Bioaktivni spojevi u listu, sjemenci i plodu maline (Rubus idaeus L.)

Jenić, Milena

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:091201

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Bioaktivne komponente u plodu, listu i sjemenci maline (*Rubus idaeus* L.)

DIPLOMSKI RAD

Milena Jenić

Zagreb, rujan, 2019.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Diplomski studij:

Hortikultura - Voćarstvo

Bioaktivni spojevi u listu, sjemenci i plodu maline (*Rubus idaeus* L.)

DIPLOMSKI RAD

Milena Jenić

Mentor:

Dr.sc. Luna Maslov

Zagreb, rujan, 2019.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Milena Jenić**, JMBAG 0178095833, rođen/a 07.06.1994. u Vranju, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

Bioaktivni spojevi u listu, sjemenci i plodu maline (*Rubus idaeus* L.)

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studenta / studentice

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Milena Jenić**, JMBAG 0178095833, naslova

Bioaktivni spojevi u listu, sjemenci i plodu maline (*Rubus idaeus* L.)

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:		potpisi:
1. Doc. dr.sc. Luna Maslov	mentor	_____
2. Prof. dr. sc. Boris Duralija	član	_____
3. Izv. prof. dr. sc. Marko Vinceković	član	_____

Zahvala

Posebno zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Luni Maslov na razumijevanju, utrošenom vremenu i korisnim savjetima te pomoći prilikom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem profesoru dr. sc. Borisu Duraliji na stručnim savjetima, susretljivosti i pomoći.
Zahvaljujem prof.dr.sc. Marku Vinceković na stručnim savjetima i srdačnosti.

Zahvaljujem cijelom osoblju analitičkog laboratorija Zavoda za kemiju na susretljivosti, srdačnosti, nesebičnoj pomoći i suradnji prilikom eksperimentalnog dijela.

Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na podršci i razumijevanju.

Sadržaj

Sažetak 1
Summary 2
1. Uvod 3
1.1. Cilj rada 3
2. Morfologija i biologija maline 4
2.1. Morfologija i biologija 4
2.2. Agroekološki uvjeti 6
2.2.1. Položaj 6
2.2.2. Klima 6
2.2.3. Voda 6
2.2.4. Tlo 6
2.3. Himbo sorta 7
2.4. Kemijski sastav ploda, listova i sjemenki maline 8
2.4.1. Plodovi 8
2.4.2. Sjemenke 11
2.4.3. Listovi 12
2.5. Polifenoli 12
2.5.1. Flavonoidi 14
2.6. Antioksidacijski kapacitet 18
3. Materijali i metode 18
3.1. Biljni materijal 18
3.2. Priprema ekstrakata uzorka 18
3.2.1. Plodovi 18
3.2.2. Listovi 19
3.2.3. Sjemenke 20
3.2.4. Priprema standardnih otopina 20
3.2.5. Ultrazvučna kupelj 21
3.2.6. Spektrofotometrijsko mjerenje 21
3.3. Statistička analiza 21
3.4. Određivanje ukupnih fenola 22
3.5. Određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktu maline 22
3.6. Određivanje ukupnih antocijana u ekstraktu maline 22
3.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti 22
3.7.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS- metodom 23
3.7.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH- metodom 23
3.8. Određivanje polifenola u plodu maline vezanim sustavom tekućinska kromatografija-spektrometar masa (LC-MS) 24

3.9. Određivanje klorofila u ekstraktu lista maline.....24
3.10. Određivanje karotenoida u ekstraktu lista maline.....24
3.11. Određivanje flavan-3-ola u ekstraktu ploda i sjemenke maline.....25
4. Rezultati i rasprava.....26
5. Zaključak.....33
Životopis.....40

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Milena Jenić**, naslova

Bioaktivni spojevi u listu, sjemenci i plodu maline (*Rubus idaeus* L.)

Malina (*Rubus idaeus* L.) jedna je od voćnih vrsta koje su bogate raznolikim kemijski spojevima kao što su vitamini, minerali i polifenoli. Polifenoli utječu na senzorna i nutritivna svojstva biljke. Listovi i sjemenke maline, koje su većinom nusprodukt proizvodnje imaju poveću količinu polifenola, te bi se zajedno s plodovima mogli više koristiti u ljudskoj prehrani kao alternativni izvor bioaktivnih spojeva. Funkcija polifenola još nije posve poznata, te postoji mogućnost da samo neki polifenoli imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje, stoga se teži usavršavanju metoda koje će sa što većom sigurnošću pomoći pri određivanju i kvantifikaciji, te identifikaciji alternativnih izvora bioaktivnih komponenti. U ovom radu određivani su polifenolni spojevi, te su utvrđene značajne količine flavonoida, antocijana, fenola, i dr., u sjemenci i listu maline sorte 'Himbo Top', dok su bile prilično manje u plodu maline. Također, određen je i antioksidacijski kapacitet pomoću DPPH i ABTS metode, te nisu utvrđene značajne razlike između ploda, lista i sjemenke. Pomoću LC-MS metode utvrđeni su antocijani i flavonoli u plodu maline. Preporuča se daljnje istraživanje i identifikacija polifenola u listu i sjemenci maline.

Ključne riječi: antioksidacijska aktivnost, polifenoli, LC-MS, Malina (*Rubus idaeus* L.), sjemenka, list

Summary

Of the master's thesis - student **Milena Jenić,** entitled

Bioactive compounds in raspberry leaf, seed and fruit (*Rubus idaeus* L.)

Raspberries are very rich with bioactive compounds like polyphenols, vitamins and minerals. Polyphenols have an effect of sensorial and nutritive characteristics of the plant. Leaves and seeds of raspberry, even tough they have significant number of bioactive compounds, are often treated as a byproduct of production. Because of rich amounts of bioactive compounds leaves and seeds could be more used as an alternative source of polyphenols. In this experiment the number of polyphenols was analyzed in fruit, leaf and seeds of raspberry variety 'Himbo Top'. Significant amounts of flavonoids and phenols were determined in raspberry leaf and seeds in comparison with raspberry fruit. There were more anthocyanins found in raspberry seeds in comparison with fruit. Antioxidative capacity was also determined, but there were no significant differences between the samples. With LC-MS method anthocyanins and flavanols were determined.

Keywords: LC-MS, polyphenols, raspberry, antioxidative capacity, flavonoids

1. Uvod

Malina koja pripada skupini jagodastog voća prirodni je izvor biokemijskih spojeva koji pogodno djeluju na ljudsko zdravlje. Bogata je spojevima kao što su vitamini, minerali te je jedan od najbogatijih izvora prirodnih antioksidacijskih spojeva kao što su fenoli, antocijani, flavonoidi, i dr. Široko je uzgajana voćna vrsta te 2017. godine zauzima ukupno 118,219 ha svjetskih površina (FAO, 2019). Maline se najčešće konzumiraju u svježem stanju kada je većina bioaktivnih spojeva još aktivna ili kao prerađevine. Upravo zbog svog kemijskog sastava malina se svrstava u funkcionalno voće. Prema Beekwilderu et al. (2005) utvrđeno je da malina ima veću antioksidacijsku aktivnost od ostalih istraživanih voćnih vrsta kao npr. jagode, kivija i jabuke, te znatno veću od nekih povrtnih vrsta kao što su brokula i rajčica. Prema Žlabur et al. (2016) malina ima antioksidacijsku aktivnost veću od 50% u usporedbi s jagodom.

Listovi i sjemenke maline, koje su većinom nusprodukt proizvodnje imaju poveću količinu polifenola, te bi se zajedno s plodovima mogli koristiti u ljudskoj prehrani kao alternativni izvor bioaktivnih spojeva. U Europi se već stoljećima listovi koriste u prirodnoj medicini za razne poremećaje. Europska medicinska agencija (2019) opisala je korisno djelovanje listova koje se spominje u farmakopejama i različitim priručnicima prema Burn i Withell (1941), British Pharmaceutical Codex (1949), Becket et al. (1954), British Herbal Pharmacopoeia (1983), Wichtl (1984), Reynolds (1989), Gruenwald (1998), Johnson (1999), McFarlin et al. (1999), Duke et al. (2002), Wichtl (2004), Tiran (2003) i Hall et al. (2011). Koristi se najčešće u obliku čaja protiv probavnih problema i upale grla. Sjemenke se najčešće koriste u obliku ulja. Zadnjih godina povećana je potražnja za funkcionalnom hranom. Funkcija polifenola još nije posve poznata, te postoji mogućnost da samo neki polifenoli imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje, stoga se teži usavršavanju metoda koje će sa što većom sigurnošću pomoći pri određivanju i kvantifikaciji, te identifikaciji alternativnih izvora bioaktivnih komponenti.

1.1. Cilj rada

Zbog bioloških svojstava koje povezujemo sa malinama, nužno je identificirati bioaktivne spojeve koji se nalaze u malini te odrediti njihovu antioksidacijsku aktivnost s ciljem utvrđivanja učinka konzumacije maline na ljudsko zdravlje. Cilj ovog rada bio je pronaći optimalan način zelene ekstrakcije pomoću ultrazvučnih valova, odrediti bioaktivne spojeve u plodu, listu i sjemenci sorte maline 'Himbo Top', te identificirati i utvrditi razine pojedinih spojeva pomoću LC-MS metode.

2. Morfologija i biologija maline

Crvena malina potječe iz Turske, gdje su još u doba Troje ljudi skupljali plodove samonikle maline u podnožju planine Ida. Prema povijesnim podatcima Palladiusa, rimskog botaničara, malina je domestificirana u 4. stoljeću (Nikolić et al., 2015). Jedan od dokaza koji potvrđuju ovu teoriju je širenje sjemena maline po cijelom Rimskom Carstvu. Prema Lutheru Burbanku (1921) malina se uzgaja u Europi već stoljećima, na što ukazuje i pronađeno sjeme na arheološkim nalazištima u Engleskoj.

U Srednjem vijeku, maline su se smatrale ljekovitim biljem. Osim u medicinske svrhe njihov sok koristio se u umjetnosti i u dekorativne svrhe. Tijekom ovog perioda samo je imućno stanovništvo moglo konzumirati njezine plodove. Jedna od prvih osoba koja je prepoznala potencijal uzgoja malina bio je kralj Edward I., uzgoj malina raste sve do 18. stoljeća kada se proširio Europom. U vrijeme dolaska Europljana u Ameriku, američki domorodci već su se bavili uzgojem malina, no zbog nomadskog načina života maline su bile sušene radi duljeg čuvanja i lakšeg transporta. Otkrićem Amerike, kultivirane američke vrste malina prenesene su u Europu.

Prvi rasadnik malina u Američkoj koloniji osnovao je William Prince 1737. godine u Flushingu u New Yorku. Burbank je stvorio mnogo hibrida malina i kupina te ih je opisao u svom radu Small Fruit and Fruit Improvement.

2.1. Morfologija i biologija

Malina (*Rubus idaeus* L.) pripada porodici Rosaceae, rodu *Rubus*, podrodu *Ideobatus*. Malina je višegodišnja, listopadna biljka. Raste u obliku grma koji može doseći visinu do 2 metra. Stvara uspravne ili savijene šibolike, srednje trnovite dvogodišnje izbojke. Izbojci do zime odrvene, a u drugoj godini se razgranjuju, cvatu i donose plod. Zbog prilagodbe na različite uvjete samonikle populacije karakteriziraju pojedina svojstva, koja većinom služe za zaštitu od predatora. Npr. trnovita stabljika, i dr. Životni ciklus traje u prosjeku od 8 do 14 godina, a može dostići starost i do 20 godina.

Korijen maline je višegodišnji, radijalne simetrije. Kod crvene maline osnova korijenovog sustava sastoji se od vlaknastih, apsorpcijskih korijenovih dlačica. Raste do dubine 50 cm. U populacijama samonikle maline često dosežu i veće dubine zbog prilagodbe siromašnijim tlima manje vlažnosti.

Stabljika divlje maline je grmolika i najčešće je viša od stabljike kultivirane maline. Sastoji se od dvogodišnjeg nadzemnog i višegodišnjeg podzemnog dijela. Tijekom druge

polovice ljeta, krajem rujna ili početkom listopada, u podzemnom dijelu se diferenciraju pupoljci iz kojih će nastati mladi izbojci iduće godine. Iz podzemnog dijela tijekom vegetacije razvija se adventivno korijenje (Purgar et al., 2007). U prvoj godini nadzemni izdanci rastu samo u visinu, dok se u drugoj godini počinju formirati rodne mladice koje, nakon što donesu rod, ugibaju (Nikolić et al., 2015). Izdanci mogu biti uspravni s povijenim vrhovima, valjkasti. Kora mladih izbojaka je zelenkasto siva ili žutosmeđa i pepeljasto dlakava, dok je kod starih smeđa i odrvenjela (Kremer, 2015).

Listanje se odvija od travnja do kraja jeseni (listopad ili studeni). Listovi su neparno perasti i obrnuto sastavljeni s 3-5 liski, na stabljici su raspoređeni spiralno. Liske su jajolikog oblika, terminalna liska ima lisnu peteljku dugačku, dok su postrane liske sjedeće (Purgar et al., 2007). Lice liske je tamno zelene boje, vrlo malo dlakavo, dok je naličje svijetlo zelene boje i prekriveno sa gustim dlakama. Rubovi listova su nazubljeni ili dvostruko nazubljeni.

Racemozan cvat maline sastoji se od 3-8 cvjetova koji mogu biti ružičaste ili bijele boje. Sastoje se od pet bijelih latica koje su većinom uspravne, okrugle i žličasto udubljene. Cvjetovi su hermafroditni i mogu imati oko 60-80 tučkova, koji se nalaze na ispupčenoj cvjetnoj loži, okruženi s oko 60-90 prašnika. Broj plodnih listića kreće se od 20 do 200. Iz svakog oplodnog listića nastaje po jedan apokarpan tučak. Veličina cvjetova se kreće od 0,5 do 1,5 cm u promjeru. Samonikle maline su samooplodne vrste i najčešće se oprašuju entomofilno (medonosnom pčelom, bumbarom) (Keep, 1986). Malina cvate obično u proljeće od svibnja do lipnja koja traje 20-30 dana ovisno o vrsti.

Časku čini 5 široko trokutastih lapova koji se sužavaju prema vrhu. Dulji su od latica, s unutrašnje strane su svijetlo zelene boje, dok su s vanjske strane zelenkasto crveni, prekriveni sa žljezdanim dlačicama (Graham et al., 2006).

Plod maline je zbirna koštunica, odnosno, veći broj sočnih apokarpnih koštunica (20-160) pričvršćenih za cvjetnu ložu. Svaka koštunica nastaje od jednog plodnog listića – karpele. Pri berbi odvaja se od cvjetne lože. Plod može biti crvene boje, izduženog ili okruglastog oblika. Plod ovisno o vrsti dozrijeva od lipnja do kolovoza (Kramer, 2015). Veličina ploda povezana je sa vlažnošću tla i genetskom raznolikošću. Plodovi malina bogati su polifenolnim i antioksidacijskim spojevima, koji doprinose prehrambenoj važnosti. Istraživanjima je utvrđeno kako su plodovi divlje maline manje sočni od plodova kultivirane maline te sadrže više sjemenki.

Sjemenke su svijetlosmeđe boje, naborane površine. Istraživanjima je utvrđeno kako je prosječan broj sjemenki s dvogodišnjih izbojaka 700 sjemenki/cm^2. Sjemenke maline najčešće su bubrežastog oblike te imaju veću ili manju bočnu zakrivljenost. Prema Skendrović i Zečevič (2019), Hummer i Peacock (1994.) masa 100 sjemenki iznosila je 170 mg. U istom istraživanju korišten je program WinSEEDLE s ciljem definiranja detaljnih morfometrijskih razlika između sjemenki te prikupljanja podataka koji bi doprinijeli daljnjim istraživanjima u evaluaciji sorata i vrsta. Utvrđena je razlika između sjemenki maline i

sjemenki ostalih jagodastih voćnih vrsta. Sjemenke se najčešće koriste kao sirovina za dobivanje hladno prešanog ulja koje ima veliku primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

2.2. Agroekološki uvjeti

2.2.1. Položaj

Za uzgoj maline optimalan položaj u umjerenoj kontinentalnoj klimi je na nadmorskoj visini između 300 i 500 metara. Pogodno bi bilo da je teren na južnoj ekspoziciji s blagom inklinacijom. Također, trebalo bi izbjegavati položaje koji nemaju dobro strujanje zraka budući da hladan zrak nepogodno djeluje na rast i razvoj biljke, dok pretjerana količina vlage pogoduje razvoju gljivičnih bolesti.

2.2.2. Klima

Malini pogoduje svježa klima s dovoljnom količinom oborina. Mladi izbojci maline mogu podnijeti niske temperature od -18 ^{o}C do -25 ^{o}C. Korijen maline osjetljiviji je na niske temperature te oštećenja nastaju između -12 i -14 ^{o}C. Budući da je malina voćna vrsta kasne cvatnje, proljetni mrazovi ne čine veliku štetu. Veće promjene u temperaturi tijekom proljeća mogu oštetiti mlade izbojke. Za optimalan rast potrebna je velika količina svjetla.

2.2.3. Voda

Malina zahtjeva veliku količinu oborina te ona mora biti veća od 800 mm godišnje. Zbog plitkog korijenovog sustava nedostatak vode može biti problem. Nedostatak vode može utjecati na sporiji rast korijena, te smanjiti rast novih izbojaka i izazvati sušenje plodova.

2.2.4. Tlo

Tla bogata humusom (> 3%), slabo kisela (pH oko 6), rastresita i slabo propusna najbolje odgovaraju uzgoju maline. Zbog plitkog korijenovog sustava (rast do 1 m dubine, većina korijenovih žila između 15 i 40 cm) podzemna voda ne smije biti bliža površini od 1 m.

2.3. Sorta Himbo-Top®

Himbo-Top® je jesenska sorta napravljena u Švicarskoj, te je na tržištu predstavljena 2008 godine. Zaštitni je znak tvrtke Promo-Fruit Ltd (2019) koja promovira, distribuira i izdaje licencirane sadnice i plodove ove sorte poznate i pod nazivom 'Rafzaqu'. Nastala je križanjem američke sorte 'Autumn Bliss' (U.S. Plant Pat. No. 6,597) i 'Raftazer' (nije licencirana u SAD-u i prodaje se pod nazivom 'Himbo Queen') (Google Patents, 2019). Sortu 'Himbo Top' karakteriziraju veliki plodovi i otpornost prema fitoftori (*Phytophtora fragariae* var. *rubi*) koja uzrokuje trulež korijena. Ima snažan rast i manji broj stolona. Cvjetovi su bijele boje i cvatu od travnja do svibnja. Plodovi su veličine 6-8 g, svijetlo crvene boje. Dozrijevaju od srpnja do rujna, berba traje 6-8 tjedana. Od drugih sorata ima za oko 50% veći prinos. Sorta je samooplodna i za uzgoj joj odgovaraju sunčani položaji sa dobro dreniranim tlima koja imaju pH 6-6.8. Također, ne preporučuje se sadnja crvenih malina u blizini crnih malina, budući da su crne maline podložnije virusnim bolestima koje su prenosive biljnim ušima. Čvrsti jednogodišnji izbojci mogu narasti do 1,8 m formirajući visoke izbojke.

Slika 1: Plodovi maline sorte 'Himbo Top'

Izvor: https://hr.blabto.com/6803-raspberry-grade-himbo-top.html

2.4. Kemijski sastav ploda, listova i sjemenki maline

Pod pojmom kemijskog sastava u nekom proizvodu podrazumijeva se udio svih tvari koji se nalaze u proizvodu uključujući i vodu. Međusobne interakcije i količina pojedinih spojeva u proizvodu utječu na biološku i nutritivnu vrijednost proizvoda. Varijabilnost kemijskog sastava u vegetativnim i generativnim organima biljke ovisi o vrsti, sorti, botaničkoj pripadnosti, načinu uzgoja, ekološkim uvjetima, agrotehnici i pomotehnici, i dr (Đilas et al., 2010; De Souza et al., 2014; Castrejón et al., 2008; Giovanelli et al., 2009; Antttonen et al., 2005; Wang et al., 2000). Na kemijski sastav utječe i stupanj zrelosti plodova prije berbe, uvjeti tijekom dozrijevanja i nakon berbe te način skladištenja (Bravo, 2009). Svaki biljni organ ima specifičan kemijski sastav, koji se najjednostavnije izražava postotkom ukupne suhe tvari. Suha tvar sastoji se od ugljikohidrata, vitamina, minerala, antioksidansa, proteina i masti, a njezin udio definiran je kao masa tvari koja ostane nakon određenog postupka sušenja na konstantnoj temperaturi do konstantne mase kao rezultat isparavanja vode (Ministarstvo poljoprivrede i vodnoga gospodarstva, 2019). Kvaliteta proizvoda definira se prema udjelu suhe tvari koje sadrži, što je udio suhe tvari veći to je veća i kvaliteta. Jagodasto voće u prosjeku sadrži između 10 i 20% suhe tvari. Svaki biljni organ sadrži drugačiji sastav i količinu kemijskih spojeva.

2.4.1. Plodovi

Prema USDA (2019) 100 g svježih plodova maline sadrži u najvećem postotku vodu, (85,75%), iza koje slijede ugljikohidrati (11,49 g) od čega šećeri iznose 4,42 g, što je vidljivo iz Tablice 1. Od ukupnih šećera sadrži najviše fruktoze (2,36 g), u manjem dijelu glukoze (1,86 g) te sukroze (0,20 g). Plodovi maline sadrže vrlo malo masti te imaju nisku energetsku vrijednost 852 kcal).

Tablica 1: Kemijski sastav maline (USDA, 2019)

Sastav	Vrijednost 100 g
Voda (g)	85,75
Energija (kcal)	52
Proteini (g)	1,20
Ukupni lipidi (g)	0,65
Ugljikohidrati (g)	11,94
od čega šećeri (g)	4,42
Vlakna (g)	6,5

Tablica 2: Sastav vitamina u 100 g svježeg ploda maline (USDA, 2019)

Vitamini	Vrijednost 100 g
Vitamin C (mg)	26,2
Tiamin (mg)	0,032
Riboflavin (mg)	0,038
Niacin (mg)	0,598
Vitamin B6 (mg)	0,055
Folat (µg)	21
Vitamin B12 (µg)	0,00
Vitamin A IU (IU)	33
Vitamin a, RAE (µg)	2
Vitamin E (mg)	0,87
Vitamin D (D2+D3) (µg)	0,0
Vitamin D (IU)	0
Vitamin K (µg)	7,8
Lutein + zeaksanthin (µg)	136

Iz Tablice 3 vidljivo je kako od mineralnih tvari sadrži najviše kalija (151 mg) i u manjim količinama fosfora, magnezija i kalcija. Od vitamina u najvećoj mjeri zastupljeni su vitamin C (26.2 mg), A (33 UI) i Lutein + zeaksanthin (136 µg) (Tablica 2).

Tablica 3: Mineralni sastav u 100 g svježeg ploda maline (USDA, 2019)

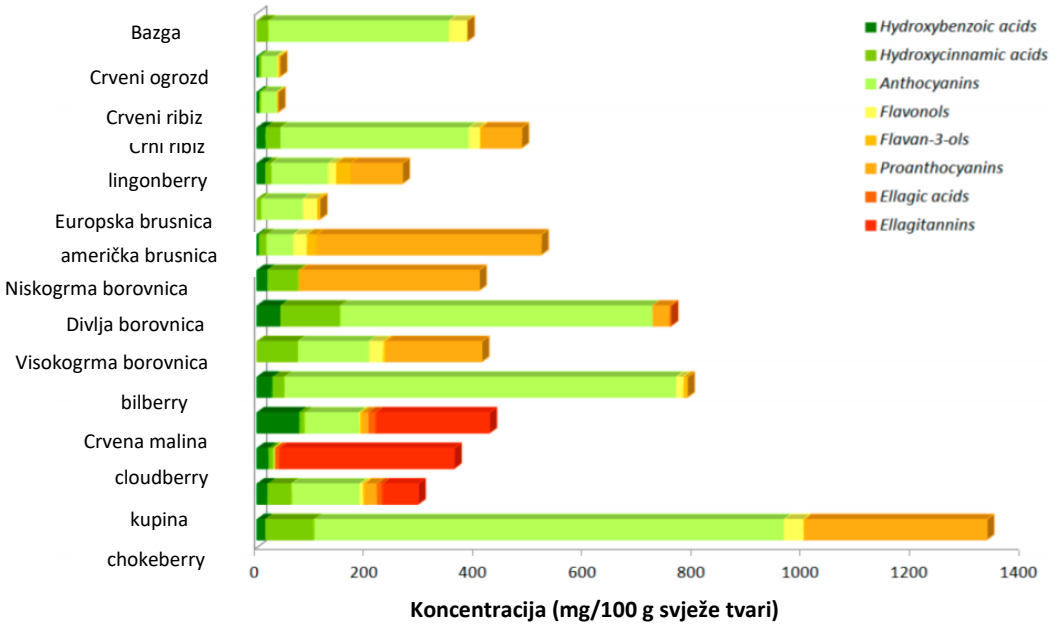
Minerali	Vrijednost 100 g
Kalcij (mg)	25
Željezo (mg)	0,69
Magnezij (mg)	22
Fosfor (mg)	29
Kalij (mg)	151
Natrij (mg)	1
Cink (mg)	0.42

Tablica 4: Flavan-3-oli i antocijanidini u 100 g svježeg ploda maline (USDA, 2019)

Flavan-3-oli (proantocijanidini)	Vrijednost 100 g
(-)-Epikatehin (mg)	3,5
(+)-katehin (mg)	1,3
Antocijanidini	
Cijanidin (mg)	45,8

Brojnim istraživanjima utvrđen je raznolik sastav flavonoida, od kojih su najviše zastupljeni antocijani, flavanoli i flavonoli, fenolne kiseline od kojih su najzastupljenije hidroksibenzojeve kiseline i hidroksicimetne kiseline (Phenol Explorer, 2013), te tanini (galotanini i elagitanini) koji se dijele na tanine (proantocijanidine) i hidrolizirane tanine (Ferlami et al., 2016). Od antocijana pronađeno je 11 različitih spojeva, najzastupljeniji su cijanidin 3-*O*-soforid, pelargonidin 3-*O*-soforozid i Cijanidin 3-*O*-glucozid. (-)-Epikatehin i (+)-katehin najviše su zastupljeni od flavanola, dok su od flavonola najzastupljeniji kvercetin 3-*O*-rutinozid, kvercetin 3-*O*-glukozid i kempferol 3-*O*-glukozid. Od hidroksibenzojevih kiselina najviše je zastupljeno sanguina H-6, lambertinina C, te nešto manji udio sadrži elaginska kiselina arabinosid (*p*-arabinosid) i elaginska kiselina. Najmanji udio imaju hidroksicimetne kiseline, od kojih najviše ima *p*-kafeliquinske kiseline, p-kumarinske kiseline 4-*O*-glukozid i *p*-kumarinske kiseline (detaljniji prikaz antocijana, i fenolnih kiselina vidljiv je iz Tablice 1 u Prilogu). Prema USDA (2019) od flavan-3-ola najzastupljeniji su epikatehin (3,5 mg) i katehin (1,3 mg), dok je od antocijanidina najzastupljeniji cijanidin (45,8 mg) što je vidljivo iz Tablice 4.

Plodovi maline zbog raznolikog kemijskog sastava predstavljaju kvalitetan nutritivni izvor. Također, utvrđena je veća prisutnost elaginske kiseline i elagitanina u odnosu na drugo jagodasto voće (Buricova et al., 2011; Antttonen et al., 2005; Beekwilder et al., 2005; Määttä-Riihinen et al., 2004; Kähkönen et al., 2012). Nositelji antioksidacijske aktivnosti su u najvećoj mjeri fenoli, posebice elagitanini koji čine 58% antioksidacijske aktivnosti (Bobinaite et al., 2012; Ferlami et al., 2016), antocijani koji čine oko 25% antioksidacijske aktivnosti (Beekwilder et al., 2005), te vitamin C i od minerala kalij (Žlabur et al., 2016). Antioksidacijska aktivnost uvelike ovisi o zrelosti plodova, kod nezrelih plodova je manja oko 50% u usporedbi sa zrelim plodovima, dok je kod zrelih plodova najveća (Wang et al., 2000). Također, s dozrijevanjem plodova količina antocijana se povećava, dok se količina elaginina smanjuje (Beekwilder et al., 2005; Wang et al., 2000). Prema Mullen et al., (2002) nakon dužeg skladištenja ili smrzavanja duljeg od 12 mjeseci količina vitamina C smanjila se za 35-55%, dok se količina elaginske kiseline smanjila između 14-21%.



Slika 2: Kemijski sastav jagodastog voća

(Izvor: Ferlami et al., 2016)

2.4.2. Sjemenke

Sjemenke maline također sadrže raznolike bioaktivne spojeve. Kemijski sastav sjemenki malina sastoji se većinom od vode, masnih kiselina (nezasićenih masnih kiselina, posebno omega 3-masne kiseline), fitonutrijenata (Žlabur et al., 2016), također sadrže i veću količinu β-karotena, klorofila i vitamina E. Dimić et al. (2012) utvrdili su kako sjemenke maline sadrže manje klorofila i β-karotena u usporedbi sa sjemenkama kupine i buče. Osim već spomenutih nutrijenata, sjemenke sadrže i veliku količinu tokofoerola koji se zbog svojih antioksidacijskih svojstava može iskoristiti kao prirodni konzervans (Žlabur et al., 2016). Oomah et al. (2000) istraživanjem prinosa ulja iz sjemenki maline utvrdili su manju količinu ulja (10,7%) u usporedbi s drugim istraživanjima u kojima je prinos ulja bio oko 14 % (Ščurović et al., 2009; Dimić et al., 2012). Također, promatran je i udio ukupnih tokoferola te njegovih izomera (α, β, γ i δ), te je utvrđen najveći postotak γ tokoferola (75%), dok su α i δ iznosili 71 i 17,4 mg/100 g. Ekstrahirano ulje iz sjemenki sastojalo se najviše od 93,8% neutralnih lipida (s manjom količinom masnih kiselina i fosfolipida) (Oomah et al., 2000). Utvrđeno je kako količina fosfolipida utječe na stabilnost i trajanje ulja (Oomah et al., 2000; Dimić et al., 2012). Od masnih kiselina najzastupljenije su linoleinska, α -linoleinska i oleinska kiselina (Oomah et al., 2000). Osim kemijskog sastava, istraživana je i učinkovitost apsorpcije ulja sjemenki UV-A, UV-B i UV-C zračenja u svrhu zaštite od sunca (Oomah et al., 2000). Utvrđeno je kako ima SPF 24-50 (Oomah et al., 2000; Badea et al., 2015; Grune, 2015).

2.4.3. Listovi

Listovi maline, unatoč bogatom kemijskom sastavu, najčešće su nusprodukt berbe, te se većina listova uništava i ne koristi u daljnjoj proizvodnji. Istraživanjima je utvrđeno kako listovi maline sadrže jednaku ili veću količinu polifenolnih spojeva (Wang et al., 2000), kao i plodovi maline, što ih čini važnim alternativnim izvorom bioaktivnih spojeva koji se mogu iskoristiti u farmaceutskoj, kozmetičkoj ili prehrambenoj industriji.

Prema istraživanju Ferlami et al., (2016) hidrolizirajući tanini zauzimaju najveći udio u kemijskom sastavu lista, te se njihova koncentracija u sušenom listu maline kreće od 2,6 do 6,9%. Također, od elagitanina identificirani su sanguin H-6 i lambertanin C, te velika količina flavonoida čak 11% što je znatno više od drugih voćnih vrsta. Fenolne kiseline nađene su u malim količinama. Prema Wang et al. (2000) listovi maline sadrže veću antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s plodovima maline, te je utvrđena značajna korelacija između ukupne antioksidacijske aktivnosti i ukupnih fenola. Značajne razlike u količini antioksidacijske aktivnosti identificirane su između plodova i listova maline. Kemijski sastav se mijenja dozrijevanjem, primjerice, mladi listovi imali su viši antioksidacijski kapacitet, te višu koncentraciju ukupnih fenola od starih listova.

2.5. Polifenoli

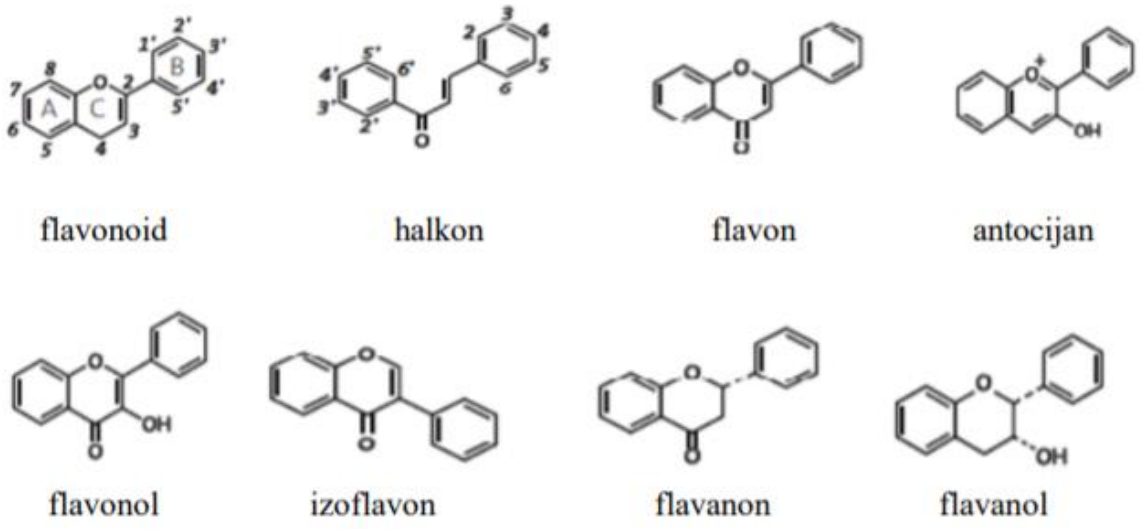
Polifenoli, uz terpene i spojeve s dušikom (alkaloide, glukozinolate, cijanohidrate), pripadaju skupini sekundarnih metabolita. Polifenolni spojevi raznolika su skupina spojeva, iako se najčešće karakteriziraju kao skupina spojeva sa fenolnim prstenom. Najveća su grupa sekundarnih metabolita i prisutni su u svim višim biljkama. Do sada je poznato oko 10000 struktura polifenolnih spojeva, od kojih je identificirano oko 4000 (Tsao, 2010). Zbog svoje velike raznolikosti i široke rasprostranjenosti često se grupiraju na više načina: prema strukturi, broju ugljikovih atoma u molekuli, načinu biosinteze, biološkoj aktivnosti i dr. Ovisno o broju fenolnih prstena koje sadrže i strukturnim elementima koji povezuju fenolne prstenove dijele se u različite podskupine. Većina polifenola u biljkama postoji u obliku glikozida s različitim jedinicama šećera i aciliranih šećera na različitim mjestima u strukturi polifenola. Kao što je već prije spomenuto u prethodnom poglavlju (2.4.1.) na količinu polifenola prisutnih u biljci utječu razni čimbenici. Polifenoli utječu na senzoričke karakteristike dijelova biljaka, stoga rezultat oksidacije polifenola tijekom skladištenja može imati pozitivan ili negativan utjecaj na konačan okus i miris proizvoda (Bravo, 2009; Maslov, 2014). Primjerice, posmeđenje sirovine uzrokovano enzimskim posmeđenjem, i dr.

Tablica 5: Podjela polifenolnih spojeva prema kemijskoj strukturi aglikona (Tsao, 2010)

Polifenoli	
Flavonoidi	Flavanoli (kahetini, teaflavini, taksifolin, proantocijadini)
	Flavonoli (rutin, kervetin, miricitin, kampaferol, isorharmnetin)
	Flavononi (hesperidin, narigenin, sibilin)
	Flavonali (delfinin, cijanidni, pelargonidin)
	Flavoni (luteolin, apigenin, tangeretin, nobiletin)
Neflavonoidi	Izoflavonoidi
	Flavonoliganani
	Lignani
	Stiblenoidi
	Kurkuminoidi
	Hidrolizabilni tanini
Aromatske kiseline	
Fenolne kiseline	
hidroksibenzojeve kiseline	elaginska kiselina, elaginska kiselina arabinosid (*p*-arabinosid)
Hidroksicimetne kiseline	*p*-kafeliquinska kiselina, *p*-kumarinske kiseline 4-*O*-glukozid

2.5.1. Flavonoidi

Najveći udio fenola u biljkama čine jednostavni flavonoidi, koji imaju malu molekularnu masu i čija topljivost ovisi o njihovoj polarnosti i kemijskoj strukturi (hidroksilaciji, alkilaciji i glikolizaciji, polimerizaciji, acilaciji alkoholne hidroksilne skupine, i dr.) (Kazazić, 2004; Maslov, 2014; Tsao, 2010; Bravo, 2009). U biljkama se najčešće nalaze u obliku 3-*O*-glikozida ili polimera. Također, neki od flavonoida mogu biti povezani sa spojevima stanične stijenke poput polisaharida i lignina. Flavonoidi imaju osnovnu strukturu difenilpropan (C_6-C_3-C_6), odnosno 1-fenil-3-(2-hidroksifenil)propan-1ol, koja se sastoji od dvije C_6 jedinice (prsten A i prsten B) fenolne (Kazazić, 2004; Maslov, 2014). Flavonoidi nastaju kondenzacijom fenilpropanoida, što rezultira nastajanjem halkona iz kojih se kasnije sintetiziraju razne strukture (Kurtagić, 2017). Halkoni, osnovni oblici flavonoida, nalaze se u obliku aglikana te se iako nemaju heterociklički prsten ubrajaju u flavonoide. U biljkama halkoni se nalaze u obliku glikana. Gubitkom vode iz fenil-3-(2-hidroksifenil)propan-1ol dolazi do zatvaranja C prstena, što rezultira nastajanjem flavana od kojeg nastaje određeni broj drugih struktura (flavanona, flavan-3-ola (katehini), flavoni, flavon-3-oli, antocijanidini i izolfavoni). Flavonoidi su monomerni dijelovi kondenziranih tanina, iako se vrlo često mogu naći kao slobodni monomeri (Bravo, 2009). Zbog hidroksilacijskog uzorka i varijacije kromanog prstena (prsten C) moguća je podjela flavonoida na podgrupe (flavone, flavonole, antocijane, flavan-3-ole, i dr.) koja ovisi broju i rasporedu hidroksilnih i metoksilnih skupina, te stupnju alkilacije i glikolizacije s mono i oligosaharidima i konjugaciji između prstena A i B (Kazazić, 2004). Većina flavonoida ima prsten B povezan s C_2 položajem prstena C, dok ostatak flavonoida poput neoflavonoida i izoflavona ima prsten B povezan na C_3 i C_4 položaju prstena C. Biološka aktivnost flavonoida ovisi o strukturi i glikolzlim oblicima, uključujući i antioksidacijsku aktivnost (Tsao, 2010). Od flavan-3-ola (proantocijanidini) najvažniji su (-)-epikatehin i (+)-katehin.

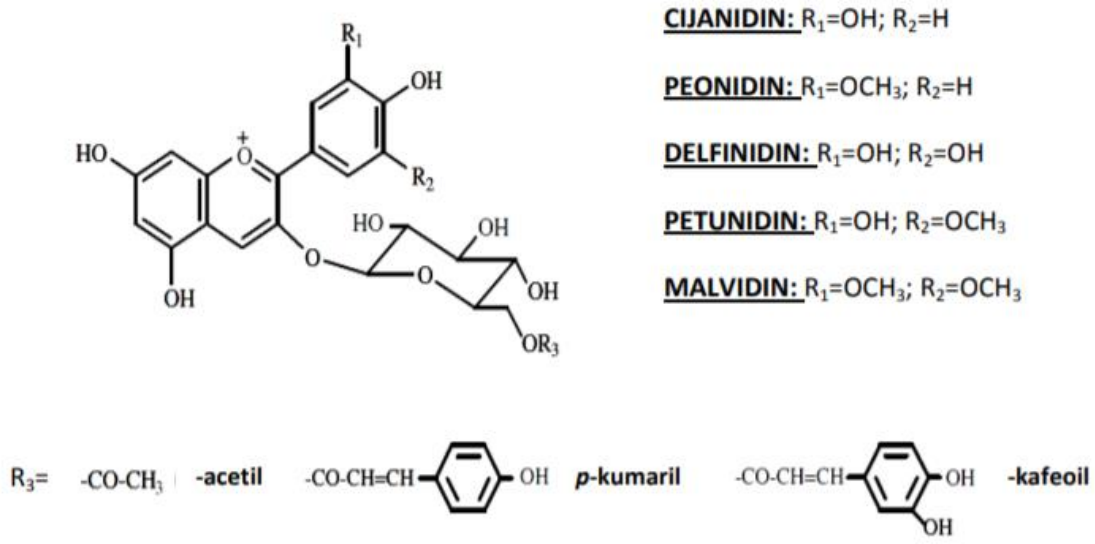


Slika 3: Osnovne strukture flavonoida i njihovih podskupina

(Izvor: Kurtagić, 2017)

2.5.1.1. Antocijani

Antocijani su glavni spojevi crvenih, plavih i ljubičastih pigmenata koji se nalaze u laticama cvjetova, plodova, te nekih žitarica (Tsao, 2010). U biljkama se nalaze u glikolizidnom obliku poznatiji kao antocijanini. Najzastupljeniji antocijani su cijanidini, delfinini i pelargonidini iz kojih nastaje oko 90% ukupnih antocijana. Do sada je identificirano više od 500 antocijana ovisno o hidroksilaciji i metoksilaciji na prstenu B, te glikolizaciji s različitim jedinicama šećera. Boja antocijana ovisi o pH uvjetima, stupnju hidroksilacije ili metilacije i glikolizacije sa šećerima. Osim toga, kemijski su stabilni u kiselim otopinama.



Slika 4: Kemijska struktura antocijana

(Maslov, 2014)

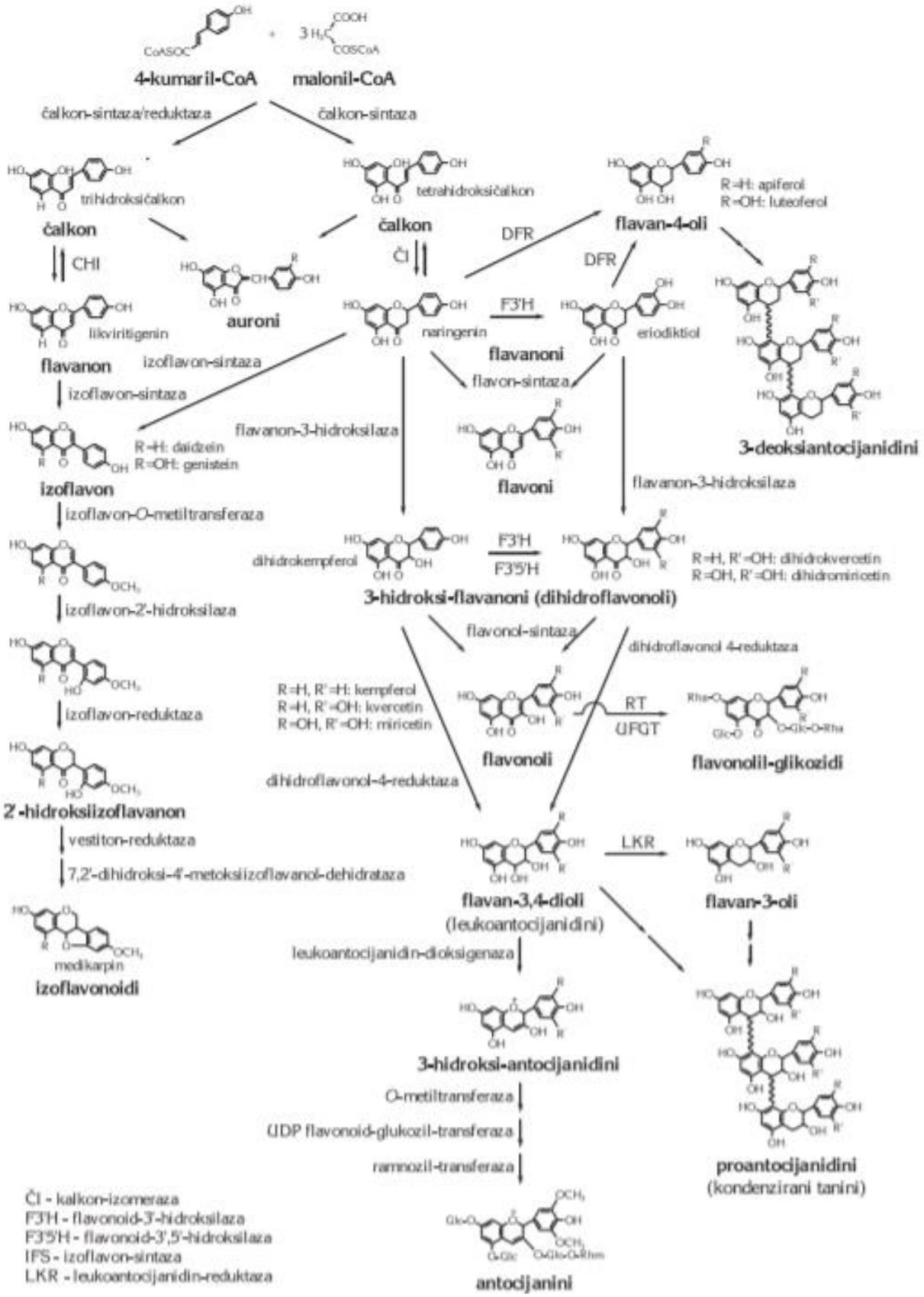
2.5.1.2. Flavonoli, flavoni

Flavonoli su 3-hidroksi derivati flavona, te zajedno sa drugim oblicima flavona (glikozidima, metoksidima i drugim aciliranim produktima na sva 3 prstena) čine najveću podgrupu flavonoida. Flavonoli su svijetložuti pigmenti pristuni u kožici, listovima i cvjetovima biljaka. Najčešće se nalaze u vakuolama epidermalnih tkiva te su teško topljivi. U malini se nalaze u 3-*O*- glikozidnom obliku u četiri aglikona: kempferol, kvercetin, miricetin i izoramnetin. Na C-3 ugljiku flavanola, najčešće je vezan šećer glukoza, no također postoji i glukozidna veza

između glukoronske kiseline i flavonola (Maslov, 2014). Do sada je identificirano približno 400 flavonola (Tsao, 2010). Njihove količine značajno variraju između sorata iste vrste, primjerice sinteza flavona i flavonola ovisi o svijetlu, te su veće količine nađene u listovima biljaka i vanjskim dijelovima (Bravo, 2009; Maslov, 2014).

2.5.1.3. Flavanoli

Od flavanola u malinama su najzastupljeniji flavan-3-oli. Nalaze se najčešće u plodu, listovima te sjemenkama. Mogu biti monomeri, oligomeri i polimeri. (-)-epikatehin i (+)-katehin te ester galne kiseline i (-)-epikatehina epikatehin-3-Ogalat su glavni predstavnici monomernih flavan-3-ola. Oligomeri i polimeri flavan-3-ola poznati su i pod nazivom kondenzirani tanini, odnosno proantocijanidini koji se razlikuju po duljini lanca i tipu interflavanske veze. U smjesi polimeriziranih antocijanidina oligomeri su najveće molekule koje se mogu identificirati, te se sastoje od 2 do 5 jedinica. Proantocijanidini se nalaze u dva oblika koji se dijele prema tipu interflavanske veze.



Slika 5: Shematski prikaz biosinteze flavonoida

(Kazazić, 2004)

2.6. Antioksidacijski kapacitet

Antioksidansi se definiraju kao tvari koje se nalaze u malim količinama u odnosu na oksidirajući supstrat te značajno usporavaju oksidaciju tog supstrata. Zbog njihove aktivnosti uvjetovane različitim mehanizmima, imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala (kao donori elektrona ili H atoma).

Flavonoidi mogu djelovati kao antioksidansi na više načina od kojih je najvažniji kada djeluju kao hvatači slobodnih radikala i tako zaustavljaju lančanu reakciju slobodnog radikala. 'Kao antioksidansi moraju zadovoljiti sljedeće uvjete: ako je prisutan u maloj koncentraciji u odnosu na tvar podložnu oksidaciji mora usporiti ili spriječiti oksidaciju i iz njega nastali radikal mora biti stabilan kako ne bi poticao lančanu reakciju' (Kazazić, 2004). Ukupna antioksidacijska aktivnost (TAC) je mjera za određivanje ukupne količine slobodnih radikala uhvaćenih kontrolnoj otopini, koja se koristi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta bioloških uzoraka. Za jagodasto voće važno je identificirati spojeve koji se nalaze u malim količinama u uzorku, a značajno djeluju na reaktivnost pojedinih reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i dušikovih spojeva (RNS). Metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti, odnosno kapaciteta dijele se po mehanizmu reakcije na dva tipa: metode koje se temelje na reakcijama prijenosa elektrona (eng. Electron transfer, ET) i metode koje se temelje na reakcijama prijenosa vodikovih atoma (eng. Hydrogen atom transfer, HET).

3. Materijali i metode

3.1. Biljni materijal

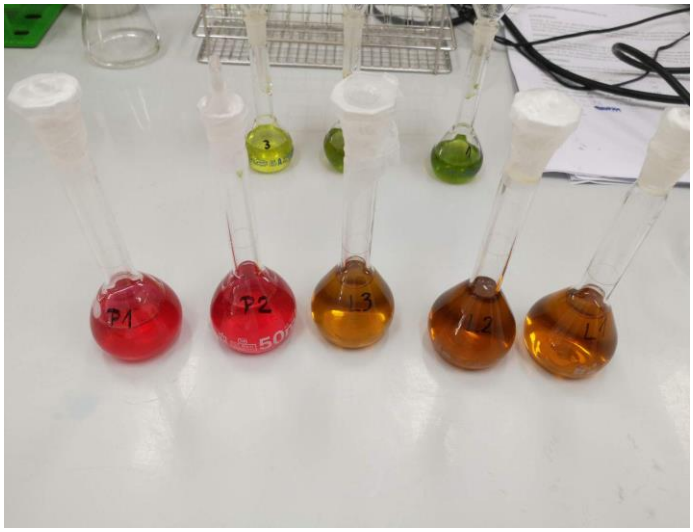
U istraživanju korišteni su plodovi, listovi i sjemenke dvogodišnjih sadnica sorte 'Himbo Top' (*Rubus idaeus* L.). Biljni materijal dopremljen je iz komercijalnog proizvodnog nasada proizvođača Fragaria d.o.o. u listopadu 2018. godine. Plodovi su prikupljeni u punoj fiziološkoj zrelosti. Zdravi, neoštećeni mladi i stariji listovi prikupljeni su s istih jedinki kao i plodovi. Zaprimljeni plodovi i listovi, čuvali su se u hladnjači analitičkog kemijskog laboratorija Zavoda za kemiju na -40 °C tijekom analiza. Sjemenke su ekstrahirane iz prikupljenih plodova.

3.2. Priprema ekstrakata uzorka

3.2.1. Plodovi

5 g ploda maline usitnjeno je u tarioniku te kvantitativno preneseno u Erlenmeyerovu tikvicu u koju je potom dodano 30 mL 50 % vodene otopine etanola (% *v/v*). Smjesa se promiješala te ostavila 24 h u mraku i na sobnoj temperaturi. Nakon toga, smjesa se stavila

u ultrazvučnu kupelj na 35 min pri 70 ^{o}C. Ekstrakt je potom filtriran kroz filtar papir u odmjernu tikvicu od 50 mL te nadopunjen s ekstrakcijskim otapalom do oznake.



Slika 6: Ekstrakti plodova i listova maline (originalna fotografija)

3.2.2. Listovi

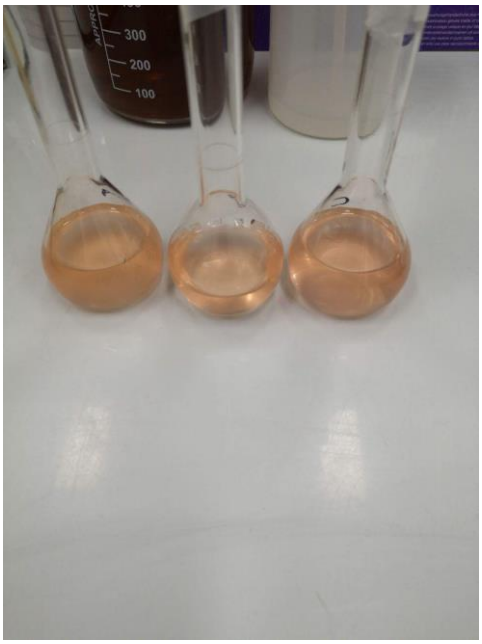
2 g listova maline usitnjeno je u tarioniku i kvantitativno preneseno u Erlenmeyerovu tikvicu u koju je potom dodano 30 mL 50 % vodene otopine etanola (% *v/v*). Nakon toga, smjesa se stavila u ultrazvučnu kupelj na 35 min pri 70 ^{o}C. Ekstrakt je potom filtriran kroz filtar papir u odmjernu tikvicu od 50 mL te nadopunjen s ekstrakcijskim otapalom do oznake.

Slika 7: Usitnjavanje svježih listova maline u tarioniku

(originalna fotografija)

3.2.3. Sjemenke

Sjemenke su iz plodova ekstrahirane pomoću miksera te su stavljene u 5% otopinu izbjeljivača na 30 min nakon kojih su stavljene na sušenje. Potom je 0,2 g osušenih sjemenki usitnjeno je u tarioniku i kvantitativno preneseno u Erlenmeyerovu tikvicu u koju je potom dodano 30 mL destilirane vode. Nakon toga, smjesa se stavila u ultrazvučnu kupelj na 35 min pri 70 ^{o}C. Ekstrakt je potom filtriran kroz filtar papir u odmjernu tikvicu od 50 mL te nadopunjen s ekstrakcijskim otapalom do oznake.



Slika 8: Ekstrakti sjemenki maline

(originalna fotografija)

3.2.4. Priprema standardnih otopina

Standardne otopine galne kiseline i kvercetina poslužile su za izradu baždarnih krivulja za određivanje ukupnih fenola odnosno ukupnih flavonoida. Standardi su pripravljeni otapanjem izvaganih masa pojedinih spojeva u destiliranoj vodi. Standardna otopina Troloksa poslužila je za izradu baždarne krivulje za određivanje antioksidacijske aktivnosti ploda i lista maline ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) i DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil).

U tablici 6 prikazane su masene, odnosno množinske koncentracije standardnih otopina koje su poslužile za izradu baždarnih krivulja. Rasponi množinskih koncentracija standardnih

otopina Troloxa za određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS-om i DPPH-om bili su različiti.

Tablica 6. Koncentracije standardnih otopina za izradu baždarnih krivulja za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktu maline te antioksidacijske aktivnosti malina

Spoj	**γ/ mg L^{-1}**	**c/ mmol L^{-1}**	**jednadžba pravca**
Galna kiselina	50 do 500		y = 0,0009x + 0,0072, R^2 = 0,9998
Kvercetin	50 do 500		y = 0,00377x-0,15840, R^2 = 0,9650
Trolox (DPPH)		40 do 400	y = 0,5366x + 0,0026, R^2 = 0,9924
Trolox (ABTS)		200 do 800	y = 0,2957x + 0,0072, R^2 = 0,9954

3.2.5. Ultrazvučna kupelj

Ultrazvučna kupelj (S10H Elmasonic, Germany) je korištena za ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju (UAE). Kupelj radi na frekvenciji od 50/60 Hz sa snagom od 90 W. Uzorci plodova, lista i sjemenki maline stavljeni su u Erlenmeyerove tikvice od 50 mL te nadopunjene s otopinom etanola i vode. Nakon toga tikvice su stavljene u ultrazvučnu kupelj. Nakon ekstrakcije otopina je filtrirana i analizirana.

3.2.6. Spektrofotometrijsko mjerenje

Spektrofotometar (*Shimadzu*, UV-1700 *Pharma Spec*, Japan) korišten je za mjerenja apsorbancije svih uzoraka.

3.3. Statistička analiza

Sva mjerenja izvršena su u multiplikantima te su rezultati izraženi kao srednje vrijednosti $(\bar{x})$ uzoraka u skupini:

$$\bar{x} = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N} x_i$$

s pripadajućim standardnim greškama $S_{\bar{x}}$

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}}$$

izračunate iz pojedinačne vrijednosti uzoraka x_i i ukupnog broja uzoraka N.

Podatci istraživanja statistički su obrađeni u Excel programu (Microsoft Office, 2019) i programskom paketu SAS, verzija 9.3 (SAS, 2010). Podatci su podvrgnuti jednosmjernoj analizi varijance (ANOVA) korištenjem PROC ANOVA funkcije (citat). Srednje vrijednosti uspoređene su Tukey-evim testom, a smatraju se značajno različitima kod $p \leq 0,05$. Uz rezultate u tablicama i slikama nalaze se i eksponenti različitih slova koji označavaju značajne statističke razlike između variranih tretman kod $p \leq 0,05$.

3.4. Određivanje ukupnih fenola

U odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetirano je 100 µL ekstrakta maline, sjemenke ili lista, zatim je dodano 7,9 mL destilirane vode i 0,5 mL Folin-Ciocaulteu-ovog reagensa. Kako bi započela reakcija, dodaje se 5 mL 20% otopine natrijeva karbonata (% *w/v*). Apsorbancija se mjerila pri valnoj duljini od 765 nm. Slijepa proba pripremljena je na isti način samo se umjesto ekstrakta ploda i lista maline dodala destilirana voda. Rezultat je izražen u ekvivalentima galne kiseline, mg EGK L^{-1}.

3.5. Određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktu maline

U tikvicu od 10 mL dodano je 100 µL ekstrakta ploda, sjemenke i lista maline, 4 mL vode te 300 µL otopine natrijevog nitrita (0,5 g L^{-1}). Tako pripremljena smjesa stajala je 5 min., nakon čega je dodano 300 µL otopine aluminijevog klorida (1 g/L). Nakon 6 min. dodana su 2 mL 1 M NaOH te je tikvica nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Mjerenja su se provodila pri valnoj duljini od 360 nm uz vodu kao slijepu probu. Rezultat je izražen u ekvivalentima kvercetina, mg EK L^{-1}.

3.6. Određivanje ukupnih antocijana u ekstraktu maline

Ekstrakti ploda i sjemenke maline razrijeđeni su s etanol kloridom tako da je apsorbancija na spektrofotometru bila u intervalu $0.3 < A < 0.6$. Ekstrakt ploda maline razrijeđen je 1:4. Mjerenja su se provodila pri valnoj duljini od 525 nm uz etanol klorid kao slijepu probu. Ukupni antocijani izraženi su prema cijanidin-3-*O*-glukozidu.

3.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Antioksidacijska aktivnost određena je spektrofotometrijskom metodom uz upotrebu ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) i DPPH radikala kationa.

3.7.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS- metodom

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka ekstrakta ploda i lista malina pripravljena je otopina radikala ABTS, oksidacijom 7 mmol/L vodene otopine reagensa ABTS s 140 mmol/L-otopinom kalijevog peroksodisulfata, do konačne koncentracije otopine kalijevog peroksidisulfata od 2,45 mmol /L. Za pripravljanje izvorne reakcijske otopine upotrjebljeno je 88 µL otopine kalijevog peroksodisulfata koncentracije 140 mmol/L te nadopunjeno s otopinom reagensa ABTS koncentracije 7 mmol/L do volumena od 5 ml. Budući da ABTS i kalijev peroksodisulfat reagiraju u stehiometrijskom omjeru 1: 0,5, oksidacija nije potpuna te je stoga pripravljena otopina držana u mraku 12 do 16 sati na sobnoj temperaturi. Neposredno prije analize pripravljena je razrijeđena otopina radikala ABTS u 96 %-tnom etanolu tako da je apsorbancija pri valnoj duljini od 734 nm bila 0,7 ± 0,2.
Alikvot od 50 µL uzorka ekstrakta maline pomiješan je s 5 mL otopine radikala ABTS u epruveti te se nakon točno 6 minuta izmjerila apsorbancija na 734 nm. Prije mjerenja uzoraka izmjerena je apsorbanciju slijepog uzorka koji je pripravljen tako da se umjesto uzorka pomiješala voda s istom količinom reagensa. Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobivena je razlika iz koje se prema baždarnoj krivulji odredila antioksidacijska aktivnost izražena u ekvivalentima Troloksa, mmol TE L^{-1}.

3.7.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH- metodom

Alikvot od 50 µL uzorka ekstrakta ploda i lista malina pomiješan je s 2 mL otopine radikala DPPH· koji je prethodno pripravljen otapanjem u metanolu do konačne množinske koncentracije od 0,065 mmol/L. Nakon 60 minuta uz miješanje pri 25 °C mjerila se apsorbancija na λ=515 nm. U slijepi uzorak se umjesto ekstrakta malina dodala voda. Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepog uzorka dobila se razlika iz koje se prema baždarnoj krivulji odredila antioksidacijska aktivnost izražena u ekvivalentima Troloksa, mmol TE L^{-1}.

Slika 9: Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom u ekstraktu plodova, lista i sjemenke maline (originalna fotografija)

3.8. Određivanje polifenola u plodu maline vezanim sustavom tekućinska kromatografija-spektrometar masa (LC-MS)

Ekstrakt malina analiziran je vezanim sustavom tekućinska kromatografija-spektrometar masa (LC-MS). Korišten je instrument Shimadzu Nexera X2-LCMS-8050. Pokretna faza A sastojala se od 1 % -tne otopine mravlje kiseline u vodi (*v/v*), a pokretna faza B sastojala se od acetonitrila. Gradijentno eluiranje bilo je sljedeće: od 0 do 7 min, 30 % B, od 7 do 27 min 50 % B, od 27 do 30 min 33 %B. Protok pokretne faze bio je 0,2 mL/min, a volumen injektirano uzorka bio je 10 µL. Korištena je kolona Shimpack XR ODS III (1.6um, 50x2.0mm). Spektrometri masa dobiveni su u pozitivnom modu uz elektrosprej ionizaciju (engl. ESI-*Electron Spray Ionization*).

3.9. Određivanje klorofila u ekstraktu lista maline

0,2 g lista maline usitnjeno je u tarioniku, te je klorofil ekstrahiran s 25 mL 80 %-nog acetona uz vorteksiranje kroz 2 min, te je zatim profiltriran. Filtrat je prenesen u odmjernu tikvicu te je dopunjen s otapalom. Izmjerena je apsorbancija filtrata na valnoj duljini od λ=663 nm za klorofil *a* te na valnoj duljini od λ=645 nm za klorofil *b*.

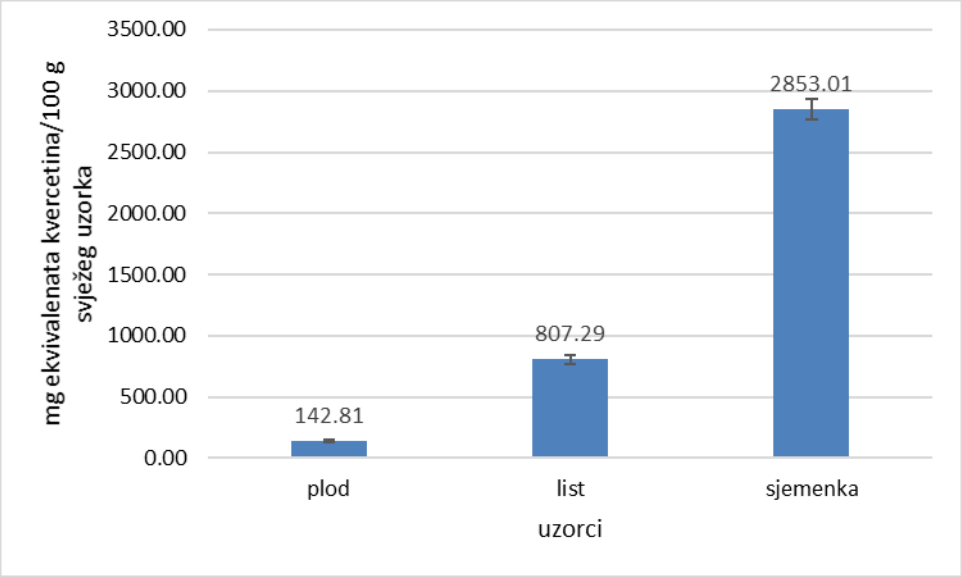
3.10. Određivanje karotenoida u ekstraktu lista maline

U tamnu epruvetu od 50 ml, stavljeno je 0,2 g lista maline koji se zatim pomiješao s 10 mL otopine acetona i heksana (4:6). tako pripremljen uzorak miješao se 1 min nakon čega je profiltriran kroz filter papir. Filtrat se do oznake napunio otapalom. Zatim se mjerila apsorbancija filtrata na valnim duljinama λ=453, 505 i 663 nm.

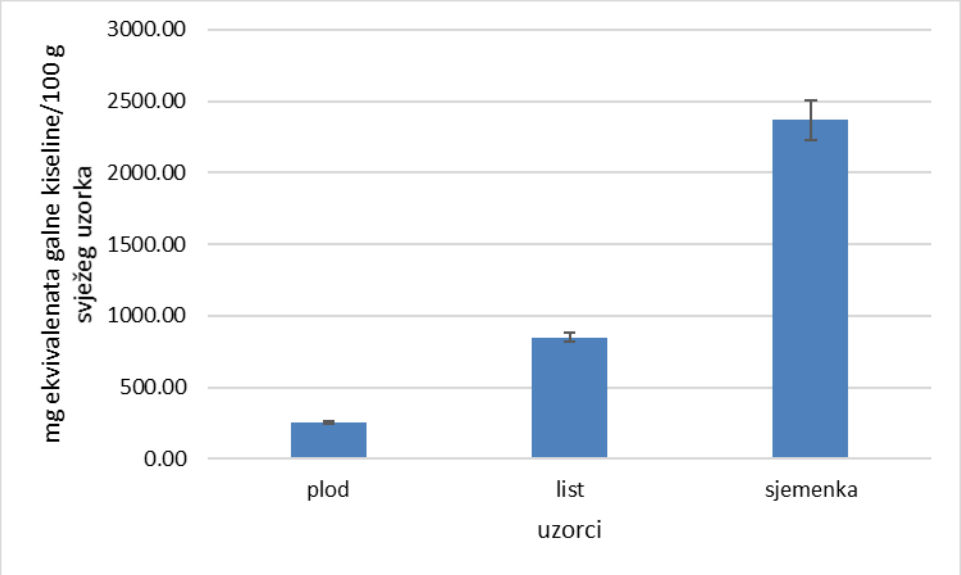
3.11. Određivanje flavan-3-ola u ekstraktu ploda i sjemenke maline

U tikvici od 10 mL dodan je 1 mL uzorka, 3 kapi glicerola te 5 mL 1 % otopine DMACA (p-dimetilaminocinamaldehid), nakon čega se tikvica nadopunila do oznake metanolom. Tako pripremljena otopina ostavila se stajati 7 min nakon čega se apsorbancija mjerila na spektrofotometru na valnoj duljini λ=640 nm. Ekstrakti su dodatno filtrirani mikrofilterima za HPLC.

4. Rezultati i rasprava



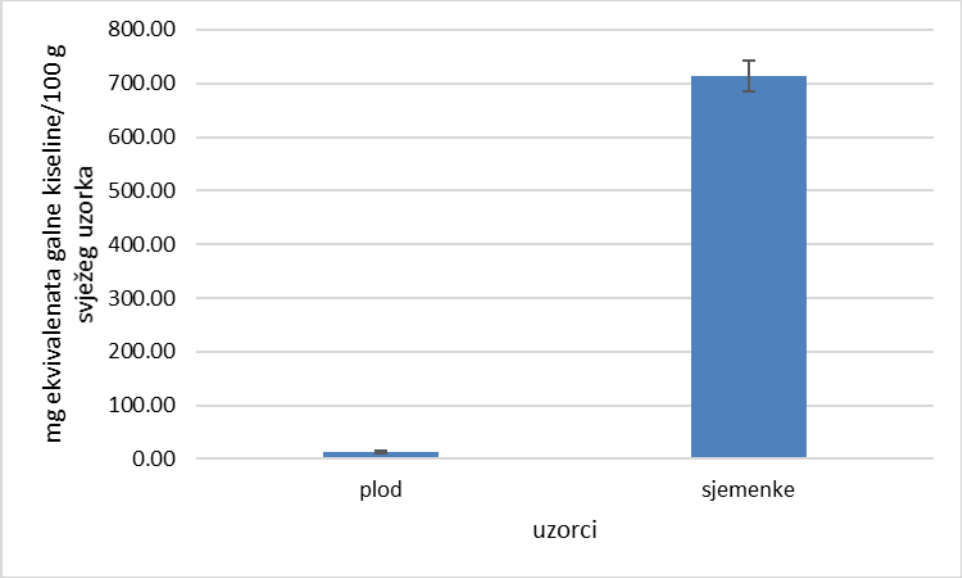
Slika 10: Srednje vrijednosti količine flavonoida u plodu, listu i sjemenci maline



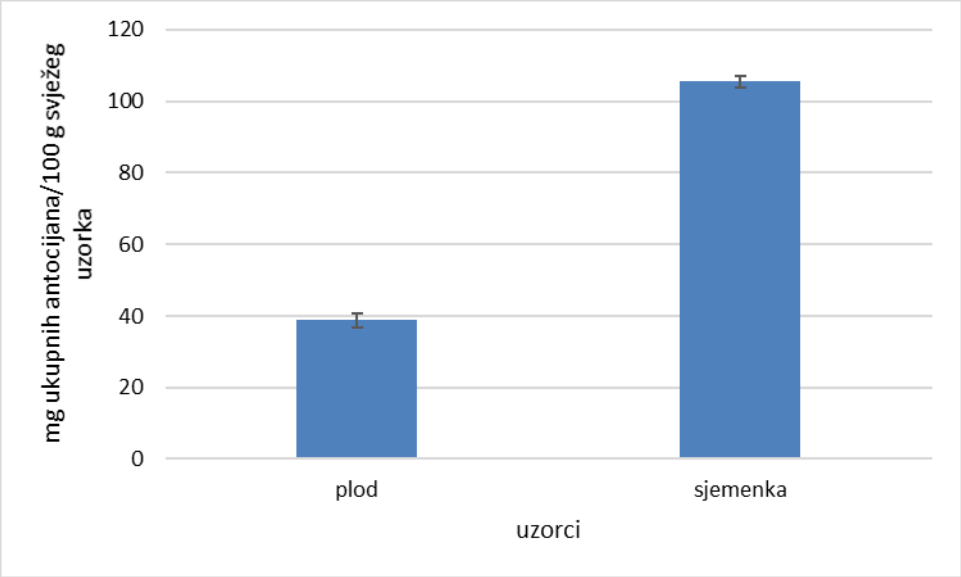
Slika 11: Srednje vrijednosti količine fenola u plodu, listu i sjemenci maline

Od svih analiziranih polifenola, pronađena je najveća količina flavonoida i fenola kod svih analiziranih jedinki. Najviše flavonoida imale su sjemenke maline 28,53 mg/g (2853,03 mg/100 g svježeg uzorka), i list maline 8,07 mg/g (807,29 mg/100 g svježeg uzorka), dok su plodovi maline imali samo 1,42 mg/g (142,81 mg/100 g svježeg uzorka) (Slika 10). Također, najveću količinu fenola imale su sjemenke 23,69 mg/g (2369,44 mg/100 g svježeg uzorka),

zatim list te plodovi (Slika 11). Prema Pantelidis et al. (2010) količina ukupnih fenola za roditeljsku sortu 'Autumn Bliss' iznosila je između 1052 i 2494 mg/100 g sušenog uzorka što je značajno veće od dobivenih rezultata. Također utvrđeno je kako sjemenke sorte 'Himbo Top' imaju veću količinu ukupnih fenola od plodova sorte 'Heritage' (1208-1905 mg/100 g), te plodova sorata kupine 'Chester Thronless' (2008 mg/100 g), 'Thornless Evergreen' (2061 mg/100 g), te 'Hull Thornless' (2349 mg/100 g). U usporedbi s drugim sortama maline analizirana sorta ima značajno manju količinu ukupnih fenola (274-714 mg/100 g svježe tvari) (Bobinaite et al., 2012). Ukupni fenoli u listovima maline iznosili su 848,89 mg/100 g svježe tvari što je veće od drugih sorata maline ('Summit' 32,3 mg/g, 'Sentry' 11,8 mg/g, 'Canby' 16,9 mg/g i 'Autumn Bliss' 30,1 mg/g svježe tvari), kupine ('Chester Thronless' 20,7 mg/g, 'Hull Thornless' 18,5 mg/g svježe tvari) i jagode ('Allstar' 13,8 mg/g svježe tvari) (Wang i Lin, 2000).



Slika 12: Srednje vrijednosti količine flavan-3-ola u plodu i sjemenci maline



Slika 13: Srednje vrijednosti količine antocijana u plodu i sjemenci maline

Od ukupnih flavan-3-ola sjemenke su imale veću količinu 7,14 mg/g (713,63 mg/100 g svježeg uzorka), dok su plodovi imali 1,29 mg/g (12,91 mg/100 g svježeg uzroka) (Slika 12). Od analiziranih polifenola najmanje je bilo antocijana, od kojih su sjemenke imale 1,05 mg/g (105,5 mg/100 g svježeg ploda), dok su plodovi imali 0,38 mg/g (38,74 mg/100 g svježeg uzorka) (Slika 13). Prema Arts et al. (2000) prosječne vrijednosti za katehin i epikatehin u plodu maline bile su 9,7 mg/kg svježe tvari odnosno 82,6 mg/kg svježe tvari. Analizirana sorta 'Himbo Top' imala je višu vrijednost flavan-3-ola u plodu od 12,92 mg/100 g, dok su

najviše vrijednosti (713, 4 mg/100 g) zabilježene su sjemenkama, što je slično drugim istraživanjima. Količina utvrđenih antocijana nije se značajno razlikovala od utvrđenih antocijana vodenih ekstrakata sorata 'Aksu Kirimizisi' (49,3 mg/100 g svježeg uzorka) i 'Hollanda Boduru' (45,6 mg/100 g svježeg uzorka), dok je bila manja od sorata 'Newburgh' (69,5 mg/100 g) i 'Rubin' (60,3 mg/100 g) (Sariburun, 2010). Također, količina antocijana podudara se s količinom antocijana roditeljske sorte 'Autumn Bliss', prema sličnom istraživanju Pantelidis et al. (2010), koji su utvrdili između 35,1 i 39,1 mg/100 g svježeg uzorka. Sorta 'Himbo Top' ima značajno manju količinu antocijana u usporedbi sa sortama kupine 'Thornless Evergreen' (146,8 mg/100 g), 'Chester Thronless' (134,6 mg/100 g), 'Hull Thornless' (152,2 mg/100 g) prema Pantedilis et al. (2010) i prema Wang i Lin (2000) 'Chester Thronless' (132,1 mg/100 g svježe tvari) i 'Hull Thornless' (146,4 mg/100 g svježe tvari), te značajno veću količinu od žute sorte maline 'Fallgold' (1,3-3,4 mg/100 g) (Pantelidis, 2010). Drugim istraživanjima potvrđeno je kako kupina ima veću količinu antocijana od maline. U usporedbi za križancima između crvene maline i kupine (*Rubus idaeus x Rubus fruticosus*) sorta 'Himbo Top' imala je značajno manju količinu antocijana 'Tayberry' (103,5 mg/100 g), 'Sunberry' (175,8 mg/100 g), 'Silvan' (197,8 mg/100 g). Veće vrijednosti ukupnih antocijana kod križanaca između kupine i maline vrlo vjerojatno su posljedica genetskog utjecja. Također, imala je značajno manju količinu antocijana u usporedbi sa sortama crvenog ribiza 'Rovada' (7,5 mg/100 g) i 'White Versailles' (1,4 mg/100 g). Nadalje, utvrđena je veća količina antocijana u odnosu na jagodu (31,9 mg/100 g svježe tvari) (Wang i Lin, 2000). Različite vrijednosti antocijana između istraživanja vjerojatno su posljedica različitih analiziranih sorata te stupnja zrelosti.

Flavonoli

Sojka i suradnici (2016) su određivali flavonole u malinama. Sadržaj flavonola kretao se od 16,9 mg/100 g do 43,8 mg/100 g, što je mnogo manje nego u drugim plodovima *Rosaceae*, poput kupina (otprilike 220 mg/100 g suhe tvari) i aronije (otprilike 110 mg /100 g suhe tvari). U sorti 'Himbo Top' flavonoli su potvrđeni pomoću vezanog sustava tekućinska kromatografija-spektrometar masa i to sljedeći spojevi: kvercetin-3-*O*-galaktozilramnozid, kempferol-3-*O*-glukozid, kempferol-3-*O*-rutinozid, kvercetin-3-*O*-glukozid, kvercetin-3-*O*-galaktozid, kvercetin-3-*O*-rutinozid.
U odnosu na rezultate drugih istraživanja sa drugim sortama analizirani uzorci imali su prosječnu količinu polifenola, značajne razlike između količine polifenola te je utvrđeno kako količina bioaktivnih spojeva ovisi o sorti i voćnoj vrsti.

Tablica 7: Polifenoli u plodu, listu i sjemenci maline

Spojevi	Plod	List	Sjemenka
Ukupni flavonoidi mg QE/100 g svježe tvari	142,81 c ± 13,64	807,29 b ± 39,04	2853,01 a ± 81,97
ukupni fenoli (GAE/ 100 g svježe tvari)	255.70 c ± 12.08	848.89 b ± 77.73	2369.44 a ± 138.66
ukupni antocijani mg cyn-3-glu eq/100 g svježe tvari	38.74 b ± 2.10	/ / /	105.5 a ± 1.5
ukupni flavan-3-oli (GAE/ 100 g svježe tvari)	12.92 b ± 1.94	/ / /	713.64 a ± 28.61
Anova	***	***	***

***- p≤0,01; N.S.- nije signifikantno, / - nije analizirano. Različita slova označavaju signifikantne razlike pri p≤0,01

Iz Tablice 7 vidljivo je kako su najveću količinu flavonoida po gramu svježe tvari imale sjemenke maline, dok su najnižu količinu imali plodovi maline. Rezultati ANOVA-e pokazali su kako postoji značajna razlika između količine polifenola u plodovima, sjemenci i listu.

Tablica 8: Klorofili i karotenoidi u listu maline

UKUPNI KLOFORIL mg /g svježe tvari	
klorofil a	0.72 ± 0.05
klorofil b	0.31 ± 0.02
ukupni klorofil	1.03 ± 0.08
ANOVA	N.S.

UKUPNI KAROTENOIDI β-karoten mg / g svježe tvari	
beta karoten	0.04 ± 0.00

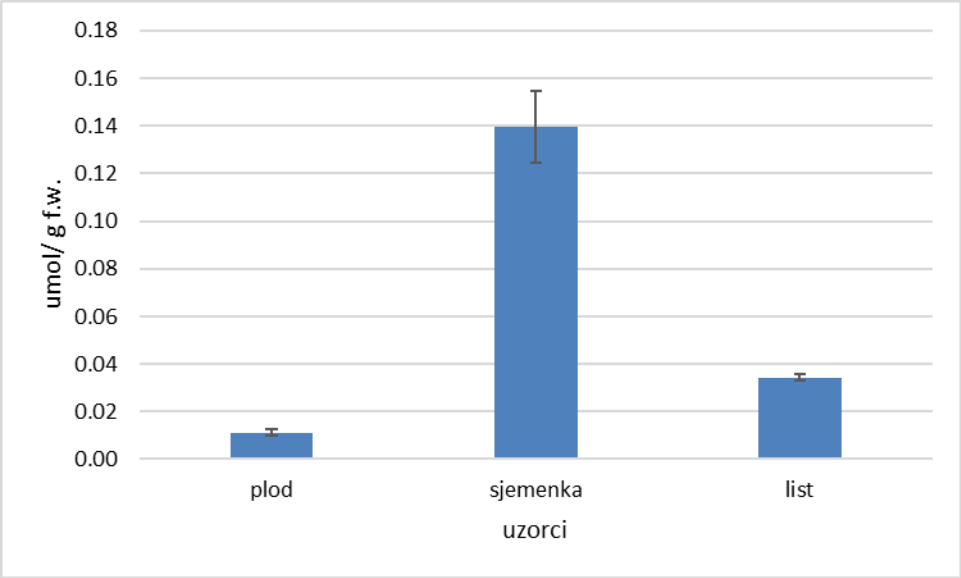
U listu maline određena je slijedeća količina ukupnih fenola te je iznosila 1,03 mg/g. utvrđeno je nešto više klorofila *a* 0,72 mg/g, u odnosu na klorofil *b* 0,31 mg/g. Rezultatima ANOVA-e utvrđeno je kako nije bilo značajne razlike u količini između klorofila *a* i *b* (Tablica 8). Osim klorofila, u listu su određivani i ukupni karotenoidi, čija je prisutnost u listu gotovo zanemariva 0,4 mg/g.

Pomoću metode LC-MS određivani su polifenoli u plodu maline te su identificirani i potvrđeni slijedeći spojevi:

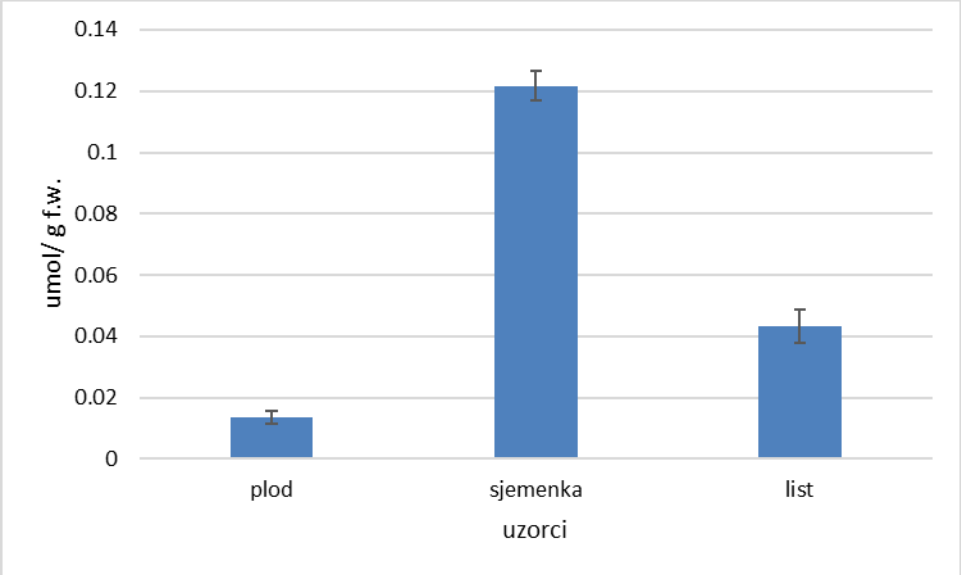
Tablica 9: Identificirani spojevi pomoću LC-MS

Redni broj	Naziv spoja	m/z $[M]^+$	MS^2 Fragmenti iona (m/z)
Antocijani			
1.	Cijanidin-3,5-*O*-glukozid	611	449, 287
2.	Cijanidin-3-*O*-glukozilrutinozid	757	611, 217
3.	Cijanidin-3-*O*-sambubiozid	581	449, 287
4.	Cijanidin-3-*O*-glukozid	449	449,287
5.	Pelargonidin-3-*O*-glukozilrutinozid	741	595, 271
6.	Pelargonidin-3-*O*-rutinozid	579	271
7.	Pelargonidin-3-*O*-glukozid	433	271
Flavonoli			
8.	Kvercetin-3-*O*-galaktozilramnozid	609	463, 301
9.	Kempferol-3-*O*-glukozid	447	285
10.	Kempferol-3-*O*-rutinozid	593	447, 285
11.	Kvercetin-3-*O*-glukozid	463	301
12.	Kvercetin-3-*O*-galaktozid	463	301
13.	Kvercetin-3-*O*-rutinozid	609	463, 301

Od antocijana utvrđeni su cijanidin u obliku 3,5-*O*-glukozida, 3-*O*-glukozilrutinozida, 3-*O*-sambubiozida, 3-*O*-glukozida, i pelargonidin u obliku 3-*O*-glukozilrutinozida, 3-*O*-rutinozida, 3-*O*-glukozida, dok su od flavanola utvrđeni kvercetin u obliku 3-*O*-galaktozilramnozida, 3-*O*-glukozida, 3-*O*-galaktozida, 3-*O*-rutinozida i kempferol u obliku 3-*O*-rutinozida, 3-*O*-glukozida.



Slika 14: Srednje vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta (DPPH) u plodu, sjemenci i listu maline



Slika 15: Srednje vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta (ABTS) u plodu, sjemenci i listu maline

Iz Slike 14 i 15 vidljivo je kako su sjemenke maline imale najveći antioksidacijski kapacitet. Metodom DPPH utvrđeno je kako su sjemenke imale 0,14 µmol/g svježeg uzorka, listovi su imali 0,03 µmol/g svježeg uzorka, dok su plodovi imali najmanji antioksidacijski kapacitet 0,01 µmol/g svježeg uzorka. Pomoću ABTS metode u sjemenkama je utvrđeno 0,12 µmol/g svježeg uzorka, u listovima 0,043 µmol/g svježeg uzorka, dok su plodovi imali najmanji antioksidacijski kapacitet 0,013 µmol/g svježeg uzorka.

5. Zaključak

Rezultatima ovog rada utvrđeno je kako postoji značajna razlika u količini polifenola u svim analiziranim uzorcima. Najveću količinu polifenola imale su sjemenke maline, od kojih je izmjereno najviše flavonoida (2853,03 mg/100 g svježeg uzorka) i fenola (2369,44 mg/100 g svježeg ploda), dok su listovi imali 807,01 mg/100 g svježe tvari flavonoida i 848,89 mg/100 g svježe tvari fenola. Najmanju količinu polifenola imali su plodovi maline, u usporedbi s listovima i sjemenkama. Nije utvrđena značajna razlika između antioksidacijskog kapaciteta u analiziranim uzorcima. Također, nije utvrđena značajna razlika u količini klorofila i karotenoida u listovima maline. Nadalje, pomoću LC-MS metode potvrđena je prisutnost polifenola te su identificirani različiti antocijani i flavonoli u plodu maline. Utvrđeno je kako su listovi i sjemenke bogatiji polifenolima nego plodovi maline te čine vrijedan alternativni prirodni izvor polifenola. LC-MS metoda pokazala se pouzdana za identifikaciju polifenola, te se preporuča korištenje spomenute metode u daljnjoj analizi listova i sjemenki maline. Budući da su bioaktivni spojevi teško dostupni ljudima i u biljkama se nalaze u malim količinama potrebna su daljnja istraživanja njihove biodostupnosti koja bi mogla dati novi pristup u medicini ili prehrambenoj industriji poput ekstrakcije i enkapsulacije bioaktivnih spojeva iz maline.

Popis literature

1. Anttonen, M. J., & Karjalainen, R. O. (2005). Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. Journal of Food Composition and Analysis, 18(8), 759–769. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157505000177> pristupljeno 23.09.2019.
2. Arts et al.(2000) Catechin Contents of Foods commonly consumed in the Nederlands 1. Fruits, Vegetables, Staple Foods and Processed Foods, J. Agric. Food Chem. 48, 5, 1746-1751
3. Badea, G., Lăcătuşu, I., Badea, N., Ott, C., & Meghea, A. (2015). Use of various vegetable oils in designing photoprotective nanostructured formulations for UV protection and antioxidant activity. Industrial Crops and Products, 67, 18–24. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669014008140> pristupljeno 23.09.2019.
4. Beekwilder, J., Hall, R. D., & Ric Vos, C. H. D. (2005). Identification and dietary relevance of antioxidants from raspberry. BioFactors, 23(4), 197–205. <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/biof.5520230404> pristupljeno 23.09.2019.
5. Beekwilder, J., Jonker, H., Meesters, P., Hall, R. D., van der Meer, I. M., & Ric de Vos, C. H. (2005). Antioxidants in Raspberry: On-Line Analysis Links Antioxidant Activity to a Diversity of Individual Metabolites. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(9), 3313–3320. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf047880b> pristupljeno 23.09.2019.
6. Bobinaitė R., Viškelis P. Venskutonis, P. R. 2012. Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (Rubus spp.) cultivars, Food Chem. 132,1495-1501.
7. Bravo, L. (2009). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. Nutrition Reviews, 56(11), 317–333. < https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-abstract/56/11/317/1901722> pristupljeno 23.09.2019.
8. Buricova, L., Andjelkovic, M., Cermakova, A., Reblova, Z., Jurcek, O., Kolehmainen, E., ... & Kvasnicka, F. (2011). Antioxidant capacities and antioxidants of strawberry, blackberry and raspberry leaves. Czech Journal of Food Sciences. <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/37219.pdf> pristupljeno 23.09.2019.
9. Castrejón A., Eichholz I., Rohn S., Kroh L. W., Huyskens-Keil S. 2008. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (Vaccinium corymbosum L.) during fruit maturation and ripening, Food Chem. 109, 564-572.

10. De Souza, V. R., Pereira, P. A. P., da Silva, T. L. T., de Oliveira Lima, L. C., Pio, R., & Queiroz, F. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. Food Chemistry, 156, 362–368. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614001770> pristupljeno 23.09.2019.
11. Dimić, E. B., Vujasinović, V. B., Radocaj, O. F., & Pastor, O. P. (2012). Characteristics of blackberry and raspberry seeds and oils. APTEFF, 43, 1-342. <https://core.ac.uk/download/pdf/26804473.pdf> pristupljeno 23.09.2019.
12. Dujmović Purgar D., Šindrak Z., Voća S., Šnajder I., Vokoruka A., Duralija B. (2007) Rasprostranjenost roda Rubus u Hrvatskoj. Pomologia Croatica 13 (2), 105-114
13. Đilas, S., Čanadanović-Brunet, J., Tumbas, V., & Ćetković, G. (2010). Biološka aktivnost bobičastog voća. Glasnik hemičara, tehnologa i ekologa Republike Srbije, 4, 1-11. <https://glasnik.tf.unibl.org/wp-content/uploads/2017/09/G_2010_B4_R1.pdf> pristupljeno 23.09.2019.
14. Europsak medicinska agencija. European Medicinal Agency (2019)
15. FAO, FAOSTAT (2019)
16. Ferlemi, A.-V., & Lamari, F. (2016). Berry Leaves: An Alternative Source of Bioactive Natural Products of Nutritional and Medicinal Value. Antioxidants, 5(2), 17. <https://sci-hub.tw/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4931538/> pristupljeno 23.09.2019.
17. Giovanelli G., Buratti S. 2009. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties, Food Chem. 112, 903908.
18. GL Grune (2015) <https://patents.google.com/patent/US9095522B2/en> pristupljeno 23.09.2019.
19. Graham J., Smith K., Tierney I., MacKenzie K. i Hackett C.A. (2006) Mapping gene H controlling cane pubescence in raspberry and its association with resistance to cane botrytis and spur blight, rust and cane spot. Theor Appl Gene 112: 818–831
20. Hummer, K. E., Peacock, D. N. (1994.): Seed Dimension and Weight of Selected Rubus Species. HortScience. 29.9: 1034-1036.
21. Kähkönen, M., Kylli, P., Ollilainen, V., Salminen, J.-P., & Heinonen, M. (2012). Antioxidant Activity of Isolated Ellagitannins from Red Raspberries and Cloudberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(5), 1167–1174. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22229937> pristupljeno 23.09.2019.
22. Kazazić, S. P. (2004). Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 55(4), 279-290.
23. Keep, E. 1968. Incompatibility in Rubus with special reference to R. idaeus L. Canadian Journal of Genetic Cytology. 10: 253-262.

24. Kremer D., Kušić Tomaić I. (2015). Od sjemenke do ploda, Zagreb: Javna ustanova „Naionalni Park Sjeverni Velebit“
25. Kurtagić, H., Redžić, S., Memić, M., & Sulejmanović, J. (2013). Identification and quantification of Quercetin, Naringenin and Hesperetin by RP LC–DAD in honey samples from B&H. Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina, 40, 25-30.
26. Määttä-Riihinen, K. R., Kamal-Eldin, A., & Törrönen, A. R. (2004). Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Berries ofFragariaandRubusSpecies (Family Rosaceae). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(20), 6178–6187. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15453684> pristupljeno 23.09.2019.
27. Maslov, L. (2014). Određivanje polifenola, indol-3-octene kiseline i 2-aminoacetofenona u vinima tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (Disertacija). <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:282243> pristupljeno 23.09.2019.
28. Microsoft Excel. Ver. 2019 (2019). Microsoft Office 365
29. Ministarstvo poljoprivrede i vodnog gospodarstva (2019)
30. Nikolić D., Milivojević J. M. (2015) Jagodaste voćke – tehnologija gajenja, Beograd: Biograf d.o.o
31. 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. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814699002605> pristupljeno 23.09.2019.
32. Pantelidis, G., Vasilakakis, M., Manganaris, G., & Diamantidis, G. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. Food Chemistry, 102(3), 777–783.
33. Promo Fruit Ltd. (2019) <http://www.promo-fruit.ch/en/himbotop_beschreibung.php> pristupljeno 23.09.2019.
34. Promo Ltd. (2005) <https://patents.google.com/patent/USPP19512P3/en> pristupljeno 23.09.2019.
35. Rothwell JA, Pérez-Jiménez J, Neveu V, Medina-Ramon A, M'Hiri N, Garcia Lobato P, Manach C, Knox K, Eisner R, Wishart D, Scalbert A. (2013) Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. Database, 10.1093/database/bat070 <http://phenol-explorer.eu/contents/food/67> pristupljeno 23.09.2019.
36. Sariburun, E., Şahin, S., Demir, C., Türkben, C., & Uylaşer, V. (2010). Phenolic Content and Antioxidant Activity of Raspberry and Blackberry Cultivars. Journal of Food Science, 75(4), C328–C335.
37. SAS Enterprise Miner 13.1. SAS Institute Inc., Cary, NC. (2019)
38. Skendrović Babojelić, M., & Zečević, A. (2019). Morfološka karakterizacija sjemenki jagodastih voćnih vrsta. Pomologia Croatica, 22(3-4), 109–122.

39. Sojka et al.(2016)Transfer and Mass Balance of Ellagitannins, Anthocyanins, Flavan-3-ols, and Flavonols during the Processing of Red Raspberries (Rubus idaeus L.) to Juice, J. Agric. Food Chem. 64, 5549−5563
40. Šućurović, A., Vukelić, N., Ignjatović, Lj., Brčeski, I. and Jovanović, D.: Physicalchemical characteristics and oxidative stability of oil obtained from lyophilized raspberry seed. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 111, 11 (2009) 1133-1141.
41. Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. Nutrients, 2(12), 1231–1246. <https://sci-hub.tw/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22254006> pristupljeno 23.09.2019.
42. United States Department of Agriculture (USDA). (2019) <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/09302> pristupljeno 23.09.2019.
43. Wang, S. Y., & Lin, H.-S. (2000). Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(2), 140–146. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10691606> pristupljeno 23.09.2019.
44. Žlabur, J. Š., Voća, S., Dobričević, N., Pliestić, S., Galić, A., Skendrović-Babojelić, M., & Petrović, M. (2016, January). The usability potential of raspberry organic residue. In 5. Simpozij s međunarodnim sudjelovanjem Kopački rit jučer, danas, sutra 2016.. <https://www.bib.irb.hr/838199?rad=838199> pristupljeno 23.09.2019.

6. Prilog

Tablica 1: Količine polifenola u plodu maline (Phenol-Explorer, 2013)

Flavonoidi	
Antocijani	
Cijanidin (mg/100 g svježe tvari)	0,53
Cijanidin 3-O-glukozid (mg/100 g svježe tvari)	14,89
Cijanidin 3-O-glukozil-rutinozid (mg/100 g svježe tvari)	7,06
Cijanidin 3-O-rutinozid (mg/100 g svježe tvari)	5,20
Cijanidin 3-O-sporozid (mg/100 g svježe tvari)	37,61
Delfinin 3-O-glukozid (mg/100 g svježe tvari)	0,21
Malvidin 3-O-glukozid (mg/100 g svježe tvari)	0,62
Pelargonidin 3-O-glukozid (mg/100 g svježe tvari)	1,65
Pelargonidin 3-O-glukozil-rutinozid (mg/100 g svježe tvari)	0,82
Pelargonidin 3-O-rutinozid (mg/100 g svježe tvari)	0,42
Pelargonidin 3-O-sporozid (mg/100 g svježe tvari)	3,46
Flavanoli	
(-)-Epikatehin (mg/100 g svježe tvari)	5,05
(+)-katehin (mg/100 g svježe tvari)	0,58
Procyanidin dimer B2 (mg/100 g svježe tvari)	0,10

Flavonoli	
Kempeferol (mg/100 g svježe tvari)	2,14e-03
Kempeferol 3-O-glukozid (mg/100 g svježe tvari)	1,03
Kvercetn (mg/100 g svježe tvari)	0,02
Kvercetin 3-O-glukozid (mg/100 g svježe tvari)	3,58
Kvercetin 3-O-glukoronid (mg/100 g svježe tvari)	0,63
Kvercetin 3-O-rutinozid (mg/100 g svježe tvari)	11,00
Fenolne kiseline	
hidroksibenzoične kiseline	
sanguiina H-6 (mg/100 g svježe tvari)	76,10
lambertinina C (mg/100 g svježe tvari)	30,84
elaginska kiselina arabinosid (mg/100 g svježe tvari)	0,20
elaginska kiselina (mg/100 g svježe tvari)	2,12
elaginska kiselina acetil-arabinosid (mg/100 g svježe tvari)	2,27
elaginska kiselina arabinosid-ksiloid (mg/100 g svježe tvari)	0,36
hidroksicinamične kiseline	
p-kafeliquinske kiseline (mg/100 g svježe tvari)	0,57
p-kumarinske kiseline (mg/100 g svježe tvari)	2,30e-04
p-kumarinske kiseline 4-O-glukozid (mg/100 g svježe tvari)	0,32

Životopis

Milena Jenić, rođena je 07. lipnja 1994. godine u Vranju. Pohađala je XI. opću gimnaziju od 2009. do 2014 kada upisuje Agronomski fakultet na Sveučilištu u Zagrebu. Završava preddiplomski studij Hortikultura 2016. godine s temom završnog rada 'Oplemenjivanje bobičastog voća' te dobiva titulu sveučilišne prvostupnice inženjerke agronomije. 2016. godine upisuje diplomski studij Hortikultura, usmjerenje Voćarstvo na kojem je i danas. Tijekom studija aktivna je u izvannastavnoj voćarskoj grupi prof. Martine Skendrović Babojelić, a sudjelovala je i na raznim događanjima u sklopu fakulteta: Dan očaranosti biljkama, Dan otvorenih vrata, AgrostartUp konferencijama, 13. znanstveno-stručno savjetovanje voćara u Daruvaru 2018. godine kao student izlagač s temom 'Biljni regulatori i biostimulatori u voćarstvu'. Sudjelovala je i na van fakultetskoj konferenciji ISC GREEN 2018. godine s plakatom 'Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from raspberry (*Rubus idaeus* L.)'. 2018. godine odlazi na Erasmus+ stručnu praksu u NIAB EMR, Kent, Ujedinjeno Kraljevstvo gdje ostaje 6 mjeseci. Nakon toga, 2019. godine odlazi na Erasmus+ studijski boravak na BOKU, Beč, Austrija gdje ostaje 5 mjeseci. Aktivna je kao samostalni korisnik na računalu, ima stečene komunikacijske vještine, naučena je na individualni i timski rad te je dobro prilagođena na okolinu. Ima B2 razinu engleskog jezika, A1 razinu talijanskog jezika te pasivno uči španjolski, ruski i njemački.