uja (sadržaj FFA < 0,8%) i devičanskih (sadržaj FFA < 2%), dok svakodnevna ili obična ulja imaju sadržaj FFA < 3,3%.⁷

2.6.3 Šećeri

Šećeri su primarni metaboliti nastali u biljkama u procesu fotosinteze. Nivo šećera u biljnim ćelijama, njihov transport, korišćenje i skladištenje su precizno regulisani i određeni fiziološkom aktivnošću ćelije i biljnih organa, uslovima životne sredine i razvojnem fazom biljke.¹¹⁵ Oni imaju ulogu izvora energije i ugljenika kod biljaka i to od procesa embriogeneze do procesa senescencije, gde uključuju odgovor biljke na stresne faktore iz životne sredine, deluju kao signalni molekuli koji regulišu međućelijsku komunikaciju i ekspresiju gena, učestvuju u sintezi drugih kompleksnih jedinjenja i koordinišu vitalne procese kao što su klijavost i razvoj semena i drugih biljnih organa.⁹²

Šećeri igraju ključnu ulogu u odbrambenim odgovorima biljaka na različite abiotičke i biotičke faktore stresa: sušu, salinitet, temperaturne promene, povrede biljnih delova ili infekcije različitim patogenima. Sposobnost biljke da reguliše nivo šećera u ćelijama može delovati kao kontrolni mehanizam, koji povezuje uticaj uslova životne sredine i unutrašnje razvojne procese koji se odigravaju u različitim biljnim delovima i direktno su regulisani fitohormonima. Šećeri se koriste kao glavni supstrati u procesu ćelijskog disanja, jer se njihovom oksidacijom obezbeđuje energija za ćelijske odbrambene odgovore protiv stresnih faktora. Takođe, obezbeđuju ugljenični skelet za sintezu odbrambenih jedinjenja uključujući sekundarne metabolite kao što su polifenoli, stilbeni i lignini.¹¹⁵

Pored arome, boje i konzistencije ploda, sadržaj šećera je jedan od glavnih parametara koji utiču na ukus voća i jedan od bitnih kriterijuma koji se razmatra prilikom procene nutritivne vrednosti voća. Sadržaj šećera u samoniklom i gajenom voću određen je genetskim faktorima, geografskim poreklom, primenjenim agrotehničkim merama prilikom gajenja, kvalitetom i sastavom zemljišta, uslovima životne sredine i starošću biljke.⁹² Najzastupljeniji i najčešće kvantitativno određivani šećeri u plodu jagodastog voća su glukoza, fruktoza i saharoza. Ipak, njihov međusobni odnos i koncentracije su promenljivi iz prethodno navedenih razloga. Ranije studije su pokazale da zbir glukoze i fruktoze čini oko 75% od ukupnog sadržaja šećera.¹¹⁶ Uglavnom niži sadržaj saharoze u poređenju sa glukozom i fruktozom može se objasniti enzimskom hidrolizom ovog disaharida u plodu nakon njegove translokacije iz lista. Ipak, zavisno od voćne vrste, razlikuje se i metabolizam ugljenih hidrata, pa uzorci jagode u poređenju sa uzorcima borovnice mogu imati značajno veći sadržaj saharoze. U ovom slučaju saharoza ima ključnu ulogu kao signalni molekul u sazrevanju jagode, koja nema klimakterično voće.⁹²

Pored glukoze, fruktoze i saharoze u plodovima samoniklog i gajenog voća određeni su i drugi manje zastupljeni šećeri i to (1) monosaharidi: galaktoza, riboza, ramnoza, arabinoza i ksiloza, (2) disaharidi: trehaloza, melibioza, maltoza i turanoza, (3) trisaharidi: rafinoza, izomaltotrioza, maltotrioza i panoza i (4) šećerni alkohol sorbitol.⁹² Sorbitol je glavni proizvod fotosinteze i primarni translokacioni šećer kod vrsta koje pripadaju familiji Rosaceae. Sintetiše se u listovima, odakle se floemom transportuje do ostalih biljnih organa. Ima značajnu ulogu kao izvor ugljenika u ranim fazama razvoja voća, utiče na kvalitet ploda i prilagođavanje biljaka osmotskom stresu. Metabolizam sorbitola je određen uslovima životne sredine. Pod uticajem abiotičkih stresnih faktora kao što je suša, dolazi do akumulacije sorbitola što snižava osmotski potencijal ćelija i omogućava osmotsko prilagođavanje biljaka. Sintiza sorbitola utiče i na sastav i odnos šećera i kiselina u plodu, a samim tim i na njegov kvalitet.¹¹⁷

Dobijanje kompletnog profila šećera je analitički zahtevnije zbog čestog nedostatka komercijalnih standarda, slične hemijske strukture i male zastupljenosti određenih saharida u uzorcima, ali je izuzetno značajno za karakterizaciju različitih biljnih vrsta i procenu njihove autentičnosti. Jagodasto voće i seme dobijeno njegovom preradom mogu biti i dobar izvor funkcionalnih oligosaharida, koji se ne mogu svariti enzimima prisutnim u ljudskim crevima, pa se mogu koristiti kao vlakna i prebiotici. Pored upotrebe u ishrani ili u vidu dijetetskih suplemenata koji mogu regulisati nivo glukoze u krvi, smanjiti nivo lipida i regulisati telesnu težinu, funkcionalni oligosaharidi su našli primenu i u farmaciji, kozmetici i agrohemiji.¹¹⁸

Za razliku od ploda, profil šećera semena samoniklog i gajenog voća je manje ispitan. Studije rađene na semenu breskve i kajsije su pokazale da su saharoza, glukoza i fruktoza najzastupljeniji šećeri, kao i da je profil šećera semena i ploda vrlo sličan.^{119,120} Saharoza je glavni saharid koji se transportuje iz fotosintetički aktivnih tkiva (potpuno razvijenih listova) preko floema do semena biljke. Kada dospe u seme saharoza može biti hidrolizovana pre upotrebe u metabolizmu ili se može koristiti kao izvor ugljenika za sintezu različitih oligo- i polisaharida. Razgradnja saharoze može biti katalizovana saharoza-sintazom pri čemu nastaju fruktoza i UDP-glukoza ili hidrolitičkim enzimom invertazom pri čemu nastaju glukoza i fruktoza. Heksoze nastale razgradnjom saharoze se mogu koristiti kao signalni molekuli koji regulišu razvoj biljke i ekspresiju gena.¹²¹

2.6.4 Proteini

Proteini su fundamentalni makronutritivni u ljudskoj ishrani, odgovorni za rast ćelija i za regenerativne mehanizme. Za procenu nutritivnog kvaliteta proteina nije ključan samo ukupan sadržaj proteina u sirovini, već i njihova svarljivost i aminokiselinski sastav. Proizvodnja proteina životinjskog porekla zahteva velike resurse i ulaganja i povezana je sa brojnim zdravstvenim rizicima. Iz navedenih razloga, sve veći broj naučnih istraživanja usmeren je ka pronalaženju alternativnih izvora proteina. Veliki izbor biljaka i biljnih organa kao što je seme, koji zaostaju kao nusproizvodi u prehrambenoj industriji, je dostupan za izolovanje proteina i njihovu dalju upotrebu.¹²² Studije funkcionalnih svojstava novih izvora proteina pružaju informacije o potencijalnoj efikasnosti proteina u prehrambenim proizvodima. Važna funkcionalna svojstva proteina za primenu u hrani su rastvorljivost, bubrenje i kapacitet zadržavanja vode/masti, emulgatorska aktivnost i kapacitet želiranja.

Na osnovu funkcije koju obavljaju u semenu biljaka, proteini su podeljeni na rezervne, strukturne i enzime koji regulišu metabolizam ćelija. Rezervni proteini se značajno akumuliraju u semenu u toku njegovog razvoja i njihova glavna uloga je snabdevanje energijom i skladištenje rezervi azota, ugljenika i sumpora, koji su neophodni tokom klijanja semena.¹²³ Različite faze razvoja biljke, uslovi životne sredine, stimulansi i stresni faktori mogu uticati na sastav proteina u biljkama. Ipak, studije rađene na semenu vrsta koje pripadaju porodici Rosaceae ukazuju na činjenicu da su proteini semena, za razliku od drugih biljnih delova, veoma stabilni i da ne podležu uticaju uslova sredine, te su stoga pogodni za primenu u taksonomskoj klasifikaciji biljaka. Proteinski profili biljaka dobijeni primenom SDS-PAGE elektroforeze uspešno su korišćeni u razjašnjavanju odnosa između određenih taksona, kao i u razgraničenju vrsta i rodova u različitim biljnim familijama.¹²⁴

Iako je poznat sadržaj proteina u semenu maline (12,2%)¹²⁵, komini zaostaloj nakon proizvodnje soka od maline (10,0%)¹²⁶, semenu peruanske jagode (8,1-13,7%)¹²⁷ i crne ribizle (19,4-22,5%)¹²⁸, profili proteina semena gajenog i samoniklog voća su bili predmet malog broja istraživanja.¹²⁹

Određivanje aminokiselinskog sastava u proteinima izolovanim iz semena crne ribizle pokazalo je da su najzastupljenije aminokiseline glutamin (17%), asparaginska kiselina (9%), arginin (8%) i leucin (6,1%). Na osnovu sastava aminokiselina vrši se procena biološke vrednosti i kvaliteta proteina u uzorcima semena voća u odnosu na parametre referentnog proteina iz celog jajeta. U ispitivanim uzorcima semena kupine biološka vrednost proteina semena crne ribizle iznosila je 68, dok je

biološka vrednost proteina celog jajeta 100. Kvalitet proteina semena crne ribizle je procenjen kao dobar, jer sadrži sve esencijalne aminokiseline u prilično uravnoteženom odnosu.¹²⁸

Poznavanje proteinskog sastava semena voća bi ukazalo na njegov nutritivni potencijal i mogućnost primene kao alternativnog izvora proteina sa povoljnim aminokiselinskim sastavom. Pouzdani biomarkeri dobijeni iz profila proteina semena mogu biti moćno sredstvo u autentifikaciji biljnog porekla.

2.6.5 Fenolna jedinjenja

Za razliku od prethodno opisanih proizvoda primarnog metabolizma (šećeri, lipidi i proteini) koji imaju fundamentalnu ulogu u rastu i razvoja biljaka, fenoli su sekundarni metaboliti biljaka značajni za njihovu ekofiziološku adaptaciju. U zavisnosti od strukture, mogu imati različite uloge u biljkama kao što je mehanička potpora, zaštita od štetnog UV sunčevog zračenja i prekomernog gubitka vode, antioksidativna i antimikrobna uloga, privlačenje oprašivača semena, odbrambena reakcija protiv biotičkih ili abiotičkih stresova i uticaj na organoleptička svojstva. Neka od ovih jedinjenja mogu da potisnu rast obližnjih konkurentskih biljaka ili da obezbede zaštitu od biljojeda i patogeni. Iz navedenih razloga prepoznati su kao vredni biljni molekuli sa veoma važnim biološkim funkcijama.¹³⁰

Fenolna jedinjenja se sintetišu uglavnom putem fenilpropanoidnog metabolizma, koji podrazumeva prisustvo prekursora koji nastaju pomoću dva glavna puta: put šikiminske kiseline i put malonske kiseline. Obuhvataju jednostavna jedinjenja sa jednim hidroksilovanim aromatičnim prstenom kao što su fenolne kiseline i kumarini do složenijih metabolita stilbena (dva aromatična prstena), flavonoida (tri prstena) i taninskih polimera. Biljke proizvode više od 10.000 fenolnih jedinjenja i većina njih su produkti metabolizma fenilpropanoida, koji potiču iz fenilalanina ili u manjoj meri iz tirozina. Najzastupljenija fenolna jedinjenja u biljnom materijalu su flavonoidi i fenolne kiseline.¹³¹

Fenolne kiseline pokazuju različite oblike biološke aktivnosti uključujući asimilaciju hranljivih supstanci, sintezu proteina, aktivnost enzima i fotosintezu. U zavisnosti od toga da li u bočnom nizu vezanom za fenolno jezgro sadrže jedan (C6-C1) ili tri ugljenikova atoma (C6-C3), dele se na derivate hidroksibenzoeve kiseline i derivate hidroksicimetne kiseline. Najzastupljeniji hidroksi-derivati benzoeeve kiseline su: *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, galna, protokatehinska, siringinska i gentizinska kiselina, koje su prisutne u biljkama u slobodnom obliku ili vezane u obliku glikozida. Pored slobodnih hidroksilnih grupa za aromatično jezgro mogu biti vezane i metoksi-grupe kao što je to slučaj kod vanilinske kiseline. Najzastupljeniji hidroksi derivati cimetne kiseline su: *p*-kumarinska, kofeinska, ferulinska i sinapinska kiselina koje su često prisutne u hrani kao estri sa hininskom kiselinom ili glukozom. Najpoznatiji estar kofeinske i hininske kiseline je hlorogena kiselina.¹³¹

Flavonoidi su jedinjenja sa fenil-benzopiranskim skeletom (C6-C3-C6), kod kojeg su dva benzenova prstena spojena preko heterocikličnog piranskog prstena. Flavonoidi su široko rasprostranjeni u biljnim vrstama, posebno u semenu biljaka gde se uglavnom nalaze vezani za šećerne komponente u obliku *O*-glikozida ili ređe *C*-glikozida. U zavisnosti od nivoa oksidacije piranskog C3 prstena, u biljkama su prisutni kao flavoni, izoflavoni, flavanoni, flavanoli, dihidroflavanoli, flavan-3-oli i njihovi oligomeri (proantocijaniini) i antocijanini.¹³¹

Plodovi samoniklog i gajenog voća su poznati kao dobar izvor fenolnih jedinjenja i zato je ispitivanje njihovog sastava, kao i uticaja upotrebe ovog voća na ljudsko zdravlje bilo predmet mnogobrojnih studija.^{108, 132-134} Povećan unos jagodastog voća može smanjiti rizik od poremećaja izazvanih reaktivnim vrstama kiseonika, uključujući rak, kardiovaskularne poremećaje i inflamatorne procese. Sinteza sekundarnih metabolita u biljkama je određena vrstom, genotipom, fiziologijom biljke, razvojnou fazom i faktorima sredine tokom rasta. Ovo ukazuje na činjenicu da su fiziološki

adaptivni odgovori koje koriste različite taksonomske grupe biljaka u suočavanju sa stresom i odbrambenim stimulansima specifični za taksonomski bliske grupe. Informacije o kvalitativnom i kvantitativnom sastavu fenolnih jedinjenja izolovanih iz semena ili drugih biljnih organa mogu poslužiti kao osnova za hemotaksonomsku klasifikaciju biljaka i utvrđivanje sličnosti i razlika između posmatranih taksona.¹³⁵

Najzastupljenija polifenolna jedinjenja određena u jagodastom voću su antocijanini (3-glukozidi delfinidina, cijanidina, malvidina i peonidina, kao i odgovarajući antocijanidini), derivati hidroksibenzoeve i hidroksicimetne kiseline, zatim flavonoli, katehini i tanini.¹³⁶ Antocijanini su obojeni pigmenti koji deluju kao moćni antioksidansi i posebno su zastupljeni u plodovima gajenih i samoniklih vrsta voćaka, čiji su plodovi zelene, žute, naranžaste, crvene, plave, ljubičaste ili skoro crne boje. Elaginska kiselina čini 50% ukupnih fenolnih jedinjenja velikog broja jagodastih vrsta, posebno iz roda *Rubus*, a najviše kod maline (*Rubus idaeus*) i može postojati u slobodnom obliku, u obliku glikozida, ili u vidu elagitanina (lambertianin C i sanguin H-6). Postoji poseban interes za elaginsku kiselinu zbog njenih potencijalnih hemopreventivnih, antiinflamatornih, antioksidativnih i antibakterijskih efekata.^{5,108} Pored elaginske kiseline, u plodovima gajenih i samoniklih vrsta voćaka određene su i *m*- and *p*-kumarinska, 3,4-dimetoksicinaminska, ferulinska, kofeinska, gentizinska, vanilinska, galna, hlorogena i protokatehinska kiselina.¹³³

Jagode, borovnice i aronija su bogati izvori flavon-3-ola, dok maline i borovnice imaju visok sadržaj tanina. Najveća količina kondenzovanih tanina sa visokim stepenom polimerizacije nalazi se u aroniji. Pod taninima se podrazumevaju kondenzovani nehidrolizovani tanini (proantocijanidini) i estri galne i elaginske kiseline definisani kao tanini koji se mogu hidrolizovati. Tanini igraju suštinsku ulogu u oblikovanju senzornih svojstava voća i voćnih proizvoda. Hidrolizujući tanini se ređe susreću, ali je njihovo prisustvo potvrđeno u jagodi, malini i kupini. Dok su proantocijanidini zastupljeni u borovnici i brusnici.⁵

Dostupna literatura se uglavnom odnosi na plod jagodastog voća, a manje na seme.^{4,137,138} Međutim, semenke jagodastog voća se obično nalaze unutar mesnatog mezokarpa (osim kod jagode gde su semenke na površini mesnatog dela) i u većini slučajeva se konzumiraju zajedno sa plodom. Njihov doprinos ukupnom sadržaju bioaktivnih jedinjenja i biološkoj aktivnosti jagodastog voća je oko 60–70%, što naglašava njihovu nutritivnu vrednost.⁴ Elagitanini, derivati galne ili elaginske kiseline, prisutni u semenu kupine i maline su pokazali značajan zaštitni efekat na DNK humanih limfocita, zahvaljujući svom snažnom antioksidativnom potencijalu većem od antioksidativnog potencijala čistih sintetičkih elagitanina. Pretpostavlja se da je visok antioksidativni potencijal ekstrakata semena rezultat sinergističkih efekata pojedinačnih jedinjenja prisutnih u semenu kupine/maline.^{137,138} Uzimajući u obzir zdravstvene koristi od konzumiranja semena jagodastog voća i povećanu potražnju na tržištu za procenom autentičnosti, postoji potreba za potpunom fitohemijskom karakterizacijom različitih vrsta i sorti. To bi ujedno ukazalo i na njihovu moguću primenu u proizvodnji prirodne funkcionalne hrane, aditiva za hranu i dijetetskih suplemenata, kao i u farmaceutskoj, kozmetičkoj industriji i industriji stočne hrane.

2.6.6 Elementalni sastav

Minerali su nutritijenti neophodni za rast, razvoj i pravilno funkcionisanje ljudskog organizma. Adekvatan unos mineralnih supstanci je esencijalan za održavanje opšteg zdravlja, kao i za prevenciju i lečenje različitih bolesti, kao što su demineralizacija kostiju, arterijska hipertenzija i ukupni kardiovaskularni rizik. Pošto organizam ne može da sintetiše esencijalne elemente i elemente u tragovima, oni se moraju redovno unositi u odgovarajućim količinama putem ishrane. Značajan deo ukupnog unosa elemenata u ljudski organizam se ostvaruje konzumiranjem voća, kao jednog od najboljih dijetetskih izvora bioaktivnih jedinjenja. Seme jagodastog voća se konzumira zajedno sa plodom, pa je poznavanje sadržaja esencijalnih elemenata i toksičnih metala u semenu ovog voća značajno za procenu njihovog doprinosa ukupnom dnevnom unosu metala.⁹⁴

Elementi koji imaju važnu ulogu (strukturnu ili kao aktivatori enzima) u vitalnim biohemijskim i fiziološkim funkcijama u živim organizmima prepoznati su kao esencijalni za život. Pored N, C, H i O za normalan rast i razvoj biljaka neophodno je još najmanje 13 makroelemenata i mikroelemenata, kojima se biljke snabdevaju iz vazduha, vode i zemljišta. Zemljište predstavlja glavni izvor makroelemenata u koje se ubrajaju N, P, K, Ca, Mg i S i mikroelemenata u koje spadaju Fe, Mn, B, Mo, Cu, Zn, Cl i Co.¹³⁹ Distribucija i translokacija mineralnih elemenata u semenu su važni procesi za njegov razvoj zbog činjenice da su ovi elementi uključeni u mnoge procese već od ranih faza razvoja embriona, kao što su održavanje integriteta membrane, regulisanje koncentracije hormona i regulacija sinteze ugljenih hidrata i proteina. Apsorpcijom vode u semenu, ovi elementi postaju veoma pokretni i dospevaju u različite regione embriona kao što je koren, da bi obezbedili neophodne uslove za rupturu endosperma i semenjače, poboljšavajući klijanje i rast biljke. Seme biljaka sadrži velike količine fosfora u organskom obliku, koji podržava rast tokom ranih faza razvoja biljke. U semenu se takođe akumuliraju mineralne hranljive supstance kao što su K, Mg, Ca, Fe, Zn, Cu i Mn koje su povezane sa održivošću semena i uključene su u sintezu proteina kao enzimski aktivatori. Fitinska kiselina deluje kao jak helator metalnih katjona u biljkama i vezuje ih u fitat, so inositol-heksakisfosfat. Tokom klijanja, fitat disosuje i hidrolizuje pomoću fitaza, a zatim se iz fitata oslobađaju neorganski fosfati, inozitol i minerali.¹⁴⁰

Seme voća je obično bogato vitaminima i mineralima, stoga je važna funkcija semena da deluje kao izvor energije i hranljivih supstanci za novu biljku. Klijanje semena kao rana faza razvoja biljke predstavlja period kada postoji povećana osetljivost na metale.¹⁴¹ Sadržaj elemenata u svim delovima biljke, uključujući i seme, zavisi od načina na koji biljke akumuliraju, distribuiraju, metabolišu i koriste mineralne supstance. Pored toga, mineralni sastav voća zavisi ne samo od vrste ili sorte, već i od uslova uzgoja kao što su tip zemljišta i geografsko poreklo. Naime, uočene su razlike među vrstama duda sa različitih područja na osnovu mineralnog sastava.¹⁴² Takođe je moguće razlikovanje samoniklog i gajenog voća na osnovu mineralnog profila. Divlje borovnice, koje rastu u prirodnim uslovima i nisu tretirane mineralnim đubrivima, su se pokazale kao bolji izvor Ca, Na i Mg, kao i Mn i Zn, u poređenju sa gajenim.¹⁴³ Pored sadržaja mineralnih supstanci prisutnih u samonikom i gajenom voću, njihova bioraspoloživost je važna za procenu nutritivnog potencijala voća. Dokazano je da određena biološki aktivna jedinjenja prisutna u godži bobicama, kao što su karotenoidi, fenolne kiseline i flavonoidi, mogu da heliraju jone Cu i Zn i na taj način poboljšaju njihovu biodostupnost u ljudskom organizmu.¹⁴⁴ Ispitivanje biodostupnosti esencijalnih elemenata u uzorcima kupine, maline, borovnice i jagode, ukazalo je na nižu biodostupnost Fe i Zn usled građenja nerastvornih jedinjenja sa fitatima i vlaknima prisutnim u voću, u poređenju sa Cu i Mn koji grade rastvorljive komplekse sa fitatima.¹⁴⁵

Poznavanje biodostupnosti, metabolizma i distribucije mineralnih supstanci u semenu različitih vrsta voća je od velikog značaja za procenu njegove biološke vrednosti i uticaja na ljudsko zdravlje. Na taj način bi se istovremeno podstaklo bolje iskorišćenje biootpada, zaostalog nakon prerade voća u prehrambenoj industriji. Pored toga, određivanjem mineralnog sastava semena voća mogu se definisati makroelementi i mikroelementi kao markeri autentičnosti biljnog i geografskog porekla.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 Uzorci semena voća

Istraživanje je obuhvatilo ukupno 74 uzorka semena voća, od toga 45 uzoraka vodilo je poreklo od gajenih sorti, a 29 uzoraka od samoniklih vrsta voćaka. Plodovi 9 različitih vrsta gajenih voćaka (**Tabela 1**) prikupljeni su tokom jedne sezone (leto/jesen 2014. godine), u komercijalnim zasadima čije su geografske koordinate (geografska širina i dužina) navedene u **Tabeli 1**. Tokom eksperimentalne godine prosečna dnevna temperatura je bila između 11 °C i 11,5 °C, dok je prosečna godišnja količina padavina bila oko 650 L/m². Pre sadnje, zemljište je adekvatno pripremljeno, izvršeno je suzbijanje korova i provera kiselosti tla. Rastojanje i dubina sadnje prilagođeni su svakoj voćnoj vrsti/sorti. Sve neophodne agrotehničke mere, kao što su rezidba, đubrenje i navodnjavanje, vršene su redovno i u skladu sa Direktivom o integrisanom upravljanju štetočinama 2009/128/EC. Sav sadni materijal kupljen je od sertifikovanih rasadnika koji su garantovali da je materijal razmnožen iz poznate matične biljke sa proverenim fitosanitarnim statusom, uz tvrdnju da je veran sortnom tipu (uz originalnu etiketu). Zasad jagoda organizovan je na podignutim duplim bankovima, prekrivenim crnom polietilenskom folijom. Borovnice su zasađene na podignutim lejama malčiranim agrotekstilom. Parcele sa malinom, kupinom, ribizlom, ogrozdom, aronijom, peruanskom jagodom i godžijem pripremljene su potpunom obradom zemljišta, gde je prostor između biljaka, unutar reda, bio ručno održavan. Svi voćnjaci su imali sistem za navodnjavanje „kap po kap” koji je korišćen i za fertigaciju. U proleće su biljke prihranjene sa NPK đubrivom (20:20:20) za stimulaciju vegetacije rasta, dok je formulacija NPK 11:11:33 korišćena u fazi orezivanja. Za jagode je korišćeno folijarno kalcijumovo đubrivo sa mikroelementima i aminokiselinama, dok su kod borovnica, u fazi zametanja i razvoja ploda, korišćeni amonijum- kalijum- i magnezijum-sulfat.

Seme samoniklog voća dobijeno je iz plodova 23 voćne vrste, koji su prikupljeni u istom periodu sa različitih lokacija u Srbiji (**Tabela 2**). U vreme berbe, nasumično je sakupljen uzorak od 50 potpuno zrelih plodova. Ubrane bobice su bile tipičnog oblika i boje, neoštećene i bez znakova bolesti.

Seme gajenog i samoniklog voća je ručno odvojeno od mezokarpa neposredno nakon branja, oprano, osušeno na vazduhu do konstantne mase i usitnjeno u fini prah primenom analitičkog mlina sa tečnim azotom (A 11 basic Analytical mill, IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen/ Germany), u cilju povećanja dodirne površine uzoraka semena radi efikasnije ekstrakcije ispitivanih jedinjenja. Tako pripremljeni uzorci čuvani su u plastičnim bočicama, na sobnoj temperaturi do analize.

Tabela 1. Spisak ispitanih uzoraka semena gajenog voća.

Oznaka uzorka (GV)	Voćna vrsta/Porodica	Sorte	Zemlja porekla	Pedigre	Geografske koordinate mesta prikupljanja uzoraka
1	Malina/Rosaceae <i>Rubus idaeus</i>	Glen Ample	Škotska	Kompleksna ukrštanja koja uključuju sorte Glen Prosen i Meeker	44°45'11.4"N
2		Meeker	SAD	Willamette × Cuthbert	20°35'08.0"E
3		Tulameen	Kanada	Nootka × Glen Prosen	
4		Willamette	SAD	Newburgh × Lloyd George	
5	Ogrozd/ Grossulariaceae <i>Ribes uva-crispa</i>	Hinnonmaki red	Finska	Nepoznat	44°45'11.4"N
6		Hinnonmaki yellow	Finska	Od divljeg ogrozda	20°35'08.0"E
7	Kupina/ Rosaceae <i>Rubus fruticosus</i>	Čačak's thornless	Srbija	Dirksen Thornless × Black Saten	44°42'59.2"N
8		Loch Ness	Škotska	Nepoznat	19°35'40.9"E
9	<i>Rubus allegheniensis</i>	Triple crown	SAD	Carbondale 47 × Arkansas 545	
10	Aronija/ Rosaceae <i>Aronia arbutifolia</i>	Nero	Češka	Nepoznat	44°10'10.8"N
11	Godži/ Solanaceae <i>Lycium barbarum</i>	Ningxia No 1	Kina	Nepoznat	20°28'44.0"E
12	Peruanska jagoda/ Solanaceae <i>Physalis peruviana</i>	Goldenberry	Peru	Nepoznat	44°37'11.3"N
13	Borovnica/ Ericaceae <i>Vaccinium corymbosum</i>	Bluecrop	SAD	GM-37 (Jersey × Pioneer) × CU-5 (Stanley × June)	20°06'30.2"E
14		Brigita blue	Australija	Nepoznat	44°11'35.3"N
15		Duke	SAD	(Ivanhoe × Earliblue) × (E 30 × E 11)	20°16'44.3"E
16		Patriot	SAD	LS3 × Earliblue	
17		Spartan	SAD	Earliblue × US 11–93	
18	Crna ribizla/ Grossulariaceae <i>Ribes nigrum</i>	Ben Nevis	Škotska	(Brödtrop × Janslunda) × (Consort × Magnus)	
19		Ben Sarek	Škotska	Goliath × Ojebyn	
20		Bona	Poljska	Öjebyn × S/12 (Ribes dikuscha × Climax)	
21		Čačanska crna	Srbija	Sadnica Malling Jet	
22		Malling Juel	Engleska	Nepoznat	44°39'00.0"N
23		Ojebin	Švedska	Nepoznat	20°14'15.4"E
24		Omata	Švajcarska	Westra × R. Nigrum	
25		Silmu	Holandija	Nepoznat	
26		Tenah	Holandija	(Goliath × R.n.) × R.n.) × Brödtorp	
27		Titania	Švedska	Altajskaja Desertnaja × (Consort × Kajaanin Musta)	
28		Triton	Švedska	Altajskaja Desertnaja × (Consort × Kajaanin Musta)	
29		Tsema	Holandija	(Goliath × R.n.) × R.n.) × Brödtorp	

Tabela 1. Nastavak.

Oznaka uzorka (GV)	Voćna vrsta/Porodica	Sorte	Zemlja porekla	Pedigre	Geografske koordinate mesta prikupljanja uzoraka
	Jagoda/ Rosaceae				
30	<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>	Sel.30.8	Italija	Nepoznat	
31		Capri	Italija	'CIVRI-30' × R6R1–26	
32		Albion	SAD	Diamante × Cal 94.16–1	
33		Alba	Italija	Honeoye × Tudla	
34		Premy	Italija	Nepoznat	
35		Asia	Italija	Maya × NF101	
36		Joly	Italija	Clery × Darselect	
37		Leatitia	Italija	Nepoznat	
38		Garda	Italija	Kompleksno ukrštanje koje uključuje sledeće sorte: Addie, Alba, Belrubi, Cardinal i Holiday	44°49'58.2"N 20°18'44.3"E
39		Clery	Italija	Sweet Charlie × Marmolada	
40		Roxana	Italija	Surprise des Halles × Senga Sengana	
41		Brilla	Italija	Kompleksno ukrštanje koje uključuje sorte: Alba, Brighton, Darselect, Cesena i Tribute	
42		Jeny	Italija	Nepoznat	
43		Irma	Italija	Don × sel. ISF 89.33.1.	
44		VR 4	Italija	Nepoznat	
45		Arosa	Italija	Chandler × Marmolada	

Tabela 2. Spisak ispitanih uzoraka semena samoniklog voća.

Oznaka uzorka (SV)	Voćna vrsta (latinski naziv)	Porodica	Lokacija	Geografske koordinate mesta prikupljanja uzoraka (geografska dužina/šrina/nadmorska visina)
1	Beli dud (<i>Morus alba</i>)	Moraceae	Novi Beograd	20°43'E/ 44°81'N/ 78
2	Beli glog (<i>Crataegus monogyna</i>)	Rosaceae	Novi Beograd	20°43'E/44°81'N/ 78
3	Burjan (<i>Sambucus ebulus</i>)	Adoxaceae	Planina Rudnik	20°32'E/ 44°07'N/ 635
4	Crni dud (<i>Morus nigra</i>)	Moraceae	Novi Beograd	20°43'E/ 4°81'N/ 78
5	Crni trn (<i>Prunus spinosa</i>)	Rosaceae	Jakovo	20°15'E/ 44°45'N/ 64
6	Crni trn (<i>Prunus spinosa</i>)	Rosaceae	Saranovo	20°51'E/ 44°13'N/ 250
7	Divlja borovnica (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	Ericaceae	Planina Golija	20°16'E/ 43°20'N/ 1100
8	Divlja borovnica (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	Ericaceae	Tara Planina	19°18'E, 43°54'N/ 1300
9	Divlja crvena ribizla (<i>Ribes alpinum</i>)	Grossulariaceae	Stara Planina, Radičevac	22°43'E, 44°01'N, 680
10	Divlja kupina (<i>Rubus caesius</i>)	Rosaceae	Suva Planina	22°10'E, 43°10'N, 900
11	Divlja dlakava kupina (<i>Rubus hirtus</i>)	Rosaceae	Golubac	21°37'E, 44°39'N, 179
12	Divlja malina (<i>Rubus idaeus</i>)	Rosaceae	Kopaonik	20°49'E, 43°16'N, 1200
13	Divlja trešnja (<i>Prunus avium</i>)	Rosaceae	Kušici	20°10'E, 43°50'N, 1000
14	Divlji ogrozd (<i>Ribes grossularia</i>)	Grossulariaceae	Stara Planina, Radičevac	22°43'E, 44°01'N, 680
15	Dunjarica (<i>Cotoneaster interrgerumis</i>)	Rosaceae	Stara Planina, Radičevac	22°43'E, 44°01'N, 680
16	Kleka (<i>Juniperus communis</i>)	Cupressaceae	Zlatar Planina	19°47'E, 43°24'N, 850
17	Orlove kandže (<i>Lonicera caprifolium</i>)		Planina Rudnik	20°32'E, 44°07'N, 635
18	Poljska ruža (<i>Rosa arvensis</i>)	Rosaceae	Suva Planina	22°10'E, 43°10'N, 1100
19	'Burnet' ruža (<i>Rosa spinosissima</i>)	Rosaceae	Uvačko jezero	19° 56' E, 43° 25' N, 985
20	Šipurak (<i>Rosa canina</i>)	Rosaceae	Planina Zlatar	19°47'E, 43°24'N, 1000
21	Svib (<i>Cornus sanguinea</i>)	Cornaceae	Planina Rudnik	20°32'E, 44°07'N, 635
22	Šimširika (<i>Berberis vulgaris</i>)	Berberidaceae	Beograd Zemun	20°41'E, 44°84'N, 79
23	Šumska jagoda (<i>Fragaria vesca</i>)	Rosaceae	Zlatibor	19°40'E, 43°38'N, 700
24	Tisa (<i>Taxus baccata</i>)	Taxaceae	Beograd-Zemun	20°41'E, 44°45'N, 79
25	Zova (<i>Sambucus nigra</i>)	Capryfoliaceae	Deliblatska Peščara	21°05'E, 44°53'N, 250
26	Crna udika (<i>Viburnum lantana</i>)	Adoxaceae	Nacionalni park Đerdap	22°31'E, 44°40' N, 320
27	Crvena udika (<i>Viburnum opulus</i>)	Adoxaceae	Tara Planina	19°18'E, 43°54'N, 700
28	Crni glog (<i>Crataegus nigra</i>)	Rosaceae	Stara Planina	21°99'E, 43°58'N, 513
29	Divlja peruanska jagoda (<i>Physalis sp.</i>)	Solanaceae	Ljig	20°14'E, 44°13' N, 210

3.2 Hemikalije i materijali

2-Aminoetil-difenilborinat (NTS) nabavljen je od firme Fluka (Steinheim, Germany), toluen, etil-acetat, aceton, *n*-heksan, FC reagens, azotna kiselina, kalijum-hlorid, amonijum-heptamolibat tetrahidrat, kalijum-hidroksid, hlorovodonična kiselina (37%, v/v) i vodonik-peroksid proizvodi su firme Merck (KGaA, Darmstadt, Nemačka), poliethilenglikol (PEG 400), cerijum(IV)-sulfat, natrijum-hidrogensulfat monohidrat, anhidrovani magnezijum-sulfat, natrijum-karbonat, metanol kao i sve hemikalije i ragensi korišćeni u elektroforezi su proizvodi kompanije Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemačka i St Louis, MO, USA), dok je mravlja kiselina nabavljena od kompanije

Kemika (Zagreb, Hrvatska). Ultračista voda ($0,055 \mu\text{S/cm}$, *ThermoFisher TKA MicroPure*, Niederelber, Nemačka), je korišćena za pripremu ekstrakata i standarda. Filteri za špriceve (13 mm, PTFE membrane $0.45 \mu\text{m}$) su proizvedeni od strane firme *Supelco* (Bellefonte, PA, USA).

Standardi korišćeni za identifikaciju i kvantifikaciju masnih kiselina: Multikomponentni standard metil-estara masnih kiselina (*Supelco*® 37 Component FAME Mix, nabavljen od firme *Sigma-Aldrich*, Burlington, MA, USA), koga čine metil-estri miristinske kiseline ($\text{C}_{14}:0$, $t_R = 7,95$), palmitinske ($\text{C}_{16}:0$, $t_R = 9,30$), palmitoleinske kiseline ($\text{C}_{16}:1$, $t_R = 9,53$), margarinske kiseline ($\text{C}_{17}:0$, $t_R = 10,17$), *cis*-10-heptadekanske kiseline ($\text{C}_{17}:1$, $t_R = 10,46$), stearinske kiseline ($\text{C}_{18}:0$, $t_R = 11,23$), oleinske i elaidinske kiseline ($\text{C}_{18}:1$ (c+t), $t_R = 11,48$), linolelaidinske i linolne kiseline ($\text{C}_{18}:2$ (c+t), $t_R = 12,07$), γ -linolne kiseline ($\text{C}_{18}:3$ n-6, $t_R = 12,46$), α -linoleinske kiseline ($\text{C}_{18}:3$ n-3, $t_R = 12,90$), arahidinske kiseline ($\text{C}_{20}:0$, $t_R = 13,86$), 11-eikozenoinske kiseline ($\text{C}_{20}:1$, $t_R = 14,19$), *cis*-11,14-eikozadienske kiseline ($\text{C}_{20}:2$, $t_R = 14,94$) kao i još 22 masne kiseline, koje nisu identifikovane u ispitivanim uzorcima semena voća.

Standardi korišćeni za identifikaciju i kvantifikaciju šećera: glukoza (Glc), fruktoza (Fru), saharoza (Sac), trehaloza (Tre), maltoza (Mal), arabinoza (Ara) su nabavljeni od *Tokyo Chemical Industry, TCI* ((Zwijndrecht, Belgium); turanoza (Tur), ramnoza (Rham), gentiobioza (Gent), isomaltoza (Ism), panoza (Pan), rafinoza (Raf), izomaltotrioza (Ismt), maltotrioza (Malt), melibioza (Mel), ksiloza (Xyl), celobioza (Cel), melecitoza (Mels) i maltotrioza (Maltotri), maltotetroza (Maltotetr), maltopentoza (Maltopen), maltoheksoza (Maltohek), i maltoheptoza (Maltohep) su proizvedene u *Tokyo Chemical Industry, TCI* (Tokyo, Japan); sorbitol (Sor), eritriol (Ert), arabinitol (Arabt), manitol (Mant), i galaktitol (Glt) su proizvodi firme *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Nemačka). Za kvantifikaciju ugljenih hidrata korišćeni su osnovni standardni rastvori dobijeni rastvaranjem glukoze, fruktoze i saharoze u ultračistoj vodi tako da koncentracija dobijenih rastvora bude 1000 ng/mL , dok je koncentracija ostalih standardnih rastvora iznosila 100 ng/mL . Za dobijanje standardne serije radnih rastvora na osnovu kojih su formirane kalibracione prave, osnovni standardni rastvori su razblaženi u rasponu koncentracija od $0,9$ do 100 ng/mL , u zavisnosti od koncentracije u uzorku.

Markeri molekulskih masa korišćeni kod SDS-PAGE elektroforeze: fosforilaza B (94000 Da), albumin goveđeg seruma (66000 Da), ovalbumin (45000 Da), karbonatna dehidrataza (30000 Da), tripsin inhibitor (20100 Da), and α -laktalbumin (14400 Da).

Standardi korišćeni za identifikaciju i kvantifikaciju fenolnih jedinjenja: protokatehuinska kiselina, eskulin, gentizinska kiselina, katehin, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, galna kiselina, hlorogena kiselina, *p*-hidroksifenilsirćetna kiselina, kofeinska kiselina, eskuletin, vanilinska kiselina, siringinska kiselina, rutin, viteksin, polidatin, *p*-kumarinska kiselina, izokvercetin, apin, sinapinska kiselina, ferulinska kiselina, naringin, astragalin, apigetrin, florizin, koniferil aldehid, miricetin, luteolin, kvercetin, kampferol i narigenin su nabavljeni od kompanije *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Nemačka).

Standardi korišćeni za kvantifikaciju metala: Osnovni multielementalni rastvor u kojem je koncentracija određenih makroelemenata (Al, Ca, Fe, K, Na, Mg, S, i P) iznosila $0,5000 \text{ g/L}$ korišćen je za pripremu serije standardnih rastvora (ICP-OES merenja), dok je za ICP-MS merenja, serija standardnih rastvora napravljena od osnovnog multielementalnog rastvora, u kojem je koncentracija određenih mikroelemenata i elemenata u tragovima iznosila $1,0000 \text{ g/L}$ (*Thermo Fisher Scientific*, Kandel, Nemačka). Za proveru tačnosti i preciznosti instrumenta korišćen je standardni referentni materijal: ERM-CD281 (rye grass), Institut za referentne materijale i merenja (IRMM). Razlike između sertifikovanih vrednosti i kvantifikovanih koncentracija određivanih elemenata bile su ispod 10%. Rezultati određivanja sadržaja elemenata u referentnom materijalu su predstavljeni u **Tabeli 3**.

Tabela 3. Rezultati određivanja sadržaja elemenata u referentom materijalu.

Element	ERM-CD281 (rye grass)		
	Sertifikovana vrednost ± merna nesigurnost* (mg/kg)	Određena vrednost ± merna nesigurnost (mg/kg)	Recovery (%)
As	0,042 ± 0,010	0,040 ± 0,012	95,24
Cd	0,120 ± 0,007	0,125 ± 0,005	104,17
Cr	24,8 ± 1,3	24,2 ± 1,0	97,58
Cu	10,2 ± 0,5	10,0 ± 0,4	98,04
Hg	0,0164 ± 0,0022	0,0149 ± 0,0030	90,85
Mn	82 ± 4	80 ± 3	97,56
Ni	15,2 ± 0,6	15,0 ± 0,4	98,68
Pb	1,67 ± 0,11	1,65 ± 0,09	98,80
Zn	30,5 ± 1,1	31,2 ± 0,9	102,30
	Dodatne informacije o materijalu (g/kg)		
	Određena vrednost (g/kg)		
Ca	6,3	6,148	97,59
Fe	0,18	0,169	93,89
K	34	33,197	97,64
Mg	1,6	1,516	94,75
Na	4	4,135	103,38
P	2,8	2,751	98,25
S	3,4	3,309	97,32

*Merna nesigurnost za 95% interval pouzdanosti (vrednost faktora pokrivanja, $k = 2$).

3.3 Metode ekstrakcije fitohemikalija iz semena voća

Ekstrakcija lipida: Lipidi su iz semena voća ekstrahovani modifikovanom metodom po Folču (Folch).¹⁴⁶ Masa od 2 g uzorka ekstrahovana je sa 90 mL smeše rastvarača metanol : hloroform (1:2, v/v). Odmerenoj količini uzorka dodato je 30 mL metanola i sadržaj je ekstrahovan tokom 5 minuta na ultrazvučnom kupatilu, na sobnoj temperaturi. Zatim je dodato 60 mL hloroforma i ekstrakcija je nastavljena narednih 6 h. Ostatak semenki odvojen je od organske faze centrifugiranjem u toku 10 minuta na 7000 rpm i urađena je jedna reekstrakcija. Dobijene organske faze su spojene i isprane sa 50 mL 0,88% vodenog rastvora kalijum-hlorida, a zatim sa 50 mL smeše metanol : voda (1:1, v/v). Organski sloj je sušen anhidrovanim MgSO_4 , a zatim je rastvarač uparen do suva na rotacionim vakuum uparivaču pod sniženim pritiskom. Osušeno ulje semena je odmereno, rastvoreno u 4 mL hloroforma i čuvano u zamrzivaču ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) do upotrebe.

Esterifikacija masnih kiselina dobijenih iz ulja semena voća: Metil-estri masnih kiselina su pripremljeni brzom metodom transmetilovanja u alkalnim uslovima, primenom hladnog metanolnog rastvora kalijum-hidroksida, prateći ISO 12966-2:2017 standardnu metodu.¹⁴⁷ Ova brza metoda primenjiva je na rutinske analize masti i ulja koja sadrže masne kiseline počev od buterne kiseline (C4:0). Odmereno je oko 0,1 g ekstrahovanog ulja i rastvoreno u 2 mL *n*-heksana, u plastičnoj kiveti od 10 mL. Potom je dodato 1 mL metanolnog rastvora kalijum-hidroksida koncentracije 2 mol/L i sadržaj kivete je mešan na vorteksu tokom 2 minuta, na sobnoj temperaturi. Heksanski sloj je odvojen centrifugiranjem na 4000 obrtaja tokom 5 minuta i rastvor je osušen dodatkom 1 g soli natrijum-hidrogensulfata monohidrata. Nakon odvajanja sredstva za sušenje u vidu taloga, 1 mL heksanskog sloja je prenet u vijalu od 2 mL za analizu masnih kiselina. Dobijeni ekstrakti metil-estara masnih kiselina su pre analize razblaženi 100 puta (10 μL početnog ekstrakta razblaženo je do 1 mL sa *n*-heksanom).

Ekstrakcija šećera: Za ekstrakciju šećera odmereno je oko 0,1 g svakog uzorka i dodato je 10 mL ultračiste vode, nakon čega je sadržaj mešan u toku 30 minuta na ultrazvučnom kupatilu, na sobnoj temperaturi. Ekstrakti su centrifugirani 10 minuta na 8000 rpm, profiltrirani kroz 0,45 µm membranske PTFE filtere i u dobijenim filtratima je određen sadržaj ugljenih hidrata.

Ekstrakcija proteina: Nakon ekstrakcije lipidne frakcije i odmašćivanja uzoraka urađena je ekstrakcija proteina semena jagodastog voća sa Tris/HCl puferom prema ranije opisanoj proceduri.⁶⁰ Masa od 0,1 g odmašćenog uzorka ekstrahovana je sa 1 mL Tris/HCl pufera koncentracije 0,03 mol/L (pH = 8), koji je sadržavao 0,01 mol/L rastvora β-merkaptetanola, u toku 2 h na sobnoj temperaturi uz intenzivno mešanje na mehaničkoj mešalici. Sakupljeni supernatanti nakon centrifugiranja na 17000 g u toku 10 minuta (Sigma Aldrich 201M centrifuge, Osterode am Harz, Nemačka) su korišćeni za dalje spektrofotometrijske i elektroforetske analize.

Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja: Izmereno je oko 0,5 g uzoraka semena voća i dodato je 10 mL mešavine metanol - voda (70:30, v/v) zakišeljene sa 0,1% HCl. Ekstrakcija je vršena na ultrazvučnom kupatilu (Sonic, Niš, Srbija) u toku 30 min, a zatim je sadržaj centrifugiran 15 minuta na 8000 rpm (Thermo Scientific Centrifuge, SL 16, Massachusetts, USA). Ekstrakcije su izvedene u tri ponavljanja, supernatanti su sakupljeni i koncentrovani do suva korišćenjem rotacionog vakuum uparivača (IKA RV 05 basic Rotary Evaporator, Staufen, Nemačka) pod sniženim pritiskom na 35°C. Ostatak nakon uparavanja rastvoren je u 10 mL metanola i čuvan na 4°C. Uzorci su filtrirani kroz 0,45 µm membranske filtere (Siringe Filter, PTFE, Supelco) pre dalje analize.

Priprema uzoraka za analizu elemenata: Uzorci semena voća su za analizu elemenata pripremljeni metodom mokre digestije. Masa od oko 0,25 g svakog uzorka odmerena je u politetrafluoroetilenske (PTFE) kivete, koje su prethodno oprane potapanjem u 10% rastvor azotne kiseline u toku 12 h, a zatim ispirane destilovanom vodom. Potom je u kivete dodato 7 mL 65% azotne kiseline i 1 mL 30 % vodonik-peroksida. Digestija uzoraka je vršena tokom 6 h na temperaturi od 85 °C. Nakon završene digestije, uzorci su ohlađeni i kvantitativno preneti u normalne sudove zapremine 25 mL i razblaženi ultračistom vodom. Rastvor slepe probe je pripremljen prema istoj proceduri. Pripremljeni rastvori uzoraka su čuvani u frižideru (4°C) do analize.

3.4 Hemijska karakterizacija semena gajenog i samoniklog voća

3.4.1 Lipidni profil semena voća dobijen primenom visokoefikasne tankoslojne hromatografije

Optimizacija uslova u tankoslojnoj hromatografiji

Pregled mobilnih faza korišćenih tokom optimizacije hromatografskog sistema za razdvajanje lipida na tankom sloju, dat je u **Tabeli 4**. Kao stacionarna faza korišćen je silika gel 60 F254 nanet na aluminijske pločice (HPTLC plate silica gel 60, Art. 105547, Merck, Darmstadt, Nemačka). Za derivatizaciju hromatograma korišćen je rastvor cerijum-amonijum-molibdata (CAM), koji je nakon zagrevanja ploče dao plave zone na beloj podlozi.

Priprema reagensa za derivatizaciju (CAM): Odmereno je 40 g amonijum-heptamolibdata tetrahidrata i 1,6 g cerijum(IV)-sulfata i rastvoreno u 720 mL destilovane vode. Potom je ukapano 80 mL koncentrovane sumporne kiseline uz mešanje i hlađenje rastvora. Dobijen je bistar žuti rastvor, koji je čuvan u tamnoj staklenoj boci u frižideru, do upotrebe.

Tabela 4. Mobilne faze korišćene u optimizaciji hromatografskih uslova.

Tip hromatografije	Mobilna faza
1D	<i>n</i> -Heksan/dietil-etar/sirćetna kiselina (80:20:1)
1D	<i>n</i> -Heksan/dietil-etar/sirćetna kiselina (60:40:1)
1D	Hloroform/metanol/voda (65:25:4)
1D	Hloroform/aceton/metanol/sirćetna kiselina/voda (50:20:10:10:5)
MOD	Kupke i saradnici ¹⁴⁸
MOD	Vajt i saradnici (White) ¹⁴⁹
2D	1. smer hloroform/metanol/voda (65:25:4), 2. smer hloroform/aceton/metanol/sirćetna kiselina/voda (50:20:10:10:5)
2D	1. smer <i>n</i> -heksan/dietil-etar/sirćetna kiselina (70:30:1,5) 2. smer hloroform/metanol/voda (65:25:4)
2D	1. smer <i>n</i> -heksan/dietil-etar/sirćetna kiselina (60:40:1) 2. smer <i>n</i> -heksan/dietil-etar/sirćetna kiselina (80:20:1)
2D	1. smer Vajt i saradnici ¹⁴⁹ 2. smer <i>n</i> -heksan/dietil-etar/sirćetna kiselina (60:40:1)

1D- jednodimenzionalna, 2D-dvodimenzionalna, MOD- multi-jednodimenzionalna

Dvodimenzionalna TLC urađena je na pločicama koje su parcijalno impregnirane srebro-nitratom. U prvom smeru je korišćena multi-jednodimenzionalana tankoslojna hromatografija prema Vajtu i saradnicima ¹⁴⁹, a u drugom smeru kao mobilna faza je korišćena smeša: *n*-heksan/dietil-etar/sirćetna kiselina (70:30:1). Posle impregnacije, pločice su sušene na vazduhu tokom 30 minuta i aktivirane tokom 30 ili 60 minuta u sušnici na temperaturi od 110 °C.

Visokoeffikasna tankoslojna hromatografija

Pripremljeni ekstrakti lipida, zapremine 1 µL, naneti su na staklene ploče silika gela (HPTLC plate silica gel 60, Art. 105461, Merck, Darmstadt, Germany) upotrebom Linomata (CAMAG, Muttenz, Switzerland). Korišćene su ploče dimenzija 20×10 cm, zone su nanete u obliku traka širine 6 mm, a front rastvarača iznosio je 90 mm. Korišćeno je gradijentno eluiranje, uz upotrebu četiri mobilne faze prema sledećem redosledu: do 25 mm hloroform:metanol:sirćetna kiselina (90:10:1, v/v/v), do 70 mm *n*-heksan:dietil-etar:acetone (60:40:5, v/v/v), do 85 mm *n*-heksan:dietil-etar (97:3, v/v) i do 90 mm 100% *n*-heksan.¹⁴⁹ Hromatogrami su razvijani u hromatografskoj kadi sa dva kanala (CAMAG, Muttenz, Switzerland), zasićenoj parama rastvarača u toku 10 minuta. Nakon razvijanja svake mobilne faze, ploče su sušene u struji toplog vazduha. Hromatogrami su derivatizovani uranjanjem ploča u sveže pripremljeni rastvor cerijum-amonijum-molibdata. Pločice su potom osušene u struji toplog vazduha i zagrevane na 110 °C tokom 5 minuta. Dobijeni hromatogrami su snimljeni fotoaparatom i obrađeni upotrebom ImageJ programa, u cilju dobijanja podataka pogodnih za dalju statističku evaluaciju.

3.4.2 Profil masnih kiselina dobijen primenom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS)

GC-MS analiza je rađena upotrebom Thermo Fisher Focus GC polaris Q sistema sa TR-WAX-MS kapilarnom kolonom (Carlsbad, USA). Ekstrakti metil-estara masnih kiselina semena gajenog i samoniklog voća razdvojeni su na kapilarnoj HP-88 koloni (0,20 µm debljina filma, 30 m dužina kolone i prečnik 0,25 mm). Temperaturni program pećnice: inicijalna temperatura 50 °C (1 minut), zatim 25 °C/min do 200 °C i na kraju 3 °C/min do 230 °C (18 minuta).

Radni uslovi su bili sledeći: temperatura injektora, transfer linije i jonskog izvora redom 250 °C, 260 °C i 260 °C. Zapremina injektovanog uzorka bila je 1 µL, injektor je bio u split modu (50:1). Kao noseći gas korišćen je helijum sa brzinom protoka 1 mL/min. Vreme trajanja analize iznosilo je 35 minuta. Metil-estri masnih kiselina su identifikovani poređenjem retencionog vremena dobijenih signala u uzorcima sa retencionim vremenima standardnih supstanci iz multikomponentnog FAME standarda (**Tabela 5**), kao i analizom dobijenih masenih spektara uzoraka i standarda sa onima u NIST bazi podataka. Rezultati sadržaja masnih kiselina u uzorcima semena voća izraženi su kao relativni sadržaj (%), dobijen metodom unutrašnjeg normiranja. Polazeći od činjenice da ukupna površina svih eluiranih komponenata prisutnih na hromatogramu predstavlja 100%, izračunat je procenat površine svake od analiziranih masnih kiselina kao udeo površine odgovarajućeg pika u odnosu na zbir površina svih eluiranih pikova. Relativni sadržaj odgovarajućih metil-estara masnih kiselina predstavlja njihov maseni udeo u smeši svih eluiranih komponenata. Izraženi rezultati predstavljaju srednju vrednost dva ponovljena merenja za svaki analizirani uzorak. Ponovljivost merenja (izražena kao srednja vrednost relativne standardne devijacije) za komponente sa niskim sadržajem u uzorku (manje od 5%) bila je do 3%, dok je RSD za komponentne prisutne u uzorku u količini većoj od 5% iznosila između 1-2%.

Tabela 5. Spisak standarda korišćenih metil-estara masnih kiselina.

tr	Lipidni broj	Metil-estri masnih kiselina prisutni u standardu	Nazivi masnih kiselina
7,95	C14:0	Metil-tetradekanoat	Miristinska kiselina
9,30	C16:0	Metil-palmitat	Palmitinska kiselina
9,53	C16:1	Metil-palmitoleat	Palmitoleinska kiselina
10,17	C17:0	Metil-heptadekanoat	Margarinska kiselina
10,46	C17:1	Metil-estar <i>cis</i> -10-heptadekanske kiselina	<i>cis</i> -10-Heptadekanske kiselina
11,23	C18:0	Metil-oktadekanoat	Stearinska kiselina
11,48	C18:1 (c+t)	Metil-estari <i>cis</i> -9-olenske kiseline i <i>trans</i> -9-elaidinske kiseline	Oleinska kiselina i elaidinska kiselina
12,07	C18:2 (c+t)	Metil-estri linolelaidinske i linolne kiseline	Linolelaidinska kiselina i Linolna kiselina
12,46	C18:3 n-6	Metil-estar gama-linolne kiseline	γ-Linolna kiselina
12,90	C18:3 n-3	Metil-linolenat	α-Linoleinska kiselina
13,86	C20:0	Metil-arahidat	Arahidinska kiselina
14,19	C20:1	Metil- <i>cis</i> 11-eiokozenoat	11-Eiokozenoinska kiselina
14,94	C20:2	Metil-estar <i>cis</i> -11,14-eikozadienske kiseline	<i>cis</i> -11,14-Eikozadienska kiselina

3.4.3 Analiza profila šećera primenom visokoefikasne jonske hromatografije

Identifikacija i kvantifikacija ugljenih hidrata u ekstraktima semena voća urađena je primenom tečnog hromatografskog sistema ICS 3000 DP (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Sistem je opremljen sfernom anjon-izmenjivačkom kolonom CarboPac PA100 (dimenzija 4 × 250 mm, veličina čestica 8,5 mm) (Dionex) na 30 °C, koja je korišćena za hromatografsko razdvajanje šećera, ICS AS-DV 50 autosamplerom (Dionex) pomoću kojeg su uzorci injektovani (zapremina uzorka: 25 µL), CarboPac PA100 Guard kolonom (4×50 mm) kao pretkolonom za dodatno uklanjanje nečistoća i pulsni amperometrijskim detektorom (PAD). Mobilna faza se sastojala od 600 mmol/L natrijum-hidroksida (A), 500 mmol/L natrijum-acetata (B) i ultračiste vode (C), a korišćena je prema sledećem linearnom gradijentnom programu (brzina protoka, 0,7 mL/min): 0–5 min, 15% A, 85% C; 5,0–5,1 min, 15% A, 2% B, 83% C; 5,1–12,0 min, 15% A, 2% B, 83% C; 12,0–12,1 min, 15% A, 4% B, 81% C; 12,1–20,0 min 15% A, 4% B, 81% C; 2,0–20,1 min 20% A, 20% B, 60% C; 20,1–30,0 min 20% A, 20% B, 60% C. Sistem je prekondicioniran mobilnom fazom koja se sastojala od 15% A i 85% C,

tokom 15 minuta. Za detekciju šećera u uzorcima semena voća korišćen je elektrohemijski detektor, koji se sastojao od Ag/AgCl referentne elektrode i zlatne, radne elektrode. Softverski paket Chromeleon (verzija 6.80) je korišćen za kontrolu uređaja, dokumentovanje i analizu podataka. Parametar linearnog modela, koeficijent korelacije (R^2), standardna devijacija (SD), relativna standardna devijacija (RSD), granice detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) za svaki standard šećera korišćen za kvantifikaciju dati su u **Tabeli 6**. Rezultati sadržaja šećera u ispitivanim uzorcima su predstavljeni kao srednje vrednosti tri ponovljena merenja izražene u mg/g.

Tabela 6. Parametar linearnog modela, koeficijent korelacije (R^2), standardna devijacija (SD), relativna standardna devijacija (RSD), granice detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) za svaki standard šećera korišćen za kvantifikaciju.

Šećeri	Nagib	R^2	SD	RSD (%)	LOD (mg/g)	LOQ (mg/g)
Eritrol	1,234	0,9956	1,856	2,85	0,039	0,129
Glicerol	3,577	0,9986	1,086	2,96	0,053	0,175
Arabinitol	2,697	0,9963	2,356	3,02	0,047	0,155
Sorbitol	4,919	0,9990	1,842	2,41	0,027	0,089
Galaktitol	2,777	0,9945	1,986	3,68	0,035	0,116
Manitol	3,539	0,9951	2,893	3,41	0,039	0,129
Trehaloza	0,538	0,9991	1,365	4,02	0,043	0,142
Ramnoza	1,256	0,9987	3,256	4,65	0,062	0,205
Arabinoza	1,310	0,9993	2,965	1,02	0,044	0,145
Ksiloza	1,322	0,9987	2,441	1,42	0,057	0,188
Glukoza	1,224	0,9992	5,325	1,05	0,031	0,102
Fruktoza	1,094	0,9994	5,689	1,04	0,046	0,152
Melibioza	1,153	0,9978	4,214	3,56	0,062	0,205
Izomaltoza	1,249	0,9935	5,632	4,65	0,063	0,208
Saharoza	0,560	0,9990	3,211	4,52	0,029	0,096
Celibioza	0,719	0,9987	2,985	2,89	0,038	0,125
Melezitoza	0,606	0,9974	4,659	3,86	0,045	0,149
Gentiobioza	1,798	0,9962	5,332	4,03	0,052	0,172
Turanoza	3,459	0,9975	2,963	4,56	0,067	0,221
Rafinoza	1,008	0,9971	4,698	4,36	0,044	0,145
Izomaltotrioza	0,563	0,9941	5,896	4,33	0,187	0,617
Maltoza	0,676	0,9962	4,227	3,12	0,089	0,294
Panoza	0,703	0,9953	6,325	4,05	0,156	0,515
Maltotrioza	0,807	0,9948	5,356	4,68	0,073	0,241
Maltotrteraoza	0,567	0,9935	6,332	4,73	0,095	0,314
Maltopentaoza	0,591	0,9937	5,895	4,58	0,103	0,340
Maltoheksaoza	0,372	0,9921	6,056	4,86	0,128	0,422
Maltoheptaoza	0,317	0,9933	4,997	4,54	0,132	0,436

3.4.4 Određivanje sadržaja proteina i elektroforetski proteinski profil semena voća

3.4.4.1 Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja rastvorljivih proteina Bradfordovom metodom

Sadržaj ekstraktibilnih proteina određen je ranije opisanom Bradfordovom metodom.⁶⁷ Zapremina od 100 μ L pripremljenih ekstrakata proteina je pomešana sa 5 mL Bradfordovog reagensa i intenzivno mešana na vorteksu, a zatim ostavljena 20 min na sobnoj temperaturi. Sadržaj ukupnih

rastvorljivih proteina određen je spektrofotometrijski (UV-1800 Spektrofotometar, Shimadzu, USA), merenjem apsorbancije na talasnoj dužini od 595 nm. Albumin iz goveđeg seruma je korišćen za pripremu standardnih rastvora, na osnovu kojih je konstruisana kalibraciona kriva. Količina prisutnih proteina izračunata je metodom najmanjih kvadrata i izražena kao g BSA u 100 g suvog odmašćenog uzorka semena voća. Sva merenja su urađena u tri ponavljanja, a rezultat je izražen kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija.

Za pripremu Bradfordovog reagensa odmerena je masa od 100 mg boje Coomassie® brilliant blue G250 i dodato 50 mL 95% etanola, zatim 100 mL 85% fosforne kiseline i 850 mL destilovane vode. Ovako pripremljen reagens je čuvan na tamnom mestu i profiltriran pre upotrebe kroz Watman filter hartiju (WNo1).

3.4.4.2 Gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Natrijum-dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE) u redukujućim uslovima je izvedena prema metodi koju su opisali Fling i Gregerson.¹⁵⁰ Korišćen je vertikalni sistem za elektroforezu LKB-2001-100 sa gel pločama (dimenzije 145×155×1,5 mm) u kombinaciji sa izvorom napajanja LKB Macrodrive 5 i LKB-MultiTemp II kao rashladnom jedinicom (LKB, Upsala, Sweden), na konstantnoj temperaturi od 10 °C. Upotrebljen je 12,5% (w/v), pH 8,85 gel za razdvajanje i 5% (w/v) pH 6,80 gel za koncentrovanje, dok je Tris-glicin (pH = 8,3) korišćen kao radni rastvor pufera, koji čine 0,05 mol/L Tris, 0,19 mol/L glicin i 0,1% (w/v) SDS. Ekstrakti uzoraka semena su razblaženi puferom za uzorke pH 6,80 (0,055 mol/L Tris-HCl, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β -merkaptotanol, 0,0025% (w/v) bromfenolplavo, 7% (v/v) glicerol) do koncentracije od 0,25 mg proteina/mL i zagrejani u ključalom vodenom kupatilu u toku 5 minuta. Nakon hlađenja, 100 μ L svakog uzorka naneto je u bunare gela za elektroforezu. Elektroforeza je inicijalno rađena pri jačini struje od 30 mA, dok polipeptidi iz koncentrujućeg gela nisu prešli u razdvajajući gel, kada je jačina struje dostigla vrednost od 45 mA. Elektroforeza je rađena u toku 4 h, a potom su gelovi fiksirani i bojeni upotrebom prethodno pripremljenog 0,23 % (w/v) rastvora boje (Coomassie brilliant blue R250), koji je sadržao 3,90% (w/v) trihlorsirćetne kiseline, 17% (v/v) metanola i 6% (v/v) sirćetne kiseline. Za obezbojavanje gela i kontrastiranje proteinskih traka korišćen je rastvor 18% (v/v) etanola i 8% (v/v) sirćetne kiseline. Gelovi su skenirani i analizirani upotrebom SigmaGel programa (SigmaGel software version 1.1, Jandal Scientific, San Rafael, CA) i Image J programa. Sadržaj ekstrahovanih proteina izražen u %, izračunat je kao udeo površine identifikovanih polipeptida u odnosu na ukupnu površinu svih detektovanih polipeptida. Analiza je izvođena u dva ponavljanja za svaku gel elektroforezu i korišćenjem uzoraka iz dve nezavisne ekstrakcije proteina, a rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ponovljenih merenja.

3.4.5 Određivanje polifenolnog profila uzoraka semena samoniklog i gajenog voća

3.4.5.1 Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Ukupan sadržaj polifenola (*eng. Total Phenolic Content*, TPC) u analiziranim uzorcima određen je spektrofotometrijski (GBC UV-Visible Cintra 6 spektrofotometar, Dandenong, VIC, Australia) uz upotrebu FC reagensa i galne kiseline kao standarda, prema postupku opisanom u literaturi.¹⁵¹ Smeša od 0,5 mL ekstrakta uzorka i 0,5 mL ultračiste vode pomešana je sa 2,5 mL 10 % FC reagensa. Posle 5 min, dodato je 2 mL 7,5% vodenog rastvora natrijum-karbonata. Ovako dobijeni rastvor je inkubiran 2 h na sobnoj temperaturi na tamnom mestu, nakon čega je merena apsorbancija na talasnoj dužini od 765 nm. Galna kiselina je korišćena za pripremu standardnih rastvora koncentracija od 20, 40, 60, 80 i 100 mg/L, pomoću kojih je konstruisana kalibraciona kriva. Rezultati su izraženi kao g ekvivalenta galne kiseline po kilogramu osušenog uzorka (g GAE/kg). Sva merenja su urađena u tri ponavljanja, a rezultat je izražen kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija.

3.4.5.2 HPTLC fenolni profil

Za dobijanje fenolnog profila uzoraka gajenog i samoniklog voća primenjena je tehnika uzlazne visokoeфикаsne tankoslojne hromatografije. Alikvoti od 10 µL svakog ekstrakta semena voća naneti su na ploče silika gela 60 (dimenzije 20 × 10 cm) kao zone širine 8 mm, upotrebom TLC CAMAG Linomat 4 za automatsko nanošenje uzorka (CAMAG, Muttentz, Švajcarska). Ploče su razvijene u hromatografskoj kadi (CAMAG), primenom smeše toluen : etil-acetat : mravlja kiselina : voda (3:6:1:0,6, v/v/v/v) kao mobilne faze. Front rastvarača iznosio je 70 mm. Nakon hromatografskog razdvajanja, ploče su osušene u struji toplog vazduha i zagrejane 3 minuta na 100 °C (TLC Heater III, CAMAG), a zatim su uronjene u rastvor za derivatizaciju (0,5% rastvor etanolamin-difenilborata u etil-acetatu) u toku 1 sekunde sa brzinom uranjanja 3,5 cm/s (Chromatogram Immersion Device III, CAMAG). Nakon sušenja na vazduhu, ploče su ponovo uronjene u 5% rastvor polietilenglikola 400 u dihlormetanu, u cilju poboljšanja intenziteta fluorescencije i stabilizacije zona. Slike su snimljene na talasnoj dužini od 366 nm pomoću Digistore 2 (CAMAG) uređaja za analizu slika u kombinaciji sa Reprostar 3 (CAMAG) sistemom. Fotografije su sačuvane kao TIF datoteke za dalju obradu.

3.4.5.3 Identifikacija fenolnih jedinjenja primenom masena spektrometrije UPLC-LTQ OrbiTrap MS

Razdvajanje i identifikacija fenolnih jedinjenja iz uzoraka semena gajenog i samoniklog voća urađeni su primenom sistema za ultraefikasnu tečnu hromatografiju (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka) sa hibridnim masenim spektrometrom visoke rezolucije koji se sastoji iz linearne jonske zamke i Orbitrap analizatora. Sistem je opremljen *Synchronis* C18 analitičkom kolonom (100 × 2,1 mm, veličina čestica 1,7 µm), *Accela* autosemplerom i kvaternarnom *Accela* 600 pumpom. Sastav mobilne faze bio je sledeći: (A) voda i 0,1% mravlja kiselina i (B) acetonitril i 0,1% mravlja kiselina, koji su linearno gradijentno eluirani prema sledećem programu: 0,0–1,0 min 5% B, 1,0–14,0 min 5–95% B, 14,0–14,2 min od 95% do 5% B, zatim 5% B do 20 min.¹⁵² Brzina protoka mobilne faze bila je 0,3 mL/min, dok je zapremina injektovanog uzorka bila 5 µL. Elektrosprej jonizacija je izvedena u negativnom jonizacionom režimu, obuhvatajući opseg od 100 do 1000 *m/z*. Napon jonskog izvora bio je 5 kV, temperatura kapilara 300 °C, glavni i pomoćni protok gasa (N₂), 40 i 8 proizvodnih jedinica. Identifikacija fenolnih jedinjenja u uzorcima semena voća je izvršena na osnovu odgovarajućih spektralnih karakteristika: masenih spektara, tačne mase, karakterističnih obrazaca fragmentacije i karakterističnog vremena zadržavanja (retenciono vreme). Prisustvo pojedinih fenolnih jedinjenja je potvrđeno poređenjem dobijenih masenih hromatograma sa dostupnim standardima ili u slučaju nedostatka standarda poređenjem sa putevima MS fragmentacije datim u literaturi.¹⁵³⁻¹⁵⁸ Molekulske formule jedinjenja su dobijene na osnovu snimljenih monoizotopskih masa molekulskog jona, dok je analiza karakterističnih puteva fragmentacije ispitivanih jedinjenja korišćena za razjašnjavanje njihove strukture. ChemDraw softver za uređivanje molekula (verzija 12.0, CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA) i generički servis hemijske baze podataka ChemSpider (vww.chemspider.com) su korišćeni za izračunavanje tačnih masa ispitivanih jedinjenja. Xcalibur softver (version 2.1, Thermo Fisher Scientific) je korišćen za kontrolu instrumenta, kao i za prikljupljanje i obradu podataka.

3.4.5.4 Kvantifikacija fenolnih jedinjenja primenom masene spektrometrije UPLC-DAD MS/MS

Polifenolna jedinjenja u uzorcima semena voća su razdvojena i kvantifikovana primenom *Dionex Ultimate 3000 HPLC* sistema. Dati sistem je opremljen sa ultravioletnim detektorom sa većim brojem dioda (eng. *Diode Array Detector* – DAD) povezanim na *TSQ Quantum Access Max* maseni spektrometar sa detektorom sa tri analizatora - trostruki kvadrupol (*UPLC-DAD MS/MS*). Karakteristike analitičke kolone, sastav mobilne faze, gradijent eluiranja, brzina protoka mobilne faze

i injekciona zapremina su detaljno opisani u prethodnom odeljku koji se odnosi na kvalitativnu analizu fenola.

Korišćeni maseni spektrometar *TSQ Quantum Access Max* sa elektrosprej jonskim izvorom bio je zagrejan na temperaturu od 200 °C, napon elektrospreja iznosio je 5 kV, dok je temperatura korišćene kapilare bila 300 °C.¹⁵⁹ Snimanje masenog spektra je izvršeno u negativnom režimu unutar odabranog opsega (100 - 1000 m/z). Za sve standarde polifenola korišćene za kvantifikaciju snimljen je molekulski jon i dva fragmenta najjačeg intenziteta iz MS/MS spektra (**Tabela 7**). Za kontrolu instrumenta, dokumentovanje i distribuciju podataka korišćen je *Xcalibur* softver (verzija 2.2). Komercijalni standardi su korišćeni za identifikaciju polifenola. Količina prisutnih polifenolnih jedinjenja izračunata je metodom najmanjih kvadrata i izražena u mg/kg suvog uzorka.

Molekulski jon (m/z) i osnovni MS/MS fragmenti (m/z) sa kolizionim energijama (eV), regresioni parametri ($Y = A + BX$), koeficijent determinacije (R^2), granice detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) i SE – standardna greška, za svaki korišćeni standard polifenola dati su **Tabeli 7**.

Tabela 7. Molekulski jon (m/z) i osnovni MS/MS fragmenti (m/z) sa kolizionim energijama (eV), regresioni parametri ($Y = A + BX$), koeficijent determinacije (R^2), granice detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) i SE – standardna greška za svaki korišćeni standard fenola.

Jedinjenje	Molekulski jon, m/z	MS/MS fragmenti, m/z (Koliziona energija, eV)	$Y = A + BX (\times 10^5)$		R^2	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
			(A $\pm$ SE)	(B $\pm$ SE)			
Protokatehinska kiselina (PrA)	153,013	108,09(23); 109,10(14)	$-0,47 \pm 0,23$	$23,78 \pm 0,24$	0,9980	0,10	0,34
Eskulin (Esk)	339,080	133,09(44); 177,06(25)	$-0,41 \pm 0,32$	$113,24 \pm 0,34$	0,9999	0,01	0,05
Gentizinska kiselina (GA)	153,003	108,07(5); 109,10(15)	$-0,07 \pm 1,03$	$28,50 \pm 1,80$	0,9998	0,02	0,06
Katehin (Cat)	289,094	203,00(23); 245,03(31)	$-1,72 \pm 0,70$	$107,71 \pm 1,35$	0,9943	0,07	0,23
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina (HBA)	137,057	93,19(19); 108,33(22)	$-0,05 \pm 0,10$	$1,96 \pm 0,08$	0,9934	0,14	0,48
Hlorogena kiselina (CGA)	353,103	191,28(25)	$-2,32 \pm 1,13$	$286,00 \pm 2,08$	0,9997	0,02	0,07
<i>p</i> -Hidroksifenilsirćetna kiselina (HFA)	151,018	136,03(15); 92,11(22)	$0,73 \pm 0,26$	$6,53 \pm 0,22$	0,9944	0,20	0,67
Kofeinska kiselina (CA)	179,004	134,00(13); 135,00(16)	$0,20 \pm 1,60$	$417,02 \pm 3,24$	0,9997	0,02	0,07
Eskuletin (Ek)	176,992	150,25(20); 133,28(19)	$4,63 \pm 5,28$	$264,84 \pm 7,34$	0,9946	0,12	0,39
Vanilinska kiselina (VA)	167,018	152,02(15); 108,23(21)	$-1,68 \pm 2,39$	$77,11 \pm 2,33$	0,9945	0,18	0,60
Siringinska kiselina (SirA)	197,046	182,02(21); 153,02(16)	$-2,50 \pm 1,00$	$69,28 \pm 1,05$	0,9982	0,09	0,30
Rutin (Rut)	609,197	299,98(42); 301,20(32)	$-1,22 \pm 1,31$	$206,49 \pm 2,31$	0,9994	0,03	0,11
Viteksin (Vit)	430,999	311,06(27); 383,06(36)	$-5,94 \pm 3,42$	$196,63 \pm 8,86$	0,9919	0,09	0,29
Polidatin (Pld)	389,400	227,07(5); 185,20(32)	$-0,35 \pm 0,16$	$3,52 \pm 0,14$	0,9921	0,20	0,67
<i>p</i> -Kumarinska kiselina (CouA)	163,031	93,12(39); 119,09(16)	$1,43 \pm 0,50$	$4,17 \pm 0,12$	0,9977	0,07	0,22
Izokvercitrin (IsoQue)	447,316	300,96(20); 270,82(38)	$-0,31 \pm 1,48$	$157,16 \pm 1,56$	0,9992	0,06	0,20
Apin (Apn)	563,056	269,01(41); 461,16(28)	$-2,50 \pm 0,91$	$32,69 \pm 1,18$	0,9923	0,14	0,47
Sinapinska kiselina (SinA)	223,082	149,21(36); 151,42(29)	$0,00 \pm 0,03$	$2,56 \pm 0,07$	0,9984	0,04	0,14
Ferulinska kiselina (FA)	193,057	134,00(18); 178,00(15)	$0,08 \pm 0,08$	$10,07 \pm 0,21$	0,9933	0,15	0,50
Naringin (Nar)	579,241	151,42(43); 217,26(33)	$-0,64 \pm 0,48$	$112,09 \pm 0,91$	0,9939	0,08	0,27
Astragalin (Ast)	447,008	284,03(29); 255,03(43)	$-1,47 \pm 1,79$	$189,25 \pm 4,65$	0,9970	0,05	0,16
Apigetrin (Apg)	431,004	268,03(36); 239,11(53)	$2,21 \pm 2,17$	$194,34 \pm 4,19$	0,9972	0,06	0,20
Florizin (Plz)	435,149	273,16(20); 167,16(34)	$0,26 \pm 0,74$	$155,32 \pm 1,43$	0,9995	0,03	0,09
Koniferil aldehid (CA)	177,083	162,10(16); 134,12(22)	$-2,45 \pm 0,98$	$29,31 \pm 0,94$	0,9938	0,19	0,59
Miricetin (Myr)	317,052	109,31(45); 150,97(27)	$0,31 \pm 0,41$	$26,17 \pm 1,02$	0,9980	0,06	0,21
Luteolin (Lut)	285,035	133,06(36); 151,03(28)	$-4,34 \pm 2,99$	$423,84 \pm 5,75$	0,9991	0,04	0,13
Kvercetin (Que)	301,026	151,01(22); 179,00(20)	$-11,52 \pm 2,86$	$319,38 \pm 4,92$	0,9988	0,05	0,16
Naringenin (Narn)	271,036	151,01(20); 107,07(26)	$-1,13 \pm 0,37$	$49,01 \pm 0,72$	0,9991	0,04	0,13
Apigenin (Apgn)	269,032	151,00(26); 225,09(23)	$-4,31 \pm 0,76$	$192,40 \pm 1,46$	0,9997	0,02	0,07
Kampferol (Kfrl)	285,074	211,00(32); 227,00(32)	$-5,08 \pm 1,43$	$197,97 \pm 2,58$	0,9991	0,04	0,12

3.4.6 Analiza makroelemenata , mikroelemenata i elemenata u tragovima

Svi uzorci semena voća analizirani su u duplikatu, dok su koncentracije elemenata određene u tri ponovljena merenja. Koncentracija makroelemenata (Al, Ca, Fe, K, Na, Mg, S, i P) je određena primenom indukovano spregnute plazme sa optičkom emisionom spektrometrijom koju proizvodi Thermo Fisher Scientific, United Kingdom), model 6500 Duo, opremljen CID86 detektorom. Instrument ima optimizovano i aksijalno i radijalno posmatranje plazme. Eksperimentalni uslovi rada instrumenta primenjeni za analizu: radna RF snaga iznosila je 1150 W, glavni protok argona bio je 12 L/min, pomoćni protok 0,5 L/min, protok argona u raspršivaču iznosio je 0,5 L/min, dok je protok uzorka iznosio 1 L/min. Ceo sistem je kontrolisan upotrebom Iteva softvera (verzija 8). Odabrane talasne dužine analiziranih elemenata bile su: 308,2 nm (Al), 422,6 nm (Ca), 238,2 nm (Fe), 285,2 nm (Mg), 769,8 nm (K), 818,3 nm (Na), 718,2 nm (P) i 180,7 nm (S). Osnovni multielementalni rastvor u kojem je koncentracija određenih makroelemenata iznosila 0,5000 g/L korišćen je za pripremu serije standardnih rastvora. Parametar linearnog modela, koeficijent korelacije (r) i vrednosti granice detekcije i kvantifikacije (LOD i LOQ) za korišćene standarde elemenata ($\mu\text{g/L}$) koji su određeni upotrebom ICP-OES date su **Tabeli 8**.

Tabela 8. Parametar linearnog modela, koeficijent korelacije (r) i vrednosti granice detekcije i kvantifikacije (LOD i LOQ) za standarde elemenata određene upotrebom ICP-OES.

Element	Nagib	r	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
Al	3,024	0,9994	1,02	3,04
Ca	48,25	0,9985	0,54	1,69
Fe	15,47	0,9995	0,49	1,55
K	0,145	0,9997	85,65	250
Mg	214,68	0,9999	0,06	0,20
Na	0,163	0,9987	0,84	2,65
P	0,142	0,9999	8,32	26,11
S	0,116	0,9999	4,60	13,46

Koncentracije ostalih elemenata određene su upotrebom indukovano spregnute plazme sa masenim detektorom, iCAP Q proizvođača Thermo Scientific X series 2, United Kingdom). Ceo sistem instrumenta je kontrolisan pomoću softvera Qtegra Instrument Control Software (verzija 2.8.3170.392). Eksperimentalni uslovi rada instrumenta bili su sledeći: RF snaga 1548, protok gasa u L/min 13,9; 0,9; 0,8; vreme snimanja 3×50 s, snimanje je rađeno u tri ponavljanja, vreme zadržavanja bilo je 10 ns i korišćen je pulsni režim rada detektora. Izmereni su sledeći izotopi: ^{75}As , ^{136}Ba , ^{111}Cd , ^{59}Co , ^{50}Cr , ^{65}Cu , ^{202}Hg , ^{55}Mn , ^{62}Ni , ^{207}Pb , ^{86}Sr , ^{68}Zn . Serija standardnih rastvora elemenata za ICP-MS merenja napravljena je od osnovnog multielementalnog rastvora, u kojem je koncentracija određenih mikroelemenata i elemenata u tragovima iznosila 1,0000 g/L. Parametar linearnog modela, koeficijent korelacije (r) i vrednosti granice detekcije i kvantifikacije (LOD i LOQ) za korišćene standarde elemenata ($\mu\text{g/L}$) koji su određeni upotrebom ICP-OES date su **Tabeli 9**.

Tabela 9. Parametar linearnog modela, koeficijent korelacije (r) i vrednosti granice detekcije i kvantifikacije (LOD i LOQ) za standarde elemenata određene upotrebom ICP-MS.

Element	Nagib	r	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
⁵⁰ Cr	6096	0,9998	0,022	0,062
⁵⁵ Mn	107633	0,9995	0,036	0,114
⁵⁹ Co	76863	0,9998	0,001	0,003
⁶² Ni	3270	0,9996	0,116	0,390
⁶⁵ Cu	18548	0,9999	0,105	0,324
⁶⁶ Zn	26795	0,9997	0,138	0,512
⁷⁵ As	12027	0,9996	0,008	0,028
⁸⁸ Sr	168887	0,9998	0,067	0,201
¹¹² Cd	6480	0,9993	0,008	0,024
¹³⁷ Ba	117593	0,9999	0,016	0,047
²⁰⁴ Hg	8296	0,9992	0,041	0,128
²⁰⁸ Pb	92218	0,9998	0,024	0,084

3.4.7 Statistička obrada podataka

Statistička obrada prikupljenih podataka je obuhvatila prikazivanje elemenata deskriptivne statistike, KW test, Tuki test (*eng. Tukey test*), obradu slika hromatograma/elektroforegrama i njihovo prevođenja u matricu podataka i multivarijantu analizu, PCA i PLS-DA.

Elementi deskriptivne statistike izraženi pomoću numeričkih i grafičkih prikaza su dobijeni pomoću *Analysis toolpack* programskog dodatka u okviru programskog okruženja *Microsoft Office Excel*-a. KW jednofaktorska analiza varijanse rangova i Tuki post hoc test su urađeni upotrebom NCSS softverskog paketa za statističku analizu. SigmaGel softver verzija 1.1 je korišćena (Jandal Scientific, San Rafael, CA) za detekciju i kvantifikaciju specifičnih proteinskih traka. Obrada slika hromatograma/elektroforegrama je izvedena primenom ImageJ softverskog programa verzija 1.53e (National Institute of Health, Maryland, USA) koji je dostupan na sledećem linku <http://rsb.info.nih.gov/ij/> i algoritimima dostupnim u okviru PLS_Toolbox statističkog paketa (Eigenvectors Inc. v. 5.7) u okviru MATLAB verzije 7.4.0.287 (R2007a) (MathWorks INC, Natick, MA, USA). Navedni PLS_Toolbox softverski paket je korišćen i za PCA i PLS-DA multivarijantnu analizu podataka. Vrednosti Q i T² za Hotelingovu (Hotelling) raspodelu tokom PCA određeni su na 95% nivo značajnosti i korišćeni za utvrđivanje prisustva rezultata koji su posledica grubih grešaka, dok je PLS-DA izvedena korišćenjem SIMPLS algoritma. Optimalna složenost i pouzdanost rezultujućih PLS-DA modela je obezbeđena četvostrukom unakrsnom validacijom (CV) koja je izvedena primenom metode preklapanja (*Venetian blinds*).

Obrada slika u okviru ImageJ programa je obuhvatila korekciju pozadine korišćenjem FFT propusnog filtera, koja se primenjuje zbog neujednačenog osvetljenja i horizontalnih „linija skeniranja“, sa širinom od 40 piksela za veće strukture i 3 piksela za manje. Median filter sa širinom od tri piksela je korišćen za uklanjanje šuma. Za dalju obradu podataka koja podrazumeva poravnavanje, normiranje i centriranje podataka, upotrebljeni su algoritmi implementirani u softveru PLS ToolBox u okviru MATLAB paketa, koji su navedeni u nastavku:

Lipidni profil (HPTLC): Variable Alignment (COW: Segment Length = 50, Slack = 5, Target Sample - Auto), SNV, Mean Centre;

Masno-kiselinski profil (GC-MS): Variable Alignment (Peak Alignment: Slack = 5, Alignment Function= Iterative Polynomial = 0, Target Sample - Auto), SNV, Mean Centre;

Proteinski profil (SDS-PAGE): Variable Alignment (COW: Segment Length = 50, Slack = 5, Target Sample - Auto), SNV, Mean Centre;

Šećerni profil (HPAEC/PAD): Variable Alignment (COW: Segment Length = 50, Slack = 5, Target Sample - Auto), SNV, Median Centre;

Fenolni profil (HPTLC): Variable Alignment (COW: Segment Length = 50, Slack = 5, Target Sample - Auto), SNV, Mean Centre;

Elementalni profil (ICP-OES/MS): Autoskaliranje.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 Metabolomička procena autentičnosti semena voća

Traganje za specifičnim svojstvima određenog taksona je glavni zadatak procene autentičnosti. Hemijska struktura metabolita i njihovi biosintetski putevi su specifični i ograničeni na taksonomski srodne vrste i stoga korisni za karakterizaciju i klasifikaciju prirodnih proizvoda.¹³⁵ Hemotaksonomija, kao pristup klasifikaciji biljaka na osnovu njihovih hemijskih sastojaka, danas ima veliku primenu.

Sekundarni metaboliti se široko koriste za hemotaksonomsku klasifikaciju zbog velikih razlika u strukturi, zastupljenosti i funkciji.¹³⁵ Dokazano je da su glikozidi, alkaloidi, isparljiva ulja, flavonoidi, fenoli i terpenoidi dobri markeri porekla zbog svojih specifičnih funkcija i ograničene pojave u biljkama. Primarni metaboliti su, međutim, uključeni u fundamentalne metaboličke procese kao što su fotosinteza, asimilacija hranljivih supstanci i disanje i imaju suštinsku ulogu u rastu i razvoju biljaka i prilagođavanju stresu.¹⁶⁰ Oni su sveprisutni, retko specifični i stoga uglavnom neprikladni za metabolomičke studije.¹⁶¹

Zbog složene prirode biljaka, hemijski otisak prsta koji uspostavlja karakterističan hemijski obrazac ekstrakta je ponekad bolji pristup za procenu autentičnosti u poređenju sa ciljanom analizom koja je ograničena na kvantitativnu analizu klase jedinjenja koja su povezana sa specifičnim putem.¹⁶² Međutim, iako hemijsko profilisanje podrazumeva brzu analizu, velika količina podataka dobijenih iz profila zahteva naprednu analizu podataka, koja uključuje obradu signala i hemometriju, kako bi se iz dobijenih rezultata izvukla maksimalna količina korisnih informacija.

Metabolička procena autentičnosti semena samoniklog i gajenog voća ispitivanih u ovoj studiji izvršena je kroz:

- određivanje hemijskog sastava uzoraka: lipidni profil, sastav masnih kiselina, profil šećera, proteinski profil, fenolni profil i elementalni sastav;
- utvrđivanje veze između određenih hemijskih karakteristika semena i njegovog biljnog porekla koristeći metode multivarijantne analize;
- uporednu studiju korišćenih analitičkih tehnika za profilisanje metabolita i klasifikaciju uzoraka.

4.1.1 Lipidni profil

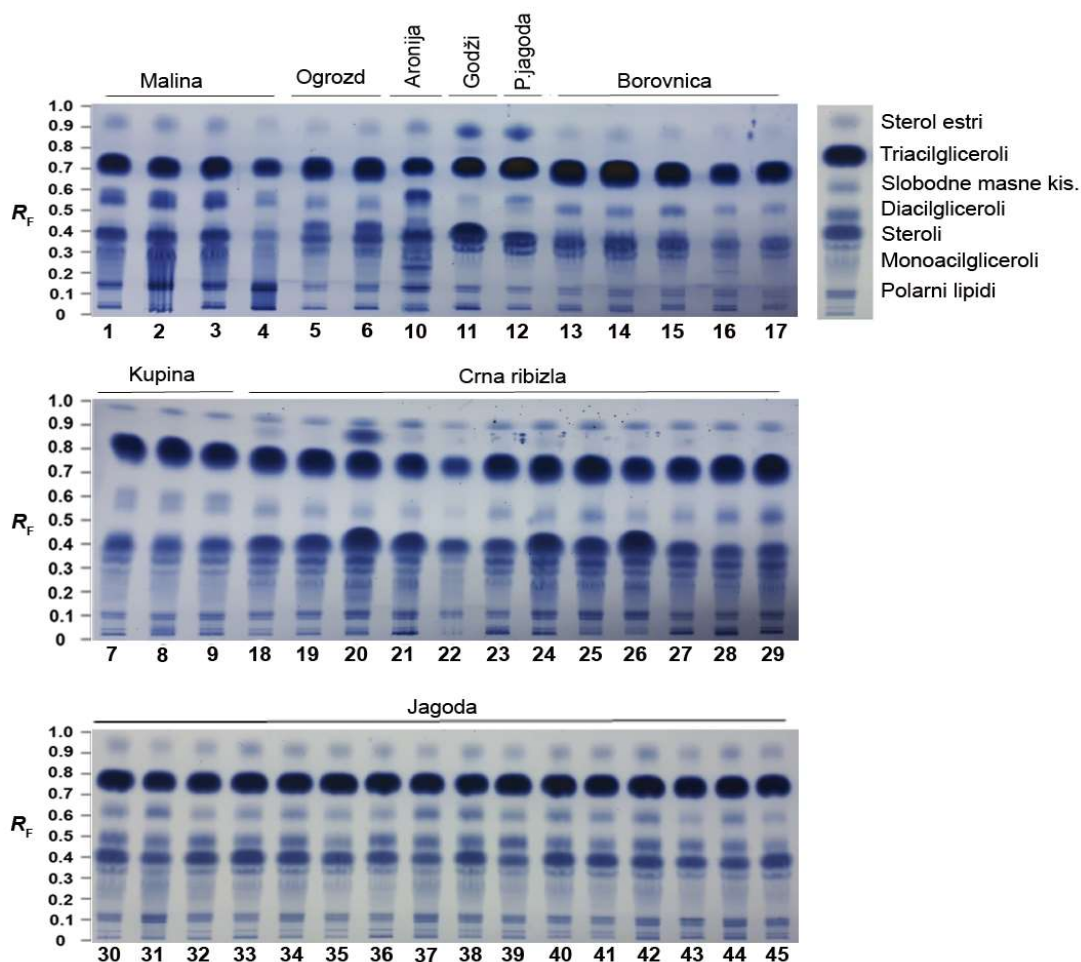
Kompletna karakterizacija lipidnog profila analiziranih semenki voća u cilju procene njihove autentičnosti izvršena je primenom visokoefikasne tankoslojne hromatografije. Zbog složenog sastava ekstrakata semena jagodastog voća, urađena je optimizacija hromatografskih uslova radi što boljeg razdvajanja slabo, srednje i veoma polarnih lipidnih jedinjenja (polarni lipidi - PL, monoacilgliceroli - MAG, steroli - ST, diacilgliceroli - DAG, slobodne masne kiseline - FFA (*eng. free fatty acids*), triacilgliceroli - TAG i sterolestri - SE). Optimizacija hromatografskih uslova je obuhvatila izbor mobilne faze i optimizaciju načina impregniranja pločica, kao i primenu jednodimenzionalne, multi-jednodimenzionalne i dvodimenzionalne hromatografije.

Mobilne faze, koje su se sastojale od smeše *n*-heksana, dietil-etra i sirćetne kiseline u različitim odnosima, su razdvojile neutralne lipide, ali nisu bile dovoljno polarne da bi razdvojile polarne lipide, već su oni ostajali na početnoj zoni. Nasuprot tome, mobilne faze u kojima su glavne komponente sadržale hloroform, metanol i vodu pokazale su se kao suviše polarne i nisu dovele do razdvajanja, već su sve komponente eluirane zajedno sa mobilnom fazom. Na osnovu dobijenih hromatograma zaključeno je da primena samo jedne mobilne faze ne može dobro razdvojiti i neutralne i polarne lipide. Razdvajanje ukupnih lipida pokušano je primenom više mobilnih faza u istom smeru, pri čemu

je svaka mobilna faza imala različitu polarnost i dužinu puta. S obzirom da su lipidi bogati dvostrukim vezama urađena je i hromatografska analiza gde je stacionarna faza impregnirana 5% i 10% vodenim rastvorom srebro-nitrata, kao i potapanjem pločice u 0,5% metanolni rastvor srebro-nitrata. Urađeno je razdvajanje i na parcijalno impregniranoj pločici, gde se u prvom smeru lipidi razdvajaju na klase, a u drugom se pojedine klase razdvajaju prema različitom broju nezasićenja. Iako su pokušani različiti načini impregnacije, u ovim uslovima nije došlo do razdvajanja u drugom smeru. Takođe, u uslovima dvodimenzionalne tankoslojne hromatografije moguće je razviti samo jedan uzorak po pločici. Primenom više mobilnih faza u istom smeru mogu se razdvojiti složene smeše lipida i moguće je naneti više uzoraka na pločicu. Zato je za razdvajanje lipida u uzorcima semena ispitivanog voća odabrana multi-jednodimenzionalna hromatografija uz upotrebu četiri mobilne faze prema sledećem redosledu: do 25 mm hloroform:metanol:sirćetna kiselina (90:10:1, v/v/v), do 70 mm *n*-heksan:dietil-etar:aceton (60:40:5, v/v/v), do 85 mm *n*-heksan:dietil-etar (97:3, v/v) i do 90 mm 100% *n*-heksan.¹⁴⁹ Izabrani sistem dao je veliki broj oštih traka, sa velikom efikasnošću razdvajanja i minimalnim pozadinskim signalom za sve biljne vrste i sve klase lipida. Identifikacija zona na hromatogramima bila je zasnovana na poznavanju polarnosti svih klasa lipida, kao i na poređenju sa ranije objavljenim rezultatima (R_F vrednosti za ispitivane klase lipida PL: ~0,11, MAG: 0,22 – 0,32, ST: 0,42, DAG: 0,48, FFA: 0,62, TAG: 0,75 i SE: 0,92).¹⁶³ Na **Slici 2** su prikazani hromatogrami ekstrakata lipida različitih vrsta gajenog voća. Dobijeni hromatogrami sačuvani su u jpeg formatu i zatim obrađeni primenom ImageJ programa prema proceduri detaljno opisanoj u Eksperimentalnom delu. Sirovi podaci su eksportovani u *Microsoft Excel*, gde su grafički predstavljeni kao zavisnost intenziteta sive boje od R_F vrednosti za svaku analiziranu vrstu voća (**Slika 3**).

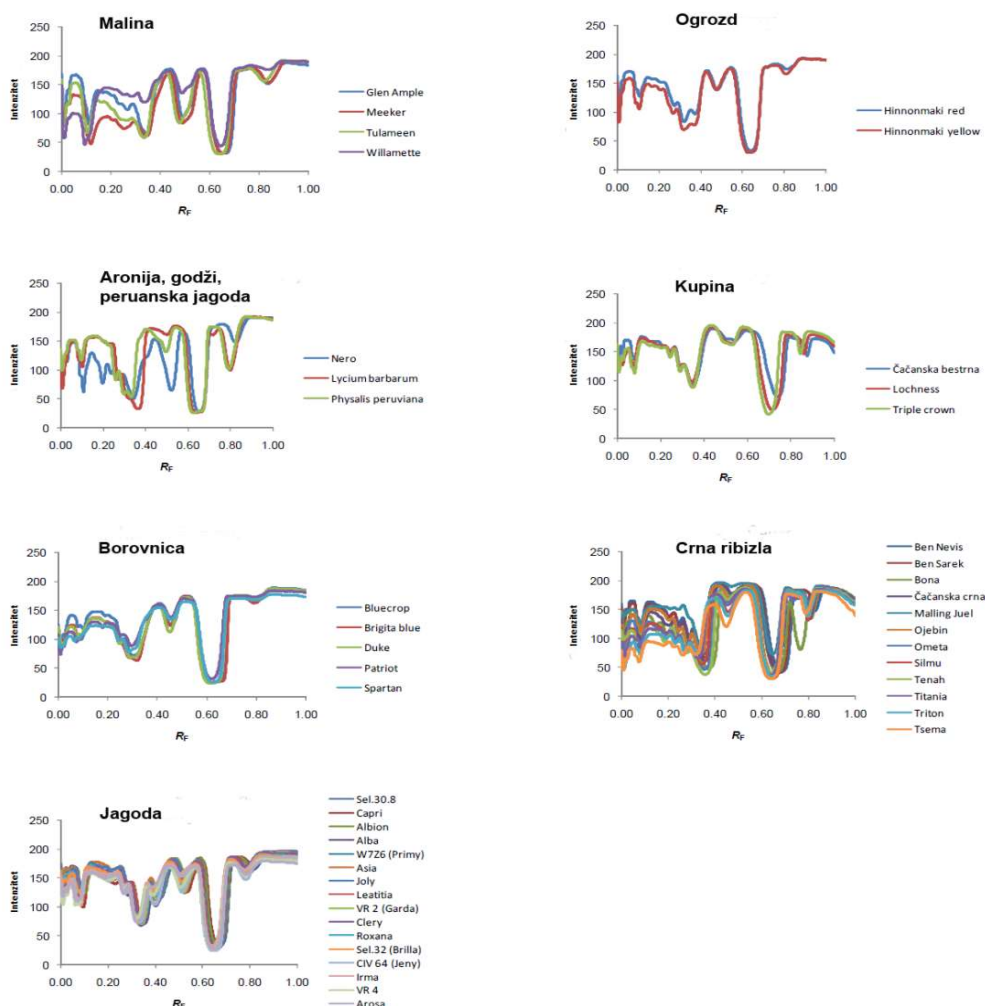
Gajeno voće

Vizuelnim upoređivanjem hromatograma (**Slika 2**) i odgovarajućih dijagrama hromatografskih signala (**Slika 3**) analiziranih uzoraka uočava se ujednačenost lipidnih profila u okviru svake ispitivane jagodaste vrste voćaka, ali takođe i razlike u zavisnosti od njihovog biljnog porekla. Iste klase lipida su prisutne u svim uzorcima, ali su u okviru svake od klasa prisutna različita jedinjenja u različitim količinama. Uočene razlike se ogledaju u prisustvu ili odsustvu zona u određenoj grupi uzoraka kao i varijabilitetu intenziteta signala prisutnih u uzorcima na istim R_F vrednostima.



Slika 2. Lipidni profil analiziranih uzoraka gajenog voća dobijen HPTLC metodom.

Hromatogrami uzoraka jagode (trake 30–45) imaju intenzivne zone na $R_F = 0,75$ koje odgovaraju triacilglicerolima i jasno razdvojene zone (za razliku od ostalih uzoraka) na R_F vrednostima 0,50 i 0,62 koje odgovaraju slobodnim masnim kiselinama. Hromatogrami uzoraka crne ribizle (trake 18–29) i maline (trake 1–4) imaju karakteristične intenzivne zone pri nižim R_F vrednostima (između 0,1 i 0,3), koje se mogu smatrati polarnim lipidima. Uzorci semena maline takođe imaju intenzivne zone koje mogu odgovarati slobodnim masnim kiselinama ($R_F = 0,62$). Zone sa najvišim R_F vrednostima (0,92) koje mogu odgovarati sterolestrima, najintenzivnije su u uzorcima godžija i peruanske jagode (trake 11 i 12). Iste zone su slabo uočljive u uzorcima borovnice (trake 13–17). Dobijeni hromatogram za ekstrakt semena aronije (traka 10) ima veći broj zona od ostalih analiziranih vrsta voća. Hromatogrami lipidnog profila godžija i peruanske jagode (trake 11 i 12) su slični uzorcima maline (trake 1–4), dok su profili ogrozda (trake 5 i 6) slični borovnicama (trake 13–17).



Slika 3. Lipidni profili predstavljeni kao grafici zavisnosti intenziteta sive boje od R_F vrednosti za svaku vrstu gajenog voća.

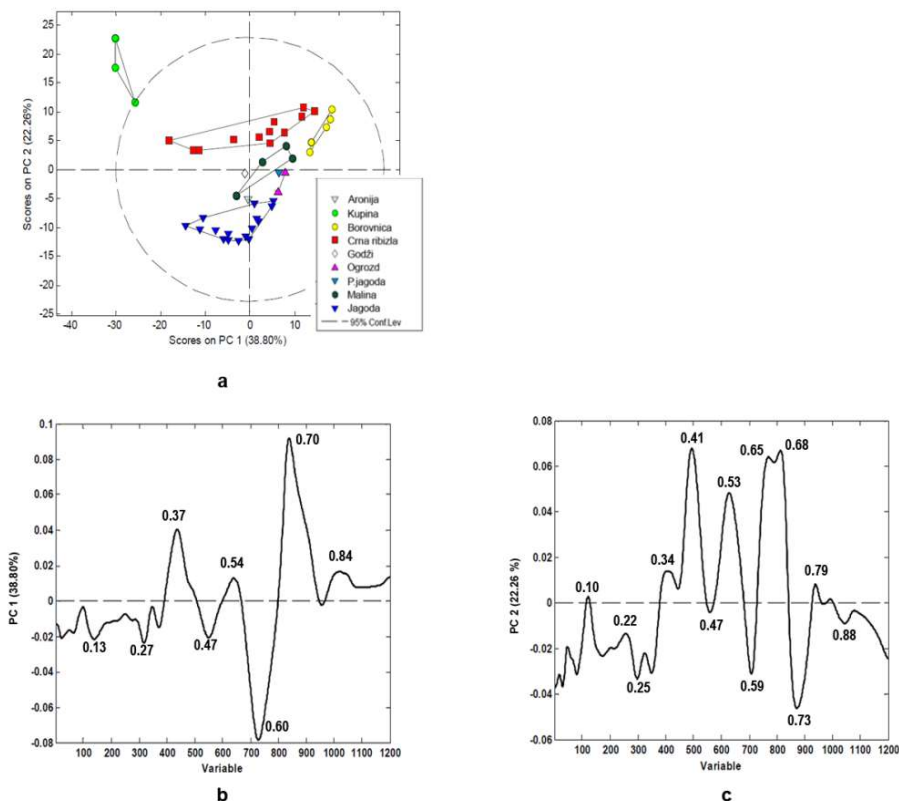
Dalja analiza dobijenih rezultata obuhvatila je multivarijantnu obradu podataka, u cilju utvrđivanja postojanja obrazaca ponašanja između uzoraka različitog biljnog porekla i odgovarajućih hromatografskih signala. Matrica podataka se sastojala od 45 objekata (ispitivani uzorci) i 1200 varijabli, koje predstavljaju intenzitete sive boje izražene u pikselima duž linije hromatograma.

Dobijeni PCA model se sastoji iz 4 komponente koje su objasnile 77,49% ukupnog varijabiliteta među podacima. Prva komponenta (PC1) obuhvata 38,80% varijabiliteta, dok druga komponenta (PC2) objašnjava 22,26% varijabiliteta. Grafik skorova (**Slika 4a**) potvrdio je postojanje 5 različitih klastera koji odgovaraju različitim vrstama jagodastog voća (kupina, jagoda, crna ribizla, malina i borovnica). Dve najveće grupe, koje čine uzorci semena crne ribizle i semena jagode, su se razdvojile duž PC2 ose. Između njih se nalaze klasteri koji pripadaju uzorcima maline i borovnice, dok su uzorci semena kupine potpuno odvojeni od ostalih uzoraka u gornjem levom delu grafika. Mali broj uzoraka semena ogrozda, peruanske jagode, aronije i godžija sprečava njihovu potpunu karakterizaciju, ali može da ukaže na određene trendove u njihovom hemijskom sastavu. Ovi uzorci raspoređeni su između klastera koji čine uzorci semena maline i jagode što ukazuje na sličnost u njihovim lipidnim profilima.

Najveći pozitivan uticaj na navedenu diferencijaciju uzoraka duž PC1 ose imaju zone sa R_F vrednostima 0,37 i 0,54 koje odgovaraju slobodnim masnim kiselinama, zatim zone sa R_F 0,70 (koja

odgovara triglicerolima) i 0,84. Najveći negativan uticaj na razdvajanje duž ove ose imaju varijable sa R_F vrednostima 0,13, 0,27, 0,47 i 0,60 (**Slika 4b**). Pored toga zone sa R_F vrednostima 0,34 (odgovaraju sterolima), 0,41 (odgovaraju digliceridima), 0,53 (odgovaraju slobodnim masnim kiselinama), 0,65 i 0,68 (odgovaraju trigliceridima) i 0,79 (odgovaraju sterolestrima) imaju značajan pozitivan uticaj na difrencijaciju uzoraka duž PC2, dok zone sa R_F vrednostima 0,22, 0,25, 0,47, 0,59, i 0,73 imaju najveći negativan uticaj (**Slika 4c**).

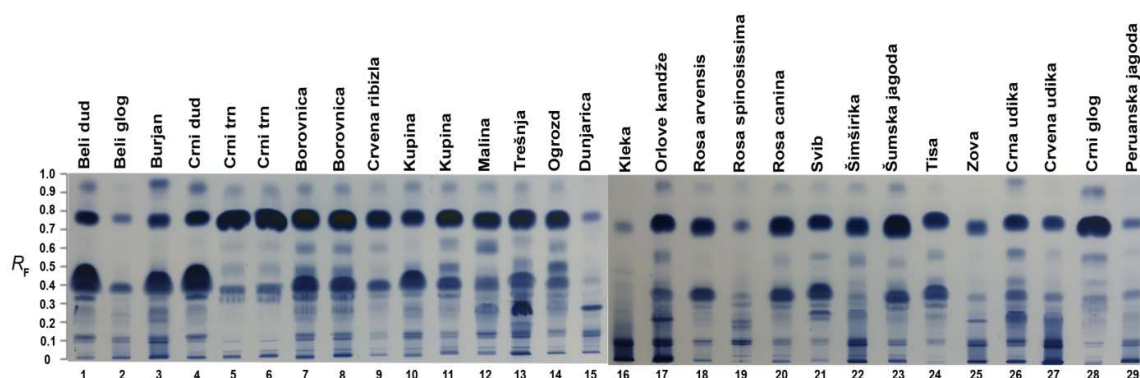
Sadržaj slobodnih masnih kiselina i triglicerola značajno utiče na diferencijaciju semena borovnice i ogrozda, dok su estri sterola, digliceridi, trigliceridi i slobodne masne kiseline glavni faktori koji dovode do odvajanja uzoraka borovnice, crne ribizle i kupine.



Slika 4. Analiza glavnih komponenta: a) grafik skorova latentnih varijabli dobijen za lipidni profil uzoraka semena gajenog voća, b/c) uzajamne projekcije vektora koeficijenata latentnih varijabli.

Samoniklo voće

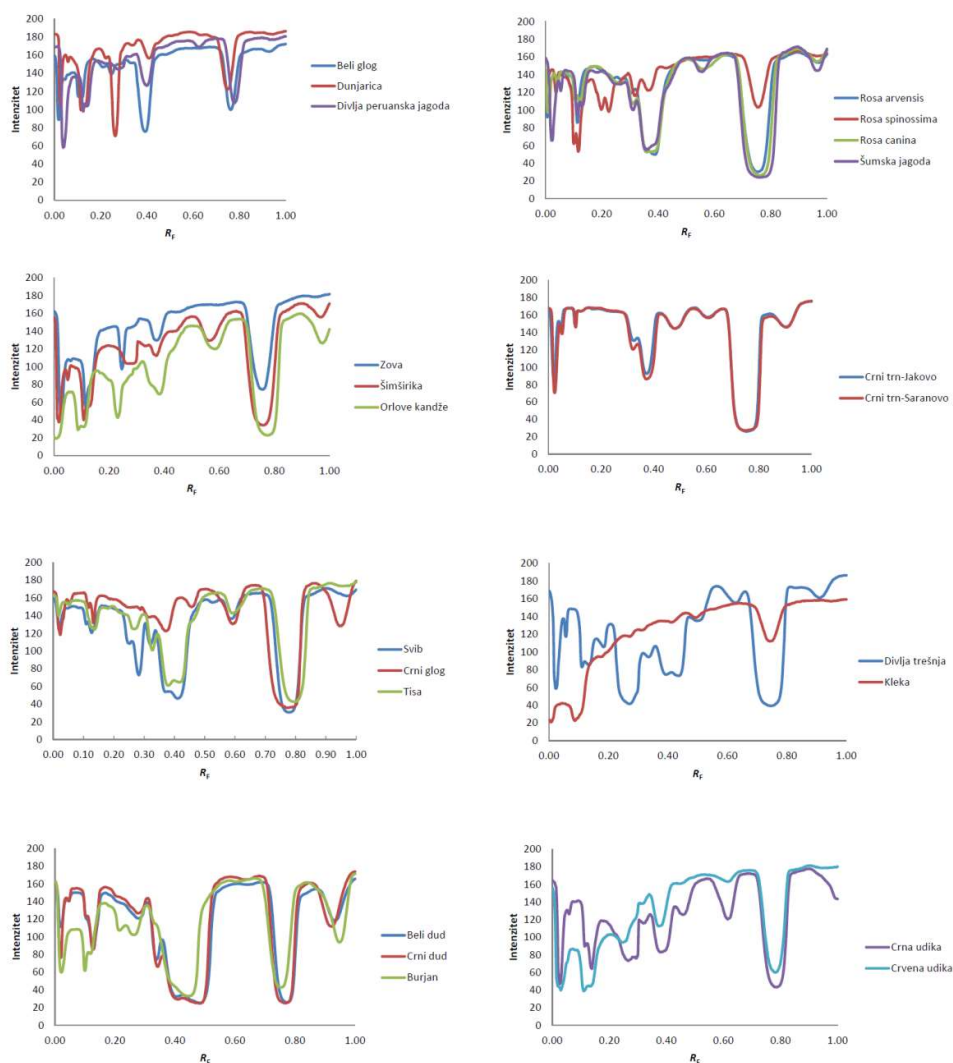
Posmatrajući hromatograme i odgovarajuće dijagrame dobijene za uzorke semena samoniklog voća (**Slike 5 i 6**) uočava se da su određene klase lipida (sterolestri, $R_F = 0,95$; triacilgliceroli $R_F = 0,76$; slobodne masne kiseline, $R_F \sim 0,60$ i steroli, $R_F \sim 0,40$) zastupljene u svim uzorcima bez obzira na njihovo biljno poreklo, samo se intenzitet njihovih zona razlikuje. Razlike u lipidnom profilu na osnovu biljnog porekla ispitivanih uzoraka semena voća (u smislu prisustva i odsustva određenih traka, kao i njihovog intenziteta) potiču od klasa lipida čije se zone javljaju u opsegu R_F vrednosti od 0,10 do 0,60.



Slika 5. Lipidni profil analiziranih uzoraka samoniklog voća dobijen HPTLC metodom.

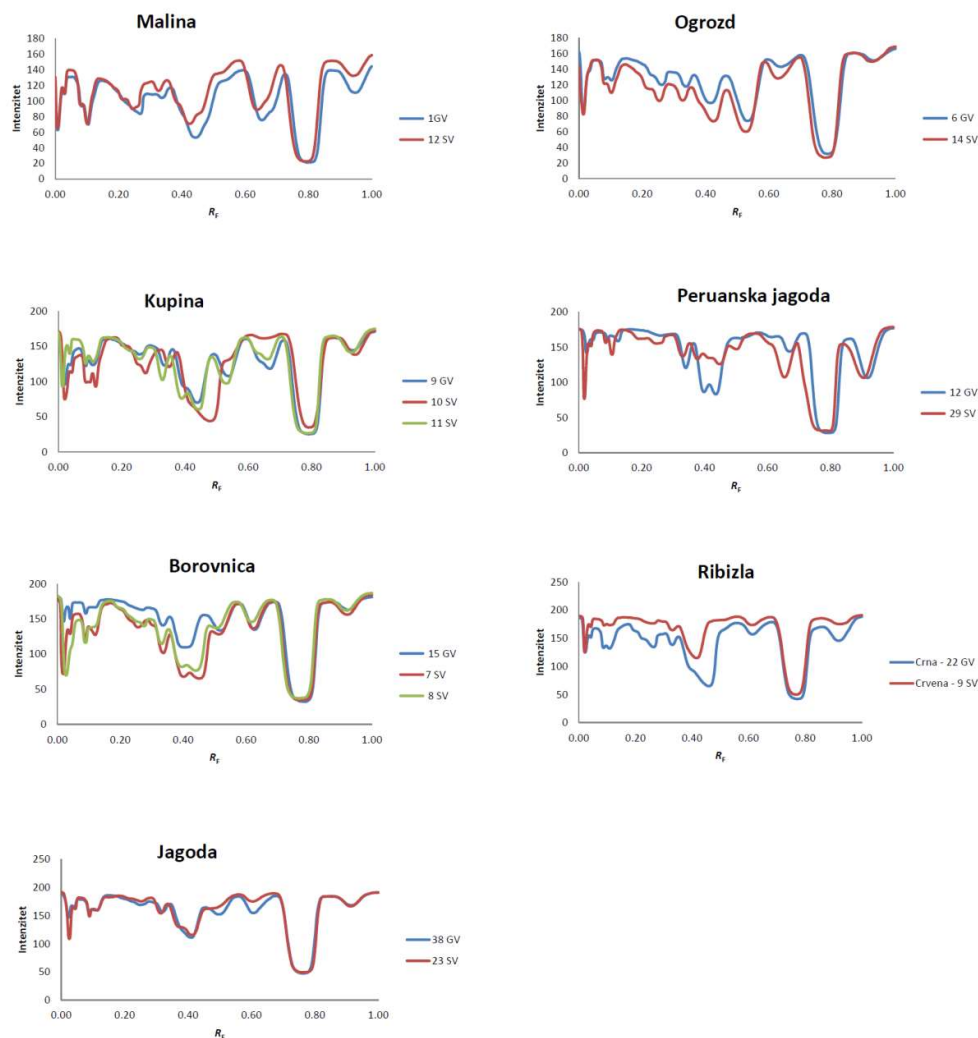
Najveći broj jasno odvojenih i intenzivnih zona u toj oblasti imaju uzorci divlje trešnje (uzorak 13) i borovnice (trake 7 i 8), dok je uzorak kleke imao najjednostavniji lipidni profil sa samo dve jasno definisane zone (koje potiču od polarnih lipida, $R_F = 0,10$ i triacilglicerola, $R_F = 0,76$). Uzorci divljih ruža (*Rosa arvensis* - traka 18 i *Rosa canina* – traka 20) pokazali su sličan lipidni profil kao uzorak šumske jagode (traka 23), dok se profil uzorka ruže *Rosa spinosissima* (traka 19) razlikovao jer je imao veći broj zona srednjeg intenziteta u opsegu R_F vrednosti od 0,1, do 0,4. Hromatogrami uzoraka semena crnog trna sa dve lokacije (trake 5 i 6) imali su isti lipidni profil, sa najizraženijim zonama koje potiču od triglicerida ($R_F = 0,76$). Takođe, njihovi hromatogrami su slični hromatogramima divljih ruža (uzroci 18 i 20) i šumske jagode (traka 23), što se verovatno može objasniti činjenicom da pripadaju istoj porodici ruža (Rosaceae). Najjednostavniji lipidni profil pokazali su uzorci dunjarice i kleke (trake 15 i 16), u kojima su jedino bile prisutne zone koje odgovaraju polarnim lipidima sa R_F vrednostima između 0,1 i 0,3 i zona slabog intenziteta sa R_F 0,76 koja odgovara triacilglicerolima. Najveći broj jasno razdvojenih intenzivnih zona uočen je u uzorku trešnje (traka 13), sa karakterističnim zonama koje odgovaraju sterolima.

Uzorci semena belog i crnog duda (trake 1 i 4) i burjana (traka 3) pokazali su sličan lipidni profil sa izrazito intenzivnim zonama koje pripadaju sterolima i trigliceridima, dok je uzorak crnog gloga (traka 28), za razliku od belog gloga (traka 2), sadržao zone koje potiču od slobodnih masnih kiselina i diglicerida. Iste klase lipida su bile prisutne u uzorcima semena crne i crvene udike (trake 26 i 27), samo je intenzitet njihovih zona bio veći u uzorku crne udike. Hromatogrami uzoraka orlovi kandži, šimširike, i zove (trake 17, 22 i 25) takođe su bili slični, samo se intenzitet zona razlikovao. Seme sviba i tise (trake 21 i 24) sadržalo je iste klase lipida, a njihove zone su bile sličnog intenziteta.



Slika 6. Grafici zavisnosti intenziteta sive boje od R_f vrednosti za uzorke samoniklog voća.

Radi lakšeg uočavanja sličnosti i razlika u lipidnim profilima istih sorti semena samoniklog i gajenog voća, njihovi hromatogrami su preklapljeni i predstavljeni na **Slici 7**. Hromatogrami su pokazali uniformnost u lipidnim profilima unutar svake vrste voća nezavisno od načina uzgajanja (divlje i gajeno voće). U uzorcima ogrozda i borovnice uočava se da su prisutne iste klase lipida, ali je intenzitet njihovih zona veći u uzorcima samoniklog voća, dok su u slučaju peruanske jagode i ribizle, intenzivnije zone u uzorcima gajenog voća.



Slika 7. Preklopljeni hromatogrami zavisnosti intenziteta sive boje od R_F vrednosti za sorte gajenih i divljih uzoraka maline, kupine, borovnice, jagode, ogrozda, peruanske jagode i ribizle.

4.1.2 Profil masnih kiselina

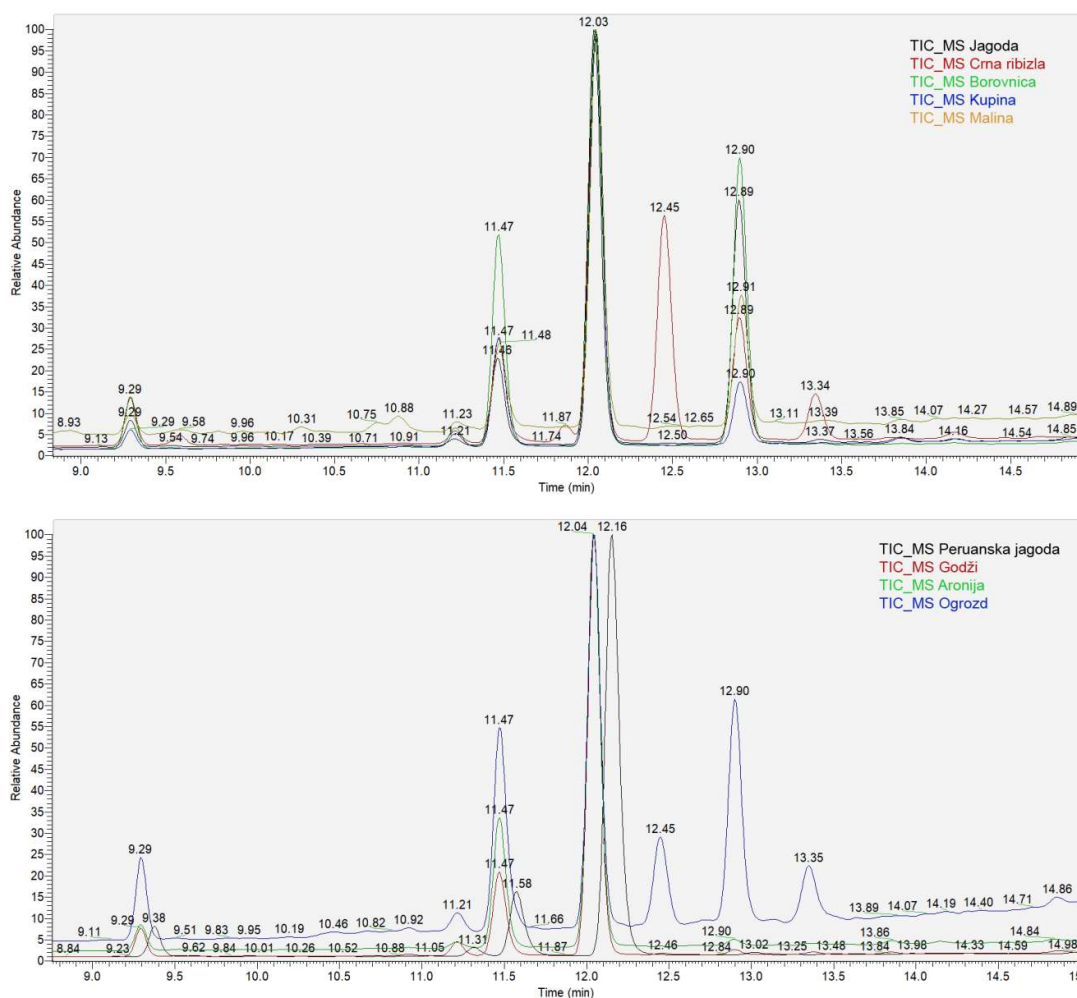
Seme se smatra dobrim izvorom biljnih ulja sa visokim sadržajem esencijalnih masnih kiselina, zbog čega bi potencijalno moglo da se koristi u proizvodnji funkcionalne hrane i dodataka ishrani. Zbog raznovrsnosti masnih kiselina duž lanca, stepena nezasićenosti, geometrije i položaja dvostrukih veza, njihov sastav predstavlja važnu karakteristiku ulja i može se označiti kao masnokiselinski profil ili „otisak prsta” posmatranog ulja.¹¹³ Takođe, raspored masnih kiselina u triacilglicerolima utiče na nutritivnu vrednost lipida izolovanih iz semena voća.¹¹⁰

Razdvajanje, identifikacija i kvantifikacija metil-estara masnih kiselina dobijenih iz semena voća urađena je primenom gasne hromatografije sa masenom detekcijom. Kvalitativni opis razlika u masno-kiselinskim profilima različitih vrsta voća se zasniva na prisustvu i intenzitetu hromatografskih signala masnih kiselina, dok je kvantitativni sastav masnih kiselina izražen kao relativni sadržaj u % i prikazan u **Tabelama 10 i 11**.

4.1.2.1 Kvalitativna analiza masnih kiselina

Gajeno voće

Profili masnih kiselina za iste biljne vrste pokazali su specifičan obrazac (Slika 8). Najzastupljenija masna kiselina u uzorcima gajenog voća bila je linolna kiselina ($t_R = 12,07$), praćena oleinskom ($t_R = 11,48$) i α -linoleinskom kiselinom ($t_R = 12,90$), što je u skladu sa rezultatima studije rađene na uzorcima semena maline, koja je pokazala da 96% ukupnih masnih kiselina u ulju semena maline čine upravo ove tri masne kiseline.¹⁶⁴ Oleinska kiselina je bila najzastupljenija u uzorcima ogrozda i borovnice, dok je α -linoleinska kiselina bila najzastupljenija u semenu jagode i borovnice, a odsutna u semenu godžija i aronije. Ranija istraživanja su potvrdila nizak sadržaj α -linoleinske kiseline u uzorcima godžija (1,1%) i aronije (0,34%)¹¹², dok je za ulje semena brusnice potvrđeno da sadrži 22% α -linoleinske kiseline, što ukazuje na njegovu potencijalnu upotrebu kao izvora ove kiseline u ishrani.¹⁶⁵ Analizom hromatograma uzoraka ribizle i ogrozda uočava se velika zastupljenost γ -linolne kiseline ($t_R = 12,46$), što potvrđuje literaturne podatke da su ulja semena voća iz porodice Grossulariaceae (rod *Ribes*) bogat izvor ove masne kiseline.¹⁶⁶ Sa druge strane u uzorcima ulja semena jagode, maline i kupine ova masna kiselina nije zastupljena, što se smatra karakteristikom vrsta koje pripadaju porodici Rosaceae. Navedene razlike između vrsta koje pripadaju porodicama Grossulariaceae i Rosaceae, iz istog reda Rosanae, su posledica različitog profila enzima desaturaza koji razlažu masne kiseline u voćnim vrstama iz ove dve familije.¹⁶⁷



Slika 8. Preklopljeni hromatogrami masnih kiselina semena gajenog voća.

Palmitoleinska kiselina ($t_R = 9,53$) i *cis*-11-eikozenoinska kiselina ($t_R = 14,19$) se javljaju kao signali srednjeg intenziteta u uzorcima jagode i ribizle. Heneikozapentaenoinska kiselina (21:5, $n-3$), $t_R = 13,34$, je nezasićena masna kiselina koja je prisutna u uzorcima ogrozda, ribizle i jagode (identifikacija ove kiseline je zbog nedostatka standarda izvršena poređenjem dobijenih masenih spektara sa NIST bazom podataka).

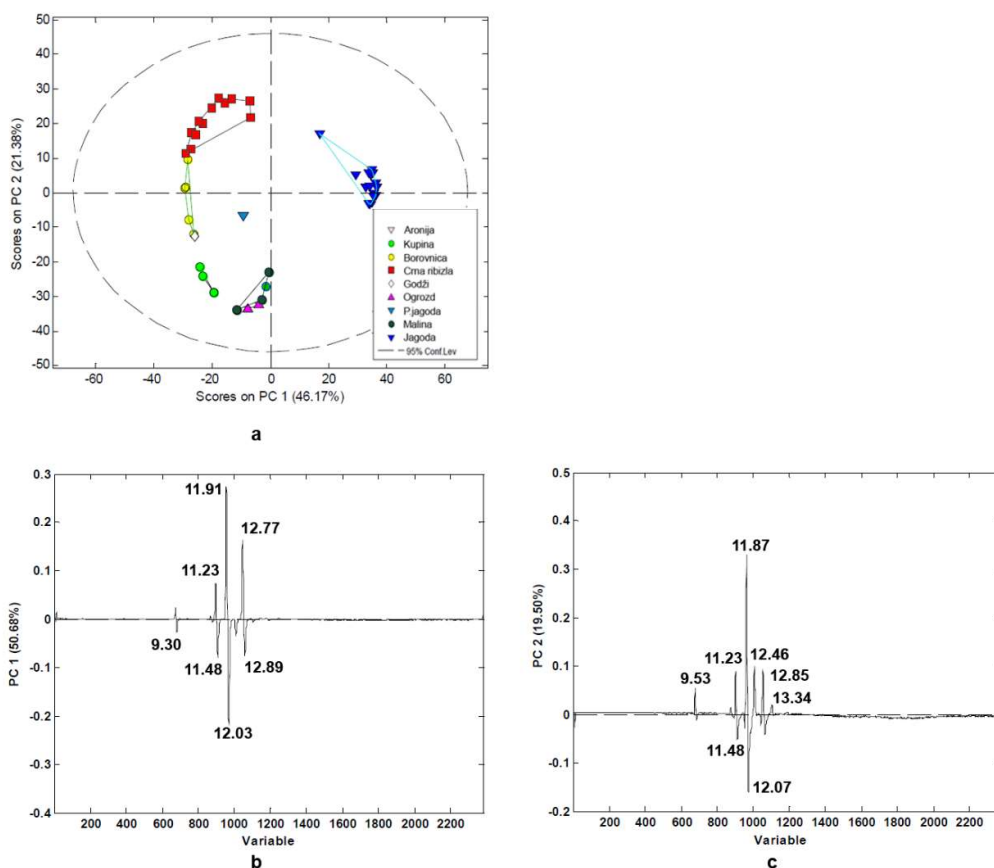
Hromatografski signali koji potiču od zasićenih masnih kiselina pripadaju palmitinskoj ($t_R = 9,30$), stearinskoj ($t_R = 11,23$) i arahidinskoj kiselini ($t_R = 13,86$). Palmitinska i stearinska kiselina su identifikovane u svim uzorcima semena gajenog voća, ali je intenzitet signala koji potiče od palmitinske kiseline bio veći, posebno u ulju semena ogrozda. Ovakvi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima koji navode palmitinsku kiselinu kao glavnu zasićenu masnu kiselinu nađenu u uzorcima semena i pulpe ogrozda.¹⁶⁸ Arahidinska kiselina ($t_R = 13,86$) je pokazala slabe signale, prisutne samo u uzorcima kupine, godžija i jagode.

U cilju dalje analize rezultata, dobijeni hromatogrami masnih kiselina uzoraka gajenog voća su eksportovani u *Microsoft Excel* kao funkcija intenziteta analitičkog signala na detektoru (2384 varijabli) od retencionog vremena. Ovi podaci su iskorišćeni kao matrica za multivarijantnu analizu, u cilju definisanja markera autentičnosti biljnog porekla semena gajenog voća na osnovu masno-kiselinskog profila. Priprema podataka za multivarijantnu analizu je opisana u Eksperimentalnom delu.

Dobijeni PCA model za profil masnih kiselina se sastojao od četiri glavne komponente, kojima se objašnjava 84,96% ukupnog varijabiliteta podataka (PC1 – 46,17%, PC2 – 21,38%). Grafički prikaz uzajamne projekcije faktora skorova ukazuje na diferencijaciju uzoraka prema biljnom poreklu (**Slika 9a**). Uzorci semena kupine, jagode, crne ribizle, maline i borovnice formirali su pet kompaktnih klastera, što ukazuje na uniformne profile slobodnih masnih kiselina unutar određene sorte. Uzorci semena jagode razdvojeni su od svih ostalih uzoraka duž PC1 ose, dok su uzorci crne ribizle razdvojeni od ostalih ispitivanih uzoraka duž PC2 ose. Uzorci ogrozda se preklapaju sa uzorcima maline, dok se uzorci godžija i aronije preklapaju sa uzorcima semena borovnice. Iako uzorci crne ribizle i ogrozda pokazuju specifične signale na hromatogramima koji odgovaraju γ -linolnoj i heneikozapentaenoinskoj kiselini, oni su različito klasifikovani prema njihovim celokupnim masno-kiselinskim profilima. Uzorak semena peruanske jagode je pokazao jedinstven profil masnih kiselina, u poređenju sa svim ispitivanim vrstama voćaka.

Posmatranjem grafika doprinosa pojedinačnih varijabli (**Slika 9b/c**) uočavamo da su varijable sa retencionim vremenom 9,30 min, 11,48 min, 12,03 min i 12,89 min (koje odgovaraju palmitinskoj, oleinskoj, linolnoj, α -linoleinskoj kiselini, redom) imale najveći negativan uticaj na PC1 osu, dok su varijable sa retencionim vremenima 11,91 i 12,77 min imale najveći pozitivan efekat. Navedene varijable su imale najveći uticaj na razdvajanje uzoraka semena jagode od ostalih vrsta voćaka.

Varijable koje su imale potencijalno najveći uticaj na razdvajanje duž PC2 ose su signali koji javljaju na retencionim vremenima 9,53 min (palmitoleinska kiselina), 11,23 min, 11,48 min, 11,87 min (6-oktadekanoinska kiselina), 12,07 min, 12,46 min, 12,90 min (linolna, γ -linolna kiselina i α -linoleinska kiselina) i 13,34 min. Među identifikovanim masnim kiselinama, one koje odgovaraju retencionim vremenima 9,53 min, 11,87 min, 12,46 min i 13,34 min se smatraju specifičnim markerima semena crne ribizle. Dodatno, signal na 11,23 min definiše uzorke borovnice. S obzirom na činjenicu da je grafik faktora skorova ukazao na diferencijaciju različitih sorti gajenog voća, jasno je da se za karakterizaciju određenog biljnog porekla mora posmatrati ceo profil masnih kiselina.

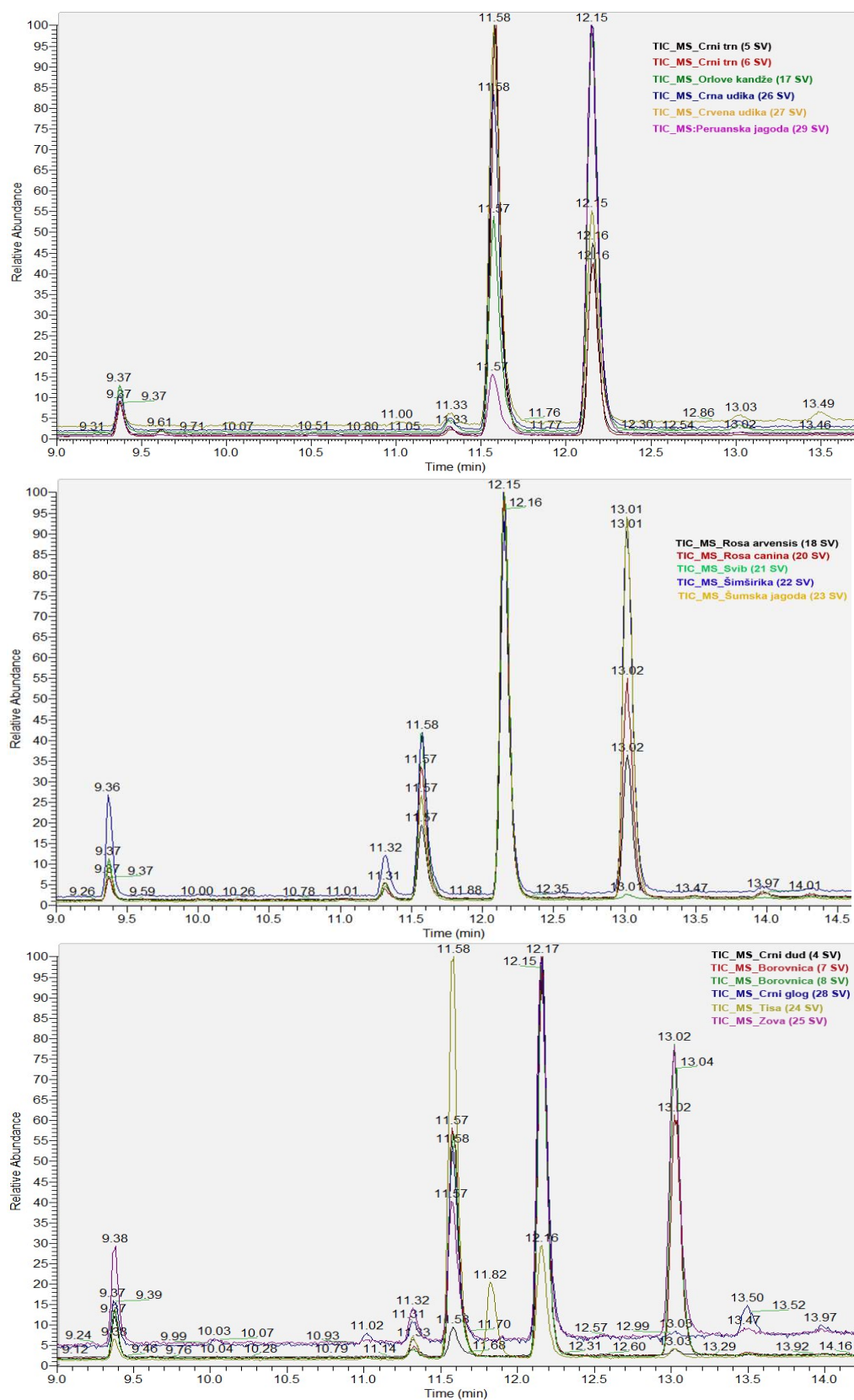


Slika 9. Analiza glavnih komponenta: a) grafik skorova latentnih varijabli dobijen za profil masnih kiselina u uzorcima semena gajenog voća, b/c) uzajamne projekcije koeficijenata latentnih varijabli.

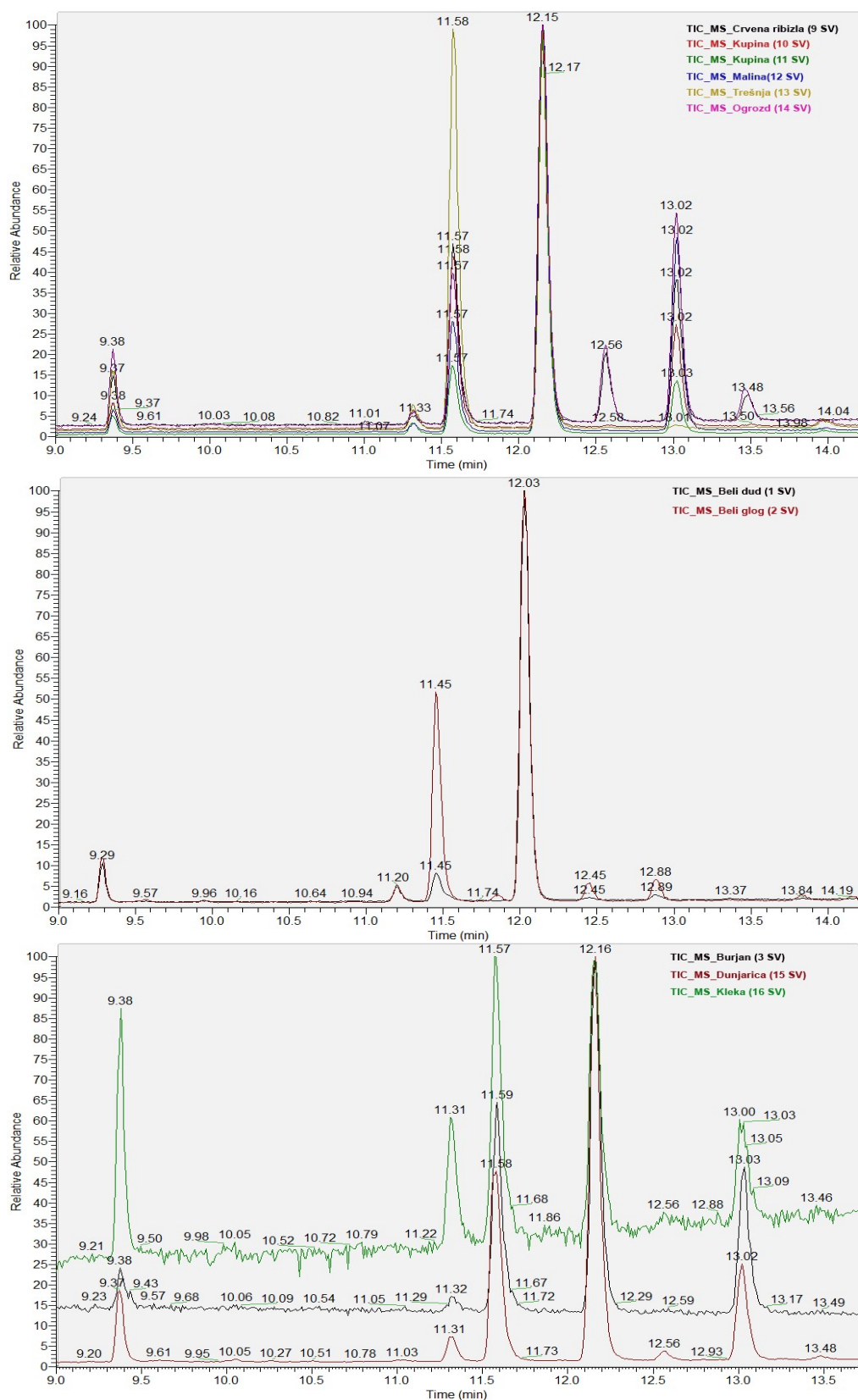
Samoniklo voće

Analizom hromatograma uzoraka semena samoniklog voća predstavljenih na **Slici 10** uočava se sličan trend kao kod gajenog voća, najzastupljenija masna kiselina je linolna kiselina, praćena oleinskom i α -linoleinskom kiselinom. Hromatografski signali koji potiču od linolne kiseline su najintenzivniji u uzorcima belog i crnog duda, što je u skladu sa prethodnim studijama rađenim na uzorcima semena belog duda iz Bangladeša¹⁶⁹, kao i uzorcima belog i crnog duda iz Španije.¹⁷⁰ Oleinska kiselina se javlja kao pik srednjeg intenziteta kod većine analiziranih uzoraka divljeg voća, osim kod uzoraka crnog trna (5 i 6) i tise (24) gde se javlja kao vrlo intenzivan hromatografski signal. Signal koji potiče od α -linoleinske kiseline je najintenzivniji u uzorcima šimširike (22) i šumske jagode (23). Od polinezasićenih masnih kiselina, prisutna je još γ -linolna kiselina, čiji je najveći pik uočen na hromatogramima divlje ribizle (9) i ogrozda (14), što je u skladu sa rezultatima dobijenim za gajeno voće. U ovim uzorcima identifikovana je i heneikozapentaenoinska kiselina (C21:5, n-3), kao karakteristična za rod *Ribes*.

Palmitinska i stearinska kiselina su identifikovane u svim uzorcima semena divljeg voća, kao pikovi niskog do srednjeg intenziteta, dok je arahidinska kiselina identifikovana kao signal slabog intenziteta u pojedinim uzorcima semena divljeg voća.



Slika 10a. Preklopljeni hromatogrami masnih kiselina semena samoniklog voća.



Slika 10b. Preklapljeni hromatogrami masnih kiselina semena samoniklog voća.

4.1.2.2 Kvantitativni sadržaj masnih kiselina

Gajeno voće

Rezultati kvantifikacije masnih kiselina u uzorcima gajenog i samoniklog voća dobijenih primenom GC-MS metode, izraženi su kao relativni sadržaj (%) i predstavljani u **Tabelama 10 i 11**. Analizom dobijenih rezultata, uočava se da su u uzorcima semena gajenog voća dominantne nezasićene masne kiseline (eng. *Unsaturated Fatty Acids* - UFA), koje čine više od 90% od ukupnog sadržaja, i to linolna, oleinska i α -linoleinska kiselina, dok su od zasićenih masnih kiselina (eng. *Saturated Fatty Acids* - SFA) prisutne palmitinska, stearinska i arahidinska kiselina.

Linolna kiselina (C18:2, n-6) je najzastupljenija masna kiselina u semenu gajenih voćaka, sa najvećim relativnim sadržajem u semenu peruanske jagode (80,09%) i godžija (74,86%), dok se njen sadržaj u ostalim uzorcima kretao u opsegu 45 – 60%. Ovo je u skladu sa postojećim literaturnim podacima za ulje pulpe peruanske jagode iz Čilea u kojem je sadržaj ove kiseline iznosio 74,60%, što može ukazati na sličan masno-kiselinski sastav pulpe i semena ove vrste jagodastog voća.¹⁷¹ Najmanji relativni sadržaj ove kiseline imali su uzorci semena borovnice (44,37%), saglasno rezultatima ranije studije za hladno ceđena komercijalna ulja semena borovnice u kojima je sadržaj ove kiseline bio 41,9%.¹⁷² Sadržaj oleinske kiseline (C18:1, n-9, c+t) je bio u opsegu od 11,07% (uzorak jagode, 20GV) do 26,38% (uzorak ogrozda, 5GV), što je veći sadržaj od onog navedenog u ranije objavljenim studijama za uzorke semena ogrozda iz Slovenije (14,32%)¹⁷³ i uzorke ploda ogrozda poreklom iz Italije (17,90 – 22,40%).¹⁷⁴ Najveća razlika u sadržaju se javlja kod α -linoleinske kiseline koja je prisutna u uzorcima kupine oko 10%, kod ribizle 12 – 20%, maline oko 23%, kod jagode i borovnice između 25% i 38%, dok je kod godžija i aronije njen udeo oko 2%. Sličan trend uočen je i pregledom literature; sadržaj ove masne kiseline se kretao u širem opsegu koncentracija, sa najvećim sadržajem u ulju semena jagode, a najmanjim u semenu aronije.¹⁷⁵

γ -Linolna kiselina (C18:3, n-6) je bila prisutna u analiziranim uzorcima u opsegu 0,05 – 24,42%, sa najvećim srednjim relativnim sadržajem u uzorcima crne ribizle (14,63%), dok u uzorcima jagode i borovnice nije identifikovana. Ovi podaci su u skladu sa rezultatima studije rađene na uzorcima ulja semena jagode (0,04%), maline (0,04%) i crne ribizle (18,54%) iz Poljske.¹⁷⁶ Ulje semena crne ribizle se zbog visokog sadržaja ove kiseline (15 – 20%) označava kao funkcionalo ulje koje ima primenu u farmaceutskoj industriji.¹⁷⁷

Palmitoleinska (C16:1) i *cis*-11-eikozenoinske kiselina (C20:1) su mononezasićene masne kiseline (eng. *Monounsaturated Fatty Acids* - MUFA), čiji je sadržaj u analiziranim uzorcima bio manji od 1% od ukupnih određenih masnih kiselina. Palmitoleinska kiselina je određena u uzorcima crne ribizle (0,30%), godžija (0,28%), jagode (0,20%) i borovnice (0,11%), dok u uzorcima maline, kupine, ogrozda i aronije nije identifikovana. *cis*-11-Eikozenoinska kiselina je određena u uzorcima crne ribizle (0,98%) i jagode (0,33%).

Sadržaj SFA bio je najveći u uzorcima ogrozda (11,32%) i crne ribizle (6,93%), među kojima su najzastupljenije bile palmitinska i stearinska kiselina. Rezultati ranijih ispitivanja uzoraka semena voća, roda *Ribes*, su pokazali sličan odnos zasićenih i nezasićenih masnih kiselina.¹⁷³ Sadržaj palmitinske kiseline se kretao od 2,04% (malina) do 8,65% (ogrozd), dok je sadržaj oleinske kiseline bio niži u svim ispitivanim uzorcima (0,14 – 3,15%). Od zasićenih masnih kiselina u uzorcima semena voća, određen je još sadržaj arahidinske kiseline, i to u uzorcima semena jagode (0,77%), godžija (0,50%) i kupine (0,21%).

Dobijeni rezultati za sadržaj masnih kiselina u uzorcima semena gajenog voća su u skladu sa literaturnim podacima, male razlike se mogu pripisati različitoj efikasnosti tehnika ekstrakcije ulja iz uzorka. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da je ulje semena ispitivanih jagodastih vrsta voćaka dobar izvor n-9 mononezasićenih i n-3 i n-6 polinezasićenih masnih kiselina (eng.

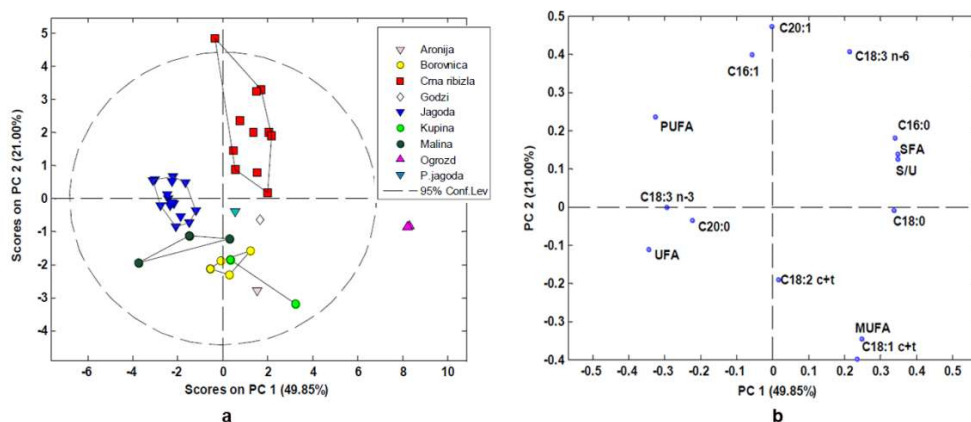
Polyunsaturated Fatty Acids – PUFA), sa niskim vrednostima odnosa SFA i UFA (manji od 0,1) i kao takvo se može koristiti kao vredna sirovina u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, kao i u proizvodnji biogoriva.

Rezultati KW testa, primenjenog na sadržaj masnih kiselina u semenu pet različitih vrsta voćaka, koje su imale statistički značajan broj uzoraka (malina, kupina, borovnica, crna ribizla i jagoda) prikazani su u **Tabeli 10**. Na osnovu ovih rezultata, uočava se da između ispitivanih uzoraka postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u sadržaju svih određenih masnih kiselina. Uzorci jagode sadržali su statistički značajno različitu količinu C18:0 i C20:0 masnih kiselina u odnosu na ostale vrste voćaka, dok je sadržaj C16:0, C18:3 n-6, SFA, UFA i odnos zasićenih i nezasićenih masnih kiselina (S/U) imao uticaj na diferencijaciju uzoraka crne ribizle. Sadržaj MUFA, i to C18:1 (c+t) i C20:1 bio je značajan za razlikovanje uzoraka kupine i borovnice.

Tabela 10. Sastav masnih kiselina u uzorcima gajenog voća izražen kao relativni sadržaj u % i rezultati KW-testa.

		C16:0	C16:1	C18:0	C18:1 n-9 (c+t)	C18:2 n-6 (c+t)	C18:3 n-6	C18:3 n-3	C20:0	C20:1	SFA	MUFA	PUFA	UFA	S/U
Malina (M) n = 4	sr.vred.	3,07	0,00	1,17	15,92	57,17	0,14	22,54	0,00	0,00	4,24	15,92	79,85	95,76	0,04
	medijana	3,06	0,00	1,43	16,18	57,99	0,00	23,24	0,00	0,00	4,49	16,18	81,15	95,51	0,05
	stdev	1,03	0,00	0,93	1,45	4,31	0,23	2,12	0,00	0,00	1,94	1,45	2,70	1,94	0,02
	min	2,04	0,00	0,14	14,36	52,51	0,00	20,15	0,00	0,00	2,18	14,36	76,73	93,96	0,02
	max	4,10	0,00	1,94	17,23	61,00	0,41	24,22	0,00	0,00	6,04	17,23	81,64	97,82	0,06
Kupina (K) n = 3	sr.vred.	3,33	0,00	2,28	22,93	61,37	4,15	5,72	0,21	0,01	5,82	22,94	71,24	94,18	0,06
	medijana	3,33	0,00	2,28	22,93	61,37	4,15	5,72	0,21	0,01	5,82	22,94	71,24	94,18	0,06
	stdev	0,53	0,00	0,03	7,38	7,62	5,87	6,38	0,27	0,01	0,77	7,36	8,14	0,77	0,01
	min	2,95	0,00	2,26	17,71	55,98	0,00	1,21	0,02	0,00	5,27	17,73	65,49	93,64	0,06
	max	3,70	0,00	2,30	28,15	66,76	8,31	10,24	0,40	0,02	6,36	28,15	77,00	94,73	0,07
Borovnica (B) n = 5	sr.vred.	3,83	0,11	1,47	21,81	44,37	0,00	28,42	<0,01	<0,01	5,30	21,92	72,79	94,70	0,06
	medijana	3,70	0,11	1,47	21,76	44,34	0,00	28,50	0,00	0,00	5,17	21,87	72,69	94,85	0,05
	stdev	0,47	0,03	0,37	0,96	2,78	0,00	2,77	0,01	0,01	0,81	0,98	0,90	0,81	0,01
	min	3,43	0,07	1,04	20,82	41,77	0,00	25,36	0,00	0,00	4,47	20,92	71,86	93,58	0,05
	max	4,49	0,14	1,92	22,88	47,03	0,00	31,30	0,01	0,01	6,41	23,01	73,90	95,53	0,07
Crna Ribizla (R) n = 12	sr.vred.	5,18	0,30	1,73	13,63	48,83	14,63	14,61	0,01	0,98	6,93	14,91	78,07	92,98	0,07
	medijana	5,18	0,15	1,76	13,50	50,52	13,46	13,92	0,00	1,17	7,18	14,62	77,46	92,83	0,08
	stdev	0,67	0,37	0,33	1,73	3,28	4,43	1,87	0,04	0,60	0,78	1,50	1,54	0,88	0,01
	min	4,34	0,00	1,20	11,07	42,48	10,15	11,53	0,00	0,00	5,54	12,88	75,50	91,72	0,06
	max	6,35	1,19	2,37	16,32	52,04	24,42	18,35	0,12	1,61	7,93	17,69	80,76	94,46	0,09
Jagoda (J) n = 16	sr.vred.	3,17	0,20	1,14	13,33	49,63	0,00	31,42	0,77	0,33	5,08	13,86	81,06	94,92	0,05
	medijana	3,10	0,19	1,12	13,19	49,53	0,00	31,37	0,74	0,26	5,03	13,94	81,31	94,96	0,05
	stdev	0,24	0,12	0,21	1,79	3,82	0,01	3,94	0,19	0,18	0,42	1,76	1,86	0,42	0,00
	min	2,81	0,00	0,88	10,15	42,56	0,00	25,20	0,46	0,07	4,53	10,72	77,81	94,13	0,05
	max	3,76	0,47	1,68	16,44	55,81	0,05	37,91	1,08	0,62	5,87	17,01	84,68	95,48	0,06
Ogrozd (n = 2)		8,26	0,00	3,05	25,83	48,91	11,57	1,03	0,00	0,00	11,32	25,83	61,51	87,34	0,13
Aronija (n = 1)		3,87	0,00	1,68	22,78	70,26	1,41	0,00	0,00	0,00	5,55	22,78	71,67	94,45	0,06
Godzi (n = 1)		4,43	0,28	2,46	15,52	74,86	0,40	0,95	0,50	0,00	7,39	15,80	76,83	92,63	0,08
P.jagoda (n = 1)		4,86	0,16	1,64	12,71	80,09	0,00	0,53	0,00	0,00	6,50	12,87	80,62	93,49	0,07
KW test	P	<0,0001	0,024	0,0011	0,0014	0,0033	0,0001	<0,0001	<0,0001	0,001	0,0004	0,0014	0,0002	0,0004	0,0004
	Z- vrednost	R(J,K,M)	J(K,M) M(R)	J(K,R)	B,K(J,R)	B(J,K,M) R(K,M)	R(B,J,M)	B,J(K,R)	J(B,M,R)	R(K,M,B) J(B,M)	R(B,J,M)	B,K(J,R)	J(B,K,R) B(M)	R(B,J,M)	R(B,J, M)

Analiza glavnih komponenta primenjena na podatke relativnog sadržaja masnih kiselina (%) (Tabela 10), rezultirala je četvorokomponentnim modelom pomoću kojeg je objašnjeno 89,41% ukupnog varijabiliteta podataka (PC1 – 49,85%, PC2 – 21,00%). Na grafiku skorova latentnih varijabli (Slika 11a) se uočava grupisanje podataka u tri klastera u okviru 95% intervala pouzdanosti, dok uzorci ogrozda formiraju četvrti klaster koji se nalazi izvan ovog intervala zbog značajnih razlika u sadržaju masnih kiselina u odnosu na ostale uzorke gajenih vrsta voćaka. Prvi klaster čine uzorci crne ribizle koji su rasuti u gornjem desnom delu grafika i odvojeni duž PC1 ose od uzoraka jagode koji formiraju drugi kompaktan klaster. U okviru treće grupe koju čine uzorci maline, kupine, borovnice i aronije, se javljaju dve podgrupe (prvu čine uzorci maline, a drugu uzorci borovnice, kupine i aronije). Sa grafika vektora latentnih varijabli (Slika 11b) uočava se da su uzorci crne ribizle odvojeni od ostalih uzoraka duž PC2 ose, zahvaljujući većem sadržaju C20:1, C18:3 n-6, C16:0, C16:1, SFA i S/U. Najveći uticaj na odvajanje uzoraka jagode imale su varijable C18:3 n-3, C20:0 i PUFA, dok su za odvajanje uzoraka ogrozda od ostalih uzoraka jagodastih voćaka odgovorne pre svega zasićene masne kiseline C16:0 i C18:0, kao i SFA i S/U. Varijabla C18:2 (c+t) je imala uticaj na razdvajanje uzoraka borovnice, koji su imali niži sadržaj ove kiseline u poređenju sa drugim uzorcima. Sadržaj C18:1 (c+t) bio je veći u uzorcima kupine, aronije, ogrozda i borovnice u odnosu na drugo gajeno voće. Rezultati PCA analize primenjene na sadržaj masnih kiselina u uzorcima gajenog voća su u skladu sa rezultatima univarijantne analize (KW test).



Slika 11. Analiza glavnih komponenta: a) grafik skorova latentnih varijabli dobijen za relativni sadržaj masnih kiselina u uzorcima semena gajenog voća, b) uzajamne projekcije koeficijenata latentnih varijabli.

Poređenjem rezultata PCA analize primenjene na profile masnih kiselina i na kvantitativni sadržaj, vidi se da je u oba slučaja došlo do grupisanja uzoraka na osnovu biljnog porekla semena. Pri analizi profila došlo je do boljeg razdvajanja uzoraka malina, kupina i borovnica, dok su uzorci crne ribizle formirali kompaktiji klaster, ali se njihov profil razlikovao od uzoraka ogrozda iako pripadaju istom rodu *Ribes*. Posmatrajući grafike dobijene za sadržaj masnih kiselina uočavamo da ogrozda nije sličan uzorcima malina, što je bio slučaj kod grafika dobijenih za profil masnih kiselina. Uzorak aronije je sličniji po sadržaju kupini, dok je u slučaju profila bio sličniji uzorcima borovnice.

Samoniklo voće

U uzorcima semena samoniklog voća, uočen je sličan trend u sadržaju masnih kiselina kao i kod uzoraka gajenog voća, ali je broj određenih masnih kiselina kao i opseg relativnog sadržaja bio širi, zbog većeg broja vrsta i rodova. Najveći relativni sadržaj imale su nezasićene masne kiseline i to linolna, oleinska i α -linoleinska kiselina, dok su od zasićenih kiselina palmitinska, stearinska i arahidinska bile najzastupljenije. Uzorci belog i crnog duda (1 i 4) su imali najveći sadržaj linolne

kiseline (83 – 90%), dok je sadržaj oleinske kiseline u ovim uzorcima (6,34 – 6,51%) bio najmanji u poređenju sa ostalim ispitivanim vrstama. Rezultati studije rađene na uzorcima belog i crnog duda poreklom iz Španije, ukazuju na sličan sadržaj oleinske kiseline (5,32 – 7,26%), dok je sadržaj linolne kiseline bio manji (72,55 – 78,02%).¹⁷⁰ U slučaju uzorka tise (24) sadržaj linolne kiseline bio je najniži (20,95%) među ispitivanim uzorcima, a sadržaj oleinske kiseline najviši (69,67%). Sličan sadržaj linolne kiseline nađen je u uzorcima ove četinarske voćne vrste iz Poljske (19,40 – 30,02%), dok je sadržaj oleinske kiseline bio znatno niži (6,65 – 12,35%).¹⁷⁸ U uzorku tise identifikovana je i 5,9-oktadekadienska kiselina (taksoleinska kiselina), poređenjem odgovarajućeg masenog spektra sa bazom podataka, ali njena kvantifikacija nije bila moguća zbog nedostatka standarda. Ova masna kiselina je tipična za ulja poreklom iz semena *Taxus baccata*.¹⁷⁸

Sadržaj α -linoleinske kiseline se u uzorcima semena samoniklog voća, kao i u slučaju gajenih vrsta, kretao u širem rasponu od 0,13% (crni trn, uzorak 5) do 42% (šumska jagoda), dok u uzorcima crvene udike (27) i crnog gloga (28) nije identifikovana. Seme šumske jagode je bolji izvor α -linoleinske kiseline (42%) od semena gajenih jagoda (25,20 – 37,91%). Studije rađene na uzorcima divlje jagode iz Portugalije su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u okviru ovog rada.¹⁷⁹

Sadržaj γ -linolne kiseline (C18:3, n-6) je određen u uzorcima belog duda (1), belog gloga (2), ribizle (9), trešnje (13), ogrozda (14) i dunjarice (15). Najveći sadržaj ove kiseline imali su uzorci divlje ribizle (8,32%) i ogrozda (8,34%), što potvrđuje rezultate dobijene za gajene uzorke ovih vrsta, a takođe i literaturne podatke koji ukazuju na visok sadržaj γ -linolne kiseline u uzorcima roda *Ribes*.¹⁶⁶

Sadržaj palmitoleinske, *cis*-11-heptadekanske i *cis*-11-eikozenoinske kiseline bio je manji od 1% od ukupnog sastava. Palmitoleinska kiselina (C16:1) određena je u uzorcima crnog trna (5 i 6), borovnice (8), divlje trešnje (13), orlovih kandži (17) i divlje peruanske jagode (29), dok je *cis*-11-heptadekanska kvantifikovana u uzorcima crnog trna (5 i 6) i divlje kupine (11). Najveći sadržaj *cis*-11-eikozenoinske kiseline određen je u uzorku kleke (3,78%), ali je karakteristična i za samonikle uzorke iz porodice Rosaceae (osim za uzorke crnog trna i crnog gloga), što je u skladu sa literaturnim podacima za uzorke samoniklih voćaka iz iste porodice prikupljene u Poljskoj.¹⁸⁰

Palmitinska (2,0 - 15,6%), stearinska (0,86 – 10,52%) i arahidinska (0,1 - 3,58%) kiselina su najzastupljenije SFA u semenu samoniklog voća. Miristinska kiselina (C14:0) je određena samo u uzorku crne udike (0,01%), margarinska kiselina (C17:0) u uzorku divlje kupine (0,09%), dok je dokosanoinska kiselina (C22:0) prisutna jedino u uzorku šumske jagode (0,05%). Najveći sadržaj SFA, kao i najveće vrednosti odnosa S/U uočene su kod uzorka kleke (16).

U poređenju sa uzorcima gajenog voća, seme samoniklog voća je imalo veći prosečan sadržaj SFA, odnosno niži sadržaj MUFA i PUFA.

Tabela 11. Sadržaj masnih kiselina u semenkama samoniklog voća izražen kao relativni sadržaj u %.

Oznaka uzorka SV	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1 (c+t)	C18:2 n-6 (c+t)	C18:3 n-6	C18:3 n-3	C20:0	C20:1	SFA	MUFA	PUFA	UFA	S/U
1	5,52	-	-	-	2,80	6,34	89,70	0,57	1,07	-	-	8,32	6,34	91,34	97,68	0,09
2	4,60	-	-	-	1,72	27,27	59,25	2,52	3,15	0,95	0,55	7,27	27,82	64,92	92,74	0,08
3	4,43	-	-	-	2,02	26,46	46,57	-	20,53	-	-	6,45	26,46	67,10	93,56	0,07
4	6,19	-	-	-	3,13	6,51	83,16	-	1,01	-	-	9,32	6,51	84,17	90,68	0,10
5	3,63	0,68	-	0,16	0,89	64,18	30,32	-	0,13	-	-	4,52	65,02	30,45	95,47	0,05
6	3,88	0,86	-	0,11	1,05	64,98	29,11	-	-	-	-	4,93	65,95	29,11	95,06	0,05
7	3,78	-	-	-	0,96	26,03	40,36	-	28,87	-	-	4,74	26,03	69,23	95,26	0,05
8	3,61	0,26	-	-	0,86	23,37	38,54	-	33,36	-	-	4,47	23,63	71,90	95,53	0,05
9	4,10	-	-	-	1,06	21,70	46,87	8,32	17,95	-	-	5,16	21,7	73,14	94,84	0,05
10	2,26	-	-	-	2,46	23,68	55,14	-	15,22	0,87	0,36	5,59	24,04	70,36	94,4	0,06
11	2,53	-	0,09	0,06	1,85	12,77	71,61	-	10,17	0,61	0,30	5,08	13,13	81,78	94,91	0,05
12	2,03	-	-	-	1,01	14,69	55,16	-	26,62	0,29	0,20	3,33	14,89	81,78	96,67	0,03
13	5,29	0,47	-	-	2,54	44,47	44,71	0,28	0,39	1,18	0,68	9,01	45,62	45,38	91,00	0,10
14	5,52	-	-	-	1,28	16,91	44,86	8,34	23,1	-	-	6,80	16,91	76,30	93,21	0,07
15	5,59	-	-	-	2,87	25,42	50,54	1,28	12,06	1,37	0,87	9,83	26,29	63,88	90,17	0,11
16	15,62	-	-	-	10,52	26,54	28,02	-	11,95	3,58	3,78	29,72	30,32	39,97	70,29	0,42
17	4,86	0,05	-	-	1,65	32,06	60,65	-	0,74	-	-	6,51	32,11	61,39	93,5	0,07
18	2,50	-	-	-	2,31	11,43	58,79	-	23,73	0,86	0,38	5,67	11,81	82,52	94,33	0,06
20	2,05	-	-	-	1,23	16,21	50,35	-	28,79	0,75	0,61	4,03	16,82	79,14	95,96	0,04
21	4,43	-	-	-	1,93	25,67	66,50	-	0,76	0,21	0,49	6,57	26,16	67,26	93,42	0,07
22	6,65	-	-	-	3,58	15,18	36,36	-	37,30	0,52	0,41	10,75	15,59	73,66	89,25	0,12
23	2,41	-	-	-	1,72	10,10	42,54	-	42,02	0,9	0,26	5,08	10,36	84,56	94,92	0,05
24	2,66	-	-	-	3,66	69,67	20,95	-	1,73	-	1,33	6,32	71,00	22,68	93,68	0,07
25	8,00	-	-	-	3,00	14,85	40,59	-	32,56	-	1,00	11,00	15,85	73,15	89,00	0,12
26	3,36	-	-	-	1,35	42,31	52,10	-	0,85	-	0,02	4,72	42,33	52,95	95,28	0,05
27	2,53	-	-	-	1,61	61,57	34,19	-	-	0,1	-	4,24	61,57	34,19	95,76	0,04
28	5,27	-	-	-	3,21	28,43	61,51	-	-	1,59	-	10,07	28,43	61,51	89,94	0,11
29	4,78	0,17	-	-	1,62	12,83	79,08	-	0,53	-	-	6,50	12,85	80,48	93,45	0,07
sr.vred.	4,58	0,09	0,00	0,01	2,28	27,55	50,66	0,76	13,38	0,49	0,40	7,36	28,06	64,80	92,86	0,08
medijana	4,27	0,00	0,00	0,00	1,79	24,55	48,61	0,00	11,06	0,05	0,11	6,39	25,04	69,80	94,01	0,07
stdev	2,64	0,22	0,02	0,04	1,82	18,15	17,00	2,20	13,84	0,78	0,75	4,89	18,35	18,86	4,97	0,07
min	2,03	0,00	0,00	0,00	0,86	6,34	20,95	0,00	0,00	0,00	0,00	3,33	6,34	22,68	70,29	0,03
max	15,62	0,86	0,09	0,16	10,52	69,67	89,70	8,34	42,02	3,58	3,78	29,72	71,00	91,34	97,68	0,42

4.1.3 Profil šećera

Metabolomička procena autentičnosti semena voća na osnovu sadržaja šećera obuhvatila je dva pristupa, metabolomičko profilisanje i ciljanu analizu. U prvom slučaju posmatran je kompletan profil šećera kao jedinstveni set hromatografskih signala karakterističnih za određeni uzorak, odnosno ispitivanu biljnu vrstu. Ciljana analiza podrazumevala je kvantitativno određivanje unapred definisanih šećera uz upotrebu odgovarajućih standarda, čiji su rezultati predstavljeni u **Tabelama 12 i 13**. Za analizu šećera korišćena je visokoefikasna anjonsko-izmenjivačka hromatografija sa pulsnom amperometrijskom detekcijom.

Gajeno voće

U ispitivanim uzorcima semena gajenog voća identifikovano je i kvantifikovano ukupno 28 šećera, od toga 5 monosaharida (Ram, Arabt, Ksil, Glu i Fru), 8 disaharida (Treh, Mel, Isomal, Sah, Gent, Tur, Malt i Cel), 5 trisaharida (Melez, Raf, Izomaltri, Pan i Maltri), po jedan tetra-, penta-, heksa- i heptasaharid (Maltetr, Malpet, Malhek i Malhept), kao i 6 šećernih alkohola (Erit, Glic, Arab, Sor, Gal i Man) (**Tabela 12**). Najzastupljeniji šećeri u svim ispitivanim vrstama bili su glukoza (37,0–148,6 mg/g), fruktoza (33,1 – 179,2 mg/g) i saharoza (59,8 – 279,5 mg/g). Dobijeni rezultati su očekivani jer su razvoj ploda i semena i fiziologija biljke određeni sintezom, transportom i razgradnjom ovih šećera.¹⁸¹ Najveći sadržaj Glu, Fru i Sah određen je u uzorcima semena kupine. Saharoza, glukoza i fruktoza su takođe određene kao dominantni šećeri u jezgri breskve i kajsije.^{119,120} Sah je glavni transportni ugljeni hidrat u višim biljkama, izuzev biljaka koje pripadaju familiji Rosaceae, koje koriste Sor kao osnovni translokator ugljenika. Transport Sah i Sor u procesu regulacije ugljenika se obavlja kroz floem od izvora (listova) do korena, ploda i semena.¹⁸² Pored transportne uloge u biljkama, saharoza i proizvodi njene razgradnje (glukoza i fruktoza) deluju i kao signalni molekuli uključeni u kontrolu ćelijske deobe, ekspanziju ćelija i razvoj biljke.¹⁸³ Nivo šećera heksoze (Glu i Fru) zavisi od aktivnosti enzima invertaze i saharoza-sintaze.¹⁸⁴ Studije rađene na uzorcima gajenog i samoniklog g voća iz Slovenije, a među njima i jagodastih vrsta, su potvrdile da glukoza i fruktoza čine 75% od ukupnog sadržaja šećera.¹¹⁶

Pored Glu i Fru, kao glavnih monosaharida u uzorcima semena voća, određen je još i sadržaj Ram (0,06 – 0,84 mg/g), Ksil (0,01 – 2,66 mg/g) i Arab (0,26 – 7,25 mg/g). Sadržaj Arab bio je najveći u uzorcima kupine (2,58 – 7,25 mg/g) i aronije (7,13 mg/g).

Među određenim disaharidima Treh je bila najzastupljenija u uzorcima semena crne ribizle (14,03 – 59,62 mg/g) dok se u ostalim ispitivanim vrstama voćaka njen sadržaj kretao od 0,14 mg/g do 18,12 mg/g. Sadržaj Mel bio je najveći u ekstraktima semena maline (0,21 – 33,7 mg/g), dok se u ostalim uzorcima kretao u opsegu od 0,11 mg/g do 13,54 mg/g. Tur je bila najzastupljenija u uzorku semena godžija (15,33 mg/g), peruanske jagode (12,74 mg/g) i aronije (12,60 mg/g), dok je najmanji sadržaj određen u ekstraktima semena maline (2,50 – 4,21 mg/g). Malt je bila prisutna u opsegu koncentracija od 1,92 do 7,28 mg/g, Isomal u opsegu 0,08 – 4,59 mg/g. Uzorci semena crne ribizle i jagode imali su najviši sadržaj Gent (2,12 mg/g i 2,27 mg/g, redom) i Cel (2,91 mg/g i 1,47 mg/g, redom).

Panoza je najzastupljeniji trisaharid u uzorcima semena voća, što je u skladu sa literaturnim podacima dobijenim za koštice kajsije.¹¹⁹ Najviši sadržaj Pan prisutan je u ekstraktima semena kupine (8,08 – 55,41 mg/g), dok je u ostalim uzorcima bila prisutna u opsegu koncentracija od 1,90 mg/g do 26,26 mg/g. Za razliku od Pan, ostali trisaharidi su bili prisutni u nižim koncentracijama, Melez (0,18 – 7,77 mg/g), Raf (0,80 – 8,36 mg/g), Isomaltri (0,20 – 1,75 mg/g) i Maltri (0,12 – 0,88 mg/g).

Maltetr (0,32 – 11,03 mg/g), Malpet (0,24 – 9,16 mg/g), Malhek (0,32 – 15,70 mg/g) i Malhept (0,31 – 15,82 mg/g) su određeni u svim ispitivanim ekstraktima semena gajenog voća, ali najveći sadržaj ovih oligosaharida bio je u uzorcima semena kupine. Ranije studije su pokazale da polisaharidi izolovani iz semena kupine imaju antikoagulaciono dejstvo, što je dalo farmakološku

osnovu za kliničku primenu izolovanih polisaharida u prevenciji i tretmanu kardiovaskularnih oboljenja.¹⁸⁵ Maltooligosaharidi se mogu koristiti kao izvor ugljenika za klijanje i razvoj semena, ako postoji enzim za hidrolizu ovih oligosaharida do krajnjih proizvoda glukoze i maltoze.¹⁸⁶

Glicerol je najzastupljeniji šećerni alkohol u uzorcima semena gajenog voća (5,87 – 44,98 mg/g) što se objašnjava činjenicom da seme predstavlja skladište lipida u biljkama uglavnom u obliku triacilglicerola (nastalih eterifikacijom glicerola i tri masne kiseline), koji se lako hidrolizuju u uslovima analize šećera (alkalna sredina). Srednja vrednost sadržaja Erit (0,98 – 14,19 mg/g) i Sor (0,90 – 9,0 mg/g) u ispitivanim uzorcima bila je veća od srednje vrednosti sadržaja Arabt (0,58 – 4,36 mg/g), Man (0,39 – 2,10 mg/g) i Gal (0,13 – 1,04 mg/g).

Na sadržaj šećera u uzorcima semena gajenog voća primenjen je KW test (**Tabela 12**), u cilju provere postojanja statistički značajne razlike u vrednostima medijana ispitivanih vrsta voća. Od ukupno 28 analiziranih šećera, jedino se sadržaj Isomal u ispitivanim vrstama nije statistički značajno razlikovao. Na osnovu sadržaja maltooligosaharida (Maltetr, Malpet, Malhek, Malhep) moguće je razlikovati ribizlu od maline, kupine i jagode, kao i borovnicu od maline i kupine (Z-test, **Tabela 12**). Na osnovu sadržaja Gal moguće je razlikovati ribizlu od ogrozda, na osnovu sadržaja Sah ribizlu od borovnice, a na osnovu sadržaja Malt borovnicu od jagode. Uzorci maline i kupine, familija Rosaceae, se mogu razlikovati na osnovu sadržaja Arab i Isomaltri. Rezultati ovog testa potvrdili su da uzorci jagode i ribizle imaju jedinstvene profile šećera, koji se značajno razlikuju prema velikom broju ispitivanih parametara u odnosu na ostale vrste.

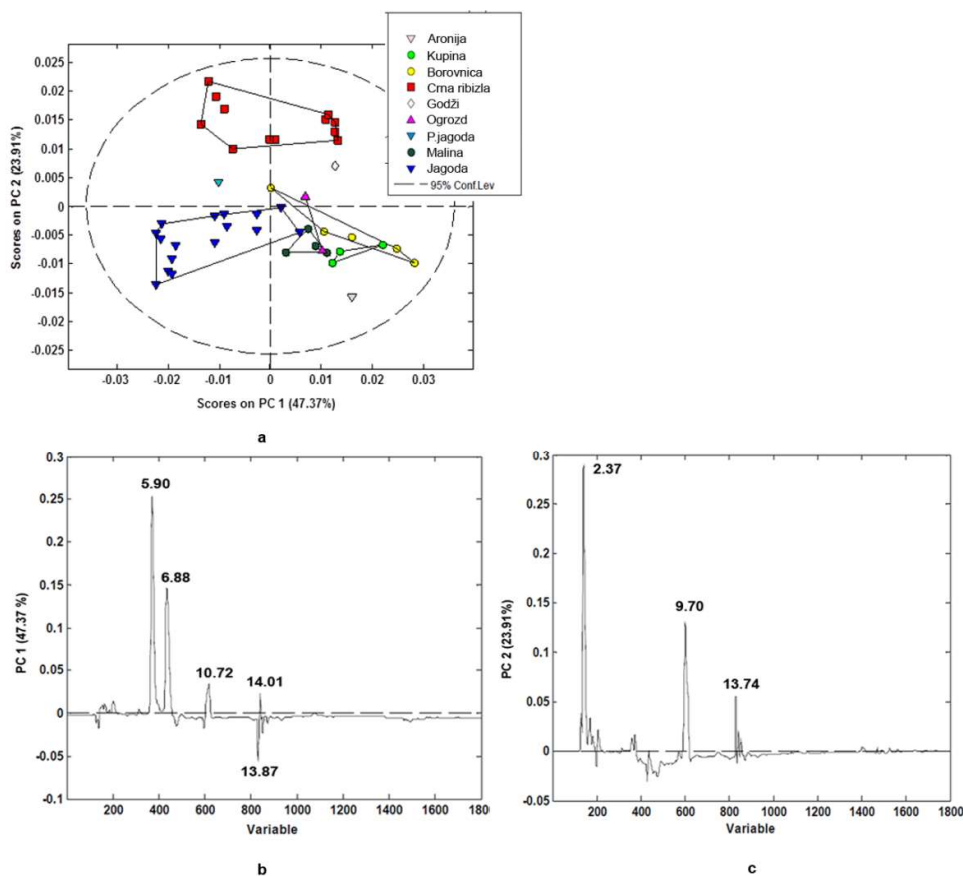
Tabela 12. Parametri deskriptivne statistike šećera u analiziranim uzorcima semena gajenog voća (mg/g) i rezultati KW-testa.

Botanička vrsta	Parametar	Erit	Glic	Arabt	Sor	Gal	Man	Treh	Ram	Arab	Ksil	Glu	Fru	Mel	Isomal
	<i>t_R</i> (min)	2,21	2,36	2,61	2,72	3,05	3,38	3,68	4,21	5,04	5,36	5,91	6,88	7,91	8,39
Malina (M) n = 4	sr.vred.	0,98	11,80	0,87	2,01	0,45	1,75	0,24	0,27	1,80	0,63	88,0	130,4	10,67	1,30
	medijana	0,88	12,14	0,36	1,40	0,37	1,75	0,18	0,28	1,80	0,79	81,9	139,5	4,39	0,25
	stdev	0,83	1,74	1,04	1,58	0,37	0,91	0,15	0,11	0,64	0,34	37,1	31,6	15,48	2,20
	min	0,09	9,39	0,33	0,95	0,10	0,90	0,14	0,13	1,06	0,12	49,6	86,0	0,21	0,08
	max	2,10	13,54	2,43	4,31	0,98	2,60	0,47	0,40	2,55	0,81	138,8	156,7	33,7	4,59
Ogrozd (O) n = 2	sr.vred.	2,54	14,72	0,99	1,46	0,13	0,87	2,53	0,57	3,46	0,99	62,0	105,8	5,50	0,67
	medijana	2,54	14,72	0,99	1,46	0,13	0,87	2,53	0,57	3,46	0,99	62,0	105,8	5,50	0,67
	stdev	1,98	3,08	1,26	1,04	0,04	0,49	3,03	0,38	0,12	0,64	2,79	48,4	0,96	0,23
	min	1,14	12,54	0,10	0,73	0,10	0,53	0,39	0,31	3,38	0,53	60,0	71,6	4,82	0,50
	max	3,94	16,90	1,87	2,20	0,16	1,22	4,67	0,84	3,55	1,44	64,0	140,0	6,17	0,83
Kupina (K) n = 3	sr.vred.	2,74	14,90	1,50	3,05	0,58	2,10	6,44	0,21	4,77	1,87	120,7	148,3	5,73	1,20
	medijana	1,62	13,92	0,44	3,22	0,52	1,86	1,00	0,07	4,47	2,51	134,4	136,2	4,71	0,45
	stdev	2,05	2,23	2,10	1,77	0,40	1,26	10,12	0,26	2,35	1,24	36,8	21,6	3,53	1,38
	min	1,50	13,33	0,14	1,20	0,21	0,98	0,20	0,06	2,58	0,44	78,9	135,5	2,82	0,35
	max	5,11	17,45	3,93	4,72	1,00	3,47	18,12	0,52	7,25	2,66	148,6	173,2	9,66	2,79
Borovnica (B) n = 5	sr.vred.	1,36	9,03	0,65	2,53	0,52	0,39	6,85	0,22	2,21	0,28	70,2	79,4	0,44	0,74
	medijana	1,46	8,42	0,54	2,29	0,38	0,40	6,62	0,18	2,23	0,27	60,8	60,6	0,44	0,34
	stdev	0,45	1,70	0,22	0,47	0,27	0,13	3,64	0,14	0,56	0,19	20,5	29,8	0,17	0,64
	min	0,62	7,50	0,50	2,18	0,27	0,20	3,41	0,09	1,37	0,08	48,5	53,2	0,25	0,24
	max	1,81	11,52	1,02	3,28	0,84	0,56	12,39	0,45	2,86	0,47	100,4	116,8	0,60	1,64
Crna Ribizla (R) n = 12	sr.vred.	5,21	28,04	4,36	1,44	1,04	1,42	14,03	0,30	2,28	0,29	68,5	77,0	3,79	0,52
	medijana	3,80	27,85	0,34	1,32	0,64	1,20	6,72	0,24	2,17	0,15	70,6	68,4	3,18	0,53
	stdev	3,79	9,58	13,24	1,34	1,23	0,76	17,17	0,17	1,24	0,30	18,0	30,5	3,17	0,32
	min	1,95	15,77	0,09	0,08	0,08	0,45	2,15	0,08	0,26	0,01	37,0	33,1	0,73	0,10
	max	14,19	44,98	46,35	5,06	4,20	2,85	59,62	0,61	4,33	0,80	99,0	130,2	11,81	1,33
Jagoda (J) n = 16	sr.vred.	2,28	12,22	0,58	0,90	0,59	0,50	3,83	0,17	2,41	1,02	77,1	125,2	2,01	0,62
	medijana	1,84	12,20	0,54	0,84	0,48	0,47	3,37	0,17	2,46	0,86	84,1	131,7	0,87	0,68
	stdev	1,56	4,28	0,25	0,32	0,44	0,27	1,58	0,07	0,79	0,30	16,8	28,4	3,39	0,22
	min	1,11	5,87	0,31	0,47	0,08	0,07	1,66	0,07	1,23	0,78	51,6	71,1	0,11	0,19
	max	7,34	19,28	1,17	1,54	1,62	1,24	6,86	0,29	3,77	1,79	96,8	179,2	13,54	1,01
Aronija (n = 1)		1,71	16,53	1,30	9,0	0,45	0,39	16,02	0,71	7,13	1,79	133,7	84,5	2,66	0,14
Godži (n = 1)		3,76	29,48	0,90	1,69	0,24	0,82	2,16	0,11	3,92	0,22	76,9	77,6	4,82	0,15
Peruanska jagoda (n = 1)		2,48	12,78	0,63	0,82	0,29	0,48	2,18	0,36	1,86	0,095	67,7	69,0	1,51	0,93
P		0,0017	<0,0001	0,6085	0,0075	0,4889	0,00025	0,0049	0,0729	0,0946	0,00014	0,2804	0,00237	0,0475	0,6769
KW test															
	Z-vrednost	R(B,J,M)	R(B,J,M)	J(K,R)	B(J,R) J(K)	R(O)	B,J(K,M,R)	M(B,J,R) J(R)	O(J,K) J(R)	K(M,R) M(O)	B,R(J,K)	K(O,R)	B,R(J,K,M)	B(K,O) J(K,R)	/

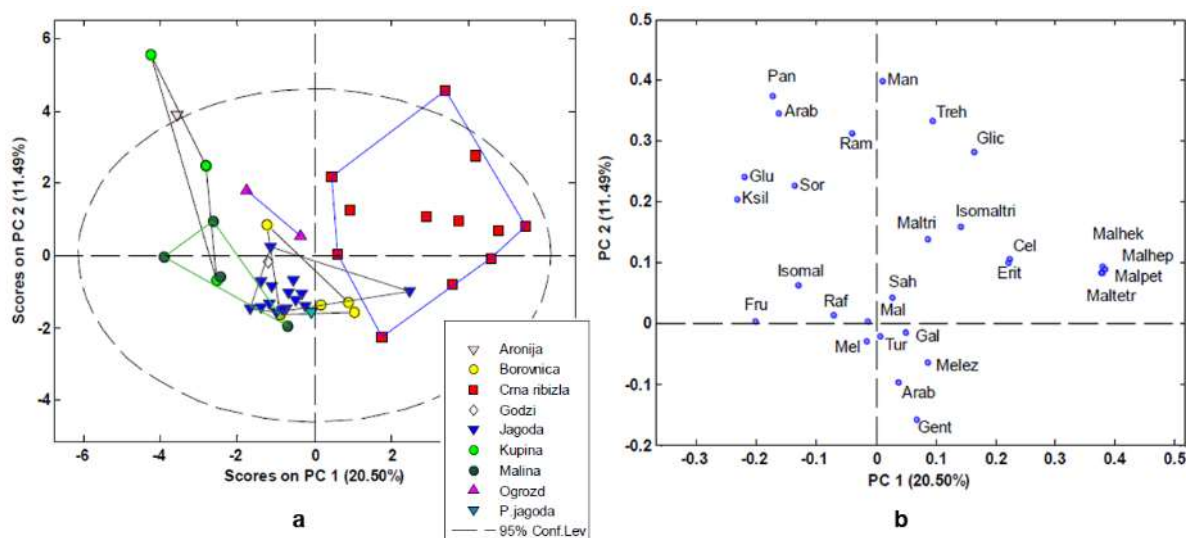
Tabela 12. Nastavak.

Botanička vrsta	Parametar	Sah	Cel	Melez	Gent	Tur	Raf	Isomaltri	Malt	Pan	Maltri	Maltetr	Malpet	Malhek	Malhep
	t_R (min)	9,70	10,72	13,74	14,01	14,35	14,62	14,93	15,82	18,11	19,43	24,38	24,68	25,03	25,39
Malina (M) n = 4	sr.vred.	144,4	0,86	0,39	0,20	3,53	3,09	0,32	2,85	13,18	0,18	1,32	1,11	1,62	1,78
	medijana	160,8	0,81	0,37	0,21	3,71	3,31	0,25	2,87	13,27	0,14	1,54	1,36	1,99	2,10
	Stdev	55,4	0,24	0,12	0,08	0,79	0,56	0,18	0,28	10,25	0,09	0,68	0,58	0,88	1,03
	Min	69,4	0,61	0,27	0,09	2,50	2,27	0,20	2,50	3,87	0,12	0,33	0,26	0,32	0,35
	Max	186,8	1,18	0,55	0,27	4,21	3,47	0,59	3,17	22,30	0,32	1,88	1,48	2,18	2,58
Ogrozd (O) n = 2	sr.vred.	155,8	2,26	1,04	0,49	4,59	7,09	1,43	3,57	18,61	0,49	2,25	2,09	3,05	2,88
	medijana	155,8	2,26	1,04	0,49	4,59	7,09	1,43	3,57	18,61	0,49	2,25	2,09	3,05	2,88
	Stdev	124,0	1,53	1,22	0,52	1,01	1,79	0,44	0,17	9,36	0,32	0,90	0,73	1,11	0,50
	Min	68,1	1,18	0,18	0,13	3,87	5,82	1,12	3,45	11,99	0,26	1,61	1,58	2,26	2,53
	Max	243,5	3,34	1,90	0,86	5,31	8,36	1,75	3,69	25,23	0,71	2,88	2,61	3,83	3,23
Kupina (K) n = 3	sr.vred.	150,3	0,84	1,61	1,04	3,51	3,80	0,88	3,28	27,45	0,37	1,40	1,26	1,85	2,02
	medijana	111,4	0,74	0,87	0,41	2,29	3,42	0,93	2,90	18,85	0,35	1,39	1,31	1,89	2,16
	Stdev	114,8	0,28	1,50	1,09	2,16	1,67	0,14	0,80	24,81	0,07	1,09	1,00	1,50	1,64
	Min	59,9	0,62	0,62	0,40	2,24	2,35	0,73	2,74	8,08	0,31	0,32	0,24	0,32	0,31
	Max	279,5	1,15	3,33	2,30	6,01	5,62	0,99	4,21	55,41	0,44	2,50	2,24	3,33	3,58
Borovnica (B) n = 5	sr.vred.	91,2	0,84	1,72	1,34	7,04	3,13	0,54	2,49	8,37	0,47	3,98	3,64	4,93	5,43
	medijana	92,3	1,09	1,85	1,75	7,19	1,68	0,57	2,27	4,58	0,39	4,18	3,79	5,43	6,25
	Stdev	15,7	0,49	1,18	0,99	0,80	2,86	0,18	0,47	10,07	0,28	1,51	1,32	1,48	1,52
	Min	73,0	0,22	0,39	0,27	5,73	0,80	0,37	2,09	2,34	0,15	1,76	1,73	2,53	2,86
	Max	115,0	1,36	3,40	2,34	7,88	7,64	0,81	3,14	26,26	0,78	5,53	5,04	6,47	6,45
Crna Ribizla (R) n = 12	sr.vred.	145,36	2,91	2,81	2,12	5,91	4,00	0,83	3,42	7,99	0,42	7,06	6,07	9,24	10,21
	medijana	149,2	1,47	2,72	1,45	6,33	3,49	0,84	3,19	5,32	0,36	6,70	6,17	9,58	10,98
	Stdev	23,4	2,98	1,21	2,35	1,60	1,48	0,38	1,09	5,72	0,23	2,75	2,37	3,85	3,91
	Min	95,9	0,25	0,81	1,20	1,22	2,64	0,35	1,92	2,39	0,15	2,33	2,17	3,33	4,07
	Max	184,6	10,01	4,98	9,55	7,65	7,81	1,74	5,68	19,25	0,88	11,03	9,16	15,70	15,82
Jagoda (J) n = 16	sr.vred.	132,8	1,47	3,96	2,27	6,97	5,15	0,69	3,99	6,51	0,43	2,78	2,51	3,69	4,09
	medijana	107,7	1,39	3,77	2,11	7,07	5,28	0,58	3,92	6,82	0,40	2,61	2,37	3,25	3,35
	Stdev	52,0	0,29	1,36	0,91	0,68	1,55	0,31	1,23	2,82	0,16	1,61	1,44	2,26	2,60
	Min	59,8	1,08	2,07	1,03	5,77	2,13	0,38	1,69	1,90	0,18	1,17	1,11	1,77	2,02
	Max	229,6	2,21	7,67	4,11	8,02	8,37	1,51	6,99	10,89	0,69	7,77	6,95	10,96	12,54
Aronija (n = 1)		97,8	0,75	1,84	0,69	12,60	7,22	0,60	2,67	19,40	0,53	1,76	1,44	2,32	2,35
Godži (n = 1)		162,2	1,29	3,74	2,45	15,33	6,68	0,73	7,28	20,63	0,21	1,61	1,06	1,30	1,12
Peruanska jagoda (n = 1)		121,2	2,16	7,77	2,62	12,74	3,96	0,76	3,14	8,93	0,31	2,20	1,90	2,72	3,10
P		0,2533	0,0094	0,00046	0,0022	0,00082	0,0222	0,0096	0,0559	0,1333	0,2028	0,00015	0,00015	<0,0001	<0,0001
KW test	Z-vrednost	B(R)	J,R(B,K,M)	J(B,K,MO) M(R)	M(B,J,R) J(O)	B,J(K,M,O) J(R)	O(B,M,R) J(B,M)	O(B,J,M) M(J,K,R)	B(J)	B(K,O) J(K)	M(B,J,R)	B (K,M) R(J,K,M,O)	B(K,M) R(J,K,M)	B(K,M) R(M,K,J)	B(M) R(J,K,M,O)

Hromatogrami šećera dobijeni primenom Chromeleon softvera su eksportovani u *Excel* kao zavisnost intenziteta signala od retencionog vremena i korišćeni za metaboličko profilisanje. Analiza glavnih komponenata primenjena na profil šećera ekstrakata semena gajenog voća rezultirala je četvorokomponentnim modelom, koji je objasnio 82,18% od ukupnog varijabiliteta podataka. Na **Slici 12a** je prikazan grafik skorova prve i druge latentne varijable, koje su objasnile 47,37%, i 23,91% varijabiliteta između podataka, redom. Za razliku od rezultata dobijenih za profil masnih kiselina i lipida, PCA primenjena na profile šećera pokazala je potpunu diferencijaju uzoraka semena crne ribizle i jagode, dok su uzorci maline, kupine i borovnice formirali klastere koji se delimično preklapaju. Uzorci semena peruanske jagode, aronije i godžija su pokazali jedinstvene profile šećera, koji se razlikuju od ostalih vrsta gajenog voća. Na grafiku doprinosa pojedinačnih varijabli (**Slika 12b/c**) uočava se da su varijable koje imaju najveći uticaj na razdvajanje duž PC2 ose šećeri na $t_R = 2.37$ (Gly), 9,70 (Sac) i 13,74 min (Mels). Varijable sa najvećim pozitivnim uticajem na razdvajanje duž PC1 ose su šećeri na $t_R = 5,90$ (Glu), 6,88 (Fru), 10,72 (Cel) i 14,01 min (Gent).



Slika 12. Analiza glavnih komponenata: a) grafik skorova latentnih varijabli dobijen za profil šećera u uzorcima semena gajenog voća, b/c) uzajamne projekcije koeficijenata latentnih varijabli.



Slika 13. Analiza glavnih komponentata: a) grafik skorova latentnih varijabli dobijen za sadržaj šećera (mg/g) u uzorcima semena gajenog voća, b/c) uzajamne projekcije koeficijentata latentnih varijabli.

Ciljana analiza izvršena je primenom analize glavnih komponentata na podatke o sadržaju određivanih šećera (mg/g) (**Tabela 12**). Dobijen je šestokomponentni model pomoću kojeg je objašnjeno 65,21% od ukupnog varijabiliteta među podacima (PC1 – 20,50%, PC2 – 11,49%). Na grafiku skorova latentnih varijabli (**Slika 13a**) se uočava odvajanje uzoraka crne ribizle duž PC1 ose od ostalih vrsta. Uzorci jagode su formirali kompaktan klaster i pokazali sličan profil šećera kao uzorci borovnice, peruanske jagode i godžija. Uzorci kupine su delimično preklapljeni sa uzorcima maline i aronije, dok su uzorci godžija formirali zaseban klaster između uzoraka jagode, crne ribizle i kupine. Sa grafika vektora latentnih varijabli (**Slika 13b**) uočavamo da su uzorci crne ribizle odvojeni od ostalih uzoraka duž PC1 ose, zahvaljujući višim vrednostima sadržaja maltooligosaharida (Maltri, Isomalti, Maltetr, Malpet, Malhek, Malhep) i Cel i Erit, dok je sadržaj Pan, Arab, Glu i Ksil bio veći u uzorcima kupine i aronije. U uzorcima ogrozda je sadržaj Raf i Ram bio veći u poređenju sa drugim vrstama, dok je sadržaj Isomali bio najmanji. Rezultati PCA analize primenjene na sadržaj šećera u uzorcima gajenog voća su u skladu sa rezultatima univarijantne analize (KW test).

Poređenjem rezultata PCA analize primenjene na profile šećera i na sadržaj pojedinačnih šećera, vidi se da je u oba slučaja došlo do grupisanja uzoraka crne ribizle i jagode, kao najbrojnijih grupa uzoraka. PCA model dobijen za sadržaj šećera, obuhvatio je manji udeo od ukupnog varijabiliteta među podacima i to sa većim brojem komponentata. Uzorci jagode su bolje razdvojeni od ostalih vrsta voćaka na osnovu profila šećera, za razliku od kvantitativnog sastava gde su formirali kompaktan klaster ali delimično preklapljen sa uzorcima maline, borovnice, peruanske jagode i godžija. U slučaju uzoraka ogrozda bolje razdvajanje je postignuto na osnovu sadržaja pojedinačnih šećera, dok su na osnovu profila šećera ovi uzorci preklapljeni sa uzorcima kupine, maline i borovnice. Kompletan profil šećera je omogućio jasnu diferencijaciju uzoraka semena peruanske jagode, aronije i godžija, za razliku od kvantitativnog sastava određenog broja ciljanih jedinjenja na osnovu kojeg nije bilo moguće razdvojiti ove uzorke od ostalih bijnih vrsta sa većim brojem ispitivanih sorti.

Samoniklo voće

U analiziranim divljim vrstama voćaka najzastupljeniji šećeri su bili Glu (57,1 – 343,3 mg/g), Fru (54,5 – 204,2 mg/g) i Sah (15,5 – 204,5 mg/g) (**Tabela 13**), dok su u uzorcima semena gajenih

vrsta voćaka bile dominantne Fru i Sah. Dobijeni rezultati u skladu su sa istraživanjima rađenim na uzorcima gajene i divlje jabuke, koja su pokazala da su Fru i Sah dominantni rastvorljivi saharidi u uzorcima gajene jabuke, dok su Glu i Fru najzastupljeniji u divljoj jabuci. Prosečna koncentracija ukupnih šećera i indeks slasti bili su relativno slični između uzoraka gajene i divlje jabuke, što je dovelo do pretpostavke da je ukupna kiselost voća, a ne slast, bila pod značajnim uticajem selekcije tokom pripitomljavanja.¹⁸⁷ Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije takođe su pokazali slične vrednosti za prosečne koncentracije ukupnih šećera u ispitivanim uzorcima gajenog i samoniklog voća određene vrste. U uzorcima malina je prosečna koncentracija ukupnih saharida u gajenim uzorcima iznosila 426 mg/g a u samoniklim 425 mg/g, za seme kupine (GV – 514 mg/g, SV – 498 mg/g), za seme ogrozda (GV – 408 mg/g, SV – 362 mg/g), za seme jagode (GV – 407 mg/g, SV – 386 mg/g), peruanske jagode (GV – 335 mg/g, SV – 366 mg/g), dok je u semenu ribizle prosečna koncentracija ukupnih saharida bila primetno niža u gajenim uzorcima (417 mg/g) u poređenju sa samoniklim (560 mg/g). Istraživanje rađeno na uzorcima divlje borovnice, jagode i šipurka sa područja Bosne i Hercegovine, takođe je pokazalo najviši sadržaj Fru i Glu, dok je sadržaj Sah bio manji, što se objašnjava visokom aktivnošću invertaze u završnoj fazi zrenja.¹⁸⁸ Sadržaj ostalih monosaharida (Ram, Ksil, Arab) u semenu samoniklog voća bio je znatno niži (0,02 – 2,25 mg/g; 0,05 – 5,11 mg/g; 0,11 – 28,6 mg/g, redom), u poređenju sa Glu i Fru.

Mel je najzastupljeniji disaharid posle Sah u svim ispitivanim uzorcima divljeg voća, sa srednjim sadržajem od 15,0 mg/g, dok je visok sadržaj ovog šećera primećen u uzorku kleke (158,0 mg/g). Sadržaj Malt (1,35 – 40,3 mg/g), Treh (0,17 – 21,8 mg/g) i Tur (0,93 – 10,0 mg/g) bio je veći od sadržaja Cel (0,07 – 16,4 mg/g), Gen (0,003 – 8,00 mg/g) i Isomal (0,01 – 6,63 mg/g). Kao i u slučaju semena gajenog voća, Pan je najzastupljeniji trisaharid sa najvećim sadržajem u uzorku crne udike (134,1 mg/g), dok je u ostalim uzorcima prisutna u opsegu koncentracija od 1,09 do 50,0 mg/g. Zatim slede Raf (0,16 – 35,9 mg/g) i Melez (0,02 – 14,21 mg/g), dok su Maltri (0,19 – 7,53 mg/g) i Isomaltri (0,13 – 1,92 mg/g) prisutni u nižim koncentracijama. Srednja vrednost sadržaja viših maltooligosaharida (Maltetr, Malpet, Malhek, Malhep) u uzorcima samoniklog voća kretala se u opsegu 6,21 – 7,67 mg/g.

Zbog hidrolize triacilglicerola u uslovima analize šećera, glicerol je najzastupljeniji šećerni alkohol i u uzorcima semena samoniklog voća (4,95 – 57,0 mg/g). Sadržaj Sor (0,02 – 28,1 mg/g) i Arabt (0,05 – 21,7 mg/g) u ispitivanim uzorcima bio je veći od sadržaja Erit (0,11 – 6,51 mg/g), Man (0,10 – 11,4 mg/g) i Gal (0,06 – 5,88 mg/g).

Tabela 13. Parametri deskriptivne statistike šećera u analiziranim uzorcima semena samoniklog voća (mg/g).

Oznaka uzorka (SV)	Erit	Glic	Arabt	Sor	Gal	Man	Treh	Ram	Arab	Ksil	Glu	Fru	Mel	Isomal	Sah	Cel	Melez	Gent
1	1,64	57,0	1,62	7,12	0,06	0,23	4,19	0,47	0,24	6,49	136,9	82,8	1,70	1,03	102,3	0,65	2,57	0,99
2	2,84	15,4	2,39	6,97	2,00	0,13	0,88	0,16	1,39	0,38	90,9	72,00	0,12	1,73	99,9	0,48	0,99	0,01
3	0,73	42,8	4,90	16,0	3,40	3,82	8,03	0,85	0,71	0,11	153,6	149,1	1,07	0,47	87,1	2,82	1,03	0,06
4	0,74	52,7	2,81	28,1	1,92	2,11	6,04	2,25	1,04	1,25	160,1	167,1	2,11	6,40	59,2	1,39	1,14	0,06
5	3,56	13,3	0,39	13,1	2,27	3,91	1,22	0,02	0,05	4,62	259,4	104,5	5,85	0,13	51,1	1,41	0,86	0,06
6	3,59	13,1	1,68	15,2	3,42	1,68	5,83	1,34	0,13	5,61	343,3	204,2	30,3	0,12	45,1	1,20	1,24	0,18
7	2,07	29,1	0,15	10,3	1,59	0,36	0,17	0,96	0,26	8,56	77,8	68,4	12,6	3,79	71,4	2,03	2,72	0,04
8	1,58	24,6	3,63	12,9	1,56	0,92	0,47	0,50	0,84	19,4	161,6	171,6	16,9	2,47	74,5	0,70	7,63	0,55
9	6,51	15,2	2,81	9,83	1,09	0,44	1,17	0,55	0,74	4,72	101,5	121,5	13,3	0,31	186,3	0,53	1,89	0,02
10	2,84	39,3	0,05	11,1	2,98	0,68	1,97	0,96	0,16	4,35	161,6	184,0	26,7	0,45	37,5	1,97	0,02	0,01
11	0,99	23,6	2,18	13,6	2,40	0,12	9,87	0,37	0,84	6,23	121,9	128,6	0,0	0,09	48,1	3,55	0,05	0,003
12	1,43	11,2	0,07	3,97	0,40	1,73	0,66	0,16	2,93	3,18	105,8	116,5	5,1	0,21	139,1	16,4	1,18	0,06
13	2,18	20,0	3,59	14,4	3,52	0,69	18,4	0,67	4,21	28,6	142,9	93,7	35,5	0,28	102,6	10,5	0,60	0,24
14	4,82	15,4	0,99	1,71	1,42	0,50	0,85	0,28	0,60	2,42	68,4	63,5	6,8	0,37	130,8	0,77	1,14	0,23
16	0,11	5,18	0,34	5,12	4,15	0,29	14,0	0,74	0,22	2,45	99,1	130,1	158,0	6,63	40,0	0,45	3,93	2,54
18	0,44	12,8	21,7	1,02	5,88	0,61	2,81	0,79	0,76	3,27	63,5	63,4	8,5	0,47	150,7	0,31	7,02	7,38
19	1,41	19,9	6,96	0,70	0,30	1,23	0,53	0,48	1,62	2,40	79,9	84,5	2,1	0,23	28,4	1,08	2,77	2,30
20	0,56	4,95	0,05	0,02	0,77	4,82	0,40	0,25	2,46	9,36	100,0	167,0	16,6	0,06	15,5	0,07	2,37	0,99
21	2,34	24,1	2,32	1,68	0,21	1,58	1,07	0,29	0,37	2,67	84,2	85,5	4,9	0,05	31,4	0,66	0,64	2,79
22	2,85	21,3	1,43	2,26	0,16	0,10	1,67	0,03	2,15	0,81	57,1	54,5	1,5	0,63	36,3	0,51	1,58	0,43
23	0,26	9,67	1,82	6,81	0,79	0,86	8,47	0,31	0,41	2,81	111,2	123,6	16,8	0,01	75,1	0,46	6,98	4,31
24	3,40	19,6	3,22	2,45	0,12	0,71	0,25	0,44	0,22	4,97	86,7	74,4	13,2	0,63	93,8	4,33	3,72	3,88
25	1,45	36,6	1,58	13,0	1,18	2,61	7,16	0,25	2,92	0,20	109,7	118,8	24,7	0,25	72,2	1,92	14,2	5,06
26	1,47	14,9	0,81	1,57	0,56	2,36	4,54	0,34	2,34	7,61	67,8	85,1	1,1	0,29	80,9	0,27	1,84	0,48
27	1,38	17,7	3,06	13,0	1,53	11,4	8,08	0,43	5,11	1,82	227,6	123,5	2,0	0,33	204,5	0,17	3,65	5,11
28	2,70	28,6	3,04	6,15	2,05	5,73	21,8	0,16	3,71	4,35	202,5	177,4	5,5	0,69	175,5	0,36	8,46	8,00
29	1,08	13,8	1,97	5,81	1,17	0,67	2,54	0,41	0,34	1,04	68,1	80,3	3,9	0,43	75,6	0,45	2,24	1,32
30	4,18	6,21	0,80	2,26	0,55	0,52	3,04	0,34	1,08	2,52	99,2	125,3	2,0	0,45	63,0	0,39	0,19	0,47
sr.vrednost	2,11	21,7	2,73	8,08	1,69	1,81	4,86	0,53	1,35	5,08	126,5	115,0	15,0	1,04	84,9	1,99	2,95	1,70
medijana	1,61	18,6	1,89	6,89	1,48	0,79	2,68	0,42	0,80	3,23	103,6	117,6	5,67	0,40	74,8	0,68	1,87	0,47
stdev	1,50	13,4	4,04	6,47	1,42	2,39	5,58	0,45	1,37	6,02	65,9	41,8	29,7	1,75	49,6	3,48	3,22	2,34
min	0,11	4,95	0,05	0,02	0,06	0,10	0,17	0,02	0,05	0,11	57,1	54,5	0,02	0,01	15,5	0,07	0,02	0,003
max	6,51	57,0	21,7	28,1	5,88	11,4	21,8	2,25	5,11	28,6	343,3	204,2	158,0	6,63	204,5	16,4	14,2	8,00

Tabela 13. Nastavak.

Oznaka uzorka (SV)	Tur	Raf	Isomalttri	Malt	Pan	Maltri	Maltetr	Malpet	Malhek	Malhep
1	4,57	2,50	1,51	2,58	12,3	0,30	4,11	4,43	5,94	6,57
2	4,34	0,82	0,13	1,35	4,30	1,03	3,27	2,44	2,75	3,14
3	4,44	1,41	0,27	16,9	1,09	0,62	2,09	1,19	1,44	0,57
4	7,10	3,22	1,43	6,13	36,7	0,74	9,39	8,24	8,08	8,65
5	3,23	1,47	1,46	1,79	21,8	0,69	4,62	4,19	4,09	4,39
6	3,28	0,16	1,67	3,12	17,5	0,63	4,42	3,84	4,60	3,10
7	7,67	3,35	1,59	3,30	3,77	0,66	8,15	5,50	6,97	5,01
8	9,99	4,43	1,16	3,28	22,9	3,65	3,16	2,37	3,66	3,29
9	5,08	6,58	1,92	2,64	47,8	7,53	9,27	4,75	2,89	3,37
10	0,93	4,44	1,69	4,96	49,8	5,00	9,87	11,9	0,76	5,85
11	1,57	8,85	1,41	6,73	17,5	6,00	3,87	6,74	3,93	4,29
12	1,77	0,82	0,87	4,63	4,14	0,19	0,72	0,62	0,67	0,60
13	3,89	6,84	1,02	2,17	6,02	0,91	17,5	15,7	22,2	24,8
14	5,50	4,96	0,66	5,08	13,2	0,20	7,68	6,56	8,16	8,63
16	6,47	7,26	0,38	3,14	24,7	0,29	2,50	1,15	1,53	1,33
18	1,33	4,57	0,48	40,3	13,7	0,24	13,6	10,5	12,8	10,3
19	5,23	1,31	1,08	10,6	43,1	0,56	16,8	9,71	10,3	6,76
20	3,52	8,59	1,03	4,42	17,7	1,48	12,6	9,05	13,4	13,9
21	7,47	5,20	0,72	7,07	33,8	0,97	9,04	8,56	12,8	13,9
22	2,98	4,82	0,58	8,71	16,9	0,40	4,16	3,48	5,09	5,52
23	7,54	35,9	0,69	10,4	29,4	0,86	15,3	13,6	20,2	22,6
24	5,44	5,83	0,40	9,63	7,23	2,42	8,79	7,51	10,7	12,1
25	4,24	0,97	0,42	3,83	43,6	0,25	12,1	10,9	16,1	17,2
26	3,12	2,64	0,43	7,65	8,78	0,26	7,63	7,19	10,3	9,89
27	5,89	16,7	0,58	18,6	134,1	0,44	2,41	2,21	3,39	3,74
28	6,47	16,2	0,80	15,3	16,0	0,56	3,32	2,79	3,82	3,31
29	5,97	4,65	0,57	8,84	20,8	0,66	6,97	5,81	8,22	8,69
30	4,10	4,20	0,17	4,68	27,0	0,46	3,50	3,06	3,33	3,14
sr.vrednost	4,75	6,03	0,90	7,78	24,8	1,36	7,39	6,21	7,44	7,67
medijana	4,50	4,50	0,76	5,02	17,6	0,65	7,30	5,66	5,51	5,68
stdev	2,16	7,11	0,52	7,81	25,5	1,88	4,71	3,95	5,72	6,19
min	0,93	0,16	0,13	1,35	1,09	0,19	0,72	0,62	0,67	0,57
max	9,99	35,9	1,92	40,3	134,1	7,53	17,5	15,7	22,2	24,8

4.1.4 Proteinski profil

Skladišni (rezervni) proteini se akumuliraju u semenu u toku njegovog razvoja i predstavljaju izvor energije i rezervu za skladištenje azota, ugljenika i sumpora, neophodnih tokom klijanja semena.¹²³ Osim što pokazuju antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost, proteini semena se mogu koristiti kao alternativni izvor proteina za ljudsku ishranu.¹⁸⁹ U cilju procene nutritivne vrednosti semena voća određen je ukupan sadržaj rastvorljivih proteina primenom Bradfordove metode prema ranije opisanom posupku i izražen kao broj g BSA na 100 g odmašćenog praha semena voća (**Tabele 14 i 15, Slike 14 i 15**). Upotrebom SDS-PAGE elektroforeze dobijen je proteinski profil, koji je korišćen kao jedinstvena karakteristika uzoraka u neciljanoj metabolomičkoj proceni autentičnosti (**Slike 17 i 18**).

4.1.4.1 Određivanje sadržaja ukupnih rastvorljivih proteina

Gajeno voće

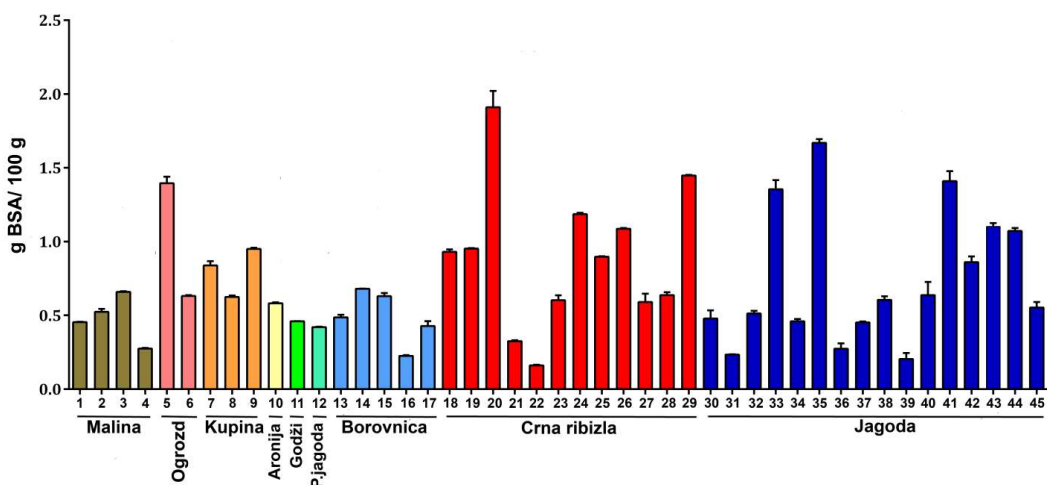
Najveći srednji sadržaj ekstraktibilnih (rastvorljivih) proteina u uzorcima gajenog voća određen je u semenu ogrozda ($1,01 \pm 0,54$ g/100 g), crne ribizle ($0,89 \pm 0,48$ g/100 g) i jagode ($0,74 \pm 0,45$ g/100 g). Nešto manji sadržaj rastvorljivih proteina imali su uzorci kupine ($0,80 \pm 0,17$ g/100 g), borovnice ($0,49 \pm 0,18$ g/100 g), maline ($0,48 \pm 0,16$ g/100 g), aronije ($0,58$ g/100g), godžija ($0,46$ g/100g) i peruanske jagode ($0,42$ g/100g). Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima za uzorke godžija iz različitih regiona Kine, gde se sadržaj rastvorljivih proteina kretao u opsegu od 0,41 do 0,62 g/100 g uzorka.¹⁹⁰

KW test (**Tabela 14**, Z test) primenjen na sadržaj rastvorljivih proteina u semenu gajenog voća je pokazao da ne postoji statistički značajna razlika u njihovom sadržaju između različitih sorti gajenog jagodastog voća.

Tabela 14. Parametri deskriptivne statistike za sadržaj rastvorljivih proteina u uzorcima gajenog voća i rezultati KW-testa.

Botanička vrsta	Malina	Ogrozd	Kupina	Borovnica	Crna ribizla	Jagoda	Aronija	Godži	P.jagoda
g BSA/100 g	(n=4)	(n=2)	(n=3)	(n=5)	(n=12)	(n=16)	(n=1)	(n=1)	(n=1)
sr.vrednost	0,48	1,01	0,80	0,49	0,89	0,74	0,58	0,46	0,42
Medijana	0,49	1,01	0,84	0,49	0,91	0,58			
Stdev	0,16	0,54	0,17	0,18	0,48	0,45			
Min	0,27	0,63	0,62	0,23	0,16	0,20			
Max	0,66	1,40	0,95	0,68	1,91	1,67			
KW test	P	0,2874							
	Z - vrednost	/							

Dosadašnja istraživanja su pokazala da je odmašćeno seme jagode (159-171 g/kg) bolji izvor proteina u poređenju sa semenom marakuje (108 g/kg), semenom pomorandže (31 g/kg), maline (60 g/kg) i kupine (122 g/kg).^{191-193, 125}



Slika 14. Sadržaj rastvorljivih proteina u uzorcima semena gajenog voća.

Samoniklo voće

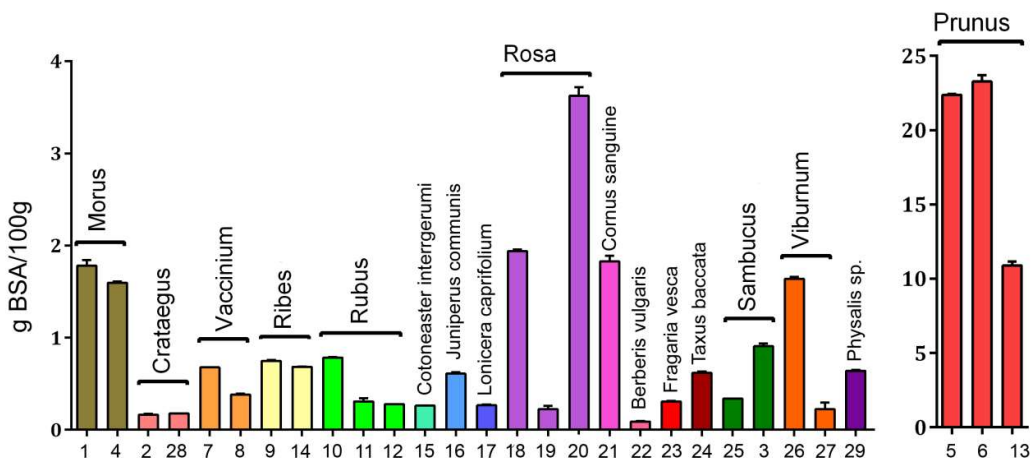
Sadržaj rastvorljivih proteina u uzorcima semena samoniklog voća je varirao u opsegu od 0,09 do 3,63 g BSA/100 g suvog odmašćenog semena, osim u uzorcima roda *Prunus* (uzorci 5, 6 i 13), gde je sadržaj bio veći (10,89–23,28 g/100g) u odnosu na ostale ispitivane vrste (**Tabela 15, Slika 15**). Ranija istraživanja rađena na uzorcima jezgre badema, koji pripadaju rodu *Prunus*, potvrdila su visok sadržaj ukupnih rastvorljivih proteina, koji se kretao u opsegu od 23,96 do 24,64 g/100 g.⁶⁰ Poređenjem literaturnih podataka za sadržaj proteina u plodu samoniklog šipurka (1,60g/100 g) sa njihovim sadržajem u semenu dobijenom u okviru ove disertacije (3,63 g/100g), može se zaključiti da je seme bolji izvor proteina od ploda.¹⁹⁴ Dokazano je i da uslovi sredine kao što je suša, koji u slučaju samoniklog voća nisu kontrolisani, mogu značajno redukovati sadržaj proteina u biljkama.¹⁹⁵

Tabela 15. Sadržaj rastvorljivih proteina izražen kao g BSA u 100 g odmašćenih suvih uzoraka semena samoniklog voća.

Oznaka uzorka (SV)	Voćna vrsta	g BSA/100 g
1	Beli dud	1,78
2	Beli glog	0,16
3	Burjan	0,91
4	Crni dud	1,59
5	Crni trn	22,38
6	Crni trn	23,28
7	Divlja borovnica	0,68
8	Divlja borovnica	0,38
9	Divlja crvena ribizla	0,75
10	Divlja kupina	0,78
11	Divlja kupina	0,31
12	Divlja malina	0,28
13	Divlja trešnja	10,89
14	Divlji ogrozd	0,68
15	Dunjarica	0,26
16	Kleka	0,61
17	Orlove kandže	0,27
18	Poljska ruža	1,94
19	`Burnet` ruža	0,22
20	Šipurak	3,63
21	Svib	1,83
22	Šimširika	0,09
23	Šumska jagoda	0,31
24	Tisa	0,62
25	Zova	0,34
26	Crna udika	1,64
27	Crvena udika	0,23
28	Crni glog	0,18
29	Divlja Peruanska jagoda	0,64
sr.vrednost		2,68
medijana		0,64
stdev		5,94
min		0,09
max		23,28

Na **Slici 15** se može uočiti da vrste koje pripadaju istom rodu imaju sličan sadržaj proteina, što ide u prilog činjenici da biljno poreklo takođe ima veliki uticaj na proteinski sastav. Izuzetak su uzorci roda *Viburnum*, kojem pripadaju crna i crvena udika, gde je sadržaj ukupnih ekstraktibilnih proteina bio sedam puta veći u uzorku crne udike. Dobijeni rezultati su u skladu sa ranijim istraživanjima, koja tvrde da crna udika ima veći sadržaj proteina, esencijalnih ulja i saponina od crvene udike.¹⁹⁶

Takođe, sadržaj proteina u uzorku ruže (19) je bio značajno manji od sadržaja u druga dva uzorka ruže (18 i 20).



Slika 15. Sadržaj rastvorljivih proteina u uzorcima semena samoniklog voća.

Poređenjem rezultata za ukupan srednji sadržaj rastvorljivih proteina istih vrsta voća (maline, ogrozda, kupine, crne ribizle i jagode) koje su uzgajane u različitim uslovima (samoniklo i gajeno voće) uočava se da su gajene vrste imale veći sadržaj proteina. Ovakvi rezultati su u skladu sa ranijim studijama koje su pokazale da na sadržaj proteina značajno utiče upotreba sintetičkih mineralnih đubriva, koja povećavaju dostupnost i apsorpciju raspoloživog azota, neophodnog za razvoj biljke.¹⁹⁷

4.1.4.2 SDS-PAGE elektroforeza

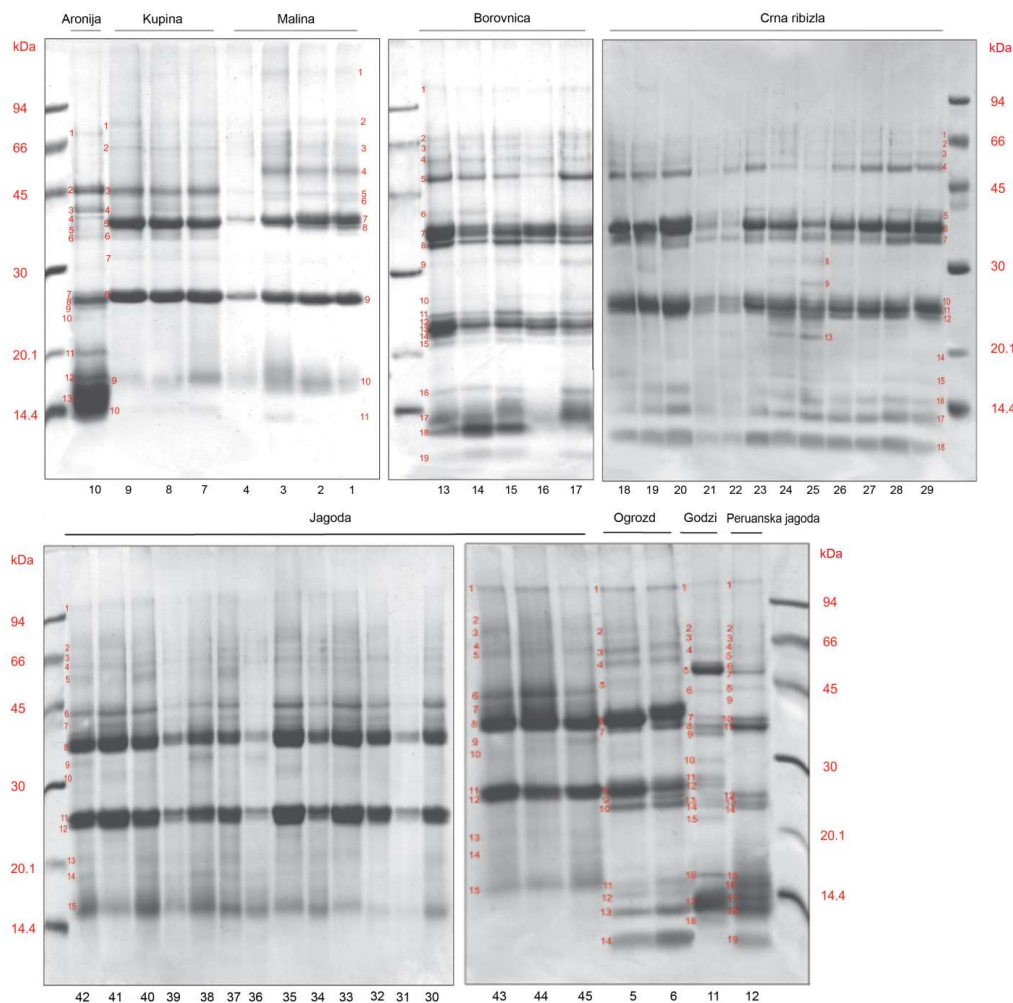
Gajeno voće

Analizom elektroforetskih profila ekstraktibilnih proteina semena gajenog jagodastog voća uočava se da je prisutan veliki broj polipeptida, od kojih su dva polipeptida od 36 – 40 kDa i 23 – 27 kDa, bila prisutna u svim uzorcima (Tabela 16, Slike 16 i 17). Trake koje potiču od ovih polipeptida su bile dominantne u svim ispitivanim vrstama, osim u semenu aronije, ogrozda i godžija, gde su najzastupljeniji bili polipeptidi sa molekulskim masama manjim od 20,1 kDa. Ranija istraživanja su pokazala da su proteini sa molekulskim masama od 36, 24 i 23 kDa karakteristični za ahenije (seme) jagode i da su označeni kao ahenija-proteini.¹²⁹ To su skladišni proteini semena i zato su detektovani u svim analiziranim uzorcima.

Takođe je uočeno da sve sorte unutar iste vrste jagodastih voćaka imaju identične polipeptidne trake sa karakterističnim molekulskim masama. Ovo je u skladu sa ranijim studijama koje su ukazale na identične SDS-PAGE elektroforetske obrasce za različite sorte uzoraka soje^{198,199}, kikirikija⁶⁴ i badema.⁶⁰ Iz navedenog se može zaključiti da su proteinski profili specifični za svaku biljnu vrstu, ali ne i za različite sorte u okviru iste biljne vrste. Sorte se mogu razlikovati prema intenzitetu polipeptidnih traka i udelu karakterističnih polipeptida.

Pored glavnih proteinskih traka koje su bile prisutne u svim analiziranim uzorcima, svaka vrsta gajenog voća je sadržala karakteristične polipeptide koji su ih razlikovali. Seme jagoda je sadržalo karakteristične polipeptidne trake sa molekulskim masama na 44,4 kDa, 37,9 kDa, 26,5 kDa i 15,7 kDa; seme crne ribizle na 52,5 kDa, 37,2 kDa, 34,7 kDa, 13,4 kDa i 10,7 kDa; seme borovnice na 53,4 kDa, 38,5 kDa, 36,2 kDa, 23,7 kDa, 14,2 kDa i 12,5 kDa, dok su uzorci semena kupine i maline imali identične dominantne proteinske trake na 39,8 kDa, 26,5 kDa i 17,4 kDa, kao i specifičan polipeptid na 55,1 kDa za uzorke maline i na 46,1 kDa za uzorke kupine (Tabela 16, Slike 16 i 17). Dobijeni SDS-PAGE elektroforetski obrasce su u skladu sa literaturnim podacima za ahenije jagode

i za uzorke malina.^{129,200} Seme ogrozda je pokazalo sličan proteinski profil kao i uzorci semena crne ribizle, sa intenzivnim polipeptidnim trakama na 13,4 kDa i 10,7 kDa, ali i karakterističnu zonu na 108,8 kDa koja nije bila prisutna u uzorcima crne ribizle. Sličan polipeptidni profil za uzorke ogrozda i crne ribizle je očekivan, s obzirom da oba pripadaju rodu *Ribes*, ali specifična traka na 108,8 kDa u uzorcima ogrozda se može koristiti za njihovu diferencijaciju. Ova traka (108,8 kDa) je takođe prisutna u uzorcima peruanske jagode, godžija, borovnice i jagode. Trake koje potiču od polipeptida sa molekulskim masama ispod 14,4 kDa nisu bile prisutne samo u uzorcima semena jagoda.

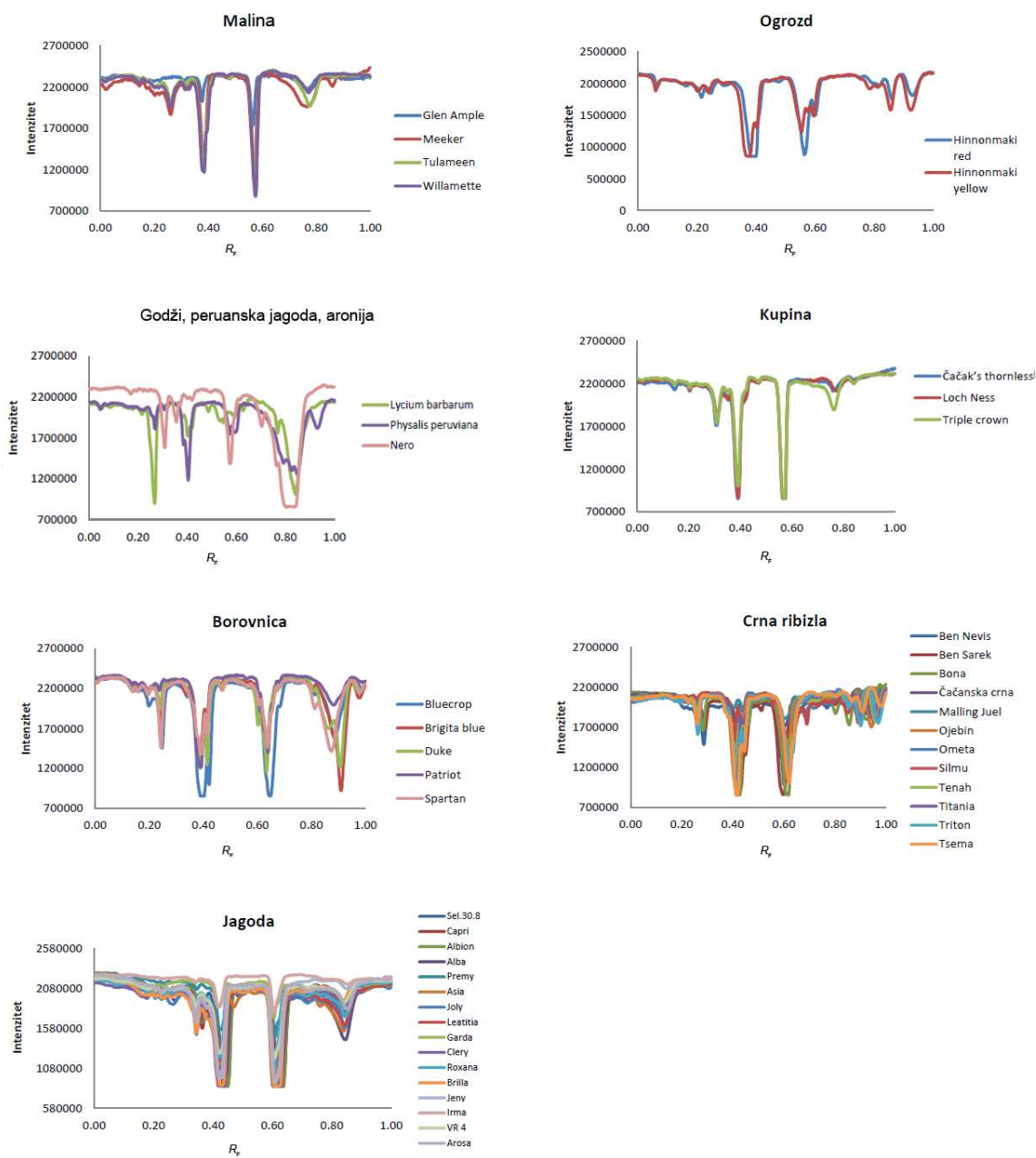


Slika 16. Elektroforetski profil semena gajenog voća dobijen SDS-PAGE elektroforezom u redukujućim uslovima. Crvenim brojevima su označene odgovarajuće trake specifičnih proteina (polipeptida) koje su karakteristične za seme svake analizirane vrste gajenog jagodastog voća. Molekulske mase i polipeptidni sastav detektovanih traka, koji su određeni upotrebom Sigma gel softvera, prikazani su **Tabeli 16**.

Prikazani rezultati ukazuju da seme svake od vrsta gajenih jagodastih voćaka ima jedinstven proteinski profil, koji se može koristiti za diferencijaciju uzoraka na osnovu biljnog porekla, kao i za otkrivanje falsifikata u proizvodima na bazi jagodastog voća.²⁰¹ Ranije studije su pokazale da različite jezgraste voćne vrste imaju specifične proteinske profile koji se mogu potencijalno koristiti kao markeri autentičnosti²⁰², dok se razlike u pokretljivosti specifičnih proteinskih traka mogu uspešno koristiti za otkrivanje falsifikata goveđeg, kozjeg i ovčijeg mleka.⁵⁷

Radi lakšeg uočavanja razlika u sastavu rastvorljivih proteina u različitim vrstama gajenog jagodastog voća, kao i između svake sorte pojedinačno, svi identifikovani polipeptidi semena su

klasifikovani prema molekulskim masama u četiri opsega proteina: > 45 kDa, $30 - 45$ kDa, $20,1 - 30$ kDa i $< 20,1$ kDa (**Tabela 16**). Značajne razlike se mogu uočiti kod svih proučavanih jagodastih vrsta i sorti. Proteinske frakcije sa MM većim od 45 kDa činile su manje od 10% rastvorljivih proteina semena jagode, dok je više od 40% bilo prisutno u semenkama godžija. Niže proteinske frakcije ($< 20,1$ kDa) bile su najzastupljenije u semenu aronije (62,94%) i crne ribizle (35,45% – 56,81%), dok su najmanji sadržaj imali uzorci semena kupine (5,05% – 16,21%). Proteinske frakcije sa MM od $20,1 - 30$ kDa su činile 33,76 – 53,36% od ukupnih rastvorljivih proteina semena maline, dok su frakcije sa MM između 30 i 45 kDa predstavljale 26,86 – 74,11% od ukupnih proteina semena jagode. Ova dva opsega MM bila su najmanje prisutna kod ekstrakta semena godžija (4,03% za $30 - 20,1$ kDa i 9,54% za $45 - 30$ kDa). Iako svaka vrsta ima jedinstven sastav proteina, različite sorte u okviru iste vrste mogu se razlikovati po udelu polipeptida u specifičnim opsezima molekulskih masa.²⁰¹



Slika 17. Profil proteina semena gajenog voća predstavljen kao zavisnost intenziteta sive boje od R_F vrednosti, dobijen nakon obrade slika elektroforegrama u ImageJ softveru.

Tabela 16. Polipeptidni sastav (%) rastvorljivih proteina u semenu gajenog jagodastog voća dobijenog uz upotrebu Sigma Gel softvera: Malina (1-4); ogrozd (5-6); kupina (7-9); aronija (10); godži (11); peruanska jagoda (12); borovnica (13-17); ribizla (18-29) i jagoda (30-45).

*Boldirane vrednosti u Tabeli označavaju procenat (%) dominantnih polipeptidnih zona u semenu analiziranog voća.

Broj trake	MM (kDa)	1	2	3	4	MM (kDa)	5	6	MM (kDa)	7	8	9
1	119,5	0,64±0,02 ^a	0,96±0,02 ^a	0,95±0,03 ^a	0,47±0,03 ^{ab}	108,8	3,5±0,1 ^a	2,919±0,009 ^{ac}	83,6	0,90±0,03 ^a	0,18±0,01 ^a	2,64±0,08 ^a
2	83,6	0,62±0,02 ^a	0,98±0,04 ^a	0,46±0,02 ^a	1,34±0,05 ^a	78,1	0,82±0,04 ^{bg}	0,109±0,008 ^b	65,7	1,49±0,03 ^a	0,57±0,01 ^{ae}	0,60±0,01 ^b
3	65,7	0,335±0,003 ^a	1,337±0,003 ^a	0,97±0,04 ^a	0,54±0,03 ^{ab}	64,1	4,5±0,2 ^c	2,4±0,1 ^a	46,1	11,7±0,4^b	10,8±0,5^b	13,9±0,6^c
4	55,1	6,75±0,04^b	4,71±0,04^b	8,49±0,04^b	1,009±0,007^{ab}	58,2	4,14±0,07 ^{ac}	3,477±0,009 ^c	42,3	0,71±0,03 ^a	0,85±0,01 ^{ad}	0,56±0,03 ^b
5	45,1	0,746±0,03 ^a	1,052±0,006 ^a	0,278±0,003 ^a	1,21±0,01 ^a	48,4	0,79±0,08 ^{bg}	0,663±0,001 ^b	39,8	26,4±0,5^c	30,7±0,7^c	33,1±1,0^d
6	43,5	0,540±0,02 ^a	0,044±0,003 ^c	0,222±0,003 ^a	0,135±0,009 ^b	39,4	27,9±0,5^d	27,2±0,4^d	36,2	0,624±0,005 ^a	1,53±0,01 ^d	0,36±0,01 ^b
7	39,8	19,7±0,3^c	23,2±0,5^d	29,2±1,0^c	19,4±0,3^c	37,2	0,35±0,01 ^b	3,3±0,2 ^c	32,2	1,36±0,04 ^a	1,04±0,03 ^{de}	0,6±0,02 ^b
8	38,5	2,70±0,02 ^d	2,301±0,003 ^e	n.d.	n.d.	26,5	13,44±0,01 ^e	4,9±0,1 ^e	26,5	40,5±0,9^d	44,9±0,2^f	43,2±0,7^e
9	26,5	52,3±0,6^e	41,0±0,6^f	33,8±0,4^d	53,4±0,9^d	25,7	n.d.	0,64±0,02 ^b	17,4	15,0±0,8^e	8,79±0,06^g	4,16±0,08^a
10	17,4	16,3±0,4^f	23,4±0,2^d	24,6±0,7^e	23,2±0,4^e	24,3	8,9±0,3 ^f	6,1±0,2 ^f	14,2	1,25±0,03 ^a	0,699±0,001 ^{ae}	0,89±0,04 ^b
11	14,2	n.d.	n.d.	2,34±0,03 ^f	n.d.	16,4	1,26±0,02 ^{gh}	2,47±0,06 ^a				
12						15,1	1,56±0,06 ^h	0,292±0,004 ^b				
13						13,4	10,410±0,002ⁱ	14,7±0,6^g				
14						10,7	23,0±0,5^j	30,9±0,2^h				
Sadržaj proteinskih frakcija (%)												
>45,0 kDa		9,09	9,05	11,50	4,57		13,74	9,55		14,12	11,58	17,10
45,0-30,0 kDa		22,95	25,59	29,45	19,56		28,24	30,49		29,14	34,08	34,64
30,0-20,1 kDa		52,30	41,99	33,76	53,36		21,83	11,66		40,53	44,86	43,21
<20,1 kDa		16,32	23,37	26,93	23,18		36,18	48,30		16,21	9,48	5,05

Tabela 16. Nastavak.

Broj trake	MM (kDa)	10	MM (kDa)	11	MM (kDa)	12	MM (kDa)	13	14	15	16	17
1	75,5	0,528±0,003 ^a	108,8	1,518±0,004 ^{afg}	108,8	3,97±0,03 ^a	108,8	0,930±0,003 ^{ah}	0,75±0,02 ^{ag}	0,68±0,02 ^{af}	2,11±0,07 ^{ai}	1,82±0,02 ^{ag}
2	46,1	18,0±0,8 ^b	78,1	0,105±0,008 ^b	78,1	0,21±0,01 ^b	73,3	1,43±0,04 ^{bi}	1,16±0,04 ^{ab}	1,42±0,02 ^{af}	1,38±0,03 ^{ag}	1,96±0,06 ^{ag}
3	41,8	5,0±0,3 ^c	75,5	0,42±0,02 ^{bd}	71,5	0,36±0,02 ^{bi}	68,8	0,55±0,03 ^a	0,70±0,02 ^{ag}	0,70±0,01 ^{af}	1,820±0,005 ^{ah}	2,88±0,03 ^{af}
4	39,8	0,549±0,001 ^a	62,7	1,65±0,04 ^{af}	65,2	0,67±0,01 ^{bc}	61,2	3,86±0,1 ^c	1,68±0,02 ^b	1,91±0,04 ^{ae}	8,01±0,02 ^b	2,5±0,1 ^{afh}
5	37,9	0,232±0,004 ^a	53,4	36,8±0,7 ^c	61,2	0,31±0,03 ^b	53,4	18,9±0,5 ^d	10,7±0,4 ^c	6,447±0,009 ^b	4,1±0,2 ^c	18,4±0,9 ^b
6	36,2	0,65±0,02 ^a	44,4	1,073±0,002 ^{adg}	56,0	1,08±0,01 ^{cj}	41,8	0,858±0,008 ^a	2,84±0,06 ^d	0,512±0,005 ^{af}	0,041±0,004 ^d	0,19±0,02 ^c
7	27,1	0,106±0,008 ^a	39,4	1,57±0,06 ^{afg}	52,5	7,3±0,3 ^d	38,5	23,0±0,2 ^e	22,1±0,5 ^e	17,1±0,7 ^c	52,4±1,4 ^e	17,1±0,8 ^d
8	26,5	11,8±0,1 ^d	37,2	2,49±0,05 ^e	45,1	1,9±0,1 ^e	36,2	5,3±0,1 ^f	6,0±0,2 ^f	8,3±0,2 ^d	6,8±0,2 ^f	4,96±0,06 ^e
9	25,2	0,042±0,003 ^a	36,2	2,04±0,02 ^{ef}	41,8	0,41±0,03 ^{bi}	32,2	0,930±0,003 ^{ah}	1,12±0,02 ^{ab}	0,559±0,001 ^{af}	0,56±0,02 ^{dgk}	3,530±0,03 ^{ef}
10	24,3	0,190±0,007 ^a	30,7	2,4±0,1 ^e	38,5	3,35±0,01 ^f	27,1	0,716±0,005 ^a	0,606±0,005 ^{ag}	0,68±0,02 ^{af}	1,30±0,02 ^{ag}	0,78±0,01 ^{cg}
11	20,0	5,08±0,07 ^c	28,0	0,94±0,01 ^{dghil}	37,2	23,8±0,6 ^g	25,2	1,88±0,05 ^b	0,933±0,005 ^a	3,5±0,1 ^{ei}	0,97±0,02 ^{dgh}	1,77±0,07 ^{agj}
12	17,4	3,7±0,2 ^e	27,1	0,55±0,04 ^{bd}	25,7	5,519±0,009 ^h	24,3	0,906±0,005 ^a	0,14±0,01 ^g	0,280±0,001 ^{af}	2,2±0,1 ^{aj}	0,049±0,004 ^c
13	15,7	54,1±0,3 ^f	25,2	0,36±0,03 ^{bh}	24,3	0,980±0,005 ^{cj}	23,7	21,6±0,4 ^g	10,13±0,08 ^c	9,6±0,3 ^d	8,8±0,4 ^b	3,8±0,1 ^{ef}
14			24,3	0,811±0,006 ^{dhi}	23,7	0,82±0,06 ^{cij}	22,7	0,906±0,005 ^a	0,023±0,002 ^g	0,14±0,01 ^f	0,37±0,04 ^{dg}	0,15±0,01 ^c
15			22,7	1,36±0,04 ^{ai}	16,4	1,11±0,04 ^c	21,7	1,408±0,008 ^{bh}	1,10±0,03 ^a	1,445±0,001 ^{af}	2,306±0,007 ^{aj}	0,99±0,02 ^{cg}
16			16,4	3,6±0,1 ^j	15,7	1,44±0,07 ^{ej}	16,4	1,67±0,05 ^b	3,22±0,08 ^d	1,38±0,04 ^{af}	0,810±0,007 ^{dgh}	3,80±0,02 ^{ef}
17			14,2	40,8±0,6 ^k	14,2	1,03±0,04 ^{cj}	14,2	0,98±0,05 ^{ahi}	0,956±0,004 ^a	12,6±0,6 ^g	1,14±0,04 ^{ghi}	30,8±2,0 ⁱ
18			12,5	1,52±0,05 ^{afi}	13,4	18,31±0,03 ^k	12,5	11,2±0,2 ^j	28,4±0,8 ^h	27,7±2,1 ^h	3,3±0,2 ^{cj}	0,290±0,001 ^{cj}
19					10,7	27,49±0,04 ^l	10,1	2,93±0,05 ^k	7,7±0,2 ⁱ	5,1±0,2 ^{bi}	1,46±0,04 ^{ahk}	3,8±0,1 ^{ef}
Sadržaj proteinskih frakcija (%)												
>45,0		18,47		40,44		15,71		25,70	14,99	11,19	17,46	28,09
45,0-30,0		6,47		9,54		27,56		30,10	32,05	26,47	59,86	25,76
30,0-20,1 kDa		12,13		4,03		7,32		27,38	12,93	15,58	15,98	7,55
<20,1 kDa		62,94		45,99		49,40		16,82	40,03	46,76	6,70	38,60

Tabela 16. Nastavak.

Broj trake	MM (kDa)	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1	68,8	0,69±0,02 ^{ab}	0,129±0,006 ^a	0,151±0,006 ^a	0,32±0,02 ^a	0,99±0,06 ^{ac}	0,165±0,009 ^a	0,36±0,02 ^{ac}	0,140±0,008 ^a	0,068±0,003 ^a	0,213±0,02 ^a	0,139±0,006 ^a	0,29±0,03 ^{ag}
2	64,1	0,28±0,04 ^{ad}	0,21±0,03 ^a	0,091±0,004 ^a	0,21±0,02 ^a	0,75±0,05 ^a	0,56±0,04 ^{ab}	0,57±0,01 ^a	0,140±0,008 ^a	0,71±0,04 ^b	0,092±0,006 ^a	0,33±0,01 ^b	0,083±0,004 ^a
3	58,2	1,2±0,1 ^{bi}	1,33±0,03 ^b	0,12±0,02 ^a	0,42±0,08 ^a	0,62±0,04 ^a	0,92±0,05 ^{bd}	2,3±0,1 ^b	0,21±0,02 ^a	0,81±0,04 ^b	1,070±0,01 ^{ae}	0,583±0,004 ^c	0,87±0,04 ^{bi}
4	52,5	18,35±0,07^c	13,2±0,2^c	11,9±0,3^b	1,59±0,01^b	9,9±0,3^b	10,4±0,1^c	2,5±0,1^b	0,31±0,02^a	6,84±0,08^c	14,19±0,4^b	13,5±0,1^d	15,0±0,1^c
5	39,8	0,046±0,002 ^d	n.d.	7,2±0,1 ^c	0,107±0,008 ^a	2,0±0,1 ^c	1,25±0,03 ^d	0,081±0,004 ^c	0,105±0,006 ^a	n.d.	n.d.	1,11±0,04 ^e	2,2±0,1 ^d
6	37,2	22,0±0,5^e	27,9±0,3^d	9,6±0,2^d	19,32±0,05^c	14,16±0,01^d	35,14±0,5^e	27,6±0,2^d	16,0±0,4^b	27,21±0,08^d	33,5±2,0^c	24,92±0,05^f	29,2±0,5^e
7	34,7	9,6±0,1^f	5,4±0,3^e	2,990±0,08^e	13,0±0,2^d	19,2±0,6^e	4,60±0,02^f	4,34±0,08^e	9,6±0,4^c	4,9±0,2^e	2,88±0,08^d	8,6±0,1^g	7,4±0,2^f
8	30,7	n.d.	1,9±0,1 ^f	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,46±0,01 ^f	3,49±0,05 ^d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
9	28,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,37±0,02 ^{ac}	3,8±0,1 ^d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10	25,7	2,44±0,05 ^g	0,34±0,03 ^a	1,69±0,02 ^f	6,8±0,2 ^e	10,19±0,001 ^b	1,25±0,03 ^d	1,30±0,06 ^{fh}	0,105±0,006 ^a	0,169±0,007 ^a	0,85±0,03 ^{ae}	0,25±0,01 ^{ab}	0,578±0,06 ^{bg}
11	25,2	2,90±0,08 ^{gj}	1,59±0,06 ^b	9,74±0,02 ^d	1,486±0,004 ^b	1,987±0,003 ^c	10,03±0,005 ^c	3,78±0,03 ^g	1,32±0,07 ^e	5,86±0,04 ^f	1,95±0,02 ^{de}	1,97±0,03 ^h	4,60±0,04 ^h
12	24,3	1,89±0,02 ^h	0,43±0,07 ^a	n.d.	5,9±0,2 ^f	3,2±0,2 ^f	n.d.	1,056±0,008 ^h	2,48±0,03 ^f	1,89±0,09 ^g	0,886±0,001 ^{ae}	2,28±0,04 ⁱ	1,24±0,03 ⁱ
13	21,7	0,97±0,06 ^b	0,26±0,01 ^a	n.d.	n.d.	1,5±0,03 ^{ac}	n.d.	3,61±0,04 ^g	5,51±0,08 ^g	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
14	19,5	n.d.	0,086±0,004 ^a	0,66±0,03 ^g	0,43±0,03 ^b	0,62±0,04 ^a	0,26±0,02 ^a	0,37±0,02 ^{ac}	0,35±0,02 ^a	0,24±0,01 ^a	0,28±0,02 ^a	0,30±0,02 ^b	0,29±0,01 ^{ag}
15	17,4	1,66±0,08 ^{hi}	0,17±0,04 ^a	n.d.	n.d.	3,60±0,03 ^f	0,46±0,04 ^{ab}	1,10±0,03 ^h	0,35±0,02 ^a	0,74±0,04 ^b	0,31±0,02 ^a	0,86±0,05 ^j	2,32±0,02 ^d
16	15,1	0,69±0,02 ^{ab}	3,82±0,05 ^g	9,7±0,2 ^d	1,380±0,004 ^b	1,24±0,05 ^{ac}	0,82±0,01 ^{bd}	3,492±0,001 ^g	5,6±0,1 ^g	2,81±0,09 ^h	5,0±0,1 ^f	3,7±0,1 ^k	1,24±0,07 ⁱ
17	13,4	3,1±0,2^j	9,4±0,1^h	18,4±0,1^h	15,2±0,4^g	1,86±0,01^c	4,7±0,1^f	11,98±0,01ⁱ	14,9±0,1^h	17,13±0,09^j	16,1±0,4^g	13,45±0,02^d	15,5±0,2^j
18	10,7	34,2±0,4^k	33,8±0,3ⁱ	27,8±0,4ⁱ	33,8±0,6^h	28,1±1,0^g	29,4±0,6^g	33,8±0,3^j	35,6±0,5ⁱ	30,7±0,3^j	22,7±0,6^h	27,98±0,02^l	19,21±0,05^k
Sadržaj proteinskih frakcija (%)													
>45,0 kDa		20,46	14,86	12,29	2,55	12,29	12,04	5,72	0,80	8,43	15,57	14,53	16,27
45,0-30,0 kDa		31,73	35,16	19,74	32,47	35,38	40,99	33,50	29,17	32,07	36,36	34,65	38,72
30,0-20,1 kDa		8,20	2,61	11,43	14,22	16,89	11,28	10,11	13,22	7,92	3,69	4,50	6,41
<20,1 kDa		39,60	47,36	56,54	50,76	35,45	35,69	50,68	56,81	51,58	44,37	46,31	38,60

Tabela 16. Nastavak.

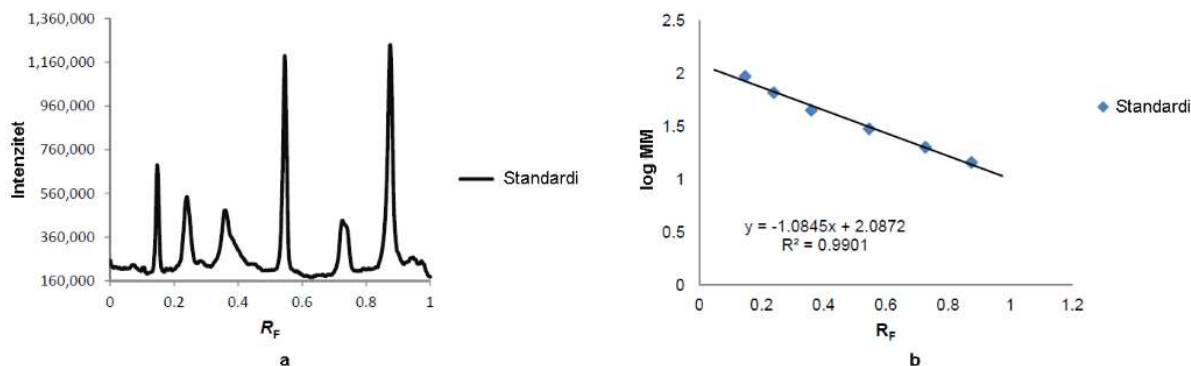
Broj trake	MM (kDa)	30	31	32	33	34	35	36	37
1	108,8	0,306±0,009 ^{ab}	n.d.	0,20±0,02 ^a	0,14±0,02 ^{af}	0,26±0,02 ^a	0,104±0,007 ^a	0,37±0,02 ^{ac}	0,26±0,02 ^{af}
2	78,1	0,084±0,005 ^a	n.d.	0,40±0,01 ^a	0,41±0,03 ^{af}	0,64±0,04 ^{af}	0,052±0,004 ^a	0,43±0,04 ^{ac}	0,26±0,02 ^{af}
3	65,7	0,799±0,009 ^{be}	1,07±0,04 ^a	0,474±0,004 ^a	0,69±0,01 ^{ad}	0,87±0,01 ^{af}	0,52±0,01 ^{ab}	0,37±0,04 ^{ac}	0,59±0,02 ^{af}
4	65,2	0,39±0,06 ^c	1,6±0,1 ^b	0,24±0,02 ^a	0,62±0,02 ^{adf}	0,34±0,02 ^a	0,078±0,005 ^a	0,56±0,03 ^{ae}	0,443±0,001 ^{af}
5	58,2	0,39±0,03 ^{ab}	n.d.	2,81±0,01 ^b	1,84±0,05 ^b	0,42±0,02 ^{af}	1,17±0,05 ^{be}	0,62±0,03 ^{ae}	3,8±0,1 ^b
6	44,4	13,1±0,3^d	2,83±0,03^c	9,7±0,3^c	8,0±0,1^c	6,6±0,3^b	9,31±0,01^c	0,24±0,06^b	5,0±0,1^b
7	41,8	1,17±0,04 ^{ce}	1,07±0,04 ^a	1,7±0,07 ^d	1,18±0,03 ^d	0,26±0,02 ^a	0,96±0,01 ^{abe}	0,25±0,01 ^c	1,10±0,02 ^{af}
8	37,9	47,1±0,3^f	61,1±0,2^d	62,3±0,6^e	54,0±0,6^e	46,4±0,7^c	51,0±1,0^d	33,1±0,3^d	46,5±2,0^c
9	34,7	0,39±0,03 ^{ab}	n.d.	0,28±0,02 ^a	0,59±0,02 ^a	0,152±0,009 ^a	0,18±0,01 ^{ab}	0,74±0,03 ^{eg}	0,19±0,02 ^a
10	32,2	0,78±0,02 ^{be}	n.d.	0,20±0,02 ^a	0,104±0,009 ^f	0,19±0,01 ^a	1,64±0,04 ^e	n.d.	0,480±0,004 ^{af}
11	26,5	13,6±0,4^d	27,5±0,4^e	10,9±0,3^f	10,2±0,3^g	19,6±0,6^d	13,6±0,7^f	14,5±0,2^f	9,3±0,4^d
12	25,2	2,98±0,02 ^g	0,68±0,04 ^{af}	5,4±0,2 ^g	12,4±0,2 ^h	0,38±0,02 ^a	4,68±0,07 ^g	0,99±0,02 ^{bg}	6,9±0,2 ^e
13	20,5	1,84±0,03 ^c	0,29±0,02 ^f	0,28±0,02 ^a	0,56±0,01 ^{af}	2,5±0,1 ^e	0,99±0,01 ^{abe}	0,186±0,009 ^c	1,365±0,007 ^{af}
14	18,8	0,306±0,009 ^{ab}	0,68±0,06 ^{af}	n.d.	0,346±0,005 ^{af}	1,25±0,04 ^f	0,013±0,005 ^{ab}	0,93±0,02 ^g	1,73±0,04 ^f
15	15,7	15,81±0,08^h	3,22±0,01^c	5,2±0,1^g	8,90±0,08ⁱ	20,2±0,5^d	15,4±0,5^h	45,70±0,01^h	22,1±1,0^g
Sadržaj proteinskih frakacija (%)									
<45,0 kDa		2,95	2,63	4,12	3,71	2,54	1,92	2,35	5,31
45,0-30,0 kDa		62,54	65,03	74,11	63,94	53,63	63,12	35,32	53,24
30,0-20,1 kDa		18,39	28,44	16,58	23,11	22,43	19,22	15,70	17,60
>20,1 kDa		16,12	3,90	5,19	9,25	21,40	15,73	46,63	23,85

Tabela 16. Nastavak.

Broj trake	MM (kDa)	38	39	40	41	42	43	44	45
1	108,8	1,02±0,04 ^{ac}	0,30±0,01 ^a	0,398±0,006 ^a	0,400±0,002 ^{ab}	0,54±0,03 ^{ad}	3,70±0,05 ^a	8,2±0,2 ^a	0,64±0,01 ^{ai}
2	78,1	0,43±0,03 ^a	0,24±0,01 ^a	0,057±0,003 ^a	0,461±0,007 ^{ab}	0,23±0,01 ^a	0,20±0,02 ^b	0,106±0,005 ^b	1,6±0,1 ^b
3	65,7	0,27±0,02 ^a	0,36±0,04 ^a	0,114±0,007 ^a	0,18±0,02 ^a	0,143±0,007 ^a	2,36±0,03 ^c	0,159±0,007 ^b	0,41±0,02 ^{af}
4	65,2	2,36±0,02 ^{bh}	0,53±0,03 ^{ae}	1,16±0,05 ^b	1,66±0,01 ^b	0,57±0,03 ^{ad}	0,2±0,1 ^b	0,159±0,007 ^b	1,784±0,003 ^b
5	58,2	1,61±0,06 ^{bc}	0,179±0,009 ^a	1,65±0,05 ^c	0,15±0,01 ^a	0,77±0,02 ^{ad}	2,07±0,03 ^{ch}	1,11±0,06 ^{ch}	0,50±0,02 ^{afi}
6	44,4	6,07±0,06^d	1,8±0,2^{be}	8,7±0,2^d	12,9±0,5^c	10,39±0,02^b	5,93±0,08^d	7,1±0,1^d	5,7±0,3^c
7	41,8	0,48±0,03 ^a	0,42±0,02 ^a	0,17±0,01 ^a	1,14±0,03 ^{ab}	0,086±0,004 ^a	0,569±0,002 ^b	0,64±0,03 ^{bch}	0,59±0,02 ^{afi}
8	37,9	12,1±0,2^e	51,3±0,8^c	35,3±0,4^e	48,8±2,0^d	31,7±0,9^c	55,0±0,3^e	47,3±0,9^e	45,8±0,3^d
9	34,7	7,9±0,3 ^f	0,36±0,02 ^a	0,31±0,04 ^a	0,18±0,02 ^a	1,4±0,1 ^{df}	0,651±0,008 ^b	0,48±0,02 ^{bc}	4,34±0,01 ^e
10	32,2	0,3±0,02 ^a	n.d.	0,23±0,01 ^a	1,475±0,003 ^{ab}	0,171±0,008 ^a	n.d.	0,42±0,02 ^{bc}	0,183±0,009 ^f
11	26,5	20,9±0,5^g	16,9±0,3^d	13,8±0,3^f	15,1±0,7^e	17,2±0,3^e	11,1±0,1^f	15,0±0,3^f	3,3±0,1^g
12	25,2	2,42±0,07 ^{bh}	2,08±0,08 ^b	2,504±0,001 ^g	7,0±0,2 ^f	1,593±0,008 ^{df}	9,4±0,6 ^g	2,643±0,007 ^g	11,3±0,1 ^h
13	20,5	0,860±0,001 ^{ac}	1,19±0,06 ^e	0,85±0,04 ^b	0,15±0,01 ^a	2,36±0,03 ^f	1,625±0,001 ^h	1,37±0,05 ^h	0,915±0,001 ^{ij}
14	18,8	3,12±0,08 ^h	0,36±0,02 ^a	0,28±0,01 ^a	0,22±0,02 ^a	1,31±0,08 ^d	0,24±0,02 ^b	0,26±0,01 ^b	1,098±0,009 ^j
15	15,7	40,2±1,1ⁱ	24,0±0,3^f	34,48±0,04^h	10,08±0,08^g	31,5±1,0^c	7,03±0,04ⁱ	15,1±0,2^f	21,8±0,3^k
Sadržaj proteinskih frakcija (%)									
>45,0 kDa		5,70	1,60	3,38	2,86	2,25	8,53	9,72	4,94
45,0-30,0 kDa		26,86	53,92	44,74	64,54	43,74	62,11	55,94	56,63
30,0-20,1 kDa		24,17	20,15	17,11	22,30	21,18	22,09	19,02	15,55
<20,1 kDa		43,27	24,32	34,77	10,30	32,83	7,27	15,32	22,88

„n.d.“-nije detektovan; Ista slova u istoj koloni označavaju da nema statistički značajnih razlika između uzoraka prema Tukey's testu, $p<0.05$.

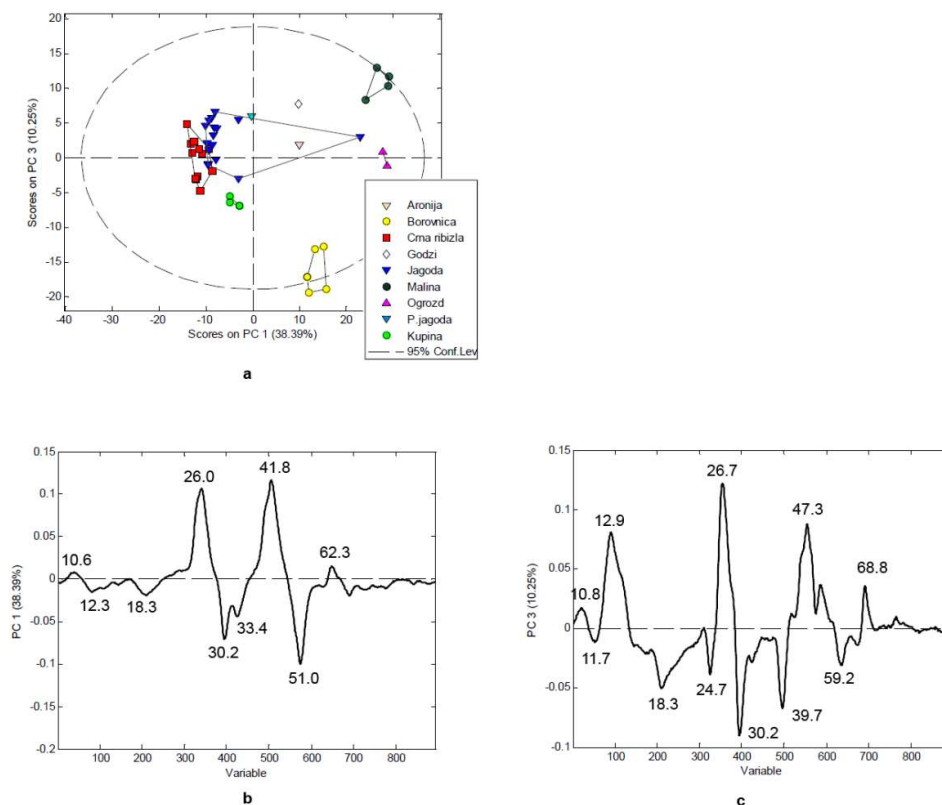
Slike elektroforegrama su pomoću ImageJ programa obrađene i prevedene u matricu podataka, koja predstavlja zavisnost intenziteta sive boje od pokretljivosti proteina (R_F vrednosti), prema prethodno opisanom postupku u Opštem i Eksperimentalnom delu disertacije. Da bi se odgovarajuće R_F vrednosti korelirale sa molekulskom masom proteina (MM), nacrtan je grafik linearne zavisnosti logaritmske vrednosti molekulske mase standarda proteina (koja je tačno definisana) od njihove pokretljivosti, R_F (Slika 18). Molekulska masa nepoznatih proteina je izračunata interpolacijom krive $\log MM = f(R_F)$.



Slika 18. Grafici zavisnosti: a) intenziteta sive boje od od pokretljivosti proteina (R_F vrednosti), b) logaritmske vrednosti molekulske mase standarda proteina od njihove pokretljivosti (R_F).

Analiza glavnih komponenta je dalje korišćena u cilju uočavanja mogućih trendova u elektroforetskim profilima rastvorljivih proteina iz semena gajenih jagodastih voćaka i definisanja proteinskih traka koje bi se mogle koristiti kao potencijalni markeri autentičnosti. Dobijeni PCA model se sastojao iz pet glavnih komponenta i objasnio 79,08% od ukupnog varijabiliteta među podacima, pri čemu je PC1 objasnila 38,39%, PC2 15,59%, dok je PC3 obuhvatila 10,25% varijabiliteta među podacima (Slika 19). Analizirani uzorci su grupisani u klastere na osnovu njihovog biljnog porekla. Uzorci ogrozda, peruanske jagode, aronije i godžija su na grafiku skorova bili udaljeni od uzoraka kupine, jagode, ribizle, maline i borovnice. Navedeni uzorci su pokazali jedinstvene proteinske profile, iako potpuna karakterizacija ovih biljnih vrsta zbog malog broja uzoraka nije bila moguća. Uzorci jagode, crne ribizle i kupine su razdvojeni duž PC1 ose od uzoraka maline, ogrozda i borovnice, pri čemu su uzorci svake vrsta posebno formirali kompaktne klastere unutar vrste. Na grafiku doprinosa pojedinačnih varijabli (Slika 19b/c) uočava se da su trake na R_F vrednostima 0,27; 0,43 i 0,62 (koje odgovaraju molekulskim masama 62,3 kDa, 41,8 kDa i 26,0 kDa, redom) imale najveći pozitivan uticaj na razdvajanje duž PC1 ose, dok su varijable sa R_F vrednostima 0,35; 0,52; 0,56; 0,76 i 0,92 (koje odgovaraju molekulskim masama 51,0 kDa, 33,4 kDa, 30,2 kDa, 18,3 kDa i 12,3 kDa, redom) imale najveći negativan uticaj. Najveći pozitivan uticaj na razdvajanje duž PC3 ose imale su varijable sa R_F vrednostima 0,23; 0,38; 0,61; 0,90; 0,97 (koje odgovaraju proteinima sa MM 68,8; 47,3; 26,7; 12,9 i 10,8 kDa, redom), dok su najveći negativan uticaj pokazale trake sa R_F vrednostima 0,29; 0,45; 0,56; 0,64; 0,76 i 0,94 (koje odgovaraju proteinima sa MM 59,2; 39,7; 30,2; 24,7; 18,3 i 11,7 kDa).

Na osnovu dobijenog obrasca u elektroforetskim polipeptidnim profilima ispitivanog semena gajenog voća, identifikovano je nekoliko markera biljnog porekla. Polipeptidi sa molekulskim masama 26,7 kDa i 41,8 kDa su specifični za uzorke maline, 10,6 kDa, 26,0 kDa, 41,8 kDa i 62,3 kDa za uzorke ogrozda, 11,7 kDa, 18,3 kDa, 24,7 kDa, 39,7 kDa i 59,2 kDa za uzorke borovnice i kupine i 30,2; 33,4; 51,0 kDa za uzorke crne ribizle.



Slika 19. Analiza glavnih komponenata: a) grafik skorova latentnih varijabli dobijen za proteinski profil semena gajenog voća, b/c) grafici vektora latentnih varijabli.

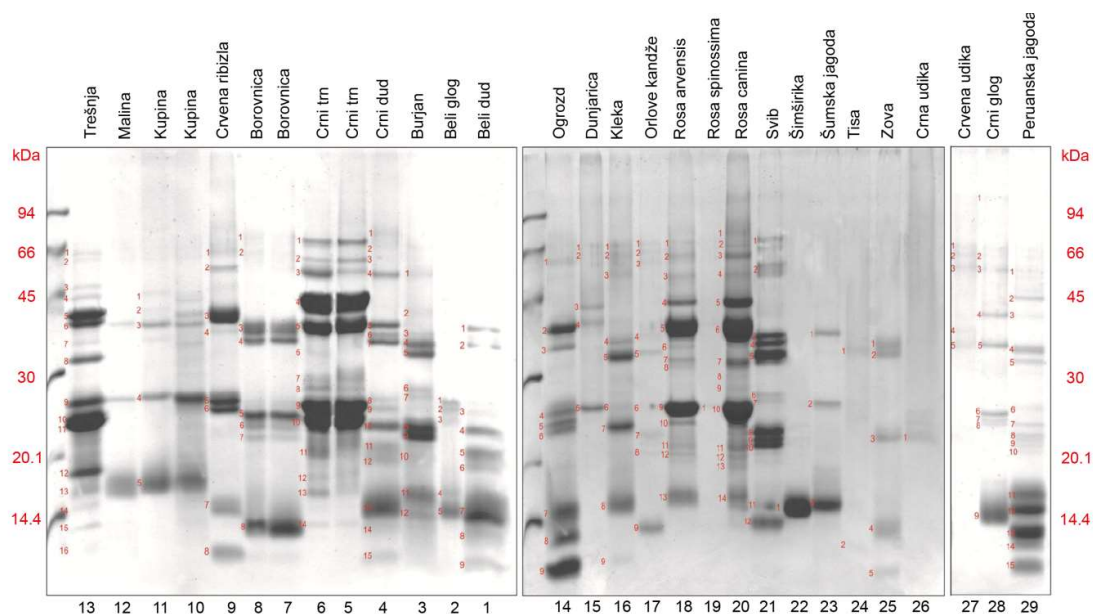
Samoniklo voće

Elektroforetski profili rastvorljivih proteina semena divljeg voća ukazuju na prisutvo velikog broja polipeptida, od kojih su tri polipeptida od 36 – 40 kDa, 23 – 27 kDa i 13,6 – 17,7 bila najzastupljenija (**Tabela 17, Slika 20**). Uzorci belog dudu (1), belog gloga (2), orlovi kandži (17) i zove (25) su pokazali slične proteinske profile sa dominantnom trakom na 14,5 kDa, zatim trakama na 23,1 kDa i 35 kDa. Literaturni podaci dobijeni za proteinski profil lista belog dudu, takođe ukazuju na prisustvo intenzivne trake na 14,5 kDa, ali su pored nje uzorci lista za razliku od ispitivanih uzoraka semena imali zastupljene i trake na 55 kDa i 102 kDa.²⁰³ Uzorci belog gloga (2), burjana (3), crnog trna (5 i 6), divlje trešnje (13), dunjarice (15), ruže (18 i 21), šumske jagode (23) i crnog gloga (28) sadržali su karakterističnu proteinsku traku molekulske mase 16,7 kDa, što se može smatrati karakteristikom porodice Rosaceae kojoj pripadaju svi navedeni uzorci osim burjana (3). Ranija istraživanja rađena na uzorcima semena biljnih vrsta iz porodice Rosaceae pokazala su da su proteini semena izuzetno stabilni i da njihov sastav ne zavisi od spoljašnjih faktora, zbog čega se proteinski profil semena može koristiti kao marker u taksonomiji biljaka.¹²⁴ Polipeptidne trake na 17,7 kDa i 27,1 kDa bile su najzastupljenije u uzorcima roda *Rubus* - divlje kupine (10 i 11) i maline (12), ali za razliku od uzorka maline uzorci kupina su sadržali i proteinske trake na 39,5; 41,7 i 44,6 kDa. Navedeni proteini takođe su identifikovani u uzorcima divlje trešnje (13), *Rosa arvensis* (18) i *Rosa canina* (20). Uzorci belog i crnog dudu pokazali su iste najintenzivnije polipeptidne trake na 23 i 15 kDa, ali je uzorak crnog dudu za razliku od uzorka belog dudu imao veći broj proteinskih traka molekulske mase > 45 kDa. Uzorci crnog trna sa dve lokacije, 5 i 6, imali su vrlo sličan proteinski profil, sa najintenzivnijim polipeptidnim trakama na 38,8 kDa i 43,7 kDa.

Najjednostavniji proteinski profil pokazali su uzorci *Rosa spinosissima* (19) sa jednom karakterističnom trakom na 26,6 kDa, zatim šimširika (22) sa karakterističnim polipeptidom

molekulske mase 15,4 kDa, crna udika (26) sa proteinskom trakom na 23,1 kDa i uzorak tise (24) sa dve polipeptidne trake molekulskih masa 35,7 i 12,8 kDa.

Poređenjem elektroforetskih profila semena gajenog i samoniklog voća istih botaničkih vrsta, uočava se manji broj prisutnih traka slabijeg intenziteta u uzorcima samoniklog voća, posebno u slučaju maline (12), kupine (11 i 10) i jagode (23). U uzorcima gajene borovnice uočljiva je traka na 53,4 kDa, koja nije prisutna u analiziranim divljim srodnicima. Ekstrakti semena crne ribizle pokazali su iste dominantne proteinske trake kao i uzorak divlje crvene ribizle, ali je proteinski profil gajene ribizle znatno bogatiji.



Slika 20. Elektroforetski profil semena gajenog voća dobijen SDS-PAGE elektroforezom u redukujućim uslovima. Crvenim brojevima su označene odgovarajuće trake specifičnih proteina (polipeptida) koje su karakteristične za seme svake analizirane vrste divljeg voća. Molekulske mase i polipeptidni sastav detektovanih traka, koji su određeni upotrebom Sigma gel softvera, prikazani su **Tabeli 17**.

Kao i u slučaju gajenih jagodastih vrsta voćaka, svi identifikovani polipeptidi semena su klasifikovani prema molekulskim masama u četiri opsega proteina: >45 kDa, 30 – 45 kDa, 20,1 – 30 kDa i <20,1 kDa (**Tabela 17**). Proteinske frakcije sa molekulskim masama većim od 45 kDa činile su manje od 10% rastvorljivih proteina semena uzoraka divljeg voća, sem u uzorcima crvene udike (48,12%), sviba (12,94%), i crnog trna (12,36 i 18,32%). Niže proteinske frakcije (<20,1 kDa) bile su najzastupljenije u svim ispitivanim uzorcima, osim u uzorcima crvene i crne udike, *Rosa spinosissima* i dunjarice koji nisu sadržali polipeptidne trake nižih molekulskih masa. Proteinske frakcije sa MM od 20,1 – 30 kDa su činile 100% rastvorljivih proteina semena ruže (19) i crne udike (26), dok su u ostalim uzorcima bile prisutne u opsegu od 6,20% (u uzorku crnog gloga) do 58,09% (u uzorku dunjarice). Frakcije sa MM između 30 i 45 kDa bile su najzastupljenije u uzorku semena tise – 80,45%, zatim u uzorcima voća iz porodice Rosaceae i to iz roda *Prunus* (uzorci crnog trna, 56,47 – 65,89% i trešnje 44,46%) i roda *Rosa* (*Rosa arvensis*, 48,82% i *Rosa canina* – 46,95%), kao i uzorku crvene udike – 51,88%. Ranija istraživanja rađena na uzorcima šest različitih sorti trešnje pokazala su sličan profil sa najvećim brojem proteinskih traka u opsegu molekulskih masa 30 – 56 kDa.²⁰⁴ Dobijeni proteinski profil semena divlje ruže (*Rosa canina*) imao je veći broj polipeptidnih traka u poređenju sa rezultatima do kojih su došli Dovidar i saradnici (Dowidar)¹²⁴ ispitujući proteinski profil semena biljaka iz porodice Rosacea, ali MM najzastupljenijih proteinskih traka bile su u saglasnosti sa navedenim literaturnim podacima.

Tabela 17. Polipeptidni sastav (%) rastvorljivih proteina u semenu divljeg voća.

Broj trake	MM (kDa)	1	MM (kDa)	2	MM (kDa)	3	MM (kDa)	4	MM (kDa)	5	6	MM (kDa)	7	8
1	38,8	5,3±0,3 ^b	26,6	7,9±0,1 ^c	54,3	4,00±0,09 ^a	81,8	0,294±0,002 ^a	75,6	7,26±0,05 ^a	5,69±0,05 ^a	75,6	0,334±0,006 ^a	0,33±0,01 ^a
2	35,0	1,37±0,02 ^{cf}	25,5	1,63±0,01 ^a	41,7	0,90±0,02 ^b	69,9	0,166±0,009 ^a	61,9	2,53±0,06 ^b	0,91±0,01 ^b	65,5	0,211±0,01 ^a	0,4±0,02 ^a
3	24,8	1,18±0,02 ^{acf}	24,1	4,9±0,3 ^d	37,8	0,150±0,009 ^c	65,5	0,294±0,002 ^a	56,2	2,57±0,04 ^b	11,7±0,2 ^c	38,8	12,03±0,03 ^b	15,8±0,1 ^b
4	23,1	16,0±0,9 ^d	16,7	4,3±0,1 ^b	35,7	9,6±0,3 ^d	54,3	6,98±0,03 ^b	43,7	38,2±0,4 ^c	35,1±0,6 ^d	36,2	6,983±0,1 ^c	5,2±0,3 ^c
5	20,5	13,0±0,2 ^e	14,5	81,3±0,6 ^e	34,0	17,33±0,06 ^e	39,5	11,11±0,08 ^c	38,8	27,7±0,3 ^d	21,0±0,7 ^e	24,8	15,13±0,1 ^d	12,7±0,1 ^d
6	19,5	1,76±0,09 ^f			28,4	4,2±0,1 ^a	37,8	0,79±0,01 ^d	34,0	n.d.	0,326±0,005 ^b	23,7	0,879±0,02 ^e	1,04±0,04 ^a
7	14,5	53,0±1,0 ^g			27,1	1,01±0,01 ^b	36,2	7,58±0,02 ^e	29,5	1,87±0,07 ^e	0,37±0,01 ^b	22,2	1,477±0,04 ^f	2,3±0,2 ^e
8	12,8	0,93±0,04 ^{acf}			23,7	19,9±0,1 ^f	27,1	1,12±0,03 ^d	28,4	0,471±0,001 ^f	0,94±0,01 ^b	13,6	62,94±0,1 ^g	62,2±0,8 ^f
9	10,0	7,65±0,09 ^g			22,6	7,08±0,02 ^g	25,9	2,81±0,07 ^f	25,9	8,90±0,08 ^g	7,5±0,2 ^f			
10					20,5	1,80±0,04 ^h	23,7	17,06±0,09 ^g	24,1	6,5±0,2 ^h	6,42±0,03 ^a			
11					16,7	29,3±0,6 ⁱ	21,5	3,0±0,2 ^f	20,5	1,46±0,05 ^{ei}	4,56±0,05 ^g			
12					14,5	4,79±0,03 ^j	19,5	1,53±0,01 ^h	18,4	0,392±0,006 ^f	1,141±0,002 ^b			
13							15,4	44,1±0,3 ⁱ	16,7	1,21±0,02 ^{ij}	3,0±0,1 ^h			
14							13,6	0,037±0,002 ^a	13,6	0,958±0,001 ^j	1,23±0,06 ^b			
15							10,7	3,12±0,07 ^f						
Sadržaj proteinskih frakcija (%)														
>45,0 kDa		0		0		4,00		7,73		12,36	18,32		0,54	0,76
45,0-30,0 kDa		6,66		0		27,95		19,48		65,89	56,47		19,01	21,02
30,0-20,1 kDa		30,12		14,41		33,96		23,97		19,20	19,83		17,49	16,02
<20,1 kDa		63,22		85,59		34,09		48,81		2,56	5,39		62,94	62,2

Tabela 17. Nastavak.

Broj trake	MM (kDa)	9	MM (kDa)	10	11	12	MM (kDa)	13	MW (kDa)	14	MM (kDa)	15	MM (kDa)	16	MM (kDa)	17
1	65,5	1,320±0,001 ^a	44,6	2,12±0,04 ^a	0,992±0,001 ^a	n.d.	65,5	0,77±0,02 ^a	61,9	1,384±0,001 ^a	69,9	6,2±0,1 ^a	75,6	0,84±0,03 ^a	75,6	0,91±0,02 ^a
2	57,3	4,97±0,03 ^b	41,7	3,38±0,08 ^b	0,35±0,03 ^b	n.d.	61,9	0,36±0,02 ^a	39,5	15,7±0,3 ^b	61,9	2,66±0,04 ^b	65,5	1,29±0,04 ^{bh}	69,9	0,35±0,02 ^a
3	40,7	41,5±0,6 ^c	39,5	4,27±0,07 ^c	10,24±0,08 ^c	6,1±0,3 ^a	49,3	1,411±0,002 ^b	36,2	3,8±0,04 ^c	44,6	12,4±0,3 ^c	57,3	0,84±0,01 ^{be}	61,9	0,70±0,03 ^a
4	37,8	0,59±0,02 ^d	27,1	38,6±0,5 ^d	16,0±0,3 ^d	9,8±0,4 ^b	44,6	2,14±0,02 ^c	25,9	5,6±0,2 ^d	40,7	20,7±0,4 ^d	37,1	3,1±0,2 ^c	37,8	6,16±0,01 ^b
5	26,6	8,36±0,02 ^e	17,7	49,8±0,5 ^e	71,0±0,1 ^e	84,1±0,6 ^c	41,7	14,67±0,03 ^d	24,8	1,042±0,004 ^a	26,2	58,1±0,3 ^e	34,0	26,56±0,06 ^d	35,0	8,4±0,3 ^c
6	25,5	4,63±0,02 ^b					39,5	3,6±0,1 ^e	23,7	1,18±0,03 ^a			26,6	0,47±0,01 ^e	26,6	12,3±0,6 ^d
7	15,4	19,7±0,2 ^f					35,7	1,304±0,008 ^b	15,4	17,0±0,2 ^e			24,1	27,6±0,3 ^f	23,1	8,8±0,3 ^c
8	11,1	19,0±0,3 ^g					33,0	22,8±0,4 ^f	12,8	14,84±0,04 ^f			16,1	36,5±0,3 ^g	21,5	2,59±0,06 ^e
9							26,6	16,3±0,3 ^g	10,4	39,42±0,04 ^g			11,1	1,71±0,02 ^{ah}	14,5	59,8±1,0 ^f
10							24,8	2,46±0,03 ^{ci}								
11							23,7	7,55±0,06 ^h								
12							18,4	16,7±0,3 ^g								
13							16,7	3,5±0,1 ^{ei}								
14							15,4	2,481±0,003 ^{ci}								
15							13,6	3,358±0,006 ^e								
16							11,1	0,663±0,004 ^a								
Sadržaj proteinskih frakcija (%)																
>45,0 kDa	6,29		0	0	0		2,54		1,38		8,83		2,97		1,96	
45,0-30,0 kDa	42,07		9,77	11,58	6,1		44,46		19,56		33,08		29,67		14,55	
30,0-20,1 kDa	12,98		38,63	16,01	9,77		26,34		7,78		58,09		28,11		23,70	
<20,1 kDa	38,66		49,75	70,97	84,13		26,65		71,28		0		38,24		59,79	

Tabela 17. Nastavak.

Broj trake	MM (kDa)	18	MM (kDa)	20	MM (kDa)	21	MM (kDa)	23	MM (kDa)	24	MM (kDa)	25	MM (kDa)	27	MM (kDa)	28	MM (kDa)	29
1	75,6	0,079±0,005 ^a	81,8	0,520±0,008 ^{ag}	75,6	1,65±0,03 ^a	38,8	13,7±0,3 ^a	35,7	80,4±0,1 ^a	37,1	7,1±0,1 ^a	75,6	11,4±0,3 ^a	110,1	0,96±0,02 ^a	61,9	1,33±0,01 ^{ag}
2	65,5	1,33±0,02 ^b	75,6	0,293±0,008 ^{ag}	59,7	11,3±0,1 ^b	27,1	16,8±0,4 ^b	12,8	19,6±0,1 ^b	35,0	8,8±0,1 ^b	69,9	17,4±0,6 ^b	69,9	0,32±0,01 ^b	49,3	2,89±0,08 ^b
3	56,2	2,32±0,05 ^c	65,5	3,31±0,02 ^b	38,8	5,2±0,2 ^c	16,7	69,5±0,7 ^c			23,1	11,5±0,6 ^c	61,9	19,3±3,0 ^b	61,9	2,13±0,03 ^c	43,7	0,35±0,01 ^c
4	44,6	10,16±0,03 ^d	57,3	1,16±0,02 ^c	37,1	3,62±0,02 ^d					14,5	59,0±0,8 ^d	40,7	10,0±1,0 ^a	43,7	4,7±0,2 ^d	37,1	8,66±0,01 ^d
5	39,5	36,67±0,03 ^e	44,6	11,3±0,4 ^d	35,0	26,7±0,2 ^e					10,4	13,6±0,2 ^e	37,8	42,0±3,0 ^c	37,8	6,73±0,08 ^e	35,0	2,6±0,1 ^{be}
6	36,2	0,363±0,008 ^f	39,5	26,9±0,1 ^e	28,4	1,60±0,02 ^a									27,1	5,46±0,08 ^f	27,7	1,65±0,02 ^{af}
7	34,0	1,45±0,01 ^g	33,0	8,66±0,09 ^f	27,1	0,70±0,01 ^f									25,9	0,187±0,01 _b	25,5	2,003±0,04 _{ae}
8	32,5	0,173±0,004 _h	30,9	0,133±0,005 ^a	23,7	8,6±0,1 ^g									25,5	0,56±0,02 ^a _b	23,7	2,437±0,02 _{bef}
9	26,2	25,53±0,03 ⁱ	28,4	0,67±0,02 ^g	22,6	0,517±0,005 ^f									15,4	78,9±0,4 ^g	23,1	0,22±0,01 ^c
10	24,8	1,058±0,007 ^j	26,2	28,59±0,01 ^h	22,2	3,1±0,2 ^h											22,2	0,54±0,01 ^{cg}
11	21,5	0,65±0,01 ^k	21,5	2,7±0,1 ⁱ	16,1	10,5±0,1 ⁱ											17,7	11,5±0,1 ^h
12			20,5	0,320±0,007 ^{ag}	14,5	26,50±0,06 ^e											16,1	15,4±0,4 ⁱ
13			19,5	0,668±0,002 ^g													13,6	20,7±0,5 ^j
14			16,7	14,8±0,2 ^j													12,8	1,33±0,02 ^{ag}
15																	10,7	28,4±0,9 ^k
Sadržaj proteinskih frakcija (%)																		
>45,0 kDa	3.72		5,29		12,94		0		0		0		48,12		3,41		4,22	
45,0-30,0 kDa	48.82		46,95		35,51		13,73		80,45		15,92		51,88		11,47		11,63	
30,0-20,1 kDa	27.71		32,30		14,56		16,77		0		11,51		0		6,20		6,86	
<20,1 kDa	19.74		15,47		36,99		69,50		19,55		72,57		0		78,92		77,29	

„n.d.“-nije detektovan; Ista slova u istoj koloni označavaju da nema statistički značajnih razlika između uzoraka prema Tukey's testu, $p < 0.05$.

*Uzorci broj 19, 22 i 26 su zbog malog broja proteinskih traka opisani u tekstu i nisu predstavljeni tabelarno.

4.1.5 Fenolni profil

Fenolna jedinjenja kao proizvode sekundarnog metabolizma biljaka, odlikuje velika raznovrsnost u strukturi i funkciji. Zbog svojih specifičnih uloga i ograničene pojave u biljkama, dobri si markeri biljnog/geografskog porekla i našli su veliku primenu u taksonomskoj klasifikaciji. Umesto ciljanog pristupa ograničenog na kvantitativnu analizu klase jedinjenja povezanih sa određenim metaboličkim putem, analiza fenolnih jedinjenja ispitivanih uzoraka semena gajenog i samoniklog voća bila je fokusirana na skeniranje celokupnog fenolnog profila kao jedinstvene karakteristike uzoraka. U tu svrhu su korišćene HPTLC i UPLC Orbitrap MS tehnike.

4.1.5.1 Određivanje ukupnog sadržaja polifenola (TPC)

Gajeno voće

Ukupan sadržaj polifenola u analiziranom semenu gajenog voća opadao je prema sledećem redosledu: kupina (26 – 33 g GAE/kg), malina (16 – 29 g GAE/kg), jagoda (8 – 29 g GAE/kg), aronija (20 g GAE/kg), borovnica (2,0 – 10,6 g GAE/kg), ogrozd (2,0 – 2,6 g GAE/kg), godži (1,4 g GAE/kg), peruanska jagoda (0,9 g GAE/kg) i ribizla (0,6 – 1,7 g GAE/kg) (**Tabela 18.**). Dobijeni rezultati su u skladu sa ranijim istraživanjima, gde su najveći sadržaj polifenola izražen na kg zaleđenog uzorka imali uzorci kupine (3,8 g GAE/kg), praćeni uzorcima maline (2,4 – 2,8 g GAE/kg) i jagode (2,5 g GAE/kg).²⁰⁵

Tabela 18. Ukupan sadržaj polifenola (g GAE/kg) u uzorcima semena gajenog voća i rezultati KW-testa.

TPC (g GAE/kg)	Malina (n = 4)	Ogrozd (n = 2)	Kupina (n = 3)	Borovnica (n = 5)	Crna ribizla (n = 12)	Jagoda (n = 16)	Aronija (n = 1)	Godži (n = 1)	P.jagoda (n = 1)
sr. vrednost	24,2	2,29	30,3	6,8	0,87	20,0	19,6	1,42	0,87
medijana	25,9	-	31,3	7,1	0,79	21,1			
stdev	6,0	0,45	3,5	3,2	0,31	5,2			
min	16,3	1,96	26,4	2,0	0,58	7,9			
max	28,9	2,61	33,2	10,6	1,69	29,0			
KW test	P	<0,0001							
	Z -	R(K,M,J)							
	vrednost	K(B,O)							

Biljne vrste sa reprezentativnim brojem uzoraka (jagoda, borovnica, malina, kupina, crna ribizla i ogrozd) su analizirane primenom KW neparametrijskog statističkog testa, da bi se utvrdilo da li uzorci pripadaju istoj populaciji. Test je pokazao da postoje statistički značajne razlike u medijanama ispitivanih vrsta, uzorci semena crne ribizle su imali značajno niži sadržaj polifenola u poređenju sa semenom maline, jagode i kupine, dok su uzorci semena kupine pokazali statistički značajno veći sadržaj fenolnih jedinjenja u poređenju sa uzorcima semena borovnice i ogrozda (**Tabela 18.**).

Samoniklo voće

U uzorcima samoniklog voća najveći sadržaj ukupnih polifenola (**Tabela 19**) određen je u uzorku šimširike (84,2 g GAE/kg), zatim u uzorcima *Rosa spinosissima* (34,0 g GAE/kg), maline (31,8 g GAE/kg), orlovih kandži (29,1 g GAE/kg), tise (23,2 g GAE/kg) i borovnice (17,5 – 21,8 g GAE/kg). Ranija istraživanja rađena na korenu (147,2 g GAE/kg), listu (120,7 g GAE/kg) i plodu (148,0 – 448,3 µg·GAE/mg) šimširike potvrdila su veliki sadržaj polifenola i antioksidativni potencijal ovog voća, ukazujući na veliku mogućnost njegove primene u prehrambenoj industriji, kao funkcionalne hrane ili kao antioksidanasa u različitim tehnološkim procesima proizvodnje.^{206,207}

Literaturni podaci dobijeni za plod uzoraka koji pripadaju vrstama iz roda *Rosa* pokazali da su ukupan sadržaj polifenola i antioksidativni kapacitet veći u uzorku *R. spinosissima* nego u ostalim ispitivanim *Rosa* vrstama (*R. canina*, *R. gallica*, *R. rugosa*), što je u skladu sa dobijenim rezultatima u okviru ove doktorske disertacije i ukazuje da se kao dobar izvor antioksidanasa iste mogu koristiti za oplemenjivanje i razvoj novih sorti.²⁰⁸ Sadržaj polifenola u semenu divlje maline sličan je rezultatima dobijenim za seme gajenih malina (24,2 mg GAE/g), kao i sa TPC vrednostima dobijenim za seme crne i crvene maline zaostalo nakon proizvodnje hladno ceđenog ulja iz ovog voća (25,1 – 41,2 mg GAE/g).²⁰⁹ Sadržaj polifenola u uzorcima divlje borovnice (17,5 – 21,8 g GAE/kg) je značajno veći od sadržaja polifenola određenog u uzorcima gajenih borovnica (2,0 – 10,6 g GAE/kg). Najniži sadržaj polifenola (< 1 g GAE/kg) određen je u semenu crvene ribizle, belog duda, belog gloga, burjana i crnog trna. Dobijeni rezultati za seme belog duda su u saglasnosti sa literaturnim podacima (76,104 – 109,107 mg GAE/100 g).²¹⁰

Tabela 19. Ukupan sadržaj polifenola (g GAE/kg) u uzorcima semena samoniklog voća.

Oznaka uzorka (SV)	Voćna vrsta	TPC (g GAE/kg)
1	Beli dud	0,97
2	Beli glog	0,92
3	Burjan	0,89
4	Crni dud	3,1
5	Crni trn	0,70
6	Crni trn	0,98
7	Divlja borovnica	17,5
8	Divlja borovnica	21,8
9	Divlja crvena ribizla	0,47
10	Divlja kupina	18,6
11	Divlja kupina	10,3
12	Divlja malina	31,8
13	Divlja trešnja	1,7
14	Divlji ogrozd	1,0
15	Dunjarica	6,3
16	Kleka	7,3
17	Orlove kandže	29,1
18	Poljska ruža	7,2
19	'Burnet' ruža	34,0
20	Šipurak	8,6
21	Svib	1,5
22	Šimširika	84,2
23	Šumska jagoda	16,8
24	Tisa	23,2
25	Zova	1,8
sr.vrednost		13,7
medijana		7,2
stdev		18,3
min		0,47
max		84,2

4.1.5.2 HPTLC fenolni profil

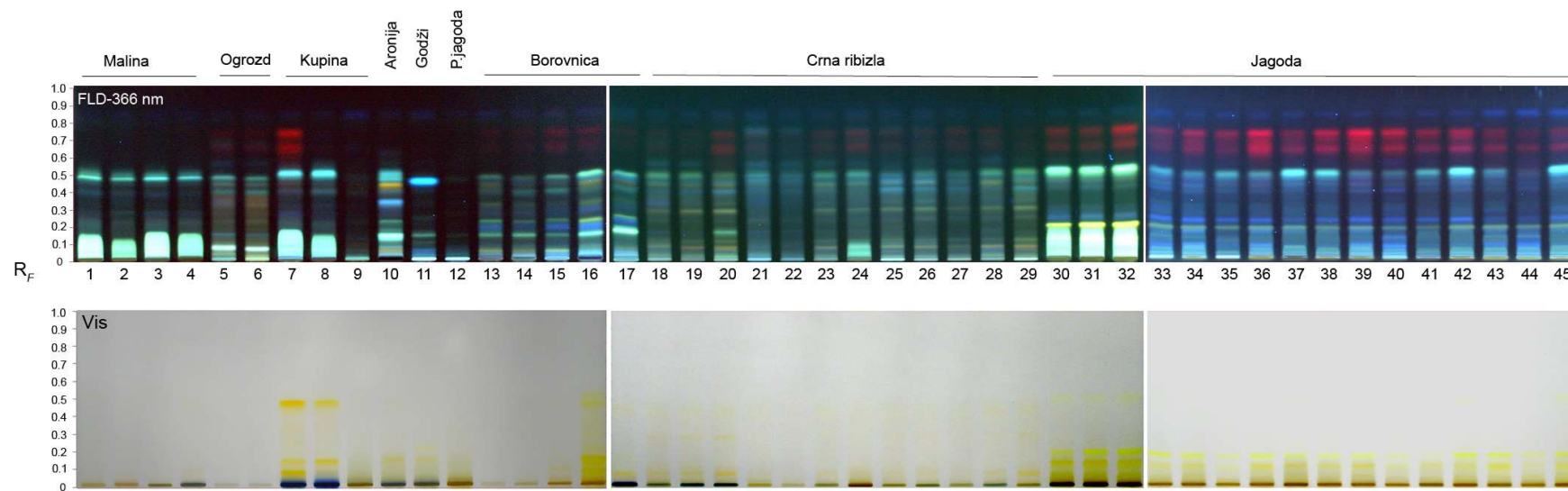
Metode otiska prsta naglašavaju skup jedinstvenih hromatografskih signala, koji se mogu koristiti za dobijanje karakterističnih obrazaca za prepoznavanje uzoraka. HPTLC je tehnika koja je često korišćena za početni skrining složenih sistema. U okviru ove disertacije ona je primenjena za profilisanje fenolnih kiselina i flavonoida u cilju potvrde biljnog porekla ekstrakata semena ispitivanog voća.

Gajeno voće

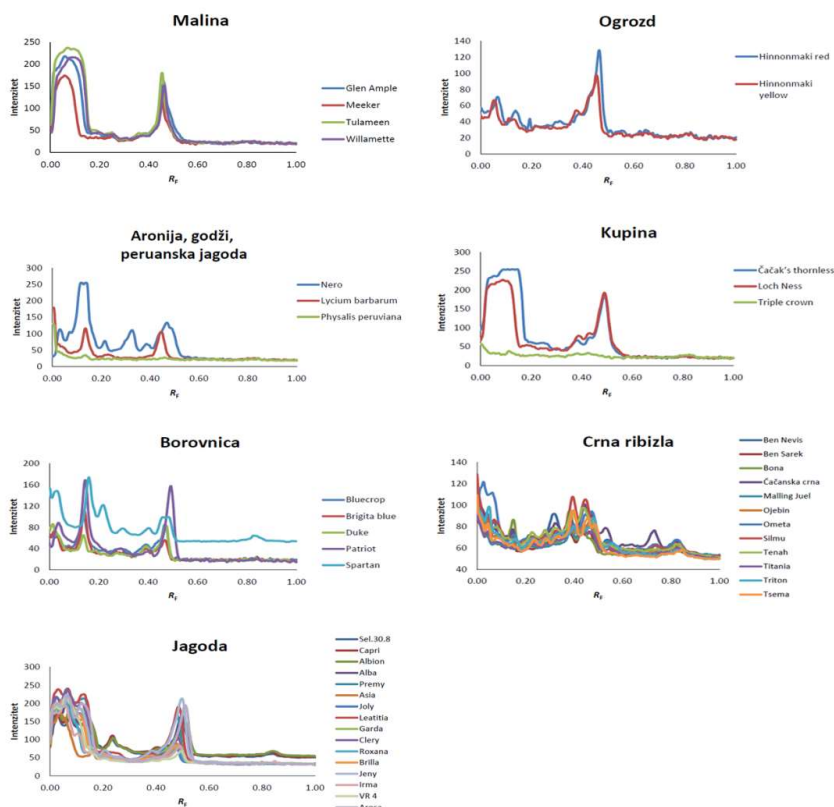
Vizuelnim pregledom hromatograma otkrivene su sličnosti i razlike u fenolnom profilu semena gajenog voća. Svi ekstrakti semena su pokazali obrazac u kojem dominiraju polarnija jedinjenja koja se jače adsorbuju na površini silika gela a koja se pojavljuju kao narandžaste, plave i zelene (366 nm), odnosno žute trake (Vis) u oblasti R_F 0,1 – 0,3. Pored toga, nepolarniji flavonoidi, kao što su flavonoli, flavanoni i izoflavonoidi, pojavljuju se na većim R_F vrednostima kao plave zone. Svi hromatogrami sadrže i karakterističnu plavu zonu na $R_F = 0,5$ (366 nm) (**Slika 21**). Takođe, uočene su razlike u fenolnim profilima između uzoraka različitog biljnog porekla i sličnosti unutar svake biljne vrste, dok su se jedinjenja koja su bila prisutna u svim uzorcima, razlikovala po količini u kojoj su zastupljene u određenim uzorcima (**Slika 21**). Hromatografsko profilisanje je dobar izvor informacija, ali ne identifikuje nedvosmisleno markere autentičnosti i ne može se koristiti za diferencijaciju uzoraka prema biljnom poreklu, zbog čega su hromatogrami dalje korišćeni kao ulazni podaci za hemometrijsku analizu, kojoj je prethodila obrada slike.

Svaki hromatogram je dodatno propušten kroz tri filtera – crveni, zeleni i plavi, čime je formiran set specifičnih hromatograma za svaki uzorak. Propuštanje slike hromatograma kroz RGB kanale izvršeno je u cilju povećanja selektivnosti, kako bi se razdvojile eventualno preklapljene zone različitih boja koje odgovaraju različitim jedinjenjima. Grafici zavisnosti intenziteta sive boje od R_F vrednosti u većoj meri u odnosu na hromatograme, ukazuju na autentičnost pojedinog uzorka (**Slika 22**).

Slike sva tri kanala su obrađene i prikupljeni podaci su izvezeni u *Excel* za dalju hemometrijsku obradu. PCA je izvedena na matrici podataka koja se sastojala od 45 uzoraka i 608 varijabli koje predstavljaju intenzitet piksela duž linije hromatograma dužine 608, za svaki kanal pojedinačno. Najbolje performanse modela postignute su za zeleni kanal, dobijen je četvorokomponentni model koji je objasnio 85,81% od ukupnog varijabiliteta među podacima (PC1 – 43,16%, PC2 – 17,67%, PC3 – 15,83%) (**Slika 23**).

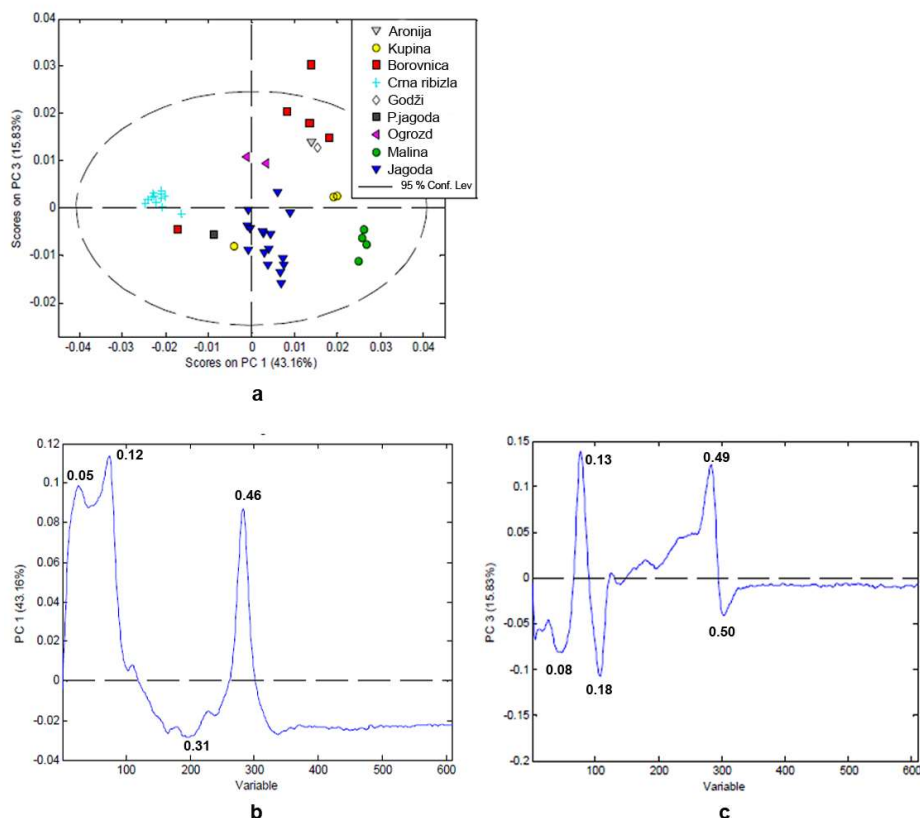


Slika 21. HPTLC-FLD 366 nm i Vis hromatogrami fenolnih jedinjenja u uzorcima semena različitih vrsta jagodastog voća (10 μ L, svaka zona), razdvojeni na HPTLC silika gel pločama upotrebom mobile faze: toluen – etil-acetat – mravlja kiselina – voda (3:6:1:0.6, v/v/v/v)



Slika 22. Profil fenola semena gajenog voća predstavljen kao zavisnost intenziteta sive boje od R_F vrednosti, dobijen nakon obrade slika HPTLC hromatograma u ImageJ softveru.

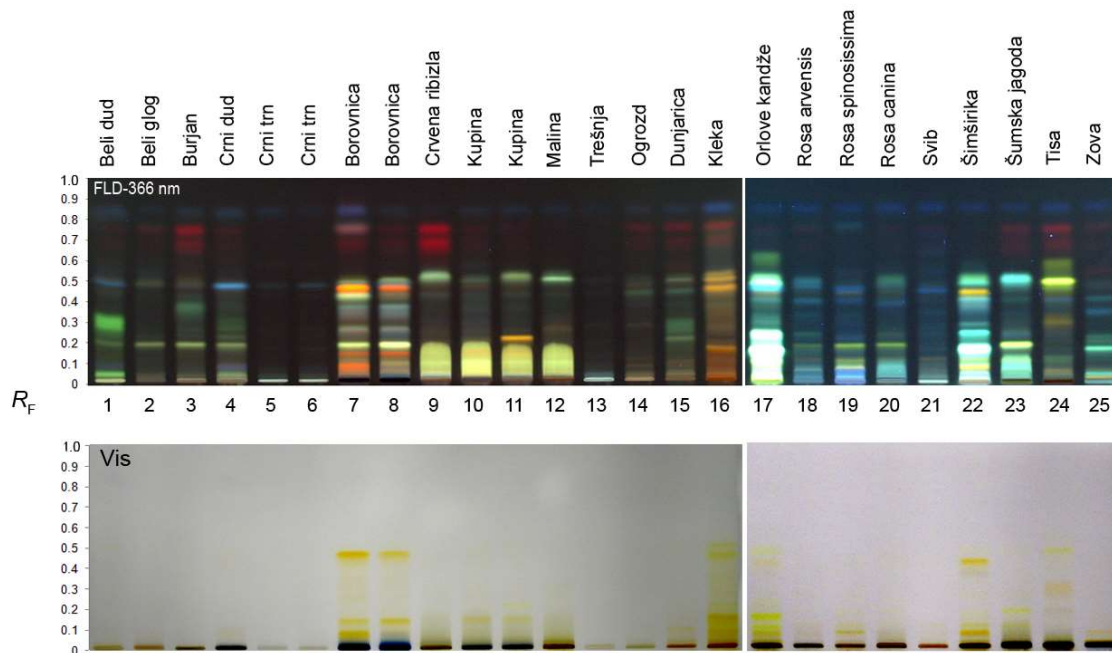
Uzimajući u obzir grafik skorova za prvu i treću glavnu komponentnu (**Slika 23a**), posmatrani uzorci su formirali pet klastera koji odgovaraju različitim vrstama jagodastog voća (jagoda, crna ribizla, malina, kupina i borovnica). Uzorci aronije i godžija su pokazali slične fenolne profile kao i uzorci semena borovnice, dok su uzorci semena ogrozda i peruanske jagode pokazali jedinstvene fenolne profile, različite od ostalih vrsta jagodastog voća. Dobijeni model je omogućio potpunu diferencijaciju analiziranog semena kultivisanog jagodastog voća prema biljnom poreklu, na osnovu fenolnog profila. Grafici vektora latentnih varijabli (**Slika 23b/c**) su pokazali da varijable sa R_F vrednostima 0,05; 0,12 i 0,46 imaju najveći pozitivan uticaj na razdvajanje duž PC1 ose. Ove varijable su imale najveći uticaj na diferencijaciju sorti maline, jagode, borovnice, kupine, aronije i godžija, dok je zona na R_F vrednosti 0,31 imala najveći negativan uticaj na izdvajanje uzoraka semena crne ribizle. Zone na R_F vrednostima 0,13 i 0,49 uticale su na PC3 na pozitivan način, što ukazuje na visok sadržaj ovih jedinjenja u sortama borovnice, aronije, ogrozda i godžija, dok su zone na R_F vrednostima 0,08; 0,18 i 0,50 značajno uticale na PC3 na negativan način i odgovorne su za diferencijaciju uzoraka semena maline, jagode i peruanske jagode.



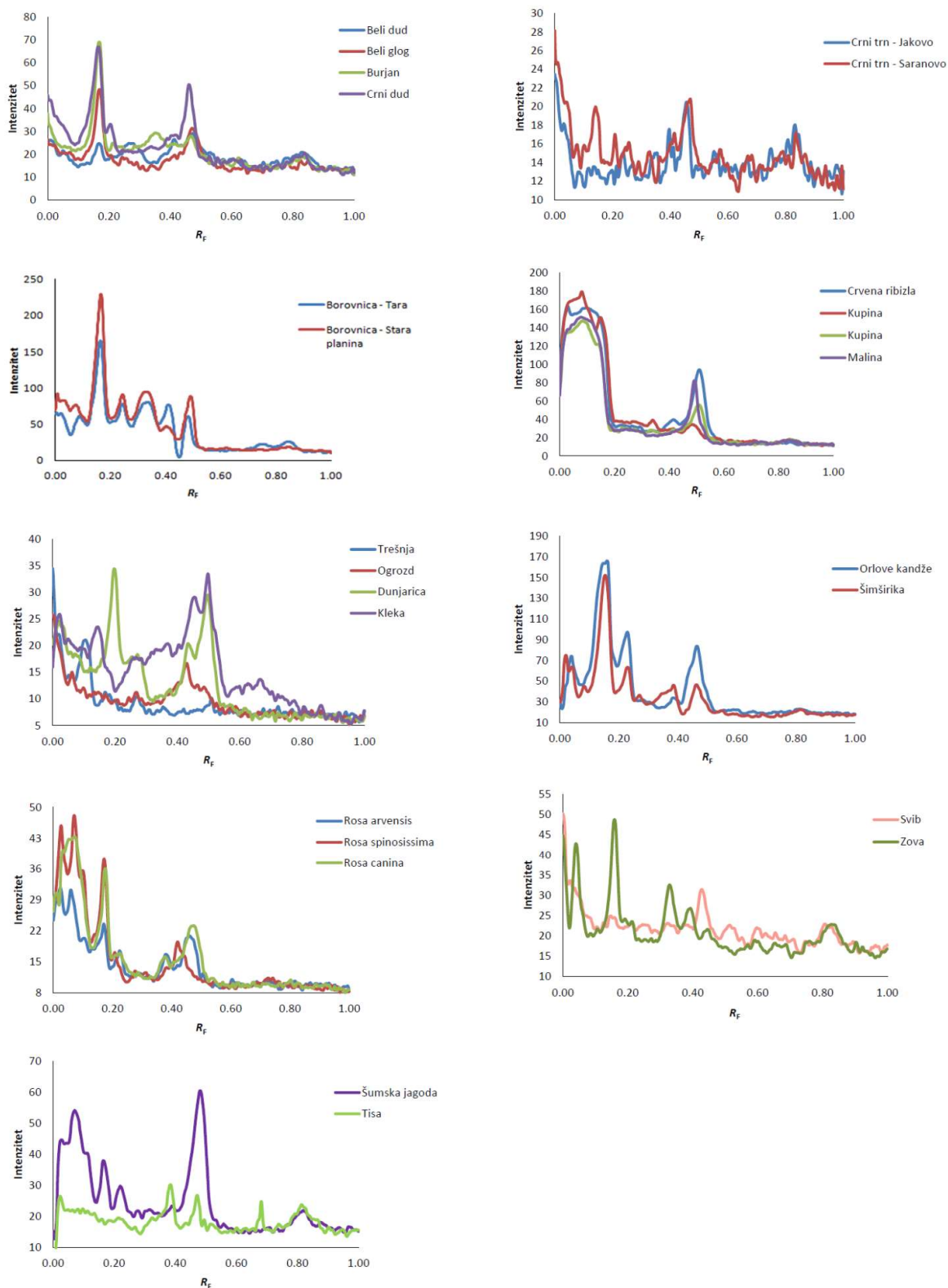
Slika 23. Analiza glavnih komponenta: a) grafik skorova latentnih varijabli dobijen za fenolni profil semena gajenog voća, b/c) grafici vektora latentnih varijabli.

Samoniklo voće

Metabolizam fenolnih jedinjenja u biljkama zavisi od velikog broja faktora: genotipa, geografskog porekla, klimatskih uslova, agrotehničkih mera, navodnjavanja, primene đubriva i pesticida. Slično uzorcima semena gajenog voća, ekstrakti semena samoniklog voća pokazali su obrazac kojim dominiraju narandžaste, plave i zelene (366 nm), odnosno žute trake (Vis) u oblasti R_F 0,1 – 0,3 i karakteristična plava zona na R_F 0,5 (366 nm) (**Slika 24**). Posmatranjem fenolnog profila i preklopljenih hromatograma (**Slike 24 i 25**) uočene su razlike u fenolnim profilima između uzoraka različitog biljnog porekla i sličnosti unutar svake biljne vrste. Takođe, poređenjem hromatograma uzoraka semena divlje maline, kupine, borovnice i jagode sa odgovarajućim hromatogramima istih vrsta gajenog voća, uočavaju se sličnosti u fenolnim profilima, samo se intenzitet zona razlikuje.



Slika 24. HPTLC-FLD 366 nm i Vis hromatogrami fenolnih jedinjenja u uzorcima semena različitih vrsta samoniklog voća (10 μ L, svaka zona), razdvojeni na HPTLC silika gel pločama upotrebom mobile faze: toluen – etil-acetat – mravlja kiselina – voda (3:6:1:0.6, v/v/v/v).

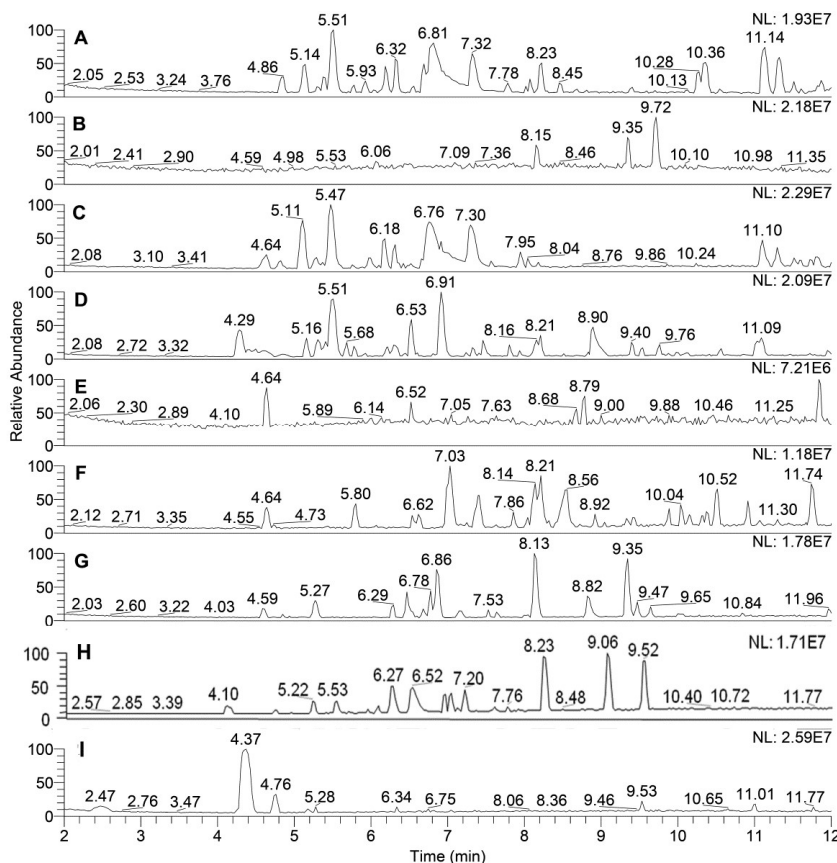


Slika 25. Profil fenola semena samoniklog voća predstavljen kao zavisnost intenziteta sive boje od R_F vrednosti, dobijen nakon obrade slika HPTLC hromatograma u ImageJ softveru.

4.1.5.3 Identifikacija fenolnih jedinjenja primenom UPLC-LTQ OrbiTrap masene spektrometrije u uzorcima ekstrakata semena gajenog i samoniklog voća

Za UPLC-LTQ OrbiTrap MS analizu odabran je po jedan reprezentativni uzorak od svake ispitivane vrste voća. HPTLC profili ekstrakata semena voća istog biljnog porekla ukazali su na uniformnost sastava unutar iste biljne vrste, čime je opravdana dalja analiza na jednom uzorku po vrsti.

Identifikovano je ukupno 114 fenolnih jedinjenja, od toga 54 fenolne kiseline i njihovih derivata, 34 flavonoida i 26 glikozida. Identifikovani flavonoidi su podeljeni u pet klasa: trinaest jedinjenja iz grupe flavan-3-ola, šest iz grupe flavonola, dva flavanonola, dvanaest flavona i jedan flavanon. Svako fenolno jedinjenje je navedeno sa retencionim vremenom (t_R), molekulskom formulom, izračunatom i tačnom masom, greškom (Δ ppm) i glavnim jonima nastalim fragmentacijom koji su korišćeni za identifikaciju fenolnih jedinjenja u odsustvu standarda (**Tabela P1**). Hromatogrami fenolnih jedinjenja identifikovanih u analiziranim vrstama jagodastog voća su predstavljeni na **Slici 26**.



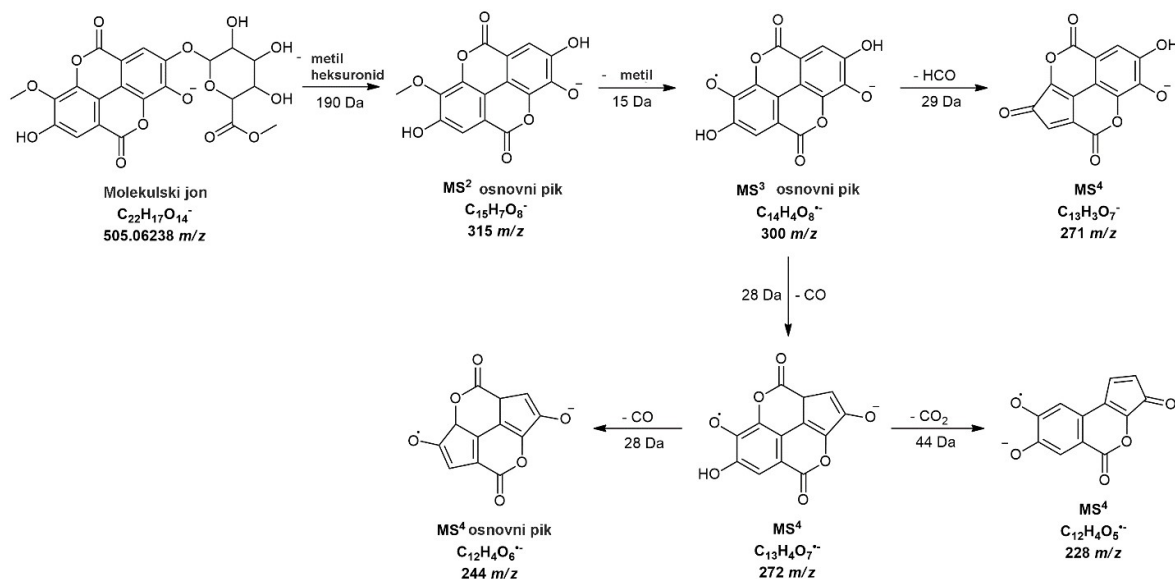
Slika 26. Hromatogrami fenolnih jedinjenja identifikovanih u uzorcima semena: A) maline, B) ogrozda, C) kupine, D) aronije, E) godžija, F) peruanske jagode, G) jagode i I) crne ribizle.

Identifikacija fenolnih kiselina i njihovih derivata

Ekstrakti semena voća su pokazali velike razlike u sastavu fenola. Snimljeni maseni spektri su potvrdili prisustvo 53 fenolne kiseline i njihovih derivata. Fenolne kiseline su bile prisutne kao slobodne ili u vezanoj formi, u obliku heksozida i estara. Najzastupljenije fenolne kiseline pripadaju klasi hidroksibenzoeve kiseline (jedinjenja **1**, **10**, **11**, **12**, **13** i **36**). Elaginska kiselina je identifikovana u svim analiziranim uzorcima semena voća, dok su derivati elaginske kiseline uključujući elagitanine,

bili najzastupljeniji u ekstraktima semena gajene i samonikle maline, kupine i jagode, potvrđujući ranije rezultate dobijene za seme jagodastog voća iz familije Rosaceae (rod *Rubus* i *Fragaria*).^{191,211,212} Poznato je da su elaginska kiselina i elagitanini prisutni u velikim količinama u jagodastom voću.¹³⁶ Fragmentacija fenolnih kiselina i njihovih derivata je generalno zasnovana na gubitku ugljen-dioksida, pri čemu nastaje glavni fragmentacioni jon $[M-H-44]^-$.

Metil-elagoil metil-heksuronid (**38**) na m/z 505 je identifikovan samo u ekstraktu semena gajene kupine, kao i u uzorcima samonikle kupine, maline i jagode. Njegovom fragmentacijom nastaju joni na m/z 315 i 300, što odgovara masama deprotonovanog metil-estra elaginske kiseline i deprotonovane elaginske kiseline, redom.²¹³ Predloženi fragmentacioni put ovog jedinjenja predstavljen je na Slici 27.



Slika 27. Predloženi fragmentacioni put metil-elagoil metil-heksuronida.

Metil-elagoil-pentozid (**37**) i metil-elagoil-heksozid (**35**) na m/z 477 imaju sličan put fragmentacije (MS/MS glavni fragmentacioni jon na m/z 315 i MS/MS jon na m/z 300), što ukazuje na gubitak pentozne i heksozne jedinice.²¹⁴ Deprotonovani molekularni jon na m/z 447 (**33**) je fragmentacijom formirao jone na 301 [448-H-146]⁻ i 300 [448-H-147]⁻. MS/MS jon na m/z 301 je dalje fragmentisan do m/z 244 i 216, i identifikovan je kao ramnozid elaginske kiseline, karakterističan za sorte jagode.²¹⁵

Od derivata galne kiseline (gallic acid – GA), najzastupljeniji je bio metil-galat (**4**) u svim ispitivanim ekstraktima semena gajenog i samoniklog voća. Izomeri trigaliol-heksozida su na m/z 635 identifikovani u semenu gajene i divlje maline, kupine i jagode (**5**) i trigaliol-heksozid 2 (**6**) u uzorcima gajene kupine i maline i divlje borovnice. Gubitkom jednog galiol-estra u slučaju trigaliol-glukozida kao proizvod nastaju MS/MS fragmentacioni joni na m/z 465 [636-H-GA]⁻ i m/z 483 [636-H-152]⁻, koji pripadaju dehidratiranoj digaliol-glukozi [484-H-H₂O]⁻ i digaliol-glukozi [484-H]⁻, redom. Kao rezultat dalje fragmentacije nastaju osnovni joni na m/z 271 [484-H-212]⁻, m/z 313 [484-H-GA]⁻ i m/z 211 [484-H-272]⁻.²¹⁶

Prisustvo hidroksicinaminskih kiselina (*p*-kumarinska i sinapinska kiselina, **47** i **50**) u ekstraktima semena voća je potvrđeno upotrebom standarda. Dimetoksicimetna kiselina (**54**) je identifikovana u svim analiziranim uzorcima dok su izomeri metil-kafeoilhinata (**52** i **53**) i diheksozid ferulinske kiseline (**48**) u semenu gajenih uzoraka nađeni samo u ekstraktima borovnice. Za razliku od gajenih vrsta, u semenu samoniklog voća feruloil-diheksozid (**48**) nije određen, dok su izomeri metil-kafeoilhinata (**52** i **53**) bili prisutni u uzorcima belog gloga, burjana, crnog duda, borovnice, orlovih kandži i zove.

Dalje, tri izomera metil-kafeoilhinata (**43**, **44** i **45**) su identifikovana na m/z 367. Prvi je pokazao MS/MS fragmentacioni jon na m/z 161 [kofeinska kiselina-H₂O-H]⁻ koji odgovara metil-3-*O*-kofeoilhinatu, dok su druga dva izomera metil-5-*O*-kofeoilhinata formirala fragmentacioni MS/MS jon na m/z 179 (koji odgovara deprotonovanoj kofeinskoj kiselini) i jon na m/z 135 dobijen gubitkom CO₂ grupe.^{151,217} Jedinjenja (**52** i **53**) na m/z 529 sa MS/MS osnovnim fragmentom na m/z 367 su označena kao metil-estri dikofeoilhininske kiseline prema literaturnim podacima.²¹⁸

Identifikacija flavonoidnih aglikona

Flavonoidi su sekundarni metaboliti prisutni u velikom broju u semenu biljaka, gde igraju značajnu ulogu u klijanju semena i zaštiti od biotičkih i abiotičkih faktora.²¹⁹ Klase flavonoida, uključujući flavonole, flavanole, flavanonole, flavone i flavanone, identifikovane su u semenu ispitivanog voća. Diferencijacija pojedinačnih jedinjenja unutar klase zavisi od supstitucije funkcionalnih grupa (metilovani, hidroksilovani, acilovani i sulfatni derivati).²²⁰ Flavonoidni aglikoni se uglavnom dobijaju kao proizvodi hidrolize odgovarajućih glikozida. Najvažniji put fragmentacije za strukturnu karakterizaciju aglikonskog dela flavonoidnih konjugata je retro-*Dils-Alderova* (RDA) reakcija. U negativnom režimu jonizacije, RDA fragmenti se najčešće javljaju na m/z 179, 165 i 151.⁴⁵ U semenu ispitivanog voća, od derivata flavan-3-ola identifikovana su tri izomera B-tip procijanidin dimera (**58**, **61** i **63**), tri izomera A-tip procijanidin dimera (**64** i **65**), katehin, epikatehin i (epi)katehin-galat (**60**, **62** i **66**). Deprotonovani molekuli izomera B-tip procijanidin dimera (**58**, **61** i **63**) na m/z 577 su proizveli glavne fragmentacione jone na m/z 451 (rezultat heterociklične fisije prstena), m/z 425 (proizvod RDA fragmentacije dimera), m/z 407 (proizvod sekvencijalne eliminacije vode) i m/z 285, što je u skladu sa literaturnim podacima.²²¹ U ispitivanim uzorcima gajenog voća jedan izomer B-tipa procijanidin dimera (**58**) je identifikovan samo u semenu aronije, dok su druga dva izomera (**61** i **63**) bila karakteristična za seme maline i kupine. Ovo je u skladu sa literaturnim podacima za gajeno jagodasto voće.⁵ Za razliku od gajenog, u uzorcima samoniklog voća ovi izomeri su identifikovani u semenu borovnice, kupine, maline, *Rosa arvensis*, *Rosa spinosissima*, šimširike, šumske jagode i zove. Katehin, epikatehin i (epi)katehin-galat (**60**, **62** i **66**) su bili dominantni flavan-3-oli u sortama gajene maline, kupine, aronije, borovnice i jagode. U uzorcima samoniklog voća katehin i epikatehin (**60** i **62**) su bili prisutni u ekstraktima borovnice, kupine, maline, trešnje, dunjarice, orlove kandže, *Rosa arvensis*, *Rosa spinosissima*, šimširike, jagode, tise i zove. (Epi)katehin-galat (**66**) je bio karakterističan za samoniklu kupinu, malinu i jagodu. Fragmentacija katehina i njihovo prisustvo u ispitivanim uzorcima potvrđeni su dostupnim standardima.²²² Prisustvo miricetina, kvercetina, kampferola i izoramnetina (**69**, **70**, **72**, **73**), iz grupe flavonola, je bilo karakteristično za uzorke semena gajene maline, ogrozda, kupine, aronije, borovnice, crne ribizle i jagode, kao i za većinu ispitivanih uzoraka samoniklog voća. Navedena jedinjenja se razlikuju u broju i položaju hidroksilnih grupa na C3 i C5, i to su najčešće identifikovani fenoli u jagodastom voću.¹¹⁶ Prethodna istraživanja su takođe potvrdila da su miricetin, kvercetin i kampferol dominantni flavonoidi u uzorcima semena crne ribizle.²²³ Pored toga, pokazali su da seme i plod jagodastog voća imaju sličan fenolni sastav. RDA fragmentacija je uočena za kampferol i miricetin, koji su dali zajednički fragment na m/z 151. Različit put fragmentacije u slučaju kvercetina je formirao fragmentni jon [^{1,2}A-CO]⁻ na istoj m/z 151, što je u skladu sa ranijim istraživanjima.⁴⁵ Izoramnetin je proizveo fragmentni jon [M-H-15]⁻ na m/z 300 i karakterističan RDA fragment na m/z 151.⁴⁵

U slučaju flavanonola, taksifolin (**74**) je identifikovan u svim analiziranim uzorcima semena gajenog voća, dok je aromadendrin (**75**) bio karakterističan samo za uzorke semena crne ribizle i jagode. Pomenuti flavanoli su identifikovani u svim ispitivanim ekstraktima semena samoniklog voća, osim belog gloga, burjana i crnog trna. Identifikacija taksifolina je zasnovana na MS² fragmentnim jonima na m/z 285, 177, i 125. Prisustvo aromadendrinske [M-H]⁻ je potvrđeno na osnovu MS² fragmenata na m/z 269, 259 i 243, koji su nastali kao rezultat uzastopnog gubitka H₂O, CO, i CO₂ dela, navedenim redom.²²⁴

Na osnovu masenih spektara potvrđeno je prisustvo dvanaest flavona (**76–86**) i jednog flavanona (naringenin, **80**), u semenu jagodastog voća. Jedinjenja **78** i **80** su identifikovana kao apigenin i luteolin. Samo u semenu ogrozda (GV) i šimširike (SV) identifikovan je apigenin $[M-H]^-$ na m/z 269 pomoću karakterističnih MS^2 fragmentacionih jona na m/z 241, 225, 201 i 197.²¹³ Luteolin $[M-H]^-$ na m/z 285 je pronađen u uzorcima semena gajene crne ribizle i jagode, kao i u većini uzoraka samoniklog voća (osim belog gloga, burjana, crnog trna, kupine i sviba), a identifikovan je na osnovu glavnih MS^2 fragmenata na m/z 241, 243, 217, 199 i 175.²¹⁸ Glavni fokus je bio na specifičnoj RDA fragmentaciji flavonoida.²²⁵ U nekim slučajevima nije bilo moguće odrediti položaj hidroksilne i metil grupe na flavonoidnom skeletu, pa takva jedinjenja nije bilo moguće identifikovati. Za seme borovnice karakteristični su bili pentahidroksi-metoksiflavon (**76**) i trihidroksi-trimetoksiflavon izomer 3 (**82**). Pentahidroksi-metoksiflavon (**76**) je detektovan pomoću $[M-H]^-$ osnovnog jona na m/z 331 i fragmenata nastalih gubitkom metil grupe (m/z 299) i eliminacijom CO_2 (m/z 255) i CO (m/z 227). Ramnocitrin (**86**) je identifikovan samo u semenu gajene crne ribizle, pa može biti značajan hemijski marker u određivanju njihovog biljnog porekla. Među uzorcima samoniklog voća prisustvo ramnocitrina je potvrđeno u semenu orlovih kandži i *Rosa arvensis*. Određivanje ramnocitrina je urađeno prema prethodno objavljenim fragmentacionim jonima na m/z 271, 255 i 165, nastalim gubitkom CO, OH i $C_7H_2O_3$ grupe, redom. Poređenje dobijenog MS spektra i retencionog vremena sa standardom omogućilo je identifikaciju naringenina (**88**), flavanona koji se nalazi u semenu gajene kupine, aronije, crne ribizle i jagode, kao i u većini uzoraka semena samoniklog voća osim belog gloga, crnog trna, crvene ribizle i sviba.

Identifikacija fenolnih glikozida

Fenolne kiseline i flavonoidi se u biljkama nalaze uglavnom u obliku glikozida, što poboljšava njihovu biodistribuciju i metabolizam. Šećerne jedinice su povezane sa aglikonom kao *O*-glikozidi ili retko kao *C*-glikozidi (**91** i **95**). Primenjena UPLC–LTQ OrbiTrap MS metoda ne može tačno da identifikuje saharidnu jedinicu bez odgovarajućeg standarda, može samo da razlikuje da li je saharid heksoza, deoksiheksoza ili pentoza. Uobičajeni put fragmentacije glikozida podrazumeva raskidanje glikozidne veze, pri čemu kao glavni MS^2 proizvodi nastaju $[M-H]^-$ joni koji potiču od fenolnih jedinjenja ili odgovarajući saharidi.

Na osnovu masenih spektara identifikovano je 26 glikozida, iz četiri klase flavonoida. Iz klase flavona, identifikovani su glikozidi luteolina (**89**, **94**, **108**, **110** i **111**), apigenina (**91**, **100** i **107**), pentahidroksiflavona (**97**, **103** i **106**), pentahidroksimetoksiflavona (**98**) i hrizin-*C*-di-heksozid (**95**). Iz grupe flavonola, analizirani uzorci semena voća su bili okarakterisani prisustvom glikozida kampferola (**104**, **112** i **114**), kvercetina (**93**, **96**, **101** i **113**) i izoramnetina (**102**). Eriodiktio (**99**) i naringenin (**109**) heksozid derivati flavanona identifikovani su u većini vrsti. Pored toga, aromadendrin heksozid (**90**) je pronađen u svim ispitivanim vrstama gajenog voća osim u uzorku godžija, dok je u uzorcima divljeg voća nije identifikovan samo u semenu belog gloga, crnog trna, crvene ribizle, ogrozda, sviba i zove.

Izoramnetin-3-*O*-(6"-ramnozil)-heksozid (**102**) je pronađen u semenu ogrozda, aronije, borovnice i crne ribizle sa glavnim MS^2 fragmentom na m/z 315 usled gubitka ramnozil-glukozida (-308 Da).²¹³ Jedinjenje **113** na m/z 609, identifikovano u uzorcima semena gajene jagode i samonikle borovnice kupine i ruže (18 – 20 SV), označeno je kao kvercetin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil)-heksozid. Njegovom fragmentacijom formira se MS^2 jon na m/z 463, usled gubitka *p*-kumaroil grupe (-146 Da). Dalje, MS^3 fragment na m/z 301 nastao gubitkom heksozil grupe (-162 Da) i MS^4 fragmenti su potvrdili prisustvo kvercetina kao aglikona. Jedinjenje **112** je identifikovano u uzorcima semena gajene jagode i aronije i divlje borovnice, kupine, maline, dunjarice, ruže, sviba i jagode, kao kampferol-3-*O*-metil-heksuronid i njegovom fragmentacijom nastali su karakteristični joni na m/z 284 (gubitak metil-heksuronil grupe, -191 Da), 255 i 227. Utvrđeno je da su apigenin-6-*C*-heksozid-8-*C*-pentoizid (**91**), hrizin-6,8-*C*-di-heksozid (**95**), kvercetin-3-*O*-heksozid (**96** i **101**) jedinstveni za seme gajene aronije. Identifikacija jedinjenja **91** i **95** zasnovana je na literaturnim podacima.^{215,216}

Rezime UPLC–LTQ OrbiTrap MS analize

Sumiranjem rezultata dobijenih *UPLC–LTQ OrbiTrap MS* analizom identifikovana su fenolna jedinjenja koju se mogu koristiti kao markeri biljnog porekla ispitivanih uzoraka gajenog voća.²²⁶ Dihidroksibenzoil-dihexozid, feruloil-dihexozid, metil-3,5-dikafeoil-hinat, pentahidroksi-metoksiflavon, trihidroksi-trimetoksiflavon izomer 3 i pentahidroksiflavon-pentozid su fenolna jedinjenja odgovorna za diferencijaciju uzoraka semena borovnice. Hidroksibenzoil-dihexozid, vaniloil-heksozid, derivat elagitanina 2, elagoil-ramnozid i kvercetin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil)-heksozid bili su specifični za seme jagode. Derivat elagitanina 11, metil-elagoil metil-heksuronid, izomer 2 dimetilelaginske kiseline, tip-A procijanidin dimera izomer 1 su jedinjenja karakteristična za seme kupine. Ramnocitrin i *p*-hidroksifenilsirćetna kiselina bili su specifični za uzorke semena crne ribizle. Skoro svi detektovani derivati elaginske kiseline uključujući elagitanine, flavan-3-ol monomere i dimere i derivate galne kiseline bili su prisutni u uzorcima semena maline i doprineli su njihovoj dobroj diferencijaciji od drugih sorti. Najveći uticaj na odvajanje semena ogrozda od ostalih uzoraka su imali luteolin-*O*-heksozid izomer 3, trihidroksi-metoksiflavon izomer 2 i apigenin. Kvercetin-3-*O*-heksozid, hrizin-6,8-*C*-di-heksozid, apigenin-6-*C*-heksozid-8-*C*-pentozid, trihidroksi-dimetoksiflavon izomer 4 i B-tip procijanidin dimera izomer 1 pokazali su se kao karakteristični za seme aronije, dok su gentizinska kiselina i metil-5-kafeoilhinat izomer 1 jedinstveni za seme ogrozda.²²⁶

Galokatehin, B-tip prodelfinidin galat i B-tip procijanidin trimer su se pokazali kao karakteristični flavan 3-oli za ekstrakt semena *Rosa spinosissima*, dok su galokatehin i epigalokatehin specifični za uzorak semena tise. Miricetin-di-*O*-heksozid i diosmetin su fenolna jedinjenja karakteristična za seme kleke, dok je hesperetin-7-*O*-(6"-ramnozil)-heksozid jedinstven za seme divlje borovnice i orlovih kandži.

4.1.5.4 Kvantitativna analiza fenolnih jedinjenja u uzorcima semena gajenog i samoniklog voća

Dalja ciljana analiza fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima semena voća urađena je primenom UPLC-DAD-MS/MS tehnike. Ciljani metabolomički pristup podrazumeva određivanje koncentracije unapred izabranog ograničenog broja fenolnih jedinjenja, uz upotrebu odgovarajućih referentnih standarda. U okviru ovog rada za kvantifikaciju je korišćeno 30 standardnih supstanci navedenih u **Tabeli 7** i dobijeni rezultati su predstavljeni u **Tabeli 20**. Zahvaljujući prethodno opisanim uniformnim fenolnim profilima dobijenim za iste biljne vrste, za analizu kvantitativnog sastava su odabrani reprezentativni predstavnici gajenog voća, dok su u slučaju samoniklog voća analizirani svi uzorci zbog njihove velike raznolikosti.

Od ukupno 30 ciljanih jedinjenja, sadržaj četiri jedinjenja je bio ispod granice kvantifikacije EK (0,39 mg/kg), Apn (0,47 mg/kg), Vit (0,29 mg/kg) i Nar (0,27 mg/kg) u svim ispitivanim uzorcima, pa njihovo određivanje nije bilo moguće. Od fenolnih kiselina u ispitivanim uzorcima su bile najzastupljenije PrA, GA, *p*-HbA, CA i SinA, dok VA i SirA, čiji je najveći sadržaj u uzorcima divlje borovnice, dunjarice i ruže. Vanilinska kiselina je identifikovana u većini analiziranih uzoraka (**Tabela P1**) prema svojim spektralnim karakteristikama, ali kvantifikacija nije bila moguća u svim uzorcima zbog niskog sadržaja (< LOQ). FA je određena samo u uzorku gajene borovnice, dok je *p*-HFA karakteristična za uzorak kleke. Kvercetin i katehin su najzastupljeniji flavonidi, praćeni sa IsoQue, Rut i Kfirl.

Najveći sadržaj fenolnih jedinjenja imali su uzorci gajene maline (3GV) i aronije (10GV) i uzorci divlje borovnice (7SV), orlovih kandži (17SV) i šimširike (23SV). Rezultati su u skladu sa prethodno prikazanim rezultatima određivanja ukupnog sadržaja polifenola spektrofotometrijski (**Tabela 18 i 19**), gde su navedeni uzorci takođe pokazali visoke vrednosti TPC-a.

Dobijeni rezultati su ukazali na prednost primene metaboličkog otiska prsta u proceni autentičnosti semena voća, u poređenju sa kvantitativnom analizom unapred određenih jedinjenja.

Posmatranje celokupnog fenolnog profila kao jedinstvene karakteristike uzoraka omogućilo je taksonomsku klasifikaciju različitih biljnih vrsta, dok je glavno ograničenje kvantitativne analize bio nedostatak odgovarajućih standardnih supstanci usled velike raznovrsnost fenolnih jedinjenja i širokog opsega koncentracija u kojima mogu biti prisutna u voću.

Tabela 20. Sadržaj fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima semena gajenog (GV) i samoniklog voća (SV) izražen u mg/kg.

	3 GV	5 GV	7 GV	9 GV	10 GV	11 GV	12 GV	16 GV	20 GV	1 SV	2SV	3 SV	4SV	5 SV	6 SV	7 SV	9 SV
PrA	0,10	0,207	0,227	0,370	7,482	0,10	0,149	0,270	5,045	0,747	0,124	0,423	0,485	0,392	0,434	3,652	0,437
Esk	0,01	0,014	0,01	0,01	0,013	0,047	0,01	0,01	0,01	0,048	0,01	0,01	0,090	0,01	0,01	0,01	0,01
GA	1,118	0,121	0,353	0,423	0,203	0,086	0,076	1,297	1,047	0,186	0,261	0,108	0,460	0,803	0,937	0,244	0,250
Cat	6,744	0,07	0,901	1,375	0,393	0,07	0,07	0,504	0,065	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	1,255	0,07
p-HbA	0,870	0,783	1,389	1,331	1,885	0,14	0,14	1,577	1,189	0,330	0,261	0,310	0,348	0,171	0,242	0,785	0,419
CGA	0,02	0,02	0,02	0,02	1,602	0,02	0,02	0,02	0,610	0,548	0,542	0,02	0,02	0,02	0,02	0,564	0,02
CA	0,042	0,048	0,048	0,036	0,071	0,043	0,040	0,074	0,186	0,101	0,038	0,172	0,095	0,054	0,060	0,156	0,074
VA	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,199	0,18
SirA	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,235	0,09
Rut	0,03	0,164	0,03	0,087	1,382	0,03	0,03	0,136	0,188	0,731	0,03	0,03	0,546	0,03	0,03	1,501	0,108
Pld	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	1,034	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
CouA	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,113	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
IsoQue	0,06	0,062	0,06	0,06	1,777	0,06	0,06	0,06	1,519	0,260	0,06	0,06	0,180	0,06	0,06	1,851	0,137
SinA	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,066	0,425	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
FA	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,193	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Ast	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,114	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Apg	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Plz	0,040	0,03	0,205	0,084	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Myr	0,06	0,085	0,06	0,06	0,110	0,06	0,06	0,06	0,06	0,200	0,06	0,06	0,095	0,06	0,06	0,06	0,06
Lut	0,04	0,094	0,04	0,04	0,067	0,04	0,04	0,021	0,120	0,042	0,04	0,04	0,053	0,04	0,04	0,092	0,04
Que	0,205	0,184	0,449	0,648	8,585	0,05	0,151	5,154	0,896	0,180	0,153	0,153	0,417	0,05	0,05	8,292	0,707
Narn	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,072	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,129	0,04
Apg	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Kfrl	0,049	0,04	0,04	0,071	0,157	0,045	0,04	0,082	0,177	0,058	0,04	0,04	0,070	0,04	0,04	0,214	0,04

Tabela 20. Nastavak.

	10 SV	11 SV	12 SV	13 SV	14 SV	15 SV	16 SV	17 SV	18 SV	19 SV	20 SV	21 SV	22 SV	23 SV	24 SV	25 SV
PrA	0,504	0,644	0,176	0,410	0,192	2,379	0,577	0,602	1,264	2,488	0,115	0,107	4,791	0,161	0,110	3,557
Esk	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,051	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
GA	0,861	1,730	1,007	0,629	0,709	0,747	0,164	1,106	3,532	0,321	1,131	0,452	0,185	1,790	0,02	0,416
Cat	0,07	0,868	4,932	0,07	0,07	0,616	0,07	0,188	3,183	3,319	0,053	0,07	5,591	4,153	0,575	0,129
p-HbA	0,463	0,753	0,630	0,290	0,805	0,844	0,364	0,952	0,426	0,760	0,245	0,14	0,804	0,608	0,14	0,631
CGA	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	10,377	0,02	0,02	0,02	0,02	0,945	0,02	1,120	0,02
p-HFA	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,220	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
CA	0,039	0,056	0,059	0,042	0,152	0,220	0,089	0,233	0,112	0,089	0,055	0,055	0,103	0,075	0,039	0,162
VA	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,467	0,18	0,18	0,276	0,18	0,18	0,18	0,18	0,225	0,18	0,18
SirA	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,270	0,09	0,09	0,132	0,09	0,09	0,09	0,158	0,09	0,09	0,09
Rut	0,075	0,03	0,03	0,132	0,457	0,419	1,937	0,362	0,089	0,216	0,074	0,120	0,483	0,03	0,111	6,184
Pld	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,913	0,20	0,20	0,237	0,20	0,403	0,567	0,20	0,20	0,20	0,20
CouA	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,083
IsoQue	0,06	0,06	0,06	0,084	0,135	1,843	3,111	0,214	0,354	1,385	0,06	0,110	0,802	0,131	0,311	2,793
SinA	0,04	0,04	0,04	0,233	0,078	0,04	0,04	0,115	0,060	0,069	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,079
Ast	0,05	0,175	0,05	0,05	0,05	0,05	0,192	0,646	0,05	0,208	0,05	0,05	0,05	0,344	0,05	0,05
Apg	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	1,023	0,224	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Plz	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,071	0,03	0,03	0,053	0,03	0,03	0,03
CA	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,122	0,19	0,19	0,19	0,19
Myr	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,146	0,06	0,06	0,086	0,06	0,06	0,089	0,084	0,06	0,06
Lut	0,04	0,04	0,04	0,04	0,048	0,041	0,475	0,167	0,04	0,04	0,04	0,04	0,052	0,044	0,04	0,04
Que	0,594	0,370	0,237	0,05	0,167	0,793	0,557	3,806	0,495	1,541	0,424	0,223	7,021	0,249	0,797	0,568
Narn	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,048	0,04	0,303	0,04	0,068	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Apgn	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,028	0,386	0,050	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Kfrl	0,069	0,761	0,04	0,04	0,04	0,04	0,071	1,226	0,064	0,063	0,442	0,04	0,966	0,602	0,396	0,04

4.1.6 Elementalni sastav

Mineralni sastav i biodostupnost su važni parametri koji se koriste u proceni nutritivne vrednosti voća. Prisustvo elemenata u svim biljnim delovima, uključujući i seme, zavisi od načina na koji biljke akumuliraju, distribuiraju i metabolišu mineralne supstance.¹⁴² Ovi procesi su u velikoj meri određeni uslovima gajenja (samoniklo i gajeno voće), biljnim i geografskim poreklom, ali i đubrenjem i navodnjavanjem. U semenu voća se akumuliraju velike količine fosfora, koji podržava rast sejanica u primarnim fazama razvoja. Pored fosfora, seme biljaka sadrži značajne količine N, K, Mg, Ca, Fe, Zn, Cu i Mn.¹⁴⁰

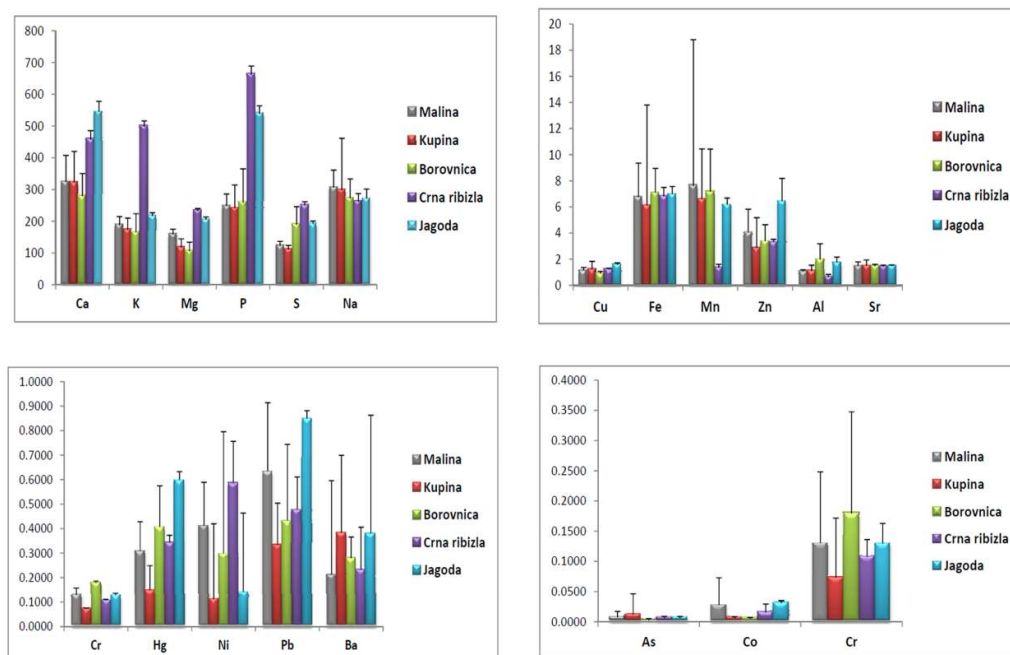
Sadržaj 20 makroelemenata i mikroelemenata određenih u semenu samoniklog i gajenog voća primenom ICP-OES (MS) tehnike, izražen je u mg/kg suve mase i prikazan u **Tabelama 21 i 22**.

Gajeno voće

Sadržaj elemenata određenih u uzorcima semena gajenog voća (malina, kupina, borovnica, crna ribizla i jagoda) predstavljen je u **Tabeli 21** i grafički pomoću štapićastih dijagrama (**Slika 28**). Vertikalni štapići označavaju 0,95 interval poverenja. Rezultati dobijeni za sadržaj elemenata u uzorcima ogrozda, aronije, godžija i peruanske jagode nisu predstavljeni na slici zbog malog broja uzoraka, ali su opisani u daljem tekstu. Među ispitivanim vrstama, uzorci crne ribizle su pokazali najviši ukupni sadržaj makroelemenata, pri čemu su K (4,98 g/kg) i P (6,61 g/kg) bili najzastupljeniji i njihov sadržaj je najmanje dvostruko viši u odnosu na druge vrste. Sadržaj K i P imao je sličan trend i u uzorcima ogrozda (3,87 i 5,40 g/kg), aronije (3,12 i 4,55 g/kg) i godžija (3,34 i 5,35 g/kg), dok je u ostalim ispitivanim vrstama gajenog voća Ca bio najzastupljeniji element (u opsegu koncentracija od 2,79 g/kg do 5,44 g/kg). Sadržaj K u plodovima gajenog voća (jagode, crne ribizle, kupine i borovnice) iz Finske bio je znatno viši u poređenju sa srednjim koncentracijama ovih elemenata u uzorcima semena jagodastog voća iz Srbije koje su se kretale u opsegu od 1,64 g/kg do 4,98 g/kg.²²⁷ Ovo se može objasniti različitim agroklimatskim uslovima gajenja, različitim tipom zemljišta, kao i različitim biljnim delovima koji su analizirani u ove dve studije. Sadržaj Ca (5,44 g/kg), Mg (2,05 g/kg) i Na (2,72 g/kg) u uzorcima jagode odgovaraju vrednostima dobijenim u prethodnoj studiji za uzorke semena jagode iz Poljske, dok je sadržaj K (2,16 g/kg) niži u odnosu na objavljene rezultate.¹⁹¹ Koncentracija Mg bila je najveća u uzorku aronije (2,68 g/kg), dok su sorte crne ribizle i ogrozda imale najveći sadržaj S (2,50 g/kg i 2,47 g/kg).

Pored većeg sadržaja makroelemenata, sorte crne ribizle su imale od 1,5 do 4 puta veći sadržaj Ni, dok je sadržaj Mn bio od 4 do 6 puta niži u poređenju sa drugim vrstama (**Slika 28**). Sadržaj Fe je bio najviši u uzorku kupine, sorta 'Triplkraun' (Triplecrown) (0,097 g/kg) i uzorku maline sorta 'Tulamin' (Tulameen) (0,091 g/kg), što ih čini pogodnim za upotrebu kod ljudi sa anemijom. Seme jagoda je imalo veći sadržaj Zn (0,064 g/kg), u odnosu na ostale vrste jagodastog voća, kao i u odnosu na rezultate dobijene u prethodnim studijama (0,043 g/kg).¹⁹¹ Seme borovnica je imalo najveći sadržaj Al (0,0197 g/kg).

Distribucija toksičnih metala, kao što su Hg, Pb i Ni bila je različita u svim vrstama jagodastog voća i kretala se u širokom opsegu koncentracija. Srednji sadržaj Hg se kretao od 0,0015 g/kg za uzorke kupine, do 0,0060 g/kg za uzorke jagode. Sadržaj Ni je bio najmanji u uzorcima kupina 0,0011 g/kg, a najveći u uzorcima crne ribizle 0,0059 g/kg. Uzorci kupina su imali najmanji sadržaj Pb (0,0034 g/kg), dok su uzorci jagoda pokazali najveći prosečan sadržaj ovog elementa (0,0085 g/kg). Sorta jagode 'Kleri' (Clery) je akumulirala najveći sadržaj Pb u semenu, verovatno zbog upotrebe mineralnih đubriva, kao što je superfosfat.²²⁸ Seme kupine je generalno sadržalo niske koncentracije teških metala, kao što su Cr, Hg, Ni i Pb.



Slika 28. Sadržaj makroelemenata i mikroelemenata u uzorcima semena gajenog voća.

Posmatrajući sve analizirane vrste gajenog jagodastog voća, izuzev specifične usvojivosti pojedinih sorti, uočava se ujednačena distribucija makroelemenata, odnosno mali varijabilitet među podacima (**Slika 28**). S druge strane, sadržaj većine mikroelemenata i elemenata u tragovima se kretao u širokom opsegu koncentracija oko centralne vrednosti, ukazujući na veliki varijabilitet među podacima.

KW test je korišćen u cilju provere postojanja statistički značajne razlike u sadržaju 20 ispitivanih elemenata, uzimajući pet biljnih vrsta gajenog voća kao jedinstveni faktor. Na osnovu dobijenih rezultata (**Tabela 21**) potvrđeno je da elementi Al, Ba, Ca, Co, Cr, Cu, K, Mg, Mn, Ni, P, S, i Zn dovode do statistički značajnih razlika između ispitivanih biljnih vrsta. Uzorci semena jagode i ribizle su se odvojili od ostalih uzoraka na osnovu sadržaja ovih elemenata.

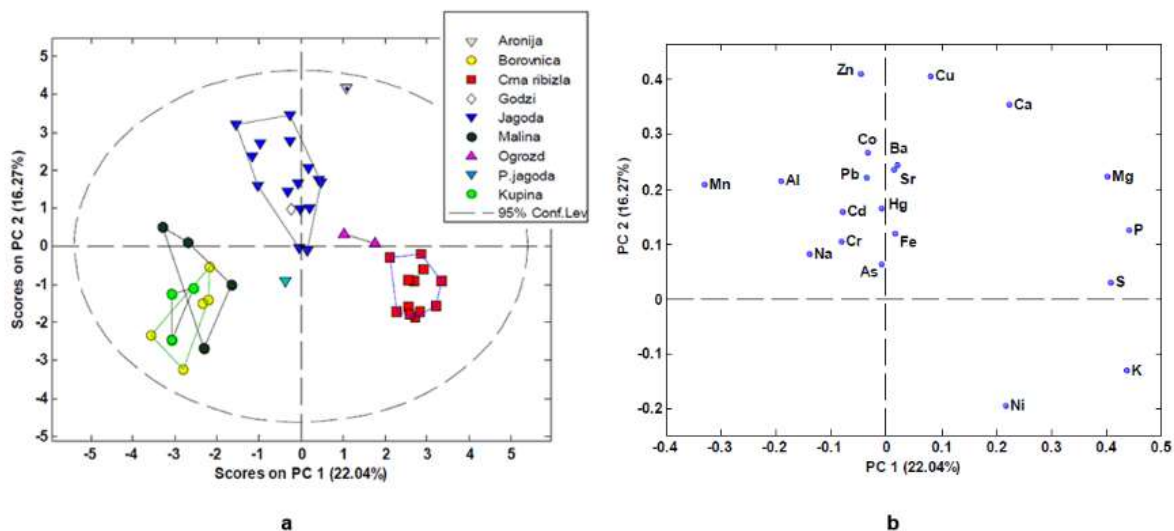
Tabela 21. Parametri deskriptivne statistike za sadržaj metala u uzorcima gajenog voća (mg/kg) i rezultati KW-testa.

		Al	As	Ba	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg
Malina (M) n = 4	sred. vred.	10,86	0,074	2,14	3232	0,252	0,275	1,30	11,40	67,5	3,10
	medijana	11,05	0,073	1,94	3012	0,240	0,180	1,01	11,93	62,3	2,75
	stdev	0,63	0,061	0,74	528	0,169	0,285	0,74	1,39	16,3	1,10
	min	9,94	0,004	1,53	2891	0,092	0,067	0,80	9,39	54,6	2,21
	max	11,38	0,145	3,13	4014	0,437	0,673	2,40	12,34	90,9	4,70
Kupina (K) n = 3	sred. vred.	11,00	0,116	3,85	3214	0,041	0,060	0,73	12,13	61,1	1,50
	medijana	11,78	0,073	2,85	3185	0,045	0,065	0,88	11,62	44,9	2,14
	stdev	1,78	0,140	1,86	397	0,012	0,010	0,40	2,49	31,0	1,24
	min	8,95	0,004	2,71	2833	0,028	0,049	0,28	9,93	41,5	0,08
	max	12,23	0,273	5,99	3625	0,051	0,066	1,04	14,83	96,8	2,29
Borovnica (B) n = 5	sred. vred.	19,70	0,025	2,80	2788	0,064	0,050	1,80	8,98	71,0	4,07
	medijana	16,16	0,018	2,88	2885	0,041	0,042	1,18	9,04	72,8	2,32
	stdev	9,74	0,025	1,29	580	0,052	0,017	1,35	1,32	14,9	4,00
	min	11,22	0,004	1,39	2180	0,030	0,034	0,86	6,98	51,1	2,19
	max	32,83	0,063	4,75	3379	0,156	0,072	4,12	10,57	92,3	11,23
Ribizla (R) n = 12	sred. vred.	6,64	0,060	2,34	4574	0,065	0,153	1,08	12,15	68,2	3,44
	medijana	5,26	0,063	2,59	4389	0,047	0,096	0,99	12,20	64,6	2,36
	stdev	2,86	0,047	0,73	445	0,054	0,224	0,45	1,43	10,6	2,66
	min	3,34	0,004	0,29	4067	0,014	0,010	0,16	9,98	54,7	0,34
	max	11,60	0,164	3,11	5466	0,205	0,857	1,69	15,07	84,6	10,54
Jagoda (J) n = 16	sred. vred.	17,53	0,063	3,82	5444	0,102	0,308	1,30	15,94	85,3	6,00
	medijana	15,22	0,052	3,56	5348	0,055	0,321	1,07	15,88	83,8	3,37
	stdev	7,38	0,043	0,92	610	0,122	0,075	0,60	2,03	23,5	5,80
	min	9,17	0,004	2,55	4244	0,018	0,191	0,59	12,61	53,4	1,96
	max	32,07	0,167	5,52	6516	0,428	0,411	2,60	19,23	141,9	21,07
Ogrozd (n = 2)		7,89	0,065	2,89	5273	0,118	0,113	1,72	13,59	70,4	1,67
Aronija (n = 1)		17,47	0,018	39,42	7067	0,399	0,108	1,22	14,82	64,0	2,82
Godzi (n = 1)		4,12	0,048	1,59	1911	1,154	0,243	1,22	15,53	76,2	3,02
P.jagoda (n = 1)		40,48	0,005	0,69	1551	0,039	0,130	0,70	13,30	81,8	1,75
KW test	P	0,0002	0,4332	0,0013	<0,0001	0,1092	<0,0001	3,6332	<0,0001	0,8342	0,0827
	Z-vrednost	R(B, J)	/	J (B, R, M)	J (K, R, B, M) R(B, M)	/	J (K, R, B) B (M)	/	J (K,R, B, M) R(B)	/	/

Tabela 21. Nastavak.

		K	Mg	Mn	Na	Ni	P	Pb	S	Sr	Zn
Malina (M) n = 4	sred. vred.	1878	1583	76,2	3062	4,14	2478	6,35	1224	15,0	40,8
	medijana	1946	1578	56,6	3059	3,61	2543	5,53	1234	15,0	38,1
	stdev	169	106	70,3	344	1,76	241	2,40	90	1,9	11,0
	min	1631	1460	19,3	2677	2,69	2143	4,50	1105	12,7	31,7
	max	1990	1716	172,5	3453	6,65	2684	9,82	1323	17,2	55,1
Kupina (K) n = 3	sred. vred.	1723	1162	66,1	2985	1,13	2410	3,36	1102	15,1	28,5
	medijana	1709	1112	67,9	3234	0,80	2298	4,00	1131	15,0	27,2
	stdev	151	114	15,4	657	0,68	295	1,27	55	1,7	9,4
	min	1579	1083	49,8	2240	0,67	2187	1,90	1039	13,4	19,9
	max	1881	1293	80,5	3482	1,91	2744	4,18	1136	16,9	38,5
Borovnica (B) n = 5	sred. vred.	1644	1051	71,8	2720	2,99	2581	4,33	1885	14,7	34,0
	medijana	1767	1125	79,8	2780	2,38	2987	4,34	2095	14,3	35,0
	stdev	479	232	26,1	494	2,50	864	0,70	460	1,1	10,0
	min	837	700	37,3	2167	0,57	1165	3,48	1186	13,3	17,8
	max	2117	1255	102,6	3355	5,86	3241	5,40	2263	15,8	45,2
Ribizla (R) n = 12	sred. vred.	4984	2327	13,5	2618	5,88	6612	4,79	2496	14,6	33,1
	medijana	4962	2324	14,3	2544	6,40	6631	4,04	2473	14,2	32,5
	stdev	282	121	4,1	399	2,08	445	2,69	190	1,6	3,2
	min	4560	2156	1,5	2098	0,61	5956	0,69	2052	12,0	29,3
	max	5466	2611	17,8	3204,4	8,24	7553	11,13	2732	16,6	38,3
Jagoda (J) n = 16	sred. vred.	2164	2051	61,8	2717	1,42	5375	8,50	1914	14,8	64,4
	medijana	2144	2025	60,1	2858	1,22	5434	5,19	1903	14,8	53,0
	stdev	188	155	9,2	537	0,58	476	8,68	162	1,5	31,6
	min	1894	1792	51,7	1418	0,68	4324	3,38	1627	11,1	30,0
	max	2570	2332	80,4	3574	2,66	6107	36,88	2180	17,2	125,2
Ogrozd (n = 2)		3865	2089	26,5	2565	1,72	5401	3,21	2470	18,3	47,0
Aronija (n = 1)		3117	2679	68,2	2569	3,64	4549	5,14	2126	24,9	62,1
Godzi (n = 1)		3338	2266	45,1	2847	2,09	5347	6,22	1999	14,0	83,8
P.jagoda (n = 1)		2782	2464	24,9	2442	0,96	5321	3,48	1933	11,5	36,9
KW test	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,4201	0,0006	<0,0001	0,2474	<0,0001	0,9564	0,0010
	Z-vrednost	R(K, B, M, J) J (B)	R (K, B, M) J (K, B)	R (K, B, M, J)	/	R (K, B, J) M (K, J)	R (K, B, M, J) J (K, B, M)	/	R (K, B, M, J) J (K)	/	J (K, B, R)

Multivarijantna analiza podataka primenjena na rezultate elementalnog sastava u uzorcima semena gajenog voća rezultirala je modelom koji se sastoji iz 7 glavnih komponenata i objašnjava 77,70% ukupnog varijabiliteta među podacima (PC1 – 22,04%, PC2 – 16,27%). Uzajamne projekcije skorova latentnih varijabli, za prve dve glavne komponente, prikazane su na **Slici 29**.



Slika 29. Analiza glavnih komponenata: a) grafik skorova latentnih varijabli za sadržaj elemenata u uzorcima semena gajenog voća, b) grafik vektora latentnih varijabli.

Sa grafika skorova prikazanog na **Slici 29a** uočava se grupisanje podataka u tri klastera. Uzorci grupisani u prva dva klastera su razdvojeni duž PC1 ose. Sorte kupine i maline (rod *Rubus*) i borovnice su formirale prvi klaster u donjem levom uglu grafikona, dok drugi klaster potiče od uzoraka ogroзда i crne ribizle (rod *Ribes*) na desnoj strani grafikona. Treća grupa uzoraka se odvojila od prve dve duž PC2 ose i obuhvata uzorke jagode, aronije, peruanske jagode i godžija.

Grafik vektora latentnih varijabli (**Slika 29b**) pokazao je da su Mg, P, S i K, varijable sa najvećim pozitivnim uticajem na razdvajanje duž PC1 ose. Visok sadržaj ovih elemenata u uzorcima semena ogroзда i crne ribizle je uticao na njihovo razdvajanje od ostalih ispitivanih uzoraka. Najveći negativan uticaj na razdvajanje duž PC1 ose imali su Mn, Al i Na. Varijable koje su potencijalno imale najveći uticaj na razdvajanje duž PC2 ose su Zn, Cu, Cd, Co, Pb, Hg i Cr, što ukazuje na njihov veći sadržaj u uzorcima jagode, aronije, peruanske jagode i godžija.

Samoniklo voće

Kako bi istakli karakteristike ovih retkih i slabo istraženih vrsta, posmatran je njihov elementalni profil (**Tabela 22**), s obzirom na to da dalja statistička obrada podataka dobijenih za sadržaj metala nije bila moguća zbog malog broja uzoraka. Najzastupljeniji element bio je Ca, sa prosečnim sadržajem od 5,49 g/kg suve mase, dok je prosečni sadržaj ovog elementa u uzorcima semena gajenog voća bio 4,41 g/kg. Iako oba načina gajenja voća ukazuju na veliki varijabilitet među podacima, sadržaj Ca u uzorcima semena samoniklog voća bio je više rasut oko centralne vrednosti i kretao se u opsegu 1,02 g/kg (divlja peruanska jagoda) do 13,96 g/kg (šumska jagoda), u poređenju sa gajenim voćem gde se sadržaj Ca kretao od 1,55 g/kg (gajena peruanska jagoda) do 7,06 g/kg u uzorku aronije. Uzorci peruanske jagode u oba načina gajenja imali su najmanji sadržaj Ca, dok je njegov sadržaj bio najviši u uzorcima divlje crvene ribizle, kleke i drena. Zajedno sa zelenim povrćem, jezgrastim i suvim voćem, seme divljeg i gajenog voća se pokazalo kao dobar izbor Ca. Fosfor je bio prisutan u sličnim koncentracijama kao i Ca, sa većim prosečnim sadržajem u uzorcima gajenog voća (4,91 g/kg) u poređenju sa samoniklim voćem (3,34 g/kg). Ove razlike su bile izraženije ako se u obzir uzmu odgovarajuće medijane (5,33 g/kg za gajeno i 2,94 g/kg za samoniklo voće). Veći sadržaj u gajenom voću može se objasniti primenom sintetičkih mineralnih đubriva koja sadrže

P. Što se tiče uzoraka samoniklog voća, najveći sadržaj P imali su divlja trešnja (6,53 g/kg), peruanska jagoda (5,64 g/kg) i ogrozd (5,20 g/kg). U poređenju sa Ca i P, koncentracije K i Na su bile manje (u opsegu 2,70 – 2,90 g/kg) i prisutni su u sličnim količinama u uzorcima gajenim na oba načina. Ovo je u skladu sa ranijim tvrdnjama, da vrsta đubriva ne utiče na skladištenje kalijuma u voću.²²⁹ Najveći sadržaj K pronađen je u uzorku divlje trešnje (5,02 g/kg). Kalijum je bio treći element po zastupljenosti u uzorcima semena voća, što je u suprotnosti sa rezultatima iz prethodne studije koja je rađena na uzorcima plodova jagodastog voća.²³⁰ Ovi autori su tvrdili da je K najzastupljeniji element u semenu, zbog svoje veće pokretljivosti u ksilemu i floemu od ostalih elemenata i da je efekat transpiracije biljaka na distribuciju K zanemarljiv. Sadržaj Na u uzorcima samoniklog voća se kretao u opsegu od 1,18 g/kg u semenu divlje jagode do 3,97 g/kg u semenu belog duda. Specifičan mineralni profil u pogledu sadržaja makroelemenata dobijen je za uzorak šumske jagode, koja sadrži izrazito veliku količinu Ca (14,0 g/kg) i manje količine K (2,47 g/kg), Mg (1,76 g/kg) i Na (1,18 g/kg).

Makroelementi Mg i S bili su prisutni u sličnim količinama, u opsegu koncentracija od 1,50 do 2,00 g/kg, sa većim sadržajem u semenu gajenog voća. Vrednosti dobijene za sadržaj Mg su u opsegu vrednosti dobijenih za uzorke jagodastog voća iz Australije i Pakistana, sa sličnim sadržajem Mg u semenu i plodu.^{231,232} Literaturni podaci ukazuju na to da koncentracija Mg u semenu biljaka ne zavisi od koncentracije drugih elemenata. Takođe, ranija istraživanja su potvrdila veći sadržaj S u uzorku crnog trna u poređenju sa drugim vrstama divljeg voća, što je slučaj i u ovoj studiji. Dostupni podaci ukazuju i na sličan sadržaj S u semenu i plodu voća, ali činjenica da je naša studija obuhvatila samo uzorke semena otežava njihovo poređenje.

Biljke mogu akumulirati dovoljne količine većine metala prisutnih u tragovima, koji su ključni za njihov normalan rast. Sadržaj mikronutritijenata u ispitivanim uzorcima opadao je prema sledećem redosledu: Fe > Zn ~ Mn > Sr > Cu. Sa izuzetkom Sr, svi navedeni elementi su bili prisutni u većoj količini u uzorcima gajenog voća.

Literaturni podaci ukazuju da je beli glog odličan izvor Fe²³³, dok je naša studija pokazala da su crni trn i borovnica najbolji izvor ovog elementa (~0,09 g/kg). Sadržaj Mn je takođe bio visok u semenu borovnice (0,189 g/kg), što je u skladu sa rezultatima dobijenim za uzorke voća iz Finske, gde je među svim ispitivanim vrstama voća plod borovnice imao najveći sadržaj Mn (0,289 g/kg).²²⁷ Samoniklo voće takođe može biti dobar izvor Cu, čiji je srednji sadržaj iznosio 0,013 g/kg, dok su uzorci crnog trna i divlje trešnje imali sadržaj preko 0,016 g/kg. Sadržaj Zn je bio najveći u uzorku burjana (0,131 g/kg), što je slično sadržaju ovog metala dobijenom u gajenom uzorku jagode sorte Albion (0,125 g/kg). Ovo je suprotno dostupnim podacima za uzorke voća iz Finske gde je uzorak maline imao najveći sadržaj ovog mikroelementa.²²⁷ Cink je antagonist drugih metala kao što su Cu, Pb i Ni i može smanjiti negativne efekte ovih toksičnih elemenata.²³⁴

Određene vrste samoniklog voća pokazale su specifičnu usvojivost minerala. Izuzetno visok sadržaj Al pronađen je u belom dudu (0,114 g/kg) i divljoj borovnici (0,059 g/kg), dok se u ostalim uzorcima kretao u opsegu od 0,0041 do 0,0320 g/kg. Seme divlje borovnice se takođe pokazalo kao bogat izvor Mn, dok je seme burjana sadržalo više Zn od svih ostalih divljih i gajenih vrsta.

Raspodela toksičnih metala, kao što su Hg, Pb, Ni i Cr se u uzorcima samoniklog voća kretala u širokom opsegu koncentracija. Sadržaj Hg se kretao u sličnom opsegu kao kod gajenog voća, od 0,0017 g/kg za uzorke kupine, do 0,0067 g/kg za uzorak sviba. Sadržaj Ni je bio najmanji u uzorcima kupina 0,00014 g/kg, a najveći u uzorku crvene ribizle 0,00536 g/kg. Uzorak crvene ribizle imao je najmanji sadržaj Pb (0,00227 g/kg), dok je uzorak borovnice pokazao najveći sadržaj ovog elementa (0,0142 g/kg). Sadržaj Cr bio je najmanji u uzorku sviba (0,00065 g/kg), a najveći u uzorku ogrozda (0,00491 g/kg). Slično gajenim uzorcima i samonikli uzorci kupine su pokazali najmanji potencijal za usvajanje toksičnih elemenata.

Tabela 22. Parametri deskriptivne statistike za sadržaj metala u uzorcima semena divljeg voća (mg/kg suvog uzorka).

Oznaka uzorka SV	Al	As	Ba	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	K	Mg	Mn	Na	Ni	P	Pb	S	Sr	Zn
1	114,13	0,125	5,31	7766	0,022	0,123	1,43	13,12	67,0	4,5	2698	2322	28,46	3966	3,21	5432	8,43	2213	26,6	44,6
2	7,79	0,004	9,96	4423	0,070	0,148	0,86	15,34	39,6	3,3	1168	816	18,18	2608	2,56	1274	6,82	835	14,0	24,3
3	8,60	0,176	7,17	7383	0,295	0,132	0,80	9,88	45,6	6,5	1934	1206	19,28	2113	0,53	2035	12,56	1008	17,5	131,5
4	31,98	0,023	3,63	6126	0,026	0,133	0,90	10,98	66,2	2,9	3327	2091	21,31	2933	2,89	5126	4,67	1960	24,4	40,7
5	4,10	0,004	6,85	6108	0,139	0,104	0,87	15,91	74,9	4,1	3577	2388	20,33	2830	0,58	4451	7,54	2636	18,6	67,0
6	24,81	0,064	13,01	6422	0,138	0,304	1,97	16,88	89,0	3,6	4228	2257	19,78	2943	1,68	4733	7,10	2435	18,4	60,7
7	42,88	0,050	13,80	3649	0,175	0,066	1,80	15,87	49,3	2,9	1269	1153	189,04	2592	2,44	2999	5,32	2660	14,4	50,3
8	74,94	0,108	8,79	3225	0,059	0,091	1,06	15,92	90,2	6,6	1797	1093	117,63	3455	3,23	2491	14,20	2418	15,4	55,7
9	5,18	0,004	19,42	9071	0,038	0,069	0,87	12,91	54,7	1,8	3791	1791	85,82	2923	5,36	4825	2,27	2250	24,8	24,5
10	8,05	0,026	2,90	3363	0,057	0,074	0,98	12,29	62,7	2,8	2507	1606	17,37	1937	1,31	3244	5,69	1486	11,8	43,5
11	11,31	0,099	2,58	4355	0,033	0,051	0,68	12,18	61,6	1,7	1906	1495	20,42	2084	0,14	2963	3,30	1191	12,8	33,2
12	12,58	0,028	7,50	4166	0,104	0,098	1,38	10,69	52,3	3,4	1610	1501	34,70	3131	1,68	2476	3,48	1185	17,4	34,7
13	5,71	0,021	9,89	6315	0,036	0,074	1,00	17,01	67,4	1,9	5015	2986	20,46	2243	0,22	6525	2,93	2165	15,1	29,8
14	9,76	0,004	10,00	6173	0,137	0,066	4,91	15,39	77,1	4,0	3673	2167	34,48	2591	1,01	5204	7,46	2512	19,1	23,2
16	8,82	0,041	2,87	9742	0,056	0,314	1,06	15,78	49,9	3,0	2477	1285	33,40	3008	1,18	2590	6,38	1527	17,2	45,1
18	15,79	0,060	2,69	5193	0,052	0,110	0,83	11,73	48,8	3,7	2566	1612	17,60	2792	2,42	2915	7,07	1657	18,5	28,8
20	5,22	0,031	2,70	3791	0,364	0,074	2,66	8,44	40,4	5,1	2074	1301	18,87	3503	0,77	2310	8,99	1373	16,6	17,6
21	4,57	0,159	3,72	9537	0,037	0,103	0,65	8,79	26,5	6,7	1153	807	6,90	2511	0,28	1440	7,19	1108	21,8	12,7
22	6,79	0,004	0,85	2495	0,020	0,127	0,76	15,18	44,6	2,5	4763	1218	24,43	2387	1,91	3389	5,11	2227	12,0	33,9
23	10,61	0,004	115,13	13961	0,221	0,211	0,68	15,91	49,6	4,2	2472	1758	62,67	1182	1,34	4449	7,16	1854	44,5	28,5
24	15,84	0,166	2,22	2782	0,022	0,070	1,07	9,18	46,6	2,0	2590	1028	14,22	3461	1,19	2191	3,28	1173	18,3	36,6
25	13,41	0,049	4,77	4821	0,039	0,060	0,90	14,19	59,2	2,3	1253	1117	19,83	3301	1,01	1450	4,41	1072	16,1	42,7
26	7,71	0,032	7,07	3009	0,504	0,076	1,42	13,58	31,6	2,4	3936	910	15,12	2424	1,84	2792	4,39	1021	12,0	24,0
27	5,62	0,004	8,95	2757	0,167	0,099	1,34	8,52	39,3	3,8	4279	1363	17,17	2388	1,06	2605	8,30	1051	11,1	20,4
28	5,84	0,004	11,71	5127	0,340	0,138	1,47	7,60	25,9	4,9	1132	537	15,56	2833	1,20	1364	10,72	814	15,9	13,0
29	5,22	0,013	1,06	1024	0,088	0,089	1,50	9,58	56,7	2,4	2338	1804	28,55	1886	2,40	5635	5,02	1530	9,5	25,6
sr.vred.	17,97	0,050	10,95	5492	0,125	0,116	1,30	12,80	54,5	3,6	2674	1524	35,44	2693	1,67	3343	6,53	1668	17,8	38,2
medijana	8,71	0,029	6,96	4974	0,065	0,098	1,03	13,02	51,1	3,3	2492	1429	20,38	2700	1,32	2939	6,60	1529	16,9	33,5
stdev	24,89	0,055	21,72	2837	0,126	0,067	0,87	3,00	16,9	1,5	1175	581	39,55	602	1,17	1494	2,89	610	6,9	23,6
min	4,10	0,004	0,85	1024	0,020	0,051	0,65	7,60	25,9	1,7	1132	537	6,90	1182	0,14	1274	2,27	814	9,5	12,7
max	114,13	0,176	115,13	13961	0,504	0,314	4,91	17,01	90,2	6,7	5015	2986	189,04	3966	5,36	6525	14,20	2660	44,5	131,5

4.2 Usporedna studija korišćenih analitičkih tehnika za profilisanje metabolita i klasifikaciju uzoraka

U prethodnoj analizi rezultata PCA je primenjena u cilju utvrđivanja kriterijuma za diferencijaciju semena jagodastog voća prema biljnom poreklu. Podaci koji se mogu pronaći u literaturi ukazuju na činjenicu da je prirodne proizvode, kao složene smeše koje sadrže veliki broj jedinjenja, teško okarakterisati posmatrajući samo jednu klasu jedinjenja, već uglavnom kombinacijom više različitih klasa. Međutim, rezultati dobijeni u okviru ove disertacije su primer uspešnog određivanja biljnog porekla semena voća samo na osnovu sadržaja jedne klase jedinjenja, bilo primarnih ili sekundarnih metabolita. Rezultati takođe ukazuju na uspešnost primene različitih analitičkih tehnika u proceni autentičnosti. Studija je obuhvatila analitičke tehnike korišćene za dobijanje lipidnog i fenolnog profila (HPTLC), profila masnih kiselina (GC-MS), profila šećera (HPAEC-PAD), profila proteina (SDS-PAGE) i metala (ICP-OES/MS).

U cilju odabira optimalne metode za hemotaksonomsku klasifikaciju semena gajenog jagodastog voća, rezultati su dalje podvrgnuti klasifikacionom modelovanju. PCA metoda dala je uvid u strukturu podataka i ukazala na postojanje nekih logičkih obrazaca u podacima koji bi se mogli objasniti, ali nije mogla da se koristi kao klasifikacioni model, već samo kao nagoveštaj šta se može očekivati od podataka. Za poređenje performansi korišćenih analitičkih tehnika analizirani su statistički parametri modela PLS regresije sa diskriminativnim pristupom. Zavisno promenljiva u PLS regresionom modelu bila je kategorička varijabla, tj. klasa ili kategorija, odnosno biljna vrsta kojoj uzorak pripada. S obzirom na ograničen broj botaničkih vrsta sa statistički zadovoljavajućim brojem uzoraka, evaluacija je vršena samo na semenu borovnice, crne ribizle, maline i jagode.

Parametri PLS-DA modela bili su statistički značajni, sa relativno visokim vrednostima R^2_{cal} i R^2_{cv} i malom razlikom između RMSEC i RMSECV, i dobrom prediktivnom sposobnošću modela, visoke vrednosti R^2_{pred} i niskom vrednošću RMSEP (**Tabela 23, Slike 30-35**). Vrednosti koeficijenta determinacije bile su u rasponu od $R^2_{cal} = 0,6428$, u slučaju semena maline na osnovu profila elemenata (ICP-OES/MS), do $R^2_{cal} = 0,9786$ za seme maline na osnovu profila masnih kiselina (GC-MS). Iako je najbolja hemotaksonomska klasifikacija postignuta na osnovu GC-MS podataka, sa prosečnim $R^2 = 0,9058$ i 0% greške u pogrešnoj klasifikaciji, nju blisko prate PLS-DA modeli zasnovani na SDS-PAGE profilu proteina (R^2 u rasponu od 0,7451 do 0,9779) i HPTLC profilu lipida (sa R^2 u rasponu od 0,7171 do 0,9582). Međutim, matematički modeli zasnovani na HPAEC profilu šećera (R^2 u rasponu od 0,4734 do 0,8801, sa aritmetičkom sredinom 0,7392), zatim HPTLC fenolnom profilu (R^2 u rasponu od 0,4137 do 0,9646, sa aritmetičkom sredinom 0,7173) i ICP-OES/MS profilu elemenata (R^2 u rasponu od 0,2682 do 0,9614, sa aritmetičkom sredinom 0,7181), bili su nešto lošiji. Pretpostavka je da to nije rezultat nedostataka navedenih tehnika, već verovatno posledica velike varijabilnosti u sadržaju šećera, fenola i metala čak i unutar svake pojedinačne vrste, što je sprečilo uspešnu diferencijaciju klasa zbog preklapanja raspona.

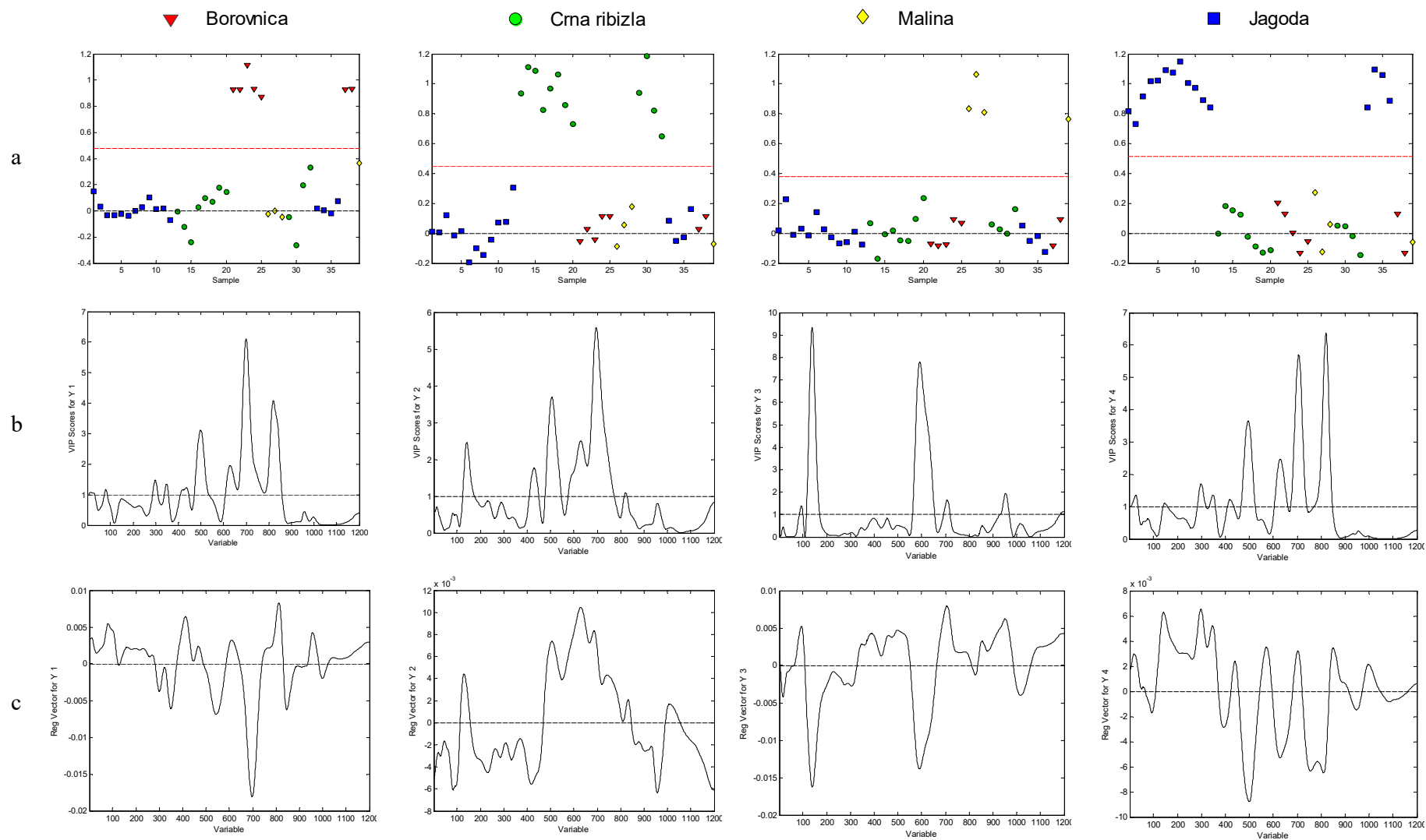
Iako je GC-MS tehnika pruža najbolje ukupne performanse PLS-DA modela, ovi modeli su najbolji za klasifikaciju semena jagode i maline (prosečne vrednosti R^2 za kalibraciju, unakrsnu validaciju i predikciju, za ove dve klase su 0,9440, i 0,9726, redom). U slučaju semena borovnice i crne ribizle SDS-PAGE proteinski profil daje modele sa najboljim statističkim parametrima (prosečne vrednosti R^2 su 0,9454 i 0,9139, redom). Ovako dobri rezultati GC-MS tehnike, u smislu obezbeđivanja najpogodnijih hromatografskih profila za PLS-DA modele, idu u prilog činjenici da je MS u sprezi sa HPLC i GC metodama odvajanja, najčešće korišćeni analitički alat za profilisanje složenih smeša metabolita. Međutim, GC-MS analiza zahteva opsežnu pripremu uzoraka i komplikovane procedure derivatizacije¹⁶⁰, iskusne i dobro obučene analitičare za rukovanje opremom i precizno podešavanje velikog broja parametara usled mogućnosti analize velikog broja različitih analita. Takođe, visoka cena reagenasa i troškova održavanja opreme mogu biti ograničavajući faktor u primeni ove metode.

Glavne prednosti HPTLC metode su jednostavnost, fleksibilnost, pouzdanost, osetljivost i pristupačnost. Sa razvojem adsorbenasa visokih performansi i sofisticirane instrumentacije za nanošenje uzoraka, razvoj hromatograma, derivatizaciju i evaluaciju značajno se povećala mogućnost primene HPTLC tehnike za analizu složenih metabolita, što je i dokazano ovom studijom. HPTLC daje dobre klasifikacione modele, te stoga može biti metoda izbora za prvu fazu analize kompleksnih uzoraka i generisanje podataka za otkrivanje biomarkera. Pored toga, glavna prednost HPTLC je mogućnost primene širokog spektra rastvarača različitog polariteta kombinovanih u multi-jednodimenzionalnom hromatografskom sistemu. S druge strane, elektroforetske tehnike kao klasične metode odvajanja su isplative, brze, pouzdane i osetljive za analizu proteinskih profila. Proteinski profil dobijen primenom SDS-PAGE elektroforeze može poslužiti kao dobar marker za procenu autentičnosti i taksonomsku klasifikaciju biljnih vrsta, što je potvrđeno ovom studijom na osnovu dobrih klasifikacionih i predikcionih parametara modela.

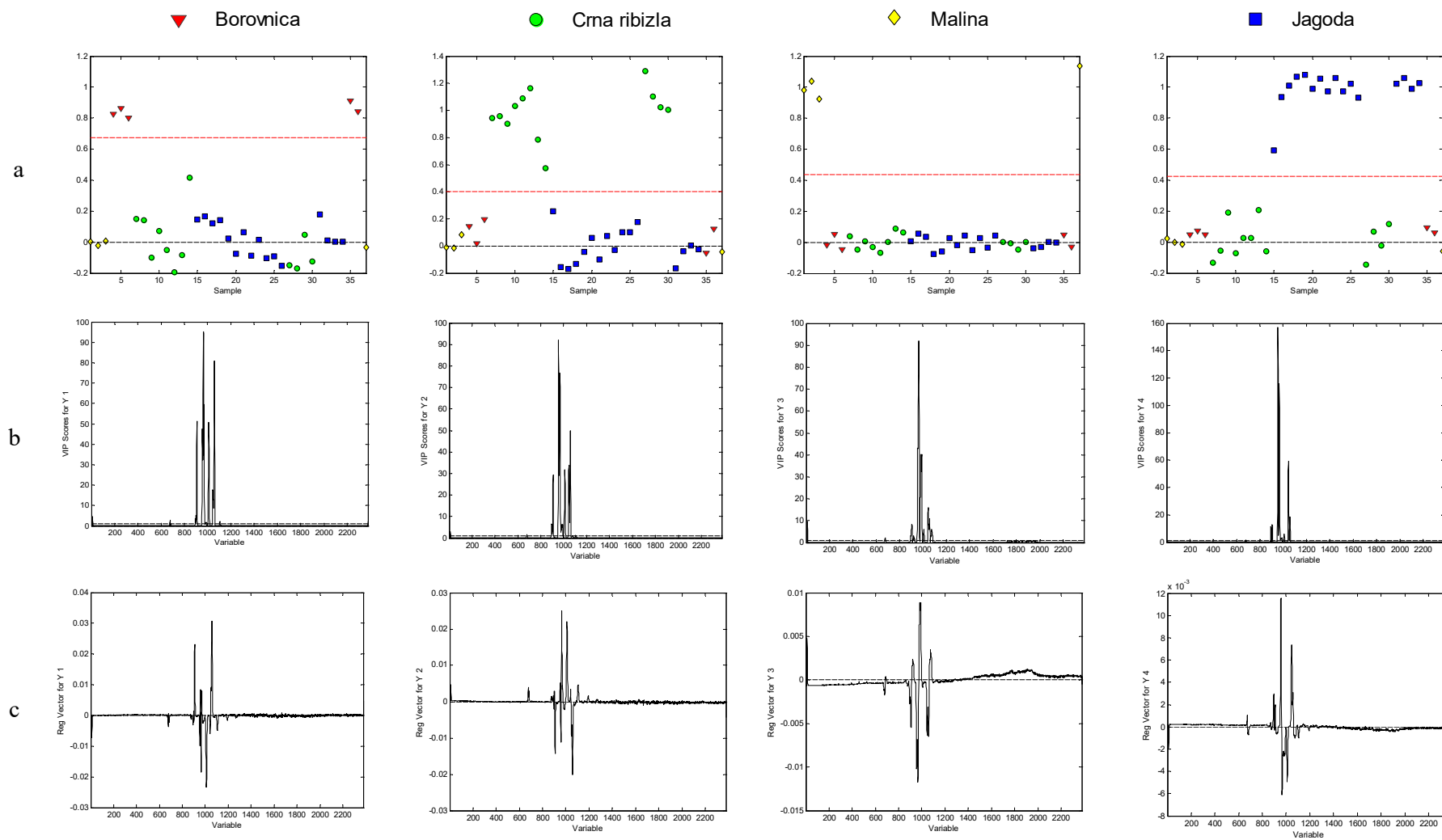
Tabela 23. Statističke performanse PLS-DA modela za klasifikaciju četiri najbrojnije grupe uzoraka gajenog jagodastog voća, na osnovu profila lipida, masnih kiselina, šećera, proteina, fenola i elemenata.

LIPIDNI PROFIL					PROFIL MASNIH KISELINA			
Botanička vrsta	Borovnica	Crna ribizla	Malina	Jagoda	Borovnica	Crna ribizla	Malina	Jagoda
R^2_{cal}	0,9434	0,9270	0,8912	0,9316	0,8061	0,9000	0,9786	0,9509
R^2_{CV}	0,8762	0,8710	0,7171	0,8489	0,7034	0,8067	0,9452	0,9021
R^2_{PRED}	0,7937	0,9052	0,8872	0,9582	0,9318	0,9717	0,9940	0,9789
RMSEC	0,0911	0,1221	0,1020	0,1294	0,0911	0,1221	0,1020	0,1294
RMSECV	0,1348	0,1664	0,1668	0,1939	0,1348	0,1664	0,1668	0,1939
RMSEP	0,1835	0,1502	0,1057	0,1020	0,1103	0,1148	0,0493	0,0738
PROFIL ŠEĆERA					PROFIL PROTEINA			
Botanička vrsta	Borovnica	Crna ribizla	Malina	Jagoda	Borovnica	Crna ribizla	Malina	Jagoda
R^2_{cal}	0,7771	0,8604	0,8774	0,8737	0,9728	0,9607	0,9763	0,9648
R^2_{CV}	0,4734	0,7861	0,4935	0,5395	0,8855	0,8550	0,8187	0,8839
R^2_{PRED}	0,8219	0,8801	0,6537	0,8332	0,9779	0,9259	0,7451	0,9260
RMSEC	0,1569	0,1826	0,1176	0,1819	0,050	0,091	0,046	0,092
RMSECV	0,2544	0,2221	0,2444	0,3654	0,108	0,177	0,133	0,170
RMSEP	0,1961	0,1834	0,1813	0,2012	0,078	0,129	0,164	0,132
FENOLNI PROFIL					ELEMENTALNI PROFIL			
Botanička vrsta	Borovnica	Crna ribizla	Malina	Jagoda	Borovnica	Crna ribizla	Malina	Jagoda
R^2_{cal}	0,9646	0,8544	0,9346	0,8353	0,8017	0,9614	0,6428	0,9343
R^2_{CV}	0,8748	0,7354	0,4287	0,4273	0,5058	0,9234	0,2682	0,8226
R^2_{PRED}	0,9377	0,6456	0,5554	0,4137	0,7882	0,7975	0,3502	0,8205
RMSEC	0,0520	0,1799	0,0707	0,2029	0,1447	0,0917	0,1942	0,1273
RMSECV	0,1014	0,2553	0,2138	0,4150	0,2286	0,1296	0,2848	0,2092
RMSEP	0,0930	0,2967	0,2912	0,5730	0,1839	0,2270	0,2573	0,2314

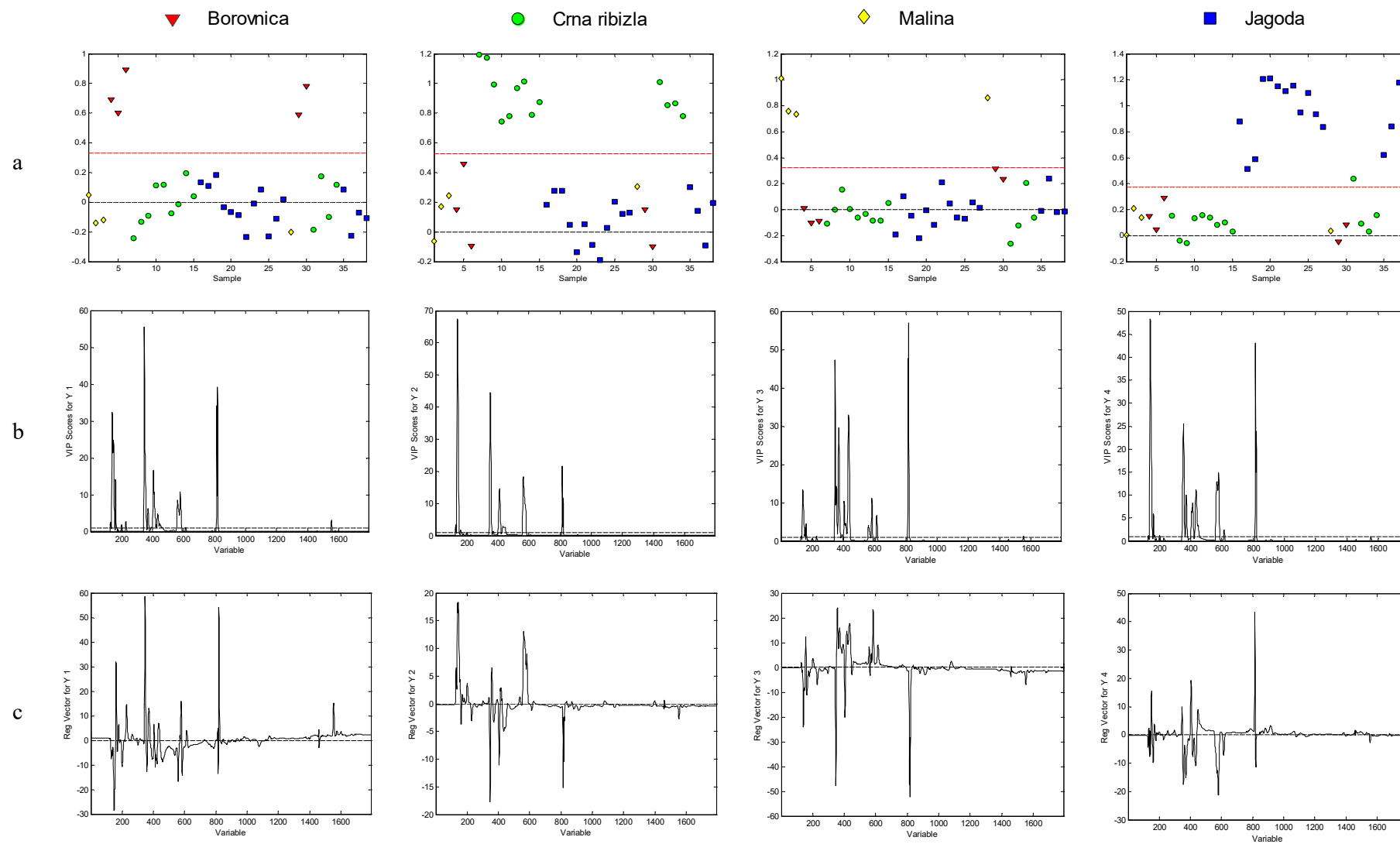
Imajući u vidu da su svi PLS-DA modeli pokazali dobre performanse za hemotaksonomsku klasifikaciju semena voća, jasno je da je pristup zasnovan na kombinovanju napredne analize podataka sa metaboličkim profilisanjem bio u stanju da prevaziđe glavne izazove povezane sa neciljanim profilisanjem metabolita.¹⁶³ Prvi nedostatak neciljane strategije, koja obuhvata složene protokole i vreme potrebno za smanjenje velikih skupova podataka generisanih iz metaboličkih profila u manji skup signala kojim se može upravljati, prevaziđen je primenom jednostavne redukcije dimenzionalnosti podataka na nekoliko latentnih varijabli (PCA, PLS-DA). Poteškoće u identifikaciji i karakterizaciji nepoznatih metabolita, kao drugi nedostatak neciljanog pristupa, rešene su korišćenjem celokupnog hromatografskog signala kao jedinstvenog hemijskog otiska ekstrakta, bez identifikacije pojedinačnih pikova. Treći nedostatak neciljane strategije je uticaj metabolita prisutnih u velikoj količini na diferencijaciju i klasifikaciju. Smanjenje dominacije signala prisutnih u velikoj količini u odnosu na one koji su manje zastupljeni, postignuto je adekvatnom prethodnom pripremom podataka pre multivarijantne analize. U slučaju ciljane analize, koja je korišćena prilikom analize elementalnog sastava semena voća, model sa zadovoljavajućim statističkim performansama dobijen je u slučaju uzoraka crne ribizle i jagode.



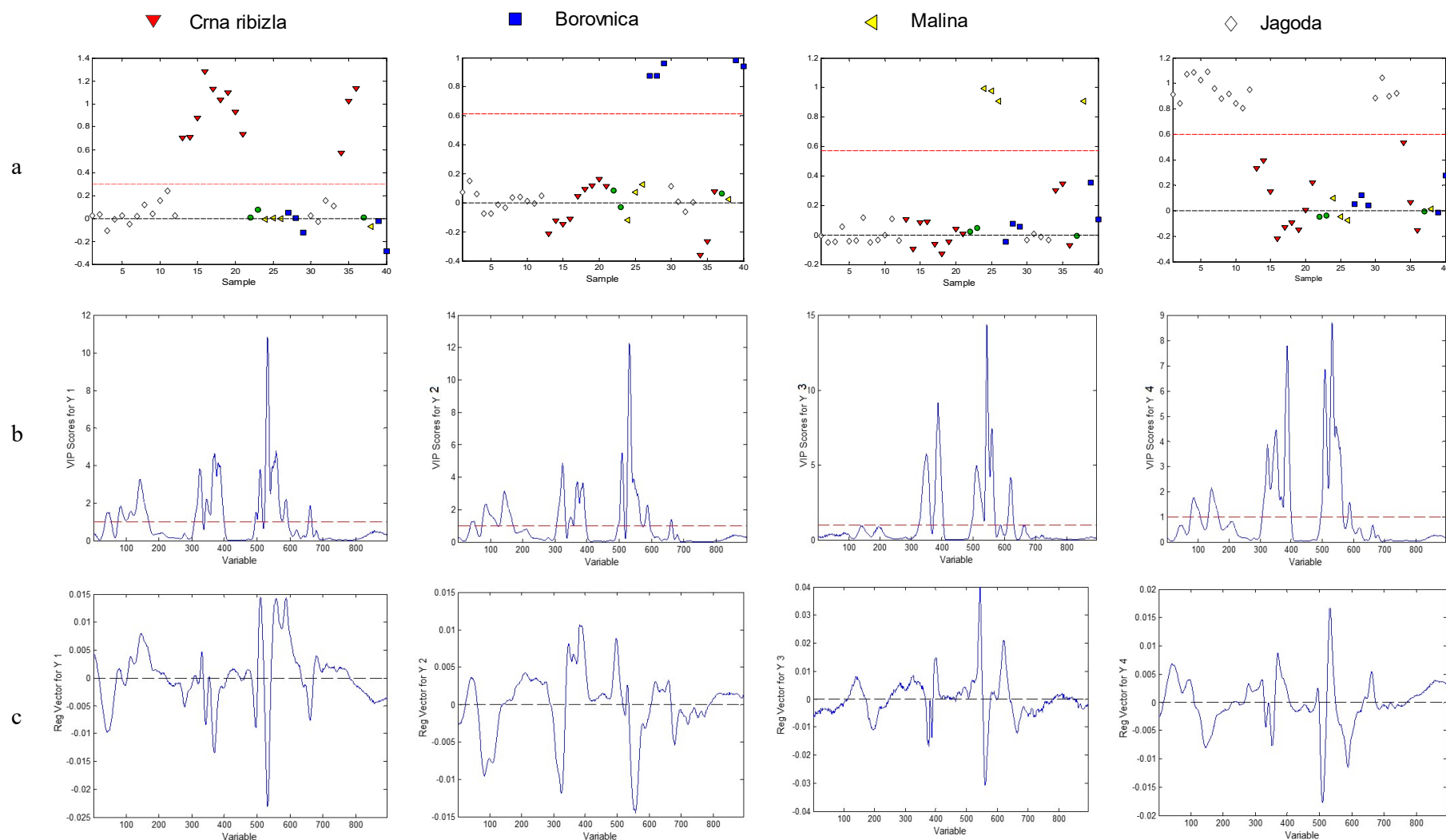
Slika 30. PLS-DA primenjen na podacima za lipidni profil gajenog voća a) grafici skorova, b) VIP skorovi c) grafici koeficijenata parametara.



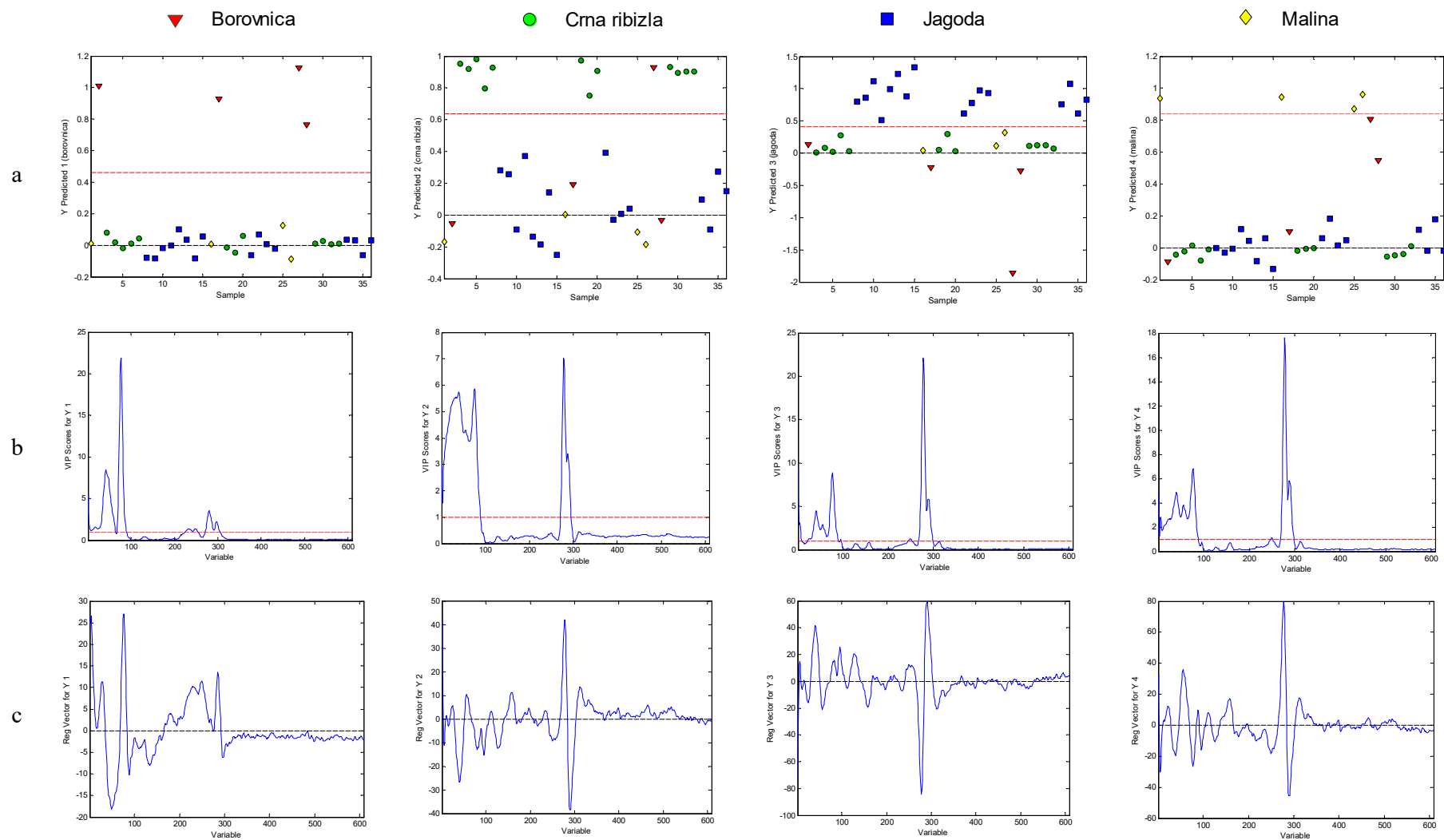
Slika 31. PLS-DA primenjen na podacima za profil masnih kiselina gajenog voća a) grafici skorova, b) VIP skorovi c) grafici koeficijena parametara.



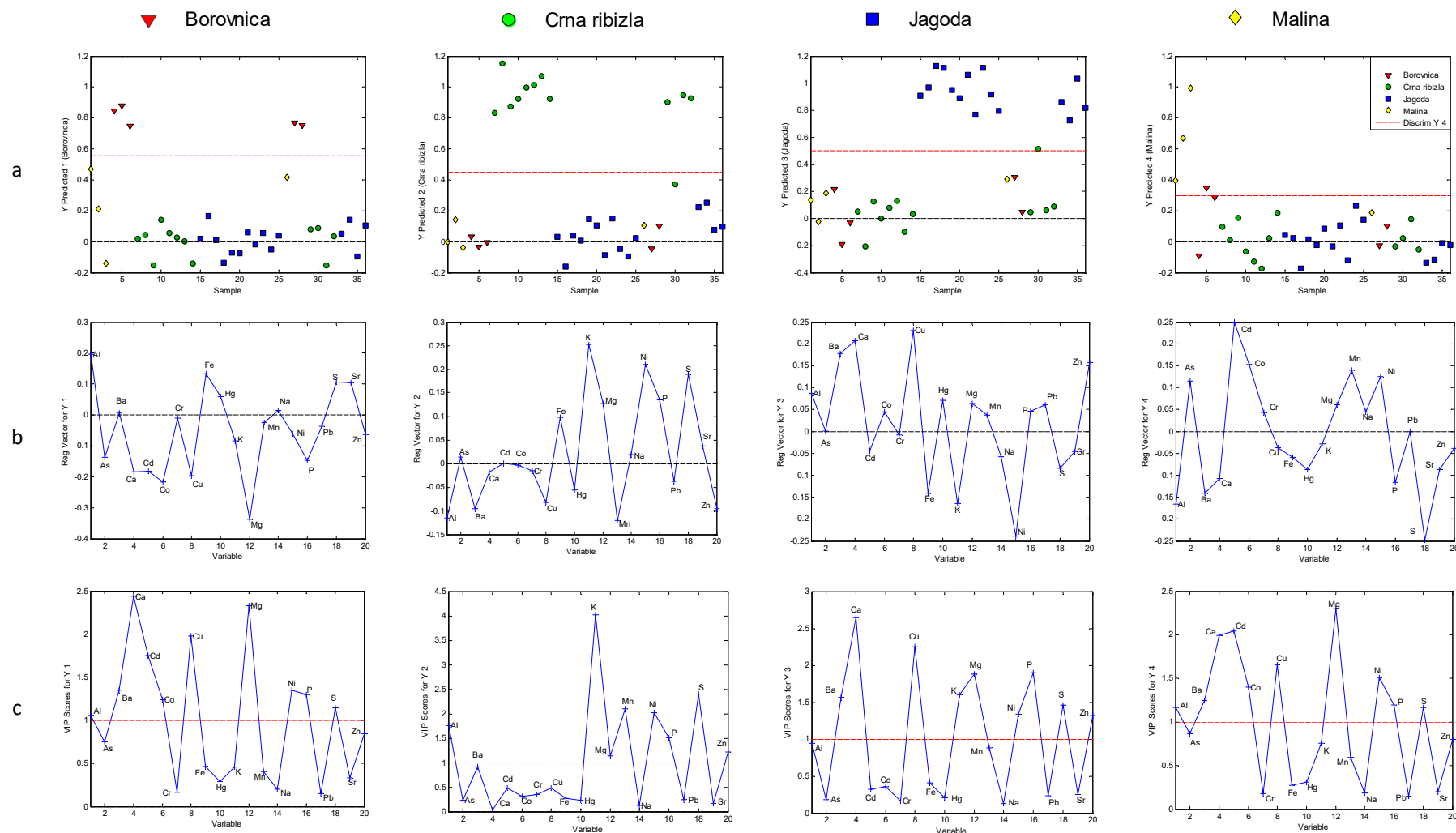
Slika 32. PLS-DA primenjen na podacima za profil šećera gajenog voća a) grafici skorova, b) VIP skorovi c) grafici koeficijena parametara.



Slika 33. PLS-DA primenjen na podacima za profil proteina gajenog voća a) grafici skorova, b) VIP skorovi c) grafici koeficijenata parametara.



Slika 34. PLS-DA primenjen na podacima za profil fenola gajenog voća a) grafici skorova, b) VIP skorovi c) grafici koeficijenata parametara.



Slika 35. PLS-DA primenjen na podacima za profil metala gajenog voća a) grafici skorova, b) VIP skorovi c) grafici koeficijena parametara.

5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije urađena je sistematska analiza statistički značajnog broja uzoraka semena gajenog (45 uzoraka) i samoniklog voća (29 uzoraka), kroz određivanje njihovog fitohemijskog sastava. Definisani su pouzdani markeri biljnog porekla i određeni su genotipovi sa najvišim sadržajem fitohemikalija. Kompletna analiza kvalitativnog i kvantitativnog hemijskog sastava ispitivanih biljnih vrsta do sada nije opisana u raspoloživoj literaturi jer je najčešće analiziran manji broj uzoraka ploda ili proizvoda dobijenih tehnološkom preradom voća, i karakterizacija je vršena ispitivanjem određene klase jedinjenja.

Autentičnost ispitivanih uzoraka u pogledu biljnog porekla potvrđena je kombinacijom setova podataka dobijenih na osnovu lipidnog profila, sastava masnih kiselina, profila šećera, proteinskog profila, fenolnog profila i elementalnog sastava, sa hemometrijskim metodama. PCA primenjena na svaku pojedinačnu klasu primarnih ili sekundarnih metabolita dala je zadovoljavajuće rezultate i pokazala da se uspešno može koristiti za diferencijaciju semena jagodastog voća na osnovu biljnog porekla. Za razliku od literaturnih podataka koji ukazuju na činjenicu da je zbog složenosti prirodne proizvode teško okarakterisati posmatrajući samo jednu klasu jedinjenja, rezultati dobijeni u okviru ove disertacije su primer uspešnog određivanja biljnog porekla semena voća samo na osnovu sadržaja jedne klase jedinjenja, bilo primarnih ili sekundarnih metabolita.

U okviru ovog rada je zbog složenog sastava ekstrakata semena samoniklog i gajenog voća, a u cilju što boljeg razdvajanja slabo, srednje i veoma polarnih lipidnih jedinjenja, urađena optimizacija uslova za razdvajanje lipida tankoslojnom hromatografijom. Izabrani multi-jednodimenzionalni sistem dao je veliki broj oštih traka, sa velikom efikasnošću razdvajanja i minimalnim pozadinskim signalom za sve biljne vrste i sve klase lipida. Lipidni profil tako velikog broja uzoraka semena samoniklog i gajenog voća i njegova upotreba u proceni autentičnosti, prema saznanjima autora do sada nisu bili predmet istraživanja. Na osnovu dobijenog lipidnog profila u ispitivanim uzorcima su identifikovane slobodne masne kiseline i trigliceroli kao glavni markeri biljnog porekla za uzorke semena borovnice i ogrozda, dok su sterolestri, digliceridi, trigliceridi i slobodne masne kiseline najuticajni parametri za razlikovanje uzoraka crne ribizle i kupine od drugih biljnih vrsta. Uočena je i uniformnost u lipidnim profilima unutar svake vrste voća nezavisno od načina uzgajanja.

Profil masnih kiselina pokazao je da je najzastupljenija masna kiselina u svim ispitivanim uzorcima semena voća bila C18:2 (n-6), praćena C18:1 (n-9) i C18:3 (n-3), dok su od zasićenih masnih kiselina najviše bile zastupljene C16:0, C18:0 i C20:0. Dobijeni rezultati su potvrdili da je ulje semena ispitivanog gajenog voća dobar izvor MUFA i PUFA sa malim vrednostima odnosa SFA i UFA i kao takvo ima visok potencijal za industrijsku upotrebu. U poređenju sa uzorcima gajenog voća, seme samoniklog voća imalo je veći prosečan sadržaj SFA, odnosno niži sadržaj MUFA i PUFA. Na osnovu sadržaja masnih kiselina C20:1, C18:3 n-6, C16:0, C16:1, SFA i S/U seme crne ribizle se razlikovalo od ostalih gajenih biljnih vrsta. Parametri C18:3 n-3, C20:0 i PUFA bili su odgovorni za diferencijaciju uzoraka jagode, dok su zasićene masne kiseline C16:0 i C18:0, kao i SFA i S/U bile karakteristične za uzorke semena ogrozda i omogućile su njegovo razlikovanje od ostalih biljnih vrsta. Sadržaj C18:1 (c+t) bio je veći u uzorcima kupine, aronije, ogrozda i borovnice u odnosu na drugo gajeno voće, dok je nizak sadržaj C18:2 (c+t) bio karakterističan za seme borovnice.

Prema dostupnim literaturnim podacima do sada nije bio određen kompletan profil šećera u semenu gajenih i samoniklih voćaka, koji bi se mogao koristiti za identifikaciju markera biljnog porekla voća i procenu njegove autentičnosti. Ograničen broj radova se bavio određivanjem sadržaja najzastupljenijih šećera u uzorcima ploda i lista voća. U okviru ovog rada dobijen je „otisak prsta” šećera ispitivanih uzoraka semena i određen je kvantitativni sadržaj 28 saharida. Najzastupljeniji šećeri u svim ispitivanim vrstama bili su Fru, Glu i Sah. Najveći sadržaj ovih šećera utvrđen je u uzorcima semena kupine. Prosečan sadržaj ispitivanih šećera bio je sličan u semenu samoniklih i

gajenih uzoraka iste sorte, što je dovelo do pretpostavke da je kiselost voća, a ne slatkoća, bila kriterijum za selekciju prilikom pripitomljavanja. Jedinstven profil šećera uzoraka jagode i crne ribizle omogućio je njihovo razlikovanje od ostalih voćnih vrsta. Potvrđeno je da je na osnovu sadržaja maltooligosaharida (Malttri, Isomalttri, Maltetr, Malpet, Malhek, Malhep) moguće razlikovati uzorke crne ribizle od maline, kupine i jagode, kao i borovnicu od maline i kupine. Na osnovu sadržaja Gal moguće je razlikovati ribizlu od ogrozda, na osnovu sadržaja Sah ribizlu od borovnice. U uzorcima ogrozda je sadržaj Raf i Ram bio veći u poređenju sa drugim vrstama, dok je sadržaj Isomal bio najmanji.

Prema saznanjima autora, profil proteina kao jedinstvena karakteristika uzoraka semena samoniklog i gajenog voća, je po prvi put korišćen u proceni autentičnosti biljnog porekla. Dobijeni rezultati za proteinski profil ispitivanih vrsta voćaka ukazali su na njihov jedinstven polipeptidni sastav, koji se može koristiti za diferencijaciju uzoraka na osnovu biljnog porekla. Identifikovani su sledeći markeri autentičnosti: polipeptidi sa molekulskim masama 26,7 kDa i 41,8 kDa su specifični za uzorke maline, 10,6 kDa, 26,0 kDa, 41,8 kDa i 62,3 kDa za uzorke ogrozda, 11,7 kDa, 18,3 kDa, 24,7 kDa, 39,7 kDa i 59,2 kDa za uzorke borovnice i kupine i polipeptidne trake sa molekulskim masama 30,2 kDa, 33,4 kDa i 51,0 kDa karakteristične za uzorke crne ribizle. Poređenjem elektroforetskih profila semena gajenog i samoniklog voća istih biljnih vrsta, kao i rezultata za ukupan srednji sadržaj rastvorljivih proteina uočava se da su gajene vrste imale veći sadržaj proteina. Ovo je ukazalo na činjenicu da na sadržaj proteina u velikoj meri utiče upotreba mineralnih sintetičkih đubriva, koja povećavaju dostupnost i apsorpciju raspoloživog azota kod gajenih sorti.

Rezultati dobijeni za fenolni profil ispitivanih uzoraka semena voća potvrdili su da su fenolna jedinjenja zbog svoje specifične uloge i velike raznolikosti dobri hemijski markeri u taksonomskoj klasifikaciji biljaka. Na osnovu fenolnog profila dobijenog HPTLC metodom bila je moguća diferencijacija uzoraka semena jagodastog voća prema biljnom poreklu. Seme gajene jagode, crne ribizle, maline, kupine, borovnice, ogrozda i peruanske jagode imalo je jedinstvene fenolne profile, dok su aronija i godži pokazali sličan fenolni profil kao i seme borovnice. Primenom UPLC–LTQ OrbiTrap MS tehnike je identifikovano ukupno 114 fenolnih jedinjenja kao markera biljnog porekla, koji su omogućili tačnije označavanje pomenutih samoniklih i gajenih vrsta voćaka. Primenom UPLC-DAD-MS/MS tehnike određen je kvantitativni sadržaj 26 fenolnih jedinjenja. Najveći sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja određen je spektrofotometrijski u semenu gajene kupine, zatim maline, jagode i aronije, dok je u slučaju samoniklog voća najbolji izvor fenolnih jedinjenja bio uzorak semena šimširike.

Slično rezultatima analize lipida, šećera i proteina, do sada nema objavljenih studija koje se bave određivanjem mineralnog sastava u tako velikom broju uzoraka semena gajenih i samoniklih jagodastih voćnih vrsta, na osnovu kojih bi se mogli definisati makroelementi i mikroelementi kao markeri biljnog porekla. Objavljeni rezultati se odnose najčešće na plod manjeg broj ispitivanih uzoraka voća. Rezultati dobijeni za mineralni sastav ispitivanih voćnih vrsta u okviru ovog istraživanja pokazali su da je seme voća dobar izvor P, K, Na, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu i Mn. Posmatrajući sve analizirane vrste gajenog jagodastog voća, uočava se ujednačena distribucija makroelemenata, dok se sadržaj većine mikroelemenata i elemenata u tragovima kretao u širokom opsegu koncentracija oko centralne vrednosti, ukazujući na veliki prirodni varijabilitet ovih parametara. U slučaju samoniklog voća određene vrste su pokazale specifičnu usvojivost. Izuzetno visok sadržaj Al pronađen je u belom dudu i borovnici. Seme divlje borovnice se takođe pokazalo kao bogat izvor Mn, dok je seme burjana sadržalo više Zn od svih ispitivanih divljih i gajenih vrsta. Elementalni profil ispitivanih uzoraka se pokazao kao dobar parametar za procenu njihove autentičnosti na osnovu biljnog porekla. Makroelementi Mg, P, S i K mogu se smatrati markerima biljnog porekla za uzorke ogrozda i crne ribizle (porodica Grossulariaceae), dok su Zn, Cu, Cd, Co, Pb, Hg i Cr glavni parametri za diferencijaciju uzoraka jagode, aronije, peruanske jagode i godžija. U cilju poređenja performansi korišćenih analitičkih tehnika (HPTLC, GC-MS, HPAEC-PAD, SDS-PAGE i ICP-OES/MS) i odabira optimalne metode za hemotaksonomsku klasifikaciju semena gajenog jagodastog voća,

analizirani su statistički parametri modela PLS regresije sa diskriminativnim pristupom. Svi PLS-DA modeli pokazali su dobre performanse za hemotaksonomsku klasifikaciju semena voća i na taj način potvrdili da se kombinovanje napredne analize podataka sa metaboličkim profilisanjem i ciljanom analizom može koristiti za predviđanje porekla novih uzoraka na osnovu fitohemijskog sastava. Takođe, rezultati su ukazali na prednost primene metaboličkog otiska prsta u proceni autentičnosti složenih metaboloma, kakvo je seme voća, u poređenju sa kvantitativnom analizom unapred definisanih jedinjenja. Posmatranje celokupnog profila uzorka, kao njegove jedinstvene karakteristike, omogućilo je taksonomsku klasifikaciju ispitivanih biljnih vrsta, dok je glavno ograničenje primenjene kvantitativne ciljane analize bio nedostatak odgovarajućih standardnih supstanci usled velike raznovrsnosti jedinjenja i širokog opsega koncentracija u kojima mogu biti prisutna u voću. Utvrđeni matematički modeli se mogu koristiti za predviđanje porekla novih uzoraka voća na osnovu njihovog fitohemijskog sastava.

Poznavanje kompletnog hemijskog sastava semena voća bi moglo da doprinese razvoju novih sorti sa željenim karakteristikama, ali i boljem iskorišćenju poljoprivredno-industrijskog otpada, njegovom primenom u hemijskoj, farmaceutskoj i industriji hrane.

6. REFERENCE

1. Republički zavod za statistiku. Dostupan na: <https://www.stat.gov.rs/sr-Latn/>.
2. Šavikin, K., Zdunić, G., Janković, T., Tasić, S., Menković, N., Stević, T., & Đorđević, B. (2009). Phenolic content and radical scavenging capacity of berries and related jams from certificated area in Serbia. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64, 212-217.
3. Filip, M., Vlassa, M., Copaciu, F., & Coman, V. (2012). Identification of anthocyanins and anthocyanidins from berry fruits by chromatographic and spectroscopic techniques to establish the juice authenticity from market. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 25(6), 534-541.
4. Soong, Y. Y., & Barlow, P. J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88(3), 411-417.
5. Nile, S. H., & Park, S. W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30(2), 134-144.
6. Manganaris, G. A., Goulas, V., Vicente, A. R., & Terry, L. A. (2014). Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(5), 825-833.
7. Van Hoed, V., De Clercq, N., Echim, C., Andjelkovic, M., Leber, E., Dewettinck, K., & Verhé, R. (2009). Berry seeds: a source of specialty oils with high content of bioactives and nutritional value. *Journal of Food Lipids*, 16(1), 33-49.
8. Isomaa K., (2013). Chemometric methods in plant metabolomics, Master's thesis, *University of Helsinki*.
9. Idle, J. R., & Gonzalez, F. J. (2007). Metabolomics. *Cell Metabolism*, 6(5), 348-351.
10. Kell, D. B. (2006). Systems biology, metabolic modelling and metabolomics in drug discovery and development. *Drug Discovery Today*, 11(23-24), 1085-1092.
11. Griffin, J. L., & Kauppinen, R. A. (2007). Tumour metabolomics in animal models of human cancer. *Journal of Proteome Research*, 6(2), 498-505.
12. Fiehn, O., Kopka, J., Dörmann, P., Altmann, T., Trethewey, R. N., & Willmitzer, L. (2000). Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology*, 18(11), 1157-1161.
13. Wolfender, J. L., Rudaz, S., Hae Choi, Y., & Kyong Kim, H. (2013). Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. *Current Medicinal Chemistry*, 20(8), 1056-1090.
14. Mohn, T., Plitzko, I., & Hamburger, M. (2009). A comprehensive metabolite profiling of *Isatis tinctoria* leaf extracts. *Phytochemistry*, 70(7), 924-934.
15. Sumner, L. W., Lei, Z., Nikolau, B. J., & Saito, K. (2015). Modern plant metabolomics: advanced natural product gene discoveries, improved technologies, and future prospects. *Natural Product Reports*, 32(2), 212-229.
16. Nakabayashi, R., & Saito, K. (2015). Integrated metabolomics for abiotic stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 24, 10-16.
17. Cagliani, L. R., Scano, P., & Consonni, R. (2017). NMR-based metabolomics: Quality and authenticity of plant-based foods. In *Modern Magnetic Resonance*, Springer, 1-20.
18. Hong, J., Yang, L., Zhang, D., & Shi, J. (2016). Plant metabolomics: an indispensable system biology tool for plant science. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 767.

19. Zhang, J., Yu, Q., Cheng, H., Ge, Y., Liu, H., Ye, X., & Chen, Y. (2018). Metabolomic approach for the authentication of berry fruit juice by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry coupled to chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(30), 8199-8208.
20. Selamat, J., Rozani, N. A. A., & Murugesu, S. (2021). Application of the metabolomics approach in food authentication. *Molecules*, 26(24), 7565.
21. D'Urso, G., Piacente, S., Pizza, C., & Montoro, P. (2018). Metabolomics of healthy berry fruits. *Current Medicinal Chemistry*, 25(37), 4888-4902.
22. Salo, H. M., Nguyen, N., Alakärppä, E., Klavins, L., Hykkerud, A. L., Karppinen, K., ... & Häggman, H. (2021). Authentication of berries and berry-based food products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(5), 5197-5225.
23. Cevallos-Cevallos, J. M., Reyes-De-Corcuera, J. I., Etzeberria, E., Danyluk, M. D., & Rodrick, G. E. (2009). Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(11-12), 557-566.
24. Lelli, V., Belardo, A., & Timperio, A. M. (2021). From targeted quantification to untargeted metabolomics. *Metabolomics—Methodology and Applications in Medical Sciences and Life Sciences*.
25. Rácz, A., Andrić, F., Bajusz, D., & Héberger, K. (2018). Binary similarity measures for fingerprint analysis of qualitative metabolomic profiles. *Metabolomics*, 14, 1-9.
26. Dos Santos, V. S., Macedo, F. A., Do Vale, J. S., Silva, D. B., & Carollo, C. A. (2017). Metabolomics as a tool for understanding the evolution of *Tabebuia sensu lato*. *Metabolomics*, 13, 1-11.
27. Krstić, G., Anđelković, B., Choi, Y. H., Vajs, V., Stević, T., Tešević, V., & Godevac, D. (2016). Metabolic changes in *Euphorbia palustris* latex after fungal infection. *Phytochemistry*, 131, 17-25.
28. Messina, A., Callahan, D. L., Walsh, N. G., Hoebee, S. E., & Green, P. T. (2014). Testing the boundaries of closely related daisy taxa using metabolomic profiling. *Taxon*, 63(2), 367-376.
29. Foito, A., & Stewart, D. (2018). Metabolomics: A high-throughput screen for biochemical and bioactivity diversity in plants and crops. *Current Pharmaceutical Design*, 24(19), 2043-2054.
30. Dunn, W. B., & Ellis, D. I. (2005). Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24(4), 285-294.
31. Dettmer, K., Aronov, P. A., & Hammock, B. D. (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 26(1), 51-78.
32. D'Amelia, L., Dell'Aversana, E., Woodrow, P., Ciarmiello, L. F., & Carillo, P. (2018). Metabolomics for crop improvement against salinity stress. *Salinity Responses and Tolerance in Plants, Volume 2: Exploring RNAi, Genome Editing and Systems Biology*, 267-287.
33. Pan, Z., Li, Y., Deng, X., & Xiao, S. (2014). Non-targeted metabolomic analysis of orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) wild type and bud mutant fruits by direct analysis in real-time and HPLC-electrospray mass spectrometry. *Metabolomics*, 10, 508-523.
34. Santucci, C., Brizzolara, S., & Tenori, L. (2015). Comparison of frozen and fresh apple pulp for NMR-based metabolomic analysis. *Food Analytical Methods*, 8, 2135-2140.
35. Farag, M. A., Mohsen, M., Heinke, R., & Wessjohann, L. A. (2014). Metabolomic fingerprints of 21 date palm fruit varieties from Egypt using UPLC/PDA/ESI-qTOF-MS and GC-MS analyzed by chemometrics. *Food Research International*, 64, 218-226.

36. Mulaudzi, N., Anokwuru, C. P., Tankeu, S. Y., Combrinck, S., Chen, W., Vermaak, I., & Viljoen, A. M. (2021). Phytochemical Profiling and Quality Control of *Terminalia sericea* Burch. ex DC. Using HPTLC Metabolomics. *Molecules*, 26(2), 432.
37. Šojić, M.D, Abramović, B., Armaković, S. and Finčur, N., 2021. Hromatografske metode analize, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Srbija.
38. Miller, J. M. (2005). *Chromatography: concepts and contrasts*. John Wiley & Sons.
39. Sherma, J. and Fried, B. eds. (2003). *Handbook of thin-layer chromatography*. CRC press.
40. Srivastava, M. (Ed.). (2010). *High-performance thin-layer chromatography (HPTLC)*. Springer Science & Business Media.
41. Audoin, C., Holderith, S., Romari, K., Thomas, O. P., & Genta-Jouve, G. (2014). Development of a work-flow for high-performance thin-layer chromatography data processing for untargeted metabolomics. *JPC–Journal of Planar Chromatography–Modern TLC*, 27, 328-332.
42. Jerkovich, A. D., Mellors, J. S., Jorgenson, J. W., & Majors, R. E. (2003). The Use of micrometer-sized particles in ultrahigh pressure liquid chromatography. *LC-GC Eur*, 16, 20-23.
43. Katam, R., Lin, C., Grant, K., Katam, C. S., & Chen, S. (2022). Advances in Plant Metabolomics and Its Applications in Stress and Single-Cell Biology. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 6985.
44. Antignac, J. P., Courant, F., Pinel, G., Bichon, E., Monteau, F., Elliott, C., & Le Bizec, B. (2011). Mass spectrometry-based metabolomics applied to the chemical safety of food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(2), 292-301.
45. Kečkeš, S., Gašić, U., Veličković, T. Ć., Milojković-Opsenica, D., Natić, M., & Tešić, Ž. (2013). The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. *Food Chemistry*, 138(1), 32-40.
46. Rohrer, J. (2012). Analysis of carbohydrates by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (hpae-pad). *Thermo Fisher Scientific, Technical Note*, 20(1), 1-12.
47. Corradini, C., Cavazza, A., & Bignardi, C. (2012). High-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed electrochemical detection as a powerful tool to evaluate carbohydrates of food interest: principles and applications. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2012.
48. Cataldi, T. R., Campa, C., & De Benedetto, G. E. (2000). Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: The potential is still growing. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 368(8), 739-758.
49. Beale, D.J., Pinu, F.R., Kouremenos, K.A., Poojary, M.M., Narayana, V.K., Boughton, B.A., Kanojia, K., Dayalan, S., Jones, O.A. and Dias, D.A., (2018). Review of recent developments in GC–MS approaches to metabolomics-based research. *Metabolomics*, 14, 1-31.
50. Gowda, G. A., & Djukovic, D. (2014). Overview of mass spectrometry-based metabolomics: opportunities and challenges. *Mass Spectrometry in Metabolomics*, 3-12.
51. Quehenberger, O., Armando, A. M., & Dennis, E. A. (2011). High sensitivity quantitative lipidomics analysis of fatty acids in biological samples by gas chromatography–mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811(11), 648-656.

52. Akhatou, I., González-Domínguez, R., & Fernández-Recamales, Á. (2016). Investigation of the effect of genotype and agronomic conditions on metabolomic profiles of selected strawberry cultivars with different sensitivity to environmental stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 101, 14-22.
53. Picó, Y. (Ed.). (2012). *Chemical analysis of food: Techniques and applications*. Academic Press.
54. Kim, D. Y., Kim, S.-H., Ahn, H. M., Lim, S. R., Oh, J., Choi, S., Lee, H.-J., Auh, J.-H., & Choi, H.-K. (2015). Differentiation of high-bush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruit cultivars by GC MS-based metabolic profiling. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 58(1), 21–28.
55. Chmiel, T., Kupska, M., Wardencki, W., & Namieśnik, J. (2017). Application of response surface methodology to optimize solid-phase microextraction procedure for chromatographic determination of aroma-active monoterpenes in berries. *Food Chemistry*, 221, 1041– 1056.
56. Manns, J. M. (2011). SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of proteins. *Current Protocols in Microbiology*, 22(1), A-3M.
57. Pesic, M., Barac, M., Vrvic, M., Ristic, N., Macej, O., & Stanojevic, S. (2011). Qualitative and quantitative analysis of bovine milk adulteration in caprine and ovine milks using native-PAGE. *Food Chemistry*, 125(4), 1443-1449.
58. Montealegre, C., Marina, M. L., & García-Ruiz, C. (2010). Separation of proteins from olive oil by CE: An approximation to the differentiation of monovarietal olive oils. *Electrophoresis*, 31(13), 2218-2225.
59. Montealegre, C., García, M. C., del Río, C., Marina, M. L., & García-Ruiz, C. (2012). Separation of olive proteins by capillary gel electrophoresis. *Talanta*, 97, 420-424.
60. Čolić, S. D., Bakić, I. V., Dabić Zagorac, D. Č., Natić, M. M., Smailagić, A. T., Pergal, M. V., Pešić, B. M., Milinčić, D.D., Rabrenović, B.B., Fotirić Akšić, M. M. (2021). Chemical Fingerprint and Kernel Quality Assessment in Different Grafting Combinations of Almond Under Stress Condition. *Scientia Horticulturae*, 275, 109705.
61. Galindo-Luján, R., Pont, L., Sanz-Nebot, V., & Benavente, F. (2021). Classification of quinoa varieties based on protein fingerprinting by capillary electrophoresis with ultraviolet absorption diode array detection and advanced chemometrics. *Food Chemistry*, 341, 128207.
62. Vergara-Barberán, M., Mompó-Roselló, Ó., Lerma-García, M. J., Herrero-Martínez, J. M., & Simó-Alfonso, E. F. (2017). Enzyme-assisted extraction of proteins from Citrus fruits and prediction of their cultivar using protein profiles obtained by capillary gel electrophoresis. *Food Control*, 72, 14-19.
63. Kvasnička, F. (2005). Capillary electrophoresis in food authenticity. *Journal of Separation Science*, 28(9-10), 813-825.
64. Wang, L., Liu, H., Liu, L., Wang, Q., Li, Q., Du, Y., & Zhang, J. (2014). Protein Contents in Different Peanut Varieties and Their Relationship to Gel Property. *International Journal of Food Properties*, 17(7), 1560-1576.
65. Slobodan M. Milosavljević, Strukturne instrumentalne metode, Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet, Beograd, 1994, 1-37.
66. Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin– Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8139-8144.

67. Bonjoch, N. P., & Tamayo, P. R. (2001). Protein content quantification by Bradford method. *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*, 283-295.
68. Hou, X., & Jones, B. T. (2000). Inductively coupled plasma/optical emission spectrometry. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 2000, 9468-9485.
69. Bulska, E., & Wagner, B. (2016). Quantitative aspects of inductively coupled plasma mass spectrometry. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374(2079), 20150369.
70. Tyler, G., & Jobin Yvon, S. (1995). ICP-OES, ICP-MS and AAS Techniques Compared. *ICP Optical Emission Spectroscopy Technical Note*, 5.
71. Ionete, R. E., Dinca, O. R., Geana, E. I., & Costinel, D. (2016). Macro-and microelements as possible markers of quality and authenticity for fruits and derived products. *Smart Energy and Sustainable Environment*, 19(1), 55.
72. Laursen, K. H., Schjoerring, J. K., Olesen, J. E., Askegaard, M., Halekoh, U., & Husted, S. (2011). Multielemental fingerprinting as a tool for authentication of organic wheat, barley, faba bean, and potato. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 59(9), 4385-4396.
73. Liu, H. L., Meng, Q., Zhao, X., Ye, Y. L., & Tong, H. R. (2021). Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP-OES)-based discrimination for the authentication of tea. *Food Control*, 123, 107735.
74. Kwon, Y. K., Bong, Y. S., Lee, K. S., & Hwang, G. S. (2014). An integrated analysis for determining the geographical origin of medicinal herbs using ICP-AES/ICP-MS and ¹H NMR analysis. *Food Chemistry*, 161, 168-175.
75. Mutavdžić, B., Nikolić-Đorić, E. (2018). Statistika, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
76. Kaur, A., & Kumar, R. (2015). Comparative analysis of parametric and non-parametric tests. *Journal of Computer and Mathematical Sciences*, 6(6), 336-342.
77. Saccenti, E., Hoefsloot, H. C., Smilde, A. K., Westerhuis, J. A., & Hendriks, M. M. (2014). Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. *Metabolomics*, 10, 361-374.
78. Percival, B., Gibson, M., Leenders, J., Wilson, P. B., & Grootveld, M. (2020). Univariate and multivariate statistical approaches to the analysis and interpretation of NMR-based metabolomics datasets of increasing complexity.
79. Guo, S., Zhong, S., & Zhang, A. (2013). Privacy-preserving kruskal-wallis test. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 112(1), 135-145.
80. Hecke, T. V. (2012). Power study of anova versus Kruskal-Wallis test. *Journal of Statistics and Management Systems*, 15(2-3), 241-247.
81. Giuliani, A. (2017). The application of principal component analysis to drug discovery and biomedical data. *Drug Discovery Today*, 22(7), 1069-1076.
82. Ringnér, M. (2008). What is principal component analysis? *Nature Biotechnology*, 26(3), 303-304.
83. Richardson, M. (2009). Principal component analysis. Faculty of Natural Sciences and Engineering, University of Ljubljana, Slovenia
84. Nyamundanda, G., Brennan, L., & Gormley, I. C. (2010). Probabilistic principal component analysis for metabolomic data. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 1-11.

85. Szymańska, E., Saccenti, E., Smilde, A. K., & Westerhuis, J. A. (2012). Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics*, 8(1), 3-16.
86. Ruiz-Perez, D., Guan, H., Madhivanan, P., Mathee, K., & Narasimhan, G. (2020). So you think you can PLS-DA? *BMC Bioinformatics*, 21(1), 1-10.
87. Krstić, Đ., Tosti, T., Đurović, S., Fotirić Akšić, M., Đorđević, B., Milojković-Opsenica, D., Andrić, F. and Trifković, J. (2022). Primary Metabolite Chromatographic Profiling as a Tool for Chemotaxonomic Classification of Seeds from Berry Fruits. *Food Technology and Biotechnology*, 60(3), 406-417.
88. Milojković-Opsenica, D., Ristivojević, P., Andrić, F., & Trifković, J. (2013). Planar chromatographic systems in pattern recognition and fingerprint analysis. *Chromatographia*, 76(19), 1239-1247.
89. Ristivojević, P., Trifković, J., Vovk, I., & Milojković-Opsenica, D. (2017). Comparative study of different approaches for multivariate image analysis in HPTLC fingerprinting of natural products such as plant resin. *Talanta*, 162, 72-79.
90. Szajdek, A., & Borowska, E. J. (2008). Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63, 147-156.
91. Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., & Sochor, J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 24673-24706.
92. Akšić, M. F., Tosti, T., Sredojević, M., Milivojević, J., Meland, M., & Natić, M. (2019). Comparison of sugar profile between leaves and fruits of blueberry and strawberry cultivars grown in organic and integrated production system. *Plants*, 8(7), 205.
93. Yang, B., & Kortessniemi, M. (2015). Clinical evidence on potential health benefits of berries. *Current Opinion in Food Science*, 2, 36-42.
94. Krstić, Đ., Vukojević, V., Mutić, J., Fotirić Akšić, M., Ličina, V., Milojković-Opsenica, D. and Trifković, J. (2019). Distribution of elements in seeds of some wild and cultivated fruits. Nutrition and authenticity aspects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(2), 546-554.
95. Thole, J. M., Kraft, T. F. B., Sueiro, L. A., Kang, Y. H., Gills, J. J., Cuendet, M., ... & Lila, M. A. (2006). A comparative evaluation of the anticancer properties of European and American elderberry fruits. *Journal of Medicinal Food*, 9(4), 498-504.
96. Mratinić, E., & Fotirić-Akšić, M. (2014). Indigenous fruit species as a significant resource for sustainable development. *Glasnik Šumarskog Fakulteta: Univerzitet u Beogradu*, 2014(suppl.), 181-193.
97. Kigel, J. (Ed.). (1995). *Seed development and germination* (Vol. 41). CRC press.
98. Bewley, J. D., Black, M., Bewley, J. D., & Black, M. (1994). Seeds: germination, structure, and composition. *Seeds: Physiology of Development and Germination*, 1-33.
99. Venskutonis, P. R. (2020). Berries. *Valorization of Fruit Processing By-products*, 95-125.
100. Lima, B. N. B., Lima, F. F., Tavares, M. I. B., Costa, A. M. M., & Pierucci, A. P. T. R. (2014). Determination of the centesimal composition and characterization of flours from fruit seeds. *Food Chemistry*, 151, 293-299.
101. Correddu, F., Maldini, M., Addis, R., Petretto, G.L., Palomba, M., Battaccone, G., Pulina, G., Nudda, A. & Pintore, G. (2019). *Myrtus communis* liquor byproduct as a source of bioactive compounds. *Foods*, 8(7), 237.

102. Majerska, J., Michalska, A., & Figiel, A. (2019). A review of new directions in managing fruit and vegetable processing by-products. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 207-219.
103. Banerjee, J., Singh, R., Vijayaraghavan, R., MacFarlane, D., Patti, A. F., & Arora, A. (2017). Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. *Food Chemistry*, 225, 10-22.
104. Klavins, L., Klavina, L., Huna, A., & Klavins, M. (2015). Polyphenols, carbohydrates and lipids in berries of *Vaccinium* species. *Environmental and Experimental Biology*, 13(4), 147-158.
105. Matthäus, B. (2012). Oil technology. In *Technological Innovations in Major World Oil Crops*; Gupta, S.K., Ed.; Springer: New York, NY, USA, Volume 2, 23–82.
106. Ramadan, M. F. (Ed.). (2019). *Fruit oils: chemistry and functionality* (p. 911). Switzerland: Springer.
107. Gustinelli, G., Eliasson, L., Svelander, C., Andlid, T., Lundin, L., Ahrné, L., & Alminger, M. (2018). Supercritical fluid extraction of berry seeds: Chemical composition and antioxidant activity. *Journal of Food Quality*, 1-10.
108. Olas, B. (2018). Berry phenolic antioxidants—implications for human health? *Frontiers in Pharmacology*, 9, 78.
109. Ali, A. S., & Elozeiri, A. A. (2017). Metabolic processes during seed germination. *Advances in Seed Biology*, 141-166.
110. Dulf, F. V., Oroian, I., Vodnar, D. C., Socaciu, C., & Pintea, A. (2013). Lipid classes and fatty acid regiodistribution in triacylglycerols of seed oils of two *Sambucus* species (*S. nigra* L. and *S. ebulus* L.). *Molecules*, 18(10), 11768-11782.
111. Li, T. S., Beveridge, T. H., & Drover, J. C. (2007). Phytosterol content of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil: Extraction and identification. *Food Chemistry*, 101(4), 1633-1639.
112. Dulf, F., Andrei, S., Bunea, A., & Socaciu, C. (2012). Fatty acid and phytosterol contents of some Romanian wild and cultivated berry pomaces. *Chemical Papers*, 66(10), 925-934.
113. Gutnikov, G. (1995). Fatty acid profiles of lipid samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 671(1-2), 71-89.
114. Popović, T.M. (2005). *Biohemija biljaka*, II izdanje, Univerzitet u Novom Sadu - Poljoprivredni fakultet.
115. Jeandet, P., Formela-Luboińska, M., Labudda, M., & Morkunas, I. (2022). The Role of Sugars in Plant Responses to Stress and Their Regulatory Function during Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 5161.
116. 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(10), C1064-C1070.
117. Akšić, M. F., Tosti, T., Nedić, N., Marković, M., Ličina, V., Milojković-Opsenica, D., & Tešić, Ž. (2015). Influence of frost damage on the sugars and sugar alcohol composition in quince (*Cydonia oblonga* Mill.) floral nectar. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37, 1-11.
118. Fidelis, M., de Moura, C., Kabbas Junior, T., Pap, N., Mattila, P., Mäkinen, S., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Tian, Y., Yang, B., & Granato, D. (2019). Fruit seeds as sources of bioactive compounds: Sustainable production of high value-added ingredients from by-products within circular economy. *Molecules*, 24(21), 3854.

119. Stanojević, M., Trifković, J., Akšić, M. F., Rakonjac, V., Nikolić, D., Šegan, S., & Milojković-Opšenica, D. (2015). Sugar profile of kernels as a marker of origin and ripening time of peach (*Prunus persicae* L.). *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(4), 433-440.
120. Mesarović, J., Trifković, J., Tosti, T., Fotirić Akšić, M., Milatović, D., Ličina, V., & Milojković-Opšenica, D. (2018). Relationship between ripening time and sugar content of apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernels. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(8), 1-10.
121. Ruan, Y. L., Jin, Y., Yang, Y. J., Li, G. J., & Boyer, J. S. (2010). Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat. *Molecular Plant*, 3(6), 942-955.
122. Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P., Bader-Mittermaier, S., & Osen, R. (2020). Food proteins from plants and fungi. *Current Opinion in Food Science*, 32, 156-162.
123. Gacek, K., Bartkowiak-Broda, I., & Batley, J. (2018). Genetic and molecular regulation of seed storage proteins (SSPs) to improve protein nutritional value of oilseed rape (*Brassica napus* L.) seeds. *Frontiers in Plant Science*, 9, 890.
124. Dowidar, A. E., Kamel, E. A., Ahmed, A. H. M., Loutfy, M. H. A., & Hafez, H. H. L. (2003). Studies on The Rosaceae II-SDS-PAGESeed Protein Electrophoresis and Its Significance in The Taxonomy of The Family. *Pakistan J. Biol. Sci*, 6(21), 1820-1829.
125. Bushman, B. S., Phillips, B., Isbell, T., Ou, B., Crane, J. M., & Knapp, S. J. (2004). Chemical composition of caneberry (*Rubus* spp.) seeds and oils and their antioxidant potential. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7982-7987.
126. McDougall, N. R., & Beames, R. M. (1994). Composition of raspberry pomace and its nutritive value for monogastric animals. *Animal Feed Science and Technology*, 45(2), 139-148.
127. Popova, V., Petkova, Z., Ivanova, T., Stoyanova, M., Panayotov, N., Mazova, N., & Stoyanova, A. (2020). Determination of the chemical composition of seeds, peels, and seedcakes from two genotypes of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 44(6), 642-650.
128. Helbig, D., Böhm, V., Wagner, A., Schubert, R., & Jahreis, G. (2008). Berry seed press residues and their valuable ingredients with special regard to black currant seed press residues. *Food Chemistry*, 111(4), 1043-1049.
129. Civello, P. M., Chaves, A. R., & Añón, C. (1996). Changes in protein composition during strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruit ripening. *Journal of Food Biochemistry*, 20(5), 135-153.
130. Laura, A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2019). Phenolic compounds. In *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Woodhead publishing, 253-271
131. Corso, M., Perreau, F., Mouille, G., & Lepiniec, L. (2020). Specialized phenolic compounds in seeds: Structures, functions, and regulations. *Plant Science*, 296, 110471.
132. Fotirić Akšić, M., Dabić Zagorac, D., Sredojević, M., Milivojević, J., Gašić, U., Meland, M., & Natić, M. (2019). Chemometric characterization of strawberries and blueberries according to their phenolic profile: Combined effect of cultivar and cultivation system. *Molecules*, 24(23), 4310.
133. Zorzi, M., Gai, F., Medana, C., Aigotti, R., Morello, S., & Peiretti, P. G. (2020). Bioactive compounds and antioxidant capacity of small berries. *Foods*, 9(5), 623.
134. Cretu, G. C., & Morlock, G. E. (2014). Analysis of anthocyanins in powdered berry extracts by planar chromatography linked with bioassay and mass spectrometry. *Food Chemistry*, 146, 104-112.

135. Singh, R. (2016). Chemotaxonomy: a tool for plant classification. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 4(2), 90-93.
136. Tešić, Ž. L., Gašić, U. M., & Milojković-Opsenica, D. M. (2018). Polyphenolic profile of the fruits grown in Serbia. In *Advances in Plant Phenolics: From Chemistry to Human Health* (pp. 47-66). American Chemical Society.
137. Gođevac, D., Tešević, V., Vajs, V., Milosavljević, S., & Stanković, M. (2011). Blackberry seed extracts and isolated polyphenolic compounds showing protective effect on human lymphocytes DNA. *Journal of Food Science*, 76(7), C1039-C1043.
138. Gođevac, D., Tešević, V., Vajs, V., Milosavljević, S., & Stanković, M. (2009). Antioxidant properties of raspberry seed extracts on micronucleus distribution in peripheral blood lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 47(11), 2853-2859.
139. Bhatla, S. C., A. Lal, M., Kathpalia, R., & Bhatla, S. C. (2018). Plant mineral nutrition. *Plant Physiology, Development and Metabolism*, 37-81.
140. Iwai, T., Takahashi, M., Oda, K., Terada, Y., & Yoshida, K. T. (2012). Dynamic changes in the distribution of minerals in relation to phytic acid accumulation during rice seed development. *Plant Physiology*, 160(4), 2007-2014.
141. Madejón, P., Cantos, M., Jiménez-Ramos, M. C., Marañón, T., & Murillo, J. M. (2015). Effects of soil contamination by trace elements on white poplar progeny: seed germination and seedling vigour. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187, 1-11.
142. Ercisli, S., & Orhan, E. (2007). Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry*, 103(4), 1380-1384.
143. Drózd, P., Šežienė, V., & Pyrzynska, K. (2018). Mineral composition of wild and cultivated blueberries. *Biological Trace Element Research*, 181(1), 173-177.
144. Wojcieszek, J., Kwiatkowski, P., & Ruzik, L. (2017). Speciation analysis and bioaccessibility evaluation of trace elements in goji berries (*Lycium Barbarum*, L.). *Journal of Chromatography A*, 1492, 70-78.
145. Pereira, C. C., da Silva, E. D. N., de Souza, A. O., Vieira, M. A., Ribeiro, A. S., & Cadore, S. (2018). Evaluation of the bioaccessibility of minerals from blackberries, raspberries, blueberries and strawberries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 73-78.
146. Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
147. ISO 12966-2:2017. Animal and vegetable fats and oils – Gas chromatography of fatty acid methyl esters – Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization (ISO); 2017.
148. Kupke, I. R., & Zeugner, S. (1978). Quantitative high-performance thin-layer chromatography of lipids in plasma and liver homogenates after direct application of 0.5-μl samples to the silica-gel layer. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 146(2), 261-271.
149. White, T., Bursten, S., Federighi, D., Lewis, R. A., & Nudelman, E. (1998). High-resolution separation and quantification of neutral lipid and phospholipid species in mammalian cells and sera by multi-one-dimensional thin-layer chromatography. *Analytical Biochemistry*, 258(1), 109-117.
150. Fling, S. P., & Gregerson, D. S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Analytical Biochemistry*, 155(1), 83-88

151. Natić, M. M., Dabić, D. Č., Papetti, A., Akšić, M. M. F., Ognjanov, V., Ljubojević, M., & Tešić, Ž. L. (2015). Analysis and characterisation of phytochemicals in mulberry (*Morus alba* L.) fruits grown in Vojvodina, North Serbia. *Food Chemistry*, 171, 128-136.
152. Šuković, D., Knežević, B., Gašić, U., Sredojević, M., Ćirić, I., Todić, S., Mutić, J., & Tešić, Ž. (2020). Phenolic profiles of leaves, grapes and wine of grapevine variety vranac (*Vitis vinifera* L.) from Montenegro. *Foods*, 9(2), 138.
153. Mertz, C., Cheynier, V., Günata, Z., & Brat, P. (2007). Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8616-24.
154. Hager, T.J., Howard, L.R., Liyanage, R., Lay, J.O., & Prior, R.L. (2008). Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 661-9.
155. Del Rio, D., Borges, G., & Crozier, A. (2010). Berry flavonoids and phenolics: Bioavailability and evidence of protective effects. *British Journal of Nutrition*, 104(S3), S67-S90.
156. Ayoub, M., de Camargo, A.C., & Shahidi, F. (2016). Antioxidants and bioactivities of free, esterified and insoluble-bound phenolics from berry seed meals. *Food Chemistry*, 197, 221-232.
157. Enomoto, H. (2021). Unique distribution of ellagitannins in ripe strawberry fruit revealed by mass spectrometry imaging. *Current Research in Food Science*, 17(4), 821-828.
158. Rai, D.K., & Tzima, K. (2021). A Review on Chromatography–Mass Spectrometry Applications on Anthocyanin and Ellagitannin Metabolites of Blackberries and Raspberries. *Foods*, 10(9), 2150.
159. Gašić, U. M., Natić, M. M., Mišić, D. M., Lušić, D. V., Milojković-Opsenica, D. M., Tešić, Ž. L., & Lušić, D. (2015). Chemical markers for the authentication of unifloral *Salvia officinalis* L. honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44, 128-138.
160. Gika, H. G., Theodoridis, G. A., Vrhovsek, U., & Mattivi, F. (2012). Quantitative profiling of polar primary metabolites using hydrophilic interaction ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1259, 121-127.
161. Lee, D. K., Yoon, M. H., Kang, Y. P., Yu, J., Park, J. H., Lee, J., & Kwon, S. W. (2013). Comparison of primary and secondary metabolites for suitability to discriminate the origins of *Schisandra chinensis* by GC/MS and LC/MS. *Food Chemistry*, 141(4), 3931-3937.
162. Longobardi, F., Ventrella, A., Bianco, A., Catucci, L., Cafagna, I., Gallo, V., Mastroianni, P., & Agostiano, A. (2013). Non-targeted ¹H NMR fingerprinting and multivariate statistical analyses for the characterisation of the geographical origin of Italian sweet cherries. *Food Chemistry*, 141(3), 3028-3033.
163. Fuchs, B., Süß, R., Teuber, K., Eibisch, M., & Schiller, J. (2011). Lipid analysis by thin-layer chromatography—a review of the current state. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2754-2774.
164. Oomah, B. D., Ladet, S., Godfrey, D. V., Liang, J., & Girard, B. (2000). Characteristics of raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil. *Food Chemistry*, 69(2), 187-193.
165. Parker, T. D., Adams, D. A., Zhou, K., Harris, M., & Yu, L. (2003). Fatty acid composition and oxidative stability of cold-pressed edible seed oils. *Journal of Food Science*, 68(4), 1240-1243.

166. Goffman, F. D., & Galletti, S. (2001). Gamma-linolenic acid and tocopherol contents in the seed oil of 47 accessions from several Ribes species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 349-354.
167. Johansson, A., & Kallio, H. (1997). Characterization of seed oils of wild, edible Finnish berries. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 204(4), 300-307.
168. Ramadan, M. F., & Mörsel, J. T. (2003). Oil goldenberry (Physalis peruviana L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 969-974.
169. Rahman, M. M., Akther, A., Moinuddin, M., Yeasmin, M.S., Rahman, M.M., Rahman, M.S., Ferdousi, S.A., & Sayeed, M. A. (2014). Investigation some physicochemical properties, lipids, glycerides and fatty acid composition of mulberry (*Morus alba* L.) seed oil of three different regions of Bangladesh. *American Journal of Applied Chemistry*, 2, 38-41
170. Sánchez-Salcedo, E. M., Sendra, E., Carbonell-Barrachina, Á. A., Martínez, J. J., & Hernández, F. (2016). Fatty acids composition of Spanish black (*Morus nigra* L.) and white (*Morus alba* L.) mulberries. *Food Chemistry*, 190, 566-571.
171. Puente, L., Vega-Gálvez, A., Fuentes, I., Stucken, K., Rodríguez, A., & Pastén, A. (2021). Effects of drying methods on the characterization of fatty acids, bioactive compounds and antioxidant capacity in a thin layer of physalis (Physalis peruviana L.) pulp. *Journal of Food Science and Technology*, 58(4), 1470-1479.
172. Li, Q., Wang, J., & Shahidi, F. (2016). Chemical characteristics of cold-pressed blackberry, black raspberry, and blueberry seed oils and the role of the minor components in their oxidative stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(26), 5410-5416.
173. Piskernik, S., Vidrih, R., Demšar, L., Koron, D., Rogelj, M., & Žontar, T. P. (2018). Fatty acid profiles of seeds from different Ribes species. *LWT*, 98, 424-427.
174. Blasi, F., Montesano, D., Simonetti, M. S., & Cossignani, L. (2017). A simple and rapid extraction method to evaluate the fatty acid composition and nutritional value of goji berry lipid. *Food Analytical Methods*, 10, 970-979.
175. Przykaza, K., Nikolaichuk, H., Kozub, A., Tomaszewska-Gras, J., Peršurić, Ž., Pavelić, S. K., & Fornal, E. (2021). Newly marketed seed oils. What we can learn from the current status of authentication of edible oils. *Food Control*, 130, 108349.
176. Pieszka, M., Migdał, W., Gąsior, R., Rudzińska, M., Bederska-Łojewska, D., Pieszka, M., & Szczurek, P. (2015). Native oils from apple, blackcurrant, raspberry, and strawberry seeds as a source of polyenoic fatty acids, tocochromanols, and phytosterols: A health implication. *Journal of Chemistry*.
177. Lyashenko, S., González-Fernández, M. J., Gomez-Mercado, F., Yunusova, S., Denisenko, O., & Guil-Guerrero, J. L. (2019). Ribes taxa: A promising source of γ -linolenic acid-rich functional oils. *Food Chemistry*, 301, 125309.
178. Tabaszewska, M., Rutkowska, J., Skoczylas, Ł., Słupski, J., Antoniewska, A., Smoleń, S., Łukasiewicz, M., Baranowski, D., Duda, I., & Pietsch, J. (2021). Red arils of *Taxus baccata* L.—A new source of valuable fatty acids and nutrients. *Molecules*, 26(3), 723.
179. Dias, M. I., Barros, L., Morales, P., Cámara, M., Alves, M. J., Oliveira, M. B. P., & Ferreira, I. C. (2016). Wild *Fragaria vesca* L. fruits: a rich source of bioactive phytochemicals. *Food & Function*, 7(11), 4523-4532.
180. Nowak, R. (2005). Fatty acids composition in fruits of wild rose species. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 74(3).

181. Jia, H., Wang, Y., Sun, M., Li, B., Han, Y., Zhao, Y., & Jia, W. (2013). Sucrose functions as a signal involved in the regulation of strawberry fruit development and ripening. *New Phytologist*, 198(2), 453-465.
182. Ramon, M., Rolland, F., & Sheen, J. (2008). Sugar sensing and signaling. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 6.
183. Wind, J., Smeeckens, S., & Hanson, J. (2010). Sucrose: metabolite and signaling molecule. *Phytochemistry*, 71(14-15), 1610-1614.
184. Hill, L. M., Morley-Smith, E. R., & Rawsthorne, S. (2003). Metabolism of sugars in the endosperm of developing seeds of oilseed rape. *Plant Physiology*, 131(1), 228-236.
185. Wang, J., Lian, P., Yu, Q., Wei, J., & Kang, W. (2017). Antithrombotic mechanism of polysaccharides in Blackberry (*Rubus* spp.) seeds. *Food & Nutrition Research*.
186. Ernst, R., & Arditti, J. (1990). Carbohydrate Physiology of Orchid Seedlings. III. Hydrolysis of Maltooligosaccharides by *Phalaenopsis* (Orchidaceae) Seedlings. *American Journal of Botany*, 77(2), 188-195.
187. Ma, B., Chen, J., Zheng, H., Fang, T., Ogutu, C., Li, S., Han, Y., & Wu, B. (2015). Comparative assessment of sugar and malic acid composition in cultivated and wild apples. *Food Chemistry*, 172, 86-91.
188. Akagić, A., Oras, A. V., Oručević Žuljević, S., Spaho, N., Drkenda, P., Bijedić, A., Memić, S., & Hudina, M. (2020). Geographic variability of sugars and organic acids in selected wild fruit species. *Foods*, 9(4), 462.
189. SonAwAne, S. K., & AryA, S. S. (2018). Plant seed proteins: chemistry, technology and applications. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 6(2), 461-469.
190. Lu, Y., Guo, S., Zhang, F., Yan, H., Qian, D. W., Shang, E. X., Wang, H. Q., & Duan, J. A. (2021). Nutritional components characterization of goji berries from different regions in China. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 195, 113859.
191. Grzelak-Błaszczak, K., Karlińska, E., Grzęda, K., Rój, E., & Kołodziejczyk, K. (2017). Defatted strawberry seeds as a source of phenolics, dietary fiber and minerals. *LWT*, 84, 18-22.
192. Chau, C. F., & Huang, Y. L. (2004). Characterization of passion fruit seed fibres—a potential fibre source. *Food Chemistry*, 85(2), 189-194.
193. Akpata, M. I., & Akubor, P. I. (1999). Chemical composition and selected functional properties of sweet orange (*Citrus sinensis*) seed flour. *Plant Foods for Human Nutrition*, 54, 353-362.
194. Andronie, L., Holonec, L., Ioana, P. O. P., Truta, A. M., Odagiu, A., SĂLĂGean, T., Sobolu, R., Coroian, A., & Balta, I. (2019). Antioxidant capacity of several Romanian forest fruits (*Rosa canina* L., *Prunus spinosa* L., *Vaccium vitis-idaea* L. and *Cornus mas* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(4), 1178-1184.
195. Forcada, C. F., Martí, À. F., & i Company, R. S. (2012). Mapping quantitative trait loci for kernel composition in almond. *BMC genetics*, 13, 1-9.
196. Konarska, A., & Domaciuk, M. (2018). Differences in the fruit structure and the location and content of bioactive substances in *Viburnum opulus* and *Viburnum lantana* fruits. *Protoplasma*, 255, 25-41.
197. Pedro, A. C., Sánchez-Mata, M. C., Pérez-Rodríguez, M. L., Cámara, M., López-Colón, J. L., Bach, F., Bellettini, M., & Haminiuk, C. W. I. (2019). Qualitative and nutritional comparison of goji berry fruits produced in organic and conventional systems. *Scientia Horticulturae*, 257, 108660.

198. Pesic, M. B., Vucelic-Radovic, B. V., Barac, M. B., & Stanojevic, S. P. (2005). The influence of genotypic variation in protein composition on emulsifying properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82(9), 667-672.
199. Žilić, S. M., Barać, M. B., Pešić, M. B., Mladenović Drinić, S. D., Ignjatović-Micić, D. D., & Srebrić, M. B. (2011). Characterization of proteins from kernel of different soybean varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(1), 60-67.
200. Marzban, G., Herndl, A., Kolarich, D., Maghuly, F., Mansfeld, A., Hemmer, W., Katinger, H., & Laimer, M. (2008). Identification of four IgE-reactive proteins in raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(12), 1497-1506.
201. Krstić, Đ., Milinčić, D. D., Kostić, A. Ž., Akšić, M. F., Stanojević, S. P., Milojković-Opsenica, D., Pešić, M.B. & Trifković, J. (2022). Comprehensive electrophoretic profiling of proteins as a powerful tool for authenticity assessment of seeds of cultivated berry fruits. *Food Chemistry*, 383, 132583.
202. Sagu, S. T., Huschek, G., Homann, T., & Rawel, H. M. (2021). Effect of sample preparation on the detection and quantification of selected nuts allergenic proteins by LC-MS/MS. *Molecules*, 26(15), 4698.
203. Jyothi, M., Pratap, M., Seenaiiah, R., & Thimma N.S. (2016). Biochemical analysis and protein profile through sds-page in leaves of four (rc-1, rc-2, g-2 and g-4) mulberry (*morus alba* l.) cultivars. *International Journal of Scientific Research*, 7(4), 103297-10300.
204. Primavesi, L., Brenna, O. V., Pompei, C., Pravettoni, V., Farioli, L., & Pastorello, E. A. (2006). Influence of cultivar and processing on cherry (*Prunus avium*) allergenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9930-9935.
205. Pavlović, A.V., Dabić, D.C., Momirović, N.M., Dojčinović, B.P., Milojković-Opsenica, D.M., Tešić, Z.L., & Natić, M.M. (2013). Chemical composition of two different extracts of berries harvested in Serbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(17), 4188-4194.
206. El-Zahar, K.M., Al-Jamaan, M.E., Al-Mutairi, F.R., Al-Hudiab, A.M., Al-Einzi, M.S. & Mohamed, A.A.Z. (2022). Antioxidant, Antibacterial, and Antifungal Activities of the Ethanolic Extract Obtained from *Berberis vulgaris* Roots and Leaves. *Molecules*, 27(18), 6114.
207. Eroğlu, A. Y., Çakır, Ö., Sağdıç, M., & Dertli, E. (2020). Bioactive characteristics of wild *berberis vulgaris* and *berberis crataegina* fruits. *Journal of Chemistry*, 2020, 1-9.
208. Koczka, N., Stefanovits-Bányai, É. & Ombódi, A. (2018). Total polyphenol content and antioxidant capacity of rosehips of some *Rosa* species. *Medicines*, 5(3), 84.
209. Parry, J., Su, L., Moore, J., Cheng, Z., Luther, M., Rao, J. N., Wang, J.Y., & Yu, L. L. (2006). Chemical compositions, antioxidant capacities, and antiproliferative activities of selected fruit seed flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3773-3778.
210. Gao, H., Guo, M., Wang, L., Sun, C., & Huang, L. (2022). Identification and Antioxidant Capacity of Free and Bound Phenolics in Six Varieties of Mulberry Seeds Using UPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *Antioxidants*, 11(9), 1764.
211. Landete, J.M. (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, 44(5), 1150-1160.
212. Häkkinen, S., Kärenlampi, S., Mykkänen, H., Heinonen, M., & Törrönen, R. (2000). Ellagic acid content in berries: Influence of domestic processing and storage. *European Food Research and Technology*, 212, 75–80.

213. Pavlović, A.V., Papetti, A., Zagorac, D.Č.D., Gašić, U.M., Mišić, D.M., Tešić, Ž.L., & Natić, M.M. (2016). Phenolics composition of leaf extracts of raspberry and blackberry cultivars grown in Serbia. *Industrial Crops and Products*, 87, 304-314.
214. Tarone, A. G., Goupy, P., Ginies, C., Junior, M. R. M., & Dufour, C. (2021). Advanced characterization of polyphenols from Myrciaria jaboticaba peel and lipid protection in in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 359, 129959.
215. Sun, J., Liu, X., Yang, T., Slovin, J., & Chen, P. (2014). Profiling polyphenols of two diploid strawberry (*Fragaria vesca*) inbred lines using UHPLC-HRMSn. *Food Chemistry*, 146, 289-298.
216. Mämmelä, P., Savolainen, H., Lindroos, L., Kangas, J., & Vartiainen, T. (2000). Analysis of oak tannins by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 891(1), 75-83.
217. Krüger, S., Urmann, O., & Morlock, G.E. (2013). Development of a planar chromatographic method for quantitation of anthocyanes in pomace, feed, juice and wine, *Journal of Chromatography A*, 1289, 105-118.
218. Plazonić, A., Bucar, F., Maleš, Ž., Mornar, A., Nigović, B., & Kujundžić, N. (2009). Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpus* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules*, 14(7), 2466-2490.
219. Samanta, A., Das, G., & Das, S.K. (2011). Roles of flavonoids in plants. *Carbon*, 100(6), 12-35.
220. Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The scientific world journal*.
221. Enomoto, H., Takahashi, S., Takeda, S., & Hatta, H. (2020). Distribution of flavan-3-ol species in ripe strawberry fruit revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging. *Molecules*, 25(1), 103.
222. Määttä-Riihinen, K.R., Kähkönen, M.P., Törrönen, A.R., & Heinonen, I.M. (2005). Catechins & procyanidins in berries of *Vaccinium* species and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8485-8491.
223. Lu, Y., & Foo, L.Y. (2003). Polyphenolic constituents of blackcurrant seed residue. *Food Chemistry*, 80(1), 71-76.
224. Koprivica, M.R., Trifković, J.Đ., Dramićanin, A.M., Gašić, U.M., Akšić, M.M.F., & Milojković-Opsenica, D.M. (2018). Determination of the phenolic profile of peach (*Prunus persica* L.) kernels using UHPLC–LTQ OrbiTrap MS/MS technique. *European Food Research and Technology*, 244(11), 2051-2064.
225. Yang, W.Z., Ye, M., Qiao, X., Wang, Q., Bo, T., & Guo, D.A. (2012). Collision-induced dissociation of 40 flavonoid aglycones and differentiation of the common flavonoid subtypes using electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry*, 18(6), 493-503.
226. Krstić, Đ. D., Ristivojević, P. M., Gašić, U. M., Lazović, M., Akšić, M. M. F., Milivojević, J., Morlock, G.E., Milojković-Opsenica, D.M., & Trifković, J. Đ. (2023). Authenticity assessment of cultivated berries via phenolic profiles of seeds. *Food Chemistry*, 402, 134184.
227. Ekholm, P., Reinivuo, H., Mattila, P., Pakkala, H., Koponen, J., Happonen, A., Hellström, J., & Ovaskainen, M. L. (2007). Changes in the mineral and trace element contents of cereals, fruits and vegetables in Finland. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(6), 487-495.

228. Shimbo, S., Zhang, Z. W., Watanabe, T., Nakatsuka, H., Matsuda-Inoguchi, N., Higashikawa, K., & Ikeda, M. (2001). Cadmium and lead contents in rice and other cereal products in Japan in 1998–2000. *Science of the Total Environment*, 281(1-3), 165-175.
229. Marzouk, H. A., & Kassem, H. A. (2011). Improving fruit quality, nutritional value and yield of Zaghloul dates by the application of organic and/or mineral fertilizers. *Scientia Horticulturae*, 127(3), 249-254.
230. dos Santos Pereira, I., Picolotto, L., Goncalves, M. A., Vignolo, G. K., & Antunes, L. E. C. (2015). Potassium fertilization affects florican mineral nutrient content, growth, and yield of blackberry grown in Brazil. *HortScience*, 50(8), 1234-1240.
231. Konczak, I., & Roulle, P. (2011). Nutritional properties of commercially grown native Australian fruits: Lipophilic antioxidants and minerals. *Food Research International*, 44(7), 2339-2344.
232. Ahmad, M., Masood, S., Sultana, S., Hadda, T. B., Bader, A., & Zafar, M. (2015). Antioxidant and nutraceutical value of wild medicinal Rubus berries. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(1), 241-247.
233. Boudraa, S., Hambaba, L., Zidani, S., & Boudraa, H. (2010). Mineral and vitamin composition of fruits of five underexploited species in Algeria: *Celtis australis* L., *Crataegus azarolus* L., *Crataegus monogyna* Jacq., *Elaeagnus angustifolia* L. and *Zizyphus lotus* L. *Fruits (Paris)*, 65(2), 75-84.
234. Dimitrijevic, M. V., Mitic, V. D., Cvetkovic, J. S., Stankov Jovanovic, V. P., Mutic, J. J., & Nikolic Mandic, S. D. (2016). Update on element content profiles in eleven wild edible mushrooms from family Boletaceae. *European Food Research and Technology*, 242, 1-10.

7. PRILOG

Tabela P1. Karakterizacija fenolnih jedinjenja identifikovanih u semenu gajenog i samoniklog voća upotrebom *UPLC-LTQ OrbiTrap MS*.

Redni broj	Identifikovana jedinjenja	t_R , min	Molekulska formula, [M-H] ⁻	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Nađena masa, [M-H] ⁻	Razlika u masi Δ ppm	MS ² Fragmenti (% osnovnog pika)	MS ³ Fragmenti (% osnovnog pika)	MS ⁴ Fragmenti (% osnovnog pika)	Jedinjenja identifikovana u semenu GV:	Jedinjenja identifikovana u semenu SV:
Derivati galne kiseline											
1	Galna kiselina	2.46	C ₇ H ₅ O ₅ ⁻	169.01425	169.01261	1.63	123(25), 125 (100), 126(7)	81 (100), 84(8), 97(6), 99(3), 107(10)	-	3, 7, 9, 20, 32, 42	7, 10, 11, 12, 14, 18, 19, 20, 22, 23, 25
2	Metil-galoil-heksozid izomer 1	4.27	C ₁₄ H ₁₇ O ₁₀ ⁻	345.08272	345.08073	1.99	124(12), 125(20), 151(14), 168(13), 169 (100), 313(52)	125 (100)	81 (100), 141(22)	3, 5, 7, 9, 10, 11, 16, 32, 42	3, 20, 21
3	Metil-galoil-heksozid izomer 2	4.59	C ₁₄ H ₁₇ O ₁₀ ⁻	345.08272	345.08051	2.21	125(18), 151(9), 169 (100), 170(10), 183(42), 313(24)	107(3), 125 (100)	81 (100), 97(18)	3, 5, 7, 9, 10, 16, 20, 32, 42	5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25
4	Metil-galat	5.38	C ₈ H ₇ O ₅ ⁻	183.02990	183.02862	1.28	124(77), 168 (100)	124 (100)	-	3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 42, 16, 20, 32, 42	1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25
5	Trigaloil-heksozid izomer 1	5.60	C ₂₇ H ₂₃ O ₁₈ ⁻	635.08899	635.08597	3.01	301(21), 331(5), 465 (100), 466(17), 552(8)	169(27), 211(6), 235(6), 295(8), 313 (100)	169 (100), 193(32), 241(32), 253(20)	3, 7, 9, 32, 42	11, 12, 20, 23
6	Trigaloil-heksozid izomer 2	5.89	C ₂₇ H ₂₃ O ₁₈ ⁻	635.08899	635.08600	2.98	301(13), 423 (100), 424(17), 465(36), 483(37), 617(31)	193(26), 211(33), 253(14), 271 (100), 405(95)	193 (100), 211(14), 253(28)	3, 7, 9	7
Drugi derivati hidroksibenzoeve kiseline											
7	Dihidroksibenzoil-diheksozid	2.66	C ₁₉ H ₂₅ O ₁₄ ⁻	477.12498	477.12283	2.15	152(42), 153 (100), 163(33), 225(37), 315(51), 459(33)	109 (100)	-	16	5, 6, 13
8	Hidroksibenzoil-diheksozid	2.95	C ₁₃ H ₁₅ O ₉ ⁻	315.07216	315.06991	2.24	108(12), 109(9), 152(42), 153 (100), 154(8), 163(10)	109 (100)	81 (100)	32, 42	1, 2, 3, 4, 6, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 23
9	Vaniloil-heksozid	3.77	C ₁₄ H ₁₇ O ₉ ⁻	329.08781	329.08553	2.28	167 (100), 168(8)	108(10), 123(69), 152 (100)	107(6), 108 (100)	32, 42	1, 7, 11, 15, 16, 18, 19, 22, 23, 25
10	Protokatehinska kiselina	4.15	C ₇ H ₅ O ₄ ⁻	153.01933	153.01836	0.97	107 (100), 108(18), 109(96), 110(6), 117(7), 125(7)	51(12), 79 (100), 81(9), 95(13), 123(6)	51 (100)	3, 5, 7, 9, 10, 16, 20	1, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 25

Tabela P1. Nastavak.

Redni broj	Identifikovana jedinjenja	t_R , min	Molekulska formula, [M-H] ⁻	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Nađena masa, [M-H] ⁻	Greška Δ ppm	MS ² Fragmenti (% osnovnog pika)	MS ³ Fragmenti (% osnovnog pika)	MS ⁴ Fragmenti (% osnovnog pika)	Jedinjenja identifikovana u semenu GV:	Jedinjenja identifikovana u semenu SV:
12	<i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina	5.14	C ₇ H ₅ O ₃ ⁻	137.02442	137.02357	0.85	93(100), 94(7), 95(5), 109(10)	-	-	3, 5, 7, 9, 10, 16, 20, 32, 42	1-23, 25
13	Vanilinska kiselina	5.61	C ₈ H ₇ O ₄ ⁻	167.03498	167.03382	1.16	108(15), 123(85), 124(7), 152(100), 153(8)	108(100)	80(100)	5, 20, 32, 42	1-9, 11-16, 18-23, 25
14	Metoksi-benzojeva kiselina izomer 1	6.76	C ₈ H ₇ O ₃ ⁻	151.04007	151.03912	0.95	136(100), 137(4)	92(100), 108(63), 109(12)	-	3, 7, 9, 11, 12, 16, 20, 32, 42	1-7, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 25
15	Metoksi-benzojeva kiselina izomer 2	8.05	C ₈ H ₇ O ₃ ⁻	151.04007	151.03911	0.96	136(100), 137(6)	92(100)	-	3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 16, 20, 32, 42	1-25
Derivati elaginske kiseline uključujući elagitanine											
16	Elagitanin derivat 1	2.72	C ₃₅ H ₂₇ O ₂₃ ⁻	815.09486	815.09113	3.73	301(100), 302(13), 333(19), 479(6), 481(25), 795(7)	185(33), 229(60), 230(17), 257(100), 284(39)	185(100), 202(7), 213(12), 229(91)	3, 7, 9	11,12
17	Elagitanin derivat 2	3.93	C ₃₄ H ₂₃ O ₂₂ ⁻	783.06865	783.06457	4.07	275(19), 301(100), 302(15), 481(32), 763(11)	185(31), 229(50), 257(100), 258(9), 284(20)	185(100), 201(19), 213(16), 229(91)	32, 42	19
18	Elagitanin derivat 3	4.41	C ₂₇ H ₁₉ O ₁₈ ⁻	631.05769	631.05479	2.90	301(8), 425(5), 449(7), 451(100), 452(21), 453(3)	379(11), 395(16), 407(10), 423(19), 433(100)	361(25), 377(41), 389(23), 405(100)	3, 7, 9, 32, 42	10, 11, 12, 20
19	Elagitanin derivat 4	4.55	C ₄₁ H ₂₅ O ₂₆ ⁻	933.06395	933.05948	4.47	451(100), 452(20), 631(49), 632(12), 913(9), 914(4)	395(15), 407(10), 423(23), 433(100), 434(19)	361(27), 377(41), 389(25), 405(100)	3, 7, 9	10, 11, 12,
20	Elagitanin derivat 5	4.60	C ₂₇ H ₂₁ O ₁₈ ⁻	633.07334	633.06961	3.73	275(5), 301(100), 302(13)	185(32), 229(63), 257(100), 258(15), 284(33)	185(72), 201(10), 213(20), 229(100)	3, 7, 9, 32, 42	10, 11, 12, 18, 19, 20, 23
21	Elagitanin derivat 6	4.84	C ₃₄ H ₂₃ O ₂₂ ⁻	783.06865	783.06444	4.21	275(17), 301(100), 302(15), 481(22)	185(31), 229(64), 257(100), 258(13), 284(25)	185(76), 213(15), 229(100)	3, 7, 9	10, 11, 12, 21
22	Elagitanin derivat 7	5.17	C ₃₅ H ₂₉ O ₁₉ ⁻	753.13085	753.12863	2.23	301(100), 302(14), 331(10), 463(5)	185(35), 229(63), 257(100), 258(11), 284(32)	185(100), 213(31), 227(9), 229(100)	3, 7, 9	10, 11, 12

Tabela P1. Nastavak

Redni broj	Identifikovana jedinjenja	t_R , min	Molekulska formula, [M-H] ⁻	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Nađena masa, [M-H] ⁻	Greška Δ ppm	MS ² Fragmenti (% osnovnog pika)	MS ³ Fragmenti (% osnovnog pika)	MS ⁴ Fragmenti (% osnovnog pika)	Jedinjenja identifikovana u semenu GV:	Jedinjenja identifikovana u semenu SV:
23	Elagitanin derivat 8	5.23	C ₄₁ H ₂₅ O ₂₆ ⁻	933.06395	933.05923	4.72	299(15), 301(11), 315(14), 613(30), 631 (100), 632(24)	301(29), 315(53), 469(43), 587(26), 613 (100)	301(14), 443(48), 445 (100), 461(78)	3, 7, 9, 32, 42	10, 11, 12, 20, 23
24	Elagitanin derivat 9	5.25	C ₂₇ H ₂₁ O ₁₈ ⁻	633.07334	633.07036	2.97	301 (100), 302(12), 463(5), 613(7)	185(36), 229(61), 257 (100), 258(16), 284(29)	185 (100), 201(14), 213(18), 229(96)	3, 7, 9, 32, 42	11, 18, 19, 20, 21, 23
25	Elagitanin derivat 10	5.34	C ₃₅ H ₂₇ O ₂₃ ⁻	815.09486	815.09039	4.47	613(12), 631(8), 633 (100), 634(27)	275(5), 301 (100), 302(11)	185(39), 201(14), 229(80), 257 (100)	7, 9, 32, 42	10, 20, 23
26	Elagitanin derivat 11	5.42	C ₂₇ H ₁₉ O ₁₈ ⁻	631.05769	631.05453	3.15	301(14), 451(20), 481(17), 613(41), 631 (100), 632(22)	301(12), 315(9), 469(11), 587(22), 613 (100)	301(18), 443(46), 445 (100), 461(76)	7, 9	10, 11, 12, 23
27	Elagoil-heksozid izomer 1	5.53	C ₂₀ H ₁₅ O ₁₃ ⁻	463.05181	463.04917	2.64	300(29), 301 (100), 302(12)	185(35), 229(66), 257 (100), 258(12), 284(26)	185 (100), 201(15), 213(18), 229(100)	3, 7, 9, 32, 42	10, 11, 12, 18, 19, 20, 21, 23, 24
28	Elagoil-heksozid izomer 2	5.81	C ₂₀ H ₁₅ O ₁₃ ⁻	463.05181	463.04991	1.90	300(39), 301 (100), 302(15)	185(28), 229(63), 257 (100), 258(11), 284(29)	185(77), 201(9), 213(24), 229 (100)	3, 7, 9	10, 11, 12, 20
29	Elagitanin derivat 12	5.82	C ₃₄ H ₂₅ O ₂₂ ⁻	785.08430	785.08094	3.36	300(11), 301 (100), 302(17), 615(10), 633(31), 634(7)	185(25), 229(50), 257 (100), 258(15), 284(19)	185(96), 201(37), 213(19), 229 (100)	3, 7, 9	11, 12
30	Elagitanin derivat 13	5.83	C ₃₅ H ₂₇ O ₂₃ ⁻	815.09486	815.09124	3.62	315(13), 483 (100), 484(18), 613(14), 633(25)	301(23), 315 (100), 316(20), 317(5)	287 (100), 299(5)	3, 7, 9, 32, 42	10, 11, 12, 20, 23
31	Elagoil-pentozid	6.06	C ₁₉ H ₁₃ O ₁₂ ⁻	433.04125	433.03879	2.46	300(67), 301 (100), 302(10)	185(35), 229(73), 257 (100), 258(13), 284(31)	185(94), 201(13), 213(20), 229 (100)	3, 7, 9, 20, 32, 42	10, 11, 12, 15, 18, 19, 20, 23
32	Elagitanin derivat 14	6.10	C ₄₁ H ₂₇ O ₂₆ ⁻	935.07960	935.07563	3.97	301(52), 302(7), 633 (100), 634(23), 915(5)	275(3), 301 (100), 302(4), 463(6), 481(3)	185(39), 229(68), 257 (100), 284(30)	3, 7, 9, 32, 42	11, 12, 18, 19, 20, 23
33	Elagoil-ramnozid	6.21	C ₂₀ H ₁₅ O ₁₂ ⁻	447.05690	447.05431	2.59	300 (100), 301(32)	229(47), 244 (100), 257(63), 271(35), 272(43)	172(21), 188(9), 200(37), 216 (100)	32, 42	7, 10, 11, 12, 16, 19, 22, 23, 24
34	Elagoil-C-heksozid	6.24	C ₂₀ H ₁₅ O ₁₃ ⁻	463.05181	463.04986	1.95	313(30), 315(37), 331(18), 343 (100), 344(17), 373(61)	300(7), 315 (100), 316(9)	271(14), 298(6), 300 (100), 301(14)	3, 7, 9	-

Tabela P1. Nastavak

Redni broj	Identifikovana jedinjenja	t_R , min	Molekulska formula, [M-H] ⁻	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Nađena masa, [M-H] ⁻	Greška Δ ppm	MS ² Fragmenti (% osnovnog pika)	MS ³ Fragmenti (% osnovnog pika)	MS ⁴ Fragmenti (% osnovnog pika)	Jedinjenja identifikovana u semenu GV:	Jedinjenja identifikovana u semenu SV:
35	Metil-elagoil-heksozid	6.31	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃ ⁻	477.06746	477.06425	3.22	300(9), 315 (100), 316(15), 441(5), 468(5)	300 (100), 301(4)	200(67), 244 (100), 271(49), 272(38)	3, 32, 42	9, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23
36	Elaginska kiselina	6.55	C ₁₄ H ₅ O ₈ ⁻	300.99899	300.99714	1.85	185(35), 229(62), 244(18), 257 (100), 284(32), 300(40)	185(86), 201(8), 213(25), 229 (100)	-	3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 16, 20, 32, 42	1-25
37	Metil-elagoil-pentozid	7.02	C ₂₀ H ₁₅ O ₁₂ ⁻	447.05690	447.05453	2.37	255(4), 284(22), 285(18), 315 (100), 316(11), 327(4)	300 (100), 301(5)	200(44), 244 (100), 271(39), 272(34)	3, 7, 9, 20, 32, 42	2, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23
38	Metil-elagoil metil-heksuronid	7.12	C ₂₂ H ₁₇ O ₁₄ ⁻	505.06238	505.05971	2.67	300(7), 315 (100), 316(11)	300 (100), 301(4)	228(35), 244 (100), 271(41), 272(43)	7, 9	10, 11, 12, 23
39	Metil-elaginska kiselina izomer 1	7.47	C ₁₅ H ₇ O ₈ ⁻	315.01464	315.01246	2.18	300 (100), 301(14)	200(43), 244 (100), 271(37), 272(40), 300(44)	172(18), 188(15), 200(38), 216 (100)	3, 5, 7, 9, 10, 32, 42	7, 10, 11, 12, 16, 22, 23
40	Metil-elaginska kiselina izomer 1	7.66	C ₁₅ H ₇ O ₈ ⁻	315.01464	315.01251	2.14	300 (100), 301(14)	200(43), 244 (100), 271(37), 272(40), 300(44)	172(18), 188(15), 200(38), 216 (100)	3, 7, 9, 20, 32, 42	10, 11, 12, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25
41	Dimetil-elaginska kiselina izomer 1	9.05	C ₁₆ H ₉ O ₈ ⁻	329.03029	329.02817	2.12	314 (100), 315(11)	299 (100), 300(4)	271 (100)	3, 7, 9	-
42	Dimetil-elaginska kiselina izomer 2	9.25	C ₁₆ H ₉ O ₈ ⁻	329.03029	329.02829	2.00	314 (100), 315(11)	299 (100), 300(4)	271 (100)	7, 9	-
Derivati hidroksicinaminske kiseline											
43	Metil-3-kafeoilhinat	5.64	C ₁₇ H ₁₉ O ₉ ⁻	367.10346	367.10168	1.77	133(8), 135(10), 161 (100), 162(9), 193(11)	133 (100)	77(53), 105 (100)	5, 7, 9, 10, 11, 16, 20	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 25
44	Metil-5-kafeolhinat izomer 1	6.01	C ₁₇ H ₁₉ O ₉ ⁻	367.10346	367.10109	2.37	135(46), 161(12), 179 (100), 180(10), 191(20)	135 (100)	107 (100)	12	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 13, 14, 17, 18, 22, 25
45	Metil-5-kafeoilhinat izomer 2	6.23	C ₁₇ H ₁₉ O ₉ ⁻	367.10346	367.10108	2.38	135(44), 161(10), 179 (100), 180(10), 191(20)	135 (100)	91(41), 107 (100), 135(21)	3, 5, 7, 9, 10, 12, 16, 20, 32, 42	1, 2, 3, 4, 7, 9, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25

Tabela P1. Nastavak.

Redni broj	Identifikovana jedinjenja	t_R , min	Molekulska formula, [M-H] ⁻	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Nađena masa, [M-H] ⁻	Greška Δ ppm	MS ² Fragmenti (% osnovnog pika)	MS ³ Fragmenti (% osnovnog pika)	MS ⁴ Fragmenti (% osnovnog pika)	Jedinjenja identifikovana u semenu GV:	Jedinjenja identifikovana u semenu SV:
46	Feruloil-heksozid izomer 1	6.53	C ₁₆ H ₁₉ O ₉ ⁻	355.10346	355.10097	2.48	193 (100), 194(7)	133(11), 134(74), 161 (100), 178(34), 193(3)	133 (100)	3, 5, 7, 9, 10, 11, 16, 32, 42	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25
47	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	6.61	C ₉ H ₇ O ₃ ⁻	163.04007	163.03895	1.12	119 (100), 120(8)	91 (100)	-	5, 10, 11, 16, 20, 32, 42	1, 3, 7, 11, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 23, 25
48	Feruloil-diheksozid	6.67	C ₂₂ H ₂₉ O ₁₄ ⁻	517.15628	517.15417	2.10	161(3), 193 (100), 194(10)	133(13), 134(64), 161 (100), 178(34), 193(3)	133 (100)	16	-
49	Feruloil-heksozid isomer 2	6.82	C ₁₆ H ₁₉ O ₉ ⁻	355.10346	355.10139	2.06	193 (100), 194(7)	133(11), 134(74), 161 (100), 178(34), 193(3)	133 (100)	3, 5, 7, 9, 10, 11, 16, 20	-
50	Sinapinska kiselina	6.89	C ₁₁ H ₁₁ O ₅ ⁻	223.06120	223.05957	1.63	164(19), 179(37), 208 (100), 209(13)	135(7), 149(20), 163(52), 164 (100), 193(10)	135(24), 149 (100)	3, 7, 9, 10, 16, 20	5, 7, 9, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 25
51	Metil-3,4-dikafeoilhinat	7.56	C ₂₆ H ₂₅ O ₁₂ ⁻	529.13515	529.13217	2.98	161(11), 367 (100), 368(21)	133(9), 135(18), 161 (100), 179(4), 193(12)	133 (100)	-	3, 4, 17, 25
52	Metil-3,5-dikafeoilhinat	7.94	C ₂₆ H ₂₅ O ₁₂ ⁻	529.13515	529.13251	2.64	161(5), 179(3), 349(6), 367 (100), 368(12)	135(52), 161(71), 179 (100), 191(23), 193(8)	135 (100)	16	2, 3, 4, 7, 13, 15, 17, 25
53	Metil-4,5-dikafeoilhinat	8.13	C ₂₆ H ₂₅ O ₁₂ ⁻	529.13515	529.13238	2.77	161(5), 179(9), 349(5), 367 (100), 368(13)	133(7), 135(61), 161(67), 179 (100), 191(25)	135 (100)	10, 16	3, 4, 7, 15, 17, 25
54	Dimetoksi-cimetna kiselina	9.53	C ₁₁ H ₁₁ O ₄ ⁻	207.06628	207.06474	1.54	147(4), 192 (100), 193(9)	133(27), 164(9), 177 (100)	133 (100)	3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 16, 20, 32, 42	1-25
Flavan-3-oli monomeri i dimeri											
55	Galokatehin	4.01	C ₁₅ H ₁₃ O ₇ ⁻	305.06668	305.06456	2.12	179 (100), 219(75), 221(76), 259(59), 261(61), 285(56)	135(23), 137(15), 151(48), 164 (100)	108(8), 120 (100), 136(12)	-	19, 24
56	Epigalokatehin	4.78	C ₁₅ H ₁₃ O ₇ ⁻	305.06668	305.06458	2.09	179 (100), 219(83), 221(66), 259(58), 261(62), 285(50)	135(22), 137(20), 151(37), 164 (100)	120 (100), 122(5), 136(6)	-	7, 24

Tabela P1. Nastavak.

Redni broj	Identifikovana jedinjenja	t_R , min	Molekulska formula, [M-H] ⁻	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Nađena masa, [M-H] ⁻	Razlika u masi Δ ppm	MS ² Fragmenti (% osnovnog pika)	MS ³ Fragmenti (% osnovnog pika)	MS ⁴ Fragmenti (% osnovnog pika)	Jedinjenja identifikovana u semenu GV:	Jedinjenja identifikovana u semenu SV:
57	B-tip prodelfinidin galat	4,87	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₇ ⁻	745.14102	745.13760	3.42	441(29), 467(20), 593 (100), 594(24), 727(26)	315(26), 423(22), 441 (100), 467(32)	153(24), 287(13), 289(20), 315 (100)	-	19
58	B-tip procijanidin dimer izomer 1	4.95	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂ ⁻	577.13515	577.13245	2.70	289(12), 407(36), 408(11), 425 (100), 426(16), 451(15)	273(7), 381(5), 407 (100)	281(63), 285 (100), 297(35), 389(49)	10	7, 11, 12, 18, 19, 22, 23
59	B-tip procijanidin trimer	5,06	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₈ ⁻	865.19854	865.19458	3.96	575(38), 577(71), 695 (100), 713(38), 739(51), 787(98)	405(45), 451(47), 525(34), 543 (100), 677(49)	391(44), 405(8), 525 (100)	-	19, 22
60	Katehin	5.12	C ₁₅ H ₁₃ O ₆ ⁻	289.07176	289.06983	1.93	179(9), 203(7), 205(27), 245 (100), 246(11)	187(21), 188(15), 203 (100), 217(7), 227(27)	161(20), 175 (100), 185(17), 188(59)	3, 7, 9, 16, 32, 42	7, 11, 12, 15, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 25
61	B-tip procijanidin dimer izomer 2	5.31	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂ ⁻	577.13515	577.13244	2.71	289(14), 407(37), 408(9), 425 (100), 426(21), 451(19)	273(7), 381(4), 407 (100)	281(78), 283(37), 285 (100), 297(36)	3, 7, 9	7, 11, 12, 15, 18, 19, 22, 23, 25
62	Epikatehin	5.63	C ₁₅ H ₁₃ O ₆ ⁻	289.07176	289.06983	1.93	179(13), 203(11), 205(39), 231(7), 245 (100), 246(17)	161(21), 187(21), 203 (100), 217(9), 227(28)	161(30), 175 (100), 185(16), 188(64)	3, 7, 9, 10, 16, 32, 42	2, 7, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 25
63	B-tip procijanidin dimer izomer 3	5.89	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂ ⁻	577.13515	577.13250	2.65	287(17), 289(21), 407(37), 425 (100), 426(16), 451(15)	273(10), 381(7), 407 (100)	281 (100), 283(26), 285(83), 389(33)	3, 7, 9	15, 18, 19, 22, 23
64	A-tip procijanidin dimer izomer 1	6.04	C ₃₀ H ₂₃ O ₁₂ ⁻	575.11950	575.11639	3.11	285(30), 289(13), 449 (100), 450(23), 453(33), 555(23)	285(25), 287 (100), 297(43), 325(24), 327(25)	125 (100), 161(37), 219(21), 243(89)	7, 9	7, 12, 15, 18, 19, 22, 23, 25
65	A-tip procianidin dimer izomer 2	6.67	C ₃₀ H ₂₃ O ₁₂ ⁻	575.11950	575.11645	3.05	407(13), 423(31), 447(11), 449 (100), 450(23), 453(13)	281(27), 287 (100), 297(32), 325(42), 327(24)	125(93), 161(32), 243 (100), 245(30)	10, 12, 32, 42	1, 2, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 20, 22, 23, 24, 25
66	(Epi)katehin-galat	6.73	C ₂₂ H ₁₇ O ₁₀ ⁻	441.08272	441.08050	2.22	289 (100), 290(17)	179(13), 203(9), 205(29), 231(6), 245 (100)	161(30), 188(22), 203 (100), 227(31)	3, 7, 9, 10, 16	11, 12, 24
67	A-tip procijanidin dimer izomer 3	7.20	C ₃₀ H ₂₃ O ₁₂ ⁻	575.11950	575.11666	2.84	285(32), 423 (100), 424(17), 447(13), 449(77), 450(20)	285 (100), 297(23), 313(10), 379(9), 405(16)	213(24), 217(44), 241 (100), 257(63)	3, 7, 9, 10, 16, 32, 42	7, 9, 11, 12, 13, 15, 17, 25

Tabela P1. Nastavak.

Redni broj	Identifikovana jedinjenja	t_R , min	Molekulska formula, [M-H] ⁻	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Nađena masa, [M-H] ⁻	Greška Δ ppm	MS ² Fragmenti (% osnovnog pika)	MS ³ Fragmenti (% osnovnog pika)	MS ⁴ Fragmenti (% osnovnog pika)	Jedinjenja identifikovana u semenu GV:	Jedinjenja identifikovana u semenu SV:
Flavonoli											
68	Miricetin-di-O-heksozid	5,73	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₈ ⁻	641.13594	641.13167	4.26	317(22), 318(4), 477(17), 478(12), 479 (100), 480(24)	316(5), 317 (100)	177 (100), 255(69), 273(57), 299(61)	-	16, 21
69	Miricetin	5.92	C ₁₅ H ₉ O ₈ ⁻	317.03029	317.02839	1.91	179 (100), 191(39), 231(53), 255(21), 271(24), 299(44)	151 (100), 169(5)	65(8), 83(12), 107 (100)	3, 7, 9, 20	4, 7, 10, 11, 15, 20, 21, 22, 24, 25
70	Kvercetin	8.87	C ₁₅ H ₉ O ₇ ⁻	301.03538	301.03343	1.95	179(8), 255(5), 271 (100), 272(12)	199(85), 201(31), 215(37), 227(89), 243 (100)	171(18), 199 (100), 201(23), 215(50)	3, 5, 7, 9, 10, 16, 20, 32, 42	1, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25
71	Galangin	9,37	C ₁₅ H ₉ O ₅ ⁻	269.04555	269.04379	1.76	149(42), 151(29), 183(16), 201(28), 225 (100), 227(17)	169(21), 180(19), 181 (100), 183(37), 197(37)	117 (100), 141(54), 153(56), 154(32)	-	1, 4, 7, 11, 14, 15, 16, 17, 20, 23, 24, 25
72	Kampferol	9.54	C ₁₅ H ₉ O ₆ ⁻	285.04046	285.03854	1.92	151(58), 169(64), 213(63), 229(78), 239(61), 285 (100)	151(85), 213(43), 229(49), 241(48), 257 (100)	-	3, 5, 7, 9, 10, 11, 16, 20, 32, 42	1-25
73	Izoramnetin	9.74	C ₁₆ H ₁₁ O ₇ ⁻	315.05103	315.04895	2.08	270(15), 285(14), 298(14), 300 (100), 301(13)	151(89), 228(19), 255(36), 271 (100), 272(73)	215(6), 227(34), 243 (100)	3, 5, 7, 9, 10, 16, 20, 32, 42	3, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23
Flavanonoli											
74	Taksifolin	7.01	C ₁₅ H ₁₁ O ₇ ⁻	303.05103	303.04893	2.10	125(8), 177(11), 273(21), 274(3), 285 (100), 286(12)	175(57), 199(18), 217(13), 241 (100), 243(16)	197(62), 199(64), 213 (100), 223(14)	3, 5, 7, 9, 10, 11, 16, 20, 32, 42	1, 4, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 25
75	Aromadendrin	7.73	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ ⁻	287.05611	287.05419	1.92	243(10), 259 (100), 260(10), 269(4)	125(48), 151(14), 165(11), 215 (100), 241(20)	172(39), 173 (100), 200(14)	20, 32, 42	1, 4, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 22, 23, 24
Flavoni											
76	Pentahidroksi-metoksiflapon	6.88	C ₁₆ H ₁₁ O ₈ ⁻	331.04594	331.04381	2.13	227(20), 245(30), 255(67), 271(69), 272(44), 299 (100)	227(42), 231(19), 243(11), 255 (100), 271(84)	199(22), 213(18), 226(15), 227 (100)	16	7, 24
77	Tetrahidroksi-dimetoksiflapon	7.73	C ₁₇ H ₁₃ O ₈ ⁻	345.06159	345.05941	2.18	330 (100), 331(16)	298(10), 299 (100), 300(13)	227(34), 243(41), 255(44), 271 (100)	3, 5, 10, 16	7, 18, 19, 24

Tabela P1. Nastavak.

Redni broj	Identifikovana jedinjenja	t_R , min	Molekulska formula, [M-H] ⁻	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Nađena masa, [M-H] ⁻	Razlika u masi Δ ppm	MS ² Fragmenti (% osnovnog pika)	MS ³ Fragmenti (% osnovnog pika)	MS ⁴ Fragmenti (% osnovnog pika)	Jedinjenja identifikovana u semenu GV:	Jedinjenja identifikovana u semenu SV:
78	Apigenin	7.80	C ₁₅ H ₉ O ₅ ⁻	269.04555	269.04400	1.55	147(13), 176(16), 197(13), 201(12), 225(69), 241 (100)	173(30), 197(41), 199 (100), 213(71), 224(9)	NA	5	22
79	Trihidroksi-dimetoksiflavon izomer 1	7.82	C ₁₇ H ₁₃ O ₇ ⁻	329.06668	329.06482	1.86	255(7), 270(8), 299(19), 314 (100), 315(17)	286(20), 297(7), 299 (100)	227(70), 255 (100), 271(58), 281(14)	3, 7, 9, 10, 16	-
80	Luteolin	8.51	C ₁₅ H ₉ O ₆ ⁻	285.04046	285.03852	1.95	175(73), 199(74), 217(66), 241 (100), 243(60), 255(65)	197(91), 198 (100), 199(79), 213(78), 226(25)	169(63), 170 (100), 174(10), 199(11)	20, 32, 42	1, 4, 7, 9, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 22, 23, 24, 25
81	Trihidroksi-metoksiflavon	8.53	C ₁₆ H ₁₁ O ₇ ⁻	315.05103	315.04892	2.10	300 (100), 301(12)	216 (100), 227(66), 228(84), 256(54), 272(67)	173(23), 187(8), 188 (100), 201(17)	5	16, 20, 24
82	Trihidroksi-trimetoksiflavon	8.93	C ₁₈ H ₁₅ O ₈ ⁻	359.07724	359.07502	2.22	344 (100), 345(19)	284(24), 329 (100)	242(29), 286(43), 301 (100), 314(91)	16	-
83	Diosmetin	9,37	C ₁₆ H ₁₁ O ₆ ⁻	299.05611	299.05415	1.96	284(5), 284 (100), 285(12)	212(55), 227 (100), 228(99), 255(41), 256(69)	183 (100), 199(16), 227(6)	-	16
84	Trihidroksi-dimetoksiflavon izomer 2	9.55	C ₁₇ H ₁₃ O ₇ ⁻	329.06668	329.06459	2.08	314 (100), 315(16)	296(27), 299 (100), 300(5)	243(14), 255(25), 271 (100)	10	7, 9, 14, 16, 20, 22, 24
85	Izokampferid	10.52	C ₁₆ H ₁₁ O ₆ ⁻	299.05611	299.05456	1.55	229(5), 257(7), 267 (100), 268(15), 269(7)	239(100)	171(7), 183(6), 195(17), 211 (100)	3, 7, 9	14
86	Ramnocitrin	11.69	C ₁₆ H ₁₁ O ₆ ⁻	299.05611	299.05418	1.93	165 (100), 240(21), 255(15), 271(77), 272(10), 284(25)	65(21), 91(10), 97(49), 121 (100), 150(42)	89(22), 91 (100), 93(24)	20	17, 18
87	Dihidroksi-tetrametoksi-flavon	11,82	C ₁₉ H ₁₇ O ₈ ⁻	373.09289	373.09081	2.08	358 (100), 359(19)	343 (100)	300(10), 315(6), 328 (100)	-	15, 20
Flavanoni											
88	Naringenin	9.34	C ₁₅ H ₁₁ O ₅ ⁻	271.06120	271.05939	1.81	151 (100), 152(7), 165(5), 177(24)	65(4), 83(4), 107 (100)	63(6), 65 (100)	7, 9, 10, 20, 32, 42	1, 3, 4, 7, 10-20, 22, 23, 24, 25
Flavonoid glikozidi											
89	Luteolin-O-heksozid izomer 1	4.49	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	447.09329	447.09041	2.87	284(63), 285 (100), 286(16), 299(17), 327(8), 339(5)	213(17), 217(34), 241 (100), 243(60), 257(31)	197(99), 199(33), 212(19), 213 (100)	5, 7, 9, 10, 16	7, 10, 11, 18, 23, 25

Tabela P1. Nastavak.

Redni broj	Identifikovana jedinjenja	t_R , min	Molekulska formula, [M-H] ⁻	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Nađena masa, [M-H] ⁻	Razlika u masi Δ ppm	MS ² Fragmenti (% osnovnog pika)	MS ³ Fragmenti (% osnovnog pika)	MS ⁴ Fragmenti (% osnovnog pika)	Jedinjenja identifikovana u semenu GV:	Jedinjenja identifikovana u semenu SV:
90	Aromodrin-7-O-heksozid izomer 1	5.77	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁ ⁻	449.10894	449.10675	2.18	227(16), 259(27), 269(26), 287 (100), 288(13)	243(17), 259 (100), 269(7)	125(68), 173(18), 215 (100), 241(11)	3, 5, 7, 9, 10, 12, 16, 20, 32, 42	1, 3, 4, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 7
91	Apigenin-6-C-heksozid-8-C-pentozid	6.08	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄ ⁻	563.14063	563.13812	2.51	353(35), 383(22), 443 (100), 444(23), 473(66), 474(20)	353 (100), 354(7), 383(25)	297(50), 325 (100), 326(5)	10	
92	Aromodrin-O-heksozid izomer 2	6.21	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁ ⁻	449.10894	449.10604	2.89	259(63), 287 (100), 288(9)	201(6), 243(20), 259 (100), 269(6)	125(50), 173(30), 215 (100), 241(23)	-	1, 2, 3, 4, 12, 15, 17, 18, 21, 22, 25
93	Kvercetin-3-O-(6"-ramnozil)-heksozid	6.26	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	609.14611	609.14256	3.55	271(8), 299(6), 300(34), 301 (100), 302(12), 343(7)	151(69), 179 (100), 257(15), 272(11), 273(16)	151 (100)	5, 7, 9, 10, 16, 20	1, 4, 7, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 24, 25
94	Luteolin-O-heksozid izomer 2	6.26	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	447.09329	447.09225	1.03	285 (100), 286(11)	175(93), 199(98), 217(73), 241 (100), 243(66)	197 (100), 198(79), 199(59), 213(58)	5, 20	7, 9, 16, 17, 19, 22
95	Hrizin-6,8-C-di-heksozid	6.26	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄ ⁻	577.15628	577.15294	3.34	337(35), 338(8), 367(14), 457 (100), 458(23), 487(31)	337 (100), 338(5), 367(12)	191(4), 281(55), 309 (100)	10	2, 17
96	Kvercetin-3-O-heksozid izomer 1	6.29	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅ ⁻	593.15119	593.14761	3.58	285 (100), 286(13)	175(92), 199(87), 217(72), 241 (100), 243(61)	197(47), 198 (100), 199(52), 213(18)	10	7, 15, 16, 17
97	Pentahidroksiflavin-O-heksozid izomer 1	6.39	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	463.08820	463.08648	1.72	299(5), 301 (100), 302(15)	165(63), 229(44), 255 (100), 273(37), 283(57)	211(38), 212(27), 227 (100), 240(50)	11, 12, 42, 20, 32, 42	1, 4, 7, 9, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25
98	Pentahidroksi-methoksiflavin-O-heksozid	6.42	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₃ ⁻	493.09877	493.09624	2.52	312(5), 313(14), 330(23), 331 (100), 332(16)	153(12), 177 (100), 181(18), 313(25), 316(57)	105(4), 133 (100), 149(13)	10, 11	7, 16
99	Eriodiktin-7-O-heksozid	6.48	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁ ⁻	449.10894	449.10561	3.32	287 (100), 288(14)	107(2), 125(4), 135(3), 151 (100), 269(3)	65(8), 83(2), 107 (100)	3, 11, 16, 20	7, 13, 15, 16, 17, 18, 20

Tabela P1. Nastavak.

Redni broj	Identifikovana jedinjenja	t_R , min	Molekulska formula, [M-H] ⁻	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Nađena masa, [M-H] ⁻	Razlika u masi Δ ppm	MS ² Fragmenti (% osnovnog pika)	MS ³ Fragmenti (% osnovnog pika)	MS ⁴ Fragmenti (% osnovnog pika)	Jedinjenja identifikovana u semenu GV:	Jedinjenja identifikovana u semenu SV:
100	Apigenin-7-O-(6"-ramnozil)-heksozid	6.65	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄ ⁻	577.15628	577.15357	2.71	269 (100), 270(13)	149(30), 197(41), 225 (100), 227(30), 269(29)	169(27), 181(46), 196(19), 197 (100)	10, 16	17
101	Kvercetin-3-O-heksozid izomer 2	6.68	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	463.08820	463.08531	2.89	298(7), 299(48), 300(47), 301 (100), 302(15)	151(73), 179 (100), 257(13), 272(11), 273(19)	151 (100), 169(7)	10	9, 16, 24
102	Izoramnetin-3-O-(6"-ramnozil)-heksozid	6.75	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₆ ⁻	623.16176	623.15796	3.80	271(8), 300(20), 315 (100), 316(12)	272(6), 287(5), 300 (100), 301(3)	255(55), 271 (100), 272(42)	5, 10, 16, 20	1, 4, 5, 6, 7, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 21, 22, 24, 25
103	Pentahidroksiflavoni O-pentozid	6.89	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁ ⁻	433.07764	433.07525	2.38	299(9), 301 (100), 302(13)	165(57), 201(43), 229(46), 255 (100), 283(61)	213(13), 227 (100), 237(7), 240(21)	16	15, 16, 19, 23, 25
104	Kampferol-3-O-heksozid	6.94	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	447.09329	447.09081	2.48	284(70), 285 (100), 286(11)	151 (100), 169(3), 213(12), 241(30), 257(46)	63(4), 65(4), 83(10), 107 (100)	16, 10, 11, 20, 32, 42	1, 4, 7, 9, 10, 11, 13-25
105	Hesperetin 7-O-(6"-ramnozil)-heksozid	7.05	C ₂₈ H ₃₃ O ₅ ⁻	609.18249	609.17986	2.64	299(10), 301 (100), 302(12)	125(20), 242(55), 257(32), 283(37), 286 (100)	174(26), 199(88), 242(98), 258 (100)	-	7, 17
106	Pentahidroksiflavon O-heksozid izomer 2	7.07	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	463.08820	463.08561	2.59	299(15), 301 (100), 302(14)	165(49), 229(40), 255 (100), 257(36), 283(54)	211(41), 212(29), 227 (100), 240(52)	5, 7, 9, 10, 11, 20, 32, 42	1, 4, 9, 10, 11, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23
107	Apigenin-7-O-heksozid	7.08	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀ ⁻	431.09837	431.09594	2.43	268(18), 269 (100), 270(13)	149(28), 197(38), 225 (100), 227(29), 269(26)	169(59), 181(70), 196(48), 197 (100)	11, 20	16, 17, 22, 25
108	Luteolin-O-pentozid izomer 1	7.18	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₀ ⁻	417.08272	417.08091	1.81	284(4), 285 (100), 286(11)	151(42), 175(87), 199(86), 217(68), 241 (100)	197 (100), 198(56), 199(43), 213(45)	3, 10, 16	15, 16, 17, 19, 25
109	Naringenin-7-O-heksozid	7.40	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀ ⁻	433.11402	433.11222	1.80	271 (100), 272(10)	107(5), 119(3), 151 (100), 165(6), 177(24)	65(4), 83(5), 107 (100)	3, 5, 7, 9, 10, 16, 20, 32, 42	7, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23
110	Luteolin-O-pentozid izomer 2	7.45	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₀ ⁻	417.08272	417.08074	1.98	283(5), 284(25), 285 (100), 286(9)	187(18), 213(71), 240(14), 241 (100), 257(41)	145(35), 185(38), 197(26), 213 (100)	10, 16	15, 16, 17, 25

Tabela P1. Nastavak.

Redni broj	Identifikovana jedinjenja	t_R , min	Molekulska formula, [M-H] ⁻	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Nađena masa, [M-H] ⁻	Razlika u masi Δ ppm	MS ² Fragmenti (% osnovnog pika)	MS ³ Fragmenti (% osnovnog pika)	MS ⁴ Fragmenti (% osnovnog pika)	Jedinjenja identifikovana u semenu GV:	Jedinjenja identifikovana u semenu SV:
111	Luteolin- <i>O</i> -heksozid izomer 3	7.55	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	447.09329	447.09091	2.38	285 (100), 286(11)	192(18), 213(70), 229(15), 241 (100), 257(37)	145(30), 185(39), 197(32), 213 (100)	5	15, 16
112	Kampferol-3- <i>O</i> -metilheksuronid	7.64	C ₂₂ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	475.08820	475.08574	2.46	255(26), 284 (100), 285(80), 286(13), 323(8), 327(12)	227(12), 255 (100), 256(21), 257(5)	211(55), 227 (100), 255(7)	10, 32, 42	7, 10, 11, 12, 15, 19, 21, 23
113	Kvercetin-3- <i>O</i> -(6''- <i>p</i> -kumaroil)-heksozid	7.76	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄ ⁻	609.12498	609.12148	3.50	301(15), 445(4), 463 (100), 464(20)	300(26), 301 (100), 302(4)	151(72), 179 (100), 257(11), 273(20)	32, 42	7, 11, 15, 18, 19, 20
114	Kampferol-3- <i>O</i> -(6''- <i>p</i> -kumaroil)-heksozid	8.23	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃ ⁻	593.13007	593.12697	3.09	285 (100), 286(12), 307(4), 447(8)	151(85), 213(43), 229(49), 241(48), 257 (100)	163(32), 213(19), 229 (100), 239(21)	7, 9, 16, 20, 32, 42	1, 4, 7, 10, 11, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 23
Druga jedinjenja											
115	<i>p</i> -Hidroksifenil-sirćetna kiselina	5.53	C ₈ H ₇ O ₃ ⁻	151.04007	151.03916	0.91	59(91), 107(29), 108(19), 109 (100), 123(16), 136(44)	-	-	20	7, 15, 16, 17, 19, 22

BIOGRAFIJA

Đurđa Krstić je rođena 06.05.1991. godine u Valjevu, Srbija. Srednju medicinsku školu (smer Farmaceutski tehničar) završila je u Beogradu. Osnovne akademske studije na studijskom programu Diplomirani hemičar na Univerzitetu u Beogradu - Hemijskom fakultetu upisala je školske 2010/11. godine, a diplomirala 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,26 (devet i 26/100) i ocenom 10 (deset) na završnom radu. Master akademske studije na studijskom programu „Hemija“ na Univerzitetu u Beogradu - Hemijskom fakultetu upisala je školske 2014/15. godine. Završni (master) rad odbranila je 2015. godine sa ocenom 10 (deset) na diplomskom radu i prosečnom ocenom 10,00 (deset i 0/100) u toku studija. Doktorske akademske studije na studijskom programu „Hemija“ pri Katedri za analitičku hemiju Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta upisala je školske 2015/16. godine.

Od septembra 2020. godine zaposlena je kao asistent na Katedri za analitičku hemiju Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta. Od 2016. godine bila je angažovana na projektu finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (projekat broj: 172017) kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, a od juna 2018. do septembra 2020. godine bila zaposlena je kao istraživač-pripravnik na istom projektu. U oktobru 2020. godine stekla je zvanje istraživač-saradnik. Đurđa Krstić je takođe angažovana od školske 2016/17. godine kao saradnik u nastavi na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. U toku osnovnih i master akademskih studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, kao i stipendista grada Valjeva.

Đurđa Krstić je učestvovala kao saradnik na tri bilateralna projekta: „Bilateralno jačanje institucija u cilju postizanja vodećih uloga u području autentičnosti pčelinjih proizvoda“ (Srbija-Hrvatska, projektni ciklus 2016-2017), „Unapređenje istraživačkih kapaciteta za pouzdanu potvrdu autentičnosti pčelinjih proizvoda“ (Srbija-Slovenija, projektni ciklus 2016-2017) i „Novi pristupi u praćenju falsifikovanja proizvoda od voća“ (Srbija – Nemačka, projektni ciklus 2018-2019).

U cilju profesionalnog usavršavanja u okviru bilateralnog projekta „Novi pristupi u praćenju falsifikovanja proizvoda od voća“, između Srbije i Nemačke boravila je 2018. godine mesec dana na Justus Liebig University, Giessen, u Nemačkoj. U toku 2016. godine kratko je boravila na Biotehničkom fakultetu u Ljubljani, Slovenija, radi pohađanja obuke iz Senzorne analize.

Đurđa Krstić je koautor 17 naučnih radova objavljenih u međunarodnim časopisima: četiri rada objavljena u časopisima izuzetnih vrednosti (M21a), četiri rada u časopisima vrhunskih vrednosti (M21), osam radova u istaknutim međunarodnim časopisima (M22) i jedan rad u međunarodnim časopisima (M23), kao i 13 naučnih saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima i na skupovima nacionalnog značaja. Rezultati istraživanja, proistekli iz ove doktorske disertacije, prikazani su u četiri naučna rada. Tri rada štampana su u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a), dok je jedan rad publikovan u časopisu vrhunskih vrednosti (M21).

Naučni radovi:

1. Krstić, Đ.D., Ristivojević, P.M., Gašić, U.M., Lazović, M., Akšić, M.M.F., Milivojević, J., Morlock, G.E., Milojković-Opsenica, D.M. and Trifković, J.Đ. (2023). Authenticity assessment of cultivated berries via phenolic profiles of seeds. *Food Chemistry*, 402, 134184.
2. Krstić Đurda, Danijel D. Milinčić, Aleksandar Ž. Kostić, Milica Fotirić Akšić, Sladana P. Stanojević, Dušanka Milojković-Opsenica, Mirjana B. Pešić, and Jelena Trifković. (2022). Comprehensive electrophoretic profiling of proteins as a powerful tool for authenticity assessment of seeds of cultivated berry fruits. *Food Chemistry* 383:132583.
3. Aleksandar Stojšavljević, Branislav Rovčanin, Đurda Krstić, Slavica Borković-Mitić, Ivan Paunović, Aleksandar Diklić, Marija Gavrović-Jankulović, Dragan Manojlović. (2019). Risk Assessment of Toxic and Essential Trace Metals on the Thyroid Health at the Tissue Level: The Significance of Lead and Selenium for Colloid Goiter Disease, *Exposure and Health*, 12, 255-264.
4. Đ. Krstić, V. Vukojević, J. Mutić, M. Fotirić Akšić, V. Ličina, D. Milojković-Opsenica, J. Trifković. (2018). Distribution of elements in seeds of some wild and cultivated fruits. Nutrition and autencity aspects. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 99 (2): 546-554.
5. Popović-Djordjević, J., Špirović-Trifunović, B., Pećinar, I., de Oliveira, L.F.C., Krstić, Đ., Mihajlović, D., Akšić, M.F. and Simal-Gandara, J. (2023). Fatty acids in seed oil of wild and cultivated rosehip (*Rosa canina* L.) from different locations in Serbia. *Industrial Crops and Products*, 191,115797.
6. Krstić, Đ., Tosti, T., Đurović, S., Fotirić Akšić, M., Đorđević, B., Milojković-Opsenica, D., Andrić, F., & Trifković, J. (2022). Primary Metabolite Chromatographic Profiling as a Tool for Chemotaxonomic Classification of Seeds from Berry Fruits. *Food Technology and Biotechnology*, 60(3), 406-417.
7. Jagodić Jovana, Branislav Rovčanin, Đurda Krstić, Ivan Paunović, Vladan Živaljević, Dragan Manojlović, and Aleksandar Stojšavljević. (2021). Elemental profiling of adrenal adenomas in solid tissue and blood samples by ICP-MS and ICP-OES. *Microchemical Journal*, 165, 106194.
8. Aleksandar Stojšavljević, Branislav Rovčanin, Đurda Krstić, Slavica Borković-Mitić, Ivan Paunović, Igor Kodranov, Marija Gavrović-Jankulović, Dragan Manojlović. (2019). Evaluation of trace metals in thyroid tissues: Comparative analysis with benign and malignant thyroid diseases, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 183, 15.
9. Ristivojević, P., Lekić, N., Cvijetić, I., Krstić, Đ., Andrić, F., Milojković-Opsenica, D., & Morlock, G. E. (2022). Effect-Directed Profiling of Strawberry Varieties and Breeding Materials via Planar Chromatography and Chemometrics. *Molecules*, 27(18), 6062.
10. Krstić, Đ., Ristivojević, P., Andrić, F., Milojković-Opsenica, D., & Morlock, G. E. (2022). Quality Assessment of Apple and Grape Juices from Serbian and German Markets by Planar Chromatography—Chemometrics. *Molecules*, 27(12), 3933.
11. Stojšavljević, A., Ristić-Medić, D., Krstić, Đ., Rovčanin, B., Radjen, S., Terzić, B., & Manojlović, D. (2022). Circulatory Imbalance of Essential and Toxic Trace Elements in Pre-dialysis and Hemodialysis Patients. *Biological trace element research*, 200(7), 3117-3125.
12. Popović-Djordjević, J. B., Kostić, A. Ž., Rajković, M. B., Miljković, I., Krstić, Đ., Caruso, G., Siavash Moghaddam, S & Brčeski, I. (2022). Organically vs. conventionally grown

- vegetables: Multi-elemental analysis and nutritional evaluation. *Biological Trace Element Research*, 200(1), 426-436.
13. Aleksandar Stojšavljević, Branislav Rovčanin, Đurđa Krstić, Jovana Jagodić, Slavica Borković-Mitić, Ivan Paunović, Vladan Živaljević, Bojan Mitić, Marija Gavrović-Jankulovića, Dragan Manojlovića. (2019). Cadmium as main endocrine disruptor in papillary thyroid carcinoma and the significance of Cd/Se ratio for thyroid tissue pathophysiology, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 55, 190-195
 14. Stojšavljević, A., Rovčanin, B., Jagodić, J., Krstić, Đ., Paunović, I., Gavrović-Jankulović, M. and Manojlović, D. (2021). Alteration of trace elements in multinodular goiter, thyroid adenoma, and thyroid cancer. *Biological Trace Element Research*, 199(11), 4055-4065.
 15. Popović-Djordjević, J., Paunović, D., Milić, A., Krstić, Đ., Siavash Moghaddam, S. and Roje, V. (2021). Multi-elemental analysis, pattern recognition techniques of wild and cultivated rosehips from Serbia, and nutritional aspect. *Biological Trace Element Research*, 199, 1110-1122.
 16. Pećinar, I., Krstić, Đ., Caruso, G. and Popović-Djordjević, J.B. (2021). Rapid characterization of hypanthium and seed in wild and cultivated rosehip: application of Raman microscopy combined with multivariate analysis. *Royal Society Open Science*, 8(3), 202064.
 17. Hadi Waisi, Aleksandra Kosović, Đurđa Krstić, Dušanka Milojković-Opsenica, Bogdan Nikolić, Vesna Dragičević, Jelena Trifković. (2015). Polyphenolic Profile of Maize Seedlings Treated with 24-Epibrassinolide, *Journal of Chemistry*.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Ђурђа Крстић**

Број индекса **ДХ07/2015**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Метаболомичка процена аутентичности семена самониклог и гајеног воћа

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

У Београду, _____

Потпис аутора

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора	Ђурђа Крстић
Број индекса	ДХ07/2015
Студијски програм	Хемија
Наслов рада	Метаболомичка процена аутентичности семена самониклог и гајеног воћа
Ментор	др Јелена Трифковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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, _____

Потпис аутора

Изјава о коришћењу

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

Метаболомичка процена аутентичности семена самониклог и гајеног воћа

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, _____

Потпис аутора

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 прерада.** 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 прерада.** 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.