

UNIVERZITET U BEOGRADU - HEMIJSKI FAKULTET

Marija R. Koprivica

HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA SEMENA BRESKVE
(*Prunus persica* L.)

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE - FACULTY OF CHEMISTRY

Marija R. Koprivica

**THE CHEMICAL CHARACTERIZATION OF PEACH
KERNELS (*Prunus persica* L.)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

Mentor: dr **Duška Milojković-Opsenica**, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

Članovi komisije: dr **Jelena Trifković**, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

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

dr **Mirjana Stojanović**, naučni savetnik
Institut za tehnologiju nuklearnih i
drugih mineralnih sirovina - ITNMS

Datum odbrane:

U Beogradu, _____ 2019.

Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za Analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu pod mentorstvom dr Dušanke Milojković-Opsenice, redovnog profesora Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Želim da joj se i ovom prilikom najiskrenije zahvalim što mi je omogućila da se bavim ovom aktuelnom temom, na stručnoj pomoći, strpljenju i sugestijama koje mi je pružila tokom eksperimentalnog rada i pisanja ove teze.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Jeleni Trifković, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta, na pokazanom interesovanju, korisnim savetima, smernicama i stručnoj pomoći prilikom izrade ove disertacije.

Srdačno se zahvaljujem dr Milici Fotirić Akšić, vanrednom profesoru Poljoprivrednog fakulteta, na korisnim sugestijama pri završnoj izradi rada.

Veliku zahvalnost dugujem dr Mirjani Stojanović, naučnom savetniku, kao i svojim kolegincama iz Instituta za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina dr Jeleni Petrović, dr Mariji Petrović, mast. inž. tehnol. Mariji Kojić, dipl. hem. Snežani Zildžović, Dobrili Janković, Ljiljani Petronijević na ukazanom poverenju i podršci.

Takođe želim da se zahvalim dr Petru Ristivojeviću, dr Urošu Gašiću, dr Aleksandri Radoičić, mast. hem. Aleksandri Dramićanin na pomoći tokom različitih faza ovog istraživanja.

I naravno, najveću zahvalnost dugujem mojim roditeljima, sestri Mirjani, suprugu Dušanu i ćerki Marini, bez njihove podrške i ljubavi ne bih mogla da istrajem do kraja, zato im posvećujem ovaj rad.

IZVOD

Istraživanjima u okviru ove doktorske disertacije na osnovu sadržaja pojedinih fitohemikalija izvršena je hemijska karakterizacija semena 25 sorti/genotipova breskve različitog genetičkog i geografskog porekla gajenih pod istim klimatskim uslovima na teritoriji Srbije u okviru kolekcije oglednog dobra „Radmilovac” Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

U cilju utvrđivanja sličnosti i razlika između pojedinih genotipova breskve, kao i određivanja potencijalnih biomarkera njihovog genetičkog i geografskog porekla, istraživanja su obuhvatila analizu varijabilnosti standardnih sorti (poreklom iz SAD i Italije), perspektivnih hibrida (nastalih ukrštanjem standardnih sorti) i nekoliko genotipova vinogradarske breskve kao autohtone sorte iz Srbije. Osim podele po poreklu, ispitivani genotipovi breskve razlikovali su se i po vremenu sazrevanja ploda.

Gasna hromatografija sa plameno-jonizacionim detektorom (*Gas Chromatography with Flame Ionization Detector, GC-FID*) korišćena je za određivanje sastava masnih kiselina u uzorcima semena breskve. Bez obzira na različitost između genotipova, ulje semena breskve ima sličan sastav masnih kiselina koji se najvećim delom sastoji od nezasićenih masnih kiselina, oleinske i linolne kiseline. Razlika između sorti/genotipova breskve se ogleda samo u razlici u procentualnim koncentracijama najzastupljenijih masnih kiselina. Ulje semena breskve ima nizak ukupni sadržaj zasićenih masnih kiselina, manji od 15%, i to uglavnom sadrži palmitinsku i stearinsku kiselinu. Fenolni profil semena breskve određen je ultra-visokoeffikasnom tečnom hromatografijom spregnutom sa hibridnim masenim spektrometrom (*Ultra High-Performance Liquid Chromatography coupled with a hybrid mass spectrometer - Linear Trap Quadrupole and OrbiTrap mass analyzer, UHPLC-LTQ OrbiTrap MS/MS*). U uzorcima semena breskve detektovane su različite klase fenolnih jedinjenja i nekoliko organskih kiselina sa manjim brojem C-atoma. Od fenolnih jedinjenja semena breskve u najvećoj količini sadrže katehin i šest fenolnih kiselina: protokatehuinsku, *p*-hidroksibenzoevu, *p*-hidroksifenilsirćetnu, hlorogenu, *p*-kumarinsku i ferulinsku kiselinu. Kvantifikacija saharida izvršena je upotrebom visoko-efikasne anjonske hromatografije sa elektrohemijском detekcijom (*High-Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD*). Rezultati ove studije pokazuju da svaki

pedigre (standardne sorte, perspektivni hibridi, vinogradarske breskve) ima jedinstven odnos najbitnijih šećera u semenu - glukoze, fruktoze i saharoze.

Dobijeni podaci statistički su obrađeni primenom multivarijantnih hemometrijskih metoda koje obuhvataju analizu glavnih komponenata (*Principal Component Analysis* - PCA), kategorijsku analizu glavnih komponenata (*CATegorical Principal Component Analysis* - CATPCA), kao i metodu delimičnih najmanjih kvadrata sa diskriminantnim pristupom (*Partial Least Square-Discriminant Analysis*, PLS-DA). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da se sastav masnih kiselina semena breskve, kao i njihov fenolni i šećerni profil mogu koristiti kao parametri za procenu autentičnosti, odnosno za međusobnu diskriminaciju različitih sorti i genotipova breskve. Takođe, ekstrakti semena su značajan izvor masnih kiselina, fenolnih jedinjenja i šećera i mogli bi se koristiti u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

Ključne reči: seme breskve; masne kiseline; fenoli; šećeri; GC-FID; LC-MS; HPAEC-PAD; multivarijantna analiza; poreklo; vreme zrenja ploda.

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Analitička hemija

ABSTRACT

The investigations in scope of this doctoral dissertation were based on the content of a several phytochemicals and it comprised chemical characterization of kernels of 25 peach cultivars/genotypes differing in genetic and geographical origin cultivated under the same climatic conditions in the territory of Serbia within a collection of the „Radmilovac” Experimental Station of the University of Belgrade - Faculty of Agriculture.

In order to determine the similarities and differences between the individual cultivars/genotypes of the peach, as well as to identify potential biomarkers of their genetic and geographical origin, the research included an analysis of the variability of standard cultivars (originating in the USA and Italy), promising hybrids (created by standard cultivars cross-breeding) and several vineyard peach genotypes as autochthonous cultivars from Serbia. Except from this division, the examined genotypes of the peach differed according to the ripening time.

Gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) was used to determine the composition of fatty acids in samples of the peach kernels. Regardless of the difference between genotypes, the peach kernel oil has the similar fatty acid composition, which the most consists of unsaturated fatty acids, oleic and linoleic acids. Variation between varieties/genotypes of peach is only seen in the difference in the percentage concentrations of the most abundant fatty acids. The kernel oil has a low total saturated fatty acid content less than 15%, which is mainly composed of palmitic and stearic acids. The phenolic profile of peach kernels was determined by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with a hybrid mass spectrometer (UHPLC-LTQ OrbiTrap MS/MS). In samples of peach kernels, different classes of phenolic substances and several organic acids with small number of C atoms were detected. Among phenolic compounds, the most abundant in peach seeds were catechin and six phenolic acids: protocatechuic, *p*-hydroxybenzoic, *p*-hydroxyphenylacetic, chlorogenic, *p*-coumaric and ferulic acids. The quantification of saccharides was performed using high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). Results from this study revealed that each pedigree (standard cultivars, promising hybrids and vineyard peaches) has unique ratio of the most important sugars in kernels – glucose, fructose and sucrose.

The obtained data were statistically processed using multivariate chemometric methods that included the Principal component analysis (PCA), the Categorical principal component analysis (CATPCA), and the Partial least square-discriminant analysis (PLS-DA). The results of this study showed that the composition of fatty acids of peach kernels, as well as their phenolic and sugar profiles, can be used as parameters for the assessment of authenticity, that is, for the mutual discrimination of different varieties and genotypes of peach. Also, extracts of the kernel are a significant source of fatty acids, phenolic compounds and sugars and could be used in the food, pharmaceutical and cosmetic industries.

Keywords: peach kernel; fatty acids; phenols; sugars; GC-FID; LC-MS; HPAEC-PAD; multivariate analysis; origin; ripening time of fruit.

Scientific field: Chemistry

Field of Academic Expertise: Analytical Chemistry

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPŠTI DEO.....	5
2.1. Otpadni materijal iz poljoprivrede i prehrambene industrije.....	5
2.2. Poreklo, klasifikacija, gajenje breskve i upotrebna vrednost ploda breskve	7
2.3. Fiziologija klijanja semena	11
2.4. Hemijski sastav semena breskve.....	11
2.4.1. Masne kiseline	12
2.4.2. Fenolna jedinjenja.....	14
2.4.3. Šećeri.....	17
2.4.4. Cijanogeni glikozidi.....	19
2.5. Analitičke metode za ispitivanje hemijskog sastava semena breskve.....	21
2.5.1. Hromatografske metode.....	21
2.5.2. Masena spektrometrija	23
2.5.3. Gasna hromatografija sa plameno-jonizacionim detektorom (GC-FID)	24
2.5.4. Tečna hromatografija - masena spektrometrija (LC-MS).....	27
2.5.5. Visokoeфикасна jonoizmenjivačka hromatografija (HPIEC)	30
2.6. Hemometrijske metode	33
2.6.1. Analiza glavnih komponenata	34
2.6.1.1. Kategorijska analiza glavnih komponenata.....	35
2.6.2. Metoda delimičnih najmanjih kvadrata sa diskriminantnim pristupom.....	37
2.7. Autentičnost hrane	38
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	41
3.1. Uzorci semena breskve	41
3.2. Određivanje fizičkih karakteristika semena breskve	43
3.2.1. Određivanje sadržaja vode	44
3.3. Određivanje hemijskih karakteristika semena breskve	44
3.3.1. Reagensi i standardi	44
3.3.2. Sekvencijalna ekstrakcija pojedinih fitohemikalija iz semena breskve.....	45
3.3.3. Određivanje masnih kiselina u uzorcima semena breskve	47
3.3.4. Određivanje fenolnog profila u uzorcima semena breskve.....	48

3.3.5.	Određivanje šećernog profila u uzorcima semena breskve.....	50
3.3.5.1.	Indeks slatkoće.....	51
3.3.6.	Statistička analiza podataka.....	52
4.	REZULTATI I DISKUSIJA.....	53
4.1.	Fizičke karakteristike i sadržaj vode u uzorcima semena breskve	53
4.2.	Sadržaj masnih kiselina u semenu breskve.....	56
4.2.1.	Multivarijantna analiza semena breskve na osnovu sadržaja masnih kiselina.....	62
4.3.	Fenolni profil semena breskve.....	63
4.3.1.	Kvalitativna analiza fenolnih jedinjenja u uzorcima semena breskve	63
4.3.1.1.	Identifikacija fenolnih kiselina i njihovih derivata.....	68
4.3.1.2.	Identifikacija flavonoidnih aglikona	68
4.3.1.3.	Identifikacija fenolnih glikozida	70
4.3.1.4.	Identifikacija ostalih fenolnih i organskih jedinjenja	71
4.3.2.	Kvantitativna analiza fenolnih jedinjenja u uzorcima semena breskve.....	72
4.3.3.	Multivarijantna analiza semena breskve na osnovu fenolnog profila.....	78
4.4.	Šećerni profil semena breskve.....	80
4.4.1.	Indeks slatkoće.....	87
4.4.2.	Multivarijantna analiza semena breskve na osnovu šećernog profila.....	88
4.5.	Rezultati PCA analize dobijeni na osnovu svih ispitivanih fitohemikalija	91
5.	ZAKLJUČAK.....	93
6.	LITERATURA.....	97
7.	PRILOG.....	113

1. UVOD

U poslednje vreme raste interesovanje i potreba za efikasnijim iskorišćavanjem poljoprivrednih i prehrambenih sporednih proizvoda. Ovi prirodni, organski materijali mogu imati visok potencijal za dalju upotrebu u mnogim industrijskim oblastima pri čemu bi se istovremeno rešili problemi skladištenja biološkog otpada i zagađenja životne sredine. Otpadna biomasa nastala preradom voća i povrća može predstavljati značajan izvor različitih fitohemikalija, šećera, esencijalnih ulja, proteina, minerala, polifenola i mnogih drugih bioaktivnih jedinjenja. Da bi se ekonomski iskoristili sporedni proizvodi prehrambene industrije, prvenstveno je neophodno poznavati njihov hemijski sastav i druge bitne karakteristike.

Prilikom proizvodnje sokova, alkoholnih pića, marmelada, kompota, konzervirane hrane, velika količina koštica i semena voća (naročito breskve, kajsije i šljive) se odbacuje a trenutno ne postoji sistem njihovog prikupljanja i dalje upotrebe^[1]. Mnoga nedavna ispitivanja pokazala su da semena voća imaju visok sadržaj esencijalnih masnih kiselina koje su neophodne za različite fiziološke funkcije u ljudskom organizmu. Takođe, u semenima su prisutna dijetetska vlakna, prirodni antioksidansi, steroli, tokoferoli, fenolna jedinjenja kao i druge fitohemikalije koje imaju blagotvorno dejstvo na zdravlje ljudi.

Breskva (*Prunus persica* L.) je treća voćna vrsta po važnosti u umereno kontinentalnom klimatu, odmah posle jabuke i kruške. U povoljnim klimatskim uslovima i pri korišćenju odgovarajućih sistema gajenja brzo se razvija i obilno plodonosi dajući kvalitetan plod atraktivnog izgleda i ukusa sa dobrim nutritivnim svojstvima^[2]. Otporna je na veliki broj bolesti i štetočina i otporna je prema suši. Danas postoji oko 6000 različitih sorti i mnogo aktivnih programa oplemenjivanja breskve širom sveta što je uticalo da breskva ima jedan od najdinamičnijih sortimenata^[3]. U Srbiji breskva je na petom mestu po broju stabala posle šljive, jabuke, kruške i višnje. Breskva se najviše upotrebljava u stonjoj potrošnji, ali se takođe i prerađuje^[3]. Nažalost, ne postoje podaci o iskorišćavanju pokožice i koštice koje postaju industrijski otpad.

Pored klimatske adaptacije, glavni cilj programa oplemenjivanja breskve je dobijanje tolerantnih ili otpornih sorti na dejstvo različitih abiotičkih i biotičkih faktora čime bi se smanjili problemi i troškovi u proizvodnji. Da bi se stvorila nova sorta breskve, poboljšanih

fizičkih i hemijskih svojstava, oplemenjivački programi prikupljaju i čuvaju u svojim kolekcijama različite, već stvorene, sorte koje se koriste za dalja ukrštanja. Takođe, jako je važno da se sačuvaju autohtoni genotipovi, kao što je vinogradarska breskva u Srbiji, koji mogu da budu nosioci gena otpornosti prema nepovoljnim uslovima gajenja ili nekim štetočinama. Opšta svest o važnosti alternativnih genetskih resursa kao izvora novih gena i alela je u stalnom porastu zbog relativno niskog nivoa genetske varijacije vodećih svetskih sorti breskve koje dele samo nekoliko zajedničkih predaka^[4]. Istraživanja povezana sa hemijskom karakterizacijom semena breskve mogu poboljšati selekciju roditelja u oplemenjivačkom programu pri čemu bi se uzgajale sorte sa višim sadržajem bioaktivnih i nutritivno značajnih jedinjenja.

Seme breskve je atraktivan otpadni materijal koji, bez obzira na raznolikost sorti, može biti dragocen izvor korisnih fitohemikalija pogodnih za ljudsku upotrebu. Trenutno se, u manjoj meri, koristi kao ekološko biogorivo visoke kalorične vrednosti koje sagorevanjem emituje manje oksida sumpora i ugljen-dioksida u atmosferu nego spaljivanje uglja, zatim se koristi i kao lignin-celulozna sirovina za dobijanje aktivnog uglja, u proizvodnji celuloze i papira^[5]. Ekstrahovano ulje semena breskve se dosta koristi u raznim kozmetičkim preparatima, sapunima, kremama i šamponima^[6]. Seme breskve ima visoki antioksidativni potencijal i sposobnost da inhibira enzime vezane za gojaznost, dijabetes tipa 2 i Alchajmerovu bolest^[5]. Ove pozitivne karakteristike breskve pripisane su prisustvu polimernih procijanidina, hidroksicinaminskih kiselina, karotenoida i cijanogenih glikozida^[5]. Zahvaljujući ovim jedinjenjima seme breskve bi moglo da bude dragocen izvor polifenola koji se koriste u farmaceutskoj industriji, za proizvodnju dijetetske hrane, za podršku u prevenciji hroničnih nezaraznih bolesti, itd. Terapijska svojstva semena breskve se cene zbog delovanja kao antimikotik i baktericid^[5]. U tradicionalnoj kineskoj medicini seme breskve se koristi kao jedan od biljnih sastojaka za izradu leka protiv ateroskleroze^[7] i kardiovaskularnih bolesti^[8]. Međutim, pozitivna svojstva na zdravlje im se pripisuju na osnovu određenih zapažanja a ne na dokazima zasnovanim na naučnim ispitivanjima. Osim kao biogorivo, u proizvodnji papira, u tradicionalnom lečenju i kozmetici, seme breskve dodatno se koristi u konditorskoj industriji za proizvodnju persipana (zamena za skuplji marcipan)^[9] i u životinjskoj ishrani^[10].

Za razliku od jestivog dela ploda breskve koji je dosta ispitan, malo ima dostupne literature o koštici i semenu. S obzirom da se seme breskve, za sada, smatra nepotrebnim i bezvrednim za ljudsku upotrebu, analiza fitohemikalija i detaljnije ispitivanje hemijskog

sastava semena breskve mogu povećati interesovanje za ovim prirodnim materijalom i omogućiti njegovo korišćenje u ishrani ili u prevenciji i lečenju od nekih oboljenja. U najvećem broju istraživanja ispitivana je uljana frakcija semena breskve, dok za domaće sorte/genotipove podataka gotovo da i nema. Osim toga, sadržaj pojedinih fitohemikalija u semenima breskve još uvek nije sistemski ispitan. Zbog toga je cilj ove doktorske disertacije fizička i hemijska karakterizacija semena breskve, odnosno određivanje fitohemijskog profila semena breskve pre svega sadržaja masnih kiselina, fenolnih jedinjenja i šećera u statistički značajnom broju genotipova breskve. U cilju definisanja sličnosti i razlika između pojedinih sorti i genotipova breskve, kao i određivanja potencijalnih biomarkera njihovog genetičkog i geografskog porekla, primenjene su multivarijantne hemometrijske metode.

Ova istraživanja mogu biti od velikog značaja sa aspekta većeg iskorišćenja poljoprivrednog otpada, kao i poboljšanja ekonomske efikasnosti pri upotrebi voća. Semena sorti, odnosno genotipova breskve, koja imaju visok sadržaj fitohemikalija mogu se opravdano iskoristiti za dobijanje dijetetskih dodataka ishrani u cilju proizvodnje funkcionalne hrane. Samo u toku 2017. godine prinos ploda breskve u Srbiji bio je 54.585 t^[11]. Ako uzmemo u obzir da je prosečni udeo koštice u plodu 8%^[12,13] odbačeno je i skladišteno kao otpad 4.366,8 t koštica breskve koja bi mogla, uz odgovarajuću obradu endokarpa, da se dalje iskoriste kao izvor fitohemikalija u prehrambene, kozmetičke ili farmaceutske svrhe. Takođe, poznavanje hemijskog sastava semena breskve može pomoći da se utvrdi njeno nutritivna vrednost koja se kasnije može iskoristiti u selekciji i ukrštanju sorti u oplemenjivačkim programima u cilju dobijanja genotipova sa uvećanim sadržajem fitohemikalija

Vrsta i količina fitohemikalija u voću, osim njihovom genetskom osnovom i načinom proizvodnje, određene su i geografskim faktorima, pa je tako ispitivanje fitohemijskog profila semena sorti breskve koje se gaje u Srbiji važno i u pogledu zaštite geografskog porekla i procene autentičnosti. Određivanje autentičnosti hrane i njeno poreklo je ključno pitanje u kontroli kvaliteta i sigurnosti namirnica. Ispitivanje razlika u sastavu fitohemijskih biomarkera semena breskve poreklom iz različitih zemalja i čiji plodovi sazrevaju u različitom periodu može biti od pomoći za odgovarajuću klasifikaciju proizvoda, odnosno zaštitu autentičnosti breskve na tržištu.

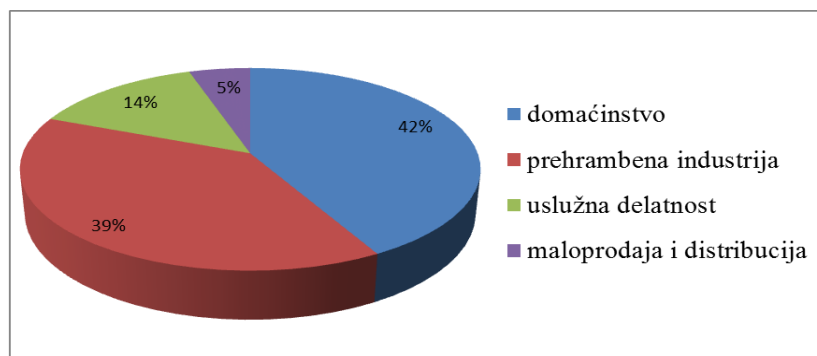
U ovoj doktorskoj disertaciji po prvi put je upotrebljena kombinacija eksperimentalnih podataka dobijenih gasnom, tečno-masenom i jonskom hromatografijom sa različitim metodama multivarijantne, hemometrijske analize u cilju hemijske karakterizacije semena breskve i definisanja genetičkog i geografskog porekla breskve. Po prvi put se koristi UHPLC-LTQ OrbiTrap MS/MS tehnika u cilju identifikacije i kvantifikacije organskih jedinjenja semena breskve i njihova primena u multivarijantnoj CATPCA analizi. Dodatno, po prvi put su detaljno analizirani, odnosno kvantifikovani saharidi u semenu breskve a multivarijantne analize PCA i PLS-DA su primenjene za klasifikaciju sorti/genotipova breskve prema sadržaju šećera.

2. OPŠTI DEO

2.1. Otpadni materijal iz poljoprivrede i prehrambene industrije

U svetu se sve više pažnje posvećuje korišćenju sporednih proizvoda i otpada nastalog iz proizvodnje prehrambene industrije i poljoprivrede^[14]. Upotreba ovih proizvoda doprinosi maksimalnom raspolaganju resursima koji imaju veliki potencijal za proizvodnju biogoriva, biorazgradive plastike, đubriva, enzima, bioaktivnih jedinjenja, raznovrsnije hrane i dodataka ishrani^[14,15,16]. Osim dobiti u vidu korisnih resursa, na ovakav način se može rešiti problem sa odlaganjem kao i pravilnijim upravljenjem i recikliranjem velike količine otpada pri čemu se smanjuje ekološko zagađenje i rizik po ljudsko zdravlje.^[15,16]

U 2011. godini procenjeno je da na svetu postoje dve milijarde čvrstog, komunalnog otpada kojem dominantan doprinos daje otpad od hrane (od 25% do 70%). Očekuje se da će ta količina otpada znatno porasti zbog brze urbanizacije, industrijalizacije i rasta populacije^[15]. Proizvodnja otpada pokriva ceo ciklus hrane - iz poljoprivrede, industrijske proizvodnje i prerade, maloprodaje i potrošnje u domaćinstvima. U razvijenim zemljama 42% otpada se proizvodi u domaćinstvima, 39% se javlja tokom industrijske prerade hrane, 14% u prehrambenom, uslužnom sektoru a preostalih 5% u maloprodaji i distribuciji (Slika 1)^[17]. Prema Organizaciji za hranu i poljoprivredu (*Food and Agricultural Organization - FAO*) jedna trećina hrane proizvedene u svetu je izgubljena u lancu snabdevanja i u mnogim zemljama otpad od hrane se trenutno odlaže na deponije ili se spaljuje zajedno sa drugim komunalnim otpadom. Nažalost, i pored ova dva postupka rešavanja otpada sve više se javljaju ekonomski i ekološki problemi.^[18]



Slika 1. Procentualni odnos izvora otpada od hrane^[17]

Iako su potrošači sve više svesni uzroka zdravstvenih problema i pozitivnog uticaja pravilne ishrane na zdravlje, veliki deo stanovništva nema dovoljan unos voća i povrća. Dijetetski dodaci ishrani mogu biti alternativan put za unos biljnih komponenata koje mogu imati zdravstvene benefite^[19]. Poslednjih godina raste potreba i interesovanje za pronalaženje fitohemikalija iz otpada hrane, biljnog materijala, koje mogu biti prirodna zamena sintetičkim supstancama u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji^[20]. Briga potrošača o bezbednosti hrane dovela je do ideje da se sintetičke supstance za koje se sumnja da imaju negativan efekat po ljudsko zdravlje zamene prirodnim, biljnog porekla^[19,20]. Mnoge nedavne studije pokazale su da su voće i povrće glavni izvor supstanci koje su biološki bitna jedinjenja sa zdravstvenim prednostima, koje sprečavaju ili odlažu nastanak hroničnih bolesti a dodatno zadovoljavaju osnovne potrebe u ishrani.^[19,20] Poznato je da sporedni proizvodi nastali obradom voća, povrća i žitarica predstavljaju značajan izvor šećera, proteina, esencijalnih ulja, organskih kiselina, minerala, dijetetskih vlakana i drugih bioaktivnih jedinjenja poput raznovrsnih polifenola.^[20]

Voće iz umereno-kontinentalne klimatske zone se obično karakteriše velikim, jestivim, mesnatim delom ploda i umerenom količinom otpadnog materijala kao što su pokožica, koštica i seme, dok znatno veća količina nusproizvoda nastaje iz prerade tropskog i suptropskog voća^[19]. Rast proizvodnje i potrošnje voćnih proizvoda kao što su voćni sokovi, marmelade, pulpe i koncentri je sve veći zbog boljeg transporta, distribucije kao i poboljšanih metoda prerade i skladištenja. Usled povećane proizvodnje, odlaganje otpada predstavlja rastući problem jer je biljni materijal sklon mikrobiološkom kvarenju. Sa druge strane, troškovi sušenja i skladištenja nastalih nusproizvoda su ekonomski ograničavajući faktori zbog čega je u opštem interesu da se agro-industrijski otpad koristi u daljoj proizvodnji hrane, đubriva, lekova, biogoriva i sl. Zato je pronalazak efikasnih i jeftinih metoda i načina iskorišćenja od velike važnosti za ekološku kao i ekonomsku profitabilnost.^[19]

Breskva je jedna od najrasprostranjenijih voćnih vrsta umereno-kontinentalne klimatske zone koja se najviše uzgaja u svetu, pored jabuke i kruške^[2]. Plod breskve se, pored potrošnje u svežem stanju, u velikoj količini koristi u cilju proizvodnje sokova, kompota, džemova, marmelada, osušene i konzervirane breskve. Obrada ploda breskve je izvor otpadnog materijala uglavnom sačinjenog od koštice i pokožice^[1]. Koštica ploda breskve se sastoji od tvrdog endokarpa i semena sa visokim sadržajem proteina i drugih, nutritivno bitnih jedinjenja. Samim tim, seme breskve može predstavljati jeftin izvor fitohemikalija koje

imaju pozitivan uticaj na telesne funkcije i na zdravlje ljudi i životinja, dok se endokarp koristi kao biogorivo.^[1,10]

2.2. Poreklo, klasifikacija, gajenje breskve i upotrebna vrednost ploda breskve

Breskva (*Prunus persica* L.) je listopadno drvo, pripadnik familije Rosaceae, roda *Prunus*. Vodi poreklo iz Kine gde se gaji više od 3000 godina, a danas je rasprostranjena širom sveta^[21,22]. Rodu *Prunus* spadaju koštičave voćke kao što su kajsija, trešnja, višnja, šljiva, a breskva zajedno sa bademom spada u podred *Amygdalus* koje karakteriše specifična, izborana koštica^[2,21]. Vrsta *Prunus persica* obuhvata prave breskve (*var. vulgaris*) i nektarine (*var. laevis*, *var. nucipersica*) koje se, iako su morfološki i biološki gledano ista biljka, komercijalno tretiraju kao različite jer imaju različitu površinu pokožice (egzokarpa) ploda koja je kod nektarine glatka a kod breskve maljava.^[2]

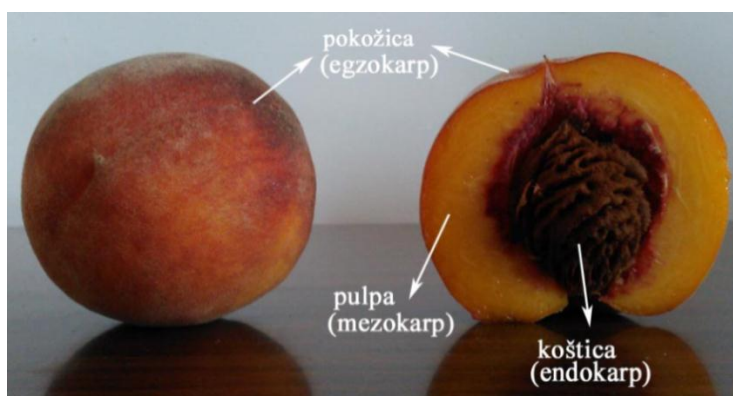
Najveće površine pod breskvom su Kina, Iran i evropske zemlje kao što su Francuska, Italija, Španija i Grčka. U novije vreme u proizvodnji breskve dosta se ističe država Džordžija (SAD) još poznatija kao „Država breskve”. Statistički podaci FAO (FAOSTAT, 2014) su pokazali da je prinos breskve u svetu prosečno oko 17,5 miliona tona godišnje. Ukupna proizvodnja Azije je oko 9,87 miliona tona godišnje, od čega 8,2 miliona tona potiče iz Kine, dok je proizvodnja u Evropi i Americi oko 4,38 miliona tona godišnje. Izvan Azije, najveći proizvođači su Italija (1,66 miliona tona), Španija (1,25 miliona tona) i SAD (1,13 miliona tona).^[23]

U Srbiji po broju stabala breskva zauzima peto mesto posle šljive, jabuke, kruške i višnje, a broj stabala i prinos su u stalnom porastu. Danas se gaji veliki broj sorti breskve a kao naročito pogodne za njeno uzgajanje su oblasti Smederevsko Podunavlje, Subotica, Novi Sad, Bela Crkva, Sremska Mitrovica, šire područje Beograda, Čačak, Niš, Leskovac i dr.^[2]

Velika potražnja za plodom ove vrste voća postoji zbog visokog kvaliteta i dobrih tehnoloških karakteristika kao što su finoća pulpe, specifična aroma, kiselost, visok sadržaj šećera kao i drugih korisnih fitohemikalija. Prosečan plod breskve se sastoji od: 10 - 21,5% suve supstance, 5 - 12% šećera, 0,4 - 1,3% proteina, 0,2 - 0,7% pektina, 0,6 - 0,86% minerala (K, Mg, Ca, Na, Mn, Fe, Cu, Zn) i vitamina C, B1, B2, B6, E.^[24]

Plod breskve se konzumira širom sveta zbog svog slatkog i sočnog ukusa, atraktivnog izgleda i visoke hranljive vrednosti^[22]. Nedavno je prihvaćen kao funkcionalna hrana zbog niskog kalorijskog sadržaja zajedno sa visokim sadržajem antioksidanasa uključujući vitamine (A, C i E), karotenoide, minerale, vlakna, fenolna i azotna jedinjenja^[22]. Pripada

grupi monoantokarpnog ploda koji nastaju iz jednog cveta sa dva anatropna semena zametka, pri čemu obično samo jedan biva oplodjen. Plod se sastoji od egzokarpa (pokožica), mezokarpa (pulpa ili meso) i endokarpa (koštica) koji sadrži jednu semenku (Slika 2)^[25]. Prosečan plod breskve težak je 75 g, od čega oko 85% čini pulpa, 8% koštica, a 6,5% pokožica. Formiranje semena u plodu je neophodno za njegov pravilan razvoj, najviše u ranim fazama rasta.^[12]



Slika 2. Plod breskve

Mesnati deo ploda breskve pokazuje bioaktivnost, uključujući smanjenje hepatotoksičnosti nastale tokom hemoterapije, inhibiranje alergijske inflamatorne aktivnosti, prevencija visokog pritiska i ateroskleroze^[7]. Epidemiološke studije su pokazale da dijetetski unos breskve može smanjiti nastajanje reaktivnih kiseoničnih vrsta u ljudskom organizmu i pružiti zaštitu od nekih hroničnih bolesti^[22]. Međutim, breskva je voće sa visokom metaboličkom aktivnošću te se plodu breskve, ubrzo posle berbe, smanjuje kvalitet^[22]. Pored ploda, lišće breskve sadrži značajnu količinu antioksidanata poput prunetina, kvercetina i kempferola. U kineskoj tradicionalnoj medicini se smesa semena breskve sa raznim lekovitim biljem koristi kao lek protiv ateroskleroze.^[7]

Produktivnost stabala breskve i nutritivni kvalitet njihovog ploda određeni su kroz interakciju između različitih faktora kao što su tip zemljišta, sorta, sistem i tehnika gajenja u zavisnosti od uslova životne sredine^[26]. U cilju poboljšanja interakcije koren - krošnja, efikasnosti proizvodnje i kvaliteta voća, neophodan je sistematski pristup istraživanju glavnih faktora proizvodnje u koje spadaju izbor sorte/podloge, razmaci sadnje, zimska i letnja rezidba, navodnjavanje, đubrenje, zaštita od bolesti i štetočina i druge. Takođe su važni klimatski faktori (temperatura, foto-period, intenzitet svetlosti, količina padavina itd.), fiziološki parametri (faktori fotosintetičkog aktivnog zračenja kombinovani sa glavnim senzoričkim komponentama – šećerima i kiselinama), nutritivnih parametara (ukupni sadržaj

polifenola, ukupni antioksidativni kapacitet, vitamini, itd.)^[26,27]. Na konačan prinos i kvalitet ploda dosta utiču faktori kao što su genetske osobine sorte i uslovi životne sredine (rizik od zimskih mrazeva, visoke razlike u temperaturi između dana i noći, visoke temperature tokom leta itd.)^[27]. Prema *Nikoliću* i saradnicima^[3], pri povoljnim uslovima i uz kvalitetan sistem gajenja, breskva u punoj rodnosti može da postigne visok prinos (30 - 40 t/ha), a u četvrtoj godini proizvodnje investicije uložene u podizanje zasada se vraćaju.

Breskva je vrsta podvrgnuta intenzivnim ukrštanjima širom sveta, pri čemu se za kratak vremenski period omogućava raznovrsnost sorti, jer se neprekidno stvaraju nove^[28]. Pored ogromnog napretka u izboru superiornih i visokoprinosnih sorti stalna je potražnja od strane proizvođača i potrošača za novim sortama, pa je dalja selekcija neophodna. Zato oplemenjivački programi vrše kontrolisana ukrštanja između sorti visokog kvaliteta ploda, a genetičkim analizama utvrđuju koje osobine mogu i na koji način da se najbrže unaprede.^[28]

Klasifikacija sorti breskve i nektarine nije jednostavna zbog njihove velike raznolikosti u pogledu perioda zrenja i morfoloških karakteristika ploda kao što su boja pokožice i pulpe (plod sa žutim, belim ili crvenim mesom), veličina ploda i koštice, ukus, aroma, konzistencija, ili čak na osnovu namene ploda (za potrošnju u svežem stanju, za preradu ili kombinovane sorte).^[13]

Prema vremenu zrenja nema jedinstvene podele jer se u različitim krajevima sveta koriste različite sorte kao merilo. Najčešće se kao standard uzima najrasprostranjenija sorta – „Redhaven” koja sazreva u drugoj polovini jula. U odnosu na nju sorte se dele na: vrlo rane (sazrevaju u prvoj polovini juna), rane (sazrevaju u drugoj polovini juna), srednje kasne (sazrevaju u drugoj polovini jula), kasne (sazrevaju u prvoj polovini avgusta), vrlo kasne (sazrevaju u drugoj polovini avgusta) i jesenje sorte koje sazrevaju u septembru.^[13]

Na osnovu veličine koštice, sorte se mogu podeliti u pet grupa: sorte sa vrlo sitnom košticom (koštica prosečne mase ispod 2 g), sa sitnom košticom (2 - 3 g), sa srednje krupnom košticom (3 - 4 g), krupnom košticom (4 - 5 g) i sorte sa izrazito krupnom košticom (prosečna masa koštice je preko 5 g), a na osnovu udela koštice u masi ploda sorte se dele u tri grupe: sorte sa malim udelom koštice (manjim od 6%), srednjim udelom (6 - 8%) i velikim udelom koštice (više od 8%).^[13]

Sorte breskve se dalje mogu podeliti na kalanke i glođuše u zavisnosti da li se mesnati deo ploda odvaja ili ne odvaja od koštice. Obe grupe mogu imati belu ili žutu boju mezokarpa. Breskve bele boje pulpe imaju visok sadržaj šećera, a malo ukupnih kiselina, pa se uglavnom konzumiraju u svežem obliku. Sorte sa žutim mezokarpom imaju izbalansiran odnos šećera i kiselina, i znatno veći sadržaj karotenoida.^[29]

U današnje vreme u proizvodnim zasadima Srbije se najviše gaje sorte srednjeg i srednjepoznog vremena sazrevanja („Redhaven”, „Fazette”, „Suncrest”, „Glohaven” i „Cresthaven”)^[3]. Cilj oplemenjivačkih programa je da se unapredi postojeći sortiment novim sortama povoljnih bioloških osobina i produži dostupnost breskve na tržištu^[3]. Pored standardnih sorti i hibrida, Srbija je poznata po lokalnim populacijama vinogradarske breskve koja ima veliki broj korisnih osobina kao što su tolerancija na sušu, otpornost na mraz, pepelnicu i kovrdžavost lišća. Zahvaljujući njima, u novije vreme ova germplazma se koristi u programima oplemenjivanja u cilju rešavanja problema osetljivosti breskve prema raznim prouzrokovanim bolestima.^[30]

Proizvodnja breskve u Republici Srbiji u toku 2017. godine iznosila je 54.585 t, sa 4.974 ha proizvodnih površina i prosečnim prinosom od 10,974 t/ha (Republički zavod za statistiku, Republika Srbija, 2018)^[11]. Ako uzmemo u obzir da je srednji udeo koštice u plodu breskve 8%^[12,13], samo u Srbiji tokom 2017. godine kao otpad je odbačeno 4.366,8 t koštica breskve.

Klima, proces proizvodnje i genetički potencijal sorte su neki od faktora koji utiču na sadržaj fitohemikalija u voću. Štaviše, čak i unutar iste sorte sastav i sadržaj organskih kiselina, ugljenih hidrata i fenolnih jedinjenja nisu homogeno distribuirani^[31]. Kvalitet voća se tradicionalno ocenjuje na osnovu fizičkih karakteristika kao što su boja pokožice, oblik i čvrstina ploda^[31,32]. Pored toga, u cilju bolje prodaje plodova breskve od vitalnog značaja su i senzorna svojstva (tekstura, konzistencija, ukus i aroma), hranljiva vrednost i mehanička svojstva^[31]. Takođe, breskva sadrži brojne sastojke koji imaju blagotvorna dejstva na zdravlje ljudi te je povećana potražnja za njenim plodovima^[31,32]. Plod breskve pospešuje želudačnu sekreciju i varenje, olakšava simptome povišenog krvnog pritiska i arteroskleroze, smanjuje nivo holesterola u krvi i koristi se za prevenciju anemije, kardiovaskularnih i bubrežnih oboljenja.^[24]

Međutim, svež plod breskve ima veliku kvarljivost i lako je podložan mehaničkim povredama i oštećenjima^[23,33]. Dozrevanje posle branja plodova dovodi do ozbiljnog smanjenja kvaliteta koji se manifestuje kroz dehidrataciju, mekšanje i smanjenje sadržaja nutritivnih komponenta^[33]. U cilju što dužeg iskorišćavanja i skladištenja, plodovi breskve se industrijski obrađuju u različite proizvode korišćenjem hlađenja, sušenja, termičke obrade i drugih, odgovarajućih postupaka.^[23,33]

2.3. Fiziologija klijanja semena

Klijanje semena je ključna faza u razvoju biljke i može se smatrati odlučujućom za produktivnost biljke. Počinje od upijanja vode, mobilizacije rezerve hrane, aktivnosti enzima sinteze proteina i sl. Da bi se održala i dobro razvila sadnica, seme čuva rezerve hrane uglavnom proteine, lipide i šećere^[34]. Pošto su većina semena diferencirana, glavne kataboličke aktivnosti su lokalizovane u skladišnim tkivima kao što je endosperm semena monokotiledonih i dikotiledonih biljaka, a prava sinteza jedinjenja, organela i tkiva se dešava u embrionu^[35]. Fiziološke i biohemijske promene praćene morfološkim promenama tokom klijanja su u velikoj meri povezane sa stopom preživljavanja sadnica i vegetativnim rastom koji je povezan sa prinomom i kvalitetom^[34]. Generalno, u procesu klijanja mogu se razlikovati tri faze. U prvoj fazi seme brzo upija vodu, u drugoj dolazi do reaktivacije metabolizma i u trećoj do izbijanja sadnica^[34]. Najbitnija je druga faza u kojoj dolazi do suštinskih fizioloških i biohemijskih procesa kao što su hidroliza, biosinteza makromolekula, disanje, biogeneza različitih organela neophodnih za razgradnju rezervnih supstanci ili za sintezu novih ćelija i tkiva biljke^[34,35].

Abiotički stres kao što je so, suša, teški metali i drugi zagađivači, toplota, niske temperature i dr, potencijalno utiču na klijavost i rast semena. U zavisnosti od intenziteta stresa i genetike biljke klijanje može biti odloženo ili potisnuto. Biljke su razvile jedinstvene strategije, uključujući i strogu regulaciju klijanja, koji osiguravaju opstanak vrste^[34]. Kao i seme, zrele biljke mogu razviti neke fiziološke i metaboličke modifikacije kao što je smanjenje fotosintetičke aktivnosti, neobična cirkulacija organskih jedinjenja i akumulacija primarnih i sekundarnih metabolita^[36].

2.4. Hemijski sastav semena breskve

Za razliku od jestivog i sočnog mezokarpa koji je dosta ispitan, malo ima dostupne literature o nutritivnim komponentama semena breskve (Slika 3). U skladu sa činjenicom da je seme koštičavog voća iz roda *Prunus* bogato lipidnom frakcijom, najveći broj istraživanja koja su povezana sa hemijskom karakterizacijom semena breskve odnosio se na esencijalna ulja, masne kiseline i tokoferol^[6,37]. Poslednjih godina se javljaju studije koje prikazuju da je seme breskve bogato i drugim potencijalno vrednim fitohemikalijama kao što su proteini, peptidi, fenolne i antioksidativne komponente^[1,6,38]. Pronađene su i značajne količine mineralnih elemenata kao što su kalijum, kalcijum i magnezijum, a u manjoj meri se javljaju

fosfor, bakar, gvožđe i cink^[39]. Sastav i količina fitohemikalija varira u zavisnosti od sorte, geografskog porekla, zrelosti i načina gajenja^[40].



Slika 3. Koštice i semena breskve

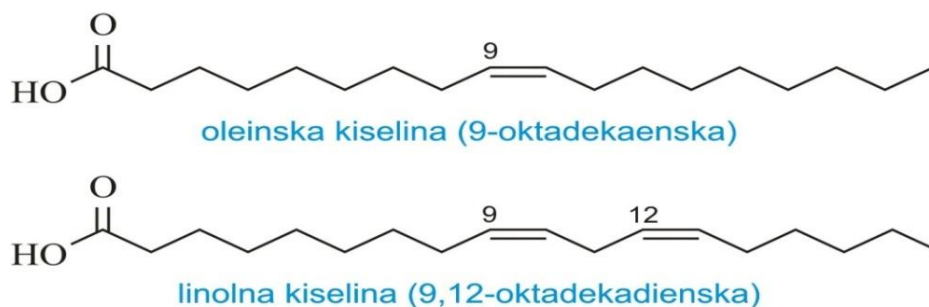
2.4.1. Masne kiseline

Sporedni proizvodi iz prehrambene industrije predstavljaju moguće nove izvore biljnih i esencijalnih ulja. Ulja semena voćki iz roda *Prunus* sadrže velike količine nezasićenih masnih kiselina - oleinske (C18:1, n9c) i linolne (C18:2, n6c) čije su hemijske strukture prikazane na slici 4, a manje su zastupljene zasićene masne kiseline kao što su palmitinska (C16:0) i stearinska (C18:0) kiselina. Dodatno, ulja sadrže i znatne količine supstanci iz grupe vitamin-E-aktivnih jedinjenja: α -tokoferol, α -tokotrienol, γ -tokoferol i δ -tokoferol. Najzastupljeniji u semenu breskve je α -tokoferol, dok u većini semena iz roda *Prunus* najzastupljeniji je γ -tokoferol. Zahvaljujući većoj zastupljenosti nezasićenih nego zasićenih masnih kiselina, ulje semena breskve može čak biti povoljnije za upotrebu nego maslinovo ulje. Sadržaj masnih kiselina i vitamin-E-aktivnih jedinjenja mogu opravdati dalju obradu semena voćki iz roda *Prunus* za proizvodnju ulja za ishranu, terapijske i farmaceutske svrhe.^[37]

Ulje semena breskve se dosta koristi u kozmetičkoj industriji kao jedan od sastojaka sapuna, šampona, losiona, krema, jer je prodorne, svetle boje, lako se apsorbuje i ne ostavlja mastan osećaj na koži^[6]. Seme breskve sadrži oko 50% ulja koje se uglavnom sastoji iz triglicerida, diglicerida, masnih kiselina i sterola^[41]. Od masnih kiselina seme breskve najviše sadrži nezasićene masne kiseline - oleinsku i linolnu, a njihov udeo u ulju zavisi od više faktora kao što su način ekstrakcije, sorta breskve, klima, područje i sistem gajenja, a možda čak i vreme zrenja i branja^[6,10]. Ispitivanja nekoliko različitih načina ekstrakcije ulja iz

semena različitih sorti breskve pokazala su da sadržaj oleinske kiseline varira između 42% i 75% dok je sadržaj linolne kiseline u intervalu 15 - 33%^[8,10,42]. Udeo zasićenih masnih kiselina u ulju semena breskve je dosta manji (oko 20%)^[41] i to su uglavnom palmitinska kiselina (5 - 23%) i stearinska kiselina (2 - 15%).^[6,10]

Oleinska i linolna kiselina su esencijalne masne kiseline koje su neophodne u ljudskoj ishrani jer imaju bitne uloge u nekim fiziološkim i biološkim funkcijama u ljudskom organizmu^[43,44]. Značajne su za građenje zdrave ćelijske membrane, normalno funkcionisanje mozga i nervnog sistema, pomažu u regulaciji krvnog pritiska, smanjenju ukupnog holesterola i triglicerida^[43,44,45]. Takođe su značajne za prevenciju mnogih bolesti kao što su razni zapaljenski procesi, autoimuni poremećaji, hipertenzija i neka srčana oboljenja^[42,43,45]. Osim zdravlja ljudi, ove nezasićene masne kiseline poboljšavaju stabilnost i produžavaju rok trajanja proizvoda koji ih sadrže, jer smanjuju oksidacione procese^[43].



Slika 4. Strukture najzastupljenijih masnih kiselina u semenu breskve

Više biljke skladište velike količine lipida u semenu i obezbeđuju energiju za rast tokom klijanja. Sadržaj lipida i sastav masnih kiselina varira u zavisnosti od uslova sredine, klime i ljudske brige kao što je način gajenja i genetski inženjering. Sastav masnih kiselina određuje fizičke i hemijske osobine ulja i daje mu ekonomsku vrednost.^[46]

Sinteza masnih kiselina u biljkama odvija se u plastidima kroz proces koji uključuje sekvencijalnu kondenzaciju (proces elongacije) malonil-ACP (ACP – *Acetyl Carrier Protein*; protein nosač acil grupe) na acil-ACP derivatima u reakciji katalizovanoj različitim oblicima enzima sintaze masnih kiselina^[47]. Finalni proizvodi ciklusa sekvencijalnih kondenzacija su 16:0-ACP i 18:0-ACP koji se dalje mogu desaturirati (desaturacija ili dehidrogenacija - uvođenje nezasićenih veza u strukturu) dejstvom $\Delta 9$ stearoil-ACP desaturaze u odgovarajuće acil-ACP derivate palmitoleat i oleat. Oleat je glavni produkt sinteze masnih kiselina u plastidima dok palmitoleinska kiselina se stvara samo u tragovima u većini biljnih tkiva^[47]. U plastidima, reakcije elongacije (produžavanja lanaca masnih kiselina) i desaturacije se

prekidaju pomoću acil-ACP tioesteraza, enzima koji hidrolizuju acil-ACP intermedijere u odgovarajuću masnu kiselinu i ACP ostatak. Dobro je poznato da se neobične MUFA (*MonoUnsaturated Fatty Acid* – mononezasićene masne kiseline) proizvode dejstvom posebnih acil-ACP desaturaza sa različitim supstrat specifičnošću pri čemu ova različitost enzima utiče i na dužinu lanca i na poziciju dvostrukih veza u MUFA. Proizvodnja MUFA zavisi od više faktora kao što su dostupnost supstrata, specifičnost kofaktora, β -oksidacija, faktori sklapanja proteina i dr.^[47]

Uloga masnih kiselina i njihovih metabolita u biljkama nije samo da su glavni strukturni i metabolički sastojci ćelije već imaju ulogu u urođenim imunim i hormonskim funkcijama^[48]. Funkcionišu kao sekundarni glasnici i regulatori mnogih puteva prenosa signala molekula koji su izazvani uslovima okoline i stimulatora razvoja. Mnoge funkcije masnih kiselina u živim organizmima povezane su sa promenom lipidnih sastojaka i prilagođavanjem fluidnosti membrane, uglavnom posredovane desaturazama. Neophodne su za funkciju membranskih proteina koje na kraju utiču na mehanizam signalizacije ćelija. Sadržaj masnih kiselina se povećava kao odgovor na razne faktore stresa i imaju ključnu ulogu u biljka - mikroorganizmi interakciji.^[48]

Nekoliko metoda se primenjuje za ekstrakciju ulja iz semena breskve, samim tim i masnih kiselina. Standardne metode za ekstrakciju ulja su maceracija i ekstrakcija po Soksletu uz korišćenje raznih rastvarača (*n*-heksan, petroletar, etiletar, etil-acetat, hloroform, dihlorometan, etanol)^[6,10]. U novije vreme od većeg značaja je i superkritična ekstrakcija pomoću ugljen-dioksida pri različitim pritiscima i temperaturama^[10,42].

Tradicionalna analitička tehnika za detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju masnih kiselina je gasna hromatografija (*Gas Chromatography* - GC) sa plameno-jonizacionim (*Flame Ionization Detector* – FID) ili masenim (*Mass Spectrometer* – MS) detektorom. Neposredno pre analize gasnim hromatografom neophodno je masne kiseline prevesti u lakše isparljiva jedinjenja te se u tu svrhu vrši njihova esterifikacija pri čemu nastaju odgovarajući derivati masnih kiselina (metil-estri, steril-estri ili drugi).^[44,45]

2.4.2. Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja predstavljaju sekundarne metabolite koji su široko rasprostranjeni u biljnom svetu i dosta zastupljeni u ljudskoj ishrani. Oni obuhvataju jedinjenja niske i visoke molekulske mase, od jednostavnih fenolnih jedinjenja (npr. fenolne kiseline i flavonoidi) do polimera (npr. kondenzovanih tanina i proantocijanidina) i drugih složenijih

makromolekulskih struktura^[49]. Dobro je poznato da polifenoli doprinose određenim senzornim svojstvima voća i povrća^[49], kao i njihovoj zaštiti od stresa, povreda, napada bolesti i štetočina^[40]. Poslednjih godina su mnoge studije posvećene proučavanju njihove potencijalno korisne, fiziološke aktivnosti, kao i karakteristikama vezanih za njihovu apsorpciju i uticaj na metabolizam kod ljudi^[49]. Fenolna jedinjenja deluju kao antioksidansi zbog njihove sposobnosti da doniraju vodonik ili elektrone te na taj način stvaraju stabilne intermedijere radikala. Takođe su sposobni da kompleksiraju metale, stimulišu antioksidativne enzime odbrane organizma i pokazuju širok spektar bioloških osobina kao što su anti-inflamatorna, antimikrobna, anti-alergena i kardioprotektivna svojstva^[40,50]. Mnoga epidemiološka i klinička istraživanja pokazala su da redovno konzumiranje raznih plodova voća i njihovih prehrambenih proizvoda sa visokim sadržajem polifenola mogu poboljšati zdravstveno stanje ljudi i smanjiti rizik od nekih hroničnih bolesti kao što su gojaznost, dijabetes, tumorna i kardiovaskularna oboljenja^[49,51].

Pored gore navedenih osobina, fenoli breskve pokazuju i nekoliko aktivnosti kao što su hepatoprotektivni, nefroprotektivni, hemoprotektivni i antiproliferativni efekat^[52].

Pri unošenju fenolnih jedinjenja, ljudski organizam ih prepoznaje kao ksenobiotike zbog čega je njihova biodostupnost niska. U zavisnosti od složenosti strukture i polimerizacije, razlikuje se i mesto njihove apsorpcije u organizmu. Fenoli male molekulske mase i dimerne strukture se lako apsorbuju u tankom crevu, dok se kompleksnije strukture apsorbuju tek u debelom crevu ili se čak izlučuju nepromenjeni^[53]. Od ukupnog unosa polifenola 90 - 95% mogu se akumulirati u lumenu debelog creva gde su zajedno sa konjugatima, dospelim u crevo preko žuči, podvrgnuti enzimskim aktivnostima od strane bakterija crevne flore pri čemu nastaju fenolni metaboliti manjih molekulske masa. Dobijeni fenolni metabolite, koji se mogu apsorbovati, mogu biti odgovorni za zdravstvene efekte koji potiču od hrane bogate polifenolima^[53].

Nakon apsorpcije u tankom crevu dolazi do prve faze (faza I) razlaganja prostijih fenola (oksidacija, redukcija i hidroliza) a zatim druga faza (faza II, konjugacija) biotransformacija u enterocitima i hepatocitima što dovodi do nastanka niza vodorastvornih metabolita, koji se brzo oslobađaju u cirkulaciju gde se dalje transportuju u organe i izlučuju u urin^[53]. U debelom crevu bakterije enzimski deluju na polifenolni skelet neapsorbovanih fenola pri čemu nastaju metaboliti sa različitim fiziološkim značajem. Metabolizam polifenola mikroorganizmima podrazumeva cepanje glikozidnih veza i razlaganje heterocikličnih struktura, pri čemu se kao rezultat dobijaju laktoni i aromatične kiseline sa različitim stepenom hidroksilacije i različitim dužinama bočnih lanaca (fenilvalerolaktoni,

fenilvalerinske kiseline, fenilpropanoinske kiseline, fenilsirćetne kiseline, hipurinske i benzoeve kiseline). Svi ovi mikrobiološki fenolni metaboliti se mogu apsorbovati i posle izlučiti fekalijama. Kada se apsorbuju, metaboliti do jetre stižu kroz portalnu venu gde i dalje su podložni metabolizmu prve i druge faze (uključujući glukuronidaciju, metilaciju, sulfaciju ili njihove kombinacije) dok konačno ne uđu u sistemsku cirkulaciju i transportuju se u organe ili izluče urinom. Dijeta bogata polifenolima i njihovim metabolitima doprinosi održanju zdravlja crevne mikroflore pri čemu stimulišu rast korisnih a inhibiraju rast patogenih bakterija (imaju sličan efekat probiotika)^[53].

Pokazano je da plod breskve sadrži raznovrsne fenole kao što su fenolne kiseline i njihovi derivati (hlorogena kiselina, neohlorogenska kiselina, kofeinska kiselina), flavan-3-oli (katehin, epikatehin), antocijani, derivati cijanidina, rutina i kvercetina.^[40,54]

Fenolni profil semena breskve je ispitan od strane Wu-a^[6] i saradnika pri čemu su poredili ukupni sadržaj fenola, identifikovane fenole i antioksidativni kapacitet ulja i ostatka semena nakon ekstrakcije ulja. Rezultati ove studije pokazuju da ostatak semena sadrži veću količinu fenolnih jedinjenja i jaču antioksidativnu aktivnost u odnosu na ulje čak i kada se koriste razni rastvarači prilikom ekstrakcije ulja (korišćeni su petrol-etar, etil-etar, hloroform i heksan). Od fenolnih jedinjenja u semenu breskve identifikovano je i kvantifikovano 15 fenolnih jedinjenja: ditiotreitol, protokatehuinska kiselina, dihidroksibenzoeva kiselina, prokatehol, katehin, procijanidin B2, gentizinska kiselina, kuromanin-hlorid, vanilinska kiselina, kofeinska kiselina, epikatehin-galat, fenilpropanoinska kiselina, sinapinska kiselina, rutin i elaginska kiselina. Ditiotreitol, rutin i kofeinska kiselina su dosta zastupljeni u ulju a u ostatku semena breskve dominantni su procijanidin B2 i fenilpropanoinska kiselina.^[6]

Na ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz biljnog matriksa utiče nekoliko faktora kao što su hemijska priroda jedinjenja, metoda ekstrakcije, veličina čestica, vreme i uslovi skladištenja biljnog materijala. Fenolna jedinjenja imaju hidroksilne grupe koje mogu biti vezane za šećere ili kiseline. Shodno tome, polaritet fenolnih jedinjenja varira i teško je razviti jedinstvenu metodu za efikasnu ekstrakciju svih fenola^[52]. Najčešći rastvarači koji se koriste za ekstrakciju fenola su etil-acetat, etanol, metanol, aceton, njihova smeša sa vodom ili pri različitim pH vrednostima rastvora, temperaturi i vremenu ekstrakcije^[49,55].

Veliki broj analitičkih tehnika se koristi za analizu fenolnih jedinjenja: spektroskopske metode (MS, NMR – *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, NIR – *Near InfraRed Spectroscopy* i dr.), hromatografske metode (LC – *Liquid Chromatography*, SFC – *Supercritical Fluid Chromatography*, GC, TLC – *Thin Layer Chromatography* i dr.),

kapilarna elektroforeza (CE – *Capillary Electrophoresis*) ili kombinovane tehnike (GC-MS, LC-MS, i dr.).^[55]

2.4.3. Šećeri

Šećeri (saharidi) predstavljaju najzastupljeniju grupu prirodnih molekula i nalaze se u svim nivoima organizacije u organizmima biljaka, životinja i ljudi. Oni služe kao direktna veza između energije Sunca i metaboličke energije potrebne za održavanje života. U organizmima koji su sposobni da vrše fotosintezu, solarna energija se koristi u svrhu sinteze glukoze iz ugljen-dioksida i vode. Energija uskladištena u ovom monosaharidu se dalje koristi za razne metaboličke procese kao što su glikoliza i disanje. Saharidi koji su najčešće korišćeni kao metabolički transporteri energije su glukoza, fruktoza, saharoza, laktoza i skrob^[56].

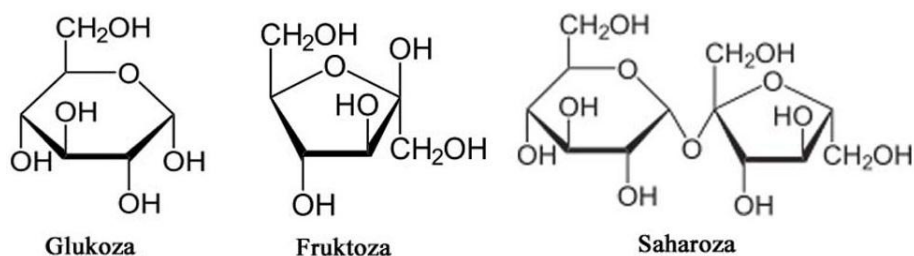
Šećeri imaju veliku nutritivnu vrednost i brojne bitne uloge u živim organizmima. Monosaharidi su glavni izvor energije i ugljenika potrebnih za metabolizam i sintezu drugih nutrijenata koji podržavaju rast i razvoj ploda, dok polisaharidi služe za skladištenje energije i kao strukturne komponente^[44]. Uključeni su u skoro sve procese metabolizma u biljkama kao što su komunikacija između ćelija, embriogeneza, klijavost semena i rast sadnica, razvoj vegetativnih i reproduktivnih organa, starenje, odgovor na sve vrste biotičkih i abiotičkih stresova, koordinacija ekspresije mnogih gena i sinteza organskih kiselina, polifenola, pigmentata, aromatičnih jedinjenja. Na kvantitativne varijacije šećera utiču mnogi faktori kao što su razlika u fazi zrelosti, starost biljke, kvalitet zemljišta, oplodnja, region i vremenski uslovi, kultivacija, geografsko poreklo i genotip. Genotip i životna sredina imaju snažan uticaj na razmenu šećera između organa biljke i mogu menjati transport proizvedenih ugljenih hidrata (Fotirić Akšić et al. 2019.)^[36]

U vidu prebiotika ili ređe antioksidanasa i anti-inflamatora imaju pozitivan efekat na zdravlje ljudi^[44]. Saharidi takođe imaju primenu u prehrambenoj industriji. Saharoza se koristi kao zaslađivač, konzervans, sirovina za fermentaciju^[56]. Potreba za identifikacijom i kvantifikacijom ovih jedinjenja dovela je do veće primene kombinovanih analitičkih metoda uglavnom zasnovanih na efikasnim tehnikama kao što su visokoefikasna tečna hromatografija (HPLC, *High-Performance Liquid Chromatography*), GC, CE i/ili NMR.^[44]

Šećeri su veoma važni parametri za održavanje kvaliteta ploda breskve i cenjeni su od strane potrošača^[57]. Ukus ploda breskve zavisi od odnosa i sadržaja šećera koji se sintetišu i

akumuliraju u plodu breskve tokom zrenja^[58]. Najrasprostranjeniji šećer u zreom plodu breskve je saharoza, a za njim najzastupljeniji su redukujući šećeri – glukoza i fruktoza uz određenu količinu sorbitola koji je najtranslociraniji izvor ugljenika kod biljaka pripadnika porodice Rosaceae^[57,58]. Ovi ugljeni hidrati utiču na aromu breskve zajedno sa najzastupljenijim organskim kiselinama – jabučnom i limunskom^[58]. Zreli plod breskve odlikuje se visokim sadržajem saharoze, između 50% i 75% od ukupnog sadržaja šećera^[57]. Fruktoza je slađa od saharoze i glukoze i predstavlja jedan od najreaktivnijih prirodnih saharida. Zajedno sa saharozom, fruktoza ima blagotvorni efekat na gastrointestinalni trakt. Voće bogato sorbitolom se sve češće koristi u ljudskoj ishrani jer se smatra da je ovaj šećerni alkohol koristan u regulaciji dijetetske ishrane i zdravlja zuba. Dodatno, sorbitol se može koristiti kao zamena za glukožu za dijabetičare i kao prirodni zaslađivač umesto saharoze.^[57]

Iako je breskva voće koje je popularno širom sveta, šećerni sastav njenog semena je slabo istražen. *Ashraf* i saradnici^[59] su pokazali da je ukupni sadržaj šećera u semenu breskve visok, dosta viši nego u mesnatom delu ploda, i iznosio je 47,45% od ukupne mase semena. Profil šećera u semenu breskve je isti kao i u mesnatom delu ploda, uglavnom ga čine saharoza, glukoza i fruktoza (Slika 5).^[59]



Slika 5. Najzastupljeniji šećeri u semenu breskve

Saharoza je bitna u biljnom metabolizmu kao glavni produkt fotosinteze, glavni oblik transporta ugljenika i kao skrob bitna je za skladištenje saharida. Saharoza se razlaže na glukožu i fruktozu hidrolitički enzimom saharozom (invertaza) ili nehidrolitički saharoza sintazom. Dalje dolazi do stvaranja fruktoze i UDP-glukoze (*Uridine DiPhosphate glucose*)^[60].

U biljkama glukoza deluje kao glavni prekursor raznih biomolekula kao što su polisaharudi (skrob), aminokiseline, karboksilne kiseline, nukleinske kiseline i dr. Takođe služi kao komponenta za skladištenje ugljenika i glavni sastojak ugljeničnog skeleta i

ćelijskog zida. Ima i zaštitnu ulogu u biljkama pri stresnim uslovima životne sredine i poboljšava brojne fiziološke funkcije kao što je klijavost semena i cvetanje^[61].

Fruktoza je monosaharid koja se u slobodnom obliku nalazi u voću, povrću i medu ili sa glukozom gradi disaharid saharozu. Fruktoza se pretežno metaboliše u jetri dok se glukoza metaboliše u mozgu. Iako je fruktoza u početku korišćena kao zaslađivač za dijabetičare, klinička studija je pokazala da prekomerna konzumacija fruktoze može dovesti do metaboličkih problema kao što su dijabetes tipa 2, otpornost na insulin, gojaznost, lipidna oksidacija. Visoka i stalna potrošnja fruktoze može da indukuje neuroinflamaciju i oksidacioni stres u mozgu koji su uključeni u patogenezu neurodegenerativnih bolesti^[62]. Sa druge strane, fruktoza može predstavljati značajan izvor energije u ljudskoj ishrani. Iako su glukoza i masne kiseline primarni energetske izvor za kontrakciju mišića, prisutnost fruktoze ima prednost kod napornih fizičkih vežbanja^[63]. Fruktoza 2,6-difosfat je bitan regulator metabolizma ugljenih hidrata u biljkama. Ovaj signalni metabolit snažno inhibira fruktoza-1,6-difosfatazu i učestvuje u regulaciji promene heksoza fosfata i trioza fosfata u citosolu (sinteza saharoze i saharoze fosfata). Tokom sinteze igra bitnu ulogu u koordinaciji ostataka CO₂ asimilacije, sinteze saharoze i pozicioniranju ugljenika između saharoze i skroba. Utiče na metabolizam ugljenih hidrata u citosolu i hloroplastima tokom procesa fotosinteze^[63].

Pored njihove uloge kao izvora ugljenika i energije, šećeri ispunjavaju signalizaciju u koordinaciji sa hormonskim signalnim mehanizmima koji kontrolišu fiziološke procese u biljkama i urođene imuno odgovore. Signalni putevi mogu biti pod jakim uticajem aktivnosti enzima koji razlažu saharozu (u vakuolama, ćelijskom zidu, neutralne invertaze i saharoza sintaze) i imaju snažano delovanje na saharozu pri čemu se dobijaju heksoze, bitni parametri u odgovoru biljke na stres. Pored rasta i odgovora na stres, signalni šećeri su bitni i pri cvetanju biljke, utiču na prinos i druge pogodnosti za biljku^[64]. Dodatno, metabolizam saharoze je najbitniji za biosintezu različitih rezervnih supstanci kao što su skrob, ulje, šećeri, proteini u tkivima za skladištenje kao što su seme, plod, stabljike, koren i cveće^[65].

2.4.4. Cijanogeni glikozidi

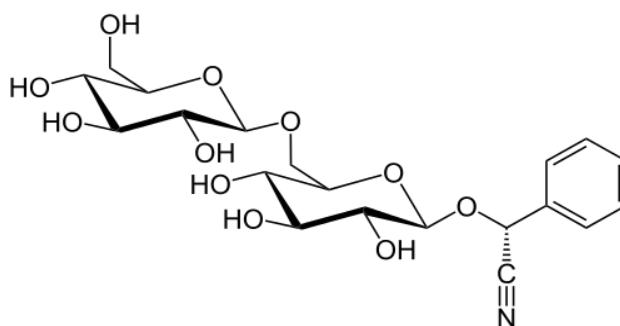
Cijanogeni glikozidi su velika grupa sekundarnih metabolita široko rasprostranjena u biljkama koje služe da se koriste u ljudskoj ishrani. Različite hemijske karakteristike cijanogenih glikozida mogu da stvaraju probleme prilikom ekstrakcije i analize pojedinih jedinjenja iz pomenutih biljaka. Biljne vrste koje sadrže cijanogene glikozide imaju

sposobnost da stvaraju toksičnu, cijanovodoničnu kiselinu (HCN) kada enzimi koje biljka sadrži (α -hidroksinitril-lijaze i β -glukozidaze) dođu u kontakt sa cijanogenim glikozidima. Enzim dovodi do raskidanja veze između aglikona i šećerne komponente i dodatno se aglikon razlaže na HCN i aldehid ili keton. Nakon konzumacije, HCN se takođe može dobiti dejstvom enzima iz crevne mikroflore životinja i ljudi na cijanogeni glikozid iz biljke.^[66]

Kod ljudi se mogu javiti problemi usled akutne toksičnosti kada je HCN u dozama između 0,5 i 3,5 mg/kg. Zavisno od doze, HCN može izazvati akutne i sub-akutne probleme kao što su glavobolja, mučnina, povraćanje, grčevi u stomaku, vrtoglavica, malaksalost, mentalna konfuzija, konvulzije, srčani zastoj, cirkulaciona i respiratorna insuficijencija, koma i u ekstremnim slučajevima smrt.^[66]

Nekoliko ekonomski važnih biljaka su visoko cijanogene, među njima su neke vrste pasulja, orah, badem, lan i bela detelina. Amigdalin (Slika 6) je jedan od najčešćih cijanogenih glikozida prisutan u semenu jabučastog i koštičavog voća.^[66]

Semena nekih vrsta voća iz porodice Rosaceae sadrže do 6% amigdalina u odnosu na masu svežeg semena.^[66] Ispitivanja semena voća ukazuju na sadržaj HCN 0,05-4 mg/g u semenu kajsije; 0,4-2,6 mg/g u semenu breskve i 0,6 mg/g u semenkama jabuke. Generalno, sadržaj HCN je niži kod semena breskve nego u gorkom bademu i semenu kajsije. Različiti faktori utiču na sadržaj amigdalina u semenu, uključujući razlike u sortama, sadržaju vode i dr.^[67]



Slika 6. Hemijska struktura amigdalina {[(6-O- β -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranosyl)oxy](phenyl)acetonitrile }

U cilju sprečavanja ili bar smanjenja toksičnosti biljaka koje sadrže cijanogene glikozide pre konzumiranja su korišćene različite procedure obrade kao što su ljuštenje, drobljenje, mlevenje, struganje, fermentiranje, sušenje. Tokom ovih postupaka dolazilo je do gubitka glikozida rastvaranjem u vodi ili otpuštanjem u atmosferu u obliku HCN nastale delovanjem biljnih ili mikrobioloških enzima^[66].

2.5. Analitičke metode za ispitivanje hemijskog sastava semena breskve

U okviru ove doktorske disertacije biće dat kratak pregled onih analitičkih metoda koje su korišćene za ispitivanje hemijskog sastava semena breskve u okviru ove studije, odnosno hromatografske metode:

- Gasna hromatografija sa plameno-jonizacionom detekcijom (GC-FID);
- Tečna hromatografija - masena spektrometrija (LC-MS);
- Visoko-efikasna jonoizmenjivačka hromatografija (HPIEC – *High-Performance Ion-Exchange Chromatography*).

2.5.1. Hromatografske metode

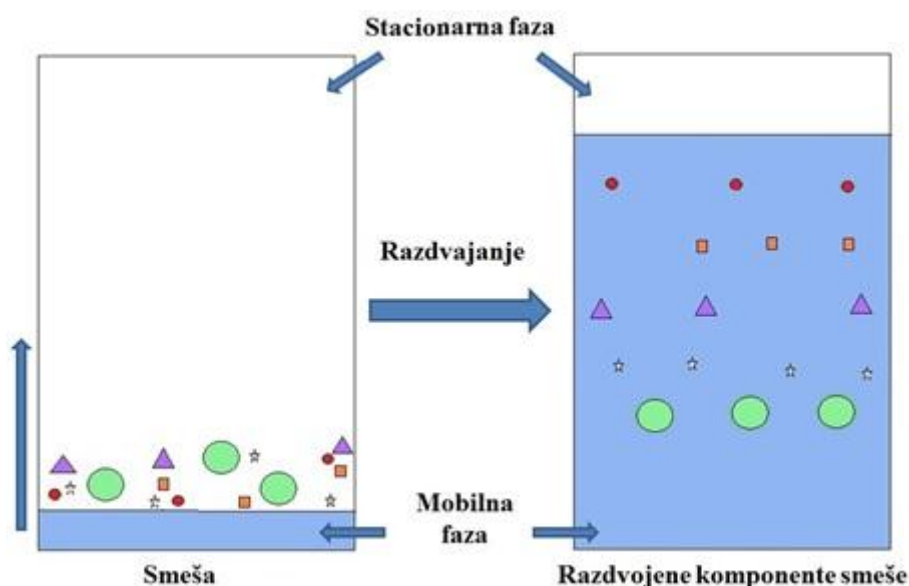
Hromatografija zauzima značajno mesto u savremenoj analitičkoj hemiji pri prečišćavanju složenih smeša, razdvajanju i izolovanju pojedinačnih komponenti iz smeša kao i pri analizi raznovrsnih uzoraka. Hromatografske metode su se brzo razvile zbog relativno jednostavne i uspešne primene teorije u praksi, kao i korišćenja opreme velike osetljivosti i preciznosti pri čemu je omogućena visokoefikasna kvantitativna analiza^[68].

Kod hromatografskih metoda se proces razdvajanja komponenata smeše zasniva na njihovoj raspodeli između dve faze, mobilne i stacionarne faze, u hromatografskoj koloni ili na ravnoj površini (Slika 7)^[69,70]. Stacionarna faza je nepokretna i može biti čvrsti, porozni, površinski aktivni materijal u obliku sitnih čestica ili tanak sloj tečnosti na inertnom nosaču. Mobilna faza je druga faza koja prolazi kroz stacionarnu fazu noseći sa sobom odvajane supstance i može biti gas ili tečnost. Ako se koristi gas, postupak je poznat kao gasna hromatografija (GC), odnosno tečna hromatografija (LC) ako je tečna mobilna faza^[69]. Komponente koje slabije interaguju sa stacionarnom fazom brže se eluiraju od supstanci koje se duže zadržavaju na stacionarnoj fazi, odnosno sporije se kreću sa mobilnom fazom.^[70]

Osim klasifikacije hromatografskih metoda prema mobilnoj fazi (GC i LC), detaljnija podela može se izvršiti prema vrsti primenjene stacionarne faze, odnosno da li je gas-tečno (*Gas-Liquid Chromatography*, GLC), gas-čvrsto (*Gas-Solid Chromatography*, GSC), tečno-tečno (*Liquid-Liquid Chromatography*, LLC) ili tečno-čvrsto (*Liquid-Solid Chromatography*, LSC) razdvajanje. Dodatno, LC metode se klasifikuju i na hromatografiju u kolonama (LLC, LSC, HPLC, HPIEC i dr.) ili na ravnim površinama (tankoslojna, TLC i na hartiji)^[68].

Postoji više postupaka i mehanizama razdvajanja u tečnoj hromatografiji te se jedna od podela zasniva na tipu interakcija između komponenata smeše i stacionarne faze, odnosno načinu zadržavanja komponenti. Razlikuje se pet mehanizama zadržavanja od kojih četiri (adsorpcija, particija, afinitet i jonska izmena) definišu vrstu interakcija između komponenata smeše i stacionarne faze (elektrostatičke sile, vodonične veze, hidrofobne interakcije, Van der Waals-ove interakcije i dr.), dok peti mehanizam zadržavanja se zasniva na isključenju po veličini, obliku ili naelektrisanju.^[71]

Prednost hromatografskih metoda se ogleda u efikasnom razdvajanju pojedinačnih analita iz smeše za kratko vreme, kao i njihovom direktnom kvalitativnom i kvantitativnom određivanju - svako jedinjenje u smeši ima svoj retencioni parametar (parametar zadržavanja) pod datim, istim uslovima i ima oblast i visinu signala koja je proporcionalna količini tog jedinjenja.^[69]



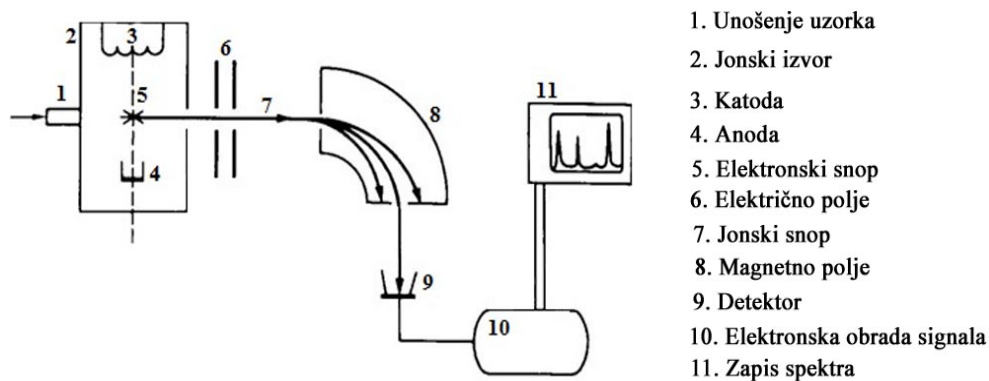
Slika 7. Šematski prikaz procesa hromatografskog razdvajanja

Najvažnija razlika između tečne i gasne hromatografije je što se gasnom hromatografijom mogu analizirati samo supstance koje isparavaju nepromenjeno na povišenim temperaturama ili se analiziraju u obliku pouzdanih, isparljivih derivata. Samo 20% od poznatih organskih jedinjenja može se analizirati pomoću gasne hromatografije bez prethodnog tretmana. Postoje tri bitne razlike između ove dve hromatografske tehnike^[69]:

- a) koeficijent difuzije uzorka u mobilnoj fazi je mnogo manji kod tečne nego kod gasne hromatografije (koeficijent difuzije je najvažniji faktor koji određuje vreme trajanja hromatografske analize);
- b) viskoznost mobilne faze je veća kod tečne nego kod gasne hromatografije (mana je visoka viskoznost jer dovodi do malog koeficijenta difuzije i velikog otpora protoku mobilne faze);
- c) stišljivost mobilne faze pod pritiskom je zanemarljiva kod tečne dok je kod gasne hromatografije značajna (ovo je prednost kod tečne hromatografije jer je kao rezultat brzina protoka mobilne faze konstantna duž cele kolone i postoje jednaki optimalni uslovi ako je brzina protoka pravilno izabrana).

2.5.2. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija je analitička metoda koja se koristi u cilju identifikacije jedinjenja ali i određivanja njihove strukture. Široka upotreba ove pouzdane metode je posledica brze, selektivne i osetljive analize, širokog opsega signala, mogućnosti kvantifikacije i kombinacije sa hromatografskim metodama. Pomoću masene spektrometrije jedinjenja se mogu fragmentisati a dobijeni fragmenti daju bitne, karakteristične informacije o masi ispitivanog molekula i strukturi jedinjenja. Uopšteno, maseni spektrometri su instrumenti koji razdvajaju jonizovane atome ili molekule na osnovu razlike u odnosu njihove mase i naelektrisanja (m/z). Sastoje se od jonizatora u kojem se vrši jonizacija analiziranih atoma ili molekula, analizatora (najčešće magnetno polje) u kojem se joni razdvajaju u prostoru i/ili vremenu, i detektora jona u kojem joni generišu električni signal koji se registruje na pisaču, računaru ili nekom drugom uređaju (Slika 8). Pošto analizator i jon detektor zahtevaju niske pritiske pri radu, instrument mora da sadrži i sistem pumpi. Najčešće se maseni spektrometar povezuje sa uređajima koji služe za odvajanje analiziranih komponenata u cilju povećanja osetljivosti, opsega i selektivnosti analitičkih metoda. Na primer, hromatografsko odvajanje se može izvesti pre maseno-spektrometrijske analize (GC-MS, LC-MS).^[72]



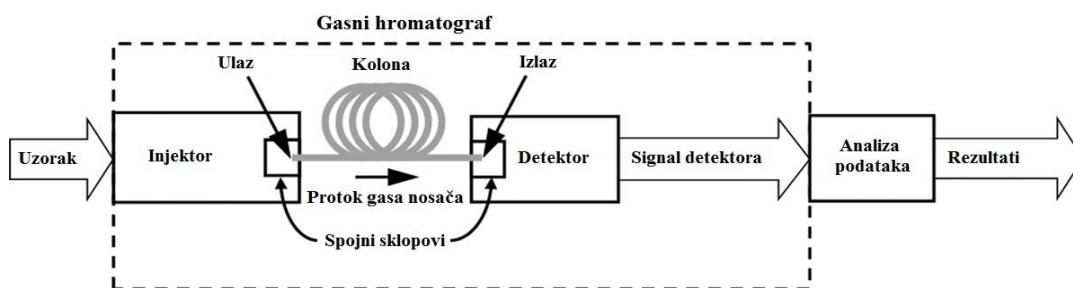
Slika 8. Šema masenog spektrometra sa magnetnim analizatorom^[73]

U masenoj spektrometriji postoje raznovrsni načini jonizacije, analiziranja mase i metode detekcije. U cilju nastanka jona iz atoma ili molekula može se koristiti nekoliko načina jonizacije: elektronska jonizacija, jonizacija brzim atomima i jonima, termosprej jonizacija, hemijska jonizacija pri atmosferskom pritisku, elektrosprej jonizacija i dr^[74]. Iako postupak jonizacije zavisi od vrste jedinjenja koja se određuju, kombinacija analizatora mase i detektora su ključni za kvalitet i pouzdanost analize^[75]. U zavisnosti od načina razdvajanja jona, analizatori mogu biti kvadrupolni, magnetni sektori, jonska zamka (eng. *Ion trap*), TOF analizatori (eng. *Time of Flight*) ili razne vrste analizatora na osnovu Furijeove transformacije (FT)^[75]. Analizatori se dalje mogu kombinovati međusobno u cilju istovremene analize analita i njihovih fragmenata (MS/MS). Najpopularnije kombinacije su trostruki kvadrupol i kvadrupol/TOF hibridni analizatori^[75]. Alternativno, isti analizator se može koristiti za MS i MS/MS (MS²) analize, kao što su radiofrekventna jon-zamka (Paulova zamka – *Paul trap*) ili statička elektromagnetna zamka (Peningova zamka ili klopka – *Penning trap*). Detekcija jedinjenja može se izvesti u pozitivnom ili negativnom jonskom modu.^[74,75]

2.5.3. Gasna hromatografija sa plameno-jonizacionim detektorom (GC-FID)

Analitička gasna hromatografija je tehnika razdvajanja komponenata smeše kod koje uzorak prvo isparava pa se zatim unosi u hromatografsku kolonu (Slika 9)^[70,76]. Pored odvajanja komponenata, cilj ove metode je kvalitativno i kvantitativno određivanje isparljivih supstanci^[76]. Hemijski inertni gasovi kao što su helijum, argon, azot, ugljen-dioksid ili vodonik, koriste se kao mobilna faza (još nazivana i gas nosač) za transport analita kroz stacionarnu fazu^[70]. Stacionarna faza je najčešće mikroskopski sloj tečnosti ili polimer na

inertnom čvrstom nosaču. Kolona je smeštena u peći, koja je pod kontrolom temperature. Optimalna temperatura kolone zavisi od tačke ključanja uzorka i potrebnog stepena razdvajanja^[70]. Kada se razdvajaju komponente smeše sa širokim opsegom temperatura ključanja, temperaturni program se kontinuirano ili u koracima povećava (gradijentno određivanje). Detektor služi za nadgledanje i registrovanje analita koji izlazi iz kolone, na taj način što proizvodi signal koji je srazmeran količini analita^[70,76]. Dobijeni signali detektora se grafički prikazuju hromatogramom koji sadrži informacije kao što su pozicija, visina i površina odvojenih pikova molekularno identifikovanih analita. Granica detekcije detektora je najmanja koncentracija analita na koju detektor reaguje sa određenim stepenom pouzdanosti.^[76]



Slika 9. Šema gasnog hromatografa^[76]

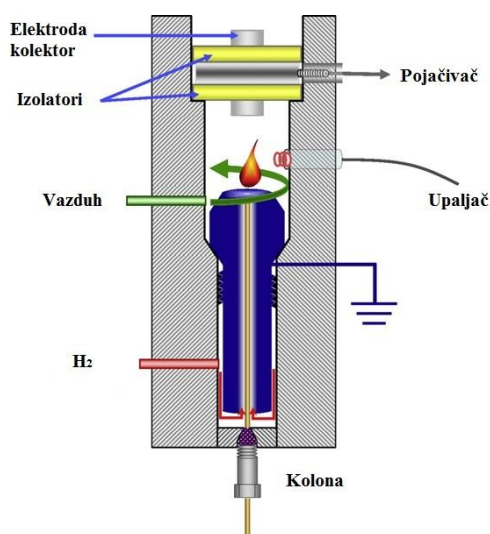
Poboljšanje performansi odvajanja komponenta smeše može se smatrati primarnim ciljem teorijskog razmatranja GC. Optimizacijom GC sistema treba prilagoditi različite faktore i procese koji se dešavaju tokom analize. Neki od njih su neidealnost gasa nosača, površina tečne stacionarne faze, neujednačena debljina čvrste stacionarne faze, tačno predviđanje vremena zadržavanja, stepen razdvajanja i granica detekcije. Dodatno, treba posmatrati efekte operativnih parametara: dimenzije kolone, tip i brzina protoka gasa nosača, programiranje temperature i optimalne brzine grejanja, ograničenja detektora, vreme analize, složenost matematičkog opisa procesa i dr.^[76]

Stacionarne faze kod GC tehnike „spakovane” su u kapilarne kolone, sastavljene od stopljenog silicijum-dioksida (eng. *fused silica*) ili nerđajućeg čelika, sa unutrašnjim prečnicima u rasponu od 100 do 300 μm . Efikasnost kolone zavisi i od njene dužine koja je u rasponu od 2 m do 50 m^[70]. Uvođenjem stopljenog silicijum-dioksida u proces pravljenja kolona znatno je poboljšana i ubrzana GC analiza. Dobijene su kapilarne kolone koje su jake, fleksibilne, znatno tanjih zidova pri čemu mogu biti dosta produžene, namotane i bolje se spajaju sa injektorom i detektorom^[77]. Postoje raznovrsne stacionarne faze, većina ima veliku molekularnu masu i predstavljaju termostabilne polimere, voskove i smole. Najčešće

upotrebljavane stacionarne faze su razne vrste polisiloksana jer su stabilni, čvrsti i prilagodljivi^[70].

Odabir detektora je jedna od ključnih prednosti GC u odnosu na druge vrste hromatografije. Gas nosač koji se koristi u GC je transparentan, nereaktivan za većinu detektora pri čemu se smanjuju smetnje i šum pozadine na hromatogramu^[78]. U GC analizi mogu se koristiti razni robusni i osetljivi detektori koji se zasnivaju na: procesu jonizacije u gasnom obliku (plameno-jonizacioni - FID), specifičnim osobinama (detektor toplotne provodljivosti, *Thermal Conductivity Detector* - TCD), optičkim osobinama (plameno fotometrijski, *Flame Photometric Detector* – FPD; hemiluminescentni, *ChemiLuminescent Detector* - CLD i atomske emisije, *Atomic Emission Detector* - AED), elektrohemiji (elektrolitičko provodljivi, *ElectroLytic Conductivity Detector* - ELCD) i naprednoj spektroskopiji (maseni - MS i infracrveni, *InfraRed* - IR).^[77,78]

Najčešće korišćeni detektor u gasnoj hromatografiji je FID detektor (Slika 10). Ima jedinstvene karakteristike koje ga postavljaju iznad svih drugih detektora koji se upotrebljavaju u GC: širok linearni radni opseg, niska cena, jednostavno rukovanje, brz odgovor i izdržljivost^[78]. Kod ovog detektora gas analita iz kolone se uvodi u plamen nastao sagorevanjem smeše vodonika i vazduha. Na taj način nastaju joni i elektroni koji provode električnu struju (jonizacija analita iz uzorka). Plamen je postavljen tako da je deo električnog kola kroz koje protiče jača struja kada se unese analit i na taj način se analit registruje. FID je najkorisniji za detekciju organskih jedinjenja, jer nije osetljiv na karbonilne, alkoholne i amino grupe kao ni na halogene i negorive gasove kao što su voda i ugljen-dioksid^[70,78].



Slika 10. Šema plameno-jonizacionog detektora^[78]

Određivanje sadržaja isparljivih jedinjenja u hrani može da bude korisno za hemijsku karakterizaciju proizvoda, evaluaciju kvaliteta i u svrhu njihovog poređenja i sledljivosti. Gasna hromatografija se može primeniti u analizi isparljivih supstanci koje se koriste da se utvrdi geografsko poreklo nekih proizvoda kao što su maslinovo ulje, kakao, kafa ili sir. U drugim slučajevima, određivanje profila isparljivih jedinjenja je korišćeno da potvrdi botaničko poreklo proizvoda kao što su cimet i med, zatim odredi razlike u sortama kod maline, breskve, jabuke, tartufa i sl.^[72]

2.5.4. *Tečna hromatografija - masena spektrometrija (LC-MS)*

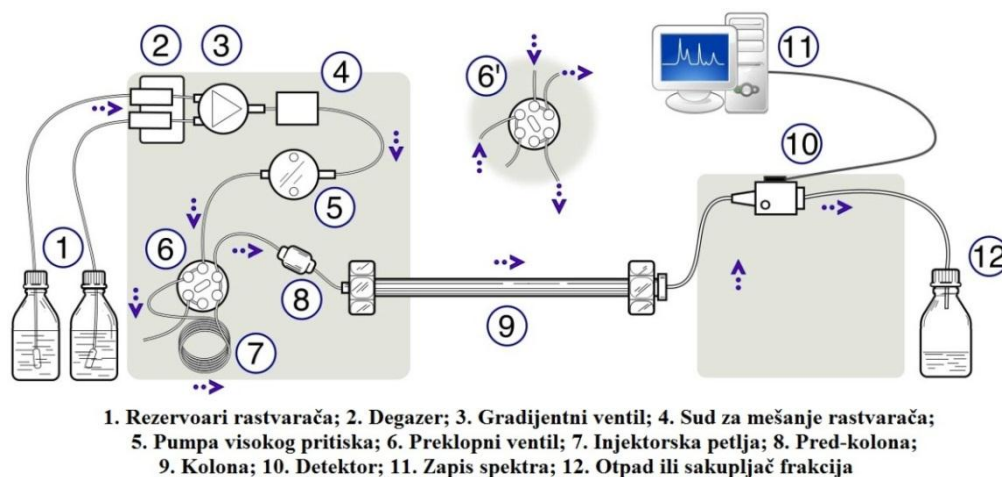
Pod terminom tečnohromatografski sistem većinom se podrazumeva svaka visokoefikasna hromatografska tehnika koja koristi tečnu mobilnu fazu i sastoji se od kolone povezane sa jednim krajem za injektor a sa drugim, izlaznim krajem za detektor (Slika 11). Kolona je temperirana i kroz nju prolazi tečna mobilna faza zajedno sa komponentama smeše pokretana pumpom. Prema dimenzijama i dizajnu kolona, kolonska tečna hromatografija se dalje može podeliti na hromatografiju sa kapilarnim kolonama i sa punjenim kolonama.^[71]

Najčešći detektori korišćeni pri LC analizi su selektivni detektori (UV/VIS, IR, MS, NMR, fluorescentni i dr) koji mere fizičku ili hemijsku osobinu karakterističnu za analit, samo komponente koje imaju datu osobinu biće registrovane. Detektori se mogu podeliti na destruktivne i nedestruktivne, kao i podela na one koji su osetljivi na masu i one osetljive na koncentraciju.^[71]

Tokom hromatografskog procesa svaka komponenta smeše uspostavlja dinamičku ravnotežu raspodele između mobilne i stacionarne faze. Pošto se komponente smeše kreću zajedno sa mobilnom fazom ravnoteža se uvek narušava i javlja se serija sorpcije i ekstrakcije komponenta koje se kontinualno odvijaju sve dok su komponente u kontaktu sa stacionarnom fazom. Koncentracioni profil komponente smeše nošene mobilnom fazom i vezane za stacionarnu fazu mogu se u idealnom slučaju predstaviti Gausovom krivom. Brzina kretanja komponenti zavisice od njihovog afiniteta prema stacionarnoj fazi odnosno duže se zadržavaju komponente koje imaju jače interakcije sa stacionarnom fazom (na polarnoj stacionarnoj fazi duže se zadržavaju polarna jedinjenja od nepolarnih jedinjenja slične strukture i sl.). Ukoliko je razlika u brzinama eluiranja dovoljno velika, i kolona dovoljno duga, zone (pikovi) komponenta će se dobro razdvojiti dok stignu do kraja kolone.^[71]

Visokoefikasna tečna hromatografija (HPLC) jedna je od najznačajnijih analitičkih tehnika koja se dosta koristi u nauci, industriji, forenzici, zaštiti životne sredine i mnogim, drugim oblastima, zahvaljujući odličnoj analizi širokog spektra analita, najčešće jednostavne pripreme uzoraka, velike fleksibilnosti i odličnih performansi. Pod HPLC se podrazumeva nekoliko tipova hromatografije kao što su normalno-fazne, reverzno-fazne, jonoizmenjivačke, afinitetne, hiralne, hromatografija jonskih parova i dr.^[71]

Performanse tečne hromatografije su poboljšane uvođenjem ultra-visokoefikasne tečne hromatografije (eng. *Ultra High Performance Liquid Chromatography* - UHPLC). U cilju boljeg hromatografskog razdvajanja, nove kolone su pakovane česticama veoma malih dimenzija (1,7 μm) pri čemu se obezbeđuje bolja efikasnost nego kod standardnih kolona (veća kontaktna površina). Poboljšan je i sistem protoka mobilne faze koji radi pri višim pritiscima i na taj način omogućava povoljniji viskozitet mobilne faze i sposobnost rastvaranja analita. Zbog korišćenja visokih pritiska neophodan je bio i razvoj boljeg hardvera u LC tehnologiji. Kao rezultat kombinacije novih kolona i visokog pritiska, UHPLC ima poboljšanu osetljivost i maksimalnu rezoluciju pri čemu se smanjuje vreme trajanja i troškovi analize.^[79]



Slika 11. Šema LC uređaja^[80]

Poslednjih godina, UHPLC povezan sa hibridnim masenim spektrometrom, koji objedinjuje LTQ (*Linear Trap Quadrupole*) i OrbiTrap maseni analizator (LTQ OrbiTrap MS), pokazao se kao efikasna tehnologija i sve se više koristi za identifikaciju fenolnih jedinjenja u biljnim ekstraktima. Primena ove hibridne tehnike omogućava istovremeno

određivanje kvalitativnog sadržaja, kvantifikaciju, MSⁿ analizu zasnovanu na visokoj rezoluciji merenja tačne mase i na podacima dobijenim MSⁿ eksperimentima (retenciono vreme analita, MSⁿ spektar tj. mehanizam fragmentacije, merenje tačne mase fragmentacionih jona i poređenje sa dostupnim standardima).^[79]

Neki od primera primene UHPLC u kombinaciji sa LTQ i Orbi Trap MS spektrometrom su određivanje fenolnog profila propolisa topola tipa i autohtonih genotipova paprike poreklom iz Srbije^[81,82]. U ekstraktima srpskog propolisa kvantifikovano je deset, a identifikovano je čak sedamdeset pet fenolnih jedinjenja koja pripadaju fenolnim kiselinama, različitim klasama flavonoida i njihovim derivatima^[81], dok u srpskoj paprici je identifikovano četrdeset devet fenolnih jedinjenja a čak dvadeset pet kvantifikovano poređenjem retencionog vremena i MS spektra sa dostupnim standardima.^[82]

Hibridni maseni spektrometar LTQ OrbiTrap MS je jedna od najpogodnijih opcija za kvalitativnu analizu jer rutinski daje veliku rezoluciju i tačnost mase koje su neophodne kako bi se skratilo vreme analize a povećala pouzdanost dobijenih rezultata. Zbog svoje sposobnosti da eliminiše smetnje u početnoj fazi selekcije mase i specifičnosti MS/MS određivanja, ovaj spektrometar olakšava i kvantitativnu analizu neciljanih jedinjenja. Za karakterizaciju je neophodna fragmentacija molekula i merenje tačne mase nastalih jona kojima se postiže određivanje strukture nepoznatih jedinjenja.^[79]

Što se tiče fragmentacije flavonoida, ona se može postići na dva načina: jedan je otvaranje prstena, koji se karakteriše gubitkom malih, neutralnih molekula kao što su H₂O (18 Da), CO (28 Da) i CO₂ (44 Da). Drugi glavni način je unakrsno cepanje prstena ili *Retro-Diels-Alder*-ova reakcija (RDA) za polifenole. Fragmenti, koji se mogu dobiti u MS spektru, nastaju gubitkom C₂H₂O (42 Da) i uzastopnim gubitkom H₂O i CO (46 Da) i oni su generalno manje karakteristični jer su zajednički za većinu flavonoida. Maseni spektar flavonoid-(di)glikozida je koristan alat za razlikovanje i razdvajanje 1→2 i 1→6 vezane šećerne komponente u diglikozidima i za razlikovanje između *O*- i *C*- glikozidnih flavonoida^[83]. Dodatno, tečnom hromatografijom kombinovanom sa masenom spektrometrijom mogu se dobiti informacije za jako polarne, termički labilne i velike molekule glikozidnih konjugata kao što su a) tip glikozilacije (*O*-, *C*- ili mešoviti glikozidi); b) aglikonski ostatak; c) vrste ugljenih hidrata (heksoze, dezoksiheksoze ili pentoze); d) sekvenca glikonskog dela; e) interglikozidne veze i f) mesto vezivanja supstituenta za aglikon^[84].

2.5.5. Visokoeffikasna jonoizmenjivačka hromatografija (HPIEC)

Terminologija koja se koristi za klasifikaciju različitih hromatografskih tehnika zasniva se na ključnom mehanizmu razdvajanja/zadržavanja komponenata smeše. Jonska hromatografija (*Ion Chromatography* - IC) je izuzetak od ove osnovne klasifikacije pošto njen naziv potiče od klase analita koji se odvajaju a ne tipa hromatografske interakcije. Ova terminologija stvara neke značajne poteškoće prilikom pravilnog definisanja IC i klasifikacije raznih hromatografskih tehnika za razdvajanje jona.^[85]

U većini slučajeva, prikladno je definisati modernu IC kao HPLC malih, naelektrisanih, rastvorenih analita pretežno zasnovanu na elektrostatičkoj interakciji tih analita sa suprotno naelektrisanim mestima/grupama stacionarne faze. Mehanizam jonoizmenjivačke hromatografije se pretežno zasniva na elektrostatičkim interakcijama između hidratiranih jona analita (A_1, A_2, \dots, A_n) i suprotno naelektrisanih funkcionalnih grupa (F) jonskog izmenjivača tj. stacionarne faze smeštene unutar kolone. Rastvoreni joni se transportuju na stacionarnu fazu protokom eluenta tj. mobilne faze koji ima odgovarajuću elucionu snagu pomoću prisutnih, konkurentnih jona (E). U procesu razdvajanja, jonoizmenjivač je uravnotežen sa jonima koji se eluiraju, a u slučaju anjon-izmenjivačke hromatografije osnovne interakcije mogu biti opisane jednačinom^[85]:



Relativna jačina interakcija između svakog pojedinačnog anjona, A_j^- i funkcionalne grupe F^+ jonskog izmenjivača definiše selektivnost jonoizmenjivačkog sistema. Afinitet jonskog izmenjivača prema specifičnom anjonu A_j^- , može se izraziti preko koeficijenta distribucije^[85]:

$$D = \frac{[A_j]_s}{[A_j]_m} \quad (2)$$

ili preko koeficijenta selektivnosti:

$$K_E^{Aj} = \frac{[A_j]_s[E]_m}{[A_j]_m[E]_s} \quad (3)$$

gde su $[A_j]_s$ i $[A_j]_m$ ravnotežne koncentracije jona A_j u stacionarnoj i mobilnoj fazi. Koeficijent selektivnosti uzima u obzir i afinitet konkurentnog jona eluenta, E. Isti princip interakcija važi i za katjon-izmenjivačku hromatografiju samo je razlika u naelektrisanju koje je suprotno u odnosu na anjonsku izmenu.

U praksi, selektivnost sistema zavisi od karakteristika mobilne faze, karakteristika stacionarne faze, od vrste jona analita i drugih interakcija i ravnoteža koje se uspostavljaju tokom procesa razdvajanja (npr. hidrofobne interakcije organskih jona, vodonične veze i dr.). U slučaju kada nema dodatnih interakcija, zadržavanje jona analita u jonoizmenjivačkoj hromatografiji je jednostavno i proporcionalno njegovom naelektrisanju, polarizabilnosti i jonskom radijusu.^[85]

Većina eluenata koji se koriste u jonoizmenjivačkoj hromatografiji su vodeni rastvori, dok u specifičnim slučajevima, kada treba da se izbegnu nepoželjne hidrofobne interakcije, mogu se koristiti određeni organski rastvarači. Eluenti koji se primenjuju pri anjonskoj izmeni su raznovrsni, od razblaženih rastvora elektrolita do složenih, višekomponentnih, puferskih rastvora organske ili neorganske prirode. Snaga eluiranja zavisi od koncentracije anjona analita, njihove selektivnosti za određenu stacionarnu fazu kao i od načina detekcije. Tipični eluenti za anjonsku izmenu u zavisnosti od korišćenog detektora su hidroksidi (natrijum ili kalijum), karbonati/bikarbonati (natrijum ili kalijum), alifatične karboksilne kiseline (limunska, vinska, sirćetna, mravlja), aromatične i alifatične sulfonske kiseline, aromatične karboksilne kiseline i neorganske soli.^[85]

U slučaju razdvajanja neorganskih i organskih katjona, postoje dve glavne grupe elucionih sistema. Prvu grupu čine sistemi u kojima se kao eluenti koriste razblažene organske i neorganske kiseline, a drugu sistemi za posebnu upotrebu koji koriste protonovane organske baze. Najpopularniji eluenti koji se koriste za standardno katjonsko razdvajanje neorganskih, jednovalentnih i dvovalentnih katjona (alkalnih i zemnoalkalnih metalnih katjona) kao i malih, organskih amina su razblažena azotna ili metansulfonska kiselina.^[85]

Postoji nekoliko opštih parametara za odabir jonoizmenjivačke kolone. Jonoizmenjivačka selektivnost zavisi od vrste jonoizmenjivačkih grupa na površini stacionarne faze, kapaciteta jonske izmene (ili tačnije raspodele naelektrisanih grupa na površini), pristupačnosti za interakcije sa rastvorenim jonima, veličine čestica adsorbensa i, donekle, od hidrofobnosti matriksa stacionarne faze.^[85]

Efikasno razdvajanje anjona nastalih disocijacijom slabih kiselina moguće je samo u baznoj sredini, pa je neophodno da anjonski izmenjivači budu hidrolitički stabilni. Najčešće korišćene i komercijalno dostupne kolone za anjonsku izmenu se sastoje od polimera: poli(vinilalkohol), poli(metakrilat), polistiren-divinilbenzen i poli(stiren-etilvinilbenzen). Više od 95% svih anjonskih izmenjivača koji se koriste u IC sadrže kvaternarne amonijumske

funkcionalne grupe. Mogu se koristiti i slabokiseli anjon-izmenjivači koji sadrže primarne, sekundarne i tercijalne amino funkcionalne grupe. Komercijalno dostupni katjon-izmenjivači mogu se podeliti u tri grupe: jakokiseli katjon izmenjivači sa sulfonskom kiselinom kao funkcionalnom grupom; slabokiseli sa karboksilnom, fosfornom i fosofrastom kiselinom kao funkcionalnim grupama i jono-izmenjivači sa kompleksirajućim ligandima.^[85]

Za detekciju jona nakon razdvajanja najčešće se koriste: konduktometrijski detektori (sa ili bez supresora), elektrohemijjski detektori (amperometrijski), spektroskopski detektori (fotometrijski) i maseni detektori.^[85]

Amperometrijska detekcija se može koristiti za detekciju elektroaktivnih rastvora, konkretno onih koji se lako mogu oksidovati ili redukovati. Princip ovog detektora je da primenjuje određeni potencijal između radne i referentne elektrode i kada rastvor prolazi preko radne elektrode oksiduje se ili redukuje i pri tim procesima teče struja. Pulsni amperometrijski detektor (PAD) se često koristi pri IC razdvajanjima. Ova vrsta detektora koristi potencijal za merenje kao i dva potencijala „čistača” za obezbeđivanje konstantno elektrohemijjski čiste površine elektroda. Analiza se vrši nizom cikličnih potencijala primenjenih na radnu elektrodu, merenjem prvog primenjenog potencijala i merenjem struje posle odgovarajućeg ravnotežnog vremena. Nakon analize, veliki pozitivni potencijal se primenjuje na elektrodu koja izaziva oksidaciono uklanjanje bilo kog proizvoda reakcije i naknadni negativni potencijal sa ciljem da se vrati radna elektroda u prvobitno stanje. Detektor PAD se primenjuje za detekciju anjona kao što su nitrati, nitriti, tiosulfati nakon njihovog razdvajanja pomoću IC. Najveći značaj primene PAD uz IC razdvajanje je određivanje šećera i aminokiselina u životnoj sredini, industriji i biološkim uzorcima.^[85]

Saharidi mogu formirati komplekse sa kalcijumom ili nekim drugim metalom (najčešće Ag^+ ili Pb^{2+})^[86]. Razdvajanje šećera je zasnovano na razlici u stabilnosti i sposobnosti rastvaranja nastalog kompleksa u mobilnoj fazi. U slučaju oligosaharida ipak je dominantan mehanizam razdvajanje molekula po njihovoj veličini, dok je razmena liganada dominantan mehanizam za razdvajanje monosaharida. Stabilnost nastalog kompleksa zavisi od vrste upotrebljavanog kontra-jona^[86] kao i od konfiguracije hidroksilnih grupa šećera.^[69]

Drugi način određivanja saharida je korišćenje anjonskog izmenjivača i to najčešće visokoefikasne anjon-izmenjivačke hromatografije (HPAEC – *High-Performance Anion-Exchange Chromatography*). Korišćenje HPAEC sa stacionarnom fazom na bazi polimera pri visokoj pH vrednosti u kombinaciji sa PAD detektorom je moćna i pouzdana tehnika za

razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju šećera. Detektor PAD je karakterističan za detekciju ugljenih hidrata zbog visoke selektivnosti i relativne specifičnosti za jedinjenja sa OH grupama. Na višim pH vrednostima (od 12 do 14) šećeri se ponašaju kao parcijalno jonizovane, slabe kiseline (oksianjoni) pri čemu mehanizam njihovog razdvajanja može biti anjonska izmena. Razlika u vremenu eluiranja nastaje usled razlike u veličini i orijentaciji molekula šećera (pogotovo u slučaju oligosaharida), dostupnosti i broju vezujućih OH grupa oksianjona prema funkcionalnim grupama na površini stacionarne faze.^[86]

2.6. Hemometrijske metode

Hemometrija je definisana kao hemijska disciplina koja koristi statističke i matematičke metode u svrhu dizajniranja ili odabira optimalnih postupaka i eksperimenata da bi se obezbedile maksimalne hemijske informacije analiziranjem hemijskih podataka. Takođe, može se reći da se hemometrija odnosi na zaključivanje na osnovu relevantnih informacija iz hemijskih podataka pomoću matematičkih i statističkih alata. Glavni zadaci hemičara su analiza složenih smeša, sinteza jedinjenja kao i konstrukcija i rad hemijsko-tehnoloških postrojenja. Međutim, hemijski/fizički sistemi od praktičnog značaja često su vrlo komplikovani i ne mogu se dovoljno teorijski opisati.^[87]

Multivarijantna statistička analiza je metoda izbora za analizu skupa podataka koji su dobijeni iz složenih sistema i koji mogu da kreiraju matematičke modele sposobne da predvide važne, direktno nemerljive vrednosti. Hemijska jedinjenja, reakcije, uzorci, tehnološki procesi su multivarijantne prirode, što znači da je za njihovu dobru karakterizaciju neophodno sagledavanje većeg broja promenljivih (varijabli). Multivarijantna analiza podataka razmatra mnoge varijable zajedno i tako često dobija novi i bolji kvalitet u proceni podataka. Mnogi primeri pokazuju da multivarijantni pristup može biti uspešan čak i u slučajevima kada je univarijantno razmatranje potpuno beskorisno.^[87]

Hemometrijske metode su postale tehnike koje se rutinski primenjuju. Tipični problemi koji se mogu uspešno prevazići hemometrijskim metodama su: određivanje koncentracije jedinjenja iz kompleksnih smeša (često iz podataka infracrvenih spektara), klasifikacija uzoraka prema poreklu (iz analitičkih ili spektroskopskih podataka), predviđanje strukturnih osobina ili aktivnosti hemijskih jedinjenja (iz podataka o hemijskoj strukturu), prepoznavanje prisutnosti/odsutnosti podstruktura u hemijskoj strukturi nepoznatog

hemijskog jedinjenja (iz spektroskopskih podataka), procena procesa u hemijskoj tehnologiji (iz podataka hemijske analize ili spektroskopskih podataka).^[87]

2.6.1. Analiza glavnih komponentata

Analiza glavnih komponentata (*Principal Component Analysis* - PCA) omogućava prikaz originalnih podataka na način koji najbolje opisuje varijansu podataka pri čemu se uočavaju sličnosti i razlike, kao i odstupajuće vrednosti među uzorcima. Ova multivarijantna statistička metoda formira novi koordinatni, latentni sistem čiji matematički model može da se predstavi kao^[88]:

$$D = T \times P \quad (4)$$

gde je D matrica podataka, a T i P su matrice skorova (*score*) i latentnih varijabli (*loading*). Prema PCA, podaci (posmatrani objekti ili uzorci) su predstavljeni i grupisani u multidimenzionalnom prostoru formiranom od strane međusobno normalnih latentnih varijabli koje predstavljaju udaljenosti između objekata^[88,89]. Latentne varijable tj. vektori koeficijentata latentnih varijabli (*loading vector*) definišu ose projektovane u nekoliko pravaca (glavnih komponentata – PC) koji predstavljaju linearnu kombinaciju originalnih podataka (skorovi).^[88,89] Glavne komponente opisuju maksimum varijanse podataka pri čemu prva glavna komponenta (PC1) se bira u smeru najveće varijanse, zatim druga glavna komponenta (PC2) je normalna na prvu i predstavlja varijabilitet koji nije objašnjen sa PC1^[88]. Sve dalje glavne komponente su ortogonalne na prethodne i na njihov pravac su projektovane varijanse među podacima koje nisu prethodno objašnjene. Glavne komponente sa niskim vrednostima varijansi pružaju informacije koje su od malog značaja za posmatranu analizu pa se mogu zanemariti.^[89]

Zavisnost skorova prve dve komponente je dvodimenzionalan, skor grafik koji daje raspored uzoraka, prikazujući grupisanje uzoraka kao i spoljašnje (odstupajuće) vrednosti.^[88] Odgovarajuće zavisnosti koeficijentata latentnih varijabli (*loading grafik* ili *grafik doprinosa pojedinačnih varijabli*) prikazuju zavisnost između varijabli i mogu se koristiti za određivanje varijabli koje doprinose pozicioniranju uzoraka u prikazu grafika skorova.^[89]

Cilj metode PCA je smanjenje dimenzionalnosti podataka i pronalaženje pravca (PC) među varijablama koji na najbolji način odražava relativno rastojanje između objekata a da opiše u što većem procentu ukupnu varijansu skorova. Na taj način se poboljšava

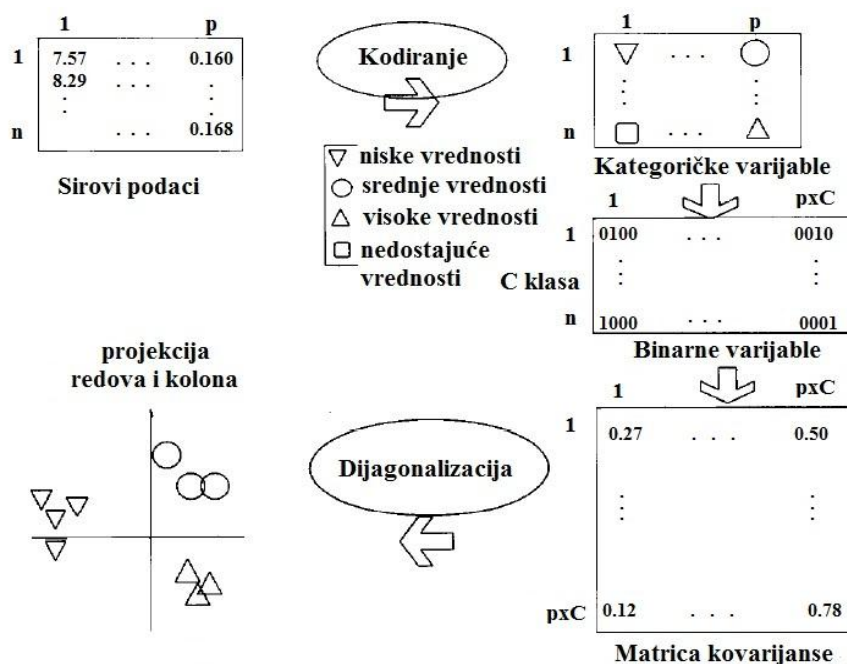
vizuelizacija podataka, prevodi visoko-korelisani u manji set nekorelisanih latentnih varijabli koje se mogu dalje iskoristiti u hemometriji, razdvajaju značajne informacije sadržane u podacima od onih manje bitnih.^[89]

2.6.1.1. Kategorijska analiza glavnih komponenata

Pretvaranje hemijskih informacija u kategorijske promenljive (varijable) je interesantan pristup za hemičare jer je veoma fleksibilan za rukovanje nedostajućim varijablama. Kada se analitički podaci posmatraju kao niz od n zapažanja, opisani I i p varijablama, opis od strane j omogućava postojanje nedostajućih varijabli korišćenjem klasičnih multivarijantnih statističkih metoda. Na primer, kvantitativne projekcione metode se ne odnose na projekcije zapažanja sa nedostajućim varijablama, jer većina algoritama koje sadrže te varijable se odbacuju. U nekim slučajevima, ovo smanjenje podataka ima neprihvatljivu veličinu. Međutim, mogu se iskoristiti metode koje mogu zameniti nedostajuće podatke bez ikakve prave provere.^[90]

Kategorijska analiza glavnih komponenata, *CATegorical Principal Component Analysis* (CATPCA) je generalni naziv za različite PCA metode koje funkcionišu na kategoričkim varijablama i u kojima se mogu kvalitativne vrednosti prevesti u kvantitativne. Kod ovih analiza mogu se kombinovati kvantitativni i kvalitativni podaci, pri čemu kvantitativne varijable odgovaraju numeričkim varijablama, a kvalitativne vrednosti imaju različite nivoe ili kategorije. Kategorije kvalitativnih podataka čuvaju neke osobine kontinuiranih numeričkih vrednosti.^[91]

Princip kategoričke analize podataka može se sažeti u nekoliko koraka (Slika 12). Prvi korak ili korak kodiranja: transformacija kvantitativne matrice podataka u kvalitativnu matricu istih dimenzija. Svaka pojedinačna vrednost je zamenjena brojem klase, označena oznakama od 1 do C . Drugi korak: transformacija svake kolone kodiranog niza u C binarne nove varijable (jedna po klasi): tj. na mestu jedne nekadašnje varijable j nalazimo C_j nove binarne varijable. Ova n ($p \times C$) matrica sadrži samo 0 i 1 vrednosti. Treći korak: izračunavanje matrice kovarijanse iz binarne matrice. To dovodi do stvaranja simetrične kvadratne $p \times C$, $p \times C$ matrice i četvrti korak: ekstrakcija svojstvenih vektora i računanje projekcije redova i kolona.^[90]



Slika12. Princip i algoritam kategorijske analize glavnih komponentata^[90]

Što je veći broj kategorija to je manja mogućnost gubitka informacija u koraku kodiranja. Međutim, pokazano je da se, u svim slučajevima, kvalitet prikaza smanjuje kada se veličina matrice povećava. Kvalitet je okarakterisan zbirom procenata varijanse svojstvenih vrednosti za faktore zadržane u prikazu. Sa druge strane, u cilju definisanja smernica za izbor graničnog broja kategorija dve napomene su korisne^[90]:

- Za jednu varijablu, ako zapažanja imaju istu vrednost moraju pripadati istoj klasi. Na taj način, granični broj kategorija ne može biti nasumično određen i povezane vrednosti imaju veliki značaj.
- Ako je veličina klasa jednaka, udaljenost između projekcija zapažanja (ili linije obrazaca) je maksimalna, što predstavlja neophodan cilj. Suprotno, veoma neizbalansirane veličine klasa mogu dovesti do nekoliko različitih zapažanja u istu kategoriju gde su izmešane i neprimetne.

Ove dve napomene se manje-više protivne jedna drugoj a osnovni princip metode se sastoji u stavljanju granice kategorija za svaku varijablu između dva zapažanja koji imaju „većinu” različitih rezultata.

2.6.2. Metoda delimičnih najmanjih kvadrata sa diskriminantnim pristupom

Metoda delimičnih najmanjih kvadrata sa diskriminantnim pristupom (*Partial Least Square-Discriminant Analysis*, PLS-DA) se primenjuje u cilju klasifikacije uzoraka. Odgovor varijabli u ovoj nadzornoj tehnici je kategoričan tj. dobijeni matematički model može se koristiti u budućoj klasifikaciji nepoznatih uzoraka. Dodatno ova tehnika zanemaruje manje bitne i ometajuće varijable i smanjuje dimenzije prilikom klasifikacije. Osnovi PLS-DA sastoje se u primeni PLS regresionog modela na originalne varijable koje su indikatori grupe. Dalje, PLS-DA klasifikuje zapažanja iz rezultata PLS regresije indikatorskih varijabli.^[92]

PLS je jedna od najčešće korišćenih hemometrijskih metoda za multivarijantnu kalibraciju, koja može da se koristi i za regresiju i za klasifikacione zadatke a može da se koristi i za smanjenje dimenzionalnosti podataka^[93]. To je metoda za linearno modelovanje odnosa između setova posmatranih varijabli posredstvom tzv. latentnih varijabli (LV) koje istovremeno pokazuju visoku varijansu i visoku korelaciju sa zavisno promenljivom y ^[92,93]. Broj latentnih varijabli u PLS modelu se određuje unakrsnom validacijom. Unutrašnja pretpostavka svih PLS metoda je da korisni podaci nastaju pomoću sistema ili procesa koji je vođen malim brojem latentnih varijabli, koje nisu direktno posmatrane ili izmerene i predstavljaju intermedijerne varijable^[93]. Za dobijanje odgovarajućih PLS modela značajna je procena varijabli koje se prepoznaju na osnovu vrednosti značajnih projektovanih varijabli (*Variable Importance in Projection*, VIP). Varijable sa VIP vrednostima većim od 1 smatraju se najrelevantnijim za objašnjenje određenih klasa uzoraka. Varijable sa VIP vrednostima manjim od 1 se mogu isključiti iz modela a da ne utiču na smanjenje predikcionih karakteristika modela.^[94]

PLS-DA je poseban tip regresione analize kod koje projektovane varijable (zavisne promenljive, y) predstavljaju klase. Razmatranjem indikatorskih i projektovanih varijabli, vrednosti uzoraka zabeležene su u matrici X dimenzija $n \times D$ i u matrici Y veličine $n \times q$. Podaci u redovima matrice X predstavljaju n objekte (uzorke) sa D karakteristikama (indikatorske, nezavisne varijable), Y opisuje za iste n objekte q svojstva (projektovane varijable, klase). Metoda PLS-DA spada u grupu multivarijantnog oblika PLS koja se naziva PLS2 regresija i ima za cilj da nađe linearnu vezu između indikatorskih i projektovanih varijabli, korišćenjem matrice B ($D \times q$) regresionih koeficijenata i matricu grešaka E ^[93]:

$$Y = XB + E \tag{5}$$

U PLS-DA, matrica Y se sastoji od binarnih varijabli koje opisuju različite klase (npr. nule i jedinice u slučaju dve klase). Broj zavisnih varijabli (y) je jednak broju klasa. Algoritam je optimizovan za uravnotežen slučaj tj. to znači da svaka klasa ima isti broj članova^[93]. Za ovu analizu vektor klasa se stvara za svaku promenljivu (varijablu) iz svake klase sa vrednošću 1 ako uzorak pripada i vrednošću 0 ako ne pripada određenoj klasi. Dodatno, ispitivani set se može podeliti na test i kalibracione setove podataka u cilju provere modela.^[94]

2.7. Autentičnost hrane

Razvoj i primena analitičkih metoda i tehnika u nauci o hrani razvijani su paralelno sa zabrinutošću potrošača o bezbednosti, kvalitetu i originalnosti hrane koju konzumiraju. Da bi se dobio adekvatan odgovor, analitičari se moraju suočiti sa složenim izazovima koji zahtevaju korišćenje najbolje dostupne nauke i tehnologije. Uzrok složenosti problematike je tzv. globalizacija tržišta i kretanja hrane i pića širom sveta koja mogu dovesti do enormnih kontaminacija, ilegalnih trgovina i zloupotreba. Dodatnu poteškoću predstavljaju proizvodi koji dele zajednička skladišta ili sadrže složene i prerađene sastojke poreklom iz različitih delova sveta.^[95]

Potvrda opisa hrane u smislu njenog sastava, procesa proizvodnje ili porekla je veoma važna u zaštiti potrošača i sprovođenju zakona u oblasti hrane. Potrošačima su potrebne jasne i tačne informacije o hrani koju kupuju jer se ona odražava na njihov način života, ekonomske ili zdravstvene probleme. Stoga, opis i/ili označavanje hrane moraju biti pouzdani i precizni, posebno pri označavanju hrane koja se obrađuje i koja je složenog sastava^[96]. Kvalitet proizvoda obuhvata poznavanje porekla (biološkog i geografskog), hemijskog sastava, da hrana ima odgovarajuća fizička svojstva, zadovoljavajuće senzorne osobine, zdravstvenu sigurnost u pogledu mikrobiološke i toksične kontaminacije, uticaj obrade (prerade) i skladištenja na kvalitet.^[97]

Hrana mora da bude „autentična” a ne pogrešno deklarirana, a kontrola kvaliteta, označavanje i verifikacija porekla hrane mora biti propisani zakonom^[96]. Novi propisi u zemljama Evropske unije, zakon o označavanju hrane i zakon o obrazovanju u SAD-u i Montrealski protokol imali su veliki uticaj na laboratorije za ispitivanje hrane^[95]. Shodno tome, povećava se potreba za prikladnijim analitičkim procedurama i sofisticiranijim

instrumentima koji bi mogli ponuditi bolje kvalitativne i kvantitativne rezultate uz povećanu osjetljivost, preciznost, specifičnost i brzinu analize.^[95]

Postoji veliki broj svojstava hrane koje se uspješno određuju metodama analitičke hemije: identifikacija efekta proizvodnje, prerade i pripreme hrane na sadržaj hranljivih supstanci, detekcija toksičnih kontaminanata i inaktivacija prirodnih toksina, otkrivanje zloupotreba, karakterizacija hemijskog sastava hrane, proučavanje hrane (reologija, morfologija, struktura i dr), analiza fizičkih, fizičko-hemijskih, toplotnih i mikrobioloških karakteristika i dr.^[95]

Tri analitička pristupa se mogu razlikovati u zavisnosti od načina za dobijanje bitnih informacija: kod prvog pristupa informacija se dobija iz hemijskog sastava hrane, drugi ima biomolekularni pristup zasnovan na DNK analizama i analizama proteina a treći je fokusiran na izotopski pristup primenom analize stabilnih izotopa određenih atoma. Hemijski pristup obuhvata tri odvojena pravca koji vode do tri različite metodologije. Prvi određuje sadržaj hemijskih vrsta različite prirode upotrebom različitih tehnika i analitičkih metoda. Poseban slučaj podrazumeva upotrebu hemijskih markera koji su definisani kao posebne komponente reprezentativne za karakterizaciju kvaliteta date namirnice povezane sa njenom autentičnošću. Druga metodologija obuhvata određivanje profila komponenata definisanog kao skup vrednosti koje opisuju sadržaj povezanih sastojaka koje imaju iste fizičke (npr. isparljiva jedinjenja, rastvorena frakcija u određenom rastvaraču i dr) ili hemijske osobine (npr. polarna jedinjenja) ili jedinjenja koja pripadaju jednoj hemijskoj klasi (npr. fenolna jedinjenja, masne kiseline, fitosteroli itd.). Profili komponenata se obično dobijaju primenom jedne analitičke metode i ako su sastojci izraženi kao relativni odnosi onda se još i nazivaju kompozicioni profili. Treća metodologija obuhvata karakterističan instrumentalni prikaz koji odražava složeni hemijski sastav analiziranog uzorka i koji se može povezati sa njegovom autentičnošću (tzv. instrumentalni otisak prsta).^[98]

Zbog složenosti prehrambenih proizvoda pri kontroli kvaliteta hrane neophodno je koristiti i kombinovati više različitih analitičkih tehnika kako bi se dobile celokupne i potrebne informacije o kvalitetu i pratili ključni proizvodni parametri. Multivarijantna analiza podataka je pouzdana i precizna metoda za klasifikaciju i predobradu podataka uz minimalnu stopu grešaka i merne nesigurnosti. U kombinaciji sa brzim i pouzdanim spektroskopskim i hromatografskim tehnikama, daje bolje definisane informacije o kvalitetu proizvoda, olakšava razlikovanje uzoraka i olakšava utvrđivanje autentičnosti hrane.^[97]

Autentičnost semena breskve može biti od velikog značaja u pogledu procene porekla kao i u selekciji semena tokom programa oplemenjivanja i ukrštanja. Ispitivanje razlika u sastavu fitohemijskih biomarkera semena breskve poreklom iz različitih zemalja i čiji plodovi sazrevaju u različitom periodu može biti od pomoći za odgovarajuću klasifikaciju proizvoda, zaštitu autentičnosti breskve na tržištu kao i veću upotrebu sorti sa visokim kvalitetom i bogatijim nutritivnim sastavom. S obzirom da je veoma lako prikupiti odbačene koštice breskve u industrijskoj proizvodnji, iskorišćavanjem ovih sirovina mogu se postići veoma zapaženi rezultati u njihovoj daljoj primeni. Pri tome, reč je o veoma velikim količinama koštica (4.366,8 t u Srbiji samo od breskve tokom 2017. godine)^[11], jer one, mereno na suhu supstancu, imaju veću masu u plodu od jestivog dela – mezokarpa.^[39]

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Uzorci semena breskve

Osnovni podaci, kao što su naziv, pedigre, zemlja porekla, vreme zrenja ploda, boja mezokarpa i tip ploda, za semena 25 genotipova breskve analiziranih u ovoj disertaciji, prikazani su u Tabeli 1. Predznaci „-“ i „+“ označavaju da plodovi genotipova breskve sazrevaju pre ili posle standardne sorte „Redhaven“, koja u agroekološkim uslovima Srbije sazreva 25. jula. Genotipovi su grupisani prema poreklu u tri grupe: 11 standardnih sorti, 6 perspektivnih hibrida i 8 različitih genotipova vinogradarske breskve. Dodatno, kasnije prikazano u disertaciji, genotipovi su podeljeni i u dve grupe prema vremenu sazrevanja ploda, sorte sa ranim (-20 do +12) i kasnim (pozne sorte, +25 do +65) vremenom zrenja.

Zasad iz kojeg potiču uzorci za ispitivanja posađen je 2010. godine u okviru kolekcije oglednog dobra „Radmilovac“ Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Od svake sorte/genotipa sakupljeno je oko 50 plodova i analizirani su plodovi iz jedne godine. Plodovi su izabrani nasumično, sa svih delova krune, u vreme pune zrelosti, kada su počeli da mekšavaju i kada su mogli da se konzumiraju. Koštice su uklonjene od mesnatog dela ručno, oprane vodom i sušene na vazduhu, na sobnoj temperaturi, dve nedelje. Nakon toga, osušene koštice su skladištene u papirne kese. Neposredno pred analizu, endokarp je odstranjen i semena (Slika 13) su usitnjena u električnom mlinu za kafu. Cilju mlevenja je bilo povećanje dodirne površine uzorka i bolje ekstrakcije analiziranih komponenti. Usitnjena i osušena semena su korišćena za dalju analizu, gde su od svakog uzorka rađene najmanje dve probe.



Slika 13. Koštice i semena pet različitih sorti/genotipova breskve

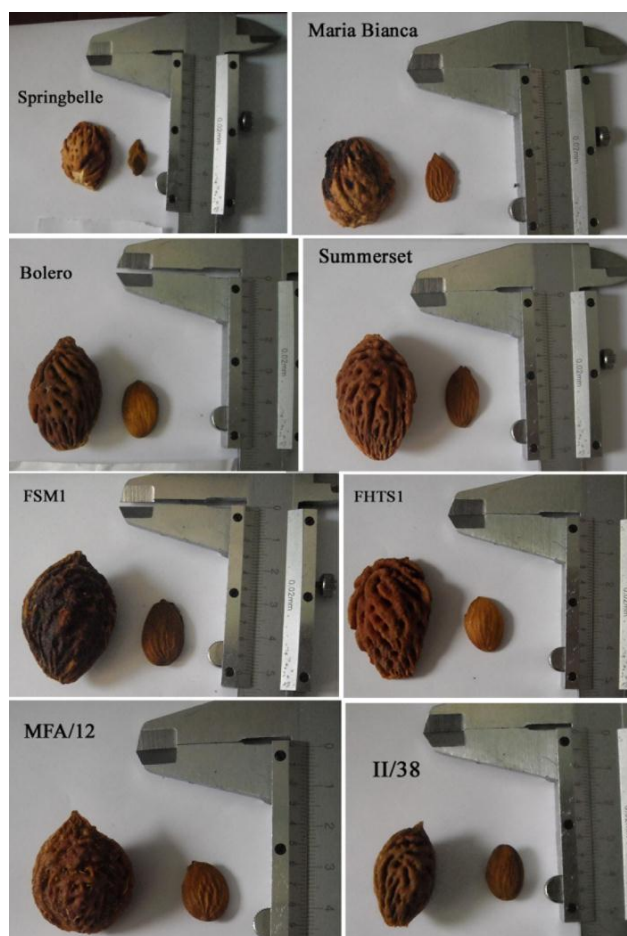
Tabela 1. Spisak ispitivanih sorti/genotipova breskve i njihove osnovne karakteristike

Broj uzorka	Sorte/Genotipovi	Zemlja porekla	Pedigre	Vreme zrenja ploda	Boja mezokarpa ploda	Tip ploda
Standardne sorte						
1	Springbelle	Italija	Nepoznat	-20	žuta	glođuše
2	Redcap	USA	Southland x Dixired	-13	žuta	glođuše
3	Maria Gracia	Italija	Fe-10/B/23 (Morettini 146 x Morettini 1)	-7	bela	glođuše
4	Royal Glory	USA	May Grand op.	-5	žuta	glođuše
5	Redhaven	USA	Halehaven x Kalhaven	0	žuta	kalanke
6	Rich Lady	USA	Amparo op.	+2	žuta	kalanke
7	Maria Bianca	Italija	Honey Dew Hale x Michelini	+8	bela	kalanke
8	Glohaven	USA	(J.H.Hale OP) x Kalhaven	+12	žuta	kalanke
9	Bolero	Italija	Cresthaven x Flamecrest	+25	žuta	kalanke
10	San Prins	USA	Redglobe x (Dixiland x FV 240-1) x (Hiley x Fireglow) x B2823	+33	žuta	kalanke
11	Summerset	USA	Kirkman Gem (mutant Rio OSO Gem) x (Hale poyna x Rio OSO Gem)	+65	žuta	kalanke
Perspektivni hibridi						
12	FSM1	Srbija	Flaminia x Samerset	+64	narandžasto-žuta	glođuše
13	FSM2	Srbija	Flaminia x Samerset	+61	žuta	kalanke
14	FA2	Srbija	Flaminia x Autumnglo	+61	narandžasto-žuta	kalanke
15	FA5	Srbija	Flaminia x Autumnglo	+60	narandžasto-žuta	kalanke
16	FHTS1	Srbija	Flaminia x Hale Tardiva Spadoni	+40	žuta	kalanke
17	FHTS4	Srbija	Flaminia x Hale Tardiva Spadoni	+63	žuta	kalanke
Vinogradarske breskve						
18	MFA/12	Srbija	Autohtoni genotip	+37	crvena	glođuše
19	MFA/16	Srbija	Autohtoni genotip	+37	crvena	glođuše
20	II/19	Srbija	Autohtoni genotip	+55	svetlo žuta	kalanke
21	II/31	Srbija	Autohtoni genotip	+54	svetlo žuta	kalanke
22	II/32	Srbija	Autohtoni genotip	+54	zeleno-bela	kalanke
23	II/35	Srbija	Autohtoni genotip	+50	zeleno-bela	kalanke
24	II/38	Srbija	Autohtoni genotip	+46	narandžasta	kalanke
25	II/42	Srbija	Autohtoni genotip	+47	svetlo žuta	kalanke

3.2. Određivanje fizičkih karakteristika semena breskve

U ovoj disertaciji posmatrana je razlika u fizičkim karakteristikama semena 25 sorti/genotipova breskve kao što su težina i dužina koštice, težina i dužina semena i sadržaj vode:

- Prosečna dužina koštica i semena određeni su merenjem dužine tri nasumično izabrane koštice ili tri semena korišćenjem nonijusa (*Nonius Vernier Caliper 0-150 mm*, Slika 14) i dodatnim izračunavanjem srednje vrednosti.
- Prosečna težina je dobijena merenjem mase tri takođe nasumično izabrane koštice ili osam semena i izračunavanjem srednje vrednosti. Težina je merena na analitičkoj vagi (*Adventurer Ohaus electronic balance*).
- Određivanje sadržaja vode u semenu izvršeno je po postupku za određivanje ukupne suve supstance opisanom u Pravilniku o metodama uzimanja uzoraka i vršenja hemijskih i fizičkih analiza radi kontrole kvaliteta proizvoda od voća i povrća (Sl. List SFRJ, br. 29/83). Uzorci su sušeni u sušnici (*Instrumentaria ST-05, Zagreb*) na 105 °C do konstantne mase.



Slika 14. Predstavnicu ispitivanih genotipova breskve

3.2.1. Određivanje sadržaja vode

Ovim postupkom određuje se ostatak posle sušenja uzoraka na 105 °C do konstantne mase. Od pribora i aparature potrebni su laboratorijska sušnica, eksikator sa sredstvom za sušenje, stakleni vegeglasi sa odgovarajućim poklopcima i analitička vaga.

Masa od 1 g uzorka je odmerena na analitičkoj vagi i prenetu u prazan vegeglas čija je masa prethodno tačno određena. Nakon zagrevanja sušnice na 105 °C ± 0,5 °C stavljeni su vegeglasi sa uzorcima i delimično otvorenim poklopcima. Uzorci su prvo sušeni 2 sata na konstantnoj temperaturi od 105 °C ± 0,5 °C, hlađeni 45 min u eksikatoru i mereni na analitičkoj vagi. Zatim su dodatno sušeni 1 sat, ponovo ohlađeni 45 min i izmereni. Ovoliko vreme sušenja je bilo dovoljno da se dostigne konstantna masa uzoraka.

Procenat vode u uzorcima određen je prema jednačini 6:

$$\% \text{ vode} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} * 100 \quad (6)$$

gde je:

m_0 – masa praznog vegeglasa [g]; m_1 – masa vegeglasa sa uzorkom pre sušenja [g]; m_2 – masa vegeglasa sa uzorkom posle sušenja [g]; $m_1 - m_0$ predstavlja i masu uzorka - m_{uz} [g].

3.3. Određivanje hemijskih karakteristika semena breskve

3.3.1. Reagensi i standardi

Etanol 96% (v/v) je nabavljen od firme *Zorka Pharma* (Šabac, Srbija), a sirćetna kiselina (MS čistoće), etil-acetat, *n*-heksan (HPLC čistoće), *n*-butanol, natrijum-hidroksid i natrijum-acetat od firme *Merck* (KGaA, Darmstadt, Nemačka). Acetonitril (MS čistoće) i metanol (HPLC čistoće) su nabavljeni u *Fluka Chemie AG* (Buh, Švajcarska), a kalijum-hidroksid, natrijum-hlorid i natrijum-hidrogensulfat (anhidrovano) u *Sigma-Aldrich* (Štajnhajm, Nemačka). Ultra-čista voda (*MicroPure*, 0,055 µS/cm, TKA, *ThermoFisher Scientific*, Niederelbert, Germany) je korišćena za pripremu standardnih rastvora i uzoraka. Špric-filteri (0,45 µm) za dodatno prečišćavanje uzoraka su nabavljeni od firme *Supelco* (Pensilvanija).

Standardi masnih kiselina: palmitinska kiselina (C16:0), palmitoleinska kiselina (C16:1), heptadekanska (margarinska) kiselina (C17:0), *cis*-10-heptadecenska kiselina (C17:1), stearinska kiselina (C18:0), oleinska kiselina (C18:1, n9c), linolna kiselina (C18:2, n6c), arahidonska kiselina (C20:0), *cis*-11-eikozanoenska kiselina (C20:1), lignocerinska

kiselina (C24:0) i još 27 u semenu breskve neidentifikovanih masnih kiselina korišćeni su u standardnom rastvoru smeše (tzv. Food Industry FAME mix, RESTEK, lot: #23889).

Standardi fenolnih jedinjenja: protokatehuinska kiselina, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, *p*-hidroksifenilsirćetna kiselina, hlorogena kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, katehin, kvercetin, galangin, pinobanksin, hrizin, naringenin, hesperetin i pinocembrin su nabavljeni od firme *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Germany).

Standardi šećera: arabinoza, glukoza, maltoza, melezitosa, saharoza, trehaloza, fruktoza su nabavljeni od firme *Tokyo Chemical Industry, TCI* (Europe, Belgium); gentiobioza, izomaltoza, izomaltotrioza, maltotrioza, maltotetraoza, maltopentaoza, maltoheksaoza, maltoheptaoza, melibioza, panoza, ramnoza, rafinoza, riboza, turanoza su nabavljeni od *Tokyo Chemical Industry, TCI* (Tokyo, Japan); galaktitol, manitol i sorbitol su nabavljeni od *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Germany).

Sve standardne supstance i reagensi korišćeni za eksperimentalni rad, čija čistoća nije prethodno označena, bili su analitičkog stepena čistoće.

3.3.2. Sekvencijalna ekstrakcija pojedinih fitohemikalija iz semena breskve

Metoda za sekvencijalnu ekstrakciju i izolovanje pojedinih klasa hemijskih jedinjenja koja su ispitivana u ovoj disertaciji predstavlja modifikovanu metodu za ekstrakciju fitohemikalija iz uzoraka polena (Slika 15).^[99]

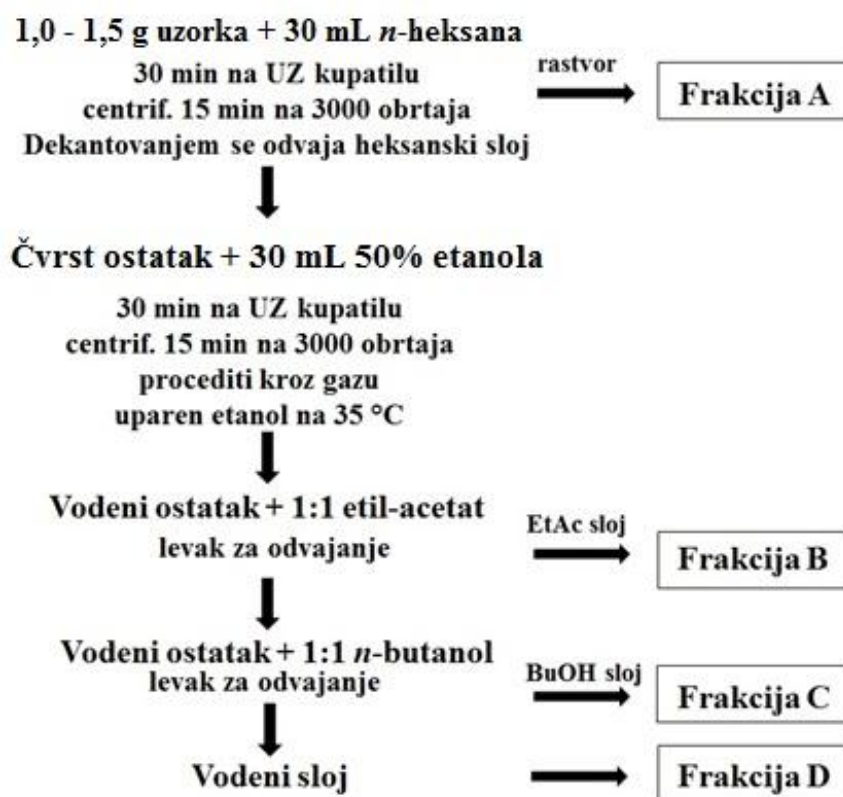
Prah semena breskve (1,0-1,5 g) je odmašćen sa 30 mL *n*-heksana u erlenmajeru od 50 mL tokom 30 min na ultrazvučnom kupatilu (UZ - *Sonic ultrasonic cleaner*) čija temperatura nije prelazila 40 °C (da ne bi došlo do razlaganja termolabilnih komponenti). Nakon završene ekstrakcije, uzorak je kvantitativno prenet u kivetu od 50 mL i centrifugiran na 3000 obrtaja tokom 15 min. Dekantovanjem je odvojen gornji heksanski sloj od taloga i on je predstavljao lipidnu frakciju (**frakcija A**) iz koje su dalje analizirane masne kiseline. Iz frakcije A je rastvarač uparen do suva na sobnoj temperaturi, ostalo ekstrahovano ulje je odloženo u zamrzivač do daljeg, potrebnog tretmana i analize.

Ostatku uzorka, nakon ekstrakcije heksanom, dodato je 30 mL 50% etanola, u porcijama kako bi se ceo talog preneo u erlenmajer od 50 mL. Ekstrakcija 50% etanolom vršena je 30 min na ultrazvučnom kupatilu na sobnoj temperaturi. Nakon ekstrakcije, uzorak je kvantitativno prenet u kivetu i centrifugiran na 3000 obrtaja tokom 15 min. Da bi se odvojile fino dispergovane čestice uzorak je proceden kroz gazu u balon od 100 mL sa

šlifovanim grlom. Proceđen etanolni rastvor uzorka uparen je do vodenog ostatka na vakuum uparivaču (*IKA RV 10 Basic*) na 35 °C. Mućenje uzorka u balonu označavalo je da je etanolni deo uparen.

Nakon uparavanja, ostatak je kvantitativno prenet u levak za odvajanje od 50 mL i dodat mu je etil-acetat u odnosu 1:1, kako bi se ekstrahovale fenolne komponente. Posle energičnog mućkanja i nakon jasnog razdvajanja organskog, gornjeg i vodenog, donjeg sloja, prvo je propuštao donji, vodeni sloj u jednu a zatim sloj sa etil-acetatom, koji predstavlja fenolnu frakciju (**frakcija B**), u drugu posudu. Frakcija B takođe se odložila u zamrzivač do dodatnog tretmana uzoraka i analize fenola.

Iz preostalog vodenog sloja *n*-butanolom je odvojena proteinska frakcija (**frakcija C**) koja nije bila predmet ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije. Frakcija C je nastala kada je u novom levku za odvajanje vodenom ostatku (oko 10 mL) dodat *n*-butanol u odnosu 1:1. Butanolni ekstrakt (gornji sloj) je odvojen od vodenog sloja, sakupljen i odložen u zamrzivač za dalju analizu. Preostali vodeni sloj predstavlja šećernu frakciju (**frakcija D**) koja je takođe odložena u zamrzivač do analize.



Slika 15. Šema sekvencijalne ekstrakcije

3.3.3. Određivanje masnih kiselina u uzorcima semena breskve

Kvantitivna i kvalitativna analiza masnih kiselina iz uzoraka semena breskve izvršena je pomoću gasne hromatografije sa plameno-jonizacionim detektorom. Nakon dobijene frakcije A, metil-estri masnih kiselina (*Fatty Acid Methyl Esters* – FAME) su pripremljeni transesterifikacijom hladnim metanolnim rastvorom kalijum-hidroksida, prateći SRPS EN ISO 12966-2:2012 standardnu metodu. Ova brza metoda transmetilovanja u alkalnim uslovima je primenjiva na rutinske analize masti i ulja koja sadrže masne kiseline počev od buterne kiseline (C4:0).

U kivetu sa poklopcem od 10 mL, izmereno je 0,1 g ekstrahovanog ulja i dodatno rastvoreno sa 2 mL *n*-heksana; rastvor je snažno promućkan na vorteksu. Nakon dodatka 1 mL 2 mol/L metanolnog rastvora KOH, smeša je na vorteksu izmućkana 2 min na sobnoj temperaturi i centrifugirana na 4000 obrtaja tokom 5 min. Nakon 2 min (talog je ostavljen da se slegne do bistrog rastvora), 2 mL rastvora natrijum-hlorida (40 g NaCl u 100 mL H₂O) dodato je u kivetu pri blagom mućkanju rastvora. Smeša je centrifugirana oko 1 min, dekantovan je gornji sloj koji sadrži metil-estre u drugu kivetu i rastvor je osušen dodatkom 1 g NaHSO₄. Nakon taloženja soli, 1 mL gornjeg sloja rastvora je prenet u vijalu od 2 mL za analizu estara masnih kiselina.

Metil-estri masnih kiselina analizirani su primenom gasnog hromatografa sa plameno-jonizacionim detektorom, GC-FID, *Agilent 7890B GC System*. Korišćena je kapilarna kolona CP-Sil 88 (100 m × 0,25 mm, 0,2 μm veličine čestica). Brzina protoka azota, gasa nosača, bila je 1,0 mL/min. Temperatura injektora je bila 250 °C, a temperatura detektora 270 °C. Temperaturni program hromatografskog razdvajanja je podrazumevao početnu temperaturu od 80 °C, zatim povećanje na 220 °C brzinom 4 °C/min i održavanje te temperature tokom 5 min. Nakon toga, temperatura je povišena na 240 °C brzinom od 4 °C/min sa održavanjem te temperature više od 10 min. Zapremina unetog uzorka bila je 1 μL. Ukupno vreme trajanja analize bilo je 55 min. Kao program za prikupljanje i obradu podataka korišćen je *Chemstation*.

Identifikacija pojedinačnih estara masnih kiselina iz semena breskve zasnovana je na poređenju retencionih vremena dobijenih pikova uzoraka sa retencionim vremenima pikova standardnih supstanci iz smeše FAME standarda. Kvantifikacija pojedinih masnih kiselina (%) u ekstraktima semena breskve je određena na osnovu metode unutrašnjeg normiranja, tj. pretpostavke da su sve komponente uzorka prisutne na hromatogramu, tako da ukupna površina ispod pikova predstavlja 100% sastojaka smeše (potpuno eluiranje). Količina date

komponente, izražena kao maseni procenat metil-estara, je izračunata kao procenat površine odgovarajućeg pika u odnosu na sumu površina svih pikova. Relativna površina odgovarajućeg pika predstavljala je maseni udeo te komponente u smeši. Površinska frakcija pojedinačnih metil-estara masnih kiselina (X), izražena u procentima, izračunata je na osnovu sledeće formule:

$$X = A / \Sigma A \times 100 \quad (7)$$

gde:

A je površina ispod pika individualnog metil-estra masnih kiselina

ΣA je zbir površina ispod svih pikova pojedinačnih metil-estara masnih kiselina.

Analiza masnih kiselina je rađena u duplikatu za svaki pojedinačni uzorak i za dalje predstavljanje rezultata uzeta je srednja vrednost. Srednja vrednost relativne standardne devijacije (RSD) za ponovljivost sadržajno manjih komponenti (supstance prisutne u uzorku manje od 1%) bila je 5%, dok je vrednost srednje RSD bila 2 - 3% za komponente koje su prisutne u količini većoj od 1%.

3.3.4. Određivanje fenolnog profila u uzorcima semena breskve

Nakon dobijene frakcije B, etil-acetat je uparen do suva pomoću vakuum uparivača na 30 °C. Metanol u zapremini od 5 mL je dodavan u porcijama da bi ostatak nakon isparavanja rastvarača kvantitativno prenet u vijale. Metanolni ekstrakt je proceden kroz 0,45 μ m PTFE špric-filter i analiziran na UHPLC-LTQ OrbiTrap MS/MS.

Osnovni standardni rastvor smeše svih fenolnih standarda koncentracije 1000 mg/L pripremljen je rastvaranjem standardnih jedinjenja u metanolu. Od ovog polaznog rastvora napravljen je standardni rastvor od 10 mg/L, čijim je razblaživanjem metanolom pripremljena serija radnih rastvora koncentracija: 0,025; 0,050; 0,100; 0,250; 0,500; 0,750 i 1,000 mg/L. Polazni i radni rastvori su čuvani u mraku na 4 °C do analize. Kalibracione krive su dobijene korelisanjem površine pikova sa koncentracijom standardnih rastvora.

Razdvajanje, identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja iz uzoraka semena breskve vršena je *ThermoFisher Scientific* tečnim hromatografom koji se sastoji od kvaternarne *Accela 600* pumpe, *Accela* autosemplera i analitičke *Synchronis C18*-kolone (100 \times 2,1 mm, 1,7 μ m veličine čestica). Mobilna faza sastojala se od vode (A) sa 0,01% sirćetne kiseline i acetonitrila (B). Mobilna faza je gradijentno menjana na sledeći način: prvih 10

min, 5 - 95% B; od 10 min do 12 min, 95% B; od 12 min do 12,2 min, 95 - 5% B, od 12,2 min do 15 min, 5% B. Injektovana zapremina svih uzoraka bila je 5 μ L i brzina protoka bila je 0,3 mL/min.

Hromatografski sistem bio je povezan sa hibridnim masenim spektrometrom (*LTO OrbiTrap MS*) sa jonskim izvorom zasnovanim na elektrosprej jonizaciji (*HESI-II; ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany*). Jonizacija je izvedena u negativnom modu, pokrivajući oblast masenog spektra u opsegu 100 m/z – 1000 m/z . Vrednosti parametara jonskog izvora su iznosili: napon jonskog izvora 4,5 kV, napon kapilara - 4 V, napon cevi - 59 V, temperatura kapilare 275 °C, glavni i pomoćni protok gasa (N_2) 30 i 7 proizvodnih jedinica. Za studije fragmentacije podaci koji zavise od snimanja su ostvareni kolizionom indukovanom disocijacijom (CID). Joni od interesa su izolovani u jonskoj zamci sa izolacionom širinom od 5 ppm i aktivirani sa 35% kolizione energije.

Fenolna jedinjenja su identifikovana i kvantifikovana prema spektralnim karakteristikama kao što su njihov maseni spektar, tačne mase, svojstvena MS fragmentacija i retenciono vreme (t_R). *Xcalibur* softver (verzija 2.1) je korišćen za kontrolu instrumenta, akviziciju i analizu podataka. Program za uređivanje molekula, *ChemDraw* (verzija 12.0), je korišćen kao referentna biblioteka i za izračunavanje tačnih masa identifikovanih jedinjenja. Strukture jedinjenja čiji standardi nisu dostupni poređene su sa MS fragmentima datim u literaturi. Kvantifikacija je rađena poređenjem retencionog vremena, tačnih masa i fragmenata jedinjenja sa odgovarajućim standardima. Granica detekcije (GD) i granica kvantifikacije (GK) (Tabela 2) su procenjene pomoću standardne greške modela (SD) i nagiba kalibracione krive (S) prema jednačinama 8 i 9:

$$GD = 3\left(\frac{SD}{S}\right) \quad (8)$$

$$GK = 10\left(\frac{SD}{S}\right) \quad (9)$$

Tabela 2. Regresioni parametri (A i B), koeficijent determinacije (R^2), granice detekcije (GD) i kvantifikacije (GK) fenolnih jedinjenja; SE – standardna greška.

Jedinjenje	$Y = A + BX (\times 10^5)$		R^2	GD (mg/L)	GK (mg/L)
	(A \pm SE)	(B \pm SE)			
Protokatehuinska kiselina	1,61 \pm 2,47	116,64 \pm 3,22	0,9962	0,11	0,36
<i>p</i>-Hidroksibenzoeva kiselina	0,80 \pm 0,85	25,19 \pm 1,05	0,9930	0,17	0,57
<i>p</i>-Hidroksifenilsirćetna kiselina	0,43 \pm 0,45	13,93 \pm 0,59	0,9946	0,16	0,52
Hlorogena kiselina	-3,30 \pm 1,05	80,81 \pm 1,31	0,9987	0,07	0,22
<i>p</i>-Kumarinska kiselina	1,72 \pm 0,70	39,35 \pm 0,94	0,9972	0,09	0,30
Ferulinska kiselina	-0,45 \pm 0,44	18,19 \pm 0,80	0,9923	0,11	0,36
Katehin	-1,17 \pm 0,94	67,11 \pm 1,68	0,9975	0,06	0,21
Kvercetin	1,18 \pm 5,42	239,98 \pm 9,30	0,9955	0,09	0,31
Galangin	8,67 \pm 7,73	833,72 \pm 12,97	0,9990	0,04	0,14
Pinobanksin	47,05 \pm 19,40	755,05 \pm 31,45	0,9931	0,12	0,39
Hrizin	21,80 \pm 11,38	410,32 \pm 20,90	0,9897	0,13	0,42
Naringenin	17,31 \pm 9,63	347,72 \pm 15,07	0,9925	0,13	0,42
Hesperetin	18,09 \pm 8,71	336,35 \pm 14,39	0,9927	0,12	0,39
Pinocembrin	35,46 \pm 17,88	663,47 \pm 29,65	0,9921	0,12	0,41

3.3.5. Određivanje šećernog profila u uzorcima semena breskve

Osnovni, standardni rastvori pripremljeni su u ultračistoj vodi; koncentracija glukoze, fruktoze i saharoze bila je 1000 ng/mL, a koncentracija ostalih ugljenih hidrata 100 ng/mL. Kalibracioni standardi korišćeni za formiranje kalibracione krive pripremljeni su razblaživanjem osnovnih standarda do koncentracije u opsegu od 0,9 do 100 ng/mL u zavisnosti od koncentracije u uzorku.

Hromatografsko razdvajanje je izvršeno korišćenjem *DIONEX ICS 3000 DP* tečnehromatografskog sistema (*Dionex, Sunnyvale, CA, USA*) koji je opremljen sa kvaternarnom gradijentnom pumpom (*Dionex*). Saharidi su razdvojeni na *Carbo Pac[®] PA 100* sfernoj anjon-izmenjivačkoj koloni (4 \times 250 mm, veličina čestica 8,5 μ m, veličina pora – mikropore < 10 Å) na temperaturi od 30 °C. Mobilna faza se sastojala od A – 600 mM natrijum-hidroksid, B – 500 mM natrijum-acetat i C – ultračista voda i njihov procenat je linearno, gradijentno menjan tokom analize (protok je bio 0,7 mL/min): prvih 5 min, 15% A, 85% C; od 5 min do 12 min, 15% A, 2% B, 83% C; od 12 min do 20 min, 15% A, 4% B, 81% C; od 20 min do 30 min, 20% A, 20% B, 60% C. Pre analize sistem je kondicioniran sa

15% A i 85% C tokom 15 min. Svaki uzorak (25 μ L) je injektovan pomoću ICS AS-DV 50 autosemplera (*Dionex*). Elektrohemijski (pulsno-amperometrijski) detektor sastojao se od radne, zlatne elektrode i Ag/AgCl referentne elektrode. Softverski paket *Chromleon* (verzija 6.80) korišćen je za kontrolu instrumenta, akviziciju i analizu podataka (Tabela 3). Dobijeni podaci šećera za svaku sortu/genotip su predstavljeni kao srednje vrednosti triplikata koji su dalje korišćeni za izračunavanje indeksa slatkoće i u multivarijantnoj analizi.

Tabela 3. Nagib krive (B), koeficijent korelacije (R^2), standardna devijacija (SD), relativna standardna devijacija (RSD), granice detekcije (GD) i kvantifikacije (GK) šećera.

Šećeri	B	R^2	SD	RSD (%)	GD (mg/L)	GK (mg/L)
Saharoza	1,37	0,9975	1,949	4,62	0,04	0,14
Glukoza	4,60	0,9982	7,220	4,07	0,04	0,13
Fruktoza	2,61	0,9970	5,641	4,92	0,07	0,23
Maltoza	2,18	0,9979	2,789	4,14	0,04	0,12
Arabinoza	5,01	0,9974	0,640	4,61	0,03	0,09
Ramnoza	0,01	0,9966	0,005	5,29	0,05	0,16
Rafinoza	1,86	0,9967	1,834	4,99	0,15	0,45
Riboza	0,72	0,9966	3,180	3,19	0,29	0,88
Gen+Turanoza	1,02	0,9976	0,207	4,47	0,04	0,13
Maltotrioza	0,87	0,9971	1,567	4,82	0,15	0,48
Maltotetraoza	0,81	0,9998	0,009	1,07	0,15	0,48
Maltopentaoza	0,57	0,9999	0,005	0,92	0,24	0,78
Maltoheksaoza	0,59	0,9995	0,014	2,35	0,24	0,78
Maltoheptaoza	0,37	0,9997	0,006	1,68	0,27	0,87
Melibioza	3,69	0,9981	0,446	4,25	0,03	0,10
Melezitoza	0,54	0,9997	0,122	1,72	0,05	0,17
Izomaltoza	2,70	0,9987	2,748	3,36	0,03	0,10
Izomaltotrioza	2,00	0,9969	1,887	4,96	0,15	0,49
Panoza	2,34	0,9981	1,862	3,91	0,12	0,39
Trehaloza	2,23	0,9981	0,527	3,94	0,05	0,17
Sorbitol	3,20	0,9983	0,131	3,79	0,03	0,09
Galaktitol	2,78	0,9989	0,041	1,47	0,24	0,72
Manitol	3,54	0,9986	0,069	1,95	0,24	0,78

3.3.5.1. Indeks slatkoće

Indeks slatkoće (IS) je izračunat na osnovu sadržaja i intenziteta slatkoće svakog individualnog šećera u semenima 25 sorti/genotipova breskve. Pri izračunavanju uzima se u obzir da je fruktoza 2,30 i saharoza 1,35 puta slađa nego glukoza. S obzirom na to, indeks slatkoće se može predstaviti jednačinom $10^{[100]}$:

$$IS = (1,00 \times [glukoza]) + (2,30 \times [fruktoza]) + (1,35 \times [saharoza]) \quad (10)$$

3.3.6. Statistička analiza podataka

U cilju provere postojanja statistički značajne razlike između uzoraka semena tri grupe sorti/genotipova breskve po poreklu i dve grupe po vremenu zrenja ploda, deskriptivna statistika, *Kruskal-Wallis* test i *Mann-Whitney* U-test su urađeni primenom demo verzije NCSS statističkog softvera (*Hintze, 2001, Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT; www.ncss.com*).

Prilikom statističke procene sličnosti i razlika između genotipova, primenom *Kruskal-Wallis*-ovog testa, odnosno vremena zrenja, primenom *Mann-Whitney*-evog U-testa, prihvatanje nulte hipoteze H_0 (kod oba testa, $P > 0,05$) znači da nema statistički značajnih razlika između grupa sorti/genotipova breskve i da varijable koje se posmatraju pripadaju istoj populaciji. Kada je vrednost P manja od 0,05, kod *Kruskal-Wallis*-ovog testa dodatno se ispituje razlika u vrednosti medijana primenom *Kruskal-Wallis*-ovog testa višestrukog poređenja Z vrednosti u cilju utvrđivanja između kojih grupa postoje statistički značajne razlike (označeni su zagradama).

Za diferencijaciju i klasifikaciju uzoraka, metode PCA i PLS-DA izvedene su korišćenjem *PLS_Toolbox*, v.6.2.1. u okviru MATLAB verzije 7.12.0 (*R2011a*) (*MathWorks INC, Natick, MA, USA*). Svi podaci su autoskalirani (centrirani i skalirani na jediničnu vrednost standardne devijacije) pre bilo koje multivarijantne analize. Za PCA je korišćen Singular Value Decomposition (SVD) algoritam i vrednosti Q i T^2 za Hotellingovu raspodelu određeni su na 95% nivou značajnosti i korišćeni za utvrđivanje prisustva spoljašnjih rezultata. Za PLS-DA primenjen je SIMPLS algoritam i venecijanska procedura slepe validacije.

Nelinearna analiza glavnih komponenti (*NonLinear Principal Component Analysis - NLPCA*) sa optimalnim skaliranjem je urađena pomoću statističkog softvera SPSS-a (*IBM SPSS Statistics 20*) koji sadrži program CATPCA (*Categorical Principal Component Analysis*).

NLPCA ima iste ciljeve kao i tradicionalna PCA ali je pogodna za varijable mešovitih nivoa merenja (nazivni, redni i numerički) koje možda nisu linearno povezani jedni sa drugima. U ovom tipu PCA sve varijable se posmatraju kao kategorične a svaka posebna vrednost varijable se naziva kategorija (kategorija 1 je dodeljena svakom jedinjenju koje je detektovano u uzorku, dok 0 označava da određeno jedinjenje nije bilo prisutno u uzorku). NLPCA je izvršena kako bi se smanjila dimenzionalnost podataka, vizualizirala struktura podataka i istakle važne varijable.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Fizičke karakteristike i sadržaj vode u uzorcima semena breskve

Do sada je kvalitet semena biljaka iz roda *Prunus* bio definisan samo po fizičkim parametrima kao što su dimenzija, oblik, masa, dupla semena, sadržaj vlage i dr. Poznavanje fizičkih karakteristika koštica breskve je neophodno, kako zbog uticaja na klijanje i rast biljke (na koje značajno utiču veličina i masa semena), tako i u slučaju projektovanja opreme za preradu, transport, sortiranje, lomljenje i razdvajanje. U većini slučajeva veće seme ima prednost u odnosu na manje, daje veći procenat sejanaca i jače sadnice^[101]. Takođe, oprema koja nije adekvatno dizajnirana može dovesti do smanjene efikasnosti rada i povećanog gubitka proizvoda. Samim tim, ispitivanje fizičkih karakteristika semena breskve može imati važnu ulogu u poboljšanju sadnje, prinosa useva i kvaliteta proizvodnje.^[102]

Za prosečnu dužinu i težinu jedne koštice (PDK i PTK) kao i za prosečnu dužinu i težinu jednog semena (PDS i PTS) 25 sorti/genotipova breskve u Tabeli 4. su prikazani parametri deskriptivne statistike za tri grupe po poreklu (standardne sorte, perspektivni hibridi, genotipovi vinogradarske breskve) i dve grupe po vremenu zrenja ploda (rane i kasne sorte). Vrednosti fizičkih parametara i vrednost sadržaja vode semena za pojedinačne sorte/genotipove breskve dati su tabelarno u Prilogu 1.

Posmatranjem fizičkih karakteristika koštica i semena breskve (Tabela 4), može se uočiti da perspektivni hibridi imaju duže i teže koštice i semena u odnosu na vinogradarske genotipove i standardne sorte, što ukazuje na aditivni efekat pri hibridizaciji breskve kada su koštica i seme u pitanju. Međutim, vinogradarske breskve imaju veći udeo semena u masi koštice u poređenju sa ostalim sortama/hybridima (kod standardnih sorti prosečno 3,8% mase koštice je masa semena; kod perspektivnih hibrida 5,1% a kod vinogradarske breskve 9%).

Pored toga, uočeno je da rane sorte imaju niže vrednosti svih fizičkih karakteristika koštice i semena u odnosu na sorte sa kasnijim vremenom zrenja (kod sorti ranijeg zrenja prosečno 2,8% mase koštice je masa semena, a kod kasnijih sorti iznosi 6,4%). To se može objasniti činjenicom da rane sorte imaju sitnije plodove, pa samim tim i sitnije koštice, u odnosu na pozne. Kada se uzmu u obzir sve koštice i semena ispitivanih sorti/genotipova breskve, zaključuje se da je prosečan udeo semena u koštici 5,4%.

U Tabeli 4. takođe su prikazane vrednosti sadržaja vode semena 25 sorti breskve grupisane u tri grupe po poreklu i dve grupe po vremenu zrenja ploda. Rezultati prikazuju da

standardne sorte i perspektivni hibridi imaju isti sadržaj vode, dok je on za vinogradarske breskve bio niži. Za razliku od drugih fizičkih karakteristika, rane sorte sadrže nešto više vode što ujedno znači da kasne sorte imaju veći procenat suve supstance. Ispitivana semena breskve imala su sadržaj vode sličan bademu (3,9%)^[103]. Seme breskve, kao i badem, može predstavljati hranu ili jedan od sastojaka raznih namirnica sa malom količinom vode pri čemu se javljaju minimalne biološke reakcije što je od suštinskog značaja za očuvanje kvaliteta i produžetka roka trajanja semena breskve i badema^[103]. Industrijski standardi propisuju za sirove bademe vrednost sadržaja vode od 3 do 6%^[103]. Vrednost za sadržaj vode u semenu kajsija je 4,4%^[104]. Sa druge strane, u drugoj studiji koja je izvedena na slatkim i gorkim semenu kajsija, utvrđeno je da sadržaj vode iznosi 6,7% i 5,4%, redom^[105].

Tabela 4. Deskriptivni parametri prosečnih dužina i težina jedne koštice, prosečnih dužina i težina jednog semena breskve grupisani u tri grupe po poreklu i dve grupe po vremenu zrenja.

		PDK [cm]	PDS [cm]	PTK [g]	PTS [g]	% Vode*
Sorte/Genotipovi						
Standardne sorte	Sr vred.	3,32	1,59	5,07	0,19	4,31
	Medijana	3,30	1,63	4,67	0,14	4,29
	St dev.	0,33	0,21	1,57	0,14	0,40
	Min	2,92	1,27	2,70	0,04	3,69
	Maks	4,02	2,00	8,15	0,47	5,00
Perspektivni hibridi	Sr vred.	3,92	1,96	8,34	0,42	4,30
	Medijana	3,93	1,97	8,76	0,41	4,25
	St dev.	0,12	0,11	0,86	0,06	0,17
	Min	3,78	1,76	6,78	0,36	4,09
	Maks	4,07	2,10	8,96	0,53	4,57
Genotipovi vinogradarske breskve	Sr vred.	3,17	1,60	4,18	0,38	4,02
	Medijana	3,17	1,59	4,17	0,37	3,99
	St dev.	0,10	0,10	0,33	0,04	0,27
	Min	3,03	1,45	3,79	0,32	3,62
	Maks	3,30	1,80	4,84	0,44	4,51
Vreme zrenja ploda						
Rane sorte	Sr vred.	3,21	1,50	4,39	0,12	4,42
	Medijana	3,21	1,54	4,14	0,12	4,33
	St dev.	0,22	0,15	1,08	0,07	0,36
	Min	2,92	1,27	2,70	0,04	4,01
	Maks	3,60	1,67	6,26	0,22	5,00
Kasne sorte	Sr vred.	3,52	1,77	6,13	0,39	4,12
	Medijana	3,30	1,76	5,85	0,39	4,11
	St dev.	0,40	0,20	2,07	0,06	0,29
	Min	3,03	1,45	3,79	0,32	3,62
	Maks	4,07	2,10	8,96	0,53	4,57

* Procenat vode je izračunat pomoću jednačine 6.;

Statistička potvrda postojanja razlika između genotipova, odnosno vremenu zrenja, za svaki od posmatranih parametara pojedinačno, proverena je *Kruskal-Wallis* testom i *Mann-Whitney U* testom (Tabela 5).

Tabela 5. Parametri statističkih testova razlikovanja genotipova breskve posmatranjem fizičkih karakteristika.

	Kruskal-Wallis test		Mann-Whitney U test	
	P	Z vrednost*	P	H ₀
PDK	0,0026	P(S,V)	0,1024	Prihvata
PDS	0,0060	P(S,V)	0,0103	Odbacuje
PTK	0,0014	P(S,V)	0,0571	Prihvata
PTS	0,0018	S(P,V)	0,0002	Odbacuje
% Vode	0,1188	-	0,0805	Prihvata

*Genotipovi sa statistički značajnom razlikom između medijana označeni su zagradama; S-Standardne sorte, P- Perspektivni hibridi, V-Vinogradarske breskve

Na osnovu *Kruskal-Wallis*-ovog testa PDK, PDS i PTK su varijable koje odvajaju uzorke semena perspektivnih hibrida od standardnih sorti i genotipova vinogradarske breskve, dok PTS odvajaju standardne sorte od ostalih posmatranih grupa. Dodatno, rezultati pokazuju da nema statistički značajnih razlika u pogledu sadržaja vode u semenu tri grupe sorti/genotipova breskve po poreklu. Rezultati procene sličnosti i razlika između dve grupe uzoraka u zavisnosti od vremena zrenja, pokazuju da varijable vezane za košticu (PDK i PTK) i sadržaj vode u semenu pripadaju istoj populaciji, dok se po PDS i PTS statistički značajno razlikuju dve posmatrane grupe.

Zapažanja u ovom radu su u saglasnosti sa rezultatima *Femenia* i saradnika^[105] za slatka i gorka semena kajsije. Morfološki, ispitivane sorte mogu se razlikovati po fizičkim svojstvima semena kao što je procenat semena (u odnosu na celu košticu), težina koštice i semena, debljina i dužina semena^[105]. Sa druge strane, parametri koštice nisu tako značajni kao parametri semena kada se radi o razlikovanju sorti^[105]. Dodatno, vlažnost nije dobar parametar za razlikovanje sorti zbog svoje velike varijabilnosti za uzorke dobijene iz istih useva^[105].

Uslovi okoline kao što su promena temperature tokom dana i noći, sunčevo zračenje, izlaganje ploda direktnoj svetlosti i padavinama, mogu uticati na razlike u zrenju i kvalitetu ploda breskve prilikom branja^[106,107]. Ovi abiotički faktori imaju različit efekat na sorte ranijeg u odnosu na sorte kasnijeg vremena sazrevanja^[106]. Temperatura tokom perioda razvoja ploda može uticati na ukupne performanse sorte i kvalitet ploda. Akumulacija toplote i sezonski uslovi se posmatraju od ranih prolećnih temperatura do 30 dana nakon cvetanja i snažno utiču na datum berbe, trend rasta i konačnu veličinu ploda. Temperature u rano proleće mogu biti niske pri čemu mogu da ograniče razvoj organa kod breskve.^[107]

4.2. Sadržaj masnih kiselina u semenu breskve

U cilju utvrđivanja procentualnog sastava ulja i masnih kiselina u ulju semena dvadeset pet sorti/genotipova breskve primenjena je GC-FID tehnika (poglavlje 3.3.3), a dobijeni rezultati navedeni su u Tabeli 6. Vrednosti za procenat ulja (% ulja ili Oil) u semenu i procenat masnih kiselina u ulju semena pojedinačnih sorti i genotipova breskve dati su u Prilogu 2. Uopšteno, rezultati pokazuju raznolikost između izabrane selekcije sorti/genotipova u ukupnom sadržaju ulja i masnih kiselina semena.

Utvrđena je velika varijabilnost u ukupnom sadržaju ulja semena; najveći sadržaj je utvrđen kod genotipa vinogradarske breskve II/42 (43,45%), dok je najniži sadržaj pronađen u standardnoj sorti „Redcap” (1,52%). Kod uzoraka 1 i 2 („Springbelle” i „Redcap”, Prilog 2) javljaju se izrazito male vrednosti za % ulja, atipične za semena breskve. Pretpostavlja se da je došlo da slabe razvijenosti semena što se češće dešava kod ranih sorti breskve nego kod poznih sorti. *Mezzomo* i saradnici^[10] su ispitivali uticaj različitih rastvarača i načina ekstrakcije na prinos dobijenog ulja iz semena breskve. Korišćenjem maceracije heksanom, postupkom i rastvaračem korišćenim i u ovoj disertaciji, dobijeno je samo 1,9% ulja iz semena breskve. Atipične male količine ulja javljaju se i kod drugih predstavnika iz roda *Prunus*. *Bernardo-Gil* i saradnici kvantifikovali su male količine ulja (oko 9%) u semenu divlje trešnje (*Prunus avium* L.) primenom superkritičnog ugljen-dioksida^[108]. Kod istih sorti mogu da se jave razlike u prinosu ulja dejstvom faktora kao što su uslovi rasta, način gajenja i klima. Ipak, prethodna ispitivanja na primeru kukuruza su jasno ukazala da genetski faktor ima veći uticaj na prinos i kvalitet ulja nego ekološki faktori^[109]. Prinos ulja i njegov sastav mogu znatno da variraju iz godine u godinu i abiotički faktori mogu imati različite uticaje na svaki usev^[109].

Saglasno rezultatima nekoliko ranijih studija^[6,10,37,41], i u ovom slučaju u ulju semena ispitivanih sorti i genotipova breskve najzastupljenije masne kiseline bile su nezasićene masne kiseline (UFA – *Unsaturated Fatty Acids*), oko 90%, i to uglavnom oleinska i linolna kiselina, zatim zasićene masne kiseline, palmitinska i stearinska kiselina, dok su ostale analizirane masne kiseline pronađene u tragovima (manje od 1% od ukupnih, identifikovanih masnih kiselina). Dominantna masna kiselina u uljima analiziranih uzoraka semena bila je oleinska kiselina (C18:1 n9c), koja je u ekstraktima prisutna u udelu od 38,4% do 74,9% u odnosu na ukupni sadržaj masnih kiselina (Tabela 6). Po svom udelu druga kiselina koja se izdvaja u ekstraktima semena breskve je linolna kiselina (C18:2 n6c), koja je dominantna u ekstraktu semena standardne sorte „Royal Glory” (44,6%).

Tabela 6. Parametri deskriptivne statistike sadržaja masnih kiselina (% u ulju) semena 25 sorti/genotipova breskve

	% Ulja u semenu	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1 n9c	C18:2 n6c	C20:0	C20:1	C24:0	SFA	MUFA	PUFA	UFA	S/U
Standardne sorte																
Sr. vred.	24,42	6,91	0,39	0,09	0,10	2,96	59,35	29,53	0,16	0,12	0,30	10,44	59,96	29,53	89,50	0,12
Medijana	27,18	6,50	0,40	0,10	0,10	2,50	60,40	30,20	0,20	0,10	0,30	9,80	60,80	30,20	90,00	0,11
St. dev.	13,05	1,06	0,11	0,03	0,00	1,27	10,33	8,50	0,05	0,06	0,32	2,17	10,30	8,51	2,15	0,03
Min.	1,52	5,50	0,20	0,00	0,10	1,90	38,40	17,00	0,10	0,10	0,00	8,50	39,20	17,00	83,85	0,09
Maks.	41,51	8,95	0,60	0,10	0,10	6,40	73,80	44,60	0,20	0,30	1,00	16,15	74,40	44,65	91,40	0,19
Perspektivni hibridi																
Sr. vred.	38,08	6,10	0,42	0,08	0,12	1,97	67,35	23,62	0,10	0,08	0,15	8,40	67,97	23,62	91,58	0,09
Medijana	39,19	6,15	0,40	0,10	0,10	1,95	66,90	23,80	0,10	0,10	0,10	8,40	67,50	23,80	91,60	0,09
St. dev.	2,69	0,30	0,04	0,04	0,04	0,12	4,56	4,50	0,00	0,04	0,20	0,24	4,59	4,50	0,28	0,00
Min.	34,22	5,70	0,40	0,00	0,10	1,80	62,10	16,90	0,10	0,00	0,00	8,10	62,70	16,90	91,10	0,09
Maks.	40,81	6,40	0,50	0,10	0,20	2,10	74,30	29,10	0,10	0,10	0,50	8,80	75,00	29,10	91,90	0,10
Genotipovi vinogradarske breskve																
Sr. vred.	40,00	6,14	0,50	0,09	0,10	2,01	71,53	19,34	0,14	0,09	0,03	8,40	72,21	19,34	91,55	0,09
Medijana	39,52	6,05	0,50	0,10	0,10	2,00	72,00	19,05	0,10	0,10	0,00	8,30	72,70	19,05	91,60	0,09
St. dev.	1,77	0,38	0,08	0,04	0,05	0,06	2,99	2,78	0,05	0,04	0,07	0,38	3,00	2,78	0,35	0,00
Min.	38,11	5,80	0,40	0,00	0,00	1,90	64,60	15,70	0,10	0,00	0,00	8,00	65,30	15,70	90,80	0,09
Maks.	43,45	7,00	0,60	0,10	0,20	2,10	74,90	25,50	0,20	0,10	0,20	9,20	75,70	25,50	92,00	0,10
Rane sorte																
Sr. vred.	19,87	7,21	0,36	0,09	0,10	3,25	56,35	31,99	0,18	0,13	0,28	11,02	56,94	31,99	88,93	0,12
Medijana	23,15	6,75	0,35	0,10	0,10	2,65	58,90	30,35	0,20	0,10	0,15	10,70	59,35	30,35	89,25	0,12
St. dev.	12,28	1,04	0,12	0,04	0,00	1,39	9,54	7,61	0,04	0,07	0,37	2,28	9,47	7,62	2,26	0,03
Min.	1,52	6,20	0,20	0,00	0,10	2,40	38,40	22,50	0,10	0,10	0,00	9,00	39,20	22,50	83,85	0,10
Maks.	34,90	8,95	0,60	0,10	0,10	6,40	66,50	44,60	0,20	0,30	1,00	16,15	67,10	44,65	91,00	0,19
Kasne sorte																
Sr. vred.	38,71	6,12	0,46	0,09	0,11	2,03	69,32	21,49	0,12	0,09	0,13	8,49	69,98	21,49	91,46	0,09
Medijana	39,17	6,10	0,50	0,10	0,10	2,00	71,60	19,40	0,10	0,10	0,00	8,40	72,30	19,40	91,60	0,09
St. dev.	2,82	0,41	0,07	0,03	0,04	0,16	5,03	4,78	0,04	0,03	0,19	0,42	5,04	4,78	0,43	0,01
Min.	32,92	5,50	0,40	0,00	0,00	1,80	57,00	15,70	0,10	0,00	0,00	8,00	57,70	15,70	90,20	0,09
Maks.	43,45	7,00	0,60	0,10	0,20	2,50	74,90	32,50	0,20	0,10	0,60	9,70	75,70	32,50	92,00	0,11

C16:0- Palmitinska kiselina; **C16:1-** Palmitoleinska kiselina; **C17:0-** Margarinska kiselina; **C17:1-** *cis*-10-Heptadecenska kiselina; **C18:0-** Stearinska kiselina; **C18:1 n9c-** Oleinska kiselina; **C18:2 n6c-** Linolna kiselina; **C20:0-** Arahidonska kiselina; **C20:1-** *cis*-11-Eikozanoenska kiselina; **C24:0-** Lignocerinska kiselina; **SFA-** Ukupno zasićene masne kiseline; **MUFA-** Mononezasićene masne kiseline; **PUFA-** Polinezasićene masne kiseline; **UFA-** Ukupno nezasićene masne kiseline; **S/U-** Odnos zasićenih i nezasićenih masnih kiselina.

Kiseline C18:1 n9c i C18:2 n6c imaju visoke nutritivne vrednosti i bitne su za ljudsko zdravlje zbog čega su semena genotipova breskve koja imaju visok sadržaj ovih nezasićenih masnih kiselina važna^[103,105]. Ulja bogata MUFA i PUFA (*PolyUnsaturated Fatty Acid* – polinezasićene masne kiseline) su poželjna u ljudskoj ishrani jer su uključeni u prevenciju kardiovaskularnih i koronarnih bolesti srca, gojaznosti, dijabetesa i tumorskih oboljenja^[103]. Dodatno, C18:1 n9c je korisna jer sprečava oksidaciju masnih kiselina tokom skladištenja, transporta i prerade semena^[103].

Od zasićenih masnih kiselina (SFA - *Saturated Fatty Acids*) u ekstraktima semena breskve po svom većem sadržaju izdvajaju se palmitinska kiselina (C16:0) koja je bila prisutna u udelu od 5,5% do 8,95% i stearinska kiselina (C18:0) prisutna u udelu od 1,80 do 6,40% (Tabela 6). Odnos SFA i UFA bio je manji od 1 kod svih ispitivanih ekstrakata, što ukazuje na karakteristike pozitivne i korisne za pravilnu ishranu i zdravlje ljudi. Prisustvo zasićenih masnih kiselina je poželjno u smislu povećanja stabilnosti ulja, međutim što je veća njihova količina ulje gubi nutritivna svojstva što može negativno uticati na zdravlje ljudi kao što je stvaranje trombocita, oštećenje srca i krvnih sudova^[103,110]. Kiselina C16:0 može da doprinese povećanju holesterola u serumu, u ulju semena breskve njen udeo je mali i manji je nego u kestenu (14 - 18%) i maslini (12 - 21%) ali veći nego kod uljane repice (3,5 - 4,5%)^[110].

Na osnovu dobijenih podataka (Tabela 6, Prilog 2) može se zaključiti da su ulja semena breskve bogata nezasićenim masnim kiselinama i imaju manji sadržaj zasićenih masnih kiselina što pokazuje da semena breskve mogu biti vredan i značajan izvor u proizvodnji visokokvalitetnih proizvoda na bazi esencijalnih ulja.

Srednje vrednosti sadržaja masnih kiselina za tri grupe sorti breskve različitog porekla (Tabela 6) pokazuju da standardne sorte imaju manji sadržaj ulja nego perspektivni hibridi i genotipovi vinogradarske breskve. Sadržaj ulja u semenima standardnih sorti bio je sličan sadržaju ulja semena breskve utvrđen od strane Wu-a i saradnika^[6] koji je iznosio 26% od ukupne mase semena. Sa druge strane, sadržaj ulja semena perspektivnih hibrida i genotipova vinogradarske breskve sličan je sadržaju ulja (37,7%) pronađenim od strane Ashraf i saradnika^[59]. Posmatranjem sorti prema vremenu zrenja (Tabela 6) uočava se da sorte sa ranijim vremenom zrenja imaju manji udeo ulja (19,87%) nego sorte koje kasnije sazrevaju (38,71%).

Po količini, masne kiseline ulja semena breskve su sadržavale redom: MUFA > PUFA > SFA nezavisno od porekla sorti/genotipova ili vremena zrenja ploda breskve. Zahvaljujući visokom sadržaju MUFA u uljima, uglavnom oleinske kiseline, ulja semena breskve mogu

biti odlični sastojci zdrave ishrane. Iako se semena ispitivanih sorti i genotipova nisu razlikovala prema sastavu najzastupljenijih masnih kiselina, različitost se ogleda u pogledu njihovih procentualnih koncentracija koje se javljaju u širem opsegu (Tabela 6): oleinske kiseline (38,4 - 74,9%), linolne kiseline (15,7 - 44,6%), palmitinske kiseline (5,5 - 8,95%) i stearinske kiseline (1,80 - 6,40%).

MUFA su poželjni supstrati za acil-KoA-holesterol-aciltransferazu (ACAT) koja katalizuje esterifikaciju jetrinog slobodnog holesterola do inertnog estera. Ovako se smanjuje količina ukupnog i lošeg holesterola u krvi^[111]. Ulje semena breskve ima veći sadržaj C18:1 n9c (oko 65% srednje vrednosti svih ispitivanih genotipova) u poređenju sa uljem masline (oko 60%), kikirikija (oko 48%), suncokretovog semena (oko 33%), semena paradajza (17 - 26% u zavisnosti od sorte)^[103].

Palmitoleinska kiselina (C16:1), margarinska kiselina (C17:0), *cis*-10-heptadecenska kiselina (C17:1), arahidonska kiselina (C20:0), *cis*-11-eikozanoenska kiselina (C20:1) i lignocerinska kiselina (C24:0) su masne kiseline pronađene u tragovima (<1%) u ulju semena breskve (Tabela 6, Prilog 2). Zasićena masna kiselina C17:0 nije detektovana u tri genotipa breskve („Royal Glory”, „FA5”, „II/19”), nezasićena C17:1 nije detektovana u genotipu vinogradarske breskve „II/19”, a C20:1 nije detektovana kod „FSM1”, „II/42” (Prilog 2). Zasićena masna kiselina C24:0 pronađena je u malom broju uzoraka semena breskve. Najviše je bila prisutna kod standardnih sorti (u svim osim „Springbelle”, „Redcap”, „Maria Gracia”, „Redhaven”), zatim je detektovana kod tri perspektivna hibrida („FSM1”, „FSM2” i „FA2”) i samo kod jednog genotipa vinogradarske breskve „II/38” (Prilog 2). Razlike u broju masnih kiselina mogu se objasniti razlikama u analiziranim genotipovima i uticajem agroekoloških uslova^[112].

Kiselina C16:1, još nazivana *cis*-9-heksadecenska kiselina, nalazi se u određenim proizvodima i ima široku primenu u medicini i kozmetici^[111,113]. Jedan je od uobičajenih sastojaka glicerida u ljudskom masnom tkivu i učestvuje u nekoliko metaboličkih procesa^[111]. Poslednjih godina, ispitivanja ukazuju da C16:1 pokazuje uticaj na lučenje insulina iz pankreasa pri čemu može ublažiti dijabetes tip 2, metabolizam lipida, povećava fluidnost ćelijske membrane, smanjenje upalnih procesa, zaštitu kardiovaskularnog sistema, inhibiranje onkogeneze, pokazuje anti-inflamatorni efekat na životinje i može sprečiti rast Gram-pozitivnih bakterija^[111,113]. Dodatno se može pretvoriti u biogorivo ili da se upotrebi u proizvodnji 1-oktena koji se koristi za dobijanje linearnog polietilena niske gustine^[113].

Modifikacija masnih kiselina tokom biosinteze lipida je ključna za dobijanje, sastav i broj raznovrsnijih lipida u biljci. Masne kiseline sa 20 ili više atoma ugljenika se nazivaju masnim kiselinama sa dugim lancem (VLCFA – *Very-Long-Chain Fatty Acids*). U biljkama najviše su prisutne na površini listova kao vosak i kao komponenta u kutikuli u cilju zaštite od ksenobiotika. U *Simmondsia chinensis* semenima VLCFA su najbitnije komponente za skladištenje energije u obliku tečnog voska sa lancima čak i do 36 - 46 ugljenikovih atoma u dužini^[46].

Zasićene masne kiseline sa više od 22 atoma ugljenika (kao što je 24:0) su komponente mnogih ljudskih tkiva a njima je posebno obogaćen mijelinski omotač nervnih ćelija. U ljudskim tkivima nastaju iz prehrambenih izvora i sintetišu se iz masnih kiselina kraćeg lanca kao što su palmitinska i stearinska kiselina. Sinteza se može odvijati u mikrozomima ili mitohondrijama i enzimi uključeni u njihovu sintezu se razlikuju od enzima koji sintetišu masne kiseline do 20 ugljenikovih atoma^[114].

Sadržaj i sastav masnih kiselina u ulju semena breskve mogu se porediti sa uljem semena badema i kajsije, jer imaju sličan sastav i malo drugačiji procenat masnih kiselina. Ispitivanjem različitih genotipova badema gajenih na teritoriji Srbije^[112], takođe je primećena veća varijabilnost u pogledu sadržaja ulja (36,3 - 62,9%). Što se tiče ukupnog sadržaja masnih kiselina, najviše su zastupljene nezasićene masne kiseline C18:1 n9c (69,86%) i C18:2 n6c (21,83%), a od zasićenih masnih kiselina C16:0 (5,48%) i C18:0 (1,90%). Ostale masne kiseline prisutne u tragovima su: C16:1, C17:0, C17:1, linoleinska kiselina (C18:3), C20:0 i C20:1^[112]. Širok raspon vrednosti za sadržaj ulja javlja se i kod slatkog i gorkog semena kajsije i može biti posledica varijacije klimatskih uslova i adaptacije sorti^[105]. Isto kao i kod semena badema i breskve, gorko i slatko seme kajsije veoma je bogato nezasićenim masnim kiselinama (C18:1 n9c i C18:2 n6c zajedno čine oko 93% masnih kiselina ulja) a sadržaj zasićenih je nizak, 6% sa C16:0 kao najzastupljenijom^[105]. *Al Juhaimi* i saradnici^[115], dodatno potvrđuju da je sirovo seme kajsije bogato MUFA i PUFA masnim kiselinama. Sadržaj ulja u semenu kajsija bio je 53,4 - 56,44%, najviše C18:1 n9c (66 - 72%), C18:2 n6c (20 - 23%), C16:0 (5,9 - 6,8%), C18:0 (1,1 - 1,9%) i u manjim količinama C16:1 (0,8 - 1,2%), C18:3 (0,21 - 0,34%) i C20:0 (0,17 - 0,23). Visok sadržaj C18:2 n6c u ulju semena roda *Prunus* čini ova ulja visoko nutritivnim, a sadržaj C18:1 n9c je veći nego u ulju pistača 50,29%, repice 54%, palme 43%, soje 25%, kokosa 7%^[115]. Visok sadržaj C18:1 n9c daje mogućnost korišćenja ulja u salatama ili kao ulja za kuvanje i prženje^[115]. Posmatranjem dostupnih literaturnih podataka za bademe i kajsije i poređenjem sa rezultatima za masne kiseline iz ove doktorske disertacije, dodatno se može zaključiti da seme breskve jedino

sadrži C24:0 kiselinu, a ulja semena badema i kajsije sadrže C18:3 masnu kiselinu^[112,115] koja nije detektovana u uzorcima semena breskve.

Vrednosti neparametrijskih statističkih testova, *Kruskal-Wallis*-ovog testa primenjenog na tri grupe koje se razlikuju po poreklu i *Mann-Whitney*-evog U-testa primenjenog na dve grupe genotipova breskve koje se razlikuju po vremenu zrenja, predstavljene su u Tabeli 7.

Tabela 7. Parametri statističkih testova razlikovanja genotipova breskve posmatranjem sadržaja ulja u semenu i sadržaja masnih kiselina u ulju semena.

	Kruskal-Wallis test		Mann-Whitney U test	
	P	Z vrednost*	P	H ₀
% Ulja u semenu	0,0025	S(P,V)	0,0001	Odbacuje
C16:0	0,0667	-	0,0017	Odbacuje
C16:1	0,0622	-	0,0136	Odbacuje
C18:0	0,0014	S(P,V)	0,0001	Odbacuje
C18:1 n9c	0,0064	S(V)	0,0005	Odbacuje
C18:2 n6c	0,0077	S(V)	0,0014	Odbacuje
C20:0	0,1988	-	0,0093	Odbacuje
C24:0	0,0845	-	0,3344	Prihvata
SFA	0,0012	S(P,V)	0,0002	Odbacuje
MUFA	0,0064	S(V)	0,0011	Odbacuje
PUFA	0,0077	S(V)	0,0014	Odbacuje
UFA	0,0010	S(P,V)	0,0002	Odbacuje
S/U	0,0054	S(P,V)	0,0001	Odbacuje

*Genotipovi sa statistički značajnom razlikom između medijana označeni su zagradama; S-Standardne sorte, P-Perspektivni hibridi, V-Vinogradarske breskve

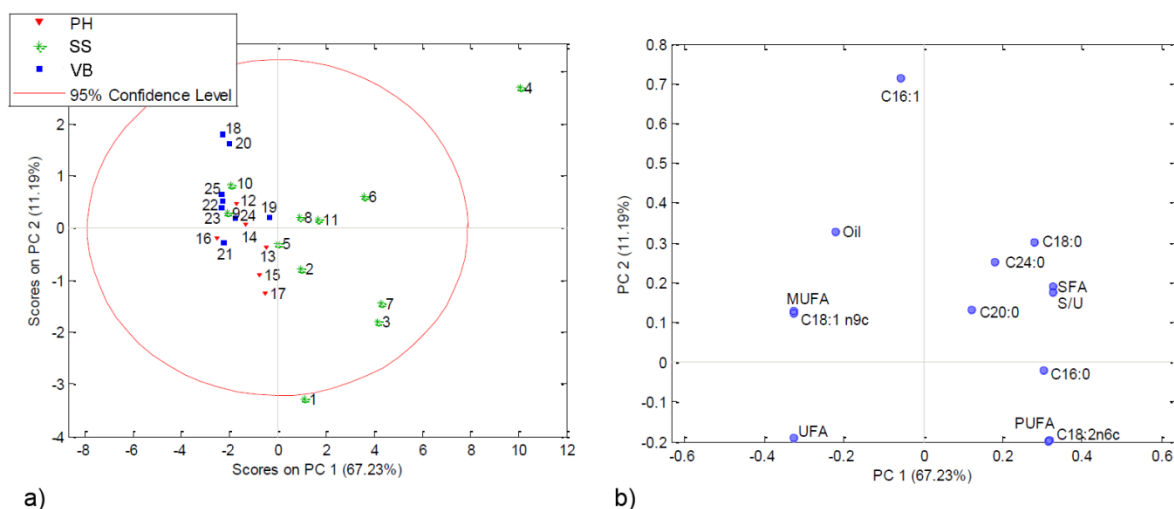
Osim sadržaja zasićenih masnih kiselina C16:0, C20:0, C24:0 i nezasićene C16:1 kiseline koje se nisu statistički značajno razlikovale između tri grupe uzoraka semena, ostale ispitivane varijable vezane za sadržaj ulja i masnih kiselina dovode do odvajanja standardnih sorti breskve od genotipova vinogradarske breskve. Dodatno, standardne sorte se razlikuju i od perspektivnih hibrida zbog statistički značajnih razlika u % ulja, sadržaju C18:0, SFA, UFA i S/U odnosa. Statistički značajna razlika između uzoraka grupisanih po vremenu zrenja, potvrđena je za sve varijable koje se odnose na sadržaj ulja semena i masnih kiselina u ulju semena breskve, osim za sadržaj lignocerinske kiseline, C24:0.

Zbog malog i jednakog sadržaja u svim uzorcima, pri čemu kod nekih uzoraka ispod granice detekcije, masne kiseline C17:0, C17:1 i C20:1 nisu uzete u obzir pri statističkoj obradi podataka.

4.2.1. Multivarijantna analiza semena breskve na osnovu sadržaja masnih kiselina

Analiza glavnih komponenta urađena je u cilju utvrđivanja razlika u sadržaju masnih kiselina kod ispitivanih sorti/genotipova breskve. Ova multivarijantna metoda primenjena je sa ciljem boljeg razumevanja rezultata, vizualizacije moguće međusobne zavisnosti između uzoraka i sadržaja masnih kiselina kao i smanjivanje dimenzionalnosti podataka.

Metoda PCA primenjena na uzorke semena breskve rezultovala je dvokomponentnim modelom kojim se objašnjava 78,42% od ukupnog varijabiliteta među podacima. Prva glavna komponenta (PC1) objašnjava 67,23% varijabiliteta, dok druga glavna komponenta (PC2) obuhvata 11,19%. Uzajamna projekcija uzoraka (vrednost skorova) i grafik promerljivih, nezavisnih (grafik doprinosa pojedinačnih varijabli) za ove dve glavne komponente date su na Slici 16.



Slika 16. PCA analiza semena breskve na osnovu sadržaja masnih kiselina

Sa grafika skorova (Slika 16a) uočava se grupisanje uzoraka u dve grupe. Prvu grupaciju čine zajedno perspektivni hibridi (PH) i genotipovi vinogradarske breskve (VB) koji su pozicionirani na levoj strani grafika duž PC1 ose. Standardne sorte (SS) su izdvojene u drugu grupu koja je široko rasprostranjena na desnoj strani grafika i pozitivne PC1 ose. Izuzeci od druge grupe su standardne sorte „Bolero” (uzorak 9) i „San Prins” (uzorak 10) koje su pridružene prvoj grupi. Mogući razlog odstupanja je njihovo vreme zrenja jer one pripadaju kasnim sortama zajedno sa perspektivnim hibridima i genotipovima lokalne, vinogradarske breskve.

Posmatranjem grafika doprinosa pojedinačnih varijabli (Slika 16b) može se zaključiti da se prva grupa odvajaju zahvaljujući većem sadržaju ulja u semenima (Oil), oleinske kiseline (C18:1 n9c), veće vrednosti ukupnih i mononezasićenih masnih kiselina (UFA i MUFA), dok

suprotno njima, standardne sorte sadrže više zasićenih masnih kiselina (C16:0, C18:0, C20:0, C24:0 i SFA) i linolnu kiselinu (C18:2 n6c).

Uzorak 1, „Springbelle” i uzorak 4, „Royal Glory”, u PCA analizi predstavljaju odstupajuće vrednosti. Niske vrednosti za Oil i MUFA, a i najmanje vrednosti za C16:1, C18:1 su dovele do odvajanja sorte „Springbelle”. Odstupanje sorte „Royal Glory” javlja se jer u odnosu na druge sorte i genotipove „Royal Glory” ima najveći sadržaj C16:0 i C18:0 kao i C18:2 n6c koja je ujedno i najzastupljenija masna kiselina u ovoj sorti (kod drugih sorti i genotipova najzastupljenija je C18:1 n9c). Dodatno, „Royal Glory” u odnosu na druge sorte i genotipove ima najmanju vrednost za MUFA i UFA a najveću za SFA i PUFA.

4.3. Fenolni profil semena breskve

Kvalitativni i kvantitativni fenolni sastav ispitivanih uzoraka semena breskve je određen primenom ultraefikasne tečne hromatografije sa LTQ OrbiTrap masenim analizatorom (UHPLC LTQ OrbiTrap MS/MS, poglavlje 3.3.4). Fenolni profil je određen poređenjem monoizotopskih masa dobijenih uz pomoć programa *ChemDraw* ili iz literaturnih podataka, sa jedne strane, i mase fenola dobijenih primenom *Exalibur* softvera, sa druge strane.

4.3.1. Kvalitativna analiza fenolnih jedinjenja u uzorcima semena breskve

Prilikom kvalitativne analize fenolne frakcije (frakcije B) semena breskve omogućena je identifikacija sledećih sedamdeset šest jedinjenja: 23 fenolne kiseline i njihovih derivata, 23 flavonoida, 21 glikozid i 9 drugih fenolnih i organskih jedinjenja. Identifikovano je pet klasa flavonoida: tri jedinjenja iz klase flavan-3-ola, dva flavonola, osam flavanonola, pet flavona i pet flavanona. Primenjenom tehnikom, pored fenolnih jedinjenja, potvrđeno je i prisustvo četiri organske kiseline i jednog njihovog derivata koji nemaju fenolnu strukturu. Spisak identifikovanih jedinjenja sa skraćenicama korišćenim u multivarijantnoj analizi, retencionim vremenima, molekulskim formulama, srednjim vrednostima monoizotopskih i izračunatih masa, masena fragmentacija i broj uzorka u kojima su pronađeni navedeni su u Tabeli 8. Od 76 identifikovanih jedinjenja, 14 je identifikovano i kvantifikovano poređenjem MS spektara i retencionih vremena (t_R) sa dostupnim standardima koji su analizirani pod istim uslovima. Zbog nedostatka standarda, identifikacija preostalih jedinjenja je zasnovana na poređenju tačne mase, $[M-H]^-$ (molekulskog jona) i njegove MS^2 fragmentacije sa odgovarajućim spektralnim informacijama opisanim u dostupnoj literaturi.

Tabela 8. Fitohemikalije identifikovane u semenu 25 sorti/genotipova breskve korišćenjem UHPLC-LTQ Orbitrap MS/MS.

Broj pika	Identifikovana jedinjenja	Skraćenice	t_{R} , min	Molekulska formula [M-H] ⁻	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Nadena masa, [M-H] ⁻	Greška u Δ ppm	MS/MS fragmentacija	Uzorci u kojima je pronađeno*	Referenca
Fenolne kiseline i derivati										
1	Vanilinska kiselina ^b	VA	4,15	C ₈ H ₇ O ₄ ⁻	167,0350	167,0345	3,0	152, 149, 123, 108, 91	2, 5, 6, 17, 18, 19	[116]
2	Protokatehuinska kiselina ^{a, b}	ProA	4,40	C ₇ H ₅ O ₄ ⁻	153,0193	153,0190	2,0	109	1-12, 14-16, 18-25	[49]
3	Neohlorogenska kiselina ^b	NeochA	4,45	C ₁₆ H ₁₇ O ₉ ⁻	353,0873	353,0864	2,5	191, 179, 135	2, 5, 6, 16, 20	[117]
4	Kumaroil-kininska kiselina ^b	CQA	4,95	C ₁₆ H ₁₇ O ₈ ⁻	337,0929	337,0924	1,5	191, 173, 163, 155, 119, 111	1-6, 8, 11, 12, 16, 20, 25	[118]
5	Kofeoil-šikiminska kiselina ^b	CShA	5,10	C ₁₆ H ₁₅ O ₈ ⁻	335,0772	335,0756	4,8	289	1-4, 6-9, 10, 16, 20, 25	[119]
6	Etoksibenzoeva kiselina ^b	EbA	5,15	C ₉ H ₉ O ₃ ⁻	165,0557	165,0551	3,6	149, 135, 93	12, 15, 22-24	[120]
7	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina ^{a, b}	<i>p</i> -HbA	5,15	C ₇ H ₅ O ₃ ⁻	137,0244	137,0240	2,9	109, 93	Svi uzorci	[117]
8	Feruloil-kininska kiselina ^b	FerQA	5,20	C ₁₇ H ₁₉ O ₉ ⁻	367,1035	367,1020	4,1	193, 191, 173, 155, 149, 134	1-6, 8, 9, 16, 20	[121]
9	<i>p</i> -Hidroksifenilirsčetna kiselina ^{a, b}	<i>p</i> -HpaA	5,25	C ₈ H ₇ O ₃ ⁻	151,0400	151,0397	2,0	121, 107	Svi uzorci	[116]
10	Hlorogena kiselina ^{a, b}	ChA	5,45	C ₁₆ H ₁₇ O ₉ ⁻	353,0878	353,0863	4,2	215, 191, 179, 135	1-12, 16, 18-21, 23-25	[122]
11	Homoprotokatehuinska kiselina ^b	HProA	6,00	C ₈ H ₇ O ₄ ⁻	167,0350	167,0349	0,6	123	5, 8, 11, 15, 25	[79]
12	<i>p</i> -Kumarinska kiselina ^{a, b}	<i>p</i> -CoA	6,25	C ₉ H ₇ O ₃ ⁻	163,0399	163,0392	4,3	119, 91	Svi uzorci	[81]; [123]
13	Vanilin ^b	Vanillin	6,35	C ₈ H ₇ O ₃ ⁻	151,0400	151,0397	2,0	136, 108, 92	5, 16, 17, 19	[116]; [122]
14	Dikofeoil kininska kiselina ^b	DCQA	6,45	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂ ⁻	515,1195	515,1182	2,5	353, 335, 191, 179, 173	1, 2, 4, 6-8	[121]
15	Ferulinska kiselina ^{a, b}	FerA	6,60	C ₁₀ H ₉ O ₄ ⁻	193,0506	193,0499	3,6	178, 149, 134	Svi uzorci	[117]
16	Izomer vanilinske kiseline ^c	VAI	6,70	C ₈ H ₇ O ₄ ⁻	167,0350	167,0342	4,8	125, 123, 108	1-4, 6, 7, 9, 12, 16, 20, 22, 24	
17	Kofeoil-feruloil-kininska kiselina ^b	CFerQA	7,10	C ₂₆ H ₂₅ O ₁₂ ⁻	529,1351	529,1332	3,6	367, 353, 335, 193, 191, 179, 173, 161	1, 3, 4, 6-8	[121]
18	Salicilna kiselina ^b	SalA	7,35	C ₇ H ₅ O ₃ ⁻	137,0239	137,0238	0,7	109, 93	8, 15, 19, 21	[116]
19	Izomer kumarinske kiseline ^c	CoAI	8,90	C ₁₀ H ₁₁ O ₂ ⁻	163,0765	163,0757	4,9	135, 119, 91	5, 15, 17, 19, 20, 24	
20	Prenil kofeat ^b	PreCa	9,70	C ₁₄ H ₁₅ O ₄ ⁻	247,0976	247,0965	4,5	179, 161, 135	3, 6, 8	[81]; [120]
21	Benzil kofeat ^b	CABE	9,75	C ₁₆ H ₁₅ O ₄ ⁻	269,0818	269,0806	4,5	251, 225, 178, 161, 134	1, 3, 4, 6, 8, 10	[120]
22	Feniletil estar kofeinske kiseline ^b	CAPE	10,05	C ₁₇ H ₁₅ O ₄ ⁻	283,0976	283,0969	2,5	179, 135	3, 6, 8	[81]
23	Cinamil-estar kofeinske kiseline ^b	CACE	10,50	C ₁₈ H ₁₅ O ₄ ⁻	295,0976	295,0964	4,1	251, 211, 178, 134	3, 6, 8	[81]

Flavan-3-oli

24	Procijanidinski dimer (B tip) ^b	ProcyadimerB	4,70	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂ ⁻	577,1346	577,1338	1,4	559, 451, 425, 407, 289, 287	2, 6, 8, 9, 20	[124]
25	Katehin ^{a, b}	Cat	5,05	C ₁₅ H ₁₃ O ₆ ⁻	289,0718	289,0705	4,5	245, 205, 203, 179	1-12, 14-16, 18-20, 23-25	[51]; [124]; [125]
26	Propelargonidin dimer (A tip) ^c	PropeldimerA	8,30	C ₃₀ H ₂₃ O ₁₀ ⁻	543,1172	543,1205	6,1	271, 177, 165, 151	22, 23	

Flavonoli

27	Kvercetin ^{a, b}	Que	7,75	C ₁₅ H ₉ O ₇ ⁻	301,0354	301,0342	4,0	273, 257, 179, 151,	10	[81]
28	Galangin ^{a, b}	Gal	10,10	C ₁₅ H ₉ O ₅ ⁻	269,0455	269,0449	2,2	227, 213, 197, 183, 169, 151	3, 6, 8, 11	[120]; [123]

Flavanonoli

29	Taksifolin ^b	Tax	6,50	C ₁₅ H ₁₁ O ₇ ⁻	303,0510	303,0496	4,6	285, 177, 125	9	[81]
30	Aromadendrin ^b	Aro	7,15	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ ⁻	287,0561	287,0549	4,2	269, 259, 243, 215, 173, 151, 125	9, 12, 14-16, 22-24	[51]
31	Pinobanksin-5-metil-etar ^b	PinobME	8,00	C ₁₆ H ₁₃ O ₅ ⁻	285,0769	285,0758	3,9	267, 252, 239, 165	3, 6, 8, 10	[126]
32	Pinobanksin ^{a, b}	Pinob	8,30	C ₁₅ H ₁₁ O ₅ ⁻	271,0611	271,0602	3,3	177, 165, 151	2, 3, 8-17, 21-23, 25	[81]
33	Pinobanksin-3-O-acetat ^b	PinobA	10,05	C ₁₇ H ₁₃ O ₆ ⁻	313,0718	313,0707	3,5	271, 253	1-4, 6-8, 10, 11	[81]; [126]
34	Pinobanksin-3-O-propionat ^b	PinobP	10,75	C ₁₈ H ₁₅ O ₆ ⁻	327,0869	327,0857	3,7	271, 253	3, 10	[81]; [126]
35	Pinobanksin-3-O-butirat (ili izomer) ^b	PinobB	11,40	C ₁₉ H ₁₇ O ₆ ⁻	341,1002	341,1003	0,3	271, 253	3, 10	[81]
36	Pinobanksin-3-O-pentanoat (ili izomer) ^b	PinobPen	11,95	C ₂₀ H ₁₉ O ₆ ⁻	355,1183	355,1169	3,9	271, 253	3, 10	[81]

Flavoni

37	Apigenin ^b	Api	8,35	C ₁₅ H ₉ O ₅ ⁻	269,0455	269,0444	4,1	251, 241, 225, 201, 181, 151, 149, 117	3, 22	[118]; [121]
38	Hispidulin ^b	Hisp	8,55	C ₁₆ H ₁₁ O ₆ ⁻	299,0560	299,0553	2,3	284	9, 12, 14-16, 22-24	[127]
39	Acacetin ^b	Aca	9,10	C ₁₆ H ₁₁ O ₅ ⁻	283,0612	283,0598	4,9	268, 240, 239, 211, 171, 151	3	[121]
40	Hrizin ^{a, b}	Chry	9,95	C ₁₅ H ₉ O ₄ ⁻	253,0505	253,0496	3,6	209, 181, 165, 143	1-3, 5-8, 10-12, 17-19	[81]
41	Hrizin-6-metil-etar ^b	Mchry	10,45	C ₁₆ H ₁₁ O ₅ ⁻	283,0612	283,0599	4,6	268	3, 6, 8	[126]

Flavanoni

42	Naringenin ^{a, b}	Nar	6,55	C ₁₅ H ₁₁ O ₅ ⁻	271,0612	271,0601	4,1	177, 165, 151, 107	5, 9, 12, 16-19, 21, 23, 25	[128]
43	Eriodiktio ^b	Erio	7,60	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ ⁻	287,0561	287,0549	4,2	151	11, 25	[117]
44	Hesperetin ^{a, b}	Hesp	8,45	C ₁₆ H ₁₃ O ₆ ⁻	301,0718	301,0708	3,3	286, 177, 151, 107	5, 8-12, 14-17, 19, 21-25	[125]

45	Pinocembrin ^{a, b}	Pinoc	9,95	C ₁₅ H ₁₁ O ₄ ⁻	255,0663	255,0656	2,7	213, 211, 187, 151, 145	1-12, 14-19, 22-25	[81]
46	Pinostrobin ^b	Pinos	11,00	C ₁₆ H ₁₃ O ₄ ⁻	269,0819	269,0807	4,5	254, 251, 236, 226, 165	3	[81]; [123]
Glikozidi										
47	Diheksozid Hidroksibenzoeve kiseline ^c	HbAdh	2,70	C ₁₉ H ₂₅ O ₁₃ ⁻	461,1301	461,1283	3,9	413, 323, 263, 221, 179, 137, 125	1-6, 8, 9, 11-14, 16, 20-25	
48	Hidroksi-benzoil-heksoza ^b	Hbh	3,75	C ₁₃ H ₁₅ O ₈ ⁻	299,0772	299,0766	2,0	239, 209, 179, 137	1, 2	[129]
49	Heksozid Protokatehuinske kiseline ^b	Prohex	3,95	C ₁₃ H ₁₅ O ₉ ⁻	315,0722	315,0711	3,5	269, 165, 153, 109	13	[130]
50	Heksozid Vanilinske kiseline 1 ^b	VAhex1	4,05	C ₁₄ H ₁₇ O ₉ ⁻	329,0877	329,0867	3,0	167	1, 2, 4, 6, 8, 13, 25	[117]
51	Dezoksiheksozid Vanilinske kiseline ^c	VAdeoh	4,60	C ₁₄ H ₁₇ O ₈ ⁻	313,0929	313,0914	4,8	269, 161, 143, 113, 101	Svi uzorci	
52	Hidroksi-metil-fenil heksozid ^c	HMPHh	4,80	C ₁₃ H ₁₇ O ₇ ⁻	285,0980	285,0971	3,2	179, 161, 143, 119	2, 9, 14, 23	
53	Diheksozid ferulinske kiseline ^c	FerAdh	4,80	C ₂₂ H ₂₉ O ₁₄ ⁻	517,1563	517,1545	3,5	323, 193, 178, 149, 134	3-6, 9, 11-16, 20-25	
54	Heksozid Vanilinske kiseline 2 ^b	VAhex2	5,15	C ₁₄ H ₁₇ O ₉ ⁻	329,0877	329,0867	3,0	167	1, 2, 4, 8, 9, 14, 15, 22-25	[117]
55	Benzoil-heksozid ^c	BH	5,50	C ₁₃ H ₁₅ O ₇ ⁻	283,0823	283,0813	3,5	265, 211, 193, 161, 147, 121	22-24	
56	Naringenin heksozid 1 ^b	Narhex1	6,00	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀ ⁻	433,1140	433,1133	1,6	271	9, 23-25	[128]
57	Eriodiktiol heksozid ^b	Eriohex	6,05	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁ ⁻	449,1089	449,1075	3,1	287	9, 14, 25	[117]
58	Kvercetin heksozid ^b	Quehex	6,10	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	463,0882	463,0869	2,8	301, 300, 151	7, 9	[121]
59	Izoramnetin rutinozid ^b	Isorhar	6,30	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₆ ⁻	623,1618	623,1599	3,0	315, 300, 271, 255	4, 6	[49]; [131]
60	Izoramnetin heksozid ^b	Isorhah	6,45	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂ ⁻	477,1038	477,1026	2,5	357, 315, 314, 285, 271	1, 4-9, 12, 14-16, 23, 24	[121]
61	Naringenin heksozid 2 ^b	Narhex2	6,55	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀ ⁻	433,1140	433,1129	2,5	271, 177, 165, 151	10, 12, 14, 15, 22	[128]
62	Hesperetin heksozid ^c	Hesph	6,65	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁ ⁻	463,1122	463,1167	9,7	301, 286, 177, 165, 151, 107	9, 10, 14, 15, 22-25	
63	Floretin heksozid ^b	Phlohex	6,70	C ₂₁ H ₂₃ O ₁₀ ⁻	435,1296	435,1283	3,0	273	6, 8, 9, 16, 23-25	[132]
64	Benzoil-heksozid Vanilinske kiseline ^c	VAbh	6,90	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀ ⁻	433,1140	433,1123	3,9	167, 152, 123, 108	1-4, 6-9, 11, 13, 16, 21	
65	Likviritin ^b	Liqu	7,40	C ₂₁ H ₂₁ O ₉ ⁻	417,1191	417,1187	1,0	255, 121	1-11, 14, 15, 17-21, 23, 24	[119]
66	Vanilin diheksozid ^b	Vdh	7,65	C ₂₀ H ₂₇ O ₁₃ ⁻	475,1451	475,1436	3,2	429, 313, 152, 151	1	[122]
67	Naringenin benzoil-heksozid ^c	Narbh	8,70	C ₂₈ H ₂₅ O ₁₁ ⁻	537,1267	537,1313	8,6	271, 177, 151, 107	22	
Ostala fenolna jedinjenja										
68	Siringaldehid ^b	Syr	4,20	C ₉ H ₉ O ₄ ⁻	181,0506	181,0498	4,4	166, 151, 137	4, 6	[116]; [122]
69	Skopoletin ^b	Sco	6,55	C ₁₀ H ₇ O ₄ ⁻	191,0350	191,0347	1,6	176	20	[133]

70	Aeskuletin ^b	Escu	6,90	C ₉ H ₅ O ₄ ⁻	177,0193	177,0186	4,0	159, 149, 133, 121, 105	13-15, 22, 23	[120]
71	Koniferil aldehid ^b	Con	7,05	C ₁₀ H ₉ O ₃ ⁻	177,0557	177,0551	3,4	162, 134, 133	3-6, 9, 10, 14-16, 19, 22-25	[116]; [122]
Ostala organska jedinjenja										
72	Kininska kiselina ^b	QA	1,20	C ₇ H ₁₁ O ₆ ⁻	191,0560	191,0554	3,1	173, 171, 127, 111, 93, 85	1-4, 6, 8, 11-13, 19, 20	[51]; [130]
73	Jabučna kiselina ^b	MA	1,25	C ₄ H ₅ O ₅ ⁻	133,0141	133,0136	3,8	115, 71	Svi uzorci	[130]
74	Limunska kiselina ^b	CA	1,75	C ₆ H ₇ O ₇ ⁻	191,0196	191,0187	4,7	173, 147, 127, 111	1-11, 13, 15, 20, 21, 23-25	[51]; [130]
75	Derivat Limunske kiseline ^b	Cad	4,50	C ₁₃ H ₁₃ O ₉ ⁻	313,0565	313,0562	1,0	295, 191, 147, 111	1, 2, 4	[130]
76	Abscizinska kiselina ^b	Abs	7,65	C ₁₅ H ₁₉ O ₄ ⁻	263,1289	263,1278	4,2	219, 201, 153, 151, 111,	2, 4, 6, 8	[123]

t_R (min): retenciono vreme (minuti); **[M-H]⁻**: molekularni jon stvoren u negativnom modu; **Greška Δ ppm**: greška između pronađene i izračunate mase izražena je u ppm; **Izračunata masa**: tačna masa jona dobijena korišćenjem hemijskog programa, ChemDraw; ^aU saglasnosti sa standardnim jedinjenjima; ^bU saglasnosti sa referencom; ^cU saglasnosti sa masenom fragmentacijom. *Videti Tabelu 1.

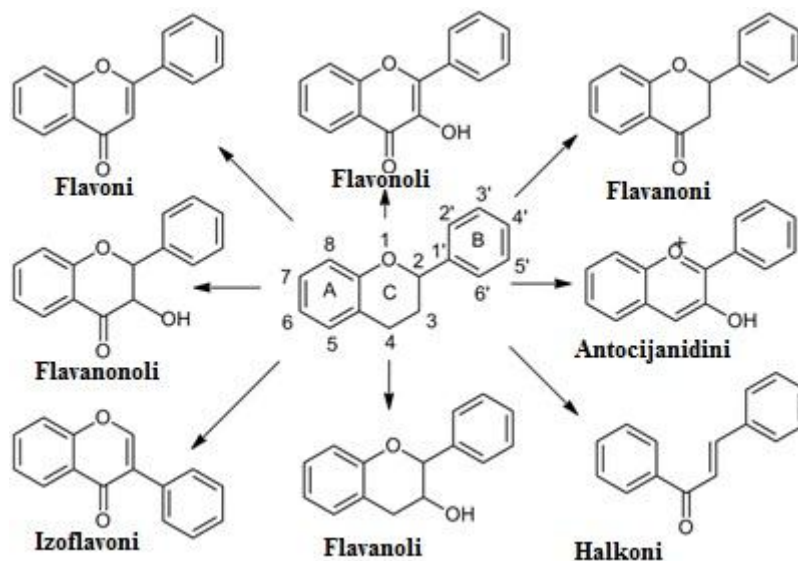
4.3.1.1. Identifikacija fenolnih kiselina i njihovih derivata

Fenolne kiseline su velika grupa fitohemikalija koja u biljkama može biti u slobodnom ili vezanom obliku. U derivatima, fenolne kiseline mogu biti povezane sa raznolikim komponentama biljke preko acetil, estarske ili etarske veze^[55]. Ispitivanjem masenih spektara otkriveno je da uzorci semena breskve uglavnom od fenolnih kiselina sadrže one koje pripadaju hidroksibenzojevoj grupi kiselina (Tabela 8, supstance **1, 2, 6, 7, 9, 11, 16 i 18**), dok jedini predstavnici grupe hidroksicinaminske kiseline pronađeni u semenima su *p*-kumarinska kiselina (**12**), ferulinska kiselina (**15**) i izomer kumarinske kiseline (**19**). Sve fenolne kiseline uglavnom imaju isti fragmentacioni mehanizam koji se sastoji od gubitka CO₂ što uzrokuje [M-H-44]⁻ glavni fragmentacioni jon^[81]. Izuzetak je kofeoil-šikiminska kiselina (**5**) koja daje fragmentacioni jon na *m/z* 289 koji odgovara [M-H-HCOOH]⁻ fragmentu^[119]. Od derivata fenolnih kiselina u semenima breskve najviše su zastupljeni estri kininske kiseline (**3, 4, 8, 10, 14 i 17**). Zajednički fragmentacioni jon ovih estara je na *m/z* 191 koji potiče od kininske kiseline. Složeniji estri kininske kiseline (**14**) i (**17**) su prisutni samo u nekim standardnim sortama. Što se tiče vanilina (**13**), jon na *m/z* 136 nastaje kada vanilin izgubi CH₃ grupu, zatim MS² fragmentacijom jona *m/z* 136 nastaju joni na *m/z* 108 i *m/z* 92 gubitkom CO i dodatnim gubitkom OH grupe. Ovo jedinjenje i ista fragmentacija uočeni su i u semenu šljive (*Prunus domestica*)^[122]. Pored derivata kininske kiseline, u semenu breskve i to pretežno u standardnim sortama, detektovana su i četiri derivata kofeinske kiseline (**20-23**) sa glavnim fragmentacionim putem koji se sastoji od homolitičkog raskidanja estarske veze pri čemu se formiraju joni *m/z* 179 ili *m/z* 178 i dodatnim gubitkom CO₂ nastaju joni *m/z* 135 ili *m/z* 134^[81,120]. Sve navedene fenolne kiseline se smatraju potencijalnim markerima autentičnosti semena breskve i stoga su uključene u ciljanu kvantitativnu analizu uzoraka semena.

4.3.1.2. Identifikacija flavonoidnih aglikona

Flavonoidi su korisni sekundarni metaboliti koji su široko zastupljeni u biljkama i imaju pozitivan efekat na ljudsko zdravlje. Osnova struktura ovih jedinjenja (Slika 17), flavansko jezgro, sastoji se od 15 atoma koji su raspoređeni u C6-C3-C6 konfiguraciju – dva fenil prstena (A i B) i jedan heterociklični prsten (C). Raznolika supstitucija na C prstenu daje mnoge flavonoidne klase jedinjenja kao što su flavanoli, flavonoli, flavoni, flavanoni, flavanonoli, izoflavoni, halkoni i antocijanidini^[55]. U negativnom modu najčešći mehanizam

fragmentacije flavonoida je *retro-Diels-Alder* (RDA) reakcija. Fragmentacioni joni koji nastaju usled ovog mehanizma su m/z 179, m/z 165 i m/z 151^[81,126].



Slika 17. Osnovne strukture flavonoida^[94]

U semenu različitih genotipova breskve, iz grupe derivata flavan-3-ola samo procijanidinski dimer B tipa (**24**), katehin (**25**) i propelargonidin dimer A tipa (**26**) su uspešno identifikovani. Procijanidinski dimer (B tip) formira molekulski jon, $[M-H]^-$ na m/z 577,1338 i glavne fragmentacione jone na m/z 451, 425, 407, 289 i 287^[124]. Katehin je pronađen skoro u svim ispitivanim genotipovima, njegova fragmentacija je potvrđena retencionim vremenom i MS spektrom standarda kao i mnogim publikovanim radovima^[51,124,125]. Jedinjenje propelargonidin dimer A tipa (afzelehin dimer) je takođe identifikovano u drugim *Prunus* vrstama kao što je npr. koren kajsije (*Prunus armeniaca*)^[134]. U slučaju flavonola, samo kvercetin (**27**) i galangin (**28**) su uočeni u malom broju uzoraka semena i potvrđeni poređenjem sa standardima i literaturom.

Ispitivanjem masenog spektra uzoraka semena breskve otkriveno je osam flavanonola i njihovih estarskih ili etarskih derivata. Taksifolin (**29**) je pronađen samo u semenu standardne kulture „Bolero” (uzorak 9) i daje glavne fragmentacione jone na m/z 285, 177 i 125^[81]. Jedinjenje **30** je identifikovano kao aromadendrin na osnovu molekulskog jona na 287,0549 i nastanka MS² fragmentacionih jona na m/z 269, 259, 243 pri grubitku H₂O, CO and CO₂, redom^[51]. Aromadendrin je više prisutan u genotipovima perspektivnih hibrida i genotipova vinogradarske breskve nego u standardnim sortama (Tabela 8). Osim jedinjenja **29** i **30**, ostali flavanonoli su pinobanksin (**32**) i njegovi derivati (**31**, **33-36**). Prema $[M-H]^-$

jonu, nastalim fragmentima na m/z 267, 252, 239, 165 i kompatibilnim literaturnim podacima, jedinjenje **31** predstavlja metilovan derivat pinobanksina, pinobanksin-5-metil-etar^[126]. Pinobanksin (**32**) je prikazan sa $[M-H]^-$ na m/z 271,0602 i glavnim fragmentima na m/z 165 i 151 koji predstavljaju karakteristične jone nastale pri RDA fragmentaciji. Dodatno, MS spektar i retenciono vreme standarda potvrđuju da je jedinjenje (**32**) pinobanksin. Četiri estarska derivata pinobanksina (**33-36**) daju identične MS^2 fragmente na m/z 271 i 253 nastale gubitkom odgovarajuće acil grupe $[M-acil]^-$ i dodatnim gubitkom vode $[M-acil-H_2O]^-$ ^[81]. Za razliku od pinobanksina, njegovi derivati pronađeni su samo u standardnim sortama.

Posmatranjem dobijenih masenih spektara uzoraka semena breskve, identifikovano je pet flavona: apigenin (**37**), hispidulin (**38**), acacetin (**39**), hrizin (**40**) i hrizin-6-metil-etar (**41**). Apigenin je pronađen samo u semenima sorte „Maria Gracia” (uzorak 3) i genotipu vinogradarske breskve II/32 (uzorak 22); potvrđen je MS^2 fragmentacionim jonima na m/z 251, 241, 225, 201, 181, 151, 149 i 117^[118,121]. Hispidulin je identifikovan na osnovu $[M-H]^-$ na m/z 299,0553 i MS^2 fragmentom na m/z 284 koji nastaje gubitkom CH_3 grupe^[127]. Acacetin je jedino pronađen u semenima standardne sorte „Maria Gracia” i daje fragmente koji odgovaraju literaturnim podacima^[121]. U negativnom modu, hrizin daje fragmentne jone koji nastaju gubitkom CO_2 (na m/z 209), C_2O_3 (na m/z 181), $2 \times CO_2$ (na m/z 165) i koji su u saglasnosti sa fragmentima hrizin standarda, a njegov metilovan derivat daje fragment na m/z 268 kada $[M-H]^-$ jon izgubi CH_3 grupu^[81,126].

Poređenjem MS spektra i t_R podataka uzoraka i odgovarajućih standarda, omogućena je identifikacija tri flavanona: naringenina (**42**), hesperetina (**44**) i pinocembrina (**45**). Osim njih, dva flavanona su identifikovana poređenjem sa podacima iz literature. Jedinjenje **43** sa $[M-H]^-$ jonom na m/z 287,0549 i MS^2 fragmentom na m/z 151 je identifikovano kao eriodiktiol u saglasnosti sa literaturom^[117]. Falavanon pinostrobin (**46**) je pronađen samo u sorti „Maria Gracia” i njegov fragmentacioni put uključuje jone na m/z 254 ($[M-H-CH_3]^-$), 251 ($[M-H-H_2O]^-$), 236 ($254-H_2O$), 226 ($254-CO$) i 165 koji je karakterističan proizvod RDA fragmentacije^[81,123].

4.3.1.3. Identifikacija fenolnih glikozida

Prirodne fenolne kiseline, flavonoidi i njihovi derivati najčešće se u biljkama nalaze u obliku glikozida, povezani sa mono- ili polisaharidom. U formi *O*-glikozida ili ređe *C*-glikozida, fenolna jedinjenja su vezana za različite ugljene hidrate kao što su glukoza,

galaktoza, glukuronska kiselina, arabinoza, ramnoza, rutinoza, ksiloza i dr. Šećerna komponenta može biti povezana sa aglikonom preko jedne ili više fenolnih grupa i predstavlja značajan deo koji utiče na biološku dostupnost fenolnih fitohemikalija^[118,135]. Nažalost, UHPLC-LTQ OrbiTrap MS tehnika može da razlikuje šećere po molekulskoj formuli npr. pentoze od heksoza, ali ne može da razlikuje bez odgovarajućeg standarda individualne šećere sa istom molekulskom formulom npr. glukozu i galaktozu.

Ispitivanjem masenih spektara uzoraka semena breskve, dvadeset jedan glikozid fenolnih kiselina i flavonoida je detektovan (Tabela 8). Pronađeni su glikozidi različitih derivata hidroksibenzoevih kiselina (**47-52**, **54**, **55**, **64**, **66**). Od glikozida flavanona pronađeni su glikozidi naringenina (**56**, **61** i **67**), eriodiktiola (**57**), hesperetina (**62**) i likviritigenina (**65**). U uzorcima semena breskve pronađeni su i glikozidi flavonola kvercetina (**58**) i dihidrohalkona floretina (**63**). Zajednička karakteristika svih ovih glikozida je da usled MS fragmentacije daju molekulski jon odgovarajućeg fenolnog aglikona ili šećernog dela kao glavni jon fragmentacije. Dva glikozida izoramnetina (**59** i **60**), takođe su detektovana u semenima nekih genotipova breskve. Izoramnetin rutinozid (**59**) identifikovan je samo u standardnim sortama „Royal Glory” (uzorak 4) i „Rich Lady” (uzorak 6) sa glavnim MS² fragmentom na m/z 315 koji nastaje gubitkom ramnozila glukozida (-308 Da)^[49,131]. Jedinjenje **60** je izoramnetin-heksozid potvrđeno sa $[M-H]^-$ na m/z 477,1026 i fragmentima koji su saglasni sa literaturom^[121]. Vanillin diheksozid (**66**) koji daje dva glavna MS² jona na m/z 313 ($[M-H]^- - \text{heksozid}^-$) i na m/z 151 ($[M-H]^- - 2 \times \text{heksozid}^-$) pronađen je jedino u sorti „Springbelle” (uzorak 1) i koji je takođe identifikovan u semenima šljive^[122].

4.3.1.4. Identifikacija ostalih fenolnih i organskih jedinjenja

Dva fenolna aldehida i dva kumarina su fenolna jedinjenja koja ne pripadaju do sada navedenim klasama fenola a prisutna su u semenima nekih genotipova breskve (Tabela 8). Prema Frolov-u i saradnicima^[116], aldehidi (**68** i **71**) nastaju usled degradacije hidroksicinamata alkalnim rastvorom i kiseonikom. Ovu pojavu treba uzeti u obzir u cilju ocenjivanja stabilnosti analita i poboljšanja skladištenja uzoraka. Kumarin skopoletin (**69**) je identifikovan samo u genotipu vinogradarske breskve II/19 (uzorak 20) sa $[M-H]^-$ na m/z 191,0347 i gubitkom CH₃ grupe (m/z 176)^[133]. Aeskuletin (**70**) je derivat kumarina pronađen u nekoliko genotipova obećavajućih hibrida i vinogradarske breskve. Ovo jedinjenje formira fragmente uzastopnim gubitkom H₂O (na m/z 159), CO (na m/z 149), CO₂ (na m/z 133), 2×CO (na m/z 121) i zajedničkim gubitkom CO i CO₂ (na m/z 105)^[120].

Kvalitativnom analizom masenih spektara uzoraka semena breskve, UHPLC LTQ OrbiTrap MS tehnika omogućila je i identifikaciju pet organskih jedinjenja koji nemaju fenolnu strukturu. Pronađene su četiri organske kiseline - kininska (**72**), jabučna (**73**), limunska (**74**), abscisinska (**76**) i jedan derivat limunske kiseline (**75**). Njihov MS spektar je u saglasnosti sa literaturnim podacima^[51,123,130]. Organske kiseline sa nižom molekulskom masom imaju bitnu ulogu u voću kao hemijski marker zrelosti i bakterijske aktivnosti. Takođe, imaju pozitivan efekat na senzorna svojstva ploda i na njihovu stabilnost tokom skladištenja^[136].

4.3.2. Kvantitativna analiza fenolnih jedinjenja u uzorcima semena breskve

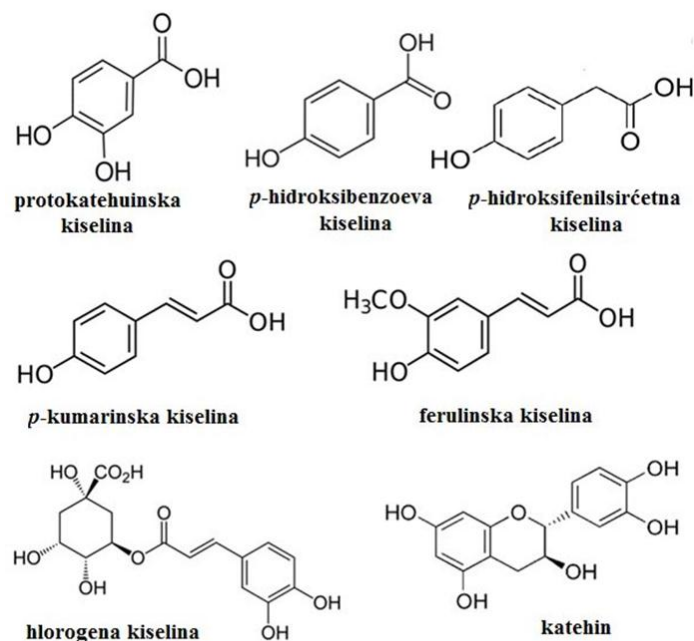
Od ukupno četrnaest dostupnih standarda, koncentracije kvercetina, galangina, pinobanksina, hrizina, naringenina, hesperetina i pinocembrina bile su ispod granice kvantifikacije. Od fenolnih jedinjenja u semenima breskve najviše su zastupljene fenolne kiseline (protokatehuinska - ProA, *p*-hidroksibenzoeva – *p*-HbA, *p*-hidroksifenilsirćetna – *p*-HpaA, hlorogena - ChA, *p*-kumarinska – *p*-CoA i ferulinska kiselina - FerA) i katehin - Cat (Tabela 9, Slika 18). Sadržaj kvantifikovanih fenolnih jedinjenja za pojedinačne, ispitivane sorte i genotipove breskve prikazani su u Prilogu 3. Dobijeni rezultati fenolnog sastava i sadržaja u semenima breskve se razlikuju od prethodno objavljenih rezultata od strane Wu-a i saradnika^[6]. Prema Wu-u^[6], ditiotreitol, rutin, procijanidin B2, kofeinska i hidroksicinaminska kiselina su glavna jedinjenja fenolnog profila ulja i ostatka semena breskve. Takođe, prema istraživanju Nowicka i saradnika^[5], seme breskve od fenolnih jedinjenja kao najzastupljenija jedinjenja sadrže polimerne procijanidine (flavan-3-olna grupa fenola). Primećeno je da semena ranijih sorti zrenja imaju veći sadržaj polimernih procijanidina nego pozne sorte. Razlog nastanka razlika mogu biti vremenski uslovi u procesu sazrevanja. Dodatno, sadržaj procijanidina se smanjuje što je zreliji plod^[5]. Posle procijanidina, odnosno flavan-3-ola, najviše ima hidroksicinaminskih kiselina od kojih je najzastupljenija ChA, zatim flavonola i flavona i njihovih glikozida^[5]. Ovakve razlike se mogu objasniti različitim sortama koje su proučavane i klimatskim uslovima pod kojima su te sorte gajene.

Tabela 9. Rezultati deskriptivne statistike sadržaja fenolnih jedinjenja (mg/kg) u semenu breskve.

	ProA (I)	<i>p</i> -HbA (II)	<i>p</i> -HpaA (III)	ChA (IV)	<i>p</i> -CoA (V)	FerA (VI)	Cat (VII)
Standardne sorte							
Sr vred.	3,64	14,25	7,73	4,79	3,57	8,93	18,51
Medijana	3,49	11,32	6,44	2,72	2,79	5,56	13,54
St dev.	1,28	10,38	3,98	6,56	2,29	8,19	14,98
Min	1,51	1,38	1,96	0,48	0,97	2,29	0,60
Maks	5,36	38,13	14,12	23,73	9,10	29,44	44,09
Perspektivni hibridi							
Sr vred.	2,54	10,19	3,57	1,09	0,95	2,80	2,94
Medijana	2,24	8,70	3,68	0,76	0,92	2,95	2,21
St dev.	0,92	4,94	1,37	0,76	0,27	0,67	2,44
Min	1,81	4,75	1,15	0,40	0,63	1,93	0,77
Maks	4,30	19,00	5,04	2,50	1,27	3,81	7,38
Genotipovi vinogradarske breskve							
Sr vred.	2,77	10,44	4,38	4,39	1,04	4,63	10,56
Medijana	2,90	9,55	4,67	3,60	0,97	4,82	7,21
St dev.	0,39	6,20	1,40	2,78	0,32	1,54	11,67
Min	2,06	2,33	1,48	0,59	0,67	2,05	2,14
Maks	3,21	19,64	6,19	9,86	1,63	6,95	38,21
Rane sorte							
Sr vred.	3,62	15,34	9,04	5,96	4,17	11,08	22,52
Medijana	3,78	12,98	9,77	3,35	3,94	7,77	15,98
St dev.	1,22	10,96	3,78	7,39	2,40	8,73	15,55
Min	1,51	1,38	2,85	1,43	1,27	3,24	1,58
Maks	4,84	38,13	14,12	23,73	9,10	29,44	44,09
Kasne sorte							
Sr vred.	2,84	10,51	4,07	2,75	1,18	3,73	7,39
Medijana	2,71	8,71	4,47	2,50	0,97	3,20	4,15
St dev.	0,91	6,11	1,45	2,57	0,57	1,44	8,88
Min	1,81	2,33	1,15	0,40	0,63	1,93	0,60
Maks	5,36	22,91	6,19	9,86	2,79	6,95	38,21

ProA – Protokatehuinska kiselina; *p*-HbA - *p*-Hidroksibenzojeva kiselina; *p*-HpaA - *p*-Hidroksifenilsirćetna kiselina; ChA – Hlorogena kiselina; *p*-CoA - *p*-Kumarinska kiselina; FerA – Ferulinska kiselina; Cat – Katehin

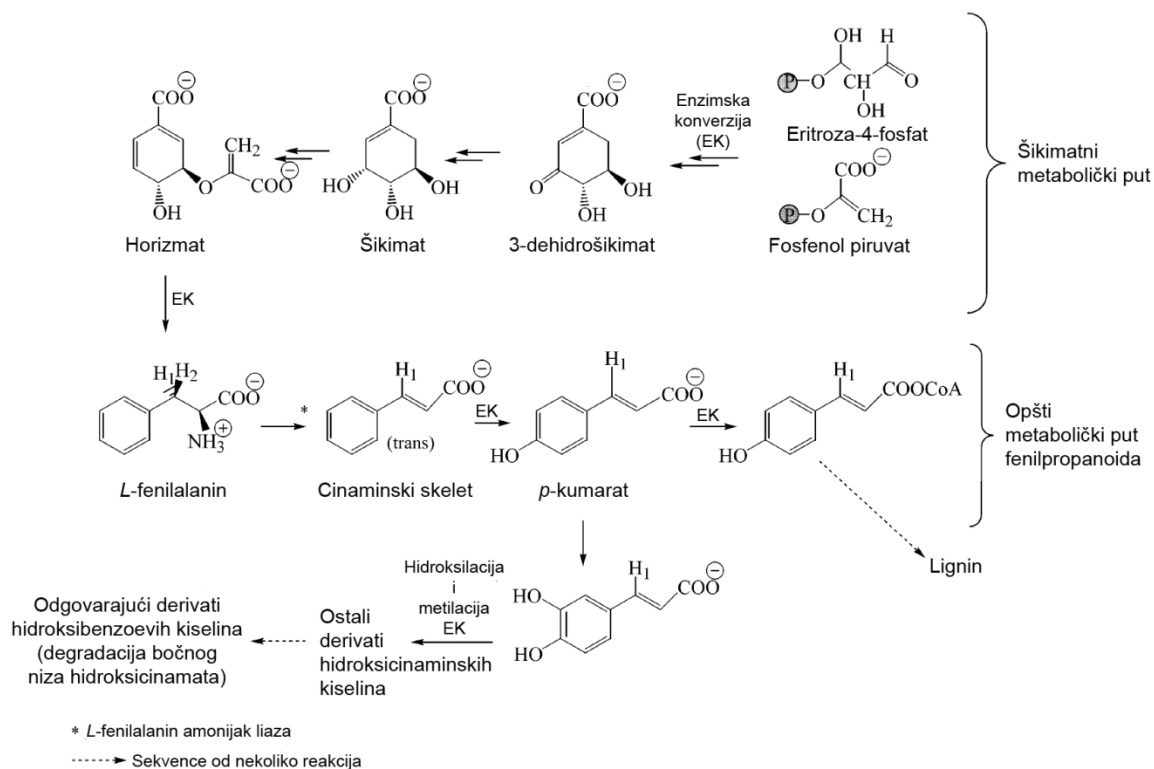
Standardne sorte imaju viši sadržaj svih kvantifikovanih fenolnih jedinjenja u odnosu na perspektivne hibride i genotipove vinogradarske breskve (Tabela 9). U proseku, standardne sorte su imale 6,2 puta veći nivo Cat, 4,4 puta više ChA i 3,75 puta više *p*-kumarinske kiseline (*p*-CoA) nego perspektivni hibridi. Sličan odnos je primećen i kada su ispitivane sorte/genotipovi podeljeni u dve grupe, gde su rane sorte u proseku imale 3,5 puta veći nivo *p*-CoA, 3 puta veći nivo Cat i 2,9 puta veći nivo FerA u odnosu na sorte kasnijeg zrenja. Ovo je očekivana pojava jer povećana količina fenola u nekim biljnim tkivima može biti uobičajen odgovor prilagođavanja biljaka pri stresnoj situaciji^[137]. Plodovi sorti koje ranije sazrevaju rastu u manje povoljnim uslovima pa se fotosintetička proizvodnja preusmerava na sekundarni metabolizam^[138].



Slika 18. Hemijske strukture fenolnih jedinjenja kvantifikovanih u semenu breskve.

U ranijim istraživanjima, Cat, ChA i ProA su takođe kvantifikovani u ostalim delovima ploda breskve^[22,139]. Pokožica i mezokarp ploda breskve sadrže veću količinu pomenutih fenolnih jedinjenja, osim ProA koja je u bliskim vrednostima u sva tri dela ploda.

Fenolne kiseline (i benzoeve i cinaminske kiseline) u biljkama se sintetišu iz aromatične amino kiseline L-fenilalanina, koja se proizvodi preko horizmatnog intermedijera, krajnjeg produkta šikimatnog metaboličkog puta u biljkama (Slika 19). Dalja konverzija L-fenilalanina do različitih hidroksicinaminskih kiselina obuhvata tri koraka poznata i po nazivu „Opšti metabolizam fenilpropanoida”^[140]. Prvi korak u fenilpropanoid metaboličkom putu je stereo-specifična deaminacija (gubitak amino grupe) fenilalanina pri čemu nastaje trans-dvostruka veza u cinaminskoj skeletnoj strukturi. Hidroksilacija aromatičnog prstena na poziciji četiri stvara *p*-kumarat koji preko enzimske konverzije formira aktivan oblik estra (*Coenzyme A ester* – CoA estar). U ostalim koracima, nakon formiranja *p*-kumarata i pre reakcije CoA ligaze, uključuju se dodatna hidroksilacija aromatičnog prstena i reakcija metilacije pri čemu nastaju drugi derivati (kofeat, ferulat i sinapat). Derivati benzoeve kiseline imaju dva načina nastanka: glavni način je degradacija bočnog lanca (gubitak acetata) odgovarajućeg derivata hidroksicinaminske kiseline, a drugi način je alternativni put koji uključuje niz enzimskih reakcija pretvaranja 3-dehidroksišikimata u različite derivate benzoeve kiseline^[140].



Slika 19. Šema biosinteze derivata hidroksibenzojeve i hidroksicinaminske kiseline^[140]

Iako nije mnogo ispitana uloga fenolnih kiselina u biljkama, većinom ih povezuju sa različitim funkcijama kao što su unos hranljivih supstanci, sinteza proteina, aktivnost enzima, fotosinteza i gradivne komponente. Derivati benzojeve i cinaminske kiseline postoje gotovo u svim namirnicama (voće, povrće, žitarice) i lokalizovani su u svim biljnim delovima – seme, list, koren, stablo. U količini i lokaciji postoje varijabilnost tokom raznih faza sazrevanja biljke. Način gajenja, temperatura i drugi faktori sredine utiču na sadržaj fenolnih kiselina u biljkama. U namirnicama, fenolne kiseline imaju važnu ulogu u senzornim svojstvima (ukus, boja, miris, tvrdoća), nutritivnim i antioksidativnim karakteristikama. Dodatno, prehrambena industrija je ispitala da sadržaj i sastav fenolnih kiselina imaju uticaj na sazrevanje ploda, prevenciju enzimskog propadanja i konzerviranje hrane (najviše zahvaljujući antioksidativnoj aktivnosti)^[140].

Čolić i saradnici^[112] su prikazali da postoji visoka varijabilnost među genotipovima badema, gde je svaki imao karakterističan fenolni profil iako su gajeni pod istim agroekološkim uslovima. U semenu badema prevladava Cat, praćen ChA, naringeninom,

rutinom, apigeninom i astragalinom. Sadržaj fenolnih jedinjenja u bademu, koji su pronađeni i u semenu breskve, bili su: ProA 0,32-1,20 mg/kg, *p*-HbA 0,19-0,69 mg/kg, ChA 0,98-21,03 mg/kg, *p*-CoA 0,14-0,72 mg/kg, FerA 0,25-2,81 mg/kg i Cat 2,67-80,75 mg/kg. Razlike u sadržaju nekih fenolnih komponenti su verovatno posledica genetske različitosti, uslova životne sredine i razlika u metodama kvantifikacije^[112]. Poređenjem količine fenola primećeno je da je u semenu badema kvantifikovano više fenolnih jedinjenja a seme breskve ima veći sadržaj ProA, *p*-HbA, *p*-CoA i FerA.

U sirovom semenu kajsije dominantna fenolna jedinjenja isto su fenolne kiseline i derivati kao što su galna kiselina, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, 1,2-dihidroksibenzen, siringinska kiselina, kofeinska kiselina, *p*-CoA (15,3 – 54,1 mg/kg), FerA (103,4 – 142,1 mg/kg) a od flavonoida Cat (135,7 – 253,8 mg/kg), rutin, kvercetin, apigenin-7-glukozid, keferol, naringenin, izoramnetin^[115]. Kvantifikovana fenolna jedinjenja iz semena kajsije od strane *Chen* i saradnika^[104] su kofeinska kiselina, epigalokatehin galat, ChA (16-349 mg/kg), *p*-CoA (14,18 mg/kg), FerA (0,43-2,22 mg/kg), siringinska kiselina, sinapinska kiselina i kvercetin^[104]. Semena kajsije imaju više kvantifikovanih jedinjenja i veći sadržaj ChA, *p*-CoA, FerA i Cat nego u semenu breskve.

Tabela 10. Parametri statističkih testova razlikovanja genotipova breskve posmatranjem fenolnih jedinjenja kvantifikovanih u semenu breskve.

	Kruskal-Wallis test		Mann-Whitney U test	
	P	Z vrednost*	P	Z vrednost*
ProA	0,0750	-	0,1104	Prihvata
<i>p</i>-HbA	0,6814	-	0,2380	Prihvata
<i>p</i>-HpaA	0,0223	S(P)	0,0011	Odbacuje
ChA	0,0368	P(S,V)	0,1244	Prihvata
<i>p</i>-CoA	0,0009	S(P,V)	0,0001	Odbacuje
FerA	0,0100	S(P)	0,0005	Odbacuje
Cat	0,0217	S(P)	0,0031	Odbacuje

*Genotipovi sa statistički značajnom razlikom između medijana označeni su zagradama; S-Standardne sorte, P- Perspektivni hibridi, V-Vinogradarske breskve

Posmatranjem sadržaja kvantifikovanih fenolnih jedinjenja, *Kruskal-Wallis*-ovim testom (Tabela 10), procenjeno je da do statistički značajnih razlika između standardnih sorti i perspektivnih hibrida dovode sva fenolna jedinjenja osim sadržaja ProA i *p*-HbA. Dodatno, genotipovi vinogradarske breskve se razlikuju od perspektivnih hibrida prema

sadržaju ChA, a od standardnih sorti po sadržaju *p*-CoA. Na osnovu *Mann-Whitney* U testa (Tabela 10) procenjeno je da su sadržaj *p*-HpaA, *p*-CoA, FerA i Cat varijable koje dovode do statistički značajnog razdvajanja dve grupe po vremenu zrenja ploda.

Protokatehuinska kiselina je jedna od glavnih metabolita (zajedno sa *p*-HbA i *p*-HpaA) složenih polifenola (antocijana i procijanidina), prisutna je u većini voća i povrća i ima potencijal u prevenciji nekih bolesti i očuvanju zdravlja. Ova jednostavna fenolna kiselina se dobro apsorbuje kod životinja i ljudi pri čemu pokazuje različite biološke aktivnosti. Značajno smanjuje pojavu infarkta miokarda, kardiomiocitnu apoptozu, agregaciju trombocita, ometa razvoj patogena. Mnoga istraživanja su pokazala da ProA ima pozitivne efekte na terapiju bolesti ishemije srca, malignih oboljenja, neurodegenerativnih i inflamatornih bolesti^[141].

Galna, vanilinska, *p*-HbA i FerA su fenolne kiseline često prisutne u biljkama za koje se pokazalo da deluju kao prirodni antimikrobitici. Fenolna kiselina *p*-HbA deluje kao fiziološki ligand za MarR (*Multiple antibiotic resistance Regulator*) transkripcione DNK proteine bakterija, pri čemu se kao mali fenolni molekul veže i inhibira njihovu aktivnost. Pokazalo se da benzoeve kiseline i njihovi derivati pasivnom difuzijom prolaze kroz ćelijsku membranu i uzrokuju unutrašnje zakišeljavanje citoplazme što dovodi do poremećaja membranskih potencijala, denaturacije vitalnih proteina, oštećenje membrana i curenje jona iz bakterija^[142].

Opisana kao moćni antioksidans, ChA se može naći u uobičajenoj hrani i piću, kao i u biljnim preparatima koji se tradicionalno koriste u kineskoj, evropskoj i drugim popularnim medicinama novog sveta. Pored antioksidativne sposobnosti, igra ključnu ulogu u regulaciji signalnih mehanizama kao i u smanjenju proinflamatornih medijatora u ljudskom telu odgovornih za nekoliko farmakoloških aktivnosti – antidijabetična, antilipidemijska, neuroprotektivna, protiv starenja ćelija, kao analgetik i antipiretik^[143]. Različite porodice biljaka sadrže ChA u većim koncentracijama u različitim tkivima, uključujući i razne namirnice koje promovisu zdravlje kao što su povrće, grožđe, jabuke, kruške, citrusi, pića (zeleni čaj, kafa i vino)^[143]. Povećano stvaranje u biljkama može se povezati sa efektom stresa uzrokovanog ranama na listovima, uticajem UV zračenja pri čemu ove supstance mogu delovati kao mehanizam odbrane ili kao ključni prekursori za sintezu lignina, suberina i drugih polifenolnih barijera^[143]. Dodatno, ChA je jedna od najzastupljenijih i najbitnijih fenolnih kiselina koje su kvantifikovane u plodovima i lišću vrsta iz roda *Prunus*^[104].

U ljudskom organizmu, FerA i *p*-CoA pokazuju antimutagene i antitumorske efekte. Mogu posredovati u prevenciji tumora debelog creva, inhibiraju proliferaciju ćelija tumora. U literaturi je opisano da FerA modifikuje proliferaciju i apoptozu intestinalnih epitelih ćelija čime se povećava zaštita od karcinogeneze^[144]. Kroz estarske i etarske veze intenzivno je uključena u umrežavanje polisaharida i lignina u ćelijski zid biljaka i na taj način sprečava svarljivost zida i štiti polisaharide od mikrobiološke enzimske hidrolize. Kao i FerA, *p*-CoA je uključena u izgradnju biljnog ćelijskog zida kovalentnim vezivanjem u lignin ali retko povezana sa polisaharidima^[145]. Centralni je intermedijer biosinteze mnogih biljnih fenola i prisutna je u mnogim vrstama voća i povrća^[146]. Dodatno je ispitana kao jedini izvor ugljenika za rast nekih vrsta gljivica i kvasaca, a kod ljudi pokazuje hemoprotektivne i antioksidativne efekte. Istraživanja mikrobnih transformacija prikazala su da prilikom metabolizma *p*-CoA, u zavisnosti koji ih mikroorganizmi razlažu, kao produkti nastaju 4-vinilfenol, *p*-HbA, kofeinska kiselina, ProA i drugi neidentifikovani metaboliti.^[146]

Flavan-3-oli (u koje spada i Cat) imaju potencijalne pozitivne efekte na ljudsko zdravlje, imaju blagotvorno dejstvo na zdravlje delujući kao antioksidansna, antitumorna, antimikrobna, antivirusna i neuro-zaštitna sredstva. Poznato je da pozitivno utiču na kardiovaskularni sistem i to na krvni pritisak, vaskularnu i trombocitnu funkciju, lipide plazme i lipidnu peroksidaciju kod ljudi. Tamna čokolada, zeleni čaj i vino su bogati izvori fenol-3-ola i u plodovima utiču na različita organoleptička svojstva kao što su opor ukus, gorčina, kiselost ili slatkoća^[147].

4.3.3. *Multivarijantna analiza semena breskve na osnovu fenolnog profila*

U cilju pronalaženja faktora koji su u stanju da okarakterišu semena iz različitih germplazmi breskve i sa različitim poreklom i vremenom zrenja na osnovu vrednovanja njihovog fenolnog profila, izvršena je nelinearna (kategorijska) analiza glavnih komponenata (NLPCA). Ova alternativna metoda primenjena je sa ciljem da se kombinuju identifikovana i kvantifikovana fenolna jedinjenja. Sadržaj fenolnih jedinjenja (kvantifikovani fenoli) posmatrani su kao numeričke varijable, a ukupni broj (76) identifikovanih fenola kao nazivne varijable (1 – prisutno, 0 – nije prisutno).

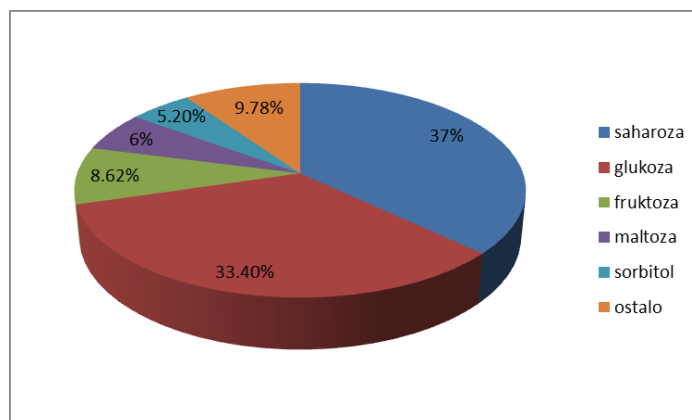
Rezultati CATPCA analize fenolnog profila semena breskve prikazani su na Slici 20. U skladu sa identifikovanim i kvantifikovanim fenolnim jedinjenjima, dve glavne

osnovu razlike u načinu gajenja, korišćenjem fitohemijskih, senzornih i numeričkih podataka, ali izražene u procentima.

4.4. Šećerni profil semena breskve

Identifikacija i kvantifikacija dvadeset saharida iz semena 25 sorti/genotipova breskve omogućene su korišćenjem anjon-izmenjivačkog hromatografskog sistema (poglavlje 3.3.5.) koji je relativno brz (oko 30 min potrebno za analizu) sa dobrom rezolucijom i razdvajanjem svih saharida. Određen šećerni profil uključuje: pet monosaharida, sedam disaharida, četiri trisaharida, po jedan tetra-, penta-, heksa- i heptasaharid i dodatno tri alditola. Sadržaj šećera za pojedinačne, ispitivane sorte i genotipove breskve prikazani su u Prilogu 4., a u Tabeli 11 prikazani su parametri deskriptivne statistike tri grupe podeljene po poreklu i dve grupe podeljene po vremenu zrenja ploda breskve.

Prosečni šećerni sastav semena breskve sastoji se od oko 37% saharoze (Sah), 33,4% glukoze (Glu), 8,62% fruktoze (Fru), 6% maltoze (Malt), 5,2% sorbitola (Sor) i 9,78% ostalih saharida (Slika 21). Ovakav rezultat je očekivan s obzirom da su Sah, Glu i Fru najbitniji šećeri koji daju energiju potrebnu za rast, posebno tokom klijavosti semena^[149,150]. Sa druge strane, Sor je glavni translokator ugljenika u plodu breskve. Po rezultatu *Brooks* i saradnika koji tvrde da je sadržaj Sor u plodu breskve oko 10%, očekivano je da će u semenu breskve biti više ovog šećernog alkohola^[151].



Slika 21. Prosečni udeo šećera u ukupnom šećernom sastavu semena breskve

U toku dana fotosintezom se višak ugljenika skladišti kao skrob u hloroplastima lišća. Noću, lako razgradiv skrob se transportuje preko amilolitičkog puta u obliku rastvorljivih šećera kao što su Malt i Glu, neophodni za sintezu saharoze, za normalan proces disanja i rasta biljke^[152]. Glukoza, maltoza i izomaltoza su glavni proizvodi degradacije skroba u

hloroplastima tokom noći. Iako je Sah glavni produkt razlaganja skroba, dejstvom specifičnih enzima u citosolu značajno se stvara i izvozi veća količina Malt.^[153]

Biljke iz familije Rosaceae koriste Sor za transport šećera umesto Sah koju koriste mnoge druge biljke. Sorbitol je glavni ugljeni hidrat sintetisan u listu i transportovan u plod jabuke. Kao izvor ugljenika, Sor igra ključnu ulogu u vegetaciji i rastu koštičavog voća, utiče na kvalitet ploda kao što su ravnoteža između šećera i kiselina i akumulacija skroba. Uključen je u odgovor biljke na abiotički stres kao što je osmotski stres. Za sintezu sorbitola ključni enzim je sorbitol-6-fosfat dehidrogenaza koji glukoza-6-fosfat prevodi u sorbitol-6-fosfat, ovaj enzim je lokalizovan u citosolu i hloroplastima ćelija lista jabuke.^[154]

Šećeri i šećerni alkoholi koji spadaju u manje prisutne saharide u semenu breskve su: arabinoza (Ara), gentiobioza (Gen), turanoza (Tur), izomaltotrioza (Izomaltotri), maltotrioza (Maltotri), melezitioza (Mel), maltotetraoza (Maltotetr), maltopentaoza (Maltopen), maltoheksaoza (Maltohek), maltoheptaoza (Maltohep), panoza (Pan), ramnoza (Ram), riboza (Rib), trehaloza (Tre), galaktitol (Gal) i manitol (Man). Sadržaj izomaltoze, melibioze i rafinoze bili su ispod granice detekcije.

Saharoza, glukoza i fruktoza su takođe dominantni šećeri u bademu i *Prunus mahaleb* semenu^[155], dok prema *Femenia* i saradnicima^[105] glavni šećeri u gorkom i slatkom semenu kajsije su Ara i Glu. Rezultati ovog rada (Tabela 11, Prilog 4) u saglasnosti su sa rezultatima dobijenim od strane *Balta*^[156] i *Yada*^[157] koji su odredili da je sadržaj Sah u semenu badema između 1,6-2,6 g/100 g semena. Sa druge strane, *Balta* i saradnici^[156] su kvantifikovali veći sadržaj Glu i u gorkom i u slatkom bademu. Svi ovi podaci sugerišu da sastav šećera zavisi od sorte/genotipa^[155,156]. Pored toga, na sastav slobodnih šećera najviše utiču klimatski uslovi (uglavnom padavine) kao i agro- i pomo-tehnika (navodnjavanje, đubrenje, vreme berbe i uslovi skladištenja)^[156].

Kod semena svih proučavanih sorti/genotipova breskve (Prilog 4) odnos Sah, Glu i Fru je 3,8:3:1. Razlika između sadržaja Glu i Fru ukazuje na to da se ovi redukujući šećeri prirodno nalaze u semenu breskve a ne da su nastali visokom aktivnošću invertaze (hidroliza Sah u Glu i Fru) čiji bi sadržaj bio sličan ili čak jednak. Sadržaj Glu u semenu većine sorti/genotipova breskve je dosta visok i sličan je sadržaju Sah. Ova pojava je najverovatnije posledica primarnih uloga Glu gde deluje kao izvor ugljenika i energije, kao signalni molekul za aktiviranje gena uključenih u metabolizam Sah, disanju, biosintezi ćelijskog zida, skroba, uticaj na gene koji reaguju na strehalozu ili su uključeni u rast biljke^[158].

Parametri deskriptivne statistike sadržaja saharida u semenima standardnih sorti, perspektivnih hibrida i genotipova vinogradarske breskve prikazani su u Tabeli 11. Sve tri

grupe sorti imaju iste šećerne komponente, ali u različitim odnosima. Opseg variranja za skoro sve ispitivane šećere u grupi standardnih sorti bio je dosta širok u odnosu na opseg vrednosti perspektivnih hibrida i lokalnih genotipova vinogradarske breskve. Ovo je verovatno posledica velike raznolikosti standardnih sorti koje potiču iz različitih oplemenjivačkih programa i sa potpuno drugačijim pedigreeom. Suprotno standardnim sortama, perspektivni hibridi imaju istog roditelja (*Flaminia*) a ostale autohtone sorte pripadaju vinogradarskoj breskvi, pa je variranje Sah i Glu jako malo.

Takođe, lokalni genotipovi vinogradarske breskve imaju veći sadržaj Fru, Gen sa Tur, Malt, Izomaltotri, Maltotri, Maltopen, Pan, Sah i Sor nego što je pronađeno u standardnim sortama. Slični rezultati su dobijeni i poređenjem vrednosti šećernih komponenti regionalnih sorti koje su veće nego vrednosti standardnih sorti za uzorke badema^[156]. Međutim, najviše prosečne vrednosti za Sah, Fru i Malt među proučavanim genotipovima imaju perspektivni hibridi. Ovi rezultati pokazuju da se najverovatnije javlja aditivni efekat pri čemu nastali genotipovi imaju veći sadržaj šećera od roditelja. Ovu vrstu transgresivnog izdvajanja je primetio *Brooks* sa saradnicima^[151] kod četiri posađene populacije breskve gde su nove sorte imale veći procenat svakog individualnog šećera od bilo koje sorte roditelja.

Rezultati iz ove disertacije prikazuju da svaka grupa podeljena po poreklu ima jedinstven odnos Sah:Glu:Fru koji je za standardne sorte iznosio 4,7:5,2:1, za perspektivne hibride 2,7:1,8:1 i genotipove vinogradarske breskve 4,4:3:1.

U Tabeli 11. dodatno su prikazani parametri deskriptivne statistike sadržaja ugljenih hidrata u semenima breskve grupisane po vremenu zrenja ploda. Sorte čiji plod ranije sazreva imaju niži sadržaj šećera od genotipova kod kojih plod kasnije sazreva. Kasne sorte imaju približno četiri puta veći nivo Fru, tri puta više Sah i čak jedanaest puta veći nivo Malt u odnosu na sorte ranijeg sazrevanja. Ovo zapažanje je najverovatnije posledica dosta kraćeg perioda vegetacije ranih sorti. Bez obzira što su šećeri potrebni za razvoj embriona i za deponovanje jedinjenja neophodnih za klijanje, rane sorte nisu imale dovoljno vremena za sintezu šećera tokom sazrevanja semena. *Kazantzis* i saradnici^[155] su imali isto zapažanje poređenjem ranih i poznih sorti badema. Sadržaj Sah je u svim ranim sortama bio manji nego u sortama kasnijeg vremena zrenja^[155]. Relativno niski nivo rezervne hrane ima za posledicu lošu održivost embriona koštičavog voća ranijeg sazrevanja^[159]. Takođe, neke sorte koje su izučavane u ovom radu kao što su „Summerset” i većina perspektivnih hibrida FSM1, FSM2, FA2, FA5 i FHST4 sazrevaju sredinom septembra kada se akumulacija ugljenih hidrata u semenima može da se javi kao odgovor na niže temperature na početku jeseni. Odnos Sah:Glu:Fru za sorte ranog sazrevanja iznosio je 4,6:8,6:1 a za pozne sorte 3,7:2,4:1.

Tabela 11. Rezultati deskriptivne statistike sadržaja šećera (mg/kg) u semenu breskve

	Ara	Fru	Glu	Ram	Rib	Gen+ Tur	Malt	Sah	Tre	Izomaltotri	Malto- tri	Mel	Pan	Malto- tetr	Malto- pen	Malto- hek	Malto- hep	Gal	Man	Sor
Standardne sorte																				
Sr. vred.	0,089	0,963	5,045	0,018	1,091	0,032	0,569	4,554	0,244	0,028	0,009	0,113	0,067	0,021	0,017	0,018	0,024	0,075	0,065	0,440
Medijana	0,040	0,382	3,986	0,014	0,185	0,017	0,023	1,975	0,091	0,020	0,009	0,074	0,082	0,008	0,016	0,006	0,009	0,058	0,012	0,053
St. dev.	0,121	1,433	4,245	0,019	2,273	0,039	1,050	5,438	0,299	0,028	0,005	0,112	0,056	0,024	0,010	0,036	0,030	0,090	0,111	0,751
Min	0,003	0,034	0,417	0,001	0,009	0,002	0,004	0,421	0,001	0,0001	0,002	0,003	0,001	0,004	0,002	0,0004	0,0003	0,0001	0,0003	0,003
Maks	0,383	4,526	12,714	0,073	7,100	0,131	3,238	16,236	0,852	0,098	0,019	0,370	0,184	0,077	0,030	0,125	0,084	0,322	0,352	2,306
Perspektivni hibridi																				
Sr. vred.	0,013	3,070	5,468	0,013	0,138	0,190	2,923	8,294	0,007	0,174	0,040	0,017	0,138	0,063	0,043	0,006	0,030	0,104	0,042	1,169
Medijana	0,005	2,523	5,993	0,007	0,079	0,164	2,293	6,559	0,007	0,111	0,022	0,009	0,110	0,004	0,054	0,005	0,011	0,045	0,037	1,255
St. dev.	0,017	2,767	2,769	0,018	0,132	0,165	2,405	4,539	0,004	0,179	0,041	0,021	0,120	0,095	0,034	0,004	0,048	0,160	0,034	0,165
Min	0,003	0,598	1,185	0,002	0,057	0,005	0,757	3,935	0,002	0,032	0,005	0,001	0,002	0,002	0,001	0,003	0,003	0,010	0,003	0,936
Maks	0,045	8,355	9,187	0,048	0,395	0,458	6,942	14,852	0,013	0,526	0,099	0,056	0,357	0,213	0,085	0,013	0,125	0,426	0,085	1,321
Genotipovi vinogradarske breskve																				
Sr. vred.	0,006	1,646	5,009	0,003	0,055	0,089	1,034	7,299	0,078	0,066	0,048	0,048	0,097	0,026	0,041	0,039	0,010	0,009	0,023	1,506
Medijana	0,006	1,037	4,666	0,002	0,037	0,014	0,392	7,575	0,014	0,046	0,033	0,024	0,109	0,013	0,022	0,027	0,007	0,008	0,009	1,025
St. dev.	0,005	1,539	2,363	0,003	0,051	0,145	1,061	1,602	0,115	0,068	0,044	0,057	0,089	0,033	0,040	0,044	0,011	0,007	0,033	0,847
Min	0,001	0,186	2,058	0,001	0,002	0,003	0,210	3,696	0,003	0,003	0,008	0,001	0,001	0,0004	0,002	0,0005	0,003	0,0005	0,002	0,876
Maks	0,016	4,273	8,750	0,010	0,157	0,365	2,764	9,133	0,273	0,199	0,135	0,159	0,252	0,101	0,099	0,110	0,036	0,021	0,098	2,999
Rane sorte																				
Sr. vred.	0,106	0,557	4,798	0,021	1,494	0,036	0,158	2,567	0,229	0,023	0,010	0,072	0,081	0,015	0,019	0,008	0,026	0,087	0,044	0,171
Medijana	0,038	0,337	4,217	0,015	0,220	0,017	0,023	1,761	0,146	0,019	0,010	0,073	0,086	0,008	0,016	0,004	0,009	0,063	0,012	0,049
St. dev.	0,139	0,869	3,748	0,022	2,588	0,043	0,343	2,419	0,241	0,017	0,005	0,023	0,056	0,016	0,010	0,009	0,035	0,098	0,064	0,366
Min	0,004	0,034	0,490	0,004	0,009	0,005	0,010	1,071	0,056	0,003	0,002	0,028	0,002	0,005	0,002	0,0004	0,0003	0,005	0,004	0,003
Maks	0,383	2,675	10,853	0,073	7,100	0,131	1,003	8,363	0,777	0,052	0,019	0,098	0,184	0,053	0,030	0,025	0,084	0,322	0,190	1,075
Kasne sorte																				
Sr. vred.	0,015	2,219	5,294	0,008	0,078	0,113	1,812	8,100	0,089	0,100	0,038	0,068	0,100	0,041	0,037	0,029	0,018	0,049	0,047	1,325
Medijana	0,005	1,443	5,558	0,003	0,057	0,018	1,329	7,365	0,010	0,066	0,026	0,009	0,095	0,012	0,023	0,010	0,008	0,010	0,013	1,133
St. dev.	0,022	2,126	3,151	0,012	0,094	0,148	1,843	4,142	0,214	0,125	0,040	0,108	0,098	0,061	0,034	0,042	0,030	0,103	0,085	0,718
Min	0,001	0,037	0,417	0,001	0,002	0,002	0,004	0,421	0,001	0,0001	0,003	0,001	0,001	0,0004	0,001	0,0005	0,001	0,0001	0,003	0,030
Maks	0,074	8,355	12,714	0,048	0,395	0,458	6,942	16,236	0,852	0,526	0,135	0,370	0,357	0,213	0,099	0,125	0,125	0,426	0,352	2,999

Ara-Arabinoza; Fru-Fruktoza; Glu-Gluukoza; Ram-Ramnoza; Rib-Riboza; Gen+Tur-Gentiobioza+Turanoza; Malt-Maltoza; Sah-Saharoza; Tre-Trehaloza; Izomaltotri - Izomaltotriozna; Maltoetri - Maltotriozna; Mel-Melezitioza; Pan-Panoza; Maltotetr-Maltotetraozna; Maltoopen-Maltopenatoza; Maltohek-Maltoheksaoza; Maltohep-Maltoheptaaoza; Gal-Galaktilol; Man-Manitol; Sor-Sorbitol.

Za statističku procenu sličnosti i razlika između rezultata, *Kruskal-Wallis*-ov test je korišćen za svaku varijablu, uzimajući odgovarajuće sorte kao jedinstveni faktor. Rezultati su prikazani u Tabeli 12. Nekoliko šećera kao što su Ara, Fru, Ram, Gen sa Tur, Malt, Tre, Izomaltotri, Maltotri, Mel, Gal i Sor identifikovani su kao parametri koji odvajaju uzorke semena standardnih sorti od perspektivnih hibrida ili genotipova vinogradarske breskve ili oba u isto vreme. Rezultati *Kruskal-Wallis*-ovog testa pokazuju da se standardne sorte razlikuju od genotipova perspektivnih hibrida i vinogradarske breskve prema sadržaju saharida.

Razlika između uzoraka razdvojenih prema vremenu sazrevanja procenjena je *Mann-Whitney*-vim U testom (Tabela 12). Sadržaj Ara, Fru, Ram, Rib, Malt, Sah, Tre, Izomaltotri i Sor uslovljavaju razdvajanje ove dve posmatrane grupe sorti.

Tabela 12. Rezultati *Kruskal-Wallis*-ovog testa razlikovanja genotipova breskve po poreklu i *Mann-Whitney*-vog U testa razlikovanja po vremenu zrenja ploda breskve posmatranjem sadržaja šećera.

	Kruskal-Wallis test		Mann-Whitney U test	
	P	Z vrednost*	P	Z vrednost*
Ara	0,0096	S(V)	0,0104	Odbacuje
Fru	0,0381	S(P)	0,0062	Odbacuje
Glu	0,8779	-	0,6834	Prihvata
Ram	0,0118	S(V)	0,0062	Odbacuje
Rib	0,2400	-	0,0122	Odbacuje
Gen + Tur	0,1090	S(P)	0,6001	Prihvata
Malt	0,0104	S(P)	0,0020	Odbacuje
Sah	0,0909	-	0,0043	Odbacuje
Tre	0,0338	S(P)	0,0052	Odbacuje
Izomaltotri	0,0124	S(P)	0,0231	Odbacuje
Maltotri	0,0085	S(V)	0,0795	Prihvata
Mel	0,0290	S(P)	0,0709	Prihvata
Pan	0,2799	-	0,6834	Prihvata
Maltotetr	0,7243	-	0,8612	Prihvata
Maltopen	0,5109	-	0,4845	Prihvata
Maltohek	0,2740	-	0,1708	Prihvata
Maltohep	0,7004	-	0,8157	Prihvata
Gal	0,0193	V(S,P)	0,0545	Prihvata
Man	0,4366	-	0,6833	Prihvata
Sor	0,0202	S(V,P)	0,0014	Odbacuje

*Genotipovi sa statistički značajnom razlikom između medijana označeni su zagradama. S-Standardne sorte, P-Perspektivni hibridi, V-Vinogradarske breskve

Pošto neki ugljeni hidrati ulaze u strukturu ćelijske membrane, povećana koncentracija pojedinačnih šećera (Ara, Ram, Rib) pokazuje da pri stresu dolazi do njihovog oslobađanja iz lanaca molekula ćelijskog zida. Otpornost na stres je složen fenomen i zavisi od nasleđenih genetskih karakteristika i uslova okoline, što su veće rezerve šećera to je veća mogućnost zaštite i tolerancije^[160]. Šećeri koji se akumuliraju kao odgovor na stres mogu funkcionisati kao osmoliti za održavanje turgor ćelija i imaju sposobnost da štite membranu i proteine od stresa.^[161]

Arabinani, polisaharidi uglavnom sačinjeni od Ara, se nalaze u pektinskoj mreži mnogih ćelijskih zidova biljaka i važni su za održavanje fleksibilnosti semena tokom sušenja i klijanja. Ćelijski zidovi biljaka koje mogu preživeti isušivanje su bogate Ara. Arabinani se akumuliraju u razvijenim i zrelim embrionima ali nestaju tokom klijanja i razvoja sadnice što ukazuje da ovi polimeri mogu pomoći u ranom rastu klijanaca^[162].

Riboza i 2-deoksi-*D*-riboza su sastojci nukleinskih kiselina zbog čega su jako bitni u biohemiji. Značajna je njihova interakcija sa vodom jer utiču na stabilnost native konfiguracije nukleinskih kiselina. Riboza je obično u obliku furanoznih anomera dominantan u ribonukleozidima, ribonukleinskoj kiselini (RNK), adenzin trifosfat ribozi (ATP-riboza) i drugim biohemijskim derivatima^[163]. Aktivno je uključena u strukturu i u mnoge važne biološke funkcije kao što su molekularno prepoznavanje, proteolitička obrada i katalitička aktivnost RNK. U mnogim katalizovanim procesima određena hidroksilna grupa Rib je uključena u stvaranje vodonične veze sa supstratom^[164].

Poboljšani metabolizam Tre može pozitivno regulisati toleranciju na abiotički stres i neophodan je za pravilno sazrevanje embriona kao i za vegetativni razvoj i cvetanje. Trehaloza je neredukujući disaharid koji se akumulira u velikim količinama u nekim biljkama otpornim na isušivanje i može da deluje kao osmolit i stabilizator proteina i membrane^[161]. Postoje tri moguća mehanizma koja objašnjavaju kako Tre štiti biomolekule: zamenjuje vodu, formiranje staklaste strukture i hemijska stabilnost^[165]. Teorija zamene vode sugerise da su sve biološke makromolekule normalno stabilizovane vodom koja formira vodonične veze (hidratacioni sloj). Tokom dehidratacije ili zamrzavanja, Tre zamenjuje molekul vode u sloju hidratacije. Glikozidna veza između dva molekula *D*-glukoze pokazuje veliku stabilnost u poređenju sa drugim disaharidima i omogućava interakciju Tre sa drugim nepravilnim,

polarnim grupama različitih makromolekula. Trehaloza je jedini šećer koji formira amorfne, nehigroskopne kristale i stabilan je na širokom opsegu temperatura čak i kada je kristal u bezvodnom stanju. Ovo omogućava Tre da formira staklastu formu. Biomolekuli mogu ostati dugo u tom staklastom stanju pri čemu im je dozvoljeno da se vrate u prvobitnu strukturu posle rehidratacije^[165]. Ovaj disaharid ima mnoge biotehnoške primene zahvaljujući svojim fizičko-hemijskim osobinama. Koristi se u očuvanju hrane, aktivnosti enzima, stabilizator i zaštitnik kompleksnih molekula (npr. antitela), čuvar ćelija, tkiva i organa, u kozmetičkoj i potencijalan u medicinskoj upotrebi (prevencija osteoporoze)^[165].

Ramnoza se sintetiše sličnim enzimskim putem u bakterijama, biljkama i gljivicama. Prisutna je u mnogim glikoproteinima i pektinskim polisaharidima, zbog čega je važna za normalan rast i razvoj biljaka^[166]. Melezitoza je trisaharid kojim je najbogatiji med od medljike (ili med medne rose) i pokazuje prebiotičke aktivnosti jer povećava populaciju dobrih bakterija i laktobacila u ljudskim crevima.^[167]

Degradacija skroba u listu karakteriše uključivanje nekoliko enzima od kojih su mnogi predstavljeni izo-formama. Enzim β -amilaza kao glavne proizvode početnih koraka razgradnje skroba stvara Malt, Maltotri i duže Malto-oligosaharide (MOS). Od dužih MOS (kao što su Maltotetr, Maltopen, Maltohek i Maltohep) mogu nastati Malt i Maltotri ponovnim dejstvom β -amilaze a drugim enzimima Maltotri daje Glu i Malt^[168].

Izomalto-oligosaharidi (IMO) se takođe dobijaju iz skroba i predstavljaju smešu oligosaharida sa stepenom polimerizacije od 2 do 10. Pokazuju nizak glikemijski indeks i klasifikuju se kao prebiotici. Najnovija istraživanja ukazuju na svestranu funkcionalnost ovih polisaharida kao sastojaka hrane, farmaceutskih i kozmetičkih preparata jer imaju visoku rastvorljivost i nisku viskoznost. U IMO stepena polimerizacije veći od 2 predstavljaju šećeri Pan, izopanoza, Izomaltotri, nigerozna, kojibioza, IMO dugih lanaca, ciklo-IMO i dr. Sve ove različite strukture mogu se potencijalno primeniti za različite vrste namirnica u zavisnosti od potrebe za rastvorljivošću. Neke IMO mogu da odlažu aktivnost amilolitičkih enzima, pri čemu može doći do modulacije hormona creva i poboljšavaju rad bakterija debelog creva.^[169]

U biljkama se alditoli (šećerni alkoholi) mogu koristiti za zaštitu ćelija od osmotskog stresa, pri kojem se u velikoj meri akumuliraju unutar ćelije u cilju kompenzacije smanjenja vodenog potencijala ćelije. Njihove hidroksilne grupe efikasno zamenjuju vodu u vodoničnim vezama u slučaju ograničene dostupnosti vode i štite enzime i membrane. Prisustvo poliola u nekoliko članova iste porodice može se koristiti kao taksonomska osobina^[170]. Sorbitol, manitol i galaktitol (još poznati kao polioli) su najčešći šećerni alkoholi pronađeni u vakuolama biljaka^[171]. Manitol je najrasprostanjeniji heksitol, prisutan je u više od 100 vrsta viših biljaka i kao i Sor primarni je produkt fotosinteze u lišću^[170]. Galaktitol je polialkoholni šećer sa šest C atoma i oksidacijom daje aldozu galaktozu i Gal metabolizam je najbolje okarakterisan u bakteriji *E. coli* u kojoj je odgovoran za mnoge metaboličke funkcije^[171]. U biljkama, Gal se sintetiše iz UDP-glukoze i inozitola i predstavlja osnovni supstrat za seriju rafinoza šećera^[170].

4.4.1. Indeks slatkoće

Slatkoća semena ploda breskve, kao i mezokarp ploda, dosta zavisi od šećernog sastava. Slad je rangirana na sledeći način: Fru > Sah > Glu > Sor^[172]. Prema tome, rezultati dobijeni za sadržaj Glu, Fru i Sah u semenima breskve su korišćeni za dobijanje indeksa slatkoće (jed. 10) koji dalje pokazuje razlike između individualnih sorti/genotipova breskve. U Tabeli 13. su sumirane vrednosti IS koji se kreće od 1,07 („Sun Prins”) do 45,04 („Bolero”) koji se uglavnom odnose na sadržaj Fru. Kao što je i očekivano nakon analize rezultata pojedinih šećera, standardne sorte imaju niži prosečni IS (13,40) nego lokalni genotipovi (IS = 18,64), dok perspektivni hibridi imaju najviši indeks (IS = 23,72). Pored toga, može se uočiti i velika varijabilnost standardnih sorti međusobno u poređenju sa lokalnim genotipovima i perspektivnim hibridima.

Tabela 13. Indeks slatkoće (IS vrednosti) uzoraka semena breskve

Standardne sorte		Perspektivni hibridi		Genotipovi vinogradarske breskve	
Broj uzorka	IS vred.	Broj uzorka	IS vred.	Broj uzorka	IS vred.
1	14,09	12	31,98	18	19,12
2	9,48	13	26,49	19	13,00
3	8,26	14	30,96	20	20,50
4	6,86	15	15,97	21	16,08
5	28,30	16	19,55	22	15,45
6	3,64	17	17,39	23	23,09
7	3,72			24	24,64
8	2,01			25	17,30
9	45,04				
10	1,07				
11	25,02				

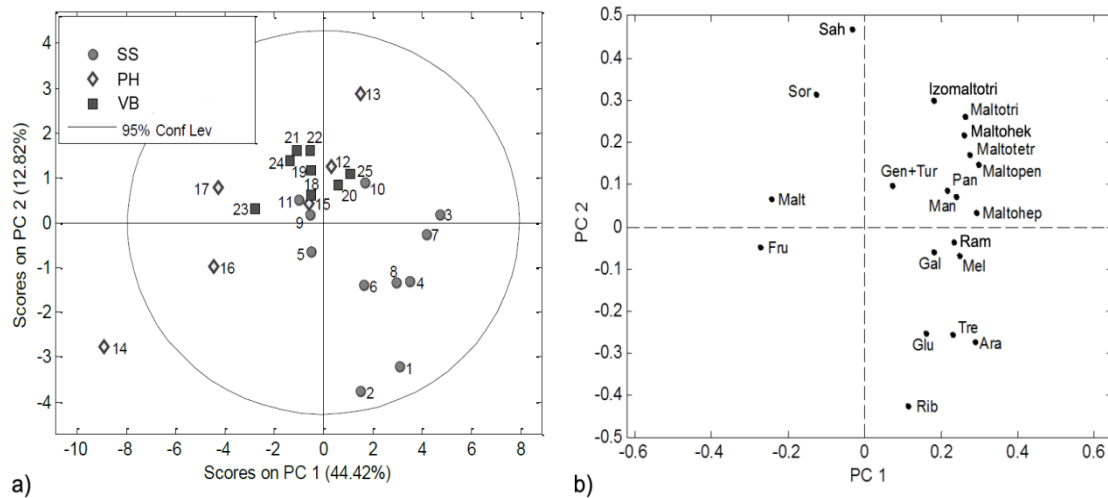
4.4.2. Multivarijantna analiza semena breskve na osnovu šećernog profila

Multivarijantne statističke analize, PCA i PLS-DA, korišćene su da uspostave kriterijumi za klasifikaciju i razlikovanje sorti/genotipova iz različitih germplazmi breskve. Metoda PCA se ne koristi kao klasifikacioni model već nagoveštava koji parametri dovode do različitosti među trenutnim uzorcima i proverava da li postoje logični podaci koji se mogu objasniti. Sa druge strane, PLS-DA služi kao metod klasifikacije. Projektovana varijabla kod ove tehnike je kategorična tj. označava klase ili kategorije uzoraka. Dobijeni matematički model se može koristiti za buduću klasifikaciju nepoznatih uzoraka.

Metoda PCA je rezultovala trokomponentnim modelom koji objašnjava 68,36% od ukupne varijanse. Prva glavna komponenta, PC1, čini 44,42% od ukupne varijanse podataka, dok druga, PC2, objašnjava dodatnih 12,82%, a treća glavna komponenta, PC3, čini 11,12%. Međusobne projekcije faktora skorova i njihovih koeficijenata latentnih varijabli za prve dve glavne komponente prikazane su na Slici 22.

Uzimajući u obzir PC1 i PC2 vrednosti skorova (Slika 22a) dobijene su tri različite grupe uzoraka koje su u vezi sa tri različita porekla breskve. Postoji nekoliko preklapanja između uzoraka perspektivnih hibrida (PH) i genotipova vinogradarske breskve (VB). Naime, uzorci perspektivnih hibrida su široko rasprostranjeni preko levog dela grafika skorova. Uprkos tome, većina uzoraka standardnih sorti (SS) dobro

su odvojeni i razlikuju se od ostale dve grupe sorti. Grafik skorova takođe prikazuje postojanje dve odvojene grupe prema vremenu zrenja ploda breskve. Sorte sa ranim sazrevanjem (uzorci 1-8) formiraju grupu u donjem desnom uglu grafika. Grafik doprinosa pojedinih varijabli (Slika 22b) pokazuje da su najuticajniji parametri koji odvajaju rane standardne sorte od ostalih sorti/genotipova: Ara, Gal, Glu, Mel, Ram, Rib i Tre, dok genotipove perspektivnih hibrida, vinogradarske breskve zajedno sa tri kasne standardne sorte („Bolero”, „San Prins” i „Summerset”) su određene sadržajem Izomaltotri, Malt, Maltotri, Maltohek, Sah, Sor i Fru.



Slika 22. Grupisanje genotipova breskve prema sadržaju šećera u semenima

Sorte različitog porekla i sa druge strane sa različitim vremenom sazrevanja su takođe modelovane korišćenjem PLS-DA. Broj latentnih varijabli zasnovan je na minimalnoj vrednosti RMSECV-a (korena srednjeg kvadratnog odstupanja koji je rezultat unakrsne validacije). Klasifikacija i validacija rezultata su izražena kao R^2_{cal} (koeficijent determinacije koji se odnosi na rezultate iz kalibracionog seta), R^2_{CV} (koeficijent determinacije koji je rezultat unakrsne validacije), RMSEC (koren srednjeg kvadratnog odstupanja koji se odnosi na rezultate iz kalibracionog seta) i RMSECV vrednosti. Rezultati modelovanja sumirani su u Tabeli 14. Dobijeni modeli za standardne sorte i perspektivne hibride daju zadovoljavajući statistički kvalitet, suprotno, model za genotipove vinogradarske breskve ne može da se iskoristi za tačnu klasifikaciju. Stoga, model za genotipove vinogradarske breskve može samo kvalitativno ukazati na varijable koje igraju važnu ulogu u klasifikaciji genotipova

breskve prema sadržaju šećera. Dodatno, modeli dobijeni za grupaciju sorti prema vremenu zrenja dobrog su statističkog kvaliteta koji ukazuje na mogućnost njihove dalje prediktivne sposobnosti.

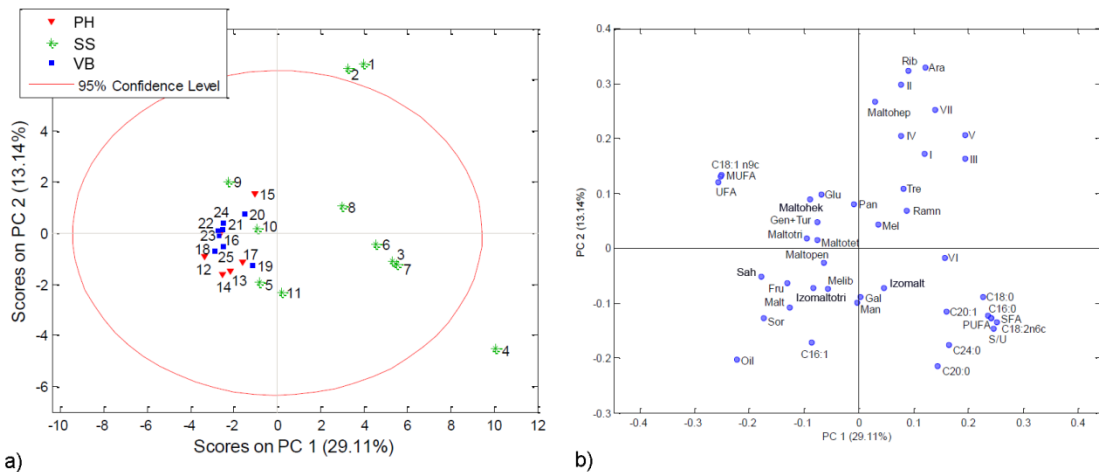
Tabela 14. Statistički parametri PLS-DA modela

Zavisne varijable	Statistički parametri modela				Varijable uključene u model
	R^2_{cal}	R^2_{cv}	RMSEC	RMSECV	
Standardne sorte	0,884	0,508	0,168	0,393	Maltoti (-), Sor (-), Mel (+), Ara (+), Izomaltoti (-), Tre(+), Gen sa Tur (-), Malt (-), Maltopen (-), Sah (-), Fru (-)
Perspektivni hibridi	0,760	0,508	0,209	0,300	Malt (+), Sor (-), Izomaltoti (+), Gal (+), Maltoti (+), Maltohek (-), Ram (+), Gen sa Tur (+)
Genotipovi vinogradarske breskve	0,737	0,357	0,239	0,473	Gal (-), Malt (-), Maltoti (+), Maltohek (+), Izomaltoti (-), Sor (+), Ram (-)
Rane sorte	0,882	0,789	0,160	0,217	Ara (+), Gal (+), Sah (-), Tre (+), Sor (-), Rib (+), Mel (+), Glu (+)
Kasne sorte	0,882	0,789	0,160	0,217	Ara (-), Gal (-), Sah (+), Tre (-), Sor (+), Rib (-), Mel (-), Glu (-)

Najvažniji faktori (Tabela 14), koji dovode do razlikovanja sorti/genotipova po poreklu, odnosno šećeri koji su uključeni u model, za perspektivne hibride i genotipove vinogradarske breskve su isti samo različitog uticaja (prikazani različitim znakom „+” ili „-”). Od njih najvažniji su Malt, Sor, Izomaltoti, Maltohek i Gal. Suprotno od ove dve grupe po poreklu, standardne sorte su određene različitim skupom šećera – Maltoti, Sor, Mel, Ara, Tre, Gen sa Tur, Maltopen, Sah, Fru. Za klasifikaciju sorti/genotipova po vremenu zrenja uticaj na model su imali sadržaj Ara, Gal, Sah, Tre, Sor, Rib, Mel i Glu.

4.5. Rezultati PCA analize dobijeni na osnovu svih ispitivanih fitohemikalija

U cilju boljeg karakterisanja semena 25 različitih sorti/genotipova breskve na osnovu dobijenih rezultata svih analiziranih fitohemikalija (masnih kiselina, kvantifikovanih fenola i šećernog profila), primenjena je klasična PCA metoda.



Slika 23. PCA analiza na osnovu svih ispitivanih fitohemikalija semena breskve

Dobijeni PCA model sastoji se od jedanaest glavnih komponenta kojima se objašnjava 86,85% od ukupnog varijabiliteta među podacima. Prva glavna komponenta obuhvata 29,11% varijabiliteta, varijansa objašnjena pomoću druge komponente iznosi 13,14% dok svaka dalja glavna komponenta objašnjava manje od 10% varijabiliteta. Nije neobično da model objašnjava mali procenat varijabiliteta sa većim brojem glavnih komponenta u slučaju kada se posmatraju podaci prirodnih uzoraka (veliko razlikovanje među uzorcima) i dodatno veliki broj razmatranih varijabli (nezavisne promenljive).

Na osnovu grafika skorova (Slika 23a) može se uočiti razdvajanje uzoraka u dve grupe. Većina standardnih sorti (SS) su široko rasprostranjene duž desne strane grafika i pozitivne strane PC1 ose, izuzeci su uzorci 5, 9 i 10 („Redhaven”, „Bolero” i „San Prins”). Sa druge strane, javlja se preklapanje među uzorcima perspektivnih hibrida (PH) i genotipova vinogradarske breskve (VB), koji su locirani sa leve strane PC1 ose. Ovakvo razdvajanje uzoraka može se objasniti i klasifikacijom uzoraka po vremenu sazrevanja ploda breskve. Naime, sorte ranijeg sazrevanja ploda (uzorci 1-8, sa

izuzetkom uzorka 5) formiraju grupaciju sa desne strane grafika, dok sorte i genotipovi koji kasnije sazrevaju javljaju se u grupi sa leve strane grafika skorova.

Na odvajanje prve grupe (rane sorte) najveći uticaj su imale (Slika 23b) Rib, Ara, svi kvantifikovani fenoli (I-VII), linolna kiselina (C18:2n6c) i sve zasićene masne kiseline, dok na odvajanje druge grupe najviše su uticale UFA i MUFA, % ulja u semenu breskve (Oil), Sor, Sah, Fru, Malt. Uzorak 5 („Redhaven”) se izdvaja zbog nižeg sadržaja fenola, zasićenih masnih kiselina i većeg % ulja, Sor, Sah, Fru, Malt i Glu.

Uzoraci 1, 2 i 4 („Springbelle”, „Redcap”, „Royal Glory”) su uzorci u PCA analizi koji predstavljaju odstupajuće vrednosti. Razlog odstupanja uzoraka 1 i 2 je što ove dve sorte imaju najveći sadržaj Ara, Rib i fenola, a razlog odstupanja uzorka 4 jer ima najveći sadržaj C16:0 i C18:2 n6c.

5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije izvršena je hemijska i nutritivna karakterizacija semena 25 različitih sorti/genotipova breskve. Na osnovu svih izloženih i prodiskutovanih rezultata mogu se formulisati sledeći zaključci:

- Primena osetljivih, tačnih i preciznih analitičkih, prvenstveno naprednih hromatografskih metoda sa niskim granicama detekcije i kvantifikacije, omogućila je sistemsko ispitivanje hemijskog sastava semena breskve.
- U ovom radu, po prvi put je upotrebljena kombinacija eksperimentalnih podataka dobijenih gasnom, tečno-masenom i jonskom hromatografijom sa različitim metodama multivarijantne, hemometrijske analize u cilju definisanja biološkog porekla breskve. Podaci dobijeni ispitivanjem masnih kiselina, fenolnog i šećernog profila semena breskve mogu biti od značaja za dobijanje vrednih biomarkera autentičnosti sorti/genotipova i mogu doprineti interkultivarnoj/genetičkoj klasifikaciji.
- U okviru ove doktorske disertacije pokazano je da se mogu izdvojiti standardne sorte breskve od perspektivnih hibrida i genotipova autohtone vinogradarske breskve. Sem grupisanja prema poreklu, ovim ispitivanjem prikazano je čak i uspešnije razlikovanje sorti prema periodu sazrevanja ploda breskve. Kao potencijalni biomarkeri koji dovode do razlikovanja uzoraka semena breskve mogu se izdvojiti sadržaj saharoze, fruktoze, maltoze, arabinoze, riboze i sorbitola, zatim kvantifikovana fenolna jedinjenja i razlika u sadržaju masnih kiselina.
- Seme breskve različitog porekla se razlikuju i po morfološkim karakteristikama. Koštica i seme perspektivnih hibrida imaju veće dimenzije i težinu u poređenju sa ostalim ispitivanim sortama i genotipovima. Kada se posmatraju rane i kasne sorte breskve, statistički značajna razlika se javlja kod fizičkih parametara vezanih za seme (dužina i težina semena). Nasuprot tome, za sadržaj vode nije utvrđena statistički značajna razlika između sorti/genotipova, te, prema tome, ovaj parametar nije bitan pokazatelj biološkog porekla breskve.

- Rezultati ove studije potvrđuju da je sastav masnih kiselina semena breskve sličan kao i u semenima drugih predstavnika roda *Prunus*. Ulje semena breskve se razlikuje od ulja semena badema i kajsije jer, za razliku od njih, sadrži lignocerinsku kiselinu. Razlikovanje sorti/genotipova breskve po genetičkom poreklu moguće je na osnovu razlika u sadržaju ulja semena i procentualnom sastavu najzastupljenijih masnih kiselina u ulju semena breskve – oleinske, linolne, palmitinske i stearinske kiseline. S obzirom da je oksidaciona stabilnost ulja veća nego kod nekih komercijalnih uljarica, kikirikija, pistaća, soje i maslinovog ulja i da su ulja semena breskve bogata nezasićenim masnim kiselinama koje blagotvorno deluju na zdravlje ljudi, ulje semena breskve bi moglo da se koristi u pripremi hrane, čime se opravdava dalja obrada semena breskve.
- U okviru ove disertacije u uzorcima semena breskve korišćenjem UHPLC-LTQ OrbiTrap MS/MS tehnike po prvi put je detektovano 76 različitih, organskih jedinjenja a uspešno kvantifikovano sedam fenolnih jedinjenja. U ekstraktima semena breskve dominiraju fenolne kiseline (uglavnom hidroksibenzoeve), estri kininske kiseline, flavanonoli, flavoni, flavanoni i glikozidi. Primjenom tehnikom potvrđeno je i prisustvo četiri organske kiseline i jednog njihovog derivata koji nemaju fenolnu strukturu. Standardne sorte imaju viši sadržaj svih kvantifikovanih fenolnih jedinjenja u odnosu na perspektivne hibride i genotipove vinogradarske breskve.
- Rezultati kvantifikacije pokazuju da seme breskve od fenolnih jedinjenja najviše sadrže katehin i fenolne kiseline (protokatehuinsku, *p*-hidroksibenzoevu, *p*-hidroksifenilsirćetnu, hlorogenu, *p*-kumarinsku i ferulinsku). Procenjeno je da do statistički značajnih razlika između standardnih sorti i perspektivnih hibrida dovode sva fenolna jedinjenja osim sadržaja protokatehuinske i *p*-hidroksibenzoeve kiseline. Dodatno, genotipovi vinogradarske breskve se razlikuju od perspektivnih hibrida prema sadržaju hlorogene kiseline, a od standardnih sorti po sadržaju *p*-kumarinske kiseline. Od fenolnih jedinjenja sadržaj *p*-hidroksifenilsirćetne, *p*-kumarinske, ferulinske kiseline i katehina su varijable koje dovode do statistički značajnog razdvajanja dve grupe po vremenu zrenja ploda. Iako je u semenu badema kvantifikovan veći broj fenolnih

jedinjenja nego u semenu breskve, seme breskve ima veći sadržaj protokatehuinske, *p*-hidroksibenzojeve, *p*-kumarinske i ferulinske kiseline nego seme badema. U odnosu na seme kajsije, seme breskve ima manji sadržaj hlorogene, *p*-kumarinske, ferulinske kiseline i katehina.

- Rezultat CATPCA pokazuje da specifični fenolni profil semena breskve (identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja) može doprineti razlikovanju porekla i različitog perioda zrenja breskve. Prema našim saznanjima, ovo je prvi rezultat uspešne klasifikacije prirodnih uzoraka zasnovanu na hemijskom profilu koji je prikazan kategoričkim varijablama.
- Kao i kod mnogih drugih predstavnika familije Rosaceae, saharoza, glukoza i fruktoza su najvažniji šećeri u semenu breskve. Dodatno, kvantifikovana je i značajna količina maltoze koja je jedan od glavnih produkata razgradnje skroba u hloroplastima i sorbitola koji je glavni translokator ugljenika u vrstama porodice Rosaceae.
- Zahvaljujući sastavu i količini prisutnih šećera koji su određeni, ova disertacija ukazuje na mogućnost šire primene semena breskve. Do sada su istraživanja u ovoj oblasti bila relativno ograničena.
- Rezultati pokazuju da se standardne sorte razlikuju od genotipova perspektivnih hibrida i vinogradarske breskve prema sadržaju saharida, a da sadržaj arabinoze, fruktoze, ramnoze, riboze, maltoze, saharoze, trehaloze, izomaltotrioze i sorbitola uslovljavaju razdvajanje prema vremenu zrenja ploda breskve. Model dobijen PLS-DA za standardne sorte i perspektivne hibride daje zadovoljavajući statistički kvalitet. Suprotno, model za genotipove vinogradarske breskve može samo kvalitativno da ukaže na varijable koje igraju važnu ulogu u klasifikaciji genotipova breskve prema sadržaju šećera. Dodatno, modeli dobijeni za grupaciju sorti prema vremenu zrenja dobrog su statističkog kvaliteta koji ukazuje na mogućnost njihove dalje prediktivne sposobnosti.
- S obzirom da se velika količina semena breskve odbacuje tokom proizvodnje a mogu biti pouzdan, vredan i relativno jeftin izvor korisnih fitohemikalija, ova disertacija pokazuje mogućnost korišćenja semena breskve u cilju ekstrakcije pojedinih bioaktivnih jedinjenja koja bi se dalje koristila kao dodatak ishrani, farmaceutskim i kozmetičkim preparatima.

- Takođe, razlikovanje sorti i genotipova breskve u pogledu sadržaja fitohemikalija može pomoći u boljoj selekciji genotipova u oplemenjivačkim programima kako bi se odabrale i preporučile sorte/genotipovi sa boljim nutritivnim vrednostima.

6. LITERATURA

1. Vásquez-Villanueva R., Marina M. L., García M. C., Revalorization of a peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) byproduct: Extraction and characterization of ACE-inhibitory peptides from peach stones, *Journal of Functional Foods*, 18(part A), (2015), 137–146.
2. Mratinić E., Breskva, Partenon, Beograd (2015), Srbija.
3. Nikolić D., Rakonjac V., Fotirić-Akšić M., Radović A., Karakteristike hibrida breskve iz kombinacije ukrštanja *Flaminia x Hale Tardiva Spadoni*, *Zbornik radova IV savetovanja „Inovacije u voćarstvu“*, Beograd, (2013), 197- 204.
4. Bakić I., Rakonjac V., Čolić S., Fotirić Akšić M., Nikolić D., Radović A., Rahović D., Agro-morphological characterisation and evaluation of a Serbian vineyard peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] germplasm collection, *Scientia Horticulturae*, 225, (2017), 668–675.
5. Nowicka P., Wojdyło A., Content of bioactive compounds in the peach kernels and their antioxidant, anti-hyperglycemic, anti-aging properties, *European Food Research and Technology*, 245(5), (2019), 1123–1136.
6. Wu H., Shi J., Xue S., Kakuda Y., Wang D., Jiang Y., Ye X., Li Y., Subramanian J., Essential oil extracted from peach (*Prunus persica*) kernel and its physicochemical and antioxidant properties, *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), (2011), 2032–2039.
7. Kono R., Okuno Y., Nakamura M., Inada K., Tokuda A., Yamashita M., Hidaka R., Utsunomiya H., Peach (*Prunus persica*) extract inhibits angiotensin II-induced signal transduction in vascular smooth muscle cells, *Food Chemistry*, 139(1-4), (2013), 371–376.
8. Pelentir N., Block J. M., Fritz A. R. M., Reginatto V., Amante E. R., Production and chemical characterization of peach (*Prunus persica*) kernel flour, *Journal of Food Process Engineering*, 34(4), (2011), 1253–1265.
9. Bruening P., Haase I., Matissek R., Fischer M., Marzipan: polymerase chain reaction-driven methods for authenticity control, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, (2011), 11910-11917.
10. Mezzomo N., Mileo B. R., Friedrich M. T., Martínez J., Ferreira S. R. (2010). Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Process yield and extract composition. *Bioresource Technology*, 101(14), (2010), 5622–5632.

11. Republički zavod za statistiku, Revizija vremenskih serija statistike poljoprivrede, 84, 2018. <http://publikacije.stat.gov.rs/G2018/Pdf/G20189084.pdf> (datum pristupa 13.09.2018.).
12. Wills R. B. H., Scriven F. M., Greenfield H., Nutrient composition of stone fruit (*Prunus* spp.) cultivars: Apricot, cherry, nectarine, peach and plum, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34(12), (1983), 1383–1389.
13. Mratinić E., Breskva, Partenon, Beograd (2012), Srbija.
14. Nyam K. L., Tan C. P., Lai O. M., Long K., Che Man Y. B., Physicochemical properties and bioactive compounds of selected seed oils, *LWT - Food Science and Technology*, 42(8), (2009), 1396–1403.
15. Pham T. P., Kaushik R., Parshetti G. K., Mahmood R., Balasubramanian R., Food waste-to-energy conversion technologies: current status and future directions, *Waste Management*, 38, (2015), 399–408.
16. Ravindran R., Jaiswal A. K., Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products, *Trends in Biotechnology*, 34(1), (2016), 58-69.
17. Mirabella N., Castellani V., Sala S., Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review, *Journal of Cleaner Production*, 65, (2014), 28-41.
18. Kiran E. U., Trzcinski A. P., Jern Ng W., Liu Y., Bioconversion of food waste to energy: A review, *Fuel*, 134, (2014), 389–399.
19. Schieber A., Stintzing F. C., Carle R., By-products of plant food processing as a source of functional compounds — recent developments, *Trends in Food Science & Technology*, 12, (2001), 401–413.
20. Đilas S., Čanadanović-Brunet J., Četković G., By-products of fruits processing as a source of phytochemicals, *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 15(4), (2009), 191–202.
21. Janick J., The Origin of Fruits, Fruit Growing, and Fruit Breeding, *Plant Breeding Reviews*, 2(5), (2005), 255-321.
22. Liu H., Cao J., Jiang W., Changes in phenolics and antioxidant property of peach fruit during ripening and responses to 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biology and Technology*, 108, (2015), 111–118.
23. Zhu A., Shen X., The model and mass transfer characteristics of convection drying of peach slices, *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 72, (2014), 345–351.
24. Iordănescu O. A., Alexa E., Radulov I., Costea A., Dobrei A., Dobrei A., Minerals and Amino Acids in Peach (*Prunus persica* L.) Cultivars and Hybrids Belonging to World

- Germoplasm Collection in the Conditions of West Romania, *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 6, (2015), 145-150.
25. Testone G., Condello E., Di Giacomo E., Nicolodi C., Caboni E., Rasori A., Bonghi C., Bruno L., Bitonti M. B., Giannino D., The KNOTTED-like genes of peach (*Prunus persica* L. Batsch) are differentially expressed during drupe growth and the class 1 KNOPE1 contributes to mesocarp development, *Plant Science*, 237, (2015), 69–79.
26. Gullo G., Motisi A., Zappia R., Dattola A., Diamanti J., Mezzetti B., Rootstock and fruit canopy position affect peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] (cv. Rich May) plant productivity and fruit sensorial and nutritional quality, *Food Chemistry*, 153, (2014), 234–242.
27. Romeu J. F., Sánchez M. C., García-Brunton J., Potential productivity evolution of flat peach cultivars (*Prunus persica* var. *platycarpa*) grown in different climatic conditions of southeast of Spain, *Scientia Horticulturae*, 197, (2015), 687–696.
28. Maulión E., Valentini G., Ornella L., Pairoba C. F., Daorden M. E., G. D. L. Cervigni, Study of statistic stability to select high-yielding and stable peach genotypes, *Scientia Horticulturae* 175, (2014), 258–268.
29. Dabbou S., Lussiana C., Maatallah S., Gasco L., Hajlaoui H., Flamini G., Changes in biochemical compounds in flesh and peel from *Prunus persica* fruits grown in Tunisia during two maturation stages, *Plant Physiology and Biochemistry*, 100, (2016), 1-11.
30. Nikolić D., Fotirić-Akšić M., Oplemenjivanje breskve u svetu, *Zbornik radova IV savetovanja „Inovacije u voćarstvu“*, Beograd, (2013), 5-28.
31. Kim H.-R., Kim I.-D., Dhungana S. K., Kim M.-O., Shin D.-H., Comparative assessment of physicochemical properties of unripe peach (*Prunus persica*) and Japanese apricot (*Prunus mume*), *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(2), (2014), 97-103.
32. Drogoudi P. D., Tsiouridis C. G., Effects of cultivar and rootstock on the antioxidant content and physical characters of clingstone peaches, *Scientia Horticulturae*, 115, (2007), 34–39.
33. Gao H., Zhang Z. K., Chai H. K., Cheng N., Yang Y., Wang D. N., Yang T., Cao W., Melatonin treatment delays postharvest senescence and regulates reactive oxygen species metabolism in peach fruit, *Postharvest Biology and Technology*, 118,(2016), 103–110.
34. Ali A. S., Elozeiri A. A., Metabolic Processes During Seed Germination, in *Advances in Seed Biology*, Chapter 8, (2017), 141-166, Ed. Jose C. Jimenez-Lopez, InTechOpen.

35. Ching T. M., Metabolism of germinating seeds, in *Germination Control. Metabolism, and Pathology, Chapter 2*, (1972), 103-218, Ed. T.T. Kozłowski, Elsevier Inc. ISBN 978-0-12-424303-3.
36. Fotirić Akšić M., Tosti T., Sredojević M., Milivojević J., Meland M., Natić M., Comparison of Sugar Profile between Leaves and Fruits of Blueberry and Strawberry Cultivars Grown in Organic and Integrated Production System, *Plants*, 8, (2019), 205.
37. Matthäus B., Özcan M. M., Fatty acids and tocopherol contents of some *Prunus* spp. kernel oils, *Journal of Food Lipids*, 16(2), (2009), 187–199.
38. González-García E., Marina M. L., García M. C., Righetti P. G., Fasoli E., Identification of plum and peach seed proteins by nLC-MS/MS via combinatorial peptide ligand libraries, *Journal of Proteomics*, 148, (2016), 105-112.
39. Kamel B.S., Kakuda Y., Characterization of the seed oil and meal from apricot, cherry, nectarine, peach and plum, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 69(5), (1992), 492-494.
40. Liu H., Cao J., Jiang W., Evaluation and comparison of vitamin C, phenolic compounds, antioxidant properties and metal chelating activity of pulp and peel from selected peach cultivars, *LWT - Food Science and Technology*, 63(2), (2015), 1042–1048.
41. Rahma E. H., Abd El-Aal M. H., Chemical characterization of peach kernel oil and protein: functional properties, in vitro digestibility and amino acids profile of the flour, *Food chemistry*, 28, (1988), 31-43.
42. Sánchez-Vicente Y., Cabañas A., Renuncio J. A. R., Pando C., Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) seed oil using carbon dioxide and ethanol, *Journal of Supercritical Fluids*, 49(2), (2009), 167–173.
43. Liu W., Wang Z.-Z., Qing J.-P., Li H.-J., Xiao W., Classification and quantification analysis of peach kernel from different origins with near-infrared diffuse reflection spectroscopy, *Pharmacognosy magazine*, 10(40), (2014) 441–448.
44. Bernal J., Mendiola J. A., Ibáñez E., Cifuentes A., Advanced analysis of nutraceuticals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55(4), (2011), 758-774.
45. Thomas M. C., Dunn S. R., Altvater J., Dove S. G., Nette G. W., Rapid identification of long-chain polyunsaturated fatty acids in a marine extract by HPLC-MS using data-dependent acquisition, *Analytical Chemistry*, 84(14), (2012), 5976–5983.

46. Yu W.-L., Ansari W., Schoepp N., Hannon M., Mayfield S., Burkart M., Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylglycerol production in microalgae, *Microbial Cell Factories*, 10(91), (2011), 1-11.
47. Salas J. J., Martínez-Force E., Garcés R., Biochemical characterization of a high-palmitoleic acid *Helianthus annuus* mutant, *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, (2004), 373–381.
48. Walley J., Kliebenstein D., Bostock R., Dehesh K., Fatty acids and early detection of pathogens, *Current Opinion in Plant Biology*, 16, (2013), 520–526.
49. Prodanov M., Garrido I., Vacas V., Lebrón-Aguilar R., Dueñas M., Gómez-Cordovés C., Bartolomé B., Ultrafiltration as alternative purification procedure for the characterization of low and high molecular-mass phenolics from almond skins, *Analytica chimica acta*, 609(2), (2008), 241–251.
50. Liu H., Cao J., Jiang W., Evaluation of physiochemical and antioxidant activity changes during fruit on-tree ripening for the potential values of unripe peaches, *Scientia Horticulturae*, 193, (2015), 32-39.
51. Álvarez-Fernández M. A., Hornedo-Ortega R., Cerezo, A. B., Troncoso A. M., García-Parrilla M. C., Determination of Nonanthocyanin Phenolic Compounds Using High-Resolution Mass Spectrometry (UHPLC-Orbitrap-MS/MS) and Impact of Storage Conditions in a Beverage Made from Strawberry by Fermentation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(6), (2016) 1367–1376.
52. Mokrani A., Madani K., Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit, *Separation and Purification Technology*, 162, (2016), 68-76.
53. Cardona F., Andrés-Lacueva C., Tulipani S., Tinahones F., Queipo-Ortuño M. I., Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, (2013), 1415–1422.
54. Noratto G., Martino H. S. D., Simbo S., Byrne D., Mertens-Talcott S. U., Consumption of polyphenol-rich peach and plum juice prevents risk factors for obesity-related metabolic disorders and cardiovascular disease in Zucker rats, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(6), (2015), 633–641.
55. Ignat I., Volf I., Popa V. I., A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food Chemistry*, 126(4), (2011), 1821–1835.

56. He X., Agnihotri G., Liu H.-W., Novel Enzymatic Mechanisms in Carbohydrate Metabolism, *Chemical Reviews*, 100(12), (2000), 4615 – 4661.
57. Font i Forcada C., Gogorcena Y., Moreno M. A., Fruit sugar profile and antioxidants of peach and nectarine cultivars on almond × peach hybrid rootstocks, *Scientia Horticulturae*, 164, (2013), 563-572.
58. Alcobendas R., Mirás-Avalos J. M., Alarcón J. J., Nicolás E., Effects of irrigation and fruit position on size, colour, firmness and sugar contents of fruits in a mid-late maturing peach cultivar, *Scientia Horticulturae* 164 (2013) 340-347.
59. Ashraf C. M., Iqbal S., Ahmed D., Nutritional and physicochemical studies on fruit pulp, seed and shell of indigenous *Prunus persica*, *Journal of Medicinal Plants Research* 5(16), (2011), 3917-3921.
60. Šindelářova M., Šindelář L., Burketová L., Changes in glucose, fructose and saccharose metabolism in tobacco plants infected with potato virus Y, *Biologia Plantarum*, 42(3), (1999), 431-439.
61. Sami F., Hayat S., Effect of glucose on the morpho-physiology, photosynthetic efficiency, antioxidant system, and carbohydrate metabolism in *Brassica juncea*, *Protoplasma*, 256(1), (2019), 213-226.
62. Bermejo-Millo J. C., Guimarães M. R. M., de Luxán-Delgado B., Potes Y., Pérez-Martínez Z., Díaz-Luis A., Caballero B., Solano J. J., Vega-Naredo I., Coto-Montes A., High-Fructose Consumption Impairs the Redox System and Protein Quality Control in the Brain of Syrian Hamsters: Therapeutic Effects of Melatonin, *Molecular Neurobiology*, 55, (2018), 7973 – 7986.
63. Scott P., Lange A. J., Kruger N. J., Photosynthetic carbon metabolism in leaves of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) containing decreased amounts of fructose 2,6-biphosphate, *Planta*, 211, (2000), 864-873.
64. Moghaddam M. R. B., Van den Ende W., Sugars, the clock and transition to flowering, *Frontiers in plant science*, 4, (2013), 22.
65. Yang Z., Liu D., Ji H., Sucrose metabolism in developing oil-rich tubers of *Cyperus esculentus*: comparative transcriptome analysis, *BMC Plant Biology*, 18, (2018), 151.
66. Bolarinwa I. F., Orfila C., Morgan M. R. A., Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially-available in the UK, *Food Chemistry* 152 (2014) 133–139.

67. Barceloux D.G., Cyanogenic Foods (Cassava, Fruit Kernels, and Cycad Seeds), *Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants, and Venomous Animals*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, (2008), 44-53.
68. Miller J., Chromatography concepts and contrasts, *Second Edition*, (2005) John Wiley & Sons Inc, ISBN: 0-471-47207-7.
69. Meyer V. R., Practical High-Performance Liquid Chromatography, *Fourth Edition*, (2004) John Wiley & Sons, Ltd ISBN: 0-470-09377-3 (Hardback) 0-470-09378-1.
70. Milne G. L., Morrow J. D., Measurement of Biological Materials, in *Clinical and Translational Science 1st edition, Chapter 5*, Ed. David Robertson, Gordon Williams, (2009) Elsevier Inc., London, UK.
71. Orčić D., HPLC: Teorija i primena u biohemijskim naukama, PMF, Novi Sad (2016) Srbija.
72. Kaklamanos G., Aprea E., Theodoridis G., Mass Spectrometry, *Chemical Analysis of food: Techniques and applications Chapter 9*, Ed. Yolanda Picó first edition (2012), eBook ISBN: 9780123848635, Academic Press.
73. <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=39268>, datum prisupa 16.01.2019.
74. Fabre N., Rustan I., de Hoffmann E., Quetin-Leclercq J., Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(6), (2001), 707-715.
75. Zubarev R. A., Makarov A., Orbitrap Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 85, (2013), 5288–5296.
76. Blumberg L., Theory of gas chromatography, in *Gas Chromatography, Chapter 2*, Ed. Colin Poole, (2012), DOI: 10.1016/B978-0-12-385540-4.00002-X, Elsevier Inc.
77. Jennings W., Poole C., Milestones in the development of gas chromatography, in *Gas Chromatography, Chapter 1*, Ed. Colin Poole, (2012), DOI: 10.1016/B978-0-12-385540-4.00001-8, Elsevier Inc.
78. Klee M., Detectors, in *Gas Chromatography, Chapter 12*, Ed. Colin Poole, (2012), DOI: 10.1016/B978-0-12-385540-4.00012-2, Elsevier Inc.
79. Lamuela-Raventós R. M., Vallverdú-Queralt A., Jáuregui O., Martínez-Huélamo M., Quifer-Rada P., Improved Characterization of Polyphenols Using Liquid Chromatography, In *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation, Chapter 14*, Ed. Ronald Ross Watson, (2014) Elsevier Inc, London, UK.

80. http://www.wikiwand.com/sr/Te%C4%8Dna_hromatografija_visokih_performansi, datum pristupa 16.01.2019.
81. Ristivojević P., Trifković J., Gašić U., Andrić F., Nedić N., Tešić Ž, Milojković-Opsenica D., Ultrahigh-performance liquid chromatography and mass spectrometry (UHPLC–LTQ/Orbitrap/MS/MS) study of phenolic profile of serbian poplar type propolis, *Phytochemical Analysis*, 26(2), (2015), 127–136.
82. Mudrić S., Gašić U., Dramićanin A., Ćirić I., Milojković-Opsenica D., Popović-Đorđević J., Momirović N., Tešić Ž, The polyphenolics and carbohydrates as indicators of botanical and geographical origin of Serbian autochthonous clones of red spice paprika, *Food Chemistry*, 217, (2017), 705-715.
83. Kontogianni V.G., Novel Techniques Towards the Identification of Different Classes of Polyphenols, In *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation*, Chapter 8, Ed. Ronald Ross Watson, (2014) Elsevier Inc, London, UK.
84. Vukics V., Ringer T., Kery A., Bonn G. K., Guttman A., Analysis of heartsease (*Viola tricolor* L.) flavonoid glycosides by micro-liquid chromatography coupled to multistage mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1206(1), (2008), 11–20.
85. Nesterenko P. N., Paull B, Ion chromatography, In *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*, second edition, Chapter 9, Ed. Fanali S., Haddad P.R., Poole C, Riekkola L., (2017), Elsevier Inc.
86. Huber C. G., Bonn G. K., HPLC of Carbohydrates with Cation- and Anion-Exchange Silica and Resin-Based Stationary Phases, in *Carbohydrate analysis high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis; first edition*, Chapter 4, Edited by Ziad El Rassi (1995), Elsevier Science.
87. Varmuza K., Filzmoser P., Chemoinformatics-chemometrics-statistics, in *Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics*, Chapter 1, (2009) Taylor & Francis Group, LLC.
88. Šegan S., Korelacija strukture i retencije steroidnih tetraoksana primenom tankoslojne hromatografije i multivarijantnih hemometrijskih metoda, *Doktorska disertacija*, Hemijski fakultet, Beograd (2013).
89. Trifković J., Određivanje kvantitativnog odnosa strukture i retencije arilpiperazina primenom tačne hromatografije i multivarijantnih hemometrijskih metoda, *Doktorska disertacija*, Hemijski fakultet, Beograd (2013).
90. Bugner E., Feinberg M., Influence of category creation in categorical data analysis, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 12(1) (1991) 21-28.

91. Gower J. C., Le Roux N. J., Gardner-Lubbe S., Biplots: qualitative data, *WIREs Computational Statistics* 8(2), (2016), 82–111. doi: 10.1002/wics.1377.
92. Chevallier S., Bertrand D., Kohler A., Courcoux P., Application of PLS-DA in multivariate image analysis, *Journal of Chemometrics*, 20(5), (2006), 221–229.
93. Kalivodová A., Hron K., Filzmoser P., Najdekr L., Janečková H., Adam T., PLS-DA for compositional data with application to metabolomics, *Journal of Chemometrics*, 29(1), (2015) 21–28.
94. Ristivojević P., Određivanje hemijskog sastava, antioksidativnih i antimikrobnih svojstava propolisa topola tipa iz različitih regiona Srbije, *Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Beograd* (2014).
95. García-Cañas V., Simó C., Herrero M., Ibáñez E., Cifuentes A., Present and Future Challenges in Food Analysis: Foodomics, *Analytical chemistry* 84, (2012) 10150-10159.
96. Primrose S., Woolfe M., Rollinson S., Food forensics: methods for determining the authenticity of foodstuffs, *Trends in Food Science & Technology*, 21, (2010) 582-590.
97. Borràs E., Ferré J., Boqué R., Mestres M., Aceña L., Busto O., Data fusion methodologies for food and beverage authentication and quality assessment – A review, *Analytica Chimica Acta*, 891 (2015) 1-14.
98. Cuadros-Rodríguez L., Ruiz-Samblás C., Valverde-Som L., Pérez-Castaño E, González-Casado A., Chromatographic fingerprinting: An innovative approach for food `identification` and food authentication – A tutorial, *Analytica Chimica Acta*, 909 (2016) 9-23.
99. Campos M. G., Webby R. F., Markham K. R., Mitchell K. A., da Cunha A. P., Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), (2003), 742–745.
100. Keutgen A., Pawelzik E., Modifications of taste-relevant compounds in strawberry fruit under NaCl salinity, *Food Chemistry*, 105(4), (2007), 1487-1494.
101. Malcom P. J., Holford P., McGlasson W. B., Newman S., Temperature and seed weight affect the germination of peach rootstock seeds and the growth of rootstock seedlings, *Scientia Horticulturae*, 98, (2003), 247–256.
102. Gezer İ., Haciseferoğulları H., Demir F., Some physical properties of Hacıhaliloğlu apricot pit and its kernel, *Journal of Food Engineering*, 56(1), (2003), 49–57.

103. Lipan L., Martín-Palomo M., Sánchez-Rodríguez L., Cano-Lamadrid M., Sendra E., Hernández F., Burló F., Vázquez-Araújo L., Andreu L., Carbonell-Barrachina Á., Almond fruit quality can be improved by means of deficit irrigation strategies, *Agricultural Water Management*, 217, (2019) 236–242.
104. Chen Y., Al-Ghamdi A. A., Elshikh M. S., Shah M. H., Al-Dosary M. A., Abbasi A. M., Phytochemical profiling, antioxidant and HepG2 cancer cells' antiproliferation potential in the kernels of apricot cultivars, *Saudi Journal of Biological Sciences*, (2019) <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.06.013>.
105. Femenia A., Rossello C., Mulet A., Cañellas J., Chemical composition of sweet and bitter apricot kernels, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, (1995), 256–361.
106. Alcobendas R., Mirás-Avalos J., Alacrón J. J., Pedrero F., Nicolás E., Combined effects of irrigation, crop load and fruit position on size, color and firmness of fruits in an extra-early cultivar of peach, *Scientia Horticulturae*, 142, (2012), 128–135.
107. Minas I., Tanou G., Molassiotis A., Environmental and orchard bases of peach fruit quality – review, *Scientia Horticulturae*, 235, (2018), 307–322.
108. Bernardo-Gil G., Oneto C., Antunes P., Rodrigues F. M., Empis J. M., Extraction of lipids from cherry seed oil using supercritical carbon dioxide, *European Food Research and Technology*, 212(2), (2001), 170–174.
109. Górnas P., Rudzińska M., Raczyk M., Mišina I., Segliņa D., Impact of Cultivar on Profile and Concentration of Lipophilic Bioactive Compounds in Kernel Oils Recovered from Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) by-Products, *Plant Foods for Human Nutrition*, 71, (2016), 158 – 164.
110. Kodad O., Socias I Company R., Variability of Oil Content and of Major Fatty Acid Composition in Almond (*Prunus amygdalus* Batsch) and Its Relationship with Kernel Quality, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, (2008), 4096–4101.
111. Kolouchová I., Sigler K., Schreiberova O., Masák J., Řezanka T., New yeast-based approaches in production of palmitoleic acid, *Bioresource Technology*, 192, (2015), 726–734.
112. Čolić S., Fotirić Akšić M., Lazarević K., Zec G., Gašić U., Dabić Zagorac D., Natić M., Fatty acid and phenolic profiles of almond grown in Serbia, *Food Chemistry*, 234, (2017), 455–463.
113. Zhou W., Wang H., Chen L., Cheng W., Tianzhong L., Heterotrophy of filamentous oleaginous microalgae *Tribonema minus* for potential production of lipid and palmitoleic acid, *Bioresource Technology*, 239, (2017), 250–257.

114. Poulos A., Stockham P., Johanson D., Paton B., Beckman K., Singh H., Metabolism of Trideuterated iso-Lignoceric Acid in Rats in Vivo and in Human Fibroblasts in Culture, *Lipids*, 34(9), (1999), 943-949.
115. Al Juhaimi F., Özcan M. M., Ghafoor K., Babiker E., The effect of microwave roasting on bioactive compounds, antioxidant activity and fatty acid composition of apricot kernel and oils, *Food Chemistry*, 243, (2018), 414-419.
116. Frolov A., Henning A., Böttcher C., Tissier A., Strack D., An UPLC-MS/MS Method for the Simultaneous Identification and Quantitation of Cell Wall Phenolics in Brassica napus Seeds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(6), (2013), 1219-1227.
117. Vallverdú-Queralt A., de Alvarenga J. F., Estruch R., Lamuela-Raventós R. M., Bioactive compounds present in the Mediterranean sofrito, *Food Chemistry*, 141(4), (2013), 3365-3372.
118. Plazonić A., Bucar F., Maleš Ž, Mornar A., Nigović B., Kujundžić N., Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry, *Molecules*, 14(7), (2009), 2466-2490.
119. Chen S.-D., Lu Ch.-J., Zhao R.-Z., Identification and Quantitative Characterization of PSORI-CM01, a Chinese Medicine Formula for Psoriasis Therapy, by Liquid Chromatography Coupled with an LTQ Orbitrap Mass Spectrometer, *Molecules*, 20(1), (2015), 1594-1609.
120. Castro C., Mura F., Valenzuela G., Figueroa C., Salinas R., Zuñiga C. M., Torres J. L., Fuguet E., Delporte C., Identification of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis, *Food Research International*, 64, (2014), 873-879.
121. Gu D., Yang Y., Abdulla R., Aisa, H. A., Characterization and identification of chemical compositions in the extract of *Artemisia rupestris* L. by liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 26(1), (2012), 83-100.
122. Khallouki F., Haubner R., Erben G., Ulrich C. M., Owen, R., W., Phytochemical composition and antioxidant capacity of various botanical parts of the fruits of *Prunus x domestica* L. from the Lorraine region of Europe, *Food Chemistry*, 133(3), (2012), 697-706.

123. Kečkeš S., Gašić U., Ćirković Veličković T., Milojković-Opsenica D., Natić M., Tešić, Ž., The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry, *Food Chemistry*, 138(1), (2013), 32–40.
124. Zhao T., He J., Wang X., Ma B., Wang X., Zhang L., Li P., Liu N., Lu J., Zhang X., Rapid detection and characterization of major phenolic compounds in Radix *Actinidia chinensis* Planch by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 98, (2014), 311–320.
125. Vallverdú-Queralt A., Regueiro J., Martínez-Huélamo M., de Alvarenga J. F., Leal L. N., Lamuela-Raventós R. M., A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay, *Food Chemistry*, 154, (2014), 299–307.
126. Falcão S. I., Vilas-Boas M., Estevinho L. M., Barros C., Domingues M. R. M., Cardoso S. M., Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(2), (2010), 887–897.
127. Martins N., Barros L., Santos-Buelga C., Henriques M., Silva S., Ferreira, I. C. F. R., Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L., *Food Chemistry*, 170, (2015), 378–385.
128. Vallverdú-Queralt A., Jáuregui O., Medina-Remón A., Andrés-Lacueva C., Lamuela-Raventós R. M., Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 24(20), (2010), 2986–2992.
129. Aaby K., Ekeberg D., Skrede G., Characterization of Phenolic Compounds in Strawberry (*Fragaria x ananassa*) Fruits by Different HPLC Detectors and Contribution of Individual Compounds to Total Antioxidant Capacity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), (2007), 4395–4406.
130. Spínola V., Pinto J., Castilho P. C., Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD–ESI-MSⁿ and screening for their antioxidant activity, *Food Chemistry*, 173, (2015), 14–30.
131. Barros L., Dueñas M., Ferreira I. C. F. R., Carvalho A. M., Santos-Buelga C., Use of HPLC–DAD–ESI/MS to profile phenolic compounds in edible wild greens from Portugal, *Food Chemistry*, 127(1), (2011), 169–173.

132. Zupan A., Mikulic-Petkovsek M., Cunja V., Stampar F., Veberic R., Comparison of phenolic composition of healthy apple tissues and tissues affected by bitter pit, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(49), (2013), 12066-12071.
133. Sanz M., Cadahía E., Esteruelas E., Muñoz Á. M., de Simón F. B., Hernández T., Estrella, I., Phenolic compounds in chestnut (*Castanea sativa* Mill.) heartwood. Effect of toasting at cooperage, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), (2010), 9631–9640.
134. Rawat M.S.M., Prasad D., Joshi R.K., Pant G., Proanthocyanidins from *Prunus armeniaca* roots, *Phytochemistry* 50, (1999), 321-324.
135. Vrhovsek U., Masuero D., Palmieri L., Mattivi F., Identification and quantification of flavonol glycosides in cultivated blueberry cultivars, *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(1), (2012), 9–16.
136. Sandín-España P., Mateo-Miranda M., López-Goti C., De Cal A., Alonso-Prados J. L., Development of a rapid and direct method for the determination of organic acids in peach fruit using LC–ESI-MS, *Food Chemistry*, 192, (2016), 268–273.
137. Caretto S., Linsalata V., Colella G., Mita G., Lattanzio V., Carbon Fluxes between Primary Metabolism and Phenolic Pathway in Plant Tissues under Stress, *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), (2015), 26378-26394.
138. Pant B.-D., Pant P., Erban A., Huhman D., Kopka J., Scheible W.-R., Identification of primary and secondary metabolites with phosphorus status-dependent abundance in *Arabidopsis*, and of the transcription factor PHR1 as a major regulator of metabolic changes during phosphorus limitation. *Plant, Cell and Environment*, 38(1), (2015) 172–187.
139. Tomás-Barberán F. A., Gil M. I., Cremin P., Waterhouse A. L., Hess-Pierce B., Kader A. A., HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), (2001), 4748–4760.
140. Robbins R., Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), (2003), 2866 – 2887.
141. Tang X.-L., Liu J.-X., Dong W., Li P., Li L., Lin Ch.-R., Zheng Y.-Q., Cong W.-H., Hou J.-C., The Cardioprotective Effect of Protocatechuic Acid on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury, *Journal of Pharmacological Sciences*, 125, (2014), 176-183.

142. Roy A., Ranjan A., HosA, a MarR Family Transcriptional Regulator, Represses Nonoxidative Hydroxyarylic Acid Decarboxylase Operon and Is Modulated by 4-Hydroxybenzoic Acid, *Biochemistry*, 55, (2016), 1120-1134.
143. Moreira E. A., Pilon A. C., Andrade L. E., Lopes N. P., New Perspectives on Chlorogenic Acid Accumulation in Harvested Leaf Tissue: Impact on Traditional Medicine Preparations, *ACS Omega*, 3, (2018), 18380 – 18386.
144. Janicke B., Önning G., Oredsson S., Differential Effects of Ferulic Acid and p-Coumaric Acid on S Phase Distribution and Length of S Phase in the Human Colonic Cell Line Caco-2, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, (2005), 6658–6665.
145. Du L., Yu P., Rosnagel B., Christensen D., McKinnon J., Physicochemical Characteristics, Hydroxycinnamic Acids (Ferulic Acid, p-Coumaric Acid) and Their Ratio, and in Situ Biodegradability: Comparison of Genotypic Differences among Six Barley Varieties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, (2009), 4777–4783.
146. Torres J. L. T., Resazza J. P. N., Microbial Transformations of p-Coumaric Acid by *Bacillus megaterium* and *Curvularia lunata*, *Journal of Natural Products*, 64(11), (2001), 1408-1414.
147. Ostertag L., Philo M., Colquhoun I., Tapp H., Saha S., Duthie G., Kemsley K., de Roos B., Kroon P., Le Gall G., Acute Consumption of Flavan-3-ol-Enriched Dark Chocolate Affects Human Endogenous Metabolism, *Journal of Proteome Research*, 16, (2017), 2516–2526.
148. Nunes-Damaceno M., Muñoz-Ferreiro N., Romero-Rodríguez M.A., Vázquez-Odériz M.L., A comparison of kiwi fruit from conventional, integrated and organic production systems, *LWT - Food Science and Technology*, 54, (2013), 291-297.
149. Kaneko M., Itoh H., Ueguchi-Tanaka M., Ashikari M., Matsuoka M., The α -amylase induction in endosperm during rice seed germination is caused by gibberellin synthesized in epithelium, *Plant Physiology* 128(4), (2002), 1264–1270.
150. Prado F. E., Boero C., Gallarodo M., González J. A., Effect of NaCl on germination, growth and soluble sugar content in *Chenopodium quinoa* Willd. seeds, *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 41(1), (2000), 27–34.
151. Brooks S. J., Moore J. N., Murphy J.B., Quantitative and qualitative changes in sugar content of peach genotypes [*Prunus persica* (L) Batsch], *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118, (1993), 97–100.

152. Ryoo N., Eom J.-S., Kim H.-B., Vo B. T., Lee S.-W., Hahn T.-R., Jeon J.-S., Expression and Functional Analysis of Rice Plastidic Maltose Transporter, OsMEX₁, *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 56(2), (2013), 149–155.
153. Lu Y., Sharkey T., The role of amylomaltase in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells, *Planta*, 218, (2004), 466–473.
154. Boris K. V., Kudryavtsev A. M., Kochieva E. Z., Sorbitol-6-Phosphate Dehydrogenase (S6PDH) Gene Polymorphism in *Malus* Mill. (*Rosaceae*), *Russian Journal of Genetics*, 51(11), (2015), 1069-1074.
155. Kazantzis I., Nanos G. D., Stavroulakis G. G., Effect of harvest time and storage conditions on almond kernel oil and sugar composition, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83, (2003), 354–359.
156. Balta F., Battal P., Balta M. F., Yoruk H. I., Free sugar compositions based on kernel taste in almond genotypes *Prunus dulcis* from eastern Turkey, *Chemistry of Natural Compounds*, 45(2), (2009), 221–224.
157. Yada S., Lapsley K., Huang G., A review of composition studies of cultivated almonds: macronutrients and micronutrients, *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(4-5), (2011), 469–480.
158. Rolland F., Sheen J., Sugar sensing and signalling networks in plants. *Biochemical Society Transactions*, 33, (2005), 269 – 271.
159. Bassi D., Ryugo K., Chemical changes in developing seeds of ‘independence’ nectarine and ‘Fay Elberta’ peach, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115(1), (1990), 115–118.
160. Fotirić Akšić M., Tosti T., Nedić N., Marković M., Ličina V., Milojković-Opšenica D., Tešić Ž., Influence of frost damage on the sugars and sugar alcohol composition in quince (*Cydonia oblonga* Mill.) floral nectar, *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(1), (2015), 1701.
161. Krasensky J., Jonak C., Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks, *Journal of Experimental Botany*, 63(4), (2012), 1593–1608.
162. Gomez L., Steele-King C., Jones L., Foster J., Vuttipongchaikij S., McQueen-Mason S., Arabinan Metabolism during Seed Development and Germination in *Arabidopsis*, *Molecular Plant*, 2(5), (2009), 966–976.

163. Quesada-Moreno M. M., Azfore L. M., Avilés-Moreno J. R., Alkorta I., Elguero J., López-González J. J., Conformational Preference and Chiroptical Response of Carbohydrates D-Ribose and 2-Deoxy-D-ribose in Aqueous and Solid Phases, *The Journal of Physical Chemistry B*, 117, (2013), 14599 – 14614.
164. Sen S., Pal U., Maiti N., pKa Determination of D-Ribose by Raman Spectroscopy, *The Journal of Physical Chemistry B*, 118, (2014), 909-914.
165. Iturriaga G., Suárez R., Nova-Franco B., Trehalose Metabolism: From Osmoprotection to Signaling, *International Journal of Molecular Sciences*, 10, (2009), 3793-3810.
166. Han X., Qian L., Zhang L., Liu X., Structural and biochemical insights into nucleotide-rhamnose synthase/epimerase-reductase from *Arabidopsis thaliana*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1854, (2015), 1476–1486.
167. Pita-Calvo C., Vázquez M., Honeydew Honeys: A Review on the Characterization and Authentication of Botanical and Geographical Origins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(11), (2018), 2523-2537.
168. Lütken H., Lloyd J., Glaring M., Baunsgaard L., Holst Laursen K., Haldrup A., Kossmann J., Blennow A., Repression of both isoforms of disproportionating enzyme leads to higher malto-oligosaccharide content and reduced growth in potato, *Planta*, 232(5), (2010) 1127–1139.
169. Sorndech W., Nakorn K., Tongta S., Blennow A., Isomalto-oligosaccharides: Recent insights in production technology and their use for food and medical applications, *Food Science and Technology*, 95, (2018), 135–142.
170. Noiraud-Romy N., Maurousset L., Lemoine R., Transport of polyols in higher plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(9), (2001), 717–728.
171. Kohlmeier M. G., White C. E., Fowler J. E., Finan T. M., Oresnik I. J., Galactitol catabolism in *Sinorhizobium meliloti* is dependent on a chromosomally encoded sorbitol dehydrogenase and a pSymB-encoded operon necessary for tagatose catabolism, *Molecular Genetics and Genomics*, 294(3), (2019), 739–755.
172. Yamaguchi S., Yoshikawa T., Ikeda S., Ninomiya T., Studies on the taste of some sweet substances Part II. Interrelationships among them, *Agricultural and Biological Chemistry*, 34(1), (1970), 187–197.

7. PRILOG

Prilog 1. Prosečna dužina, prosečna težina jedne koštice i jednog semena kao i % vode u semenima 25 sorti/genotipova breskve

Uzorci	PDK [cm]	PDS [cm]	PTK [g]	PTS [g]	% Vode*
Standardne sorte					
Springbelle	2,92	1,27	2,7031	0,0387	4,20
Redcap	3,12	1,35	3,7610	0,0476	4,01
Maria Gracia	3,32	1,63	4,0270	0,1402	5,00
Royal Glory	3,07	1,40	3,9951	0,0783	4,89
Redhaven	3,60	1,67	6,2574	0,2219	4,08
Rich Lady	3,00	1,48	4,2525	0,1135	4,37
Maria Bianca	3,30	1,63	5,4306	0,1301	4,53
Glohaven	3,34	1,59	4,6749	0,1971	4,29
Bolero	3,70	1,83	6,7189	0,4700	3,69
San Prins	3,17	1,68	5,8529	0,3369	3,91
Summerset	4,02	2,00	8,1492	0,3288	4,49
Perspektivni hibridi					
FSM1	3,80	2,10	8,9155	0,5293	4,23
FSM2	4,02	1,95	6,7847	0,4489	4,43
FA2	3,88	1,99	8,9555	0,4161	4,09
FA5	3,98	1,76	7,8902	0,3969	4,57
FHTS1	3,78	1,94	8,6187	0,3613	4,23
FHTS4	4,07	1,99	8,8914	0,3904	4,26
Genotipovi vinogradarske breskve					
MFA/12	3,17	1,60	4,8446	0,3477	3,62
MFA/16	3,04	1,64	4,3039	0,3713	3,84
II/19	3,03	1,45	4,2132	0,3884	3,88
II/31	3,12	1,57	3,7943	0,4302	4,24
II/32	3,17	1,55	3,9281	0,3770	4,11
II/35	3,30	1,58	4,1320	0,4360	4,04
II/38	3,25	1,60	4,3271	0,3203	4,51
II/42	3,27	1,80	3,9020	0,3494	3,94

PDK - Prosečna dužina koštice; **PDS**- Prosečna dužina semena; **PTK**- Prosečna težina koštice; **PTS** –Prosečna težina semena; *Procenat vode je izračunat pomoću jednačine 6.

Prilog 2. Sastav i sadržaj masnih kiselina (% u ulju) u heksanskim ekstraktima ulja semena 25 sorti/genotipova breskve

Uzorci	% Ulja u semenu	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1 n9c	C18:2 n6c	C20:0	C20:1	C24:0	SFA	MUFA	PUFA	UFA	S/U
Standardne sorte																
Springbelle	3,97	6,40	0,20	0,10	0,10	2,40	60,40	30,20	0,10	0,10	<0,1	9,00	60,80	30,20	91,00	0,10
Redcap	1,52	7,00	0,40	0,10	0,10	3,00	66,50	22,50	0,10	0,10	<0,1	10,30	67,10	22,50	89,60	0,11
Maria Gracia	23,90	8,20	0,30	0,10	0,10	2,60	49,70	38,70	0,20	0,10	<0,1	11,10	50,20	38,70	88,90	0,12
Royal Glory	13,88	8,95	0,60	<0,1	0,10	6,40	38,40	44,60	0,15	0,10	0,65	16,15	39,20	44,60	83,80	0,19
Redhaven	34,90	6,40	0,40	0,10	0,10	2,40	64,40	25,90	0,20	0,10	<0,1	9,10	65,00	25,90	91,10	0,10
Rich Lady	27,18	6,20	0,30	0,10	0,10	4,10	57,40	30,50	0,20	0,10	1,00	11,60	57,90	30,50	88,60	0,13
Maria Bianca	22,39	8,00	0,30	0,10	0,10	2,40	50,50	37,60	0,20	0,30	0,30	11,10	51,20	37,60	89,00	0,13
Glohaven	31,24	6,50	0,40	0,10	0,10	2,70	63,50	25,90	0,20	0,10	0,30	9,80	64,10	25,90	90,20	0,11
Bolero	35,22	5,50	0,40	0,10	0,10	2,50	73,80	17,00	0,10	0,10	0,30	8,50	74,40	17,00	91,60	0,09
San Prins	41,51	5,90	0,50	0,10	0,10	2,20	71,30	19,40	0,10	0,10	0,20	8,50	72,00	19,40	91,60	0,09
Summerset	32,92	7,00	0,50	0,10	0,10	1,90	57,00	32,50	0,10	0,10	0,60	9,70	57,70	32,50	90,40	0,11
Perspektivni hibridi																
FSM1	39,81	6,20	0,50	0,10	0,10	1,80	70,00	21,00	0,10	<0,1	0,20	8,40	70,60	21,00	91,90	0,09
FSM2	40,81	6,40	0,40	0,10	0,10	2,00	64,80	25,70	0,10	0,10	0,20	8,80	65,40	25,70	91,30	0,10
FA2	38,74	5,70	0,40	0,10	0,10	2,10	69,00	21,90	0,10	0,10	0,50	8,50	69,60	21,90	91,70	0,09
FA5	39,64	6,40	0,40	<0,1	0,10	1,90	63,90	27,10	0,10	0,10	<0,1	8,40	64,50	27,10	91,80	0,09
FHTS1	35,26	5,80	0,40	0,10	0,20	2,10	74,30	16,90	0,10	0,10	<0,1	8,10	75,00	16,90	92,10	0,09
FHTS4	34,22	6,10	0,40	0,10	0,10	1,90	62,10	29,10	0,10	0,10	<0,1	8,20	62,70	29,10	92,00	0,09
Genotipovi vinogradarske breskve																
MFA/12	38,49	6,20	0,60	0,10	0,10	2,10	74,90	15,70	0,20	0,10	<0,1	8,60	75,70	15,70	91,40	0,09
MFA/16	39,88	7,00	0,50	0,10	0,10	2,00	64,60	25,50	0,10	0,10	<0,1	9,20	65,30	25,50	90,80	0,10
II/19	39,17	6,20	0,60	<0,1	<0,1	2,10	72,80	18,00	0,20	0,10	<0,1	8,50	73,50	18,00	91,50	0,09
II/31	38,92	5,90	0,40	0,10	0,20	2,00	72,10	19,00	0,10	0,10	<0,1	8,10	72,80	19,00	91,80	0,09
II/32	41,38	6,00	0,50	0,10	0,10	2,00	71,90	19,10	0,10	0,10	<0,1	8,20	72,60	19,10	91,70	0,09
II/35	40,56	5,90	0,50	0,10	0,10	1,90	71,60	19,70	0,10	0,10	<0,1	8,00	72,30	19,70	92,00	0,09
II/38	38,11	5,80	0,40	0,10	0,10	2,00	71,70	19,30	0,20	0,10	0,20	8,30	72,30	19,30	91,60	0,09
II/42	43,45	6,10	0,50	0,10	0,10	2,00	72,60	18,40	0,10	<0,1	<0,1	8,30	73,20	18,40	91,60	0,09

C16:0- Palmitinska kiselina; **C16:1-** Palmitoleinska kiselina; **C17:0-** Margarinska kiselina; **C17:1-** *cis*-10-Heptadecenska kiselina; **C18:0-** Stearinska kiselina; **C18:1 n9c-** Oleinska kiselina; **C18:2 n6c-** Linolna kiselina; **C20:0-** Arahidonska kiselina; **C20:1-** *cis*-11-Eikozanoenska kiselina; **C24:0-** Lignocerinska kiselina; **SFA-** Ukupno zasićene masne kiseline; **MUFA-** Mononezasićene masne kiseline; **PUFA-** Polinezasićene masne kiseline; **UFA-** Ukupno nezasićene masne kiseline; **S/U-** Odnos zasićenih i nezasićenih masnih kiselina.

Prilog 3. Prosečne vrednosti sadržaja fenolnih jedinjenja (mg/kg) u semenu 25 sorti/genotipova breskve.

Uzorci	ProA (I)	<i>p</i> -HbA (II)	<i>p</i> -HpaA (III)	ChA (IV)	<i>p</i> -CoA (V)	FerA (VI)	Cat (VII)
Standardne sorte							
Springbelle	4,69	38,13	14,12	2,15	4,40	5,56	43,27
Redcap	2,87	18,48	5,89	23,73	9,10	5,23	32,61
Maria Gracia	2,76	10,01	11,12	1,95	5,61	29,44	14,99
Royal Glory	3,14	11,32	6,44	6,64	3,77	7,22	16,96
Redhaven	1,51	1,38	2,85	2,72	1,27	3,24	1,58
Rich Lady	4,73	14,64	12,37	5,06	2,46	11,67	13,13
Maria Bianca	5,00	8,49	10,88	1,43	4,10	8,31	13,54
Glohaven	4,41	20,26	8,66	3,97	2,61	17,97	44,09
Bolero	5,36	22,91	5,75	0,63	2,19	4,22	12,16
San Prins	3,49	6,72	5,00	3,96	2,79	2,29	10,71
Sumerset	2,05	4,39	1,96	0,48	0,97	3,05	0,60
Perspektivni hibridi							
FSM1	1,81	7,72	3,19	0,40	0,91	3,00	0,77
FSM2	2,71	8,70	1,15	0,77	0,71	2,94	2,28
FA2	1,94	12,28	3,57	0,74	0,92	2,96	1,12
FA5	4,30	19,00	5,04	1,38	0,63	2,16	2,14
FHTS1	2,16	4,75	4,67	0,75	1,25	1,93	3,98
FHTS4	2,31	8,71	3,79	2,5012	1,27	3,81	7,38
Genotipovi vinogradarske breskve							
MFA/12	2,96	11,16	4,86	3,20	1,63	4,88	9,45
MFA/16	2,50	9,42	4,10	2,70	1,38	4,12	7,98
II/19	3,21	19,64	5,34	9,86	0,67	2,05	38,21
II/31	2,83	2,33	4,90	5,79	1,05	3,20	12,49
II/32	2,47	4,31	3,67	3,39	0,75	4,99	6,43
II/35	2,06	9,67	4,47	3,80	0,92	6,07	2,14
II/38	3,07	18,99	6,19	5,76	1,02	6,95	3,65
II/42	3,02	7,97	1,48	0,59	0,91	4,76	4,15

ProA – Protokatehuinska kiselina; ***p*-HbA** – *p*-Hidroksibenzojeva kiselina; ***p*-HpaA** – *p*-Hidroksifenilsirćetna kiselina; **ChA** – Hlorogena kiselina; ***p*-CoA** – *p*-Kumarinska kiselina; **FerA** – Ferulinska kiselina; **Cat** – Katehin;

Prilog 4. Prosečne vrednosti sadržaja šećera (mg/kg) u semenu 25 sorti/genotipova breskve

Uzorci	Ara	Fru	Glu	Ram	Rib	Gen+Tur	Malt	Sah	Tre	Izomaltotri	Malto-tri	Mel	Pan	Malto-tetr	Malto-pen	Malto-hek	Malto-hep	Gal	Man	Sor
Standardne sorte																				
Springbelle	0,383	0,293	9,545	0,019	3,750	0,035	0,087	2,869	0,777	0,052	0,013	0,094	0,184	0,012	0,030	0,025	0,084	0,036	0,086	0,028
Redcap	0,265	0,382	5,592	0,014	7,100	0,131	0,088	2,228	0,300	0,045	0,019	0,072	0,082	0,053	0,014	0,016	0,079	0,005	0,004	0,003
Maria Gracia	0,025	0,403	4,663	0,004	0,215	0,060	0,023	1,975	0,091	0,018	0,012	0,074	0,114	0,006	0,030	0,0004	0,009	0,074	0,012	0,063
Royal Glory	0,066	0,434	3,771	0,012	0,402	0,017	0,023	1,547	0,201	0,020	0,008	0,098	0,091	0,008	0,030	0,002	0,002	0,053	0,031	0,044
Redhaven	0,004	2,675	10,853	0,008	0,009	0,008	1,003	8,363	0,264	0,022	0,008	0,028	0,057	0,005	0,002	0,010	0,008	0,322	0,190	1,075
Rich Lady	0,032	0,138	1,518	0,016	0,224	0,011	0,018	1,334	0,073	0,003	0,002	0,053	0,025	0,006	0,015	0,006	0,024	0,078	0,012	0,059
Maria Bianca	0,037	0,097	1,950	0,021	0,071	0,018	0,010	1,149	0,056	0,018	0,009	0,071	0,094	0,007	0,013	0,002	0,0003	0,068	0,009	0,053
Glohaven	0,040	0,034	0,490	0,073	0,185	0,005	0,013	1,071	0,067	0,007	0,011	0,090	0,002	0,021	0,016	0,001	0,003	0,058	0,011	0,045
Bolero	0,074	4,526	12,714	0,019	0,010	0,002	1,757	16,236	0,001	0,029	0,006	0,370	0,007	0,077	0,023	0,125	0,028	0,125	0,011	1,133
San Prins	0,003	0,037	0,417	0,001	0,016	0,061	0,004	0,421	0,002	0,0001	0,003	0,003	0,001	0,004	0,002	0,001	0,001	0,0001	0,0003	0,030
Summerset	0,057	1,573	3,986	0,010	0,022	0,002	3,238	12,897	0,852	0,098	0,010	0,285	0,084	0,026	0,016	0,010	0,027	0,010	0,352	2,306
Perspektivni hibridi																				
FSM1	0,004	1,193	9,187	0,002	0,395	0,154	3,220	14,852	0,007	0,176	0,019	0,009	0,095	0,213	0,053	0,010	0,003	0,057	0,022	0,983
FSM2	0,005	2,322	3,625	0,002	0,163	0,173	1,365	12,985	0,002	0,526	0,005	0,004	0,125	0,003	0,062	0,004	0,025	0,032	0,003	1,321
FA2	0,014	8,355	6,427	0,003	0,083	0,295	6,942	3,935	0,002	0,032	0,026	0,001	0,002	0,003	0,001	0,003	0,003	0,087	0,076	1,266
FA5	0,045	0,598	6,824	0,013	0,057	0,458	0,985	5,757	0,006	0,086	0,085	0,026	0,357	0,006	0,002	0,003	0,125	0,014	0,052	1,246
FHTS1	0,004	3,225	5,558	0,011	0,075	0,058	0,757	4,872	0,010	0,095	0,009	0,009	0,085	0,002	0,054	0,006	0,010	0,010	0,013	0,936
FHTS4	0,003	2,725	1,185	0,048	0,058	0,005	4,267	7,361	0,013	0,126	0,099	0,056	0,165	0,154	0,085	0,013	0,013	0,426	0,085	1,263
Genotipovi vinogradarske breskve																				
MFA/12	0,008	0,186	8,750	0,001	0,008	0,012	1,329	7,365	0,273	0,136	0,008	0,008	0,001	0,031	0,099	0,032	0,036	0,001	0,035	2,693
MFA/16	0,002	0,478	6,914	0,001	0,002	0,009	0,386	3,696	0,056	0,199	0,027	0,009	0,004	0,015	0,022	0,025	0,008	0,008	0,098	2,999
II/19	0,001	1,443	6,673	0,002	0,157	0,018	0,286	7,786	0,014	0,025	0,026	0,040	0,135	0,004	0,094	0,001	0,003	0,008	0,011	0,998
II/31	0,003	1,075	2,869	0,003	0,038	0,003	2,542	7,955	0,003	0,032	0,135	0,083	0,099	0,035	0,013	0,009	0,010	0,003	0,002	0,999
II/32	0,010	0,999	2,058	0,010	0,084	0,011	2,764	8,216	0,251	0,060	0,095	0,159	0,252	0,009	0,007	0,110	0,008	0,009	0,004	1,026
II/35	0,011	4,273	3,473	0,002	0,032	0,274	0,210	7,252	0,005	0,003	0,019	0,002	0,156	0,012	0,023	0,029	0,003	0,021	0,003	1,025
II/38	0,016	3,838	3,479	0,003	0,036	0,365	0,399	9,133	0,010	0,009	0,038	0,001	0,010	0,101	0,070	0,104	0,006	0,015	0,008	1,433
II/42	0,002	0,876	5,852	0,003	0,086	0,017	0,358	6,985	0,013	0,066	0,039	0,086	0,120	0,0004	0,002	0,003	0,003	0,006	0,025	0,876

Ara-Arabinoza; **Fru**-Fruktoza; **Glu**-Glukoza; **Ram**-Ramnoza; **Rib**-Riboza; **Gen+Tur**-Gentiobioza+Turanoza; **Malt**-Maltoza; **Sah**-Saharoza; **Tre**-Trehaloza; **Izomaltotri** - Izomaltotriozna; **Maltotri**-Maltotriozna; **Mel**-Melezitoza; **Pan**-Panoza; **Maltotetr**-Maltotetraozna; **Maltopen**-Maltopenataozna; **Maltohek**-Maltoheksaoza; **Maltohep**-Maltoheptaozna; **Gal**-Galaktitol; **Man**-Manitol; **Sor**-Sorbitol

Marija R. Koprivica

Biografija

Marija R. Koprivica (rođena Stanojević), master hemičar, rođena je 05. maja 1988. godine u Beogradu, Savski venac, Republika Srbija. Osnovnu školu završila je u Sremčici, opština Čukarica, a srednju Medicinsku školu završila je u Beogradu, opština Zvezdara. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani hemičar za životnu sredinu je upisala 2007. godine. Diplomirala je 19. septembra 2011. godine sa prosečnom ocenom 8,61 (osam i 61/100) i ocenom 10 na završnom radu pod nazivom „*BCR sekvencijalna ekstrakcija rečnih sedimenata Srbije*”. Master studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani hemičar master, upisala je 2011. godine i završila 02.10.2012. godine sa prosečnom ocenom 10,00 (deset i 0/100) i ocenom 10 na završnom master radu pod nazivom „*Određivanje ortofosfata ICP-OES metodom*”. Doktorske akademske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, katedra za Analitičku hemiju, upisala je 15.10.2012. godine.

Od 01.09.2013. godine do 28.02.2014. godine bila je zaposlena kao honorarni asistent Opšte i neorganske hemije na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Od 01.05.2014. zaposlena je u Institutu za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina, ITNMS-u, u Laboratoriji za hemijska ispitivanja. U zvanje istraživač saradnik izabrana je 29.07.2016. godine.

Od 2014. godine je angažovana na projektima finansiranim od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (projekti broj TR 31003 i TR 34013).

Marija R. Koprivica je koautor osam naučnih radova publikovanih u međunarodnim časopisima, pet naučnih radova u nacionalnim časopisima, dvadeset dva naučna saopštenja na međunarodnim i nacionalnim naučnim skupovima, kao i tri tehničko-razvojna rešenja.

Spisak naučnih radova i saopštenja

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu M21:

1. **Marija Stanojević**, Jelena Trifković, Milica Fotirić Akšić, Vera Rakonjac, Dragan Nikolić, Sandra Šegan, Dušanka Milojković-Opsenica, Sugar Profile of Kernels as a Marker of Origin and Ripening Time of Peach (*Prunus persicae* L.), *Plant Foods for Human Nutrition*, **70**, **4**, (2015) 433-440.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11130-015-0515-4>
2. Tatjana Šoštarić, Marija Petrović, Jelena Milojković, Časlav Lačnjevac, Aleksandar Ćosović, **Marija Stanojević**, Mirjana Stojanović, Application of waste apricot stones from fruit processing industry in environmental clean-up: copper biosorption study, *Fruits*, **70**, **5**, (2015) 271-280.
3. Marija Petrović, Tatjana Šoštarić, Mirjana Stojanović, Jelena Milojković, Marija Mihajlović, **Marija Stanojević**, Slavka Stanković, Removal of Pb²⁺ ions by raw Corn silk (*Zea Mays* L.) as a novel biosorbent, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **58**, (2016) 407-416.
4. Jelena Milojković, Lato Pezo, Mirjana Stojanović, Marija Mihajlović, Zorica Lopičić, Jelena Petrović, **Marija Stanojević**, Milan Kragović, Selected heavy metal biosorption by compost of *Myriophyllum spicatum* - A chemometric approach, *Ecological Engineering*, **93**, (2016) 112-119.

Rad u istaknutom međunarodnom časopisu M22:

1. Mirjana Stojanović, Lato Pezo, Časlav Lačnjevac, Marija Mihajlović, Jelena Petrović, Jelena Milojković, **Marija Stanojević**, Biometric approach in selecting plants for phytoaccumulation of uranium, *International Journal of Phytoremediation*, **18**, (2016) 527-533.
2. **Marija Koprivica**, Jelena Trifković, Aleksandra Dramićanin, Uroš Gašić, Milica Fotirić Akšić, Dušanka Milojković-Opsenica, Determination of the phenolic profile of peach (*Prunus persica* L.) kernels using UHPLC–LTQ OrbiTrap MS/MS technique, *European Food Research and Technology*, **244**, (2018) 2051–2064.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-018-3116-2>

Rad u međunarodnom časopisu M23:

1. **Marija Stanojević**, Jelena Trifković, Slađana Kostić-Rajačić, Vukić Šoškić, Živoslav Tešić, Dušanka Milojković-Opsenica, Assessment of lipophilicity of some biologically active arylpiperazines by RPTLC and multivariate analysis, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **37, 20**, (2014) 2814-2828.
2. Marija Mihajlović, **Marija Stanojević**, Mirjana Stojanović, Jelena Petrović, Jelena Milojković, Marija Petrović, Zorica Lopičić, To what extent soft mechanical activation and process parameters increases the efficiency of different zeolite/phosphate rock fertilizer mixtures?, *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, **23, 1**, (2017) 1-9.

Rad u nacionalnom časopisu međunarodnog značaja M24:

1. Jelena Petrović, Marija Mihajlović, Mirjana Stojanović, **Marija Stanojević**, Marija Petrović, Jelena Milojković, Časlav Lačnjevac, Održiva konverzija otpadne biomase primenom postupka hidrotermalne karbonizacije, *Zaštita materijala* **56, 2**, (2015) 206-212.
2. Marija Mihajlović, Jelena Petrović, Mirjana Stojanović, Jelena Milojković, Zorica Lopičić, **Marija Koprivica**, Časlav Lačnjevac, Hydrochars, perspective adsorbents of heavy metals: A review of the current state of studies, *Zaštita materijala*, **57, 3**, (2016) 488-495.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini M33

1. Marija Mihajlović, Mirjana Stojanović, Jelena Milojković, Tatjana Šoštarić, Marija Petrović, Jelena Petrović, **Marija Stanojević**, Mechanical activation of exchange fertilisers mixtures for phosphate rock direct application, *46th International October Conference on Mining and Metallurgy, 01-04 October, Bor, Metallurgy*, ISBN:978-86-6305-026-6, COBISS.SR-ID 210151180, 01-04 October, Bor, (2014) 286-290.
2. Marija Petrović, Tatjana Šoštarić, Jelena Milojković, Marija Mihajlović, Zorica Lopičić, Jelena Petrović, **Marija Stanojević**, Mirjana Stojanović, Biosorption of methylene blue onto corn cob, *IV International symposium on environmental and material flow*

- management*–EMFM 2014, 31st October–2nd November, Bor, Serbia, ISBN: 978-86-6305-029-7, (2014) pp. 26-31.
3. Marija Petrović, Tatjana Šoštarić, Mirjana Stojanović, Jelena Petrović, **Marija Stanojević**, Jelena Milojković, Zorica Lopičić, Corn silk as novel biosorbent for Cd²⁺ removal from aqueous solution, *X International Symposium on Recycling Technologies and Sustainable Development*, Bor, Serbia, November 4-7, 2015, ISBN: 978-86-6305-037-2, (2015) pp. 208-214.
 4. Marija Petrović, Tatjana Šoštarić, Mirjana Stojanović, Jelena Milojković, Marija Mihajlović, Jelena Petrović, **Marija Stanojević**, Biosorption of heavy metals by agro waste biomass, *47th International October Conference on Mining and Metallurgy*, Bor Lake, Serbia, October 4-6, ISBN: 978-86-7827-047-5, (2015) pp.445-449.
 5. Tatjana Šoštarić, Marija Petrović, Jelena Milojković, Jelena Petrović, **Marija Stanojević**, Časlav Lačnjevac, Mirjana Stojanović, Biosorption of methylene blue by waste apricot shells from food industry, *IV International Congress Engineering, Ecology and Materials in the Processing Industry*, Jahorina 4-6.3.2015. Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina, ISBN 978-99955-81-18-3, (2015), pp. 786-792.
 6. Tatjana Šoštarić, Marija Petrović, Jelena Milojković, Jelena Petrović, **Marija Stanojević**, Ljubiša Andrić, Mirjana Stojanović, Biosorption of Cu(II) ions from aqueous solution by waste apricot stones pre-treated by mechanical activation, *XVI Balkan Mineral Processing Congress*, Belgrade, Serbia, June 17-19, 2015, COBISS.SR-ID 215731468, ISBN: 978-86-82673-10-1 (MI), (2015) pp. 1017-1021.
 7. Mirjana Stojanović, Marija Mihajlović, Časlav Lačnjevac, Zorica Lopičić, Jelena Petrović, Jelena Milojković, **Marija Stanojević**, Long-term behavior of depleted uranium in the environment, *Metallurgical & Materials Engineering Congress of South-East Europe (MME SEE 2015)*, Belgrade, Serbia, June 3-5, 2015, ISBN: 978-86-87183-27-8, (2015) pp. 247-253.
 8. Marija Petrović, Tatjana Šoštarić, Mirjana Stojanović, Jelena Milojković, Marija Mihajlović, Jelena Petrović, **Marija Stanojević**, Modified corn silk as biosorbent for Pb(II) ions removal from aqueous solution, *XXIII International Conference, "Ecological Truth" Eco-Ist'15*, Kopaonik, Serbia, June 17-20, 2015, Org. University of Belgrade - Technical faculty Bor, ISBN: 978-86-6305-032-7, COBBIS.SR-ID 215721740, (2015) pp. 308-313.
 9. Jelena Milojković, Marija Mihajlović, Zorica Lopičić, Milan Kragović, Tatjana Šoštarić, Jelena Petrović, **Marija Stanojević**, Development of hybrid organic-inorganic

- (bio)sorbents for Pb(II) removal, *Proceedings of XVI BALKAN MINERAL PROCESSING CONGRESS* Belgrade, Serbia, June 17-19, 2015, COBISS.SR-ID 215731468, ISBN: 978-86-82673-10-1 (MI), (2015) pp. 783-787.
10. Marija Petrović, Tatjana Šošćarić, Jelena Petrović, Jelena Milojković, **Marija Koprivica**, Mirjana Stojanović, Corn silk as biosorbent for the metal ions removal from the mining, smelting and electroplating wastewater, *The 50th International October Conference of Mining and Metallurgy*, Borsko jezero, 30. Sep – 3. Oct, isbn: 978-86-7827-050-5, (2018) pp. 335-339.
11. Tatjana Šošćarić, Marija Petrović, Jelena Milojković, Marija Kojić, **Marija Koprivica**, Katarina Pantović Spajić, Zorica Lopičić, Applicability of biosorption technology in real systems, *40. Međunarodna konferencija Vodovod i kanalizacija '19*, Zbornik radova, Novi Sad 01.-04.10.2019. Izdavač: Savez inženjera i tehničara Srbije, Beograd, Urednik: Časlav Lačnjevac. (2019) Str: 130-135.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu M34:

1. A. Radoičić, R. Petronijević, H. Majstorović, **M. Stanojević**, Ž. Tešić, D. Milojković-Opsenica: Development and validation of a TLC-densitometric method for the quantitative determination of amygdalin, *The XXXVIth SYMPOSIUM 'Chromatographic Methods of Investigating The Organic Compounds*, Katowice – Szczyrk, June 5th-7th (2013), Book of Abstracts p.14.
2. J. Milojković, M. Stojanović, M. Mihajlović, M. Petrović, T. Šošćarić, J. Petrović, **M. Stanojević**, Sorption of Pb(II) from aqueous solution by a powder mixture of Myriophyllum Spicatum and bentonite, *IV International symposium on environmental and material flow management – EMFM*, 31st October–2nd November, Bor, Serbia, (2014) p.25, ISBN:978-86-6305-029-7.
3. J. Milojković, M. Stojanović, M. Mihajlović, Z. Lopičić, M. Petrović, J. Petrović, **M. Stanojević**, Application of waste biomass for preventing the negative effects of climate changes. *International Scientific conference on the environment and adaptation of industry to climate change*, 22 – 24. April, Book of abstracts (2015) 69-70.
4. M. Petrović, T. Šošćarić, M. Stojanović, J. Petrović, **M. Koprivica**, J. Milojković, Z. Lopičić, Corn silk (*Zea mays* L.) as novel biosorbent for heavy metals removal, *Fourteenth Young Researchers Conference – Materials Science and Engineering*,

- December 9-11, 2015, Hall 2, SASA Institutes Belgrade, Serbia, ISBN 978-86-80321-31-8 Book of Abstract, (2015) str 46.
5. J. Petrović, M. Mihajlović, M. Stojanović, M. Petrović, **M. Koprivica**, Z. Lopičić, T. Šošarić, Uticaj temperature hidrotermalne konverzije komine grožđa na karakteristike proizvoda, *IV Memorijalni naučni skup iz zaštite životne sredine „Docent dr Milena Dalmacija“*, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, , issn: ISBN 978-86-7031-412-2, Srbija, 1.-2. Apr, (2016) pp. UO-1-UO-2.
 6. M. Kojić, J. Petrović, M. Stojanović, M. Petrović, M. Mihajlović, **M. Koprivica**, J. Milojković, Uticaj procesne temperature na strukturne karakteristike dobijenih hidročađi, *Međunarodna naučna konferencija, Zelena ekonomija i zaštita životne sredine*, , isbn: 978-86-89061-11-6, Beograd, Srbija, 23.-25. Apr, (2018) pp. 69.
 7. **M. Koprivica**, J. Petrović, M. Petrović, M. Mihajlović, J. Milojković, M. Kojić, M. Stojanović, Sorption of Pb^{2+} ions from wastewater by Paulownia leaves and their hydrochar, *Seventeenth Young Researchers Conference – Materials Science and Engineering*, dr. Smilja Marković, isbn: 978-86-80321-34-9, Beograd, 5.-7. Dec, (2018) pp. 82.
 8. M. Petrović, J. Petrović, T. Šošarić, M. Kojić, **M. Koprivica**, M. Grubišić, Z. Lopičić, Alkali modified corn cob hydrochar as biosorbent of Mn^{2+} ions from aqueous solutions. *4th Metallurgical & Materials Engineering Congress of South-East Europe MME SEE 2019*, June 5-7, Belgrade, Serbia. Ed Dragomir Glišić, Branislav Marković, Vaso Manojlović. (2019) pp 51.
 9. J. Petrović, M. Petrović, M. Mihajlović, M. Kojić, **M. Koprivica**, Z. Lopičić, J. Milojković, Grape pomace hydrochars as potential adsorbents of Cd(II) and Al(III) from aqueous solutions. *4th Metallurgical & Materials Engineering Congress of South-East Europe MME SEE 2019*, 5-7 June, Belgrade, Serbia. Ed Dragomir Glišić, Branislav Marković, Vaso Manojlović, ISBN 978-86-87183-30-8, (2019) p 50.

OBJAVLJENI RADOVI NACIONALNOG ZNAČAJA

Rad u vrhunskom časopisu nacionalnog značaja M51

1. Marija Mihajlović, Mirjana Stojanović, Jelena Petrović, **Marija Stanojević**, Zorica Lopičić, Časlav Lačnjevac, Dragan Radulović, The effect of complex phosphate rock based fertilizers on maize, *Zaštita materijala i životne sredine, Crnogorsko društvo za koroziju, zaštitu materijala i zaštitu životne sredine*, **2**, (2014) 67-70.

2. Jelena Milojković, Mirjana Stojanović, Marija Mihajlović, Zorica Lopičić, Marija Petrović, Jelena Petrović, **Marija Stanojević**, Primena otpadne biomase za sprečavanje negativnog efekta klimatskih promena, *Ecologica*, **79**, (2015) 498-502.
3. Marija Mihajlović, Jelena Petrović, Milan Kragović, Mirjana Stojanović, Jelena Milojković, Zorica Lopičić, **Marija Koprivica**, Effect of KOH activation on hydrochars surface: FT-IR analysis, *Radiation and applications*, **2**, 1, (2017) 65-67.

Predavanje po pozivu sa skupa nacionalnog značaja štampano u celini M61:

1. Jelena Petrović, Marija Mihajlović, Marija Petrović, Mirjana Stojanović, Marija Kojić, **Marija Koprivica**, Jelena Milojković, Hidročadi kao potencijalni adsorbensi različitih polutanata iz otpadnih voda, Međunarodni stručno-naučni skup, vodovod i kanalizacija '18, 09-12. Oktobar, Valjevo. Izdavač: Savez inženjera i tehničara Srbije, ISBN 978-86-80067-39-1.; (2018) pp. 103-110.

Saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampana u izvodu M64:

1. Vesna P.Vasić, **Marija R. Koprivica**, Đurđa D. Krstić, Milica M. Fotirić-Akšić, Jelena Đ. Trifković, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Sadržaj polifenola u košticama šljive različitog porekla i perioda zrenja, 53. *Savetovanje Srpskog hemijskog društva*, Srpsko hemijsko društvo, issn: ISBN 978-86-7132-056-6, 10-11. Jun, Srbija, (2016) pp. 20-20.

TEHNIČKO RAZVOJNA REŠENJA M80

Novo tehničko rešenje (metoda) primenjeno na nacionalnom nivou M82

1. Marija Mihajlović, Mirjana Stojanović, Dragan Radulović, Časlav Lačnjevac, Mirko Grubišić, Zorica Lopičić, Jelena Petrović, **Marija Stanojević**, (2014) "Dobijanje složenog čvrstog mineralnog đubriva na bazi prirodnog fosfata i parcijalno modifikovanog zeolita - FosZel", TR31003, odluka naučnog veća ITNMS, 13/26-5 od 1.12.2014. god.

http://www.itnms.ac.rs/downloads/tehnicka_resenja/Dobijanje%20slozenog.pdf

2. Jelena Milojković, Mirjana Stojanović, Marija Mihajlović, Milan Kragović, Zorica Lopičić, Marija Petrović, Jelena Petrović, **Marija Koprivica**, (2016) „Vodeni korov *Myrophyllum spcatum* inkapsuliran alginatom kao biosorbentom za uklanjanje teških metala iz otpadnih voda–MsA-biosorb“, TR31003, odluka naučnog veća ITNMS, 13/8-5 od 25.02.2016. god.
http://www.itnms.ac.rs/downloads/tehnicka_resenja/Msa_biosorb_2016.pdf

Bitno poboljšano tehničko rešenje na nacionalnom nivou M84

1. Marija Mihajlović, Mirjana Stojanović, Dragan Radulović, Jelena Milojković, Zorica Lopičić, Jelena Petrović, **Marija Koprivica** (2015) Dobijanje mehanički aktiviranog mineralnog složenog čvrstog đubriva na bazi prirodnog fosfata i parcijalno modifikovanog zeolita - FosZelPlus, TR31003, odluka naučnog veća ITNMS, 13/6-5 od 27.11.2015.
http://www.itnms.ac.rs/downloads/tehnicka_resenja/FosZel_Plus_Mihajlovic_Konacno.pdf

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Марија Р. Копривица**

Број индекса **ДХ08/2012**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Хемијска карактеризација семена брескве (*Prunus persica* L.)

- 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.

Потпис аутора

М. Копривица

У Београду, **18. новембар 2019.**

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Марија Р. Копривица**
Број индекса **ДХ08/2012**
Студијски програм **доктор хемијских наука**
Наслов рада **Хемијска карактеризација семена брескве (*Prunus persica* L.)**

Ментор **др Душанка Милојковић-Опсеница**

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

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктор 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.

Потпис аутора

M. Koprivica

У Београду, **18. новембар 2019.** године

Изјава о коришћењу

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

Хемијска карактеризација семена брескве (*Prunus persica* L.)

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 (CCBY)

2. Ауторство – некомерцијално (CCBY-NC)

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

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

5. Ауторство – без прерада (CCBY-ND)

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

(Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

M. Koprivica

У Београду, 18. новембар 2019. године

1. **Ауторство.** Дозвољавање умножавања, 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 умножавања, 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 умножавања, 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 умножавања, 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 умножавања, 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 умножавања, 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.