



UNIVERZITET U NOVOM SADU

PRIRODNO-MATEMATIČKI
FAKULTET



DEPARTMAN ZA HEMIJU, BIOHEMIJU I
ZAŠTITU ŽIVOTNE SREDINE

Boško Marić

**VALORIZACIJA SEMENA MALINE KAO
POTENCIJALNOG IZVORA BIOAKTIVNIH
JEDINJENJA ZA PRIMENU U
FUNKCIONALNOJ HRANI I SUPLEMENTIMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Novi Sad, 2022.



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI
FAKULTET



DEPARTMAN ZA HEMIJU, BIOHEMIJU I
ZAŠTITU ŽIVOTNE SREDINE

**VALORIZACIJA SEMENA MALINE KAO
POTENCIJALNOG IZVORA BIOAKTIVNIH
JEDINJENJA ZA PRIMENU U
FUNKCIONALNOJ HRANI I SUPLEMENTIMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

Prof. dr Biljana Abramović

Dr Nebojša Ilić

Kandidat:

Boško Marić

Novi Sad, 2022.

ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Бошко Марић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Др Биљана Абрамовић, редовни професор у пензији, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду Др Небојша Илић, научни саветник, Научни институт за прехранбене технологије, Универзитет у Новом Саду
Наслов рада:	Валоризација семена малине као потенцијалног извора биоактивних једињења за примену у функционалној храни и суплементима
Језик публикације (писмо):	Српски (латиница)
Физички опис рада:	Унети број: Страница 151 Поглавља 6 Референци 211 Табела 24 Слика 36 Графикона/Схема 4 Прилога 0
Научна област:	Хемија
Ужа научна област (научна дисциплина):	Аналитичка хемија и хемија хране биљног порекла
Кључне речи / предметна одредница:	Малина, валоризација семена малине, оптимизација екстракције уља, оптимизација екстракције елагинске киселине, маснокиселински састав и индекси функционалности уља, садржај токоферола у уљу, антиоксидативно дејство екстраката, антимикуробно дејство екстраката, антипролиферативно дејство екстраката

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б - Изјава о ауторству;

5в - Изјава о истовестности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

5г - Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

<p>Резиме на језику рада:</p>	<p>Циљ ове докторске дисертације је био валоризација семена малине са ендокарпом (у даљем тексту: семе) као нуспроизвода (отпад) из производње сока и каше од плода малине. Валоризација је извршена на основу садржаја високо-квалитетног уља и садржаја фенолних једињења са акцентом на садржај елагинске киселине. Уље из семена три сорте малине (Виламет, Полка и Микер) је екстраховано применом четири екстракционе технике и то чврсто-течном екстракцијом (етанолом, смешом дихлорметана и метанола и хлороформом), екстракцијом са хексаном по Soxhlet-у, суперкритичним угљен-диоксидом и хладним цеђењем. Екстракционе технике су оптимизоване у сврху добијања највеће количине уља. Метода екстракције суперкритичним угљен-диоксидом је оптимизирана применом Vox-Behnken експерименталног дизајна и методологије одзивних површина. Ова метода екстракције је посебно разматрана из разлога што је то „зелена“ екстракциона техника, након које је производ одмах спреман за употребу, односно, нема потребе за упаравањем растварача, као и због тога што је прегледом литературе утврђено да нема података о оптимизацији ове методе за екстракцију уља из семена малине. Из обезмашћеног семена, елагинска киселина је екстрахована применом четири методе екстракције и то чврсто-течном екстракцијом етанолом, ултразвучном, микроталасном и екстракцијом растварачем под притиском. Екстракционе технике су оптимизоване у сврху добијања екстракта са највећим садржајем елагинске киселине. Метода ултразвучне екстракције је оптимизирана, такође применом Vox-Behnken експерименталног дизајна и методологије одзивних површина. Такође, испитан је маснокиселински састав екстрахованих уља, где је утврђено присуство значајне количине полинезасићених масних киселина, као и оптимални односи $\omega-6/\omega-3$ масних киселина за примену у људској исхрани. Испитан је и садржај токоферола где је утврђено присуство α, γ, и δ-токоферола у значајним количинама, док β-токоферол није детектован ни у једном узорку. Што се тиче полифенола, испитан је садржај елагинске киселине у свим узорцима, као и фенолни профил екстракта, где је утврђено присуство великог броја флавонола, антоцијана и фенолних киселина. Затим су испитане биолошке активности екстракта уља антиоксидативним (1,1-дифенил-пикрил-хидразил-радикал) и антимикуробним (диск-дифузиона метода) <i>in vitro</i> тестовима, где је утврђено значајно антиоксидативно деловање уља, док антимикуробно дејство није доказано. Биолошка активност полифенолног екстракта је испитана антиоксидативним (на 1,1-дифенил-пикрил-хидразил-радикал, диамонијум-2,2'-азинобис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонатни) катјон, и 2,4,6-трипиридил-<i>s</i>-триазин радикал), антимикуробним (диск-дифузиона метода) и антипролиферативним (на ћелијске линије HeLa, MCF7 и MRC-5) <i>in vitro</i> тестовима, где је утврђено значајно деловање екстракта у сва три теста. На основу добијених резултата, може се закључити да овај нуспроизвод који се добија у процесу прераде малине може допринети функционалности хране као додаток или суплемент.</p>
<p>Датум прихватања теме од стране надлежног већа:</p>	<p>27.12.2018.</p>

<p>Датум одбране:</p> <p>(Попуњава одговарајућа служба)</p>	
<p>Чланови комисије:</p> <p>(титула, име, презиме, звање, институција)</p>	<p>Председник: Др Даниела Шојић Меркулов, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>Ментор: Др Биљана Абрамовић, редовни професор у пензији, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>Члан: Др Немања Теслић, научни сарадник, Научни институт за прехранбене технологије, Универзитет у Новом Саду</p> <p>Члан: Др Дејан Орчић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>Члан: Др Драгана Четојевић-Симин, редовни професор, Универзитет Сингидунум, Београд и научни саветник, Институт за онкологију Војводине, Сремска Каменица</p> <p>Члан: Др Бранимир Павлић, доцент, Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду</p>
<p>Напомена:</p>	

UNIVERSITY OF NOVI SAD

FACULTY OF SCIENCES

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Boško Marić
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Dr. Biljana Abramović, Retired Full Professor, Faculty of Science, University of Novi Sad Dr. Nebojša Ilić, Full Research Professor, Institute of Food Technology, University of Novi Sad
Thesis title:	Valorization of raspberry seeds as a potential source of bioactive compounds for application in functional food or supplements
Language of text (script):	Serbian language (latin)
Physical description:	Number of: Pages 151 Chapters 6 References 211 Tables 24 Illustrations 36 Graphs/Schemes 4 Appendices 0
Scientific field:	Chemistry
Scientific subfield (scientific discipline):	Analytical chemistry and chemistry of food with plant origin
Subject, Key words:	Raspberry, valorization of raspberry seeds, optimization of oil extraction, optimization of ellagic acid extraction, fatty acid composition and oil functionality indices, tocopherol content in oil, antioxidant effect of extracts, antimicrobial effect of extracts, antiproliferative effect of extracts
Abstract in English	The aim of this doctoral dissertation was to valorize raspberry seeds with endocarp (hereinafter: seeds) as by-products (waste) from the production of

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 - Statement on the authority,

5B - Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r - Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

language:	<p>raspberry juice and pulp. Valorization was performed through the content of high quality oil and the content of phenolic compounds with an emphasis on the content of ellagic acid. The oil from the seeds of three varieties of raspberry (Willamette, Polka and Meeker) was extracted using four extraction techniques: solid-liquid extraction (extraction with ethanol, mixture of methylene chloride/methanol and chloroform), Soxhlet extraction with hexane, supercritical carbon dioxide and cold pressing, followed by extracritical carbon dioxide extraction. Extraction methods were optimized to achieve the highest oil content. Supercritical fluid extraction was optimized by applying Box-Behnken experimental design and response surface methodology. This extraction method was specially investigated because it is a "green" extraction technique, after which the product is immediately ready for use, i.e. there is no need to evaporate the solvent, as well as because the literature review found that there is not optimization data for these methods for extracting raspberry seed oil. From the defatted seed, ellagic acid was extracted using four extraction methods, namely solid-liquid extraction with ethanol, ultrasonic, microwave and pressure solvent extraction. Extraction methods were optimized to obtain the extracts with highest ellagic acid content, and the ultrasonic extraction method was optimized using Box-Behnken experimental design and response surface methodology. Furthermore, the fatty acid composition of extracted oils was examined, where the presence of a significant amount of polyunsaturated fatty acids was determined, as well as the optimal ratios of ω-6/ω-3 fatty acids for use in human nutrition. The content of tocopherol was also examined, where the presence of significant amounts in α, γ, and δ-tocopherol was determined, while β-tocopherol was not detected in any of the samples. As for polyphenols, the content of ellagic acid in all samples was examined, as well as the phenolic profile of the extracts, where the presence of a large number of flavonols, anthocyanins and phenolic acids was determined. Then, the biological activities of the oil extracts were examined by antioxidant test on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl-radical (DPPH) and antimicrobial (disk-diffusion method) <i>in vitro</i> tests, where a significant antioxidant effect of the oil was determined, while the antimicrobial effect was not proven. The biological activity of the polyphenolic extract was examined by antioxidant (DPPH, ABTS⁺ and FRAP), antimicrobial (disk diffusion method) and antiproliferative (on HeLa, MCF7 and MRC-5 cell lines) <i>in vitro</i> tests, where a significant effect of the extracts was found in all three test. Based on the results, it can be concluded that this by-product can contribute to the functionality of the food as a supplement.</p>
Accepted on Scientific Board on:	27.12.2018.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	<p>President: Dr. Daniela Šojić Merkulov, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad</p> <p>Supervisor: Dr. Biljana Abramović, Retired Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad</p>

	<p>Member: Dr. Nemanja Teslić, Research Associate, Institute of Food Technology, University of Novi Sad</p> <p>Member: Dr. Dejan Orčić, Associate Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad</p> <p>Member: Dr. Dragana Četojević-Simin, Full Professor, Singidunum University and Full Research Professor, Oncology Institute of Vojvodina, Sremska Kamenica</p> <p>Member: Dr. Branimir Pavlić, Assistant Professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad</p>
Note:	

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je rađena na Katedri za analitičku hemiju, Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, u Laboratoriji za ćelijske kulture Instituta za onkologiju Vojvodine i na Odeljenjima mikroanalitike, hemije i mikrobiologije, Naučnog instituta za prehrambene tehnologije, Univerziteta u Novom Sadu, u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Novi proizvodi od cerealijske i pseudocerealijske u organskoj proizvodnji“ (III 46005).

Pre svega, želim da se zahvalim mentoru, dr Biljani Abramović, redovnom profesoru u penziji Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu što me je prihvatila kao svog doktoranda i nesebičnim savetima i zalaganjem pomogla da ova disertacija bude kvalitetnija. Takođe, veliko hvala za savete i usmerenja u pisanju ove disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem mentoru dr Nebojši Iliću, naučnom savetniku Naučnog instituta za prehrambene tehnologije Univerziteta u Novom Sadu, za zdravo radno okruženje i za sve savete i pomoć u toku izrade ove disertacije.

Takođe, veliko hvala internom mentoru dr Nemanji Tesliću, naučnom saradniku Naučnog instituta za prehrambene tehnologije Univerziteta u Novom Sadu za divnu saradnju, svu pruženu pomoć kako za same eksperimente, tako i za savete i usmerenja u pisanju ove disertacije.

Dr Mariji Bodroži-Solarov, naučnom savetniku Naučnog instituta za prehrambene tehnologije Univerziteta u Novom Sadu dugujem veliku zahvalnost za pomoć oko izbora teme istraživanja i nesebičnu pomoć kroz moje doktorske studije.

Dr Branimiru Pavliću, docentu Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, se zahvaljujem na ogromnoj pomoći prilikom ekstrakcija ulja i polifenola.

Dr Latu Pezu, naučnom savetniku Instituta za opštu i fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu, hvala na velikoj pomoći pri zahtevnim statističkim obradama rezultata, uvek prisutnom optimizmu i prijateljskim savetima.

Dr Ljubiši Šariću, naučnom saradniku Naučnog instituta za prehrambene tehnologije Univerziteta u Novom Sadu veliko hvala na nesebičnoj pomoći pri eksperimentima antimikrobnog delovanja ulja i ekstrakata elaginske kiseline.

Dr Danieli Šojić Merkulov, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, veliko hvala na korisnim informacijama i savetima i nesebičnoj pomoći prilikom izrade ove disertacije.

Dr Dragani Četojević-Simin, redovnom profesoru Departmana za farmaciju, Univerziteta Singidunum i naučnom savetniku Instituta za onkologiju Vojvodine, veliko hvala na nesebičnoj pomoći pri eksperimentima antiproliferativnog delovanja i pisanju ove disertacije.

Dr Dejanu Orčiću, vanrednom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, dugujem zahvalnost za nesebične savete pri koncipiranju ove disertacije.

Veliko hvala kompaniji „MONDI LAMEX d.o.o.“ iz Kraljeva na donaciji sirovine za potrebe istraživanja u okviru ove disertacije.

Takođe, veliko hvala firmi „PAN-UNION d.o.o.“ na pomoći prilikom hladnog ceđenja ulja.

Dr Aleksandri Novaković, naučnom saradniku Naučnog instituta za prehrambene tehnologije Univerziteta u Novom Sadu, veliko hvala na pruženim savetima tokom realizacije ovog istraživanja.

Dr Zvonku Nježiću, višem naučnom saradniku Naučnog instituta za prehrambene tehnologije Univerziteta u Novom Sadu, veliko hvala na aktivnom koordinisanju i savetima prilikom koncipiranja i realizacije doktorske disertacije, koji se odnosi na ekološke aspekte istraživanja.

Veliku zahvalnost dugujemi Milošu Bokorovu, stručnom saradniku Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu za nesebičnu pomoć pri snimanju semena maline skenirajućim elektronskim mikroskopom.

Dr Michal Ockowski, docent sa Instituta za nauku o ljudskoj ishrani, Univerziteta prirodnih nauka u Varšavi, Poljska i Dr Jacek Wilczak, docent sa Instituta veterinarske medicine, Univerziteta prirodnih nauka u Varšavi, Poljska, su mi nesebično pomogli pri radu na određivanju polifenolnog profila ekstrakata i za to im veliko hvala.

Hvala kolegincama dr Jeleni Krulj i dr Jovani Kojić, naučnim saradnicima Naučnog instituta za prehrambene tehnologije Univerziteta u Novom Sadu, Lidiji Peić-Tukuljac, Jeleni Perović, istraživačima saradnicima Naučnog instituta za prehrambene tehnologije Univerziteta u Novom Sadu, kao i tehničkim saradnicima Odeljenja za hemiju, mikrobiologiju i mikroanalitiku Naučnog instituta za prehrambene tehnologije Univerziteta u Novom Sadu na pruženoj pomoći tokom realizacije ovog istraživanja.

Hvala mojim prijateljima na podršci i razumevanju.

Veliko hvala mojim roditeljima Mirjani i Dušku i sestri Dunji koji su verovali u mene i uvek mi bili oslonac u životu.

Najveću zahvalnost dugujem supruzi Katarini i sinu Vuku koji su uvek bili uz mene i pružali mi nesebičnu podršku, ljubav i razumevanje.

Boško Marić

Vuku i Katarini, umesto nekih sati...

Sadržaj

Lista skraćenica korišćenih u disertaciji.....	1
1. Uvod.....	4
2. Teorijski deo.....	7
2.1. Malina (<i>Rubus idaeus</i> L.).....	7
2.2. Hemijski sastav semena maline.....	9
2.2.1. Ulje.....	10
2.2.2. Polifenolna jedinjenja.....	12
2.3. Biološko dejstvo semena maline.....	16
2.4. Ekstrakcija ulja.....	20
2.4.1. Konvencionalne tehnike ekstrakcije.....	20
2.4.2. Ekstrakcija superkritičnim ugljen-dioksidom.....	22
2.5. Ekstrakcija polifenola.....	24
2.5.1. Ultrazvučna ekstrakcija.....	25
2.5.2. Mikrotalasna ekstrakcija.....	26
2.5.3. Ekstrakcija rastvaračem pod pritiskom.....	27
2.6. Metode za optimizaciju ekstrakcije.....	29
3. Eksperimentalni deo.....	30
3.1. Hemikalije i rastvori.....	30
3.2. Biljni materijal.....	31
3.3. Metode za ekstrakciju ulja.....	32
3.3.1. Čvrsto-tečna ekstrakcija.....	32
3.3.1.1. Ekstrakcija hloroformom.....	32
3.3.1.2. Ekstrakcija smešom dihlormetana i metanola.....	32
3.3.1.3. Ekstrakcija etanolom.....	33
3.3.2. Hladno ceđenje.....	33
3.3.3. Ekstrakcija <i>n</i> -heksanom po Soxhlet-u.....	33
3.3.4. Ekstrakcija superkritičnim ugljen-dioksidom.....	34
3.4. Metode za ekstrakciju polifenola.....	35
3.4.1. Čvrsto-tečna ekstrakcija etanolom.....	35
3.4.2. Čvrsto-tečna ekstrakcija kiselog hidrolizata metanolom.....	36
3.4.3. Ekstrakcija primenom rastvarača pod pritiskom.....	36
3.4.4. Mikrotalasna ekstrakcija.....	36
3.4.5. Ultrazvučna ekstrakcija.....	37
3.5. Metode za karakterizaciju ulja.....	39

3.5.1. Određivanje masnokiselinskog sastava ulja gasnom hromatografijom i funkcionalni indeksi...	39
3.5.2. Određivanje sadržaja tokoferola u ulju tečnom hromatografijom	40
3.5.3. Rancimatni test.....	42
3.6. Metode za karakterizaciju ekstrahovanih polifenola.....	43
3.6.1. Određivanje sadržaja elaginske kiseline tečnom hromatografijom.....	44
3.6.2. Spektrofotometrijsko određivanje redukcionog kapaciteta.....	44
3.6.3. Određivanje fenolnog profila tečnom hromatografijom sa masenim spektrometrom kao detektorom	45
3.7. Metode za određivanje bioaktivnosti ulja i ekstrahovanih polifenola.....	46
3.7.1. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidativne aktivnosti primenom 1,1-difenilpikril hidrazil-radikala.....	46
3.7.2. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidativne aktivnosti na diamonijum-2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat).....	47
3.7.3. Sposobnost redukcije Fe ³⁺ -jona	47
3.7.4. Određivanje antimikrobne aktivnosti	48
3.7.5. Određivanje antiproliferativne aktivnosti polifenolnog ekstrakta	50
3.8. Statistička analiza.....	51
4. Rezultati i diskusija.....	52
4.1. Karakterizacija ekstrahovanog ulja.....	52
4.1.1. Određivanje hemijskog sastava semena maline.....	52
4.1.2. Prinos ulja primenom različitih ekstrakcionih tehnika.....	52
4.1.3. Masnokiselinski sastav i indeksi funkcionalnosti	63
4.1.4. Sadržaj tokoferola.....	78
4.1.5. Antioksidativna aktivnost ulja	86
4.1.6. Optimizacija ekstrakcije ulja pomoću metode odzivne površine i eksperimentalna validacija ..	88
4.1.7. Oksidativna stabilnost ulja.....	89
4.1.8. Antimikrobna aktivnost ulja	90
4.2. Karakterizacija polifenolnih ekstrakata.....	90
4.2.1. Sadržaj elaginske kiseline	90
4.2.2. Redukcioni kapacitet	93
4.2.3. Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije pomoću metode odzivne površine i eksperimentalna validacija.....	94
4.2.4. Fenolni profil ekstrakta.....	102
4.2.5. Antioksidativna aktivnost ekstrakta.....	107
4.2.6. Antimikrobna aktivnost ekstrakta.....	109
4.2.7. Antiproliferativno dejstvo polifenolnog ekstrakta.....	111

5. Zaključak.....	114
6. Literatura.....	117
Biografija	141

Lista skraćenica korišćenih u disertaciji

16:0	Palmitinska kiselina
18:0	Stearinska kiselina
18:1(9)	Oleinska kiselina
18:2(6)	Linolna kiselina
18:3(3)	α -linolenska kiselina LNA; 18:3, ω -3
ABTS ⁺	Diamonijum-2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonatni) katjon
A _c	Apsorbancija kontrole
AdjR ²	Prilagođeni koeficijent determinacije
AI	Indeks aterogenosti (Atherogenicity Index)
ANOVA	Analiza varijanse (Analysis of variance)
A _t	Apsorbancija test uzorka
BAP	Krvni agar (Blood Agar Plates)
CFU	Broj bakterijskih kolonija (Colony Forming Unit)
CV	Koeficijent varijacije
DAD	Detektor sa nizom dioda (Diode Array Detector)
DMEM	Dulbekov modifikovani esencijalni medijum (Dulbecco's Modified Essential Medium)
DMSO	Dimetil-sulfoksid
DPPH [·]	1,1-difenil-pikril-hidrazil-radikal
EA	Elaginska kiselina (Ellagic Acid)
ESCF	Evropski naučni komitet za hranu (European Scientific Committee for Food)
FCS	Fetalni teleći serum (Fetal Calf Serum)
FLD	Fluorescentna detekcija (Fluorescence Detection)
FRAP	Moć redukcije jona gvožđa Fe ³⁺ (Ferric Reducing Antioxidant Power)
GAE	Ekvivalent galne kiseline (Galic Acid Equivalent)
GC-FID	Gasna hromatografija sa plameno-jonizacionim detektorom (Gas Chromatography with Flame Ionization Detector)
HeLa	Ćelijska linija karcinoma grlića materice (Henrietta Lacks)

HHDP	Heksahidroksidifenilna kiselina (Hexahydroxydiphenic acid)
H/H	Odnos hipoholesterolskih i hiperholesterolskih masnih kiselina
HPLC	Tečna hromatografija visoke efikasnosti (High Performance Liquid Chromatography)
HSD	Značajna razlika prema Tukey-ovom testu (Honestly Significant Difference)
IC ₅₀	Koncentracija koja inhibira rast ćelija za 50 %
MBC	Minimalna baktericidna koncentracija (Minimum Bactericidal Concentration)
MCF7	Ćelijska linija adenokarcinoma dojke (Michigan Cancer Foundation-7)
MHB	Mueller-Hinton bujon
MIC	Minimalna inhibitorna koncentracija (Minimum Inhibitory Concentration)
MRC-5	Ćelijska linija humanih fetalnih fibroblasta pluća (Medical Research Council, cell strain 5)
NCCLS	Nacionalni komitet za kliničke laboratorijske standarde (National Committee for Clinical Laboratory Standards)
NIH	Nacionalni zdravstveni Institut (National Institutes of Health)
PUFA	Polinezasićene masne kiseline (PolyUnsaturated Fatty Acids)
R ²	Koeficijent determinacije
RC	Redukcioni kapacitet (Reducing capacity)
RSM	Metodologija odzivnih površina (Response Surface Methodology)
SFA	Zasićene masne kiseline (Saturated Fatty Acids)
SFE	Ekstrakcija superkritičnim fluidom (Supercritical Fluid Extraction)
SRB	Sulforodamin B
SZO	Svetska zdravstvena organizacija (World Health Organization)
TE	Troloks ekvivalent
TI	Indeks trombogenosti (Thrombogenicity Index)

TTC	Ukupni sadržaj tokoferola (Total Tocopherols Content)
UAE	Ultrazvučna ekstrakcija (Ultrasound Assisted Extraction)
Y	Prinos (Yield)
α -TOC	α -tokoferol
β -TOC	β -tokoferol
γ -TOC	γ -tokoferol
δ -TOC	δ -tokoferol

1. Uvod

Nagli porast svetske populacije je doveo do potrebe za povećanjem proizvodnje hrane. Koncept proizvodnje funkcionalne hrane koji podrazumeva proizvodnju prehrambenih proizvoda koji mogu da poboljšaju opšte zdravstveno stanje i smanje rizik od pojave hroničnih bolesti sve više uzima maha na svetskom tržištu (Doyon i Labrecque, 2008). S obzirom da povećanje proizvodnje funkcionalne hrane u velikoj meri može rešiti ovaj problem, neophodno je izgraditi veliki broj održivih sistema za proizvodnju funkcionalne hrane i na taj način obezbediti dovoljnu količinu funkcionalnih prehrambenih proizvoda (Tripathi i dr., 2019). Zatim, nova istraživanja u pogledu proizvodnje funkcionalne hrane su zasnovana na tome da se u hranu uvode funkcionalni sastojci, a da se iz nje eliminišu ili smanje količine sastojaka koji imaju negativno dejstvo na zdravlje ljudi (Šarić, 2016). Takođe, sve je više istraživanja koja upućuju na benefite upotrebe prehrambenih suplemenata u ishrani, koji imaju ulogu da povećaju kvalitet i zdravstvene i nutritivne vrednosti hrane. U suplemente po definiciji spadaju vitamini, minerali, aminokiseline i njihovi koncentracije, metaboliti i ekstrakti (Domínguez Díaz i dr., 2020).

S razvojem prehrambene industrije, povećava se količina sporednih proizvoda i otpada, koji ima veoma izražen negativan uticaj na životnu sredinu, a čije se odlaganje ili uništavanje ne sprovodi u potpunosti ispravno (Giroto i dr., 2015). Poslednjih godina, sve veći broj istraživanja ukazuje na mogućnosti valorizacije nusproizvoda u prehrambenoj industriji u svrhu dobijanja funkcionalne hrane, koja pored nutritivnih, može da poseduje i lekovite karakteristike. Prema tome, nusproizvod koji se dobija prilikom proizvodnje hrane biljnog porekla, ima veliki potencijal za iskorišćenje u vidu dobijanja velikog broja bioaktivnih jedinjenja, u zavisnosti od same sirovine.

Ekonomске analize koje se odnose na industrijsku preradu voća u Republici Srbiji nedvosmisleno ukazuju na porast proizvodnje voćnih sokova, za razliku od ostalih voćnih prerađevina čija se proizvodnja smanjuje. Republika Srbija je jedan od najvećih svetskih proizvođača i izvoznika maline (Faostat, 2021), a proizvodnja prehrambenih proizvoda od maline (posebno kašastih sokova) generiše velike količine semena koje predstavlja nusproizvod ili otpad. Istraživanja su pokazala da je seme maline bogato značajnom

količinom ulja, koje u zavisnosti od sorte, može da sadrži značajne količine tokoferola, kao i zasićenih i nezasićenih masnih kiselina (Oomah i dr., 2000). Takođe, seme maline sadrži najveći procenat polifenolnih jedinjenja u odnosu na ostali deo ploda maline, poznatih po svom biološkom dejstvu (Daniel i dr., 1989). Imajući to u vidu, ovako dobijeni nusproizvod predstavlja značajan izvor bioaktivnih jedinjenja koja bi potencijalno mogla da se iskoriste u svrhu primene u funkcionalnoj hrani i dijetetskim suplementima.

Glavni cilj istraživanja ove doktorske disertacije jeste valorizacija semena maline sa endokarpom (u daljem tekstu: seme) koji predstavlja nusproizvod, odnosno otpad pri proizvodnji kaše ili soka od maline ekstrakcijom visoko-kvalitetnog ulja, upotrebom različitih ekstrakcionih tehnika, kao i ekstrakcija elaginske kiseline, polifenolnog jedinjenja poznatog po svojim biološkim aktivnostima. Takođe, određivanje biološke aktivnosti ekstrakata predstavlja jedan od ciljeva istraživanja. Za ove svrhe korišćeno je seme dobijeno od tri sorte maline (Vilamet, Polka i Miker).

Odabranim ekstrakcionim tehnikama (ekstrakcija hladnim ceđenjem, čvrsto-tečna ekstrakcija hloroformom, smešom dihlormetana i metanola i etanolom, ekstrakcija *n*-heksanom po Soxhlet-u i ekstrakcija superkritičnim ugljen-dioksidom) ekstrahovano je ulje iz semena maline, od kojih je savremena tehnika ekstrakcije superkritičnim ugljen-dioksidom optimizovana pomoću metodologije odzivnih površina (RSM) u vidu definisanja parametara ekstrakcije, a u cilju dobijanja maksimalnog prinosa ekstrakcije, ciljnih jedinjenja i biološke aktivnosti.

Ostatak dobijen nakon ekstrakcije ulja, odnosno obezmašćeno seme, je takođe iskorišćeno kao sirovina za ekstrakciju elaginske kiseline primenom različitih ekstrakcionih tehnika (čvrsto-tečna ekstrakcija etanolom, ultrazvučna ekstrakcija, mikrotalasna ekstrakcija i ekstrakcija rastvaračem pod pritiskom), od kojih je ekstrakcija ultrazvukom optimizovana pomoću RSM u cilju dobijanja najveće koncentracije elaginske kiseline u ekstraktu, dok je ekstrakcija etanolom optimizovana u cilju određivanja optimalne polarnosti rastvarača radi dobijanja najvećeg prinosa elaginske kiseline (EA). Metoda ekstrakcije ultrazvukom je posebno zanimljiva za optimizaciju, jer u literaturi nema podataka o optimizaciji ekstrakcije EA iz semena maline mikrotalasnom ekstrakcijom, dok za ostale metode uglavnom postoje podaci o optimalnim uslovima.

Testirana je antioksidativna, antimikrobna i antiproliferativna aktivnost ekstrakata EA. Krajnji cilj istraživanja predstavlja definisanje sastava i bioaktivnosti ekstrakata semena

maline u cilju njihovog korišćenja kao dodatka funkcionalnoj hrani ili dijetetskim suplementima.

2. Teorijski deo

2.1. Malina (*Rubus idaeus* L.)

Malina (Slika 1) je višegodišnja biljka, žbunastog ili polužbunastog rasta, koja pripada porodici ruža (Rosaceae) i rodu *Rubus*, i može dostići visinu i do 3,5 m. S obzirom na mogućnost prilagođavanja maline različitim klimatskim uslovima i uslovima zemljišta, može se gajiti na različitim terenima i područjima. Za ljudsku upotrebu, plod maline se obično koristi u svežem stanju, ali se može koristiti i kao sirovina za proizvodnju različitih proizvoda, kao što su sokovi, kaše, džemovi, sirupi i vino (Šarić, 2016).



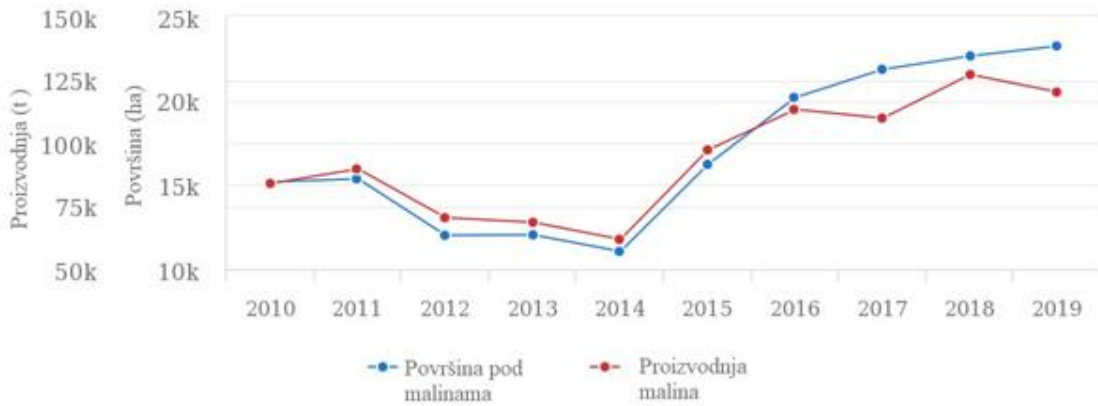
Slika 1. Malina (*Rubus idaeus* L.)
(Šarić, 2016)

Malina ima dugu istoriju uzgoja i potrošnje u Evropi. Danas je svetska proizvodnja maline fokusirana na istočnu Evropu i Rusiju, pri čemu je Rusija vodeći proizvođač (Faostat, 2021). Plod maline može imati nekoliko boja, uključujući crvenu i žutu (obe *Rubus idaeus*), ljubičastu (*Rubus neglectus*) i crnu (*Rubus occidentalis*), ali crvena malina je najrasprostranjenija vrsta, s obzirom na bolju otpornost na bolesti i veću produktivnost u odnosu na druge vrste (Šarić, 2016).

Malina se samo u malom procentu konzumira sveža, dok se uglavnom proizvedene maline smrjavaju ili prerađuju u džemove i druge proizvode. Takođe, malina je izvor osnovnih vitamina i minerala i drugih jedinjenja koja mogu biti zdravstveno korisna. Pored upotrebe ploda maline kao hrane, mnogi delovi biljke maline, kao što su list i koren, takođe se koriste u medicinske svrhe (Cho i dr., 2015; Ponder i Hallmann, 2019).

Republika Srbija je jedan od najvećih svetskih proizvođača i izvoznika maline sa proizvodnjom od 120.058 tona sveže maline u toku 2019. godine (Faostat, 2021) (Grafik 1). Uzimajući u obzir klimatske uslove i uslove zemljišta, u Republici Srbiji se najviše uzgaja

malina sorte Vilamet, i to na 95 % površine pod malinom, a preostalih 5 % pripada otalim sortama poput Miker, Polka, Tjulamin itd.



Grafik 1. Godišnja proizvodnja maline u Republici Srbiji u periodu od 2010. - 2019. godine (Faostat, 2021)

Sam plod maline je specifičan po svojim biološkim aktivnostima, kao što su antioksidativno i antiinflamatorno dejstvo, zbog svog specifičnog hemijskog sastava. Razne hranljive materije i druga potencijalno korisna jedinjenja nalaze se u plodu maline, uključujući vitamin E, vitamin C, minerale, pojedine aminokiseline, esencijalne masne kiseline i dijetetska vlakna (Šarić, 2016) (Tabela 1). Ove hranljive materije ne samo da određuju zdravstvena svojstva ploda već mogu uticati i na njegov ukus, teksturu i izgled. Kao i kod drugog voća, voda je glavni sastojak maline. Šećeri, naročito glukoza i fruktoza, predstavljaju glavne rastvorljive čvrste materije. Takođe, plod maline sadrži značajan procenat dijetetskih vlakana. Takođe, malina je bogata i proteinima, u čiji sastav ulaze aminokiseline lizin, arginin, alanin, leucin, izoleucin i tirozin (Jee Joo, 1978; Kim i dr., 2015). Što se tiče mineralnog sastava, najzastupljeniji je kalijum, dok se fosfor, kalcijum, magnezijum, mangan, cink i natrijum, takođe nalaze u plodu maline u značajnim količinama (Nile i Park, 2014). Pored svog hranljivog sastava, maline su i odličan izvor neesencijalnih fitohemikalija kao što su lutein i zeksantin (Zhang i dr., 2019), koje nisu neophodne za život, ali mogu da poboljšaju sveukupno zdravstveno stanje ako se konzumiraju u odgovarajućim količinama. Osim toga, malina sadrži razna monomerna i polimerna fenolna jedinjenja. Monomerna jedinjenja koja se nalaze u malini uključuju flavonoide, fenolne kiseline i karotenoide (Kim i dr., 2015).

Tabela 1. Hemijski sastav ploda maline (Šarić, 2016)

Proteini (g/100 g)	Masti (g/100 g)	Ugljeni hidrati (g/100 g)	Dijetetska vlakna (g/100 g)	Pepeo (g/100 g)	Energetska vrednost (kcal/100 g)
1,20	0,65	11,94	6,50	/	52,00

Osim po biološkim osobinama, malina je značajna i sa ekonomskog aspekta. S obzirom na to, intenziviranjem njene proizvodnje, u smislu visoke rodnosti na ovom podneblju, kao i izvoza na inostrano tržište, malina je postala jedna od najrentabilnijih voćnih kultura u Republici Srbiji (Šarić, 2016).

2.2. Hemijski sastav semena maline

Uzimajući u obzir da je malina jedna od najviše gajenih voćnih kultura u Srbiji (Radosavljević, 2008), kao i da se prehrambeni proizvodi od maline u velikoj količini izvoze na inostrano tržište, porasla je proizvodnja istih. Nakon industrijske proizvodnje prehrambenih proizvoda od ploda maline, kao što su sokovi, džemovi ili kaše, zaostaje velika količina semena koje se smatra nusproizvodom ili otpadom.

Ovakvi sporedni proizvodi su poslednjih godina u sferi istraživanja, iz razloga što je dokazano da upravo u njima zaostaje značajna količina bioaktivnih komponenti koje sadrži plod. Osim toga, ovakav otpad predstavlja veliki ekonomski i ekološki problem, te postoji potreba da se pronađu adekvatni načini da se sporedni proizvodi maline ponovo koriste kao sirovina za dobijanje komponenata od kojih je moguće dobiti funkcionalnu hranu, ili dijetetske suplemente koje je dalje moguće koristiti u ljudskoj ishrani. Korišćenjem valorizovanih komponenata se stvara nova vrednost nusproizvoda, a u isto vreme se smanjuje negativni ekološki uticaj.

Maseni udeo semena u plodu maline je oko 10 % i ono zaostaje nakon ceđenja soka ili kaše. Istraživanja koja su sprovedeli Kosmala i dr. (2015) ukazuju na to da najveći maseni udeo semena maline imaju dijetetska vlakna. Zatim, seme maline sadrži visok procenat ulja, proteina i šećera. Takođe, seme maline sadrži značajnu količinu polifenola, od kojih su najzastupljeniji elagitanini, koji su po istraživanju Kosmala i dr. (2015) zastupljeni do 81 % sadržaja svih prisutnih polifenola.

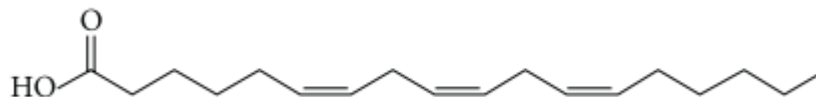
Ovakav hemijski sastav semena maline ukazuje na mogućnost valorizacije istog, što upućuje na potencijalnu mogućnost iskorišćenja ovog nusproizvoda u cilju dobijanja dodatka funkcionalnoj hrani.

2.2.1. Ulje

S obzirom na hemijski sastav semena maline, moguće ga je iskoristiti kao sirovinu za ekstrakciju značajne količine ulja sa visokim sadržajem esencijalnih masnih kiselina. Seme maline sadrži između 10 % i 23 % ulja (Oomah i dr., 2000), u zavisnosti od sorte maline i klimatskih uslova na kojima je gajena, dok prinosa ulja zavisi od primenjene ekstrakcione tehnike. Ulje semena maline je blago zamućeno, žuto-zlatne boje, koja potiče od karotenoida. Ova nijansa žute boje ulja daje ulju karakterističan izgled poput maslaca, bez potrebe dodavanja konvencionalne boje koja se često koristi u prehrambenoj industriji (Dimić i dr., 2012).

Masne kiseline mogu biti zasićene, mononezasićene ili polinezasićene, u zavisnosti od broja dvostrukih veza. Takođe se razlikuju po dužini lanca, odnosno, imaju lanac od 4–28 atoma ugljenika. Dugolančane masne kiseline su masne kiseline sa lancima od 16 ili više ugljenika (Beerman i dr., 2003). Ova grupa masnih kiselina uključuje polinezasićene masne kiseline, koje sadrže dve ili više dvostrukih veza. Postoje dve glavne porodice polinezasićenih masnih kiselina i to su ω -3 i ω -6 masne kiseline. Budući da ljudski organizam ne može da sintetiše masne kiseline sa dvostrukom vezom u položaju 6 ili nižem, ω -3 i ω -6 polinezasićene masne kiseline su esencijalne masne kiseline neophodne za ljudsko zdravlje i moraju se unositi putem ishrane. Istraživanja pokazuju relativno visok sadržaj ω -3 masnih kiselina u ulju semena maline (Mazurek i dr., 2017; Parry i dr., 2005). Ulje semena maline je bogato ω -3 masnim kiselinama, jer sadrži oko 30 % α -linolenske kiseline (Parry i Yu, 2004). Isto tako, nađeno je da su linolna, α -linolenska, oleinska i palmitinska kiselina uglavnom najzastupljenije masne kiseline iz semenskog ulja 22 vrste bobičastog voća uključujući i malinu (Johansson i dr., 1997), a glavna ω -3 masna kiselina u biljkama je α -linolenska kiselina čija je strukturna formula prikazana na slici 2. Dalje, α -linolenska kiselina je jedina ω -3 masna kiselina koja može biti prisutna u biljnim materijalima, uključujući i ulje dobijeno iz semena različitih biljnih vrsta (Parry i Yu, 2004). Osim ove masne kiseline, u ω -3 masne kiseline spadaju i dokozaheksaenska i ikozapentaenska kiselina koje se mogu pronaći u ribljem ulju i ulju od algi. Prethodna istraživanja pokazuju da se organski rastvarači, npr. *n*-heksan (Oomah i dr., 2000) ili ekstrakcija hladnim presovanjem može koristiti za ekstrakciju ulja iz semena maline prilikom čega bi se dobila značajna količina ulja. Stoga se ulje semena

maline može koristiti kao značajan, alternativni izvor ω -3 masnih kiselina. Ulje semena maline pokazalo je dobre efekte na aktivnosti intraćelijskih antioksidativnih enzima i ima uticaj da štiti jetru od oksidativnog stresa inhibicijom proteinskih kinaza (Teng i dr., 2017). Stoga bi ekstrakcija ulja iz semena maline, otpadnog materijala, mogla dovesti do proizvodnje korisnog sastojka hrane, kao i pomoći u rešavanju ekoloških problema zaštite okoline i proširiti tržište maline.



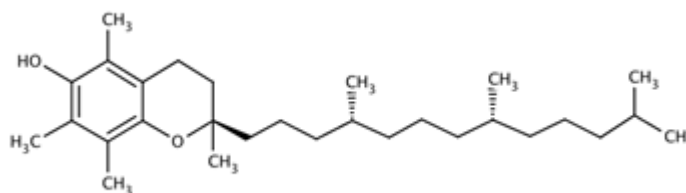
Slika 2. Strukturna formula α -linolenske kiseline (Blondeau i dr., 2015)

Pored masnih kiselina, drugi značajan sastojak ulja je vitamin E, koji se javlja u obliku osam različitih jedinjenja – α -, β -, γ - i δ -tokoferol i α -, β -, γ - i δ -tokotrienol (Yang i dr., 2020), pri čemu se u semenu maline mogu naći α -, γ - i δ - izomeri tokoferola (Oomah i dr., 2000). Tokoferoli se sastoje od dva prstena: jednog fenolnog i jednog heterocikličnog, kao i zasićenog repa i razlikuju se samo po broju metil-supstituenata i obrascu supstitucije u fenolni prsten (Kamal-Eldin i Appelqvist, 1996).

Antioksidativna aktivnost predstavlja sposobnost određenih jedinjenja da sprečavaju štetne efekte slobodnih radikala i drugih oksidanasa, odgovornih za pojavu različitih bolesti i stanja kao što su kancer, kardiovaskularne bolesti, ateroskleroza i poremećaji nervnog sistema (Alam i dr., 2013). Relativna antioksidativna aktivnost tokoferola generalno zavisi od sistema proizvodnje hrane. Rezultati istraživanja o antioksidativnoj aktivnosti različitih tokoferola u prehrambenim proizvodima su različiti jer su eksperimenti uglavnom bili fokusirani na različite namirnice i metode za određivanje antioksidativne aktivnosti. U zavisnosti od sistema proizvodnje hrane, u nekim slučajevima tokoferoli su ispoljili višu antioksidativnu aktivnost od sintetičkih antioksidanasa, dok su u nekim drugim sistemima proizvodnje hrane sintetički antioksidansi bili efikasniji i time produžili stabilnost hrane u odnosu na onu koja sadrži tokoferole. α -Tokoferoli su pokazali mnogo višu antioksidativnu aktivnost u odnosu na γ -tokoferole u uljima i mastima (Seppanen i dr., 2010). Takođe, vitamin E dobija sve veću pažnju u kozmetičkoj industriji i kliničkoj dermatologiji zbog osobine fotoprotekcije i antioksidativnih svojstava (Thiele i dr., 2005). Za razliku od bilo kog

drugog antioksidansa, evolutivni, genetski i biohemijski dokazi ukazuju na to da ćelijska signalizacija predstavlja glavnu aktivnost α -tokoferola u ćelijskom sistemu (Azzi, 2007). α -Tokoferol (Slika 3) igra značajnu ulogu u održavanju integriteta dugolančanih polinezasićenih masnih kiselina u ćelijskim membranama (Saini i Keum, 2016). Dakle, bioaktivni lipidi, kao što su tokoferoli, su važni signalni molekuli koji različito menjaju nivoe kao odgovor na spoljno okruženje, u zavisnosti od obima i vrste stimulacija. Ova pojava je ključna za unutarćelijske interakcije kojima upravlja α -tokoferol (Traber, 2007). Ovim mehanizmom α -tokoferol igra ključnu ulogu u toleranciji biljaka na stres. Pretpostavlja se da povećani nivo α -tokoferola doprinosi toleranciji na stres, dok niži nivo doprinosi oksidativnom oštećenju biljaka (Munné-Bosch, 2005).

Istraživanja su pokazala visok sadržaj tokoferola u ulju semena maline (Oomah i dr., 2000). Budući da tokoferole sintetišu samo biljke, ova jedinjenja su veoma važan hranljivi sastojak za ljude i životinje. Tokoferoli su prisutni u uljima dobijenim iz semena, zatim u lišću i drugim zelenim delovima višeg nivoa biljaka. α -Tokoferol je prisutan uglavnom u hloroplastima biljnih ćelija, dok se β -, γ - i δ -izomeri obično nalaze izvan ovih organela. Sadržaj tokoferola u hrani takođe je važan za zaštitu lipida u hrani od autooksidacije i, samim tim, za povećanje njihove dužine trajanja ili upotrebljivosti i njihove vrednosti kao zdrave hrane. Poznato je da „apsolutne“ i „relativne“ *in vitro* aktivnosti tokoferola ne zavise isključivo od njihove apsolutne hemijske reaktivnosti sa slobodnim radikalima, već i od dejstva na mnoge druge moguće neželjene reakcije.



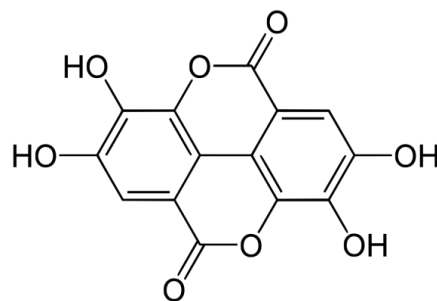
Slika 3. Strukturna formula α -tokoferola (Cooney i dr., 1993)

2.2.2. Polifenolna jedinjenja

Polifenoli su grupa organskih jedinjenja koje karakteriše prisustvo fenolnih jedinica. Ova jedinjenja se često mogu naći u biljkama i značajna su zbog svojih bioloških svojstava. Jedna od najznačajnijih bioloških osobina polifenola jeste antioksidativno dejstvo koje ova

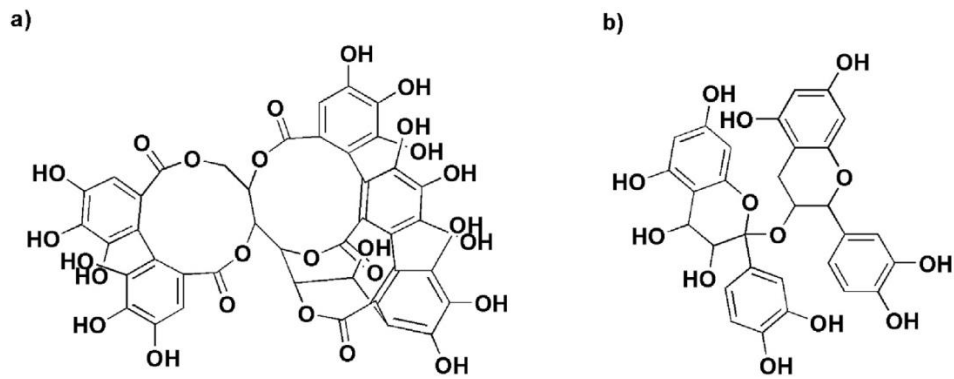
jedinjenja ispoljavaju sprečavanjem oksidativne degradacije lipida i na taj način poboljšavaju nutritivna svojstva hrane (Kähkönen i dr., 1999). S obzirom da su polifenoli velika grupa jedinjenja, mogu se podeliti na osnovu broja fenolnih prstenova i strukturnih elemenata koji spajaju ove prstenove, što dovodi do podele na fenolne kiseline, flavonoide, lignane i stilbene (El Gharras, 2009). Generalno, glavna fenolna jedinjenja koja se nalaze u semenu maline su elagitanini i antocijani, dok su hidroksicimetne kiseline i flavonoli sporedni fenolni sastojci (Määttä-Riihinen i dr., 2004). Osim toga, seme maline sadrži i male količine drugih flavonoida kao što su katehin, epikatehin, kvercetin i kemferol (Zafrilla i dr., 2001). Koncentracija fenolnih kiselina u malinama je u opsegu 26–29 mg/100 g svežih malina. Međutim, procenat slobodnih fenolnih kiselina je niži od 10 % ukupnog sadržaja fenolnih kiselina (Bobinaite i dr., 2015).

Nakon ekstrakcije ulja iz semena maline zaostaje obezmašćeno seme maline koje se takođe može valorizovati na osnovu sadržaja EA koja je poznata po svojim biološkim svojstvima (Puupponen-Pimia i dr., 2001), a koja su opisana u sledećem poglavlju o biološkim dejstvu semena maline. Pored toga, studije pokazuju da se približno 88 % EA u malini nalazi u samom semenu (Daniel i dr., 1989). Zatim, istraživanja pokazuju da je u semenu maline, EA prisutna u tri različita oblika, kao slobodna EA (Slika 4), glikozid elaginske kiseline i u vidu elagitanina (Zafrilla i dr., 2001).



Slika 4. Strukturna formula elaginske kiseline (Barch i dr., 1996)

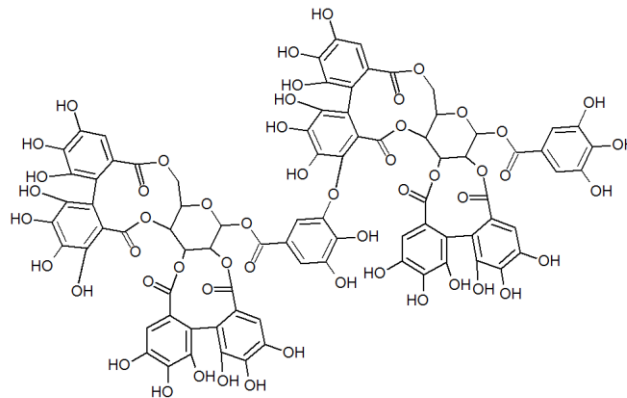
Tanini koji se mogu podeliti na hidrolizujuće i kondenzovane, čije se strukture mogu videti na slici 5, su široko rasprostranjeni u biljnom carstvu i smatra se da se biosintetišu i akumuliraju kao odbrambena jedinjenja protiv mikroorganizama, biljojeda i oksidativnog stresa (Barbehenn i dr., 2006).



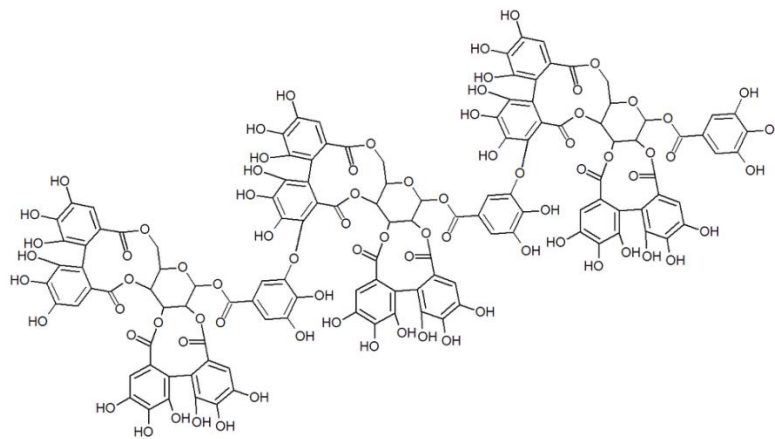
Slika 5. Primeri strukturnih formula: a) hidrolizujućeg i b) kondenzovanog tanina (Alfei i dr., 2019)

Elagitanini su često identifikovani kao aktivne komponente lekovitih biljaka. Oni spadaju u tzv. hidrolizujuće tanine, s obzirom da su podložni hidrolizi. S druge strane, postoje elagitanini koji se ne mogu hidrolizovati zbog C - C kuplovanja polifenolnog ostatka, ali se ipak ubrajaju u hidrolizujuće iz istorijskih razloga (Landete, 2011). Nivo slobodne EA je uglavnom nizak u plodovima maline, dok je glavni deo EA prisutan u obliku elagitanina rastvorljivih u vodi, u vakuolama biljne ćelije (Määttä-Riihinen i dr., 2004). Relativni sadržaj slobodne EA čini samo 1–2 % ukupnog sadržaja EA (Bobinaite i dr., 2012; Koponen i dr., 2007). Hidrolizom elagitanina se oslobađa heksahidroksidifenilna kiselina (HHDP) čijom spontanom laktonizacijom nastaje elaginska kiselina (Alfei i dr., 2019). Ova reakcija se obično koristi za detekciju i kvantifikaciju prehrambenih elagitanina (Koponen i dr., 2007). Najzastupljeniji elagitanini u malini su sanguin H-6, sanguin H-10 (Slika 6a), kao i izomeri bis-HHDP-glukoze, lambertianin C (Slika 6b) i lambertianin D (Landete, 2011; Majewski i dr., 2020).

a)



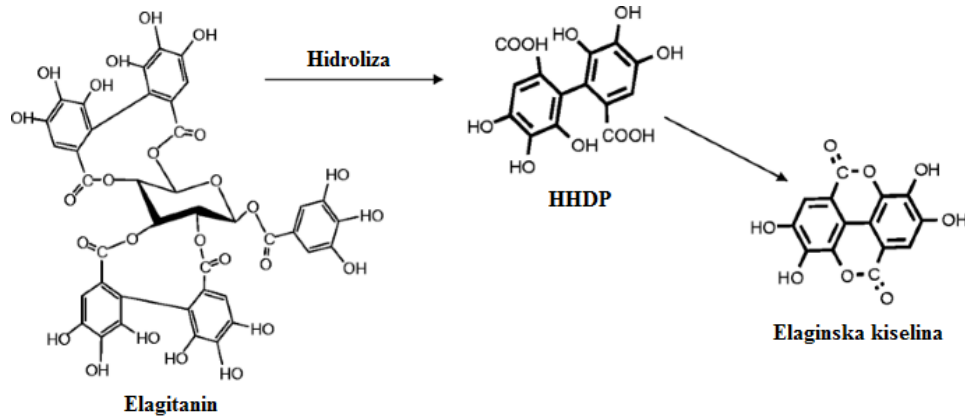
b)



Slika 6. Strukturne formule najzastupljenijih elagitanina u malini: a) sanguin H-10 i b) lambertianin C (Landete, 2011)

Klasična tehnika za ekstrakciju EA iz semena maline je čvrsto-tečna ekstrakcija upotrebom metanola (MeOH) kao rastvarača (Daniel i dr., 1989). Kako bi se ekstrahovala ukupna EA iz semena maline, potrebno je primeniti hidrolizu hlorovodoničnom kiselinom (HCl) (Slika 7). Korišćenje MeOH i HCl kao sredstva za ekstrakciju EA, s obzirom na njihovu izuzetnu toksičnost po ljudski organizam, kao i sa aspekta zaštite životne sredine, čini ekstrakte neupotrebljivim za ljudsku ishranu. U tom smislu, inovativne tehnike ekstrakcije, poput ultrazvučne, mikrotalasne i ekstrakcije rastvaračima pod pritiskom, u kombinaciji sa „zelenim” rastvaračima, kao što je etanol, se pokazuju kao bolje u odnosu na klasičnu čvrsto-tečnu ekstrakciju (Pavlić, 2017). Sve ove tehnike ekstrakcije se koriste kako bi se povećao prinos ciljnih jedinjenja, smanjila potrošnja energije, redukovalo trajanje ekstrakcije i upotreba rastvarača, kao i minimalizovao uticaj na životnu sredinu korišćenjem

„zelenih” rastvarača (Zeković i dr., 2017). U novijim istraživanjima, te tehnike su korišćene za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz različitih biljnih materijala, poput mente, aronije i pšeničnih klica (Pavlić i dr., 2019; Ramić i dr., 2015; Teslić i dr., 2019).



Slika 7. Hidroliza elagitanina do elaginske kiseline (Aguilera-Carbo i dr., 2008)

2.3. Biološko dejstvo semena maline

Prirodna, bezbedna i lekovita hrana u poslednje vreme izuzetno dobija na značaju u redovnoj zdravstvenoj zaštiti (Chen i dr., 2018; Vinayagam i dr., 2017). U novijim istraživanjima identifikovana su potencijalno korisna jedinjenja i hemijska svojstva maline i ispitani su njihovi efekti na zdravlje na ćelijskim kulturama, životinjskim modelima i u ograničenom stepenu kod ljudi. Na osnovu ovih studija, maline, zahvaljujući jedinjenjima koja sadrže, imaju širok spektar potencijalnih dejstava, uključujući antikancerogeno, antidijabetičko, antihipertenzivno, antikoagulantno, antiinflamatorno, antivirusno, antidepresivno i neuroprotektivno dejstvo (Yao i dr., 2021). Na ove efekte utiče hemijski sastav maline, koji je određen sortom maline, stepenom rasta, uslovima skladištenja i prerade, pa do individualnih razlika u genetici i crevnoj mikrobioti potrošača (Kim i dr., 2015).

Sve veći broj rezultata istraživanja u vezi upotrebe ulja od semena maline kao dijetetskog suplementa, pokazuje pozitivan uticaj na zdravlje ljudi (Pieszka i dr., 2013). S obzirom na hemijski sastav semena maline, uključujući masnokiselinski sastav i sadržaj EA, može se govoriti o potencijalnom biološkom dejstvu semena maline.

Prethodna istraživanja objasnila su biološko dejstvo masnih kiselina. Kada se unesu u organizam, najveće količine apsorbovanih masnih kiselina se inkorporiraju u triacilglicerole i transportuju iz tankog creva hilomikronima i/ili lipoproteinima veoma niske gustine

(Palmquist, 2009). Prethodna istraživanja su se bavila ispitivanjem odnosa ω -6/ ω -3 masnih kiselina u ljudskoj ishrani i njegovim uticajem na zdravlje. Rezultati tih istraživanja su pokazala da je taj odnos 10:1, pa čak i 25:1 (Simopoulos, 2002). Međutim, u velikom broju istraživanja je za objašnjenje uticaja masnih kiselina na zdravlje umesto odnosa ω -6/ ω -3, posebno ispitivan uticaj količine unosa ω -6 i posebno unosa ω -3 masnih kiselina. Ovom metodologijom se došlo do zaključka da veći uticaj na zdravlje ima unos polinezasićenih masnih kiselina, posebno ω -3 masnih kiselina, nego odnos ω -6/ ω -3 (Palmquist, 2009). S druge strane, povećani unos ω -3 masnih kiselina smanjuje uticaj ω -6 masnih kiselina u organizmu, te je odnos ω -6/ ω -3, ipak donekle značajan (Goyens i dr., 2006). Poznato je da polinezasićene masne kiseline imaju uticaj na fluidnost ćelijske membrane. Najveći efekat na fluidnost ima konverzija prve dvostruke veze u zasićenu masnu kiselinu. Većina ćelijskih membrana se sastoji od oko 50 % zasićenih masnih kiselina, dok su polinezasićene masne kiseline koncentrisane u fosfolipidima unutrašnjeg sloja ćelijske membrane. Zasićene masne kiseline, holesterol i sfingomijelin se nalaze u takozvanim ćelijskim "splavovima", na spoljašnjem membranskom sloju (Pike, 2006). Ovi ćelijski "splavovi" imaju ulogu u regulaciji ćelijskih receptora (Li i dr., 2005). ω -6 i ω -3 masne kiseline su prekursori ikozanoida i prostanoida, biološki aktivnih lipidnih medijatora. To su velike grupe jedinjenja koja imaju širok opseg bioaktivnosti (Palmquist, 2009). Ova jedinjenja imaju značajnu ulogu u regulaciji inflamatornih procesa i balansiranim unosom ω -6 i ω -3 masnih kiselina moguće je uticati na razvoj i snagu odgovora organizma na inflamatorne procese (Simopoulos, 2002). Povećani unos α -linolenske kiseline povezan je sa smanjenjem nivoa holesterola u krvi, smanjenjem rizika od srčanog udara i smanjenjem rasta karcinoma dojke, debelog creva i prostate (Chavarro i dr., 2007; Menendez i dr., 2006; McEntee i dr., 2008; Tanaka i dr., 2008). α -linolenska kiselina takođe ima uticaj na snižavanje krvnog pritiska kao i nivoa triglicerida u krvi (Oomah i Mazza, 1999). S druge strane, primena linolne kiseline postaje sve popularnija u kozmetičkoj industriji zbog svojih korisnih uticaja na kožu. Istraživanje ukazuje na efikasna svojstva linolne kiseline kada se lokalno nanosi na kožu, tj. ispoljava antiinflamatorna svojstva (Zhao i dr., 2005). Takođe je utvrđeno da linolna kiselina aktivno utiče na snižavanje nivoa holesterola (Hegsted i dr., 1993). Na osnovu veze između unosa linolne kiseline i koncentracije holesterola u plazmi i veze između koncentracije holesterola u plazmi i incidence koronarnih bolesti, savetodavne agencije u zapadnim zemljama već dugo preporučuju povećanje unosa linolne kiseline na 5–10 % dnevnog unosa energije (Raatz i dr., 2018). Zatim, dugolančane ω -3 masne kiseline imaju sposobnost sprečavanja i lečenja hipertenzije, artritisa, zapaljenskih i autoimunih poremećaja, kao i raka (Berquin i dr., 2008;

Chapkin i dr., 2008; Endres i dr., 1995; Judé i dr., 2006). Takođe, karakteristični efekat ovih masnih kiselina je smanjenje koncentracije triglicerida u plazmi i shodno tome – smanjenje rizika od fatalnih koronarnih bolesti. Prema Evropskom naučnom komitetu za hranu (ESCF), 2 % od ukupnog broja dnevnog unosa energije treba da potiče od ω -6 i 0,5 % od ω -3 polinezasićenih masnih kiselina (European Scientific Committee on Food, 1993), što odgovara dnevnom unosu od približno 6 g dnevno za žene (5 g ω -6 i 1 g ω -3) i 8 g dnevno za muškarce (6,4 g ω -6 i 1,6 g ω -3) (NIH, 2021). Takođe, neumeren unos masnih kiselina, a smanjen unos dijetetskih vlakana povećava rizik od gojaznosti, dijabetesa tipa 2, kardiovaskularnih i mnogih drugih bolesti (Astrup i dr., 2011). S druge strane, Svetska zdravstvena organizacija (SZO) preporučuje unos 2,5–9 % ω -6 i 0,5–2 % ω -3 masnih kiselina u odnosu na ukupan dnevni unos energije. Ova razlika između preporuka ESCF-a i SZO-a nastaje usled različitih nutricionističkih ciljeva, gde se ESCF preporuka zasniva na količinama potrebnim za ispravljanje klinički očiglednih nedostataka, dok se preporuke SZO zasnivaju na očuvanju kardiovaskularnog zdravlja i normalnog neurorazvoja (De Souza i dr., 2015). Uzimajući u obzir prisustvo masnih kiselina u ulju semena maline, ono se može koristiti kao dodatak ishrani i ima pozitivan efekat u lečenju mnogih bolesti (Traber, 2007).

Osim masnih kiselina, ulje dobijeno iz semena maline je bogato tokoferolima (Oomah i dr., 2000). Njihovo antioksidativno svojstvo poznato je još od početka 1930-ih. Od tada su klasifikovani kao glavni antioksidansi rastvorljivi u lipidima koji štite lipide i membrane od oksidativnog oštećenja *in vitro* i *in vivo* (Burton i Ingold, 1981). Tokoferoli se u ljudskom organizmu apsorbuju u tankom crevu i ulaze u cirkulaciju preko limfnog sistema. Apsorbuju se zajedno sa lipidima u vidu hilomikrona i tako transportuju do jetre (Traber, 2007). Ovaj proces je sličan za sve tokoferole, s tim što se α -tokoferol nakon prolaska kroz jetru može detektovati u plazmi (Ouahchi i dr., 1995). Funkcionalna grupa karakteristična za sve tokoferole, zbog koje svi oni mogu reagovati kao antioksidansi, je hidroksilna grupa (Musialik i Litwinienko, 2005). Kada se testiraju sa organskim peroksilnim radikalima kao oksidacionim partnerima, redosled antioksidativnog potencijala tokoferola je α -> β -> γ -> δ -tokoferol (Burton i Ingold, 1981). Za razliku od α -tokoferola, γ -tokoferol je snažan nukleofil, koji “hvata” elektrofilne mutagene i na taj način dopunjava dejstvo glutationa, koji sprečava dejstvo elektrofilnih mutagena u vodenom delu ćelije. Ovo znači da γ -tokoferol štiti lipide, DNK i proteine od oštećenja izazvanim peroksinitritima (Brigelius-Flohé i Traber, 1999). Takođe, značajan deficit vitamina E u ljudskom organizmu može dovesti do neuromuskularnih poremećaja. Na primer, periferna neuropatija se javlja kao posledica

oštećenja nerava slobodnim radikalima i dovodi do odumiranja senzornih neurona (Traber i dr., 1978). Slično, vitamin E smanjuje rizike od pojave hemolitičke anemije, najčešće kod novorođenčadi, koja može da bude posledica oštećenja izazvanog slobodnim radikalima (Brigelius-Flohé i Traber, 1999). Imajući u vidu biološko dejstvo tokoferola, odnosno vitamina E, bilo bi značajno unositi ga putem ishrane. Preporučena dnevna doza vitamina E je od 4 mg za decu do 15 mg za odrasle. To znači da 3–5 g ulja dnevno u potpunosti opskrbljuje ljudsko telo vitaminom E, koji pomaže u zaštiti ćelija od štete koju izazivaju slobodni radikali, zatim, pojačava imuni sistem, pomaže u sprečavanju zgrušavanja krvi u krvnim sudovima, a takođe može pomoći u prevenciji Alchajmerove bolesti, održavanju zdravlja mozga i sprovođenju mnogih drugih važnih funkcija (Brown i Crowley, 2005; Schagen i dr., 2012; Sen i dr., 2006).

Osim bioaktivnosti ulja, koje je posledica masnokiselinskog sastava i sadržaja tokoferola, poslednjih godina povećalo se interesovanje za biološku aktivnost polifenola, u koje spada i EA. EA ispoljava antioksidativna, antimikrobna, antiinflamatorna i antikancerogena svojstva, što potvrđuju brojne studije.

Metabolizam elagitanina se odvija u gastrointestinalnom traktu. Samo mala količina slobodne EA se apsorbuje u želucu, dok su elagitanini uglavnom stabilni u kiseloj sredini želuca, te se ni ne raspadaju, niti hidrolizuju do EA, nego se hidroliza odvija u tankom crevu, gde kao produkt hidrolize nastaju najveće količine EA. Kao što je prethodno opisano, a što se može videti na slici 7, hidroliza podrazumeva nastanak HHDP, jedinjenja koje spontano prelazi u elaginsku kiselinu (Alfei i dr., 2019). EA ispoljava pozitivne efekte na poremećaje centralnog nervnog sistema, na primer Parkinsonove bolesti (Tansey i Goldberg, 2010). Farmakološke strategije za lečenje Parkinsonove bolesti uglavnom se zasnivaju na povećanju sadržaja dopamina. U ovom slučaju, terapija podrazumeva unos prirodnih proizvoda koji ispoljavaju antiradikalno dejstvo, kao što to čini EA, te se može koristiti kao zaštita neurona od oksidativnog stresa i inflamacije (Obeso i dr., 2010). Takođe, nedavna istraživanja su pokazala pozitivan uticaj EA na autoimune poremećaje. Unosom EA, klinički simptomi autoimunih poremećaja, na primer autoimunog encefalomijelitisa, značajno mogu da se smanje i/ili odlože (Busto i dr., 2018). Takođe, EA se upotrebljava i u prevenciji gojaznosti (Xiang i dr., 2008). Istraživanja su takođe pokazala da unos hrane koja je bogata elaginskom kiselinom može poboljšati zdravlje i sprečiti hronične bolesti i stanja, kao što su kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne bolesti i rak (Erdman i dr., 2007; Scalbert i dr., 2005). Antikancerogena aktivnost EA i njenih derivata povezana je sa sposobnošću hvatanja

slobodnih radikala. Na taj način se, upotrebom EA, sprečava ili smanjuje oksidativni stres, koji bi u suprotnom mogao da indukuje karcinogenezu, i koji je glavni uzrok ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti (Kaneto i dr., 2010). Zatim, istraživanja su potvrdila postojanje korelacije između konzumacije hrane bogate polifenolima, naročito elaginskom kiselinom i njenim derivatima, kao i poboljšanog kardiovaskularnog zdravlja (Beretta i dr., 2009; Larrosa i dr., 2010). Trenutno na tržištu, postoji veliki broj komercijalno dostupnih ekstrakata lekovitog bilja i prehrambenih proizvoda koji sadrže elaginsku kiselinu ili elagitanine.

2.4. Ekstrakcija ulja

Ciljevi ekstrakcije ulja su težnja da se sačuva struktura ulja tokom rada, smanjenje sadržaja nečistoća, smanjenje količine ulja koja preostaje u ostatku i dobijanje najvećeg mogućeg prinosa. Pomenuti ciljevi su zajednički svim metodama ekstrakcije, iako su njihove tehnologije različite. S obzirom da konvencionalne tehnike ekstrakcije ulja iz različitog biljnog materijala podrazumevaju upotrebu organskih rastvarača, sve više se teži upotrebi novih, savremenih ekstrakcionih tehnika pri kojima se ovi rastvarači koriste u manjoj količini ili se uopšte ne koriste, a u svrhu dobijanja jeftinijih tehnika, čiji proizvodi nisu toksični i koje nisu opasne po čoveka i životnu sredinu.

2.4.1. Konvencionalne tehnike ekstrakcije

Prva ekstrakcija ulja iz biljnog materijala, uz upotrebu organskog rastvarača je obavljena u Francuskoj 1855. godine. Iako su se u proteklom periodu za ekstrakciju ulja iz biljnog materijala koristili razni rastvarači, danas se *n*-heksan koristi kao najčešće ekstrakciono sredstvo za pomenutu ekstrakciju. Princip ove tehnike ekstrakcije se zasniva na selektivnoj raspodeli jedne ili više komponenti između čvrste i tečne faze (Otašević i dr., 2014).

Parametri koji utiču na prinos ekstrakcije su kontaktna površina ulja sa rastvaračem, fizičko-hemijske osobine rastvarača i biljnog materijala, odnos količina rastvarača i biljnog materijala, dužina trajanja i temperatura pri kojoj se izvodi ekstrakcija. U matriksima biljnog porekla ulje se obično nalazi između ćelija, te se mlevenje mora sprovoditi kao predtretman, jer se na taj način povećava površina kontakta između rastvarača i biljnog matriksa (Pavlić, 2017).

Kako bi se rastvarači lakše uklonili iz smeše nakon završene ekstrakcije, najčešće se upotrebljavaju rastvarači sa nižom tačkom ključanja. Zatim, upotrebom viših temperatura

ekstrakcije, povećava se brzina difuzije rastvarača kroz matriks uzorka (Nikolić, 2019). Prednosti konvencionalnih metoda ekstrakcije jesu jednostavna oprema i visoka efikasnost. Međutim, kako bi se postigao maksimalni prinos ulja, odnosno postigla visoka efikasnost, često je neophodno upotrebiti veliku količinu toksičnih rastvarača štetnih po ljudsko zdravlje i životnu sredinu, koji ekstrakte čine gotovo neupotrebljivim u ljudskoj ishrani. Uzimajući u obzir loše strane upotrebe štetnih organskih rastvarača za ekstrakciju ulja, kao što su toksičnost po ljudski organizam i štetnost po životnu sredinu, kao i iz želje za dobijanjem visoko kvalitetnog ulja bez uticaja na životnu sredinu, kao i smanjivanje cene ekstrakcije, sve češće se koriste mehaničke tehnike ekstrakcije ulja (Subroto i dr., 2015), kao npr. hladno ceđenje. Prednosti mehaničke ekstrakcije ulja su jednostavna upotreba, brza realizacija procesa što dovodi do kratkog trajanja procesa, moguća primena kod širokog dijapazona sirovina bez upotrebe štetnih rastvarača i niska cena. Jedna od negativnih strana ove tehnike jeste relativno mali prinos ulja, manji nego kod čvrsto-tečnih ekstrakcionih tehnika uz upotrebu organskih rastvarača, jer prema literaturnim podacima, u zavisnosti od matriksa, u semenu zaostaje oko 7 % ulja. Metoda mehaničke prese se često definiše kao sistem za odvajanje čvrste od tečne faze i koristi se za ekstrakciju ulja iz semena uljarica sa sadržajem ulja ispod 20 % (Çakaloğlu i dr., 2018). Za separaciju faza ovom tehnikom koristi se mehanički pritisak i u zavisnosti od toga da li se primenjuje visoka temperatura, naziva se ekstrakcija toplim ili hladnim ceđenjem. Tretman biljnog materijala pre samog ceđenja ulja može da podrazumeva ljuštenje, sušenje, ili enzimatski tretman materijala, dok su parametri koji utiču na proces ekstrakcije a u vezi su sa presom, unutrašnji prečnik otvora dizne, temperatura, brzina ceđenja koja zavisi od zadatog pritiska i brzina dodavanja materijala u presu. U poslednje vreme, za laboratorijske potrebe i u pilot postrojenjima, najčešće se koriste takozvane “twin-cold” prese (Uitterhaegen i Evon, 2017). Još neke prednosti upotrebe ove tehnike ekstrakcije u odnosu na konvencionalne tehnike su te da je ulje dobijeno hladnim ceđenjem odmah spremno za ljudsku upotrebu, bez potrebe za rafinisanjem. Takođe, mnoga termosenzitivna jedinjenja zaostaju u ulju čime se povećava stepen kvaliteta gotovog proizvoda (Çakaloğlu i dr., 2018).

Uticaj temperature na kvalitet ulja dobijen iz različitih sirovina ovom tehnikom je istražen i opisan od strane mnogih autora (Kim i dr., 2002). Istraživanja su pokazala da se povećanjem temperature povećava i sadržaj različitih bioaktivnih komponenti kao što su tokoferoli, a s druge strane smanjuje sadržaj masnih kiselina i povećava kiselost ulja, što dovodi do zaključka da se sa povećanjem temperature ekstrakcije smanjuje kvalitet ulja

(Rabadán i dr., 2018). S druge strane, što je i očekivano, veliki uticaj na kvalitet i prinos ulja ima i vrsta biljnog materijala (Rombaut i dr., 2015). Takođe, istraživanja su pokazala da se povećanjem brzine rotacije smanjuje prinos ulja jer se na taj način smanjuje kapacitet prese, te je bitno optimizovati sve ove parametre u svrhu dobijanja najveće količine ulja i najvećeg mogućeg kvaliteta (Burg i dr., 2017). Takođe, u svetu je povećana svest o zagađenju prirode i zaštite ljudskog zdravlja, te se teži razvijanju alternativnih, zelenih tehnika ekstrakcije ulja, kao što je ekstrakcija superkritičnim ugljen-dioksidom (Savić, 2014; Stanišić, 1987).

2.4.2. Ekstrakcija superkritičnim ugljen-dioksidom

Konvencionalne ekstrakcione tehnike, kao što je klasična čvrsto-tečna ekstrakcija, imaju svega nekoliko parametara na koje može da se utiče kako bi se kontrolisala selektivnost procesa. Stoga, razvoj alternativnih ekstrakcionih tehnika više selektivnosti i efikasnosti uzima maha. Jedna od tehnika koja se poslednjih decenija razvija je ekstrakcija superkritičnim ugljen-dioksidom (SFE), kao jedna od tehnika koja ne zagađuje životnu sredinu i koja je veoma efikasna. Poslednjih godina SFE se razvila u potpunosti, te je postala tehnika koja se koristi u mnogim oblastima. Jedno od najvažnijih područja primene SFE jeste izolovanje aktivnih komponenti iz biljnog materijala (Lang i Wai, 2001).

Prednosti SFE u odnosu na konvencionalne tehnike ekstrakcije jesu te da ova ekstrakciona tehnika omogućava lakše prodiranje ekstrakcionog sredstva u pore čvrstog biljnog materijala s obzirom na zanemarljivu viskoznost, i omogućava mnogo brži transfer mase, te ubrzava ekstrakciju. Takođe, s obzirom na konstantni protok ugljen-dioksida kroz uzorak, izazvan konstantnim pritiskom, ova ekstrakciona tehnika omogućava potpunu ekstrakciju, odnosno da se sirovina u potpunosti iscrpi (Stashenko i dr., 1996). Ekstrakciona moć ugljen-dioksida se može kontrolisati promenom pritiska i/ili temperature i na taj način se može postići izuzetna selektivnost, što je veoma značajno kod ekstrakcije iz kompleksnih matriksa, kao što je biljni materijal. Kritična temperatura za ugljen-dioksid je 31,3 °C, a kritičan pritisak 73,9 bar, tako da se SFE najčešće izvodi na relativno niskim temperaturama (Skoog i dr. 2007), tako da se može koristiti za ekstrakciju termosenzitivnih jedinjenja (Dron i dr., 1997; Pan i dr., 1995; Polesello i dr., 1993). Prednost ove tehnike je i što se prilikom izvođenja ekstrakcije ne koriste toksični organski rastvarači opasni po životnu sredinu. Takođe, prednost ove ekstrakcione tehnike se ispoljava i u lakom odvajanju ugljen-dioksida od ekstrakta koje se postiže hlađenjem i dovođenjem ekstrakta na atmosferski pritisak. Dodatna prednost je što se razdvojeni ugljen-dioksid može reciklirati i ponovo

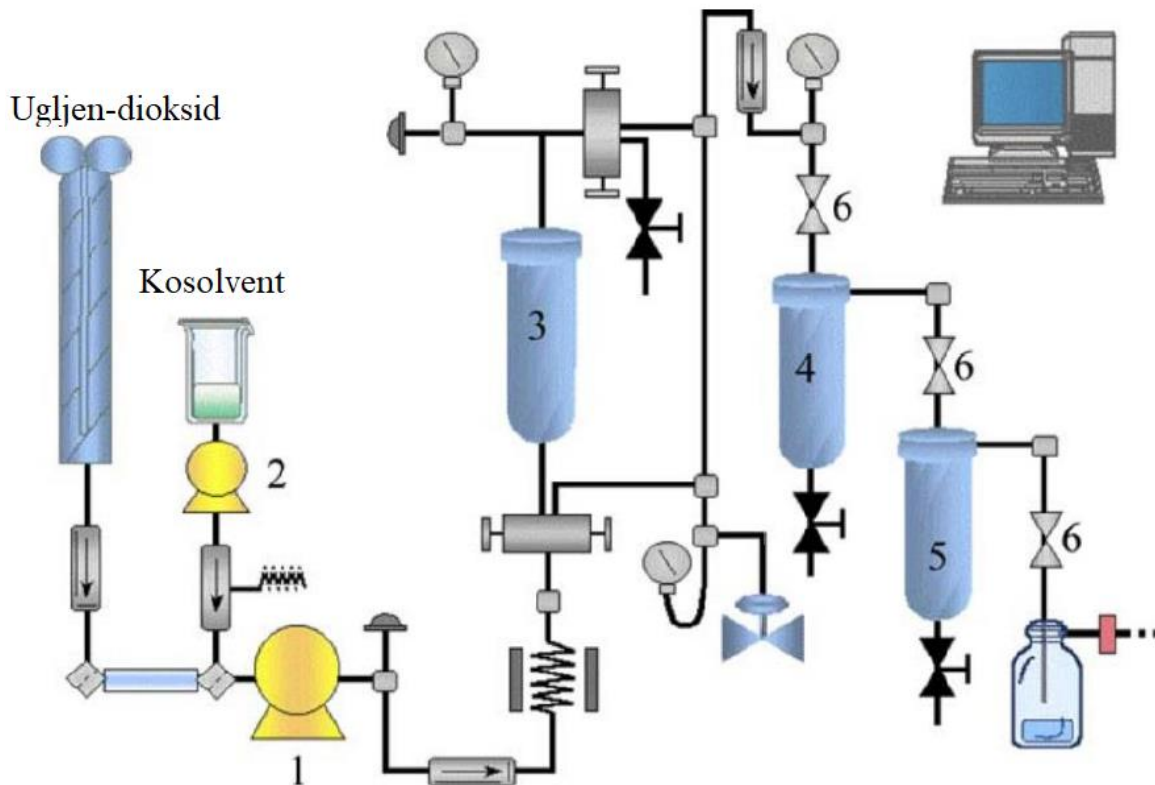
upotrebiti za ekstrakciju, čime se dodatno smanjuje uticaj na životnu sredinu i proces postaje jeftiniji.

Parametri koji utiču na efikasnost procesa ekstrakcije su pritisak, temperatura, protok ugljen-dioksida, kao i osobine matriksa. Pritisak na kojem se odvija ekstrakcija utiče na gustinu fluida, a samim tim i na moć rastvaranja, što znači da se sa povećanjem pritiska povećava i prinos ekstrakcije. S druge strane, na gustinu fluida utiče i temperatura, čijim povećanjem se gustina smanjuje, te se smanjuje i prinos ekstrakcije. Povećanje temperature, takođe utiče i na povećanje napona pare lako isparljivih jedinjenja i tako povećava njihovu rastvorljivost. Protok ugljen-dioksida je značajan parametar za proces ekstrakcije bez obzira što ne utiče direktno na fizičko-hemijske osobine superkritičnog ugljen-dioksida, iz razloga što značajno utiče na prenos mase. Povećanjem protoka povećava se prenos mase usled pomeranja koncentracionog gradijenta dodavanjem nove količine rastvarača (Pavlič, 2017).

Međutim, promena ovih parametara može imati i negativan uticaj na efikasnost ekstrakcije, pa tako povećanjem pritiska, osim što se povećava prinos, dolazi do koekstrakcije neželjenih jedinjenja. Takođe, povećanje temperature ekstrakcije nema značajan uticaj na ekstrakciju slabo isparljivih jedinjenja, pa nije moguće uvek predvideti uticaj povećanja temperature na ukupni prinos ekstrakcije. Osim toga, povećanje protoka ugljen-dioksida, može imati negativan uticaj na prinos ekstrakcije jer se skraćuje vreme kontakta ugljen-dioksida i biljnog materijala. Izbor veličine ovih parametara takođe zavisi i od ulja koja se ekstrahuju. Na primer, etarska ulja se ekstrahuju pri nižim vrednostima temperature i pritiska (Goodarznia i Eikani, 1998), dok se masne kiseline ekstrahuju pri višim (Maheshwari i dr., 1992). Superkritični ugljen-dioksid se koristi za ekstrakciju nepolarnih jedinjenja poput masnih kiselina, ali korišćenjem kosolvenata, npr. etanola, kao i promenom parametara ekstrakcije, moguće je uticati kako na selektivnost ekstrakcije (menjanjem polarnosti solventa), tako i na ukupan prinos i kvalitet ekstrakta (Pavlič, 2017). Iz navedenih razloga neophodno je posvetiti veću pažnju optimizaciji ove metode ekstrakcije.

Shema uređaja za SFE sa glavnim delovima opreme su prikazani na shemi 1. Uređaj se najčešće sastoji od boce sa ugljen-dioksidom i rezervoarom za kosolvent koji se pumpom meša sa ugljen-dioksidom i u kompresoru se zajedno komprimuju na odgovarajući radni pritisak. Ovaj radni pritisak se podešava sistemom ventila. Prilikom izvođenja eksperimenata u ovoj disertaciji nije bilo potrebe za upotrebom kosolventa. Dalje, superkritični ugljen-dioksid prolazi kroz ekstraktor i posle ekstrakcije se dovodi u prvi separator gde se

promenom procesnih parametara menja moć rastvaranja ugljen-dioksida i dobija se prvi ekstrakt. Zatim se smeša sa jedinjenjima koja se nisu izdvojila u prvom separatoru uvode u drugi separator gde se pritisak i temperatura spuštaju ispod kritičnih uslova i ugljen-dioksid se u obliku gasa oslobađa u atmosferu, ili se vraća u proces do kompresora. Ekstrakti dobijeni SFE su se čuvali u tamnim bocama, napunjenim do vrha, u frižideru do daljih analiza.



Shema 1. Shema aparature za ekstrakciju superkričnim ugljen-dioksidom: 1) kompresor, 2) pumpa, 3) ekstraktor, 4) prvi separator, 5) drugi separator, 6) sistem ventila (Herrero i dr., 2006)

2.5. Ekstrakcija polifenola

Bioaktivne komponente iz biljnog materijala mogu biti ekstrahovane na različite načine. Najveći broj ovih ekstrakcionih tehnika se bazira na ekstrakcionoj moći različitih rastvarača uz zagrevanje i/ili mešanje (Azmir i dr., 2013). Konvencionalne tehnike koje podrazumevaju upotrebu organskih rastvarača kao što su metanol, aceton, acetonitril, etil-acetat, etanol, koje prati uparavanje rastvarača pod vakuumom, se često koriste za ekstrakciju polifenola (Shi i dr., 2003). S obzirom na bezbednost ljudi i životne sredine koja je povezana sa upotrebom štetnih organskih rastvarača, koji mogu zaostati u proizvodu i nakon

uparavanja, teži se razvijanju metoda za ekstrakciju polifenola koje podrazumevaju upotrebu bezbednih, “zelenih” rastvarača.

Najjednostavnija konvencionalna tehnika za ekstrakciju polifenola je čvrsto-tečna ekstrakcija metanolom ili etanolom. S obzirom da je upotreba metanola štetna po životnu sredinu, kao i da nakon ekstrakcije metanolom nije preporučljivo upotrebljavati ekstrakte u ljudskoj ishrani, za ekstrakciju polifenola se sve češće koristi čvrsto-tečna ekstrakcija smešom etanola i vode kao rastvarača (Bonilla i dr., 1999; Shi i dr., 2003; Shrikhande, 2000). Takođe, upotrebom savremenih tehnika ekstrakcije, kao što su ultrazvučna ekstrakcija, mikrotalasna ekstrakcija i ekstrakcija rastvaračem pod pritiskom, značajno se povećava prinos, a u zavisnosti od korišćenog rastvarača, bez opasnosti po životnu sredinu i zdravlje ljudi.

2.5.1. Ultrazvučna ekstrakcija

Upotreba ultrazvuka za laboratorijsku ekstrakciju (UAE) bioaktivnih komponenti, između ostalog i polifenola, je već široko rasprostranjena kao alternativa konvencionalnim ekstrakcionim tehnikama (Vilkhu i dr., 2008). Prednosti ekstrakcije pomoću ultrazvuka su veća reproduktivnost, ekstrahuje se na nižim temperaturama, kraće trajanje ekstrakcije i što je najvažnije veći prinos i manja toksičnost po životnu sredinu (Chemat i dr., 2011). Takođe, ova relativno jednostavna tehnika zahteva značajno manja ulaganja od drugih ekstrakcionih tehnika.

Ultrazvuk je definisan kao zvuk frekvencije iznad 15 kHz, što je prag za ljudsku slušnu detekciju (Sanderson, 2004). Izlazni izvor ultrazvuka je obično telo koje vibrira, što čini da i okolni medijum vibrira, a zatim ultrazvučni talas prenosi energiju na druge susedne čestice. Glavni fizički parametri koji imaju ulogu u ultrazvučnom procesu su snaga, frekvencija i amplituda. Nivo energije na kojoj se ultrazvuk širi kroz medijum može se izraziti kao snaga ultrazvuka (V), intenzitet ultrazvuka (V/cm^2) ili gustina zvučne energije (V/cm^3). Mehanizam ultrazvučne ekstrakcije se zasniva na različitim fizičkim i hemijskim fenomenima koji dovode do ubrzanja prenosa mase u tečnu fazu, kao što su kavitacija, vibracije, drobljenje, mešanje, trenje, pritisak, dekompresija i formiranje slobodnih radikala (Wen i dr., 2018). Kavitacioni, termički i mehanički efekti imaju značajan uticaj na proces ultrazvučne ekstrakcije. Akustična kavitacija je jedinstveni fizički fenomen izazvan širenjem jakog ultrazvučnog talasa u tečnostima, koji predstavlja glavnu pogonsku silu ultrazvučne ekstrakcije. Zbog kontinuiranog ciklusa kompresije, mehurići gasa u tečnoj fazi naizmenično se kompresuju i dekompresuju dok ne dostignu svoju kritičnu vrednost, nakon čega dolazi do

rasta i implozije mehurića, što prouzrokuje povećanje lokalne temperature (oko 5000 K) i pritiska (500 bar) u zoni kavitacije (Priego-Capote i Luque De Castro, 2004). Ovaj nagli porast temperature i pritiska se dešava na površini biljnog materijala i dovodi do oštećenja ćelijskog zida, razaranja ćelija i povećanja brzine reakcije kroz transfer mase, ne uzrokujući promene u kvalitetu ekstrakta i strukturi ekstrahovanih komponenti (Ashokkumar, 2015; Ayim i dr., 2018; Rostagno i dr., 2003; Toma i dr., 2001). Pritisak, temperatura ili zapremina ne mogu uticati na makroskopski sistem, ali mogu uticati na strukturu ćelije i na proces prenosa mase. Zatim, efekti kavitacije mogu promeniti hemijske procese u sistemu i povećati brzinu reakcionog procesa ili pokrenuti nove reakcione mehanizme formiranjem različitih vrsta slobodnih radikala, koji takođe mogu da oštete ćelijski zid, ali istovremeno mogu da izazovu i niz reakcija pri kojima dolazi do degradacije jedinjenja od značaja (Kondo i Kano, 1988). Ovi radikali su uglavnom hidroksilni radikali koji nastaju kada se voda koristi kao rastvarač, a formiranje ovih slobodnih radikala zavisi od vrste rastvorenih gasova (Arzeni i dr., 2012).

Primena veće snage ultrazvuka dovodi do većeg intenziteta mešanja, intenzivnijeg razaranja ćelijskog zida, međutim, isto tako može da dovede i do degradacije osetljivih jedinjenja, te se najčešće optimizacija metode vrši na taj način, da se sa što manjom snagom dobiju najbolji rezultati (Bermúdez-Aguirre i dr., 2011). Takođe, upotrebom niže frekvencije se najčešće postiže veći prinos ekstrakcije, te se uglavnom koriste frekvencije od 20 do 100 kHz (Chemat i dr., 2017).

2.5.2. Mikrotalasna ekstrakcija

Upotreba kućnih mikrotalasnih pećnica u laboratoriji se prvi put pominje 1975. godine za tretman biljnog materijala u svrhu analize tragova metala (Abu-Samra i dr., 1975), dok su prve ekstrakcije organskih jedinjenja upotrebom mikrotalasa obavljene 1986. godine (Ganzler i dr., 1986). Od tada, mnoge laboratorije istražuju mogućnosti upotrebe mikrotalasa u analitičke svrhe. Mikrotalasno zagrevanje se koristi za ekstrakciju organskih jedinjenja kao što su pesticidi, polihlorovani bifenili, fenoli, policiklični aromatični ugljovodonici, itd. Glavne prednosti mikrotalasne ekstrakcije u odnosu na konvencionalne tehnike su skraćenje dužine trajanja ekstrakcije i smanjenje količine rastvarača. Zatim, smanjenje otpada nastalog od rastvarača, smanjen uticaj na životnu sredinu i izloženost ljudi štetnom uticaju rastvarača, su takođe prednosti ove ekstrakcione tehnike (Letellier i Budzinski, 1999).

Upotreba mikrotalasa kao energetske vektora predstavlja direktno dejstvo mikrotalasa na materijal koji je u stanju da apsorbira deo elektromagnetne energije i

transformiše je u toplotnu. Mikrotalasne pećnice koriste mikrotalase frekvencije od 2450 MHz, koja odgovara talasnoj dužini od 12,2 cm i energiji od 0,23 cal/mol. Električna komponenta mikrotalasa se menja $4,9 \times 10^9$ puta u sekundi izazivajući neorganizovano kretanje polarnih molekula i na taj način se postiže zagrevanje (Letellier i Budzinski, 1999).

Transformacija elektromagnetne energije u toplotnu se izvodi preko dva mehanizma, jonske provodljivosti i rotacije dipola. Jonska provodljivost generiše toplotu usled otpora matriksa protoku jona. Protok rastvorenih jona uzrokuje sudare među molekulima jer se smer jona menja onoliko puta koliko polje menja znak. Rotacija dipola je povezana sa alternativnim kretanjem polarnih molekula koji pokušavaju da se izjednače sa električnim poljem. Veliki broj sudara generiše oslobađanje energije i samim tim i porast temperature (Letellier i Budzinski, 1999).

Parametri koji utiču na ekstrakcionu moć ove tehnike su dužina trajanja ekstrakcije, temperatura ekstrakcije, priroda matriksa, odnos rastvarača i supstance, snaga zračenja, kao i njihove međusobne interakcije (Pavlić, 2017). Dužina trajanja ekstrakcije predstavlja bitan faktor koji utiče na efikasnost ekstrakcije, naročito u interakciji sa temperaturom i snagom zračenja. Istraživanja su pokazala da produženo trajanje ekstrakcije može dovesti do raspada određenih, osetljivih jedinjenja, te hidrolize i oksidacije što značajno utiče na kvalitet ekstrakta (Chan i dr., 2011; Hao i dr., 2002). Uticaj snage zračenja je takođe bitan parametar, uzimajući u obzir mogućnost degradacije jedinjenja koje se ekstrahuje. Povećanjem snage mikrotalasnog zračenja, raste prinos ekstrakcije, s tim da je moguća koekstrakcija balastnih jedinjenja, te je sadržaj jedinjenja od interesa znatno manji. Uticaj temperature ekstrakcije na proces direktno zavisi od snage mikrotalasnog zračenja. To implicira da izbor optimalne snage mikrotalasnog zračenja i temperature za proces ekstrakcije zavisi od stabilnosti ciljnih jedinjenja koja se ekstrahuju. Takođe, prednost mikrotalasnog ekstrakcije u odnosu na klasičnu čvrsto-tečnu ekstrakciju, jeste i ušteda toplotne energije koja se generiše u ekstrakcionom medijumu i koja je posledica kretanja dipola, te su gubici znatno manji (Letellier i Budzinski, 1999).

2.5.3. Ekstrakcija rastvaračem pod pritiskom

Ekstrakcija rastvaračem pod pritiskom se zasniva na smanjenju potrebne zapremine rastvarača, usled povećanja temperature i pritiska pod kojima se izvodi ekstrakcija, jer se sa povećanjem ovih parametara povećava i rastvorljivost željenih komponenti. Pri izvođenju ove ekstrakcione tehnike, supstanca se postavlja u ćeliju za ekstrakciju koja se puni

odgovarajućim rastvaračem i koristi za statičku ekstrakciju pod povišenom temperaturom (50–200 °C) i pritiskom (35–206 bar), sa kraćom dužinom trajanja ekstrakcije (5–10 min). Komprimovani gas se koristi za prenos ekstrakta iz ćelija u posudu za skupljanje (Richter i dr., 1996).

Dva su glavna razloga zašto upotreba povišene temperature i pritiska daju bolje rezultate u odnosu na ekstrakciju na sobnoj temperaturi i pri atmosferskom pritisku, a to su povećana rastvorljivost i efekti prenosa mase, kao i narušavanje površinske ravnoteže. Ukoliko je rastvaranje endotermno, što je uglavnom slučaj, ekstrakcija na višoj temperaturi povećava sposobnost rastvarača da rastvori analit. Takođe, smeša vode i organskog rastvarača ima veću ekstrakcionu moć na višim temperaturama. Ovo je značajno u slučajevima kada pri nižim temperaturama i pritisku rastvaračem ne mogu da se ekstrahuju željene komponente zbog vodom zapušanih pora supstance. Povećanjem temperature i pritiska se olakšava dostupnost ovih zapušanih pora i povećava ekstrakciona moć rastvarača. Takođe, povećanje temperature rezultuje bržom difuzijom rastvarača u uzorak. Povećanje temperature može poremetiti jake interakcije rastvora i matriksa izazvane Van der Waals-ovim silama i vodoničnom vezom. Toplotna energija može da poremeti kohezivne i adhezivne interakcije smanjenjem energije aktivacije potrebne za proces desorpcije. Pored toga, više temperature dovode do smanjenja površinskog napona rastvarača i supstance, omogućavajući na taj način bolje “kvašenje” supstance (Pavlič, 2017).

Da bi se mogla koristiti temperatura iznad tačke ključanja rastvarača, mora se primeniti dovoljno visok pritisak tokom ekstrakcije. Upotreba povišene temperature i prednosti koje su povezane sa tim se ne bi mogle razmatrati bez upotrebe povišenog pritiska kako bi rastvarač ostao u tečnom stanju. Upotreba povišenog pritiska omogućava ekstrakciju željenih komponenti iz uzoraka u kojima su analiti “zarobljeni” u porama matriksa, na taj način što se rastvarač potiskuje u pore uzorka do kojih inače ne bi došao pri atmosferskom pritisku. S druge strane, povišen pritisak pomaže u rastvaranju vazdušnih mehurića, tako da veća količina rastvarača brže dolazi u kontakt sa celokupnim matriksom (Richter i dr., 1996). Kako bi se moglo uticati na selektivnost metode, kod ekstrakcije sa povišenim pritiskom se, osim promene pritiska i temperature, koriste fluidi koji se nalaze u subkritičnom stanju. Jedan od najčešće korišćenih subkritičnih fluida za ekstrakciju polifenola je subkritična voda. Glavna prednost korišćenja subkritične vode kao solventa se ogleda u tome što se dielektrična konstanta vode smanjuje sa povećanjem temperature ekstrakcije, što smanjuje njenu polarnost i olakšava ekstrakciju nepolarnijih jedinjenja. Takođe, upotrebom visokog pritiska

može se dodatno poboljšati ekstrakcija analita iz matriksa (Kanmaz, 2014). Nedostatak ekstrakcije polifenola pri upotrebi viših temperatura se ogleda u nestabilnosti nekih polifenola na temperaturama iznad 35 °C.

2.6. Metode za optimizaciju ekstrakcije

Kako bi se metoda ekstrakcije optimizovala u cilju dobijanja što većeg prinosa i što kvalitetnijeg ekstrakta, u optimizaciju moraju biti uključeni matematički modeli. Jedna od metoda koja se koristi za optimizaciju ekstrakcije je RSM. RSM se sastoji iz grupe matematičkih i statističkih tehnika koje se koriste u razvoju odgovarajućeg funkcionalnog odnosa između odgovora proučavanog sistema i nekog broja povezanih parametara. Kako bi se ustanovila zavisnost između parametara, korišćenjem ove metodologije, najčešće se koriste dva modela, model prvog i drugog stepena. Kada se ustanovi zavisnost između kontrolnih varijabli i odziva, odnosno zavisnih varijabli može da se koristi za predviđanje vrednosti koje će se potencijalno dobiti promenom ulaznih parametara. Zatim, ova metodologija se koristi, kroz testiranje postavljene hipoteze, za određivanje uticaja kontrolnih varijabli na zavisne varijable. Takođe, što je ključno, ova metodologija se koristi radi određivanja vrednosti kontrolnih varijabli, kako bi se dobili optimalni odzivi zavisnih varijabli (Khuri i Mukhopadhyay, 2010). U cilju optimizacije ovom metodologijom, prvo se mora obaviti serija eksperimenata, u kojima se meri svaki odziv u zavisnosti od kontrolnih varijabli, što predstavlja eksperimentalni dizajn. Veoma je važno izabrati odgovarajući eksperimentalni dizajn, zbog toga što kvalitet predviđanja značajno utiče na zavisne varijable. Jedan od najčešće korišćenih eksperimentalnih dizajna za optimizaciju ekstrakcionih uslova jeste Box-Behnken eksperimentalni dizajn (Box i Behnken, 1960). Box-Behnken eksperimentalni dizajn pruža tri nivoa za svaki faktor i sastoji se od kombinacija 3^k faktorijalnog dizajna, gde k predstavlja broj parametara i može biti 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12 i 16. Ovaj dizajn se često koristi u industrijskom istraživanju jer je ekonomičan i zahteva samo tri nivoa za svaki faktor (-1, 0 i 1). Jedan od najvažnijih razloga upotrebe RSM jeste određivanje optimalnih vrednosti kontrolnih varijabli koji rezultuju maksimalnim ili minimalnim odzivom zavisnih varijabli. Ovo zahteva odgovarajući model koji pruža adekvatan prikaz srednje vrednosti, jer se isti model koristi za određivanje optimalnih vrednosti (Myers i dr., 2004).

3. Eksperimentalni deo

Eksperimentalni deo je obuhvatio ekstrakciju ulja iz semena maline upotrebom šest ekstrakcionih tehnika i to ekstrakciju hloroformom, smešom dihlormetana i metanola, etanolom, hladno ceđenje, ekstrakciju *n*-heksanom po Soxhlet-u i ekstrakciju superkritičnim ugljen-dioksidom. Takođe, ekstrakcija superkritičnim ugljen-dioksidom je bila optimizovana pomoću RSM. Nakon ekstrakcija, utvrđen je sadržaj masnih kiselina i sadržaj tokoferola, kao i antioksidativno i antimikrobno delovanje ulja, kao i njegova oksidativna stabilnost koja je ispitana Rancimatnim testom. Nakon obezmašćivanja seme je valorizovano na osnovu sadržaja EA, koja je ekstrahovana upotrebom četiri ekstrakcione tehnike i to: čvrsto-tečnom ekstrakcijom etanolom, ekstrakcijom mikrotalasima, ekstrakcijom ultrazvukom i ekstrakcijom rastvaračem pod pritiskom. Nakon toga je metoda ultrazvučne ekstrakcije optimizovana. Takođe, ispitana je biološka aktivnost ovih ekstrakata antioksidativnim, antimikrobnim i antiproliferativnim *in vitro* testovima.

3.1. Hemikalije i rastvori

Za potrebe ekstrakcije ulja i polifenola korišćene su sledeće hemikalije: hloroform (99 %) i etanol (96 %, 98 %) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka), dihlormetan (*p.a.*) (Carlo Erba, Chaussée du Vexin, Francuska), metanol (99,9 %) (Fisher Scientific, Loughborough, Velika Britanija) i *n*-heksan (HPLC) (Promochem, Bejrut, Liban).

Za određivanje masnokiselinskog sastava ulja primenjeni su: natrijum-hlorid (99 %), natrijum-hidroksid (98 %), natrijum-sulfat (anhidrovani) (99 %) (Lach-Ner, Neratovice, Češka), bor-trifluorid, izooktan (*p.a.*) i standard masnih kiselina Supelco GRAIN FAME miks (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka).

Kako bi se ispitao sadržaj tokoferola u ulju korišćeni su tetrahidrofuran (*p.a.*) (Carlo Erba, Chaussée du Vexin, Francuska), α -tokoferol (analitički standard), β -tokoferol (analitički standard), γ -tokoferol (analitički standard) i δ -tokoferol (analitički standard) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka). Za određivanje sadržaja EA korišćena je mravlja kiselina (*p.a.*), analitički standard EA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka) i acetonitril (HPLC) (Carlo Erba, Chaussée du Vexin, Francuska).

Pri određivanju redukcionog kapaciteta primenjeni su Folin-Ciocalteu reagens (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka) i natrijum-karbonat (99,5 %) (Lach-Ner, Neratovice, Češka).

Za određivanje antioksidativne aktivnosti korišćene su sledeće hemikalije: 1,1-difenil- β -pikrilhidrazil (DPPH), diamonijumova so 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS), 2,4,6-tripiridil-*s*-triazin (TPTZ), gvožđe(III)-hlorid (*p.a.*), trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina) (98 %) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka), kalijum-persulfat (99 %) (Lach-Ner, Neratovice, Češka) i hlorovodonična kiselina (Fisher Scientific, Loughborough, Velika Britanija). Acetatni pufer je napravljen upotrebom natrijum-acetata (99 %) i glacijalne sirćetne kiseline (98 %) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka).

Za procenu antimikrobne aktivnosti korišćeni su propilen-glikol (*p.a.*) (Applichem, Darmstadt, Nemačka) i resazurin (7-hidroksi-10-oksidofenoksazin-10-ijum-3-on) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka), krvni agar (Biomerieux, Marcy-l'Etoile, Francuska), Mueller-Hinton bujon (MHB, LabM, Lancashire, Ujedinjeno Kraljevstvo) i propilen-glikol (Applichem, Darmstadt, Nemačka).

Pri proceni antiproliferativnog delovanja polifenolnog ekstrakta primenjeni su: fetalni teleći serum (FCS) i Dulbeco's Modified Essential Medium (DMEM, PAA Laboratories GmbH, Pasing, Austria), streptomycin (Galenika, Beograd), tripsin (Serva, Heidelberg, Nemačka), EDTA (Laphoma, Skoplje), trihlorsirćetna kiselina (TCA), tris(hidroksimetil)amino metan (TRIS), sulforodamin B (SRB) i dimetilsulfoksid (99,7 %) (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Nemačka).

3.2. Biljni materijal

Biljni materijal koji je korišćen u eksperimentima, odnosno oko 100 kg semena tri sorte maline (Vilamet, Miker i Polka), je ljubazno donirala kompanija Mondi Lamex d.o.o., Kraljevo, Srbija. Seme je sušeno u laboratorijskoj sušnici (Sterimaric ST-11, Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska) na 40 °C u toku 12 h. Nakon sušenja, određena je vlaga u semenu primenom gravimetrijske AOAC metode 950.46/1990 ($3,25 \pm 0,16$ % za Vilamet, $5,13 \pm 0,02$ % za Polku i $5,30 \pm 0,12$ % za Miker) na laboratorijskom vlagomeru (MB45, Ohaus, Parsippany, SAD). Seme je samleveno na laboratorijskom minu (Glen Mills, Clifton, NJ, SAD) i takvo korišćeno za sve metode ekstrakcije osim za hladno ceđenje, pri čemu je korišćeno celo seme jer bi u suprotnom došlo do zapušnja prese.

Sadržaj dijetetskih vlakana je određen primenom Megazyme AOAC metode 991.43/1995 (AOAC, 1995). Sadržaj pepela je određen metodom AOAC 923.03/2005 (AOAC, 2005), ulja AOAC 945.16/2000 (AOAC, 2000), proteina Kjeldahl-ovom metodom (Kjeldahl, 1883), skroba Evers-ovom polarimetrijskom metodom (Ewers, 1908), a sadržaj šećera Luff-Schoorl metodom (Luff i Schoorl, 1929).

3.3. Metode za ekstrakciju ulja

Ekstrakcija ulja iz semena sve tri sorte maline izvedena je upotrebom četiri tehnike (šest metoda) ekstrakcije i to: čvrsto-tečna ekstrakcija (ekstrakcija hloroformom, ekstrakcija smešom dihlormetana i metanola, ekstrakcija etanolom), hladno ceđenje ulja, ekstrakcija ulja *n*-heksanom po Soxhlet-u i ekstrakcija superkričnim ugljen-dioksidom.

3.3.1. Čvrsto-tečna ekstrakcija

Čvrsto-tečna ekstrakcija ulja iz semena sve tri sorte maline je izvedena pomoću hloroforma, dihlormetana i metanola, kao i etanola.

3.3.1.1. Ekstrakcija hloroformom

Ekstrakcija ulja iz semena maline upotrebom hloroforma kao ekstrakcionog sredstva je izvedena po metodi koju su opisali Gutiérrez i dr. (2008). Postupak je obuhvatao sledeće faze: osušeno i sameveno seme maline je homogenizovano i u njega je dodat hloroform u odnosu 1:5 (m/v) i smeša je ostavljena preko noći na laboratorijskom šejkeru (Biosan, Riga, Letonija) pri brzini rotacije od 120 min⁻¹. Nakon mešanja, smeša je profiltrirana kroz filter papir (MN 751, Machery Nagel, Allentown, Pensilvanija, SAD) u levak za razdvajanje. U čvrsti ostatak nakon filtriranja je ponovo dodat hloroform u istoj proporciji, smeša je ponovo profiltrirana i filtrati spojeni. Zatim je hloroform uparen na 40 °C na rotacionom vakuum uparivaču (Büchi R-205, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, SAD). Ekstrakti su čuvani u tamnim bocama, napunjenim do vrha, u frižideru do daljih analiza.

3.3.1.2. Ekstrakcija smešom dihlormetana i metanola

Ekstrakcija ulja upotrebom smeše dihlormetana i metanola (MeOH) kao ekstrakcionog sredstva je izvedena po metodi koju su opisali Cequier-Sánchez i dr. (2008). U suve i samevene uzorke (50 g) dodato je po 200 cm³ smeše CH₂Cl₂/MeOH u odnosu 2:1 (v/v). Smeša je ostavljena preko noći na laboratorijskom šejkeru (Biosan, Riga, Letonija) čija brzina rotacije je bila podešena na 120 min⁻¹. Nakon toga, uzorci su profiltrirani kroz filter papir (MN 751, Machery Nagel, Allentown, Pensilvanija, SAD) i rastvarač je uparen na 40

°C na rotacionom vakuum uparivaču (Büchi R-205, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, SAD). Ekstrakti su čuvani u tamnim bocama, napunjenim do vrha, u frižideru do daljih analiza.

3.3.1.3. Ekstrakcija etanolom

Kako bi se odredio optimalni odnos uzorka i rastvarača u smislu dobijanja najvećeg prinosa ulja, ekstrakcija ulja etanolom kao ekstrakcionim sredstvom je izvedena pri odnosima etanola i uzorka od 50/1, 20/1 i 10/1 (v/m). Najveći prinos ekstrakcije je dobijen pri upotrebi odnosa od 50/1 (v/m) i to 15,22 % za Vilamet, 15,07 % za Polku i 16,65 % za Miker, ali sa ekonomskog i aspekta zelene hemije, odlučeno je da se za ekstrakciju ulja etanolom upotrebi odnos 20/1 (v/m) prilikom čije upotrebe je prinos bio 14,41 % za Vilamet, 13,19 % za Polku i 14,68 % za Miker. S druge strane, pri upotrebi odnosa 10/1 (v/m), prinosi su značajno manji (9,11 % za Vilamet, 8,89 % za Polku i 8,25 % za Miker). Ekstrakcija je izvedena tako što je u osušene i samevene uzorke dodat etanol u navedenom odnosu. Zatim je smeša ostavljena preko noći na laboratorijskom šejkeru (Biosan, Riga, Letonija), pri brzini rotacije od 120 min⁻¹. Nakon toga, smeša je profiltrirana kroz filter papir (MN 751, Machery Nagel, Allentown, Pensilvanija, SAD) i etanol uparen na 40 °C na rotacionom vakuum uparivaču (Büchi R-205, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, SAD). Ekstrakti su čuvani u tamnim bocama, napunjenim do vrha, u frižideru do daljih analiza.

3.3.2. Hladno ceđenje

Hladno ceđenje ulja iz semena maline je izvedeno upotrebom pužne prese (Oriental Motor, Gearhead DY9 97575, Tokyo, Japan), kako su opisali Marić i dr. (2020). Od svake sorte maline je oko 5 kg semena korišćeno za hladno ceđenje. Dobijena ulja su profiltrirana vakuum filtracijom (Vacuumbrand, ME 2C, Wertheim, Nemačka) kako bi se uklonile fine čestice koje su zaostale u ulju nakon ceđenja. Za ovu tehniku nije korišćeno samleveno već celo seme, kako ne bi došlo do zapušanja prese. Ekstrakti su čuvani u tamnim bocama, napunjenim do vrha, u frižideru do daljih analiza.

3.3.3. Ekstrakcija *n*-heksanom po Soxhlet-u

Ekstrakcija ulja po Soxhlet-u je izvedena po metodi opisanoj od strane Pavlić i dr. (2015) uz modifikacije u smislu korišćenja 20 g uzorka i *n*-heksana umesto dihlormetana. Postupak ekstrakcije je obuhvatao sledeće: iz 20 g osušenog, samlevenog i homogenizovanog uzorka semena maline je pomoću *n*-heksana ekstrahovano ulje metodom po Soxhlet-u. U balon (500 cm³) sa okruglim dnom je sipano sameveno seme maline, na koje je dodato 100 cm³ *n*-heksana. Sadržaj balona je zagrevan na 60 °C. Kada se telo ekstraktora napuni

ekstragensom, sadržaj se preliva u balon i ovaj postupak je ponovljen 15 puta (oko 8 h). Nakon toga, *n*-heksan je uparen na 40 °C na rotacionom vakuum uparivaču (Büchi R-205, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, SAD), a dobijeni ekstrakti su sušeni 24 h na sobnoj temperaturi. Ekstrakti su se čuvali u tamnim bocama, napunjenim do vrha, u frižideru do daljih analiza.

3.3.4. Ekstrakcija superkritičnim ugljen-dioksidom

Ekstrakcija ulja iz semena tri sorte maline superkritičnim ugljen-dioksidom je izvedena na laboratorijskom ekstraktoru (NOVA-Swiss, High-pressure extraction plant 565.0156; Nova Werke Ltd, Effertikon, Švajcarska). Za optimizaciju ekstrakcije i uvid u uticaj uslova ekstrakcije na odabrane zavisne varijable, upotrebljen je Box-Behnken-ov eksperimentalni dizajn sa metodom odzivne površine. Parametri koji su bili ispitivani su pritisak (X_1 , 250–350 bar), temperatura (X_2 , 40–60 °C) i protok CO₂ (X_3 , 0,2–0,4 kg/h). Obradena su tri faktora na tri nivoa, sa tri ponavljanja na centralnim vrednostima kontrolnih varijabli (pritisak 300 bar, temperatura 50 °C i protok CO₂ 0,3 kg/h), što čini ukupno 15 eksperimenata. Kako bi se postigao maksimalni prinos ulja i na osnovu ranijih istraživanja odlučeno je da trajanje ekstrakcije bude konstantno i iznosi 4 h (Pavlić i dr., 2019). Kako bi se stekao jasniji uvid u uticaj istraživanih parametara, u plan su uključena još dva ponavljanja, što dovodi do ukupnog broja od 17 eksperimenata. Varijable su kodirane upotrebom sledeće jednačine (Pavlić i dr., 2020):

$$X = \frac{X_i - X_0}{\Delta X} \quad (1)$$

gde su: X kodirana vrednost nezavisno promenljive, X_i odgovarajuća realna vrednost nezavisno promenljive, X_0 realna vrednost u centru domena, dok ΔX predstavlja razliku između maksimalne i centralne vrednosti nezavisno promenljive (faktora).

Kako bi odnos kontrolnih i zavisnih varijabli bio adekvatno opisan, upotrebljena je sledeća jednačina (Bezerra i dr., 2008):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{i < j}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

gde Y predstavlja određeni odgovor, dok β_0 , β_i (linearni), β_{ii} (kvadratni) i β_{ij} (interakcija) predstavljaju regresione koeficijente modela. X_i i X_j su kodirane vrednosti nezavisnih varijabli (Tabela 2).

Tabela 2. Eksperimentalni uslovi primenjeni u Box-Behnken-ovom dizajnu sa realnim i kodiranim vrednostima nezavisnih promenljivih korišćeni pri ekstrakciji ulja iz semena sorte Vilamet superkritičnim ugljen-dioksidom

Eksperiment	Pritisak (bar)		Temperatura (°C)		Protok CO ₂ (kg/h)	
1	300	(0)	40	(-1)	0,2	(-1)
2	250	(-1)	40	(-1)	0,3	(0)
3	350	(1)	50	(0)	0,2	(-1)
4	350	(1)	60	(1)	0,3	(0)
5	250	(-1)	50	(0)	0,2	(-1)
6	250	(-1)	60	(1)	0,3	(0)
7	300	(0)	60	(1)	0,4	(1)
8	350	(1)	50	(0)	0,4	(1)
9	300	(0)	50	(0)	0,3	(0)
10	300	(0)	40	(-1)	0,4	(1)
11	300	(0)	50	(0)	0,3	(0)
12	350	(1)	40	(-1)	0,3	(0)
13	300	(0)	50	(0)	0,3	(0)
14	300	(0)	60	(1)	0,2	(-1)
15	250	(-1)	50	(0)	0,4	(1)
16	350	(1)	50	(0)	0,3	(0)
17	250	(-1)	50	(0)	0,3	(0)

3.4. Metode za ekstrakciju polifenola

Seme maline sve tri ispitivane sorte obezmašćeno optimizovanom metodom SFE je korišćeno za dalju ekstrakciju polifenola. U tu svrhu obrađene su četiri ekstrakcione tehnike i to čvrsto-tečna ekstrakcija, ekstrakcija mikrotalasima, ekstrakcija ultrazvukom i ekstrakcija upotrebom rastvarača pod pritiskom. Kao rastvarač u svim primenjenim ekstrakcionim tehnikama je korišćen etanol. Zatim, kako bi se dobio uvid u ukupni sadržaj EA, primenjena je hidroliza sa hlorovodoničnom kiselinom. Takođe, metoda ultrazvučne ekstrakcije (UAE) je optimizovana pomoću RSM, u cilju dobijanja najveće količine EA i najvećeg redukcionog kapaciteta (RC).

3.4.1. Čvrsto-tečna ekstrakcija etanolom

Ekstrakcija polifenola je izvedena etanolom kao ekstrakcionim sredstvom u cilju određivanja sadržaja slobodne EA u obezmašćenom semenu maline. Ekstrakcija je izvedena tako što je u oko 1 g samevenog uzorka dodato 20 cm³ etanola/vode u odnosima 0 %, 20 %, 40 %, 60 %, 80 % i 100 % sadržaja etanola, kako bi se metoda optimizovala u cilju postizanja

najvećeg prinosa EA. Smeša je ostavljena preko noći na laboratorijskom šejkeru (Biosan, Riga, Letonija) pri brzini rotacije od 120 min^{-1} . Nakon toga je ekstrakt profiltriran kroz filter papir (MN 751, Machery Nagel, Allentown, Pensilvanija, SAD) i tako dobijen uzorak je čuvan na $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize.

3.4.2. Čvrsto-tečna ekstrakcija kiselog hidrolizata metanolom

U cilju određivanja ukupnog sadržaja EA u ostatku nakon ekstrakcije ulja izvedena je čvrsto-tečna ekstrakcija kiselog hidrolizata metanolom po metodi koju su opisali Määttä-Riihinen i dr. (2004). Hidroliza je izvedena upotrebom $2 \text{ mol/dm}^3 \text{ HCl}$ u MeOH, uz refluks, 2 h na $85 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Izmereno je 0,1 g uzorka u vijalu i u njega dodato $1 \text{ cm}^3 2 \text{ mol/dm}^3 \text{ HCl}$ u MeOH. Nakon hidrolize, uzorak je kvantitativno prenet u laboratorijski sud i dopunjen do 20 cm^3 rastvorom $2 \text{ mol/dm}^3 \text{ HCl}$ u MeOH. Zatim je uzorak postavljen u ultrazvučno kupatilo (ATU, Valenisija, Španija) 30 min i nakon toga filtriran u vijale kroz $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ membranski filter (Amtast, Lakeland, Florida, SAD). Uzorak je čuvan na $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize.

3.4.3. Ekstrakcija primenom rastvarača pod pritiskom

Ova ekstrakcija je izvedena po metodi koju su opisali Nayak i dr. (2015). Postupak se sastojao u sledećem: 3,3 g obezmašćenog semena maline je odmereno u ćeliju od nerđajućeg čelika ekstraktora Dionex ASE 350 (Dionex, Sunnyvale, CA, SAD). Kako bi se izbeglo nakupljanje čestica u vijali, u ćelije su postavljeni filteri od celuloze (Amtast, Lakeland, Florida, SAD). Ekstrakcija je izvedena pri sledećim eksperimentalnim uslovima: kao rastvarač je korišćeno je $10 \text{ cm}^3 80 \%$ etanola, pritisak je iznosio 103,42 bar, a temperatura $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Zagrevanje se vršilo tokom 6 min, nakon čega je sistem 5 min mirovao. Ovaj postupak se ponovio tri puta. Uzorak je čuvan na $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize.

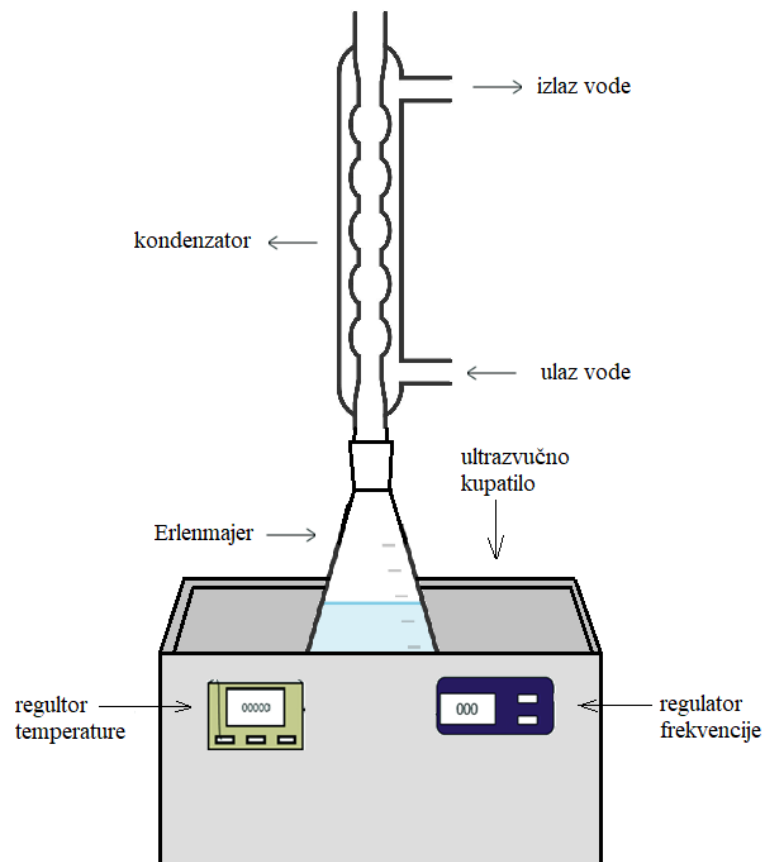
3.4.4. Mikrotalasna ekstrakcija

Ekstrakcija polifenola mikrotalasima je izvedena pomoću Bosch-ove kuhinjske mikrotalasne pećnice (MM817ASM, Bosch, Nemačka) i odgovarajuće staklene aparature koja se sastoji od staklenog balona sa okruglim dnom od 500 cm^3 i kondenzatora koju su opisali Zeković i dr. (2017). Postupak ekstrakcije je bio u skladu sa postupkom Teslić i dr. (2019) i sastojao se u sledećem: 2,5 g uzorka je pomešano sa $50 \text{ cm}^3 80 \%$ etanola u staklenom balonu sa okruglim dnom zapremine 500 cm^3 . Ekstrakcija je zatim izvedena pri snazi od 600 W i u periodu od 10 min. Nakon završetka ekstrakcije, ekstrakt je profiltriran kroz filter papir (MN 751, Machery Nagel, Allentown, Pensilvanija, SAD) vakuumom i

centrifugiran (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) 10 min pri brzini rotacije od 3000 min^{-1} kako bi se uklonile čestice uzorka iz ekstrakta.

3.4.5. Ultrazvučna ekstrakcija

Ova tehnika ekstrakcije je izvedena uz upotrebu ultrazvučnog kupatila EUP540A (Eustruments, Francuska) (Shema 2), pri fiksnoj frekvenciji od 40 kHz kao što su opisali Teslić i dr. (2019). Postupak ekstrakcije se sastojao u sledećem: 5 g obezmašćenog semena maline je u Erlenmajeru pomešano sa 100 cm^3 etanola (80 %). Erlenmajeri su se uvek nalazili na istoj udaljenosti od sonde, pri čemu dodatno mešanje nije primenjeno. Etanolni ekstrakti su odmah nakon ekstrakcije profiltrirani kroz filter papir (MN 751, Machery Nagel, Allentown, Pensilvanija, SAD) uz vakuum. S obzirom da je ovom metodom ekstrakcije u odnosu na prethodne dobijena najveća količina EA i najveći RC, odlučeno je da se ista optimizuje pomoću RSM.



Shema 2. Shema ultrazvučnog ekstraktora

Kako bi se metoda optimizovala, kao i u svrhu istraživanja uticaja faktora ekstrakcije na dobijenu količinu EA, kao i RC, primenjen je Box-Behnken-ov dizajn sa metodom odzivne površine. Istraživani faktori su bili koncentracija etanola (60–100 %), dužina trajanja ekstrakcije (5–15 min), odnos ekstrakcionog sredstva i uzorka (5–25 cm³/g) i temperatura ekstrakcije (40–80 °C). U tabeli 3 su prikazani eksperimentalni uslovi primenjeni u Box-Behnken-ovom dizajnu sa realnim i kodiranim nivoima nezavisnih promenljivih, u cilju optimizacije ove metode.

Tabela 3. Eksperimentalni uslovi primenjeni u Box-Behnken-ovom dizajnu sa realnim i kodiranim vrednostima nezavisnih promenljivih korišćeni pri UAE polifenola iz semena sorte Vilamet

Eksperiment	Sadržaj etanola (%)		Trajanje ekstrakcije (min)		Odnos čvrsto-tečno (cm ³ /g)		Temperatura (°C)	
1	60	(-1)	15	(-1)	30	(1)	50	(-1)
2	100	(1)	45	(1)	30	(1)	50	(-1)
3	80	(0)	30	(0)	30	(1)	60	(0)
4	100	(1)	45	(1)	10	(-1)	70	(1)
5	100	(1)	45	(1)	10	(-1)	50	(-1)
6	80	(0)	30	(0)	20	(0)	60	(0)
7	100	(1)	15	(-1)	10	(-1)	50	(-1)
8	60	(-1)	15	(-1)	30	(1)	70	(1)
9	80	(0)	15	(-1)	20	(0)	60	(0)
10	80	(0)	30	(0)	20	(0)	60	(0)
11	100	(1)	15	(-1)	30	(1)	70	(1)
12	80	(0)	30	(0)	20	(0)	50	(-1)
13	100	(1)	15	(-1)	10	(-1)	70	(1)
14	60	(-1)	15	(-1)	10	(-1)	50	(-1)
15	100	(1)	15	(-1)	30	(1)	50	(-1)
16	100	(1)	45	(1)	30	(1)	70	(1)
17	100	(1)	30	(0)	20	(0)	60	(0)
18	60	(-1)	45	(1)	30	(1)	50	(-1)
19	80	(0)	30	(0)	20	(0)	60	(0)
20	80	(0)	45	(1)	20	(0)	60	(0)
21	80	(0)	30	(0)	20	(0)	70	(1)
22	60	(-1)	15	(-1)	10	(-1)	70	(1)
23	60	(-1)	45	(1)	10	(-1)	50	(-1)
24	60	(-1)	45	(1)	30	(1)	70	(1)
25	80	(0)	30	(0)	10	(-1)	60	(0)
26	60	(-1)	30	(0)	20	(0)	60	(0)
27	60	(-1)	45	(1)	10	(-1)	70	(1)

Kako bi se što tačnije utvrdio odnos ispitivanih faktora i odziva, ukupno je izvedeno 27 eksperimenata (Tabela 3). Za kodiranje varijabli korišćena je jednačina (1), a kako bi se opisao odnos faktora i odziva korišćena je jednačina (2).

3.5. Metode za karakterizaciju ulja

Kvalitet ekstrahovanog ulja je određen na osnovu masnokiselinskog sastava i funkcionalnog kvaliteta ulja, kao i sadržaja tokoferola. Takođe određena je i oksidativna stabilnost ulja Rancimatnim testom.

3.5.1. Određivanje masnokiselinskog sastava ulja gasnom hromatografijom i funkcionalni indeksi

Masnokiselinski sastav ulja je određen po metodi Popović i dr. (2017) na sledeći način: 50 cm³ uzorka ulja je odmereno u Erlenmajer od 100 cm³ i pomešano sa 2 cm³ 0,5 mol/dm³ metanolnog natrijum-hidroksida. Zatim je smeša zagrevana uz refluks na 70 °C uz povremeno mućkanje. Nakon toga, dodato je 2,5 cm³ 14 % metanolnog rastvora bor-trifluorida i zagrevanje je nastavljeno još 10 min. Posle toga, u smešu je dodato 1,5 cm³ izooktana i nakon skidanja sa refluksa, dodato je još 5 cm³ zasićenog rastvora natrijum-hlorida. Nakon dvominutnog mućkanja i razdvajanja slojeva, pipetom je odvojen gornji sloj i u njega dodat antidrovani natrijum-sulfat. Na taj način su pripremljeni metilestri masnih kiselina koji su analizirani gasnim hromatografom sa plameno-jonizacionim detektorom (GC-FID Agilent 7890A system, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), sa auto-injektorom i kolonom (fused silica capillary column, SP-2560) dimenzija 100 m x 0,25 mm; debljina filma stacionarne faze 0,20 µm. Injektovana zapremina je bila 1 µl. S obzirom da se pri nižim temperaturama kolone vreme trajanja analize produžava, a da pri visokim može doći do preranog eluiranja i lošeg razdvajanja, primenjen je sledeći temperaturni program: početna temperatura je iznosila 140 °C prvih 5 min. Zatim se linearno povećavala 5 °C/min dok nije dostignuta temperatura od 150 °C na kojoj je sistem zadržan 1 min. Nakon toga se temperatura kolone linearno povećavala 3 °C/min, dok nije dostignuto 240 °C i na toj temperaturi je sistem zadržan 10 min. Temperatura injektora i detektora su podešene na 250 °C. Kao gas nosač je korišćen helijum čistoće 99,9999 % sa protokom od 1,26 cm³/min. Jedinjenja su identifikovana pomoću standarda Supelco GRAIN FAME mix. Rezultati su prikazani kao masa pojedine masne kiseline (g) na 100 g ukupnog sadržaja masnih kiselina (g/100 g; %).

Funkcionalni kvalitet dobijenih ulja je određen upotrebom odnosa hipoholesterolskih i hiperholesterolskih masnih kiselina (H/H) pomoću jednačine (Cunha i dr., 2019):

$$H/H = \frac{c_{18:1(9)} + c_{18:2(6)} + c_{20:4(6)} + c_{18:3(3)} + c_{20:5(3)} + c_{22:5(3)} + c_{22:6(3)}}{c_{14:0} + c_{16:0}} \quad (3)$$

zatim, indeksa aterogenosti (AI) i indeksa trombogenosti (TI) su izračunati pomoću sledećih jednačina (Cunha i dr., 2019):

$$AI = \frac{c_{12:0} + 4(c_{14:0}) + c_{16:0}}{\sum \text{MUFA} + \sum \omega - 3 + \sum \omega - 6} \quad (4)$$

$$TI = \frac{c_{14:0} + c_{16:0} + c_{18:0}}{0,5(\sum \text{MUFA}) + 3 \sum \omega - 3 + 0,5 \sum \omega - 6 + \left(\frac{\sum \omega - 3}{\sum \omega - 6}\right)} \quad (5)$$

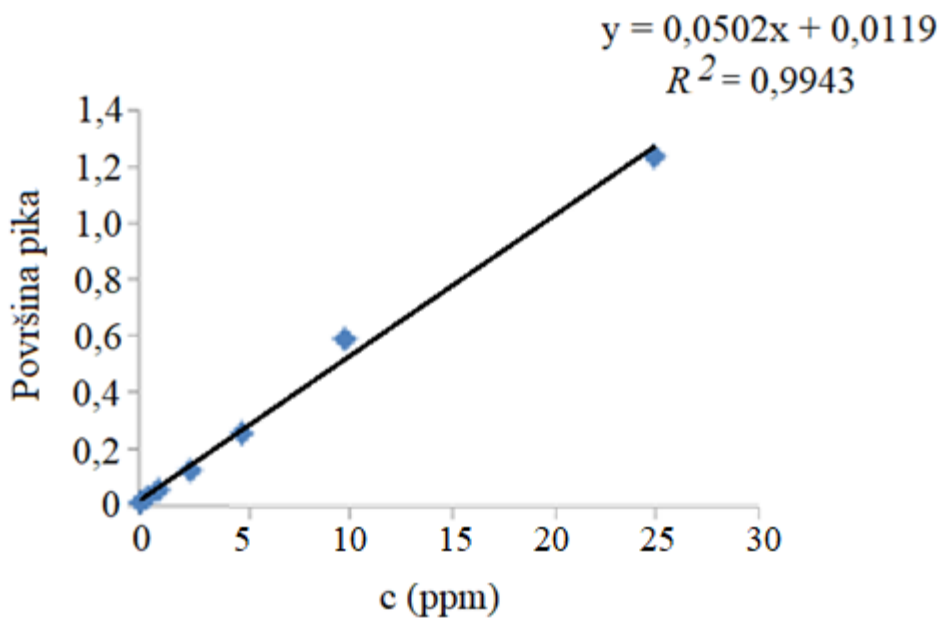
gde je: $c_{12:0}$ koncentracija laurinske kiseline, $c_{14:0}$ koncentracija miristinske kiseline, $c_{16:0}$ koncentracija palmitinske kiseline, $c_{18:0}$ koncentracija stearinske kiseline, $c_{18:1(9)}$ koncentracija oleinske kiseline, $c_{18:2(6)}$ koncentracija linolne kiseline, $c_{18:3(3)}$ koncentracija α -linolenske kiseline, $c_{20:4(6)}$ koncentracija arahidonske kiseline, $c_{20:5(3)}$ koncentracija eikozapentaenoiniske kiseline, $c_{22:5(3)}$ koncentracija dokozapentaenoiniske kiseline, $c_{22:6(3)}$ koncentracija dokozahexaenoiniske kiseline, $\sum \text{MUFA}$ suma koncentracija mononezasićenih masnih kiselina, $\sum \omega - 3$ suma koncentracija polinezasićenih $\omega - 3$ masnih kiselina i $\sum \omega - 6$ suma koncentracija polinezasićenih $\omega - 6$ masnih kiselina.

3.5.2. Određivanje sadržaja tokoferola u ulju tečnom hromatografijom

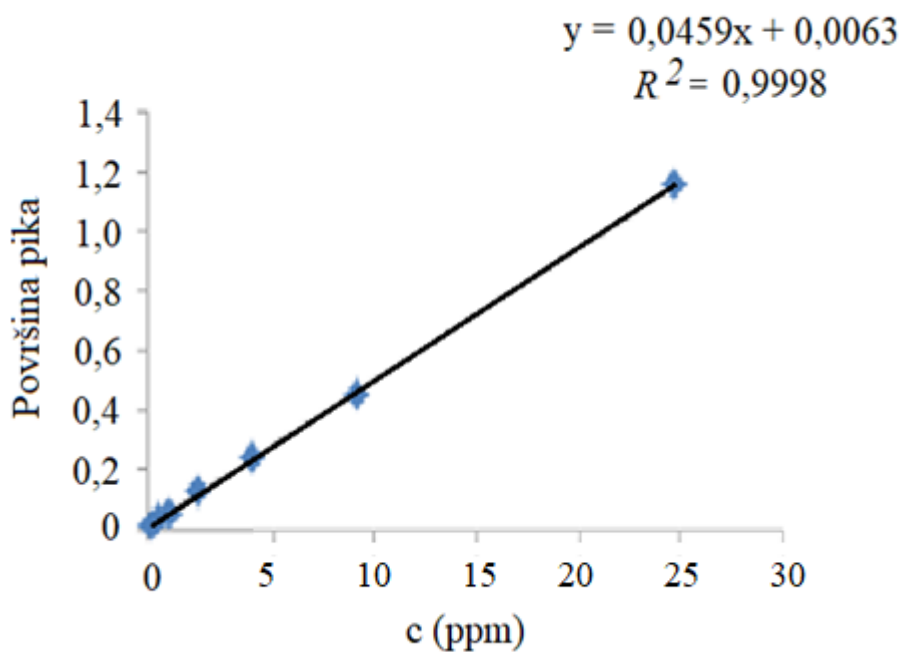
Analiza tokoferola u dobijenom ulju je izvedena po metodi koju su opisali Butinar i dr. (2011) na sledeći način: oko 0,6 g ulja je rastvoreno u 5 cm³ *n*-heksana. Zatim su uzorci mešani na vorteks mikseru (Velp Scientifica, Usmate, Italija) i filtrirani kroz membranski filter (0,45 μ m, Amtast, Lakeland, Florida, SAD) u vijale za analizu. Tako pripremljeni uzorci su analizirani tečnom hromatografijom visoke efikasnosti sa fluorescentnim detektorom (HPLC-FLD Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD), uz normalnofaznu kolonu (Luna Silica, prečnik zrna 5 μ m, 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, SAD), sa 4 % tetrahidrofuranom u *n*-heksanu kao eluentom. Protok je podešen na 1 cm³/min. Za ekscitaciju je primenjeno zračenje talasne dužine od 290 nm, a emisija je merena pri talasnoj dužini od 330 nm. Kalibracione krive su konstruisane upotrebom standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola ($R^2=0,9943$ za α -tokoferol; $R^2=0,9998$ za β -tokoferol; $R^2=0,9988$ za γ -tokoferol; $R^2=0,9999$ za δ -tokoferol) (Slika 8). Koncentracija tokoferola je određena

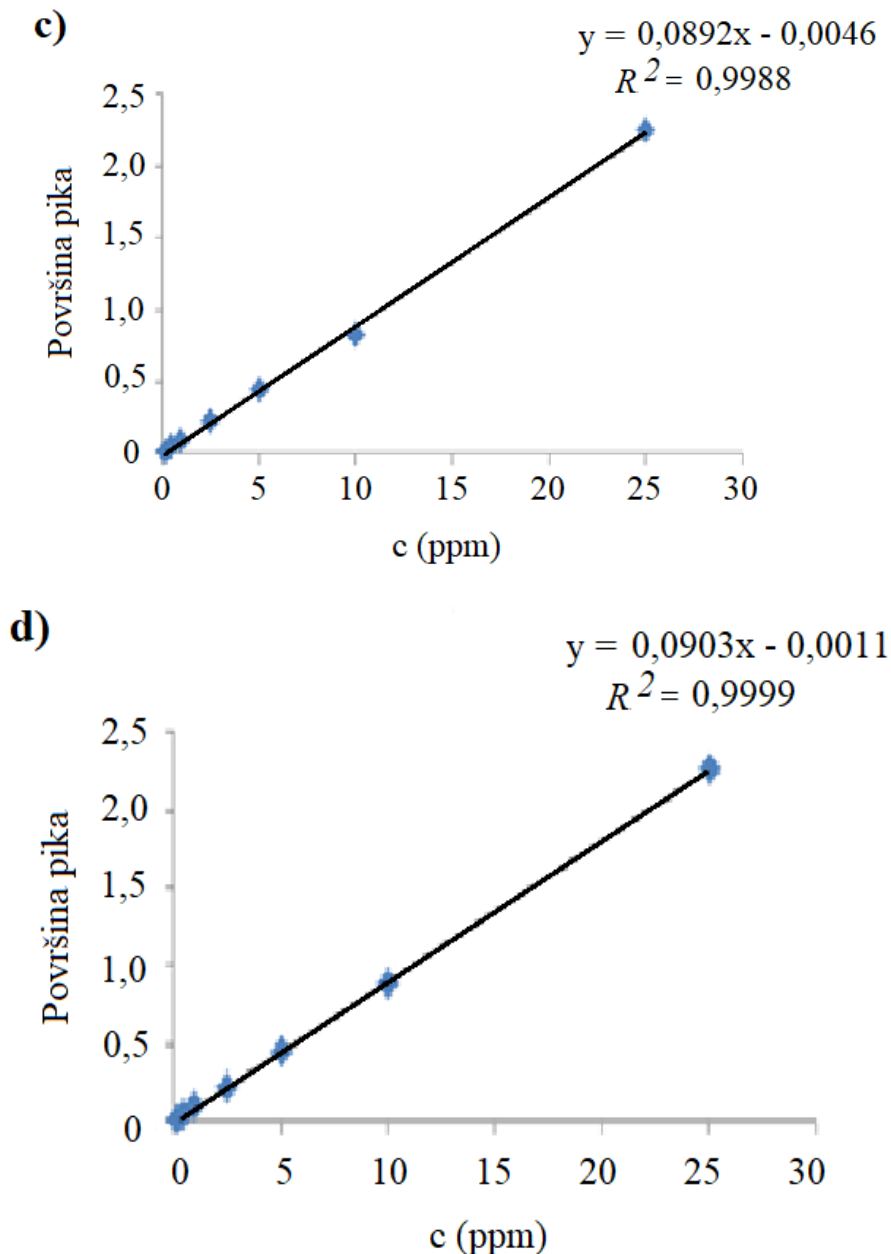
upotrebom odgovarajuće kalibracione krive (Slika 8a-d), dok su izomeri tokoferola identifikovani pomoću odgovarajućeg retencionog vremena, UV/Vis spektra i spajkovanjem standardom.

a)



b)



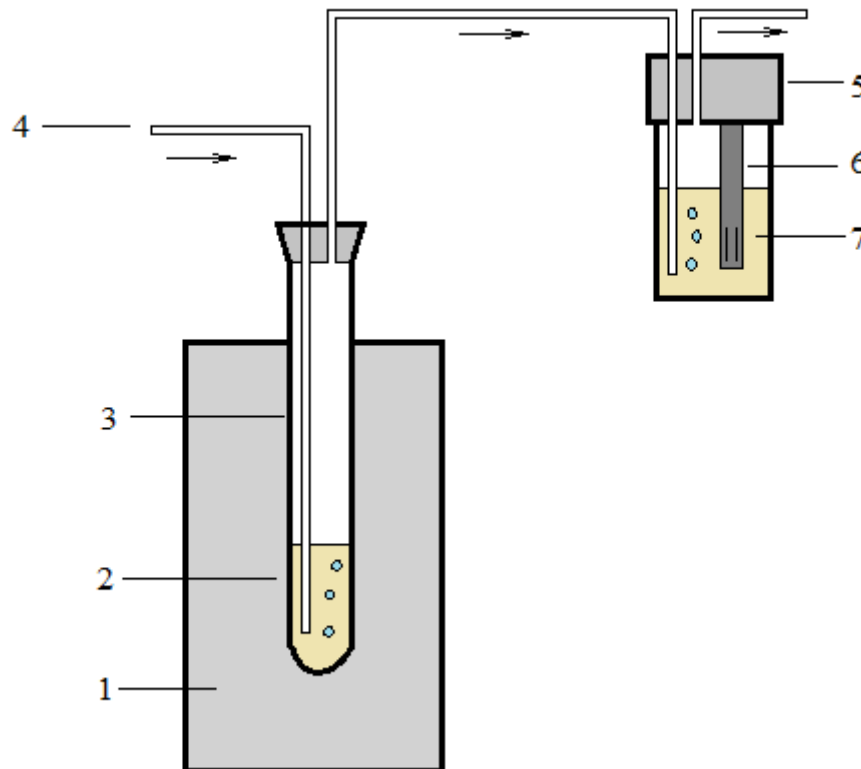


Slika 8. Kalibracione krive dobijene za određivanje: a) α -TOC; b) β -TOC; c) γ -TOC i d) δ -TOC HPLC-FLD metodom

3.5.3. Rancimatni test

Po Rancimatnom testu, isparljivi proizvodi razgradnje zadržavaju se u destilovanoj vodi, sadržaj se određuje konduktometrijski, a indukcioni period se određuje iz krive provodljivost u funkciji vremena. Shema aparature za Rancimatni test je prikazana na shemi 3 i ona se sastoji iz grejača, uzorka, reakcionog suda, priključka za vazduh, posude za merenje, konduktometra i demineralizovane vode. Test oksidativne stabilnosti ulja – Rancimatni test – je izveden u skladu sa ISO 6886:2016, pri čemu je oksidativna stabilnost

ulja izražena kao indukcioni period (h) ispitivanih uzoraka, pri temperaturi od 100 °C i protoku vazduha 18–20 dm³/h. Korišćeno je po 3 g uzorka, a eluent je sakupljan u posudu sa 60 cm³ destilovane vode. Sva merenja su urađena u tri ponavljanja i rezultati su prikazani u obliku srednje vrednosti ± standardna devijacija.



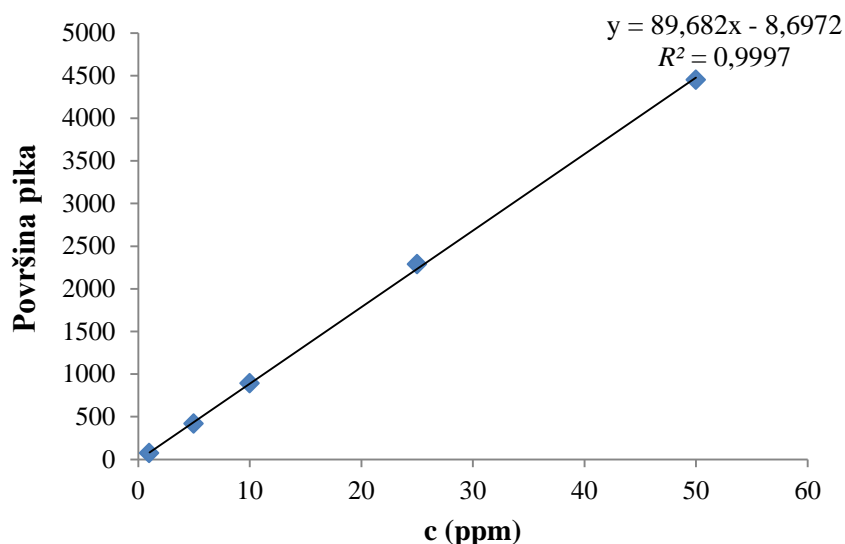
Shema 3. Shema aparature za Rancimatni test: 1) grejač, 2) uzorak, 3) reakcioni sud, 4) priključak za vazduh, 5) posuda za merenje, 6) konduktometar, 7) demineralizovana voda (Jain i Sharma, 2011)

3.6. Metode za karakterizaciju ekstrahovanih polifenola

Nakon ekstrakcije ulja iz semena maline zaostaje obezmašćeni prah semena maline (200–400 μm) iz kog su zatim prethodno navedenim tehnikama (čvrsto-tečna ekstrakcija etanolom, mikrotalasna, ultrazvučna i ekstrakcija rastvaračem pod pritiskom) ekstrahovani polifenoli. Akcenat istraživanja polifenola je bio na određivanju sadržaja EA, zatim RC i određivanje fenolnog profila ekstrakata.

3.6.1. Određivanje sadržaja elaginske kiseline tečnom hromatografijom

Sadržaj EA u svim ispitivanim uzorcima je određen po metodi koju su opisali Kryževičiute i dr. (2016) tečnom hromatografijom visoke efikasnosti sa detektorom sa nizom dioda - HPLC-DAD (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) sa C18 kolonom (Agilent, 4,6 mm×50 mm, 1,8 μm veličina čestica). Injektovana zapremina je bila 5 μl, dok je temperatura bila podešena na 30 °C. Kao eluent je korišćena smeša 1 % mravlje kiseline i acetonitrila. Dobro razdvajanje pikova je postignuto upotrebom sledećeg gradijenta: 0–6 min 15% acetonitrila, 6–28 min, 50 % acetonitrila. Kalibraciona kriva (Slika 9) je konstruisana pomoću standarda EA ($R^2=0,9997$). EA je detektovana na 254 nm i identifikovana na osnovu odgovarajućeg retencionog vremena, UV/Vis spektra i potvrđena spajkovanjem standardom.

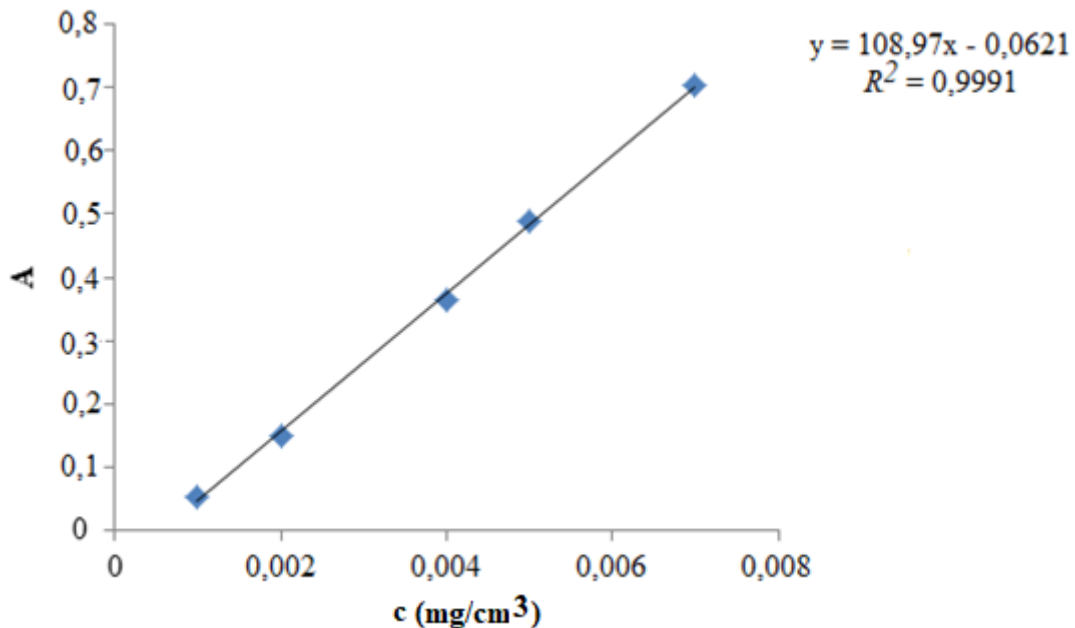


Slika 9. Kalibraciona kriva za određivanje elaginske kiseline HPLC-DAD metodom

3.6.2. Spektrofotometrijsko određivanje redukcionog kapaciteta

Redukcioni kapacitet je određen spektrofotometrijski Folin-Ciocalteu-ovom procedurom, kako su opisali Kähkönen i dr. (1999). Folin-Ciocalteu reagens ($\text{Na}_2\text{WO}_4/\text{Na}_2\text{MoO}_4$) je pripremljen za analizu rastvaranjem reagensa u vodi u odnosu 1:2 (v/v), dok je 20 % Na_2CO_3 pripremljen rastvaranjem u vodi u odnosu 1:4 (m/m). Postupak se sastojao u sledećem: 0,1 cm³ ekstrakta pomešen je sa 7,9 cm³ destilovane vode, 0,5 cm³ pripremljenog Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 cm³ 20 % Na_2CO_3 . Tako pripremljeni uzorci su inkubirani u tamnom prostoru na sobnoj temperaturi 60 min. Nakon inkubiranja, apsorbanca je izmerena na 750 nm na UV/Vis spektrofotometru (Shimadzu UV-1800, Kyoto, Japan). Kalibraciona kriva je konstruisana upotrebom standardnog rastvora galne kiseline

($R^2=0,9991$) (Slika 10). Rezultat je izražen kao masa ekvivalenata galne kiseline (GAE) po 100 g uzorka.



Slika 10. Kalibraciona kriva za spektrofotometrijsko određivanje RC

3.6.3. Određivanje fenolnog profila tečnom hromatografijom sa masenim spektrometrom kao detektorom

Fenolni profil ekstrakata je određen primenom sistema tečnog hromatografa ultravisoke efikasnosti Symbiosis Pico UHPLC (Spark Holland, Waanderweg, Holandija). Korišćeni detektor je bio SCIEX TripleTOF 5600+ DuoSpray Source SCIEX TripleTOF 5600+ (TurboIonSpray i APCI). Podaci su analizirani pomoću softvera SCIEX MarkerView™, KSCMSplus i MetaboAnalyst 4.0.

Uzorci su postavljeni u epruvete od 1,5 cm³, a zatim je dodato 800 μ l 1:1 (v/v) smeše acetonitrila i metanola. Bočice su mučkane 15 min na vortex uređaju (Velp Scientifica, Usmate, Italija) (brzina rotacije od 2000 min⁻¹) i centrifugirane (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) 15 min pri brzini rotacije od 13000 min⁻¹. Supernatant je prenet u staklene bočice za autosempler, koje su zatim stavljene u autosempler na 4 °C. Uzorci (8,0 μ l) su injektovani direktno u LC-MS/MS. Hromatografsko razdvajanje je izvršeno na Hypersil hromatografskoj koloni, BDS C18, 150 mm x 4,6 mm x 5 μ m sa zaštitnom kolonom Hipersil C18 (10 mm x 2,1 mm x 5 μ m). Temperatura kolone je iznosila 40 °C. Mobilna faza se sastojala od dve

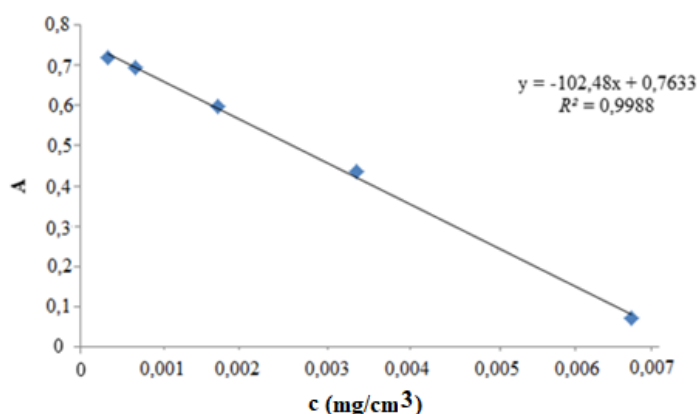
komponente: komponenta A je bila MeOH i mravlja kiselina (99:1, v/v) i komponente B koja je bila smeša vode i mravlje kiseline (99:1, v/v), protok je iznosio 500 $\mu\text{l}/\text{min}$. Primenjen je sledeći gradijent: 0–1 min 100 % A, 1–40 min 0–100 % B, 40–55 min 100 % B i 55–60 min post time. Vreme izvođenja analize je bilo 60 min. Polifenolna jedinjenja su identifikovana upotrebom standarda.

3.7. Metode za određivanje bioaktivnosti ulja i ekstrahovanih polifenola

Bioaktivnost ulja i ekstrakata EA je ispitivana primenom *in vitro* testova antioksidativne aktivnosti, antimikrobnog dejstva i antiproliferativnog delovanja.

3.7.1. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidativne aktivnosti primenom 1,1-difenilpikrilhidrazil-radikala

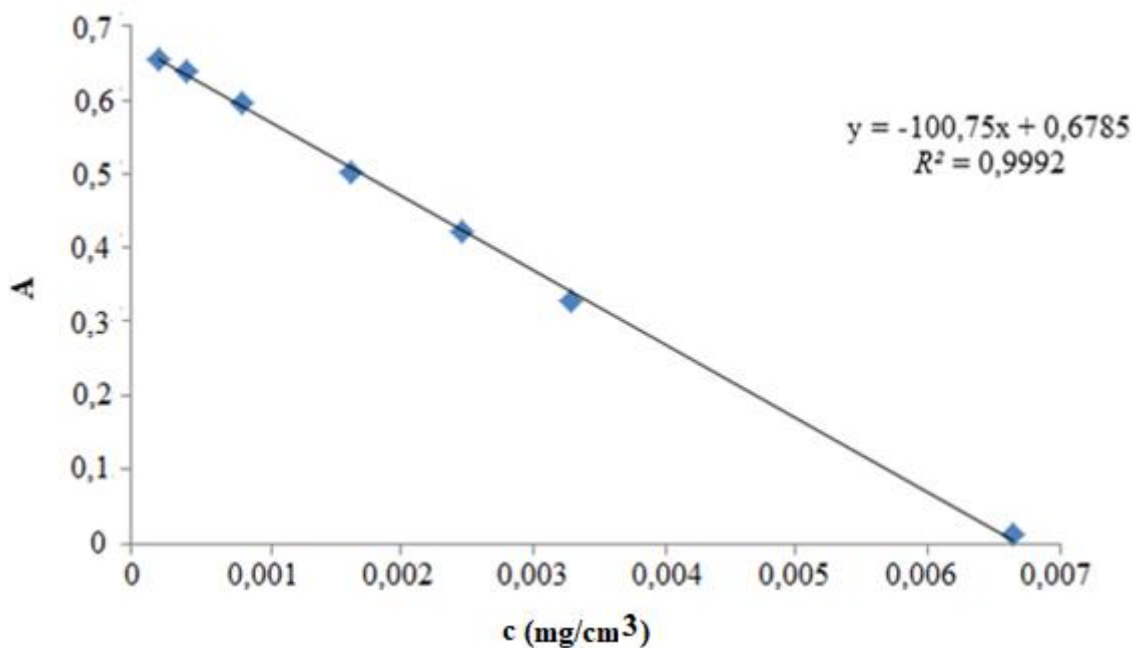
Antioksidativna aktivnost ulja i ekstrakata EA primenom 1,1-difenilpikrilhidrazil-radikala je ispitana testom koji je su opisali Brand-Williams i dr. (1995). Postupak se sastojao u sledećem: metanolni rastvor DPPH reagensa je pripremljen tako što je u normalni sud od 1 dm^3 dodato 26 mg reagensa, dopunjen do crte sa MeOH i podešen na apsorbanciju $0,70 \pm 0,02$ na 517 nm razblaživanjem sa MeOH. Uzorci su pripremljeni tako što je 0,1 cm^3 ekstrakta pomešan sa 2,9 cm^3 pripremljenog reagensa. Nakon toga, uzorci su inkubirani u tamnoj prostoriji 1 h. Meranja su izvedena na 517 nm na UV-Vis spektrofotometru (6300 Spectrophotometer, Jenvai, Ujedinjeno Kraljevstvo). Rezultati su izraženi kao μmol Trolox ekvivalenata (TE) po g uzorka ($\mu\text{mol}/\text{g}$). U cilju dobijanja kalibracionog dijagrama, korišćen je sveže pripremljen vodeni rastvor Trolox-a i kalibracioni dijagram je prikazan na slici 11.



Slika 11. Kalibraciona kriva za određivanje antioksidativne aktivnosti polifenolnih ekstrakata iz semena maline na DPPH radikale

3.7.2. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidativne aktivnosti na diamonijum-2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)

Za određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata na ABTS korišćena je metoda koju su opisali Uysal i dr. (2017). Rastvor ABTS reagensa je pripremljen mešanjem 7 mmol/dm³ vodenog rastvora ABTS i 2,45 mmol/dm³ kalijum-persulfata u odnosu 1:1 (v/v) i inkubacijom između 12 i 16 h u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, reagens je razblažen acetatnim puferom (pH 3,3) kako bi se podesila apsorbancija na $0,700 \pm 0,02$ na 734 nm. Ekstrakti (0,1 cm³) su pomešani sa reagensom (2,9 cm³). Zatim je smeša postavljena da se inkubira u mračnoj prostoriji, na sobnoj temperaturi u periodu od 1 h i nakon toga je očitavana apsorbancija na 734 nm na UV-Vis spektrofotometru (6300 Spectrophotometer, Jenvai, Ujedinjeno Kraljevstvo). U cilju dobijanja kalibracionog dijagrama (slika 12), korišćen je sveže pripremljen vodeni rastvor Trolox-a. Rezultati su izraženi kao μmol Trolox ekvivalenata po gramu uzorka ($\mu\text{mol/g}$ ekstrakta).

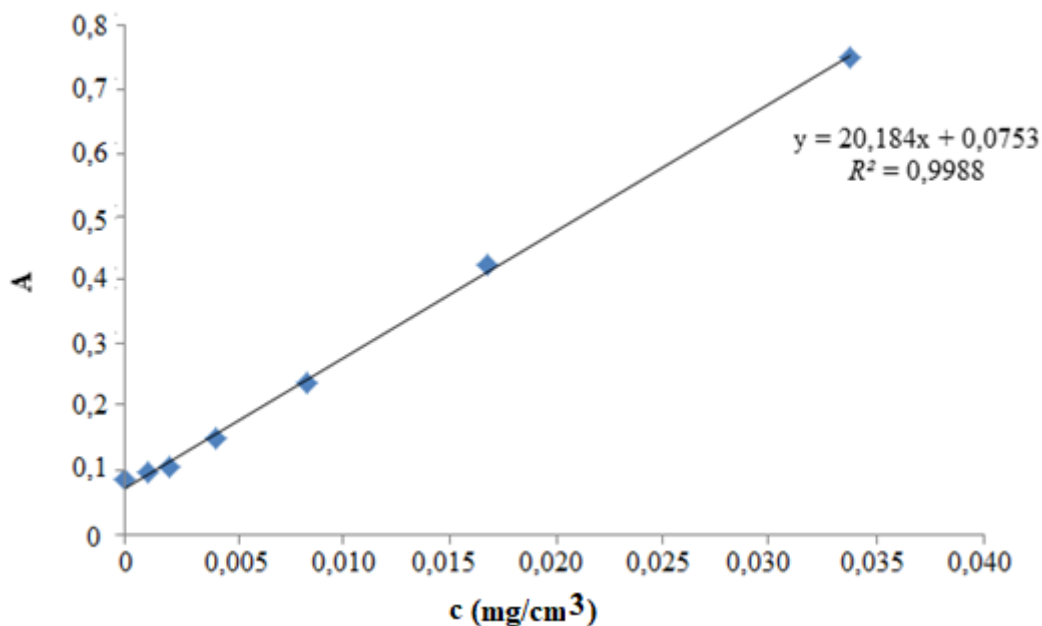


Slika 12. Kalibraciona kriva za određivanje antioksidativne aktivnosti polifenolnih ekstrakata iz semena maline na ABTS⁺ radikale

3.7.3. Sposobnost redukcije Fe³⁺-jona

Sposobnost redukcije gvožđe(III)-jona (eng. Ferric ion reducing antioxidant power, FRAP) je određena FRAP testom. Analiza FRAP aktivnosti sprovedena je kako su opisali Benzie i Strain (1996). Rastvor polifenolnog ekstrakta (1 mg/cm³; 0,1 cm³) dodat je FRAP

reagensu ($2,9 \text{ cm}^3$) koji sadrži acetatni pufer ($0,3 \text{ mol/dm}^3$, pH 3,6), TPTZ (10 mmol/dm^3) u 40 mmol/dm^3 HCl i gvožđe(III)-hlorid (20 mmol/dm^3) u odnosu 10:1:1 (v/v/v). Nakon 1 h inkubacije na sobnoj temperaturi očitana je apsorbancija uzorka na 593 nm na UV-Vis spektrofotometru (6300 Spectrophotometer, Jenvai, Ujedinjeno Kraljevstvo). Kalibraciona kriva je pripremljena korišćenjem standardnih rastvora gvožđe(III)-sulfata (Slika 13). FRAP aktivnost izražena je u $\mu\text{mol/dm}^3 \text{ Fe}^{2+}$ po gramu ekstrakta ($\mu\text{mol/dm}^3/\text{g}$ ekstrakta).



Slika 13. Kalibraciona kriva za određivanje sposobnosti redukcije Fe^{3+} -jona polifenolnih ekstrakata iz semena maline

3.7.4. Određivanje antimikrobne aktivnosti

Za određivanje antimikrobnog dejstva ulja i ekstrakata EA upotrebijene su sledeće bakterijske kulture: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* i *Salmonella* Enteritidis (Microbiologics, MN, SAD). Ove kulture su čuvane u frižideru i jednom nedeljno su subkultovane na svež hranljivi agar (bacteriological grade) (HiMedia, Mumbai, Indija).

Antimikrobno delovanje ulja određeno je Bujon mikro-dilucionom metodom (Ledina i dr., 2018). Za pripremu inokuluma ispitivanih izolata korišćen je sterilni fiziološki rastvor (0,9 % NaCl u vodi). Priprema i standardizacija inokuluma je izvedena primenom 18 h bakterijskih kultura. Svaki testirani izolat je kultivisan na krvnom agaru tokom 18 h na temperaturi od $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Nekoliko identičnih kolonija ispitivane bakterijske kulture resuspendovano je u 9 cm^3 fiziološkog rastvora. Optička gustina (OD) inokuluma je podešena

do gustine koja je odgovarala McFarland standardu 0,5 ($\sim 1 \times 10^8$ CFU/cm³) korišćenjem denzitometra DEN-1 (Biosan, Riga, Latvia). Finalna koncentracija inokuluma korišćena u ispitivanjima antimikrobne aktivnosti iznosila je 10^6 CFU/cm³. Prilikom izvođenja ove metode od posebne važnosti je standardizacija inokuluma. Nakon pripreme inicijalne suspenzije bakterija optičke gustine ekvivalentne McFarland standardu 0,5, finalni inokulum se pripremao razblaživanjem sa Mueller-Hinton bujonom u odnosu 1:100 radi dobijanja koncentracije bakterija u iznosu od 1×10^6 CFU/cm³. Koncentracija bakterija izražena po mililitru inokuluma zavisi od same zapremine tečnosti koja se unosi u medijum. Tokom ovog ispitivanja primenjen je inokulum zapremine 20 μ l koji je sadržavao 2×10^6 CFU/cm³, kako bi finalna koncentracija bakterija po bunariću iznosila 2×10^5 CFU/cm³. Dilucioni antibiogram je izveden tako što je napravljena serija koncentracija ulja u propilen-glikolu. MHB je inokulisan u količini od 160 μ l u test bunariće mikrotitar ploče, u koje je zatim dodato ulje svake testirane koncentracije u količini od 20 μ l i bakterijski inokulum, takođe u količini od 20 μ l. Konačna zapremina po bunariću u mikrotitar ploči je iznosila 200 μ l. Uporedno su postavljene sledeće kontrole:

- pozitivna kontrola I - kontrola rasta mikroorganizama: MHB (160 μ l), suspenzija bakterija (20 μ l) i rastvarač propilen-glikol (20 μ l);
- negativna kontrola - kontrola sterilnosti: MHB (160 μ l), ulje (20 μ l) i rastvarač propilen-glikol (20 μ l);
- pozitivna kontrola II: MHB (160 μ l), suspenzija bakterija (20 μ l) i rastvor streptomocina (20 μ l).

Mikrotitar ploče su inkubirane tokom 24 h na temperaturi od 37 °C. Postupak je izveden u četiri ponavljanja. U cilju određivanja minimalne inhibitorke koncentracije (MIC) nakon 18 h inkubiranja u svaki otvor je dodato po 20 μ l 0,01 % resazurina kao indikatora bakterijskog rasta, mikrotitar ploče su obmotane aluminijumskom folijom, a zatim su reinkubirane tokom narednih 6 h pri prethodno pomenutoj temperaturi. MIC je definisana kao najniža koncentracija ulja koja inhibira vidljivi rast test mikroorganizama, a određena je na osnovu redukcije resazurina i predstavlja onu koncentraciju ulja koja sprečava redukciju resazurina. Minimalna baktericidna koncentracija (MBC) je određena zasejavanjem po 100 μ l iz svakog bunarića u kome nije došlo do promene boje na površini agara (PCA, LabM, Lancashire, Ujedinjeno Kraljevstvo) za ukupan broj bakterija i njihovim inkubiranjem 24 h

na prethodno pomenutim temperaturama. Najniža koncentracija ulja pri kojoj je zabeleženo potpuno odsustvo bakterijskog rasta se smatrala kao MBC.

Antimikrobni test za ekstrakte EA je izveden u skladu sa NCCLS (1999). Posle inkubacije preko noći na hranljivom agaru na 37 °C, dobro izolovane kolonije svakog ispitivanog mikroorganizma inokulirane su u sterilni fiziološki rastvor (0,9 % NaCl u vodi) i dobro promešane. Gustina bakterijske suspenzije je prilagođena na 0,5 McFarland standarda upotrebom prethodno pomenutog denzitometra DEN-1. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti ispitivanih ekstrakata izvršeno je disk-difuzionom metodom. Kontrola je bio etanol (80 %) koji se koristio za ekstrakciju. Mueller-Hinton bujon u sterilne Petrijeve posude (90 mm) inokulisan je sa 100 cm³ bakterijske suspenzije koja sadrži 1-2×10⁸ CFU/cm³ pomoću sterilnog tampona. Sterilni diskovi filter papira (6 mm) (Whatman, Maidstone, Velika Britanija) impregnirani sa 10 cm³ ekstrakata, stavljeni su na površinu agara. Posle 24 h inkubacije na 37 °C, ploče su ispitane na zone inhibicije. Sve analize su izvedene u četiri ponavljanja.

3.7.5. Određivanje antiproliferativne aktivnosti polifenolnog ekstrakta

Za određivanje antiproliferativne aktivnosti, ekstrakti su rastvoreni u 9 mg/cm³ NaCl, sterilisani pomoću filtera za špric, veličine pora 0,22 μm (Sartorius, Nemačka) i ispitani u opsegu koncentracija od 0,39–200 μg/cm³. Standard EA je rastvoren u DMSO i ispitivan u opsegu koncentracija od 0,244–62,5 μg/cm³.

Ove analize su izvedene *in vitro* upotrebom humanih ćelijskih linija: HeLa (epitelioidni karcinom grlića materice, ECACC 93021013), MCF7 (adenokarcinom dojke, ECACC 86012803) i MRC-5 (fetalni fibroblasti pluća, ECACC 84101801).

Ćelijske linije su prikupljene i zasejane u mikrotitarske ploče (Sarstedt, Nevton, SAD) pri gustini sejanja 4 × 10³, u zapremini od 180 μl (ekstrakti) ili 199 μl (standard), i pre-inkubirane u DMEM dopunjenom sa 5 % FCS, na 37 °C tokom 24 h. Nakon toga, dodata su serijska, dvostruka razblaženja ekstrakata (20 μl) i standarda (1 μl) da bi se postigle potrebne koncentracije. U kontrolne otvore dodate su jednake zapremine rastvarača, pri čemu je koncentracija DMSO u ćelijskoj kulturi bila ≤ 0,05 % (v/v). Zatim su mikroploče inkubirane na 37 °C, tokom 48 sati. Rast ćelija je određen kolorimetrijskim testom SRB koji su opisali Skehan i dr. (1990), a modifikovali Četojević-Simin i dr. (2009). Apsorbancija je merena na čitaču mikroploča (Multiscan Ascent, Labsystems; Helsinki, Finska) na 540/620 nm. Efekat

na rast ćelija izračunat je kao $100 \times (A_t/A_c)$ (%), gde je A_t apsorbancija test uzorka i A_c apsorbancija kontrole. Krive zavisnosti ćelijskog rasta u odnosu na koncentraciju (efekat doze) su prikazane za svaki tretman. Vrednosti IC_{50} (koncentracija koja inhibira rast ćelija za 50 %) određene su upotrebom OriginPro 8 PRO (Origin-Lab Corporation, Northampton, USA) softvera.

3.8. Statistička analiza

Sva merenja su vršena u najmanje tri ponavljanja i rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Analiza varijanse (ANOVA) i post-hoc Tukey test ($p < 0,05$) su korišćeni da bi se utvrdile značajne razlike između rezultata. Korišćen softver je bio STATISTICA 13.0 (StatSoft, Palo Alto, SAD). Takođe, korišćeni su i softveri Design Expert 12 (Stat-Ease, Inc. Minesota, SAD) i OriginPro 8 PRO (Origin-Lab Corporation, Northampton, USA).

4. Rezultati i diskusija

4.1. Karakterizacija ekstrahovanog ulja

Ekstrahovano ulje karakterizovano je određivanjem masnokiselinskog sastava, sadržaja tokoferola, kao i određivanjem oksidativne stabilnosti. Takođe, određena je i bioaktivnost ulja pomoću antioksidativnih i antimikrobnih *in vitro* testova.

4.1.1. Određivanje hemijskog sastava semena maline

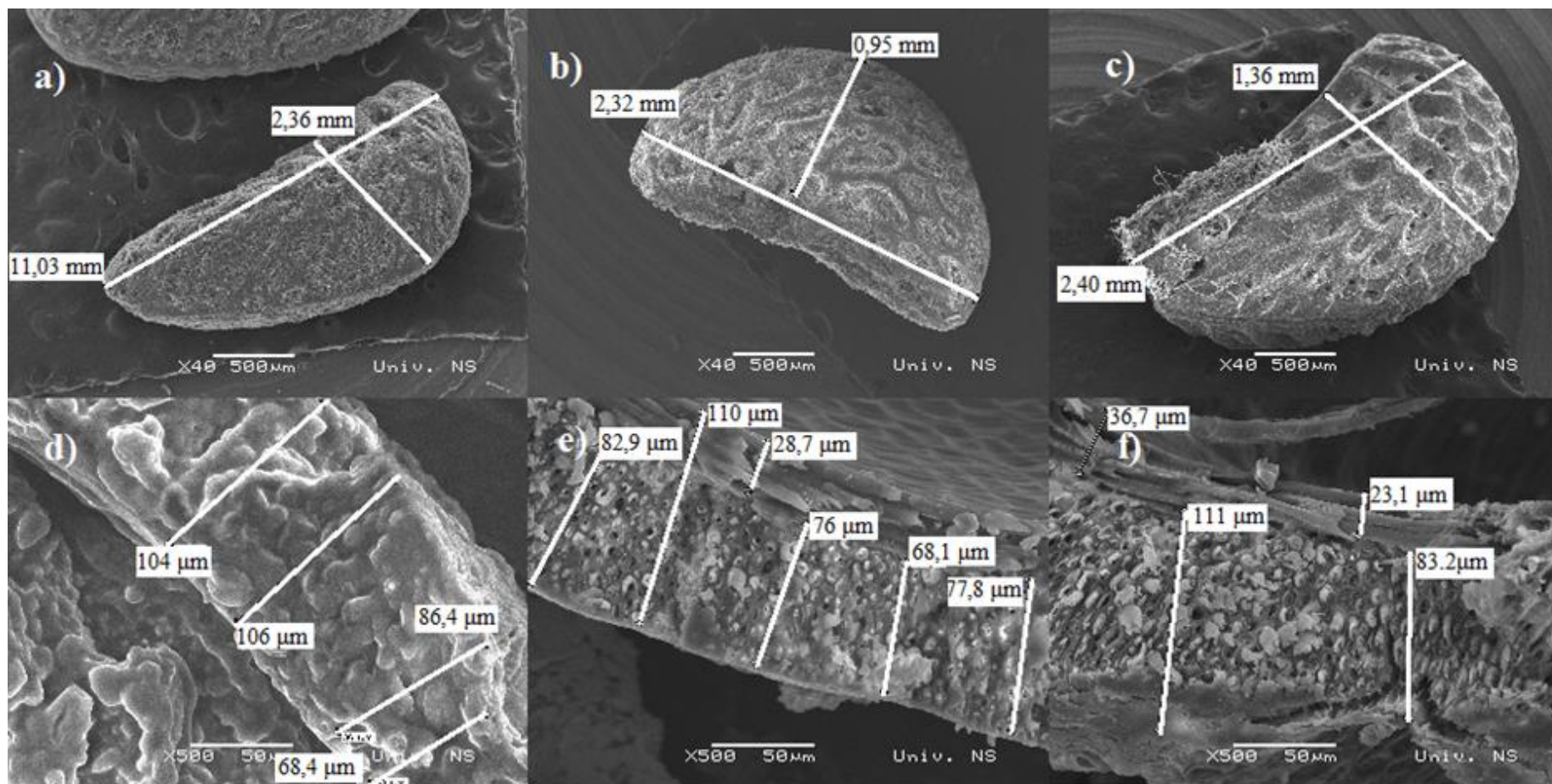
Hemijski sastav semena maline sorte Vilamet je određen prethodno navedenim metodama, u cilju određivanja potencijalno korisnih komponenti radi dalje valorizacije. Dobijeni rezultati (Tabela 4) koji prikazuju masene udele u semenu maline ove sorte impliciraju da najveći sadržaj imaju dijetetska vlakna (65,79 %), dok značajne masene udele imaju još i ulje (14,90 %), proteini (6,9 %), voda (5,71 %) i šećeri (3,27 %). Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima istraživanja koja su sproveli Kosmala i dr. (2015). Takođe, sličan sadržaj ulja u semenu maline su našli i Oomah i dr. (2000) koji su utvrdili da se u semenu maline u zavisnosti od sorte nalazi između 10 i 23 % ulja.

Tabela 4. Hemijski sastav semena maline sorte Vilamet

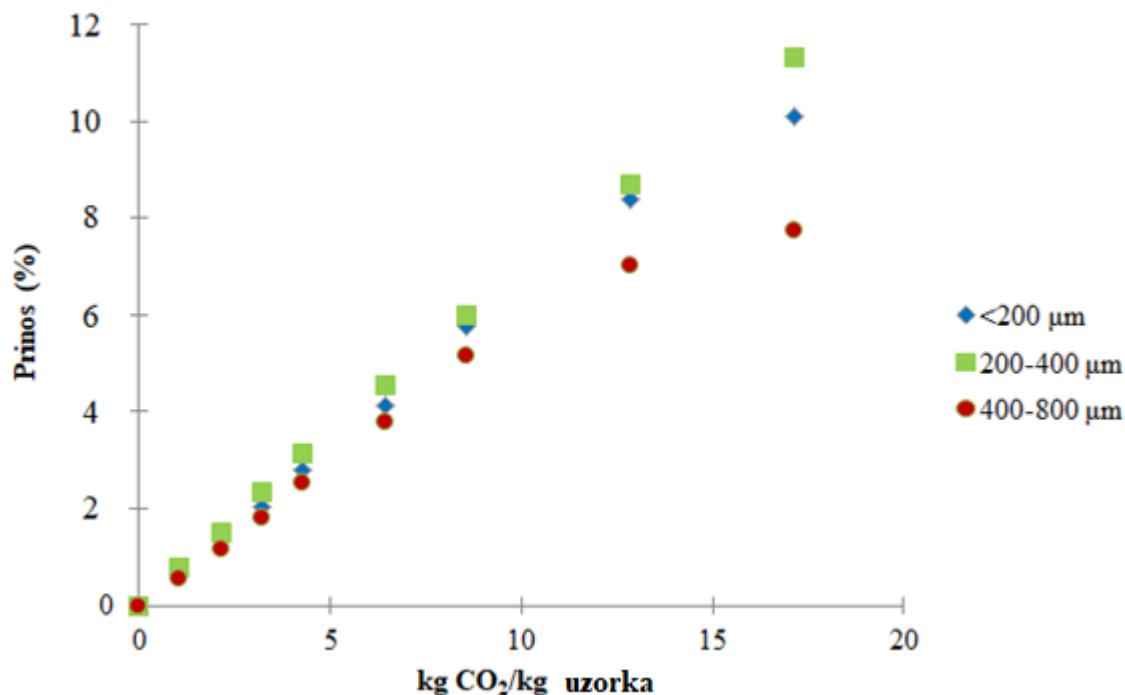
Voda (%)	Proteini (%)	Pepeo (%)	Skrob (%)	Ulje (%)	Šećeri (%)	Dijetetska vlakna (%)
5,71±0,19	6,9±0,91	1,38±0,10	1,04±0,43	14,90±0,90	3,27±1,18	65,79±2,16

4.1.2. Prinos ulja primenom različitih ekstrakcionih tehnika

Kako se u biljnom materijalu (Slika 14) ulje obično nalazi između ćelija, da bi se postigao što veći prinos ulja, potrebno je da se poveća površina kontakta između rastvarača i biljnog materijala kao što je rečeno u teorijskom delu. To je postignuto tako što je osušeno seme maline sameveno i prosejano na tri granulacije, na 400–800 µm, 200–400 µm i na manje od 200 µm. Seme maline sve tri sorte sameveno na granulaciju 200–400 µm je dalo najveći prinos ulja (Slika 15) upotrebom SFE, te je odlučeno da se ono koristi u daljim eksperimentima. Bilo je očekivano da se smanjenjem veličine čestica poveća prinos ulja s obzirom na veću površinu, međutim, ovo smanjenje prinosa se može objasniti kanalisanjem unutar ekstrakcionog sloja i povećanjem unutrašnjeg otpora prenošenju mase.



Slika 14. Izgled semena maline sorte Vilamet (a), Polka (b) i Miker (c) i presek semena maline sorte Vilamet (d), Polka (e) i Miker (f) snimjene skenirajućim elektronskim mikroskopom



Slika 15. Uticaj granulacije semena maline na prinos ulja iz semena maline sorte Vilamet dobijen pomoću SFE pri srednjim uslovima (300 bar, 50 °C i 0,3 kg/h)

Rezultati prinosa ulja (Y) nakon ekstrakcije svim ispitivanim metodama prikazani su u tabeli 5 i na slici 16. Kao što se može videti iz priložene tabele, najviši prinos ulja dobijen je nakon ekstrakcija *n*-heksanom po Soxhlet-u i SFE, dok je najniži prinos ulja dobijen nakon hladnog ceđenja. Takođe, značajno visok prinos ulja se dobija nakon ekstrakcije hloroformom i dihlormetanom sa MeOH. Međutim, iako se rastvarači uparavaju nakon ekstrakcije postoji mogućnost da u ulju ostanu u tragovima i na taj način negativno utiču na ljudski organizam pri upotrebi u ljudskoj ishrani. Iz tog razloga, ekstrakcije ovim rastvaračima su razmatrane isključivo radi poređenja rezultata analiza sa rezultatima dobijenim nakon ekstrakcija takozvanim „zelenim” rastvaračima. Na osnovu metode ekstrakcije ulja po Soxhlet-u, zaključeno je da je prinos ulja iz sorte Polka ($18,42 \pm 0,07$) % bio znatno veći od prinosa ulja sorti Vilamet ($17,52 \pm 0,02$) % i Miker ($17,52 \pm 0,05$) %, koji su bili vrlo slični. Pored toga, prinos ulja iz sorte Polka, dobijen metodom ekstrakcije po Soxhlet-u, bio je niži od prinosa ulja dobijenom nakon SFE koristeći centralne vrednosti parametara (300 bar, 50 °C i 0,3 kg/h). Naime, ekstrakcijom superkričnim ugljen-dioksidom se ekstrahovala značajna količina ulja, slična količini dobijenoj metodom po Soxhlet-u, kao što se može videti u tabeli 5 i na slici 16. Ovo dobija na značaju jer SFE spada u „zelene” ekstrakcione tehnike. Dobijeni rezultati su u skladu sa ranijim istraživanjima sadržaja ulja u

semenima maline (Johansson i dr., 1997). Ovi autori su ulje iz semena maline ekstrahovali čvrsto-tečnom ekstrakcionom tehnikom pri čemu su kao rastvarač koristili smeštu hloroforma i MeOH u odnosu 2:1 (v:v).

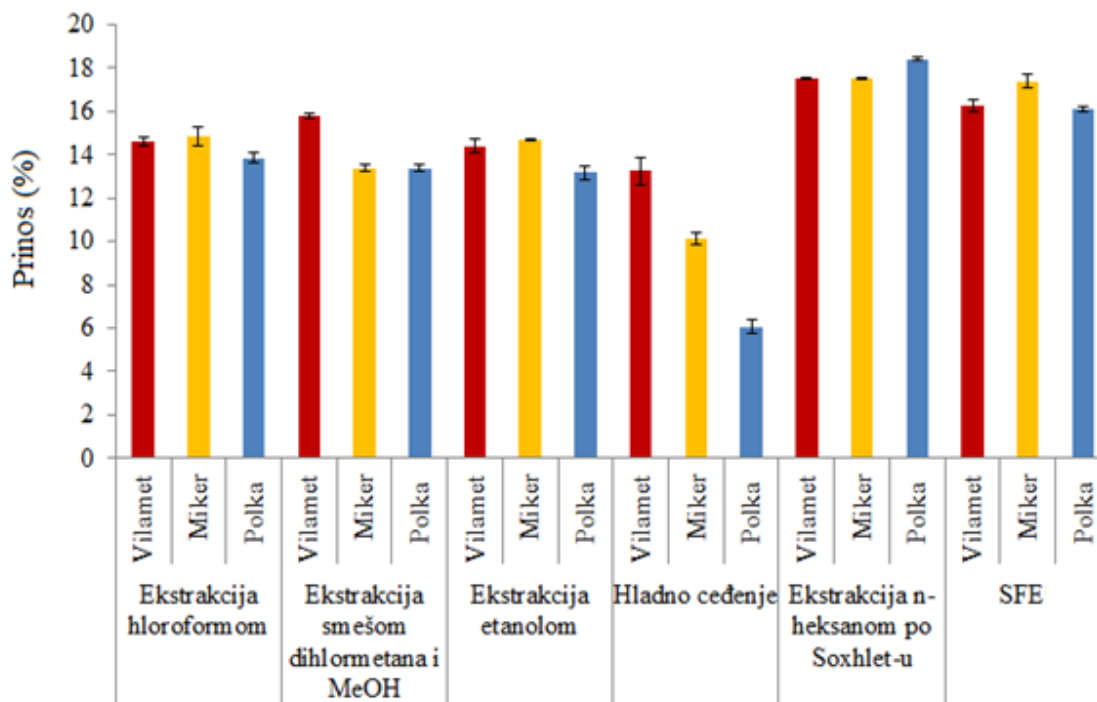
Tabela 5. Uticaj ispitivanih metoda ekstrakcije i sorte maline na prinos ulja (Y)

Metoda ekstrakcije	Sorta	Y (%)
Ekstrakcija hloroformom	Vilamet	14,61 ± 0,19 ^{2b}
	Miker	14,87 ± 0,43 ^{2c}
	Polka	13,86 ± 0,21 ^{1b}
Ekstrakcija smešom dihlormetana i MeOH	Vilamet	15,77 ± 0,12 ^{2bc}
	Miker	13,38 ± 0,17 ^{1b}
	Polka	13,37 ± 0,16 ^{1b}
Ekstrakcija etanolom	Vilamet	14,41 ± 0,30 ^{2b}
	Miker	14,68 ± 0,05 ^{2c}
	Polka	13,19 ± 0,31 ^{1b}
Hladno ceđenje	Vilamet	13,25 ± 0,64 ^{3a}
	Miker	10,12 ± 0,27 ^{2a}
	Polka	6,07 ± 0,32 ^{1a}
Ekstrakcija <i>n</i> -heksanom po Soxhlet-u	Vilamet	17,52 ± 0,02 ^{1d}
	Miker	17,52 ± 0,05 ^{1d}
	Polka	18,42 ± 0,07 ^{2d}
Ekstrakcija superkritičnim ugljen-dioksidom*	Vilamet	16,27 ± 0,26 ^{1c}
	Miker	17,40 ± 0,30 ^{2d}
	Polka	16,11 ± 0,15 ^{1c}

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD, $n = 3$. Različita slova ukazuju na značajne razlike u prinosu ulja između primenjenih tehnika ekstrakcije (sorta = konst.). Različiti brojevi ukazuju na značajne razlike u prinosu ulja između sorti (metoda ekstrakcije = konst.) prema Tukey-ovom HSD testu ($p < 0,05$).

* Ekstrakcija superkritičnim ugljen-dioksidom je izvršena pri srednjim vrednostima parametara (300 bar, 50 °C i 0,3 kg/h).

Razlike između prinosa ulja dobijenih različitim metodama ekstrakcije se verovatno mogu objasniti time što se u zavisnosti od polarnosti korišćenih rastvarača koekstrahuju različita jedinjenja slične poslarnosti (Dunford i Zhang, 2003). Uzimajući u obzir rasprostranjenost sorti u Srbiji, kao i izbor najsavremenije “zelene” tehnike ekstrakcije, odlučeno je da se SFE optimizuje korišćenjem semena maline Vilamet i pomoću RSM.



Slika 16. Prinosi ulja dobijeni različitim metodama ekstrakcije za sve tri sorte maline

Prinosi ulja iz semena maline sorte Vilamet dobijeni postupkom optimizacije SFE prikazani su u tabeli 6. Najniži prinos (6,77 %) postignut je pri uslovima od 250 bar, 50 °C i protok CO₂ od 0,2 kg/h (eksperiment 5), dok je najviši prinos (18,29 %) dobijen pri uslovima 350 bar, 50 °C i protok CO₂ od 0,4 kg/h (eksperiment 8) (Tabela 6). U poređenju sa prethodnim istraživanjima (Kryževičiute i dr., 2016), čiji su optimalni uslovi bili 450 bar, 60 °C i vreme trajanja ekstrakcije 120 min sa prinosom ulja 14,61 %, rezultati iz tabele 6 sugerišu veći prinos ulja dobijen pri optimalnim uslovima primenom RSM. S obzirom da u navedenoj literaturi nije navedena sorta maline, koja takođe može biti razlog nešto nižeg prinosa ulja, razlog ovome može biti i sam uzorak, odnosno način pripreme, relativno kratka dužina trajanja ekstrakcije (dva puta kraća), kao i to što jedan od parametara nije bio protok CO₂, kao ni veličina čestica, koji takođe značajno utiču na prinos ulja. Važno je napomenuti da je *Y* dobijen ekstrakcijom po Soxhlet-u bio nešto niži u poređenju sa eksperimentom sa najvećim *Y* zbog moguće koekstrakcije drugih jedinjenja sa uljanom fazom tokom SFE procesa.

Tabela 6. Uticaj procesnih parametara SFE na prinos ekstrakcije (Y) i masnokiselinski sastav semena maline sorte Vilamet

Eksperiment*	Y (%)	16:0 (%)	18:0 (%)	18:1(9) (%)	18:2(6) (%)	18:3(3) (%)
1	9,83	2,76	0,68	12,08	49,43	35,03
2	11,55	2,75	0,68	12,19	49,47	34,88
3	14,13	3,05	0,98	12,91	50,00	33,03
4	15,70	2,51	0,75	12,97	49,58	34,17
5	6,77	2,90	0,73	12,36	49,71	34,28
6	8,21	3,03	0,78	12,72	49,80	33,63
7	17,05	2,75	0,70	12,40	49,79	34,34
8	18,29	2,47	0,69	12,56	49,40	34,86
9	16,07	2,71	0,73	12,17	49,22	34,32
10	17,43	2,56	0,71	12,67	49,48	34,56
11	16,11	2,69	0,68	11,82	49,08	34,94
12	15,61	2,48	0,67	12,35	49,36	35,11
13	16,65	2,81	0,72	11,90	49,55	35,01
14	8,67	2,88	0,74	12,42	49,77	34,16
15	13,29	2,72	0,65	12,17	49,53	34,90
16	16,30	2,61	0,89	13,37	49,58	33,53
17	9,85	2,92	0,72	12,47	49,62	34,25

*Eksperimentalni uslovi su prikazani u tabeli 2

Procenjeni koeficijenti prilagođenog polinomnog modela drugog reda za Y su prikazani u tabeli 7. Rezultati eksperimentalno dobijenih prinosa ulja fitovani su kvadratnim polinomnim modelom (jednačina (6)). Za proveru slaganja modela sa eksperimentalnim podacima korišćena je ANOVA i deskriptivna statistika (koeficijent determinacije i koeficijent varijacije), a rezultati su prikazani u tabeli 8. Kao što se može videti, izračunata je visoka vrednost za koeficijent determinacije (R^2) koji je iznosio 0,9692, dok je prilagođeni koeficijent determinacije ($AdjR^2$) bio 0,9296, što ukazuje da je matematički model dobra

aproksimacija eksperimentalnih rezultata. Relativno nizak koeficijent varijacije (CV, 7,21 %) ukazuje na relativno male varijacije srednje vrednosti i na dobru ponovljivost rezultata. Da bi se potvrdila adekvatnost modela, neophodno je da se primeni ANOVA. Nedostatak fitovanja (Lack of fit) bio je značajan ($p > 0,05$), što sugeriše da primenjeni polinomski model drugog reda predstavlja dobru aproksimaciju eksperimentalnih rezultata.

Tabela 7. Procenjeni koeficijenti fitovanja polinomskog modela drugog reda za prinos ulja i TOC pri optimizaciji SFE semena maline sorte Vilamet

Članovi	Y	α -TOC	γ -TOC	δ -TOC	TTC
β_0	15,97	55,39	120,36	7,54	183,29
Linearni					
β_1	3,04*	-8,19*	-17,75*	-1,81*	-27,75*
β_2	-0,60	-4,69**	0,27	0,58**	-3,83
β_3	3,33*	-6,33*	-10,08*	-1,18*	-17,59*
Interakcija					
β_{12}	0,86	3,86***	3,05	-0,59***	6,32
β_{13}	-0,59	4,84**	3,20	0,36	8,41
β_{23}	0,19	4,79**	6,01	-0,08	10,72***
Kvadratni					
β_{11}	-2,00*	5,12**	9,16**	0,36	14,65**
β_{22}	-1,43**	3,61	10,17**	1,19*	14,96**
β_{33}	-1,08***	1,79	3,31	1,05*	6,15
R^{2a}	0,9692	0,9340	0,9326	0,9652	0,9462
Adj R^{2b}	0,9296	0,8493	0,8460	0,9205	0,8770
CV ^c	7,21	6,50	5,36	6,27	5,05
p_m - vrednost ^d	0,0002	0,0023	0,0024	0,0003	0,0012
p_{if} - vrednost ^e	0,0760	0,9641	0,8553	0,5394	0,9711

Visko značajan * $p < 0,01$.

Značajan ** $0,01 \leq p < 0,05$.

Umereno značajan *** $0,05 \leq p < 0,1$.

^aKoeficijent determinacije.

^bPrilagođeni koeficijent determinacije.

^cKoeficijent varijanse (%).

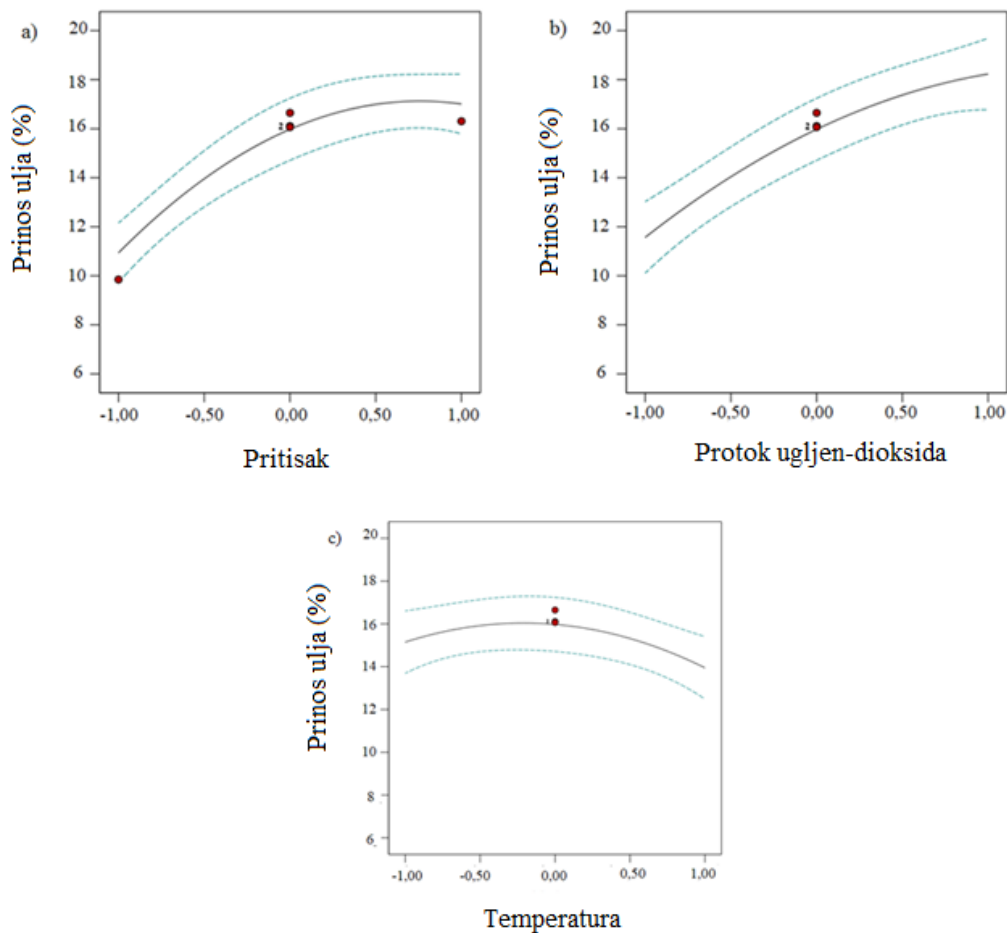
^dVerovatnoća F-vrednosti za model.

^eVerovatnoća F-vrednosti za nedostatak fitovanja.

Matematička zavisnost između eksperimentalno dobijenih rezultata i modela pokazala je visoko značajne p -vrednosti ($< 0,0001$) za model. Jednačina prediktivnog modela za prinos ekstrakcije sa izostavljenim koeficijentima čiji uticaj nije značajan ($p > 0,05$) bila je sledeća:

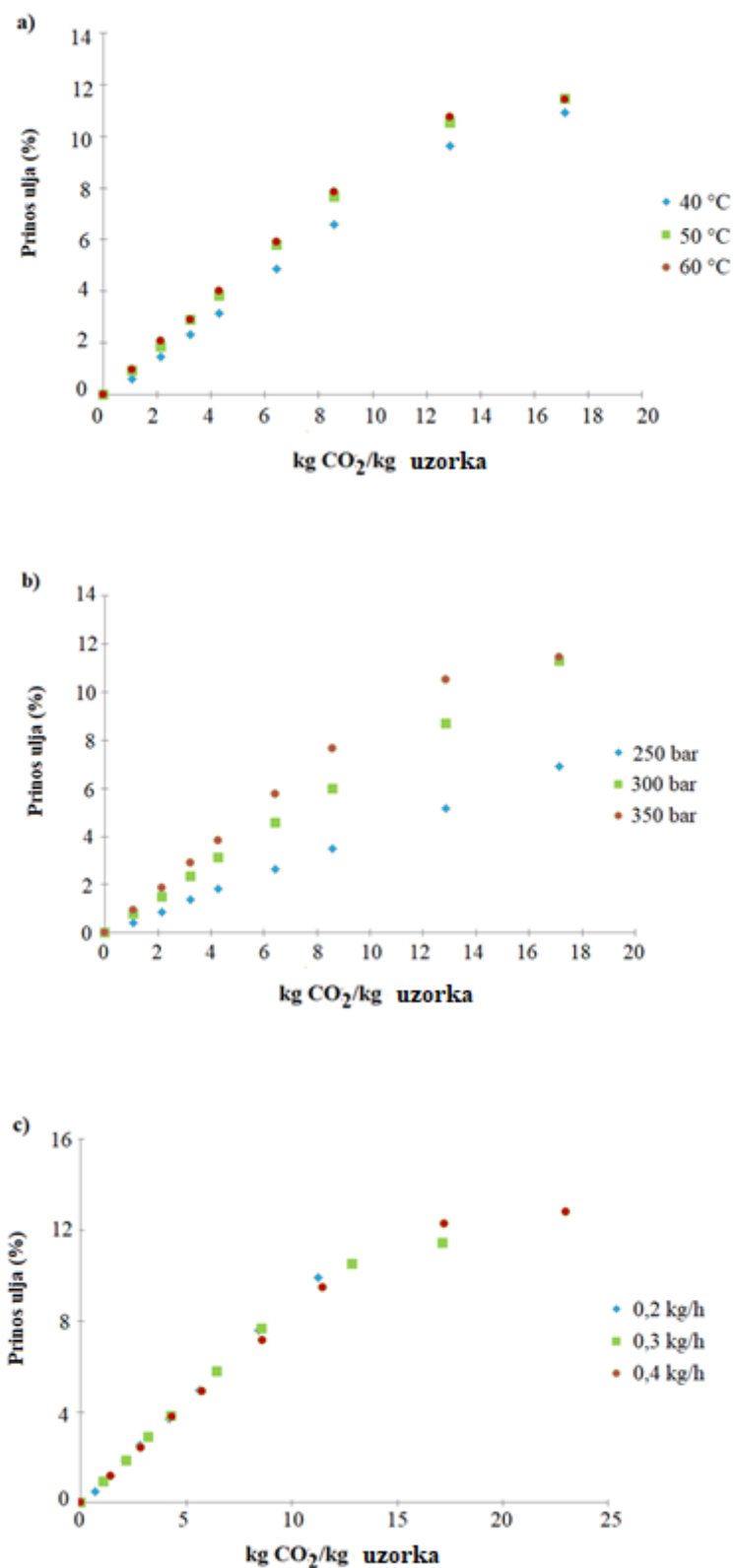
$$Y (\%) = 15,97 + 3,04X_1 + 3,33X_3 - 2,00X_1^2 - 1,43X_2^2 - 1,08X_3^2 \quad (6)$$

Uticaj parametara na prinos SFE prikazan je na slikama 17 i 18. Dobijeni rezultati sugerišu da linearni parametri pritiska i protoka CO₂ imaju značajan uticaj ($p < 0,05$) na prinos ulja, dok je linearni parametar temperature moguće zanemariti. Značajno povećanje prinosa ulja je dobijeno povišenjem pritiska, najverovatnije usled poboljšanja rastvorljivosti koje je rezultat povećane gustine rastvarača (Liu i dr., 2009), dok bi se porast prinosa ulja povećanjem protoka CO₂ mogao objasniti smanjenjem otpora prenosa mase sa povećanjem protoka (Yin i dr., 2005).



Slika 17. Uticaj linearnih članova jednačine 6 na prinos ulja iz semena sorte Vilamet: a) uticaj pritiska, b) uticaj protoka CO₂ i c) uticaj temperature

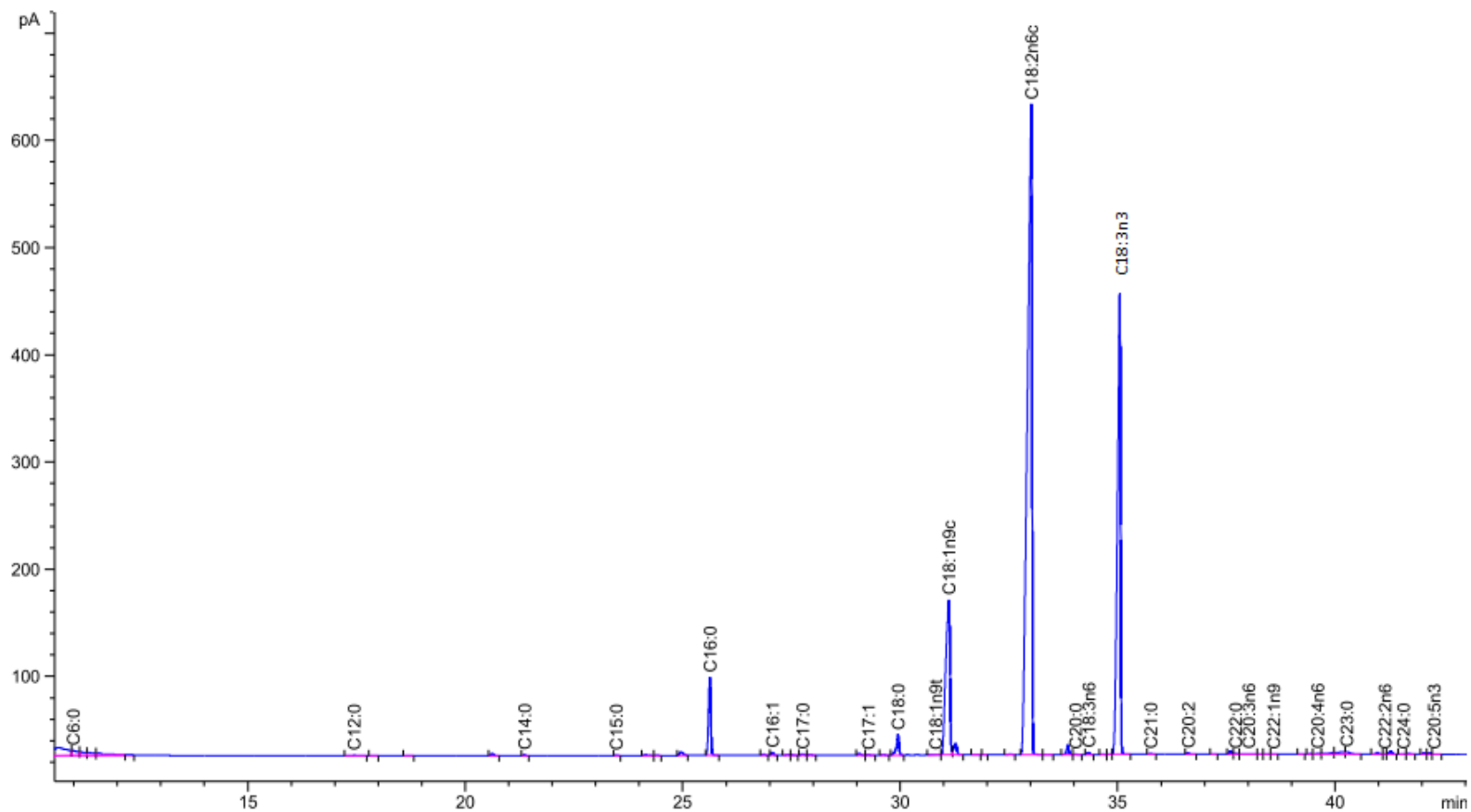
Interakcije parametara nisu imale značajan uticaj na prinos ulja ($p > 0,05$). Kvadratni izrazi sva tri parametra pokazali su značajan uticaj na prinos ekstrakcije. U slučaju pritiska i protoka CO₂, pozitivni linearni koeficijent ukazuje da se najveći prinos ekstrakcije postiže pri njihovim gornjim nivoima (350 bar i 0,4 kg/h).



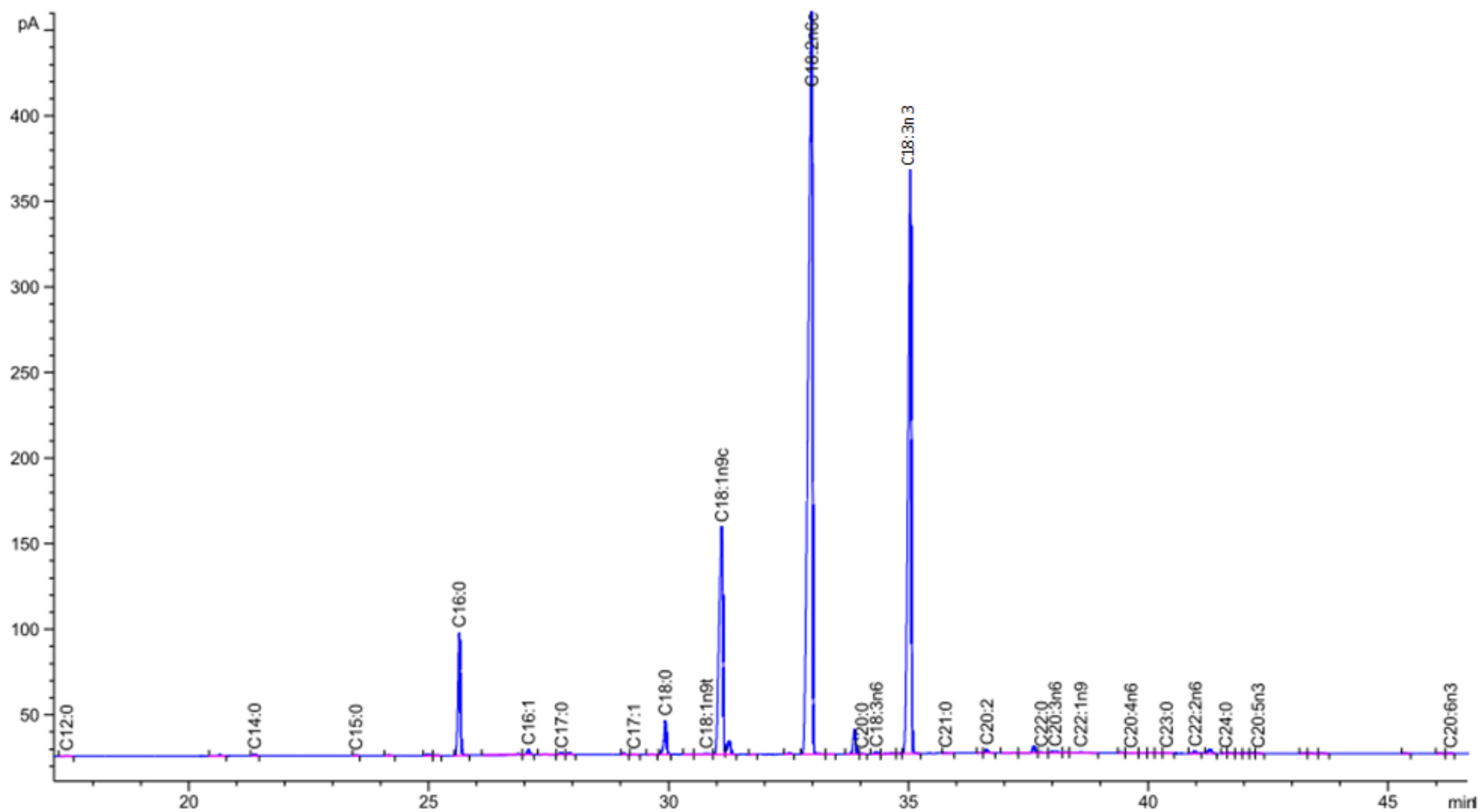
Slika 18. Uticaj parametara SFE na prinos ulja semena sorte Vilamet: a) temperatura (pritisak 300 bar, protok CO₂ 0,3 kg/h), b) pritiska (temperatura 50 °C, protok CO₂ 0,3 kg/h) i c) protok CO₂ (temperatura 50 °C, pritisak 300 bar)

4.1.3. Masnokiselinski sastav i indeksi funkcionalnosti

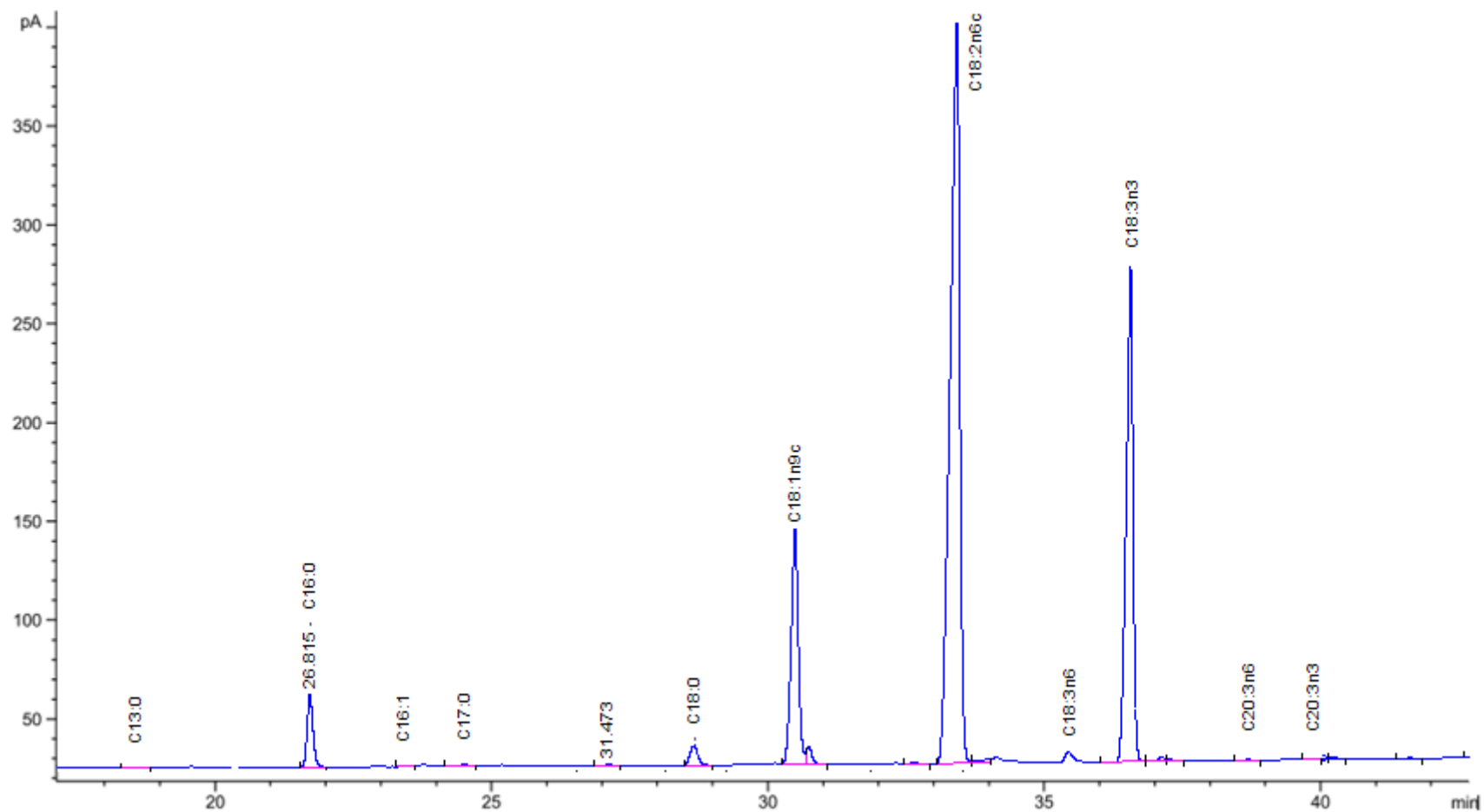
Rezultati određivanja sadržaja masnih kiselina u ulju dobijeni svim ispitivanim ekstrakcionim metodama sve tri ispitivane sorte maline, prikazani su u tabeli 8. Iz prikazanih rezultata se može zaključiti da je u svim uljima poreklom iz semena sve tri sorte najveći sadržaj 18:2(6), 18:3(3) i 18:1(9). Takođe, 16:0 i 18:0 su prisutne u značajnoj količini (Slika 19a-i). Sve ostale masne kiseline su detektovane samo u tragovima. Analizom masnokiselinskog sastava svih dobijenih ulja došlo se do zaključka da sva ulja sadrže visok sadržaj polinezasićenih masnih kiselina, koje se svrstavaju u grupu funkcionalnih jedinjenja, s obzirom na njihove pozitivne efekte na zdravlje. Što se biološkog dejstva tiče, ove masne kiseline imaju uticaj na nivo HDL-holesterola, te se istraživanja usmeravaju u pravcu upotrebe sirovina bogatih istim u svrhu kreiranja funkcionalne hrane (Gambuś i dr., 2009; Gouveia i dr., 2008). Rezultati prikazani u tabeli 8 ukazuju da je 18:2(6) najzastupljenija masna kiselina u uljima dobijenim svim metodama ekstrakcije, iz semena sve tri ispitivane sorte. Najviši sadržaj ove masne kiseline (55,49 %) je dobijen iz semena sorte Polka, primenom SFE, dok je najniži sadržaj (43,69 %) dobijen nakon ekstrakcije smešom dihlormetana i MeOH iz semena sorte Miker.



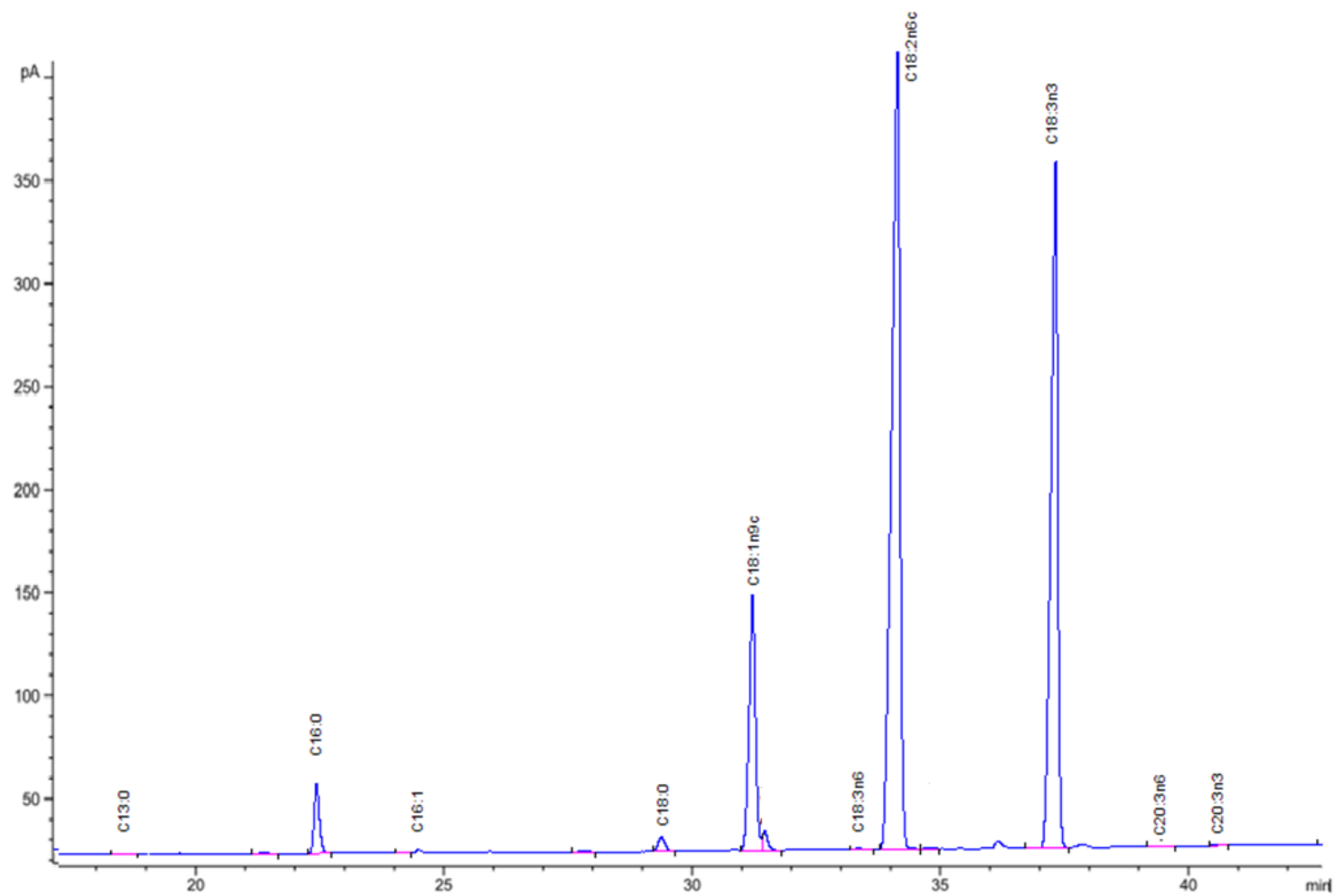
Slika 19a. GC-FID hromatogram masnokiselinskog sastava ulja semena maline sorte Vilamet dobijenog SFE sa ugljen-dioksidom pri srednjim vrednostima parametara (300 bar, 50 °C i 0,3 kg/h)



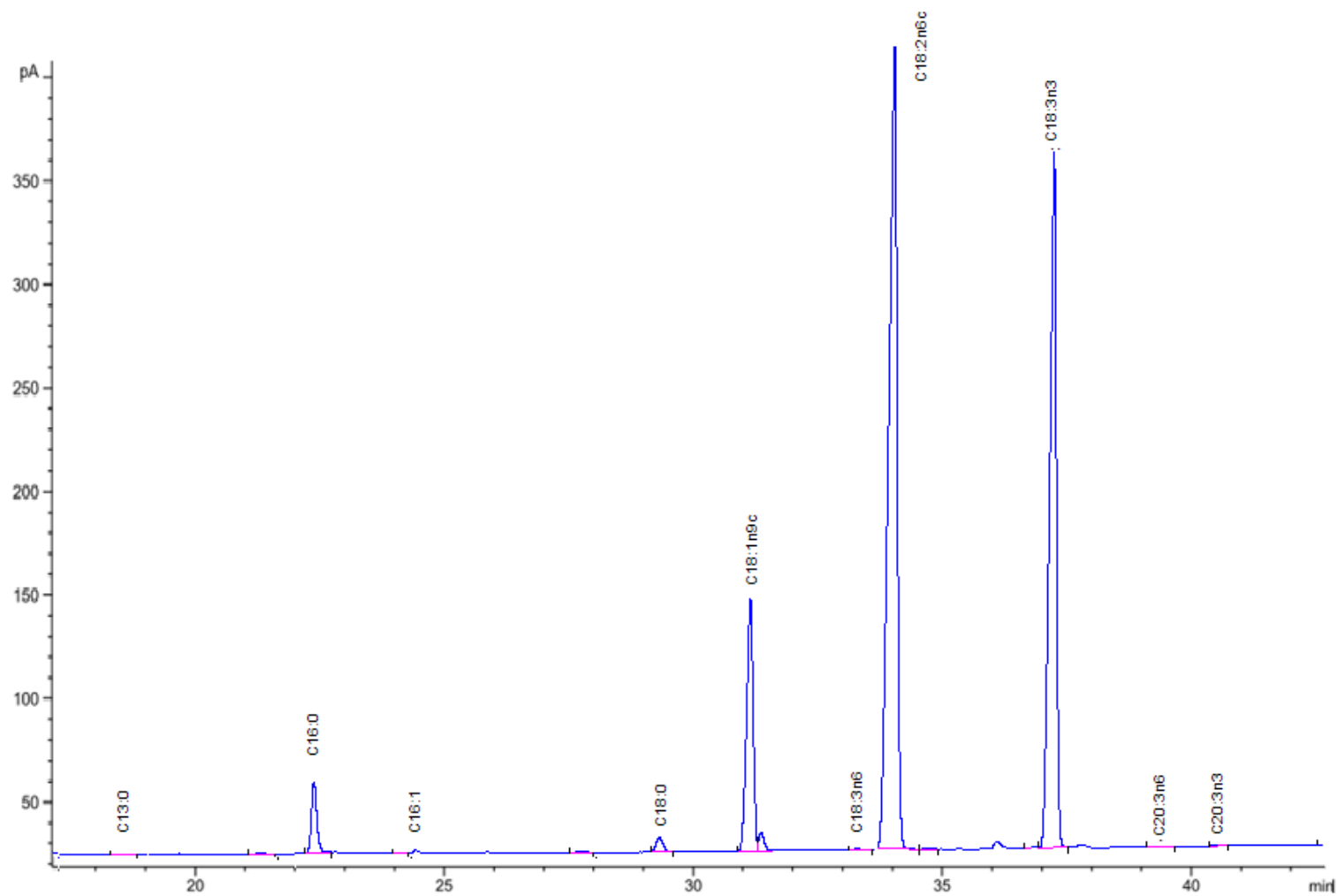
Slika 19b. GC-FID hromatogram masnokiselinskog sastava ulja semena maline sorte Vilamet dobijenog ekstrakcijom po Soxhlet-u



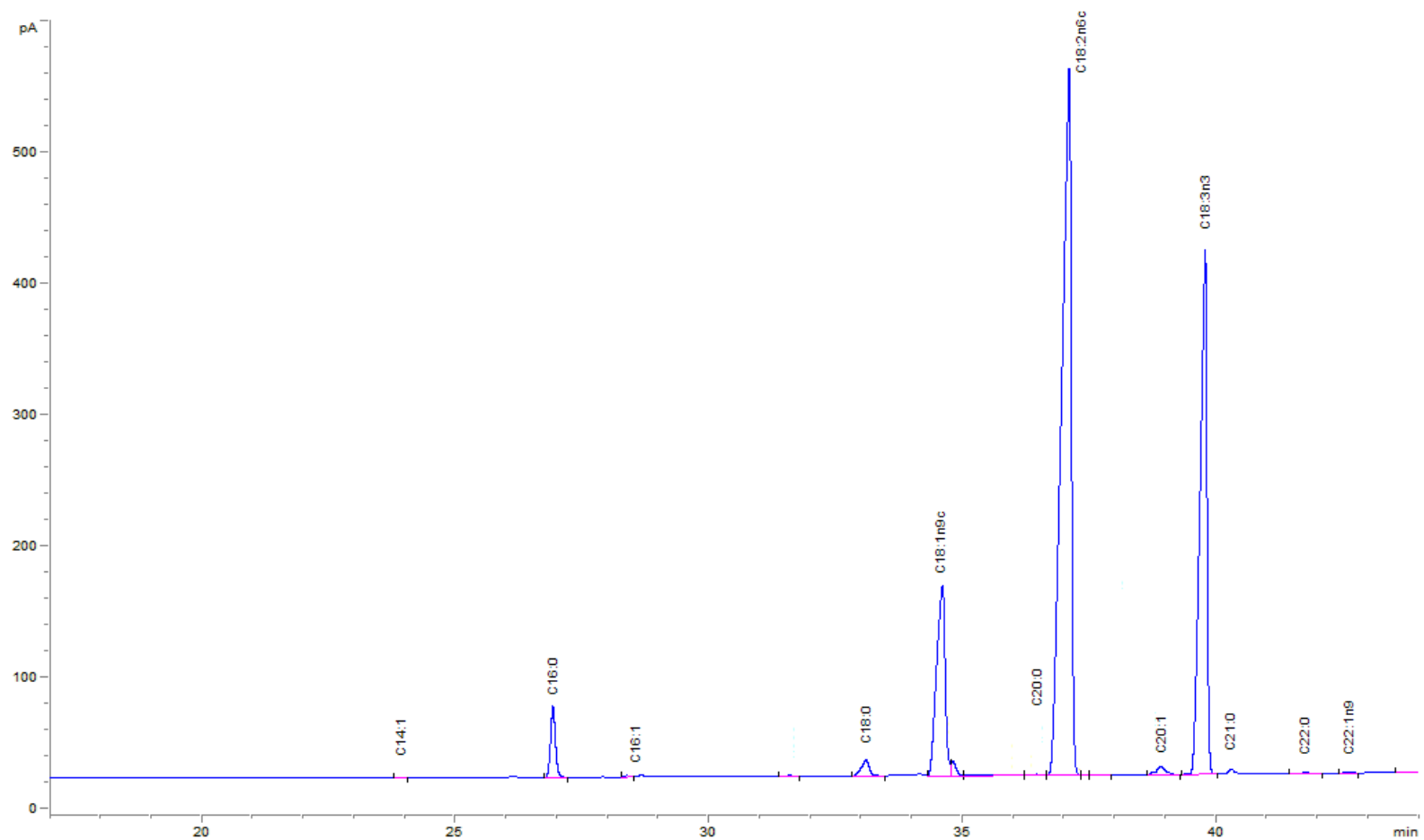
Slika 19c. GC-FID hromatogram masnokiselinskog sastava ulja semena maline sorte Vilamet dobijenog ekstrakcijom hloroformom



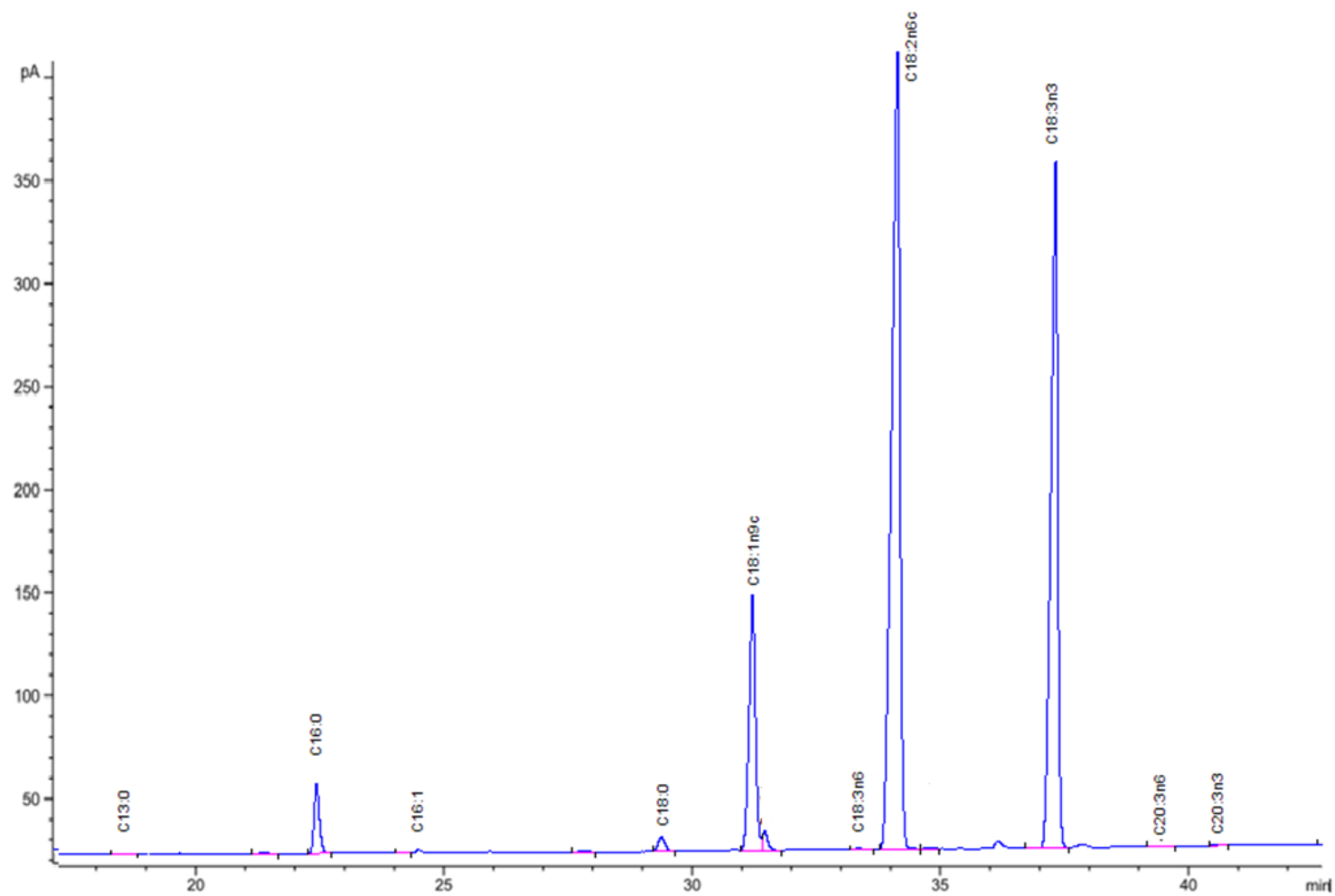
Slika 19d. GC-FID hromatogram masnokiselinskog sastava ulja semena maline sorte Vilamet ekstrakcijom smešom dihlormetana i MeOH



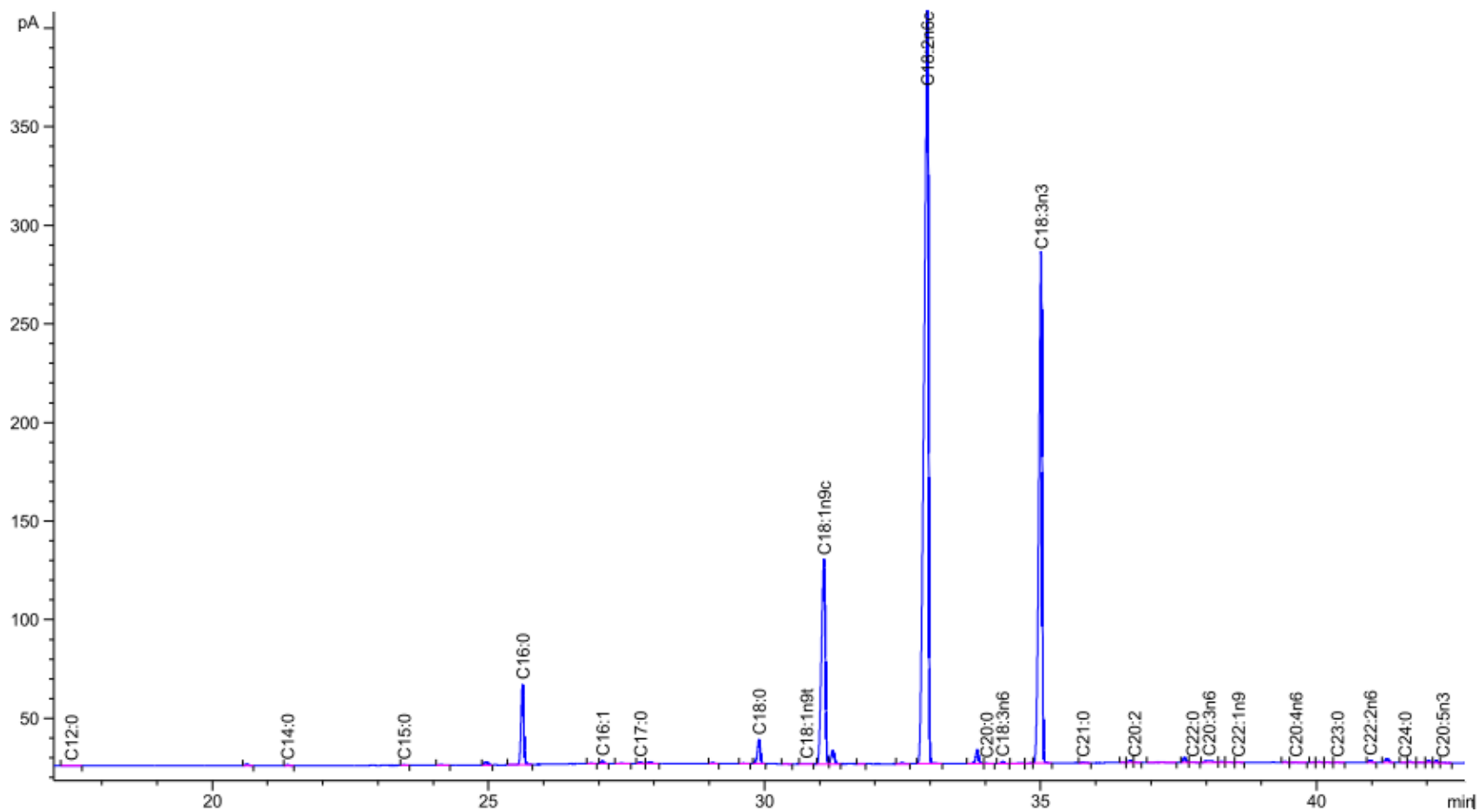
Slika 19e. GC-FID hromatogram masnokiselinskog sastava ulja semena maline sorte Vilamet dobijenog ekstrakcijom etanolom



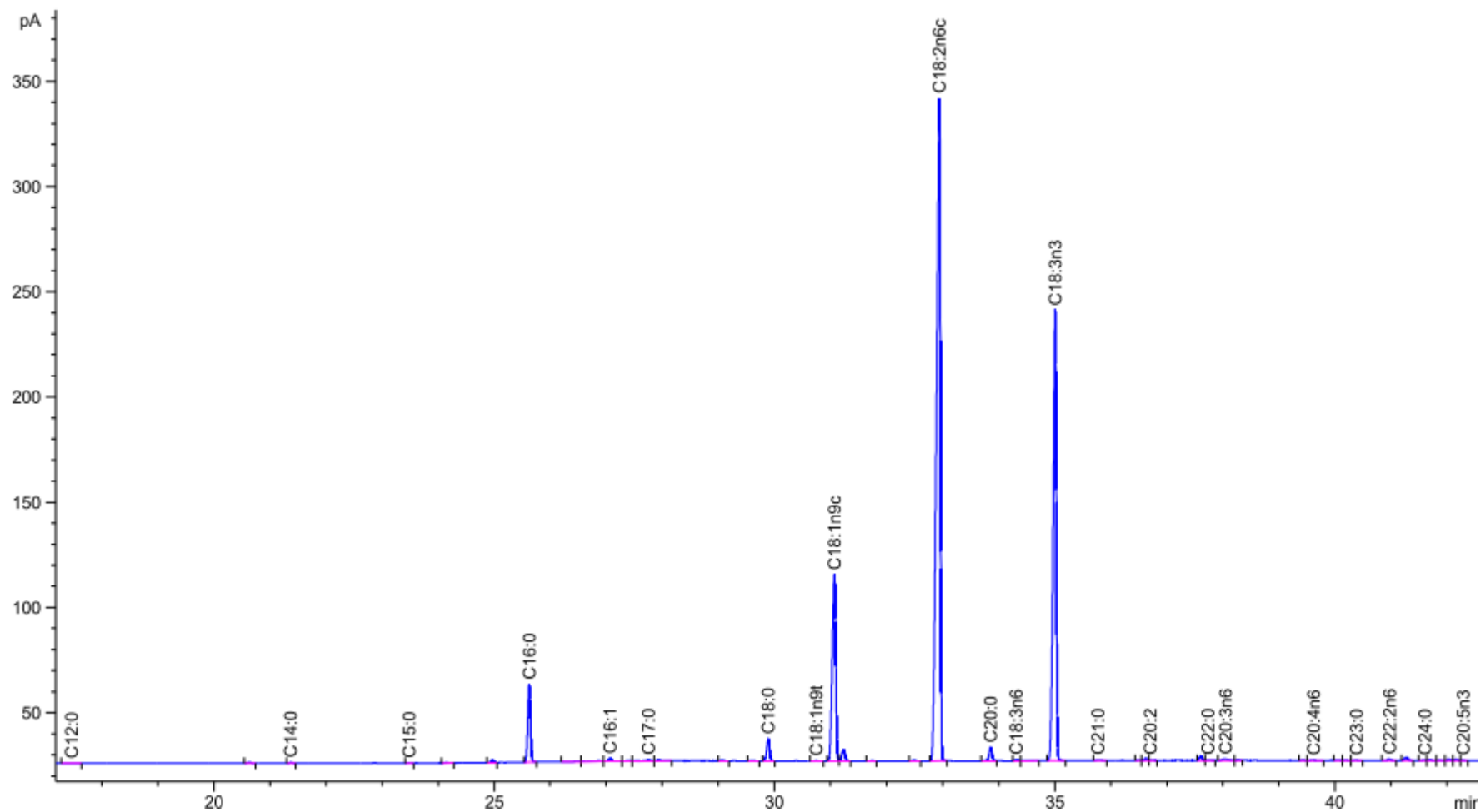
Slika 19f. GC-FID hromatogram masnokiselinskog sastava ulja semena maline sorte Vilamet dobijenog hladnim ceđenjem



Slika 19g. GC-FID hromatogram masnokiselinskog sastava ulja semena maline sorte Vilamet dobijenog SFE sa ugljen-dioksidom pri optimalnim uslovima (340 bar, 51 °C i 0,4 kg/h)



Slika 19h. GC-FID hromatogram masnokiselinskog sastava ulja semena maline sorte Polka dobijenog SFE sa ugljen-dioksidom pri optimalnim uslovima (340 bar, 51 °C i 0,4 kg/h)



Slika 19i. GC-FID hromatogram masnokiselinskog sastava ulja semena maline sorte Miker dobijenog SFE sa ugljen-dioksidom pri optimalnim uslovima (340 bar, 51 °C i 0,4 kg/h)

Tabela 8. Uticaj metode ekstrakcije i sorte maline na masnokiselinski sastav ulja

Metoda ekstrakcije	Sorta	16:0 (%)	18:0 (%)	18:1(9) (%)	18:2(6) (%)	18:3(3) (%)
Ekstrakcija hloroformom	Vilamet	5,18 ± 0,02 ^{1bc}	1,78 ± 0,02 ^{1b}	15,39 ± 0,25 ^{1b}	46,22 ± 0,90 ^{1b}	30,42 ± 0,25 ^{1b}
	Polka	4,96 ± 0,02 ^{1b}	1,47 ± 0,03 ^{1ab}	14,89 ± 0,37 ^{1ab}	46,63 ± 0,12 ^{1b}	29,89 ± 0,71 ^{1c}
	Miker	5,22 ± 0,03 ^{1bc}	1,66 ± 0,02 ^{1b}	15,22 ± 0,22 ^{1b}	45,98 ± 0,81 ^{1b}	30,35 ± 0,44 ^{1c}
Ekstrakcija smešom dihlormetana i MeOH	Vilamet	5,96 ± 0,01 ^{2c}	1,94 ± 0,01 ^{1b}	15,37 ± 0,56 ^{1b}	43,96 ± 0,55 ^{1a}	30,42 ± 0,20 ^{1b}
	Polka	5,14 ± 0,01 ^{1b}	1,87 ± 0,02 ^{1b}	15,19 ± 0,88 ^{1b}	43,71 ± 0,65 ^{1a}	30,31 ± 0,17 ^{1c}
	Miker	5,65 ± 0,01 ^{12c}	1,91 ± 0,01 ^{1b}	15,26 ± 0,45 ^{1b}	43,69 ± 0,34 ^{1a}	30,27 ± 0,44 ^{1c}
Ekstrakcija etanolom	Vilamet	2,75 ± 0,09 ^{1a}	0,96 ± 0,13 ^{1a}	13,63 ± 0,33 ^{1a}	49,13 ± 0,09 ^{1c}	33,44 ± 0,28 ^{2c}
	Polka	3,28 ± 0,05 ^{2a}	1,29 ± 0,04 ^{1a}	13,26 ± 0,20 ^{1a}	55,11 ± 0,13 ^{2c}	27,04 ± 0,35 ^{1bc}
	Miker	3,29 ± 0,33 ^{2a}	1,18 ± 0,08 ^{1a}	13,67 ± 0,32 ^{1a}	55,01 ± 0,88 ^{2c}	27,18 ± 0,02 ^{1b}
Hladno ceđenje	Vilamet	4,91 ± 0,01 ^{1b}	1,91 ± 0,02 ^{1b}	16,32 ± 0,53 ^{1b}	47,36 ± 0,55 ^{2b}	28,48 ± 0,66 ^{3b}
	Polka	4,74 ± 0,01 ^{1b}	1,88 ± 0,01 ^{1b}	16,82 ± 0,41 ^{1b}	46,12 ± 0,43 ^{2b}	24,80 ± 0,61 ^{1a}
	Miker	4,98 ± 0,01 ^{1b}	1,94 ± 0,01 ^{1b}	15,71 ± 0,91 ^{1b}	44,33 ± 0,86 ^{1a}	26,15 ± 0,74 ^{2a}
Ekstrakcija <i>n</i> -heksanom po Soxhlet-u	Vilamet	2,49 ± 0,01 ^{1a}	0,75 ± 0,01 ^{1a}	12,84 ± 0,08 ^{1a}	49,15 ± 0,25 ^{1c}	34,15 ± 0,21 ^{2c}
	Polka	3,25 ± 0,04 ^{2a}	1,23 ± 0,02 ^{2a}	12,62 ± 0,03 ^{2a}	55,06 ± 0,14 ^{2c}	26,49 ± 0,09 ^{1b}
	Miker	3,25 ± 0,05 ^{2a}	1,19 ± 0,01 ^{12a}	12,99 ± 0,03 ^{12a}	55,47 ± 0,13 ^{2c}	25,71 ± 0,14 ^{1a}
SFE sa ugljen-dioksidom*	Vilamet	3,25 ± 0,05 ^{1ab}	1,19 ± 0,01 ^{1a}	12,99 ± 0,03 ^{2a}	55,47 ± 0,13 ^{1d}	25,71 ± 0,14 ^{1a}
	Polka	3,41 ± 0,05 ^{1a}	1,08 ± 0,01 ^{1a}	11,82 ± 0,08 ^{1a}	55,49 ± 0,08 ^{1c}	27,30 ± 0,17 ^{2c}
	Miker	3,55 ± 0,29 ^{1a}	1,10 ± 0,02 ^{1a}	12,91 ± 0,15 ^{2a}	54,76 ± 0,34 ^{1c}	27,27 ± 0,28 ^{2b}

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD, $n = 3$. Različita slova ukazuju na značajne razlike između primenjenih tehnika ekstrakcije (sorta = konst.). Različiti brojevi ukazuju na značajne razlike između sorti (metoda ekstrakcije = konst.) prema Tukey-ovom HSD testu ($p < 0,05$).

*Ekstrakcija superkritičnim ugljen-dioksidom je izvršena na srednjim vrednostima parametara (300 bar, 50 °C i 0,3 kg/h)

Osim 18:2(6) masne kiseline, rezultati iz tabele 8 pokazuju visok sadržaj i 18:3(3) masne kiseline u svim ispitivanim uzorcima. Najviši sadržaj ove masne kiseline (34,15 %) je dobijen iz semena sorte Vilamet, nakon ekstrakcije *n*-heksanom po Soxhlet-u, dok je najniži sadržaj (24,80 %) dobijen nakon hladnog ceđenja iz semena sorte Polka. Ovako dobijeni rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima koja su pokazala da ulje semena maline, ekstrahovano superkritičnim ugljen-dioksidom pri uslovima temperature od 35 °C i pritiska od 200 bar sadrži 47,14 % 18:2(6), 35,82 % 18:3(3), 8,87 % 18:1(9) i 3,38 % 16:0 masne kiseline (Mazurek i dr., 2017). Takođe, rezultati su u skladu sa prethodnom studijom, prema kojoj ulje semena maline sadrži 53,0 % 18:2(6), 32,4 % 18:3(3), 12,4 % 18:1(9) i 1,3 % 16:0 masne kiseline (Parry i dr., 2005). Izuzetan kvalitet ovih ulja u pogledu funkcionalnosti potvrđuju i rezultati dobijeni izračunavanjem indeksa funkcionalnosti (Tabela 9). Odnos polinezasićenih i zasićenih masnih kiselina (PUFA/SFA) je značajno veći u odnosu na preporučeni odnos “balansirane ishrane”, definisan od strane SZO koji iznosi minimalno 0,4, kao i na preporuku da ulja u kojima je ovaj odnos manji od 0,45 ne bi trebalo koristiti u ljudskoj ishrani (Cunha i dr., 2019; HMSO, 1994). Rezultati su pokazali da su najveće vrednosti odnosa PUFA/SFA u ulju dobijenom pomoću ekstrakcije po Soxhlet-u za sortu Vilamet (25,60 %). Što se tiče ulja iz semena sorte Polka, odnos PUFA/SFA je najveći u ulju dobijenom SFE (18,39 %), dok je ovaj odnos najveći u ulju semena sorte Miker dobijenom čvrsto-tečnom ekstrakcijom sa etanolom kao rastvaračem (18,44 %). Sveukupno gledano, ulja dobijena iz semena malina sorti Polka i Miker nemaju značajnih razlika u odnosu PUFA/SFA uzimajući u obzir sve primenjene tehnike ekstrakcije.

Takođe, kada je reč o funkcionalnosti ulja, odnos ω -6/ ω -3 masnih kiselina predstavlja značajnu karakteristiku ulja. Rezultati u tabeli 9 pokazuju da se odnos ω -6/ ω -3 masnih kiselina kreće od 1,44 pa do 2,16. Istraživanja sprovedena od strane Simopoulos (2002), ukazuju na to da je optimalan odnos ω -6/ ω -3 masnih kiselina iznosi 1–4, kao i to da prekomerni unos ω -6 masnih kiselina u odnosu na ω -3 stimuliše hronične inflamatorne procese. Ovako dobijena ulja semena sve tri ispitivane sorte imaju značajno niži navedeni odnos u poređenju sa uljima dobijenim iz suncokretovog semena (71), kukuruza (57), masline (9) ili soje (6,75) (Bhardwaj i dr., 2016). Drugi dobijeni parametri indeksa funkcionalnosti takođe pokazuju značaj upotrebe ulja od semena maline u ljudskoj ishrani. Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 9, može se uočiti da je odnos H/H vrlo visok, naročito u uljima dobijenim nakon ekstrakcije po Soxhlet-u, gde se kreće i do 38,65 u ulju iz semena sorte Vilamet. U poređenju sa prethodnim istraživanjima o funkcionalnom kvalitetu ulja, dobijeni

rezultati u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju znatno bolji funkcionalni kvalitet ulja dobijenog iz semena sve tri sorte maline, korišćenjem svih navedenih metoda ekstrakcije (Pinto i dr., 2020). Istraživanje koje su sproveli Pinto i dr. (2020) na ulju biljke *Endopleura uchi* pokazuje da je H/H odnos od 2,36 do 2,66, što je značajno niže. Dobijeni rezultati prikazani u tabeli 9 pokazuju visok odnos H/H, što u skladu sa prethodnim istraživanjima znači da su ovako visoke vrednosti direktno povezane sa benefitima metabolizma holesterola, dok su AI i TI značajno niži od maksimalnih vrednosti preporučenih za ljudsku ishranu koje prema ranijim istraživanjima iznose 1 (Pinto i dr., 2018; Valfré i dr., 2003). Kao što se može videti iz rezultata prikazanih u tabeli 9, najniže vrednosti AI su dobijene u uljima ekstrahovanim hloroformom (0,0648–0,0683), smešom dihlometana i MeOH (0,0694–0,0801) i hladnim ceđenjem (0,0647–0,0707) i među njima ne postoje statistički značajne razlike. Ovo dobija na značaju jer je hladno ceđenje “zelena” ekstrakciona tehnika i ne zahteva upotrebu rastvarača, te je ulje odmah primenljivo u ljudskoj ishrani. Osim toga, u poređenju sa ostalim primenjenim tehnikama najveći AI je kod ulja dobijenih pomoću SFE (0,1383–0,1498), ali je značajno manji od maksimalne preporučene vrednosti za ljudsku ishranu (<1) (Pinto i dr., 2018). Što se tiče TI, prema rezultatima prikazanim u tabeli 9 ne postoje statistički značajne razlike između ulja različitih sorti. Najniže vrednosti su dobijene ekstrakcijom etanolom (0,028–0,039) i ekstrakcijom po Soxhlet-u (0,024–0,039). Takođe, u uljima dobijenim ostalim tehnikama ekstrakcije TI je značajno manji od 1, pa je tako najveći TI dobijen u uljima ekstrahovanim dihlormetanom i MeOH (0,062–0,069) i hladnim ceđenjem (0,062–0,068). Prema istraživanjima koja su sproveli Cunha i dr. (2019), na ulju biljke *Oenocarpus distichus* Mart. vrednosti AI se kreću od 0,22–0,25, što je oko dva puta veće u odnosu na ovaj indeks dobijen iz ulja semena maline, dok su vrednosti TI značajno više i kreću se od 0,47–0,52 (Cunha i dr., 2019). Sumirajući ove rezultate, može se doći do zaključka da ulje iz semena maline u pogledu masnokiselinskog sastava u potpunosti odgovara preporukama stručnjaka i samim tim se može upotrebljavati u ljudskoj ishrani u vidu dodatka funkcionalnoj hrani. Uticaj procesnih parametara optimizacije SFE ugljen-dioksidom na masnokiselinski sastav, kao i na indekse funkcionalnosti ulja prikazani su u tabelama 6 i 10. Prema primenjenoj metodologiji optimizacije nije utvrđen značajan uticaj procesnih parametara na masnokiselinski sastav, te nije uziman u obzir prilikom optimizacije. Iz tabele 7 se može zaključiti da je masnokiselinski sastav uglavnom sličan pri svim ispitivanim uslovima ekstrakcije, odnosno, da je u svakom ekstrahovanom ulju najviši sadržaj 18:2(6), zatim 18:3(3) i 18:1(9) masne kiseline, a da su još u značajnoj koncentraciji određene 16:0 i 18:0 masne kiseline.

Tabela 9. Indeksi funkcionalnosti ulja dobijenih nakon svih metoda ekstrakcije

Metoda ekstrakcije	Sorta	PUFA/SFA	H/H	AI	TI	$\omega-6/\omega-3$
Ekstrakcija hloroformom	Vilamet	11,06 ± 0,04 ^{1b}	17,87 ± 0,57 ^{1ab}	0,0672 ± 0,001 ^{1a}	0,060 ± 0,004 ^{1a}	1,52 ± 0,01 ^{1a}
	Polka	11,90 ± 0,07 ^{1a}	18,43 ± 0,64 ^{1a}	0,0648 ± 0,002 ^{1a}	0,057 ± 0,003 ^{1b}	1,56 ± 0,01 ^{1a}
	Miker	11,09 ± 0,12 ^{1a}	17,54 ± 0,88 ^{1b}	0,0683 ± 0,001 ^{1a}	0,059 ± 0,004 ^{1b}	1,51 ± 0,02 ^{1a}
Ekstrakcija dihlormetanom i metanolom	Vilamet	9,42 ± 0,09 ^{1a}	15,06 ± 0,13 ^{1a}	0,0801 ± 0,002 ^{1a}	0,069 ± 0,004 ^{1c}	1,45 ± 0,02 ^{1a}
	Polka	10,56 ± 0,15 ^{1a}	17,36 ± 0,49 ^{2a}	0,0694 ± 0,002 ^{1a}	0,062 ± 0,003 ^{1b}	1,44 ± 0,01 ^{1a}
	Miker	9,78 ± 0,03 ^{1a}	15,79 ± 0,41 ^{1a}	0,0764 ± 0,001 ^{1a}	0,067 ± 0,002 ^{1b}	1,44 ± 0,01 ^{1a}
Ekstrakcija etanolom	Vilamet	22,26 ± 1,03 ^{2d}	34,97 ± 1,16 ^{2d}	0,1144 ± 0,004 ^{1b}	0,028 ± 0,001 ^{1a}	1,47 ± 0,02 ^{1a}
	Polka	17,93 ± 0,28 ^{1b}	29,03 ± 0,48 ^{1b}	0,1378 ± 0,002 ^{2b}	0,039 ± 0,001 ^{1a}	2,04 ± 0,03 ^{2c}
	Miker	18,44 ± 1,78 ^{1d}	29,26 ± 2,96 ^{1d}	0,1374 ± 0,015 ^{2b}	0,038 ± 0,004 ^{1a}	2,02 ± 0,03 ^{2b}
Hladno ceđenje	Vilamet	11,12 ± 0,87 ^{2b}	18,77 ± 0,76 ^{2b}	0,0647 ± 0,001 ^{1a}	0,062 ± 0,003 ^{1c}	1,66 ± 0,02 ^{1a}
	Polka	10,71 ± 0,72 ^{12a}	18,51 ± 0,92 ^{12a}	0,0668 ± 0,001 ^{1a}	0,068 ± 0,004 ^{1b}	1,86 ± 0,03 ^{1b}
	Miker	10,18 ± 0,41 ^{2e}	17,31 ± 0,61 ^{1b}	0,0707 ± 0,002 ^{1a}	0,068 ± 0,004 ^{1b}	1,69 ± 0,01 ^{1a}
Ekstrakcija <i>n</i> -heksanom po Soxhlet-u	Vilamet	25,60 ± 0,16 ^{1a}	38,65 ± 0,11 ^{2e}	0,1038 ± 0,001 ^{1b}	0,024 ± 0,001 ^{1a}	1,44 ± 0,01 ^{1a}
	Polka	18,17 ± 0,25 ^{1b}	29,11 ± 0,36 ^{1b}	0,1383 ± 0,002 ^{2b}	0,039 ± 0,001 ^{1a}	2,08 ± 0,01 ^{2c}
	Miker	18,22 ± 0,18 ^{1b}	29,12 ± 0,46 ^{1d}	0,1383 ± 0,002 ^{2b}	0,039 ± 0,001 ^{1a}	2,16 ± 0,02 ^{2b}
SFE sa ugljen-dioksidom*	Vilamet	18,22 ± 0,38 ^{1c}	29,12 ± 0,46 ^{3c}	0,1383 ± 0,002 ^{1c}	0,039 ± 0,001 ^{1b}	2,16 ± 0,02 ^{1b}
	Polka	18,39 ± 0,22 ^{1b}	27,82 ± 0,43 ^{2b}	0,1445 ± 0,002 ^{2b}	0,038 ± 0,001 ^{1a}	2,03 ± 0,01 ^{1c}
	Miker	17,62 ± 1,04 ^{1b}	26,87 ± 2,19 ^{1c}	0,1498 ± 0,012 ^{2b}	0,041 ± 0,002 ^{1a}	2,01 ± 0,03 ^{1b}

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD, n = 3. Različita slova ukazuju na značajne razlike između primenjenih tehnika ekstrakcije (sorta = konst.). Različiti brojevi ukazuju na značajne razlike između sorti (metoda ekstrakcije = konst.) prema Tukey-ovom HSD testu ($p < 0,05$).

*Ekstrakcija superkritičnim ugljen-dioksidom je izvršena na srednjim vrednostima parametara (300 bar, 50 °C i 0,3 kg/h)

Najveći sadržaj 18:2(6) (50,00 %), 16:0 (3,05 %) i 18:0 (0,98 %) masne kiseline je dobijen pri uslovima 350 bar, 50 °C i protoku CO₂ od 0,2 kg/h (eksperiment 3), dok je pri ovim uslovima dobijena najmanja količina 18:3(3) masne kiseline (33,03 %) (Tabela 6). Najveći sadržaj ove masne kiseline (35,11 %) je dobijen pri uslovima 350 bar, 40 °C i protok CO₂ od 0,3 kg/h (eksperiment 12). Najniži sadržaj 16:0 masne kiseline (2,47 %) dobijen je pri uslovima od 350 bar, 50 °C i protoka CO₂ od 0,4 kg/h (eksperiment 8). Zatim, najniži sadržaj 18:0 masne kiseline (0,65 %) je dobijen pri uslovima od 250 bar, 50 °C i protoku CO₂ od 0,4 kg/h (eksperiment 15), dok su najniže vrednosti za C18:1(9) (11,82 %) i 18:2(6) (49,08 %) masne kiseline dobijene pri uslovima od 300 bar, 50 °C i protoka CO₂ od 0,3 kg/h (srednje vrednosti ekstrakcije, eksperiment 11).

Tabela 10. Uticaj procesnih parametara SFE na indekse funkcionalnosti ulja dobijenih iz semena sorte Vilamet

Eksperiment*	PUFA/SFA	H/H	AI	TI	$\omega-6/\omega-3$
1	24,51	34,94	0,1145	0,0252	1,41
2	24,55	35,09	0,1140	0,0252	1,42
3	20,52	31,36	0,1275	0,0308	1,51
4	25,58	38,43	0,1041	0,0243	1,45
5	23,08	33,18	0,1205	0,0270	1,45
6	21,81	31,64	0,1264	0,0288	1,48
7	24,29	34,98	0,1143	0,0257	1,45
8	26,57	39,09	0,1023	0,0233	1,42
9	24,19	35,34	0,1136	0,0256	1,43
10	25,65	37,77	0,1059	0,0242	1,43
11	24,85	35,72	0,1124	0,0248	1,40
12	26,74	39,04	0,1024	0,0231	1,41
13	23,92	34,29	0,1166	0,0259	1,42
14	23,12	33,36	0,1199	0,0270	1,46
15	24,94	35,42	0,1129	0,0248	1,42
16	23,71	36,94	0,1083	0,0264	1,48
17	22,97	32,97	0,1213	0,0271	1,45

*Eksperimentalni uslovi su prikazani u tabeli 2

Slično kao kod masnokiselinskog sastava, nije utvrđen uticaj procesnih parametara na indekse funkcionalnosti (Tabela 10), te ni ovi indeksi nisu razmatrani prilikom optimizacije SFE. Međutim, kao što je prethodno opisano, može se videti da je ulje iz semena maline visokokvalitetno u pogledu odnosa PUFA/SFA, kao i ostalih parametara funkcionalnosti. Kao što se može videti iz rezultata prikazanih u tabeli 10, najviši odnos PUFA/SFA (26,74) je dobijen pri uslovima od 300 bar, 40 °C i protoka CO₂ od 0,4 kg/h (eksperiment 12), dok je najniži odnos PUFA/SFA (20,52) dobijen pri uslovima od 350 bar, 50 °C i protoka CO₂ od 0,2 kg/h (eksperiment 3). Zatim, najviše vrednosti AI (0,1275), TI (0,0308) i najniža vrednost odnosa H/H (31,36) su dobijene pri uslovima od 350 bar, 50 °C i protoka CO₂ od 0,2 kg/h (eksperiment 3). Najniža vrednost AI (0,1023) i najviša vrednost odnosa H/H (39,09) su dobijene pri uslovima od 350 bar, 50 °C i protoka CO₂ od 0,4 kg/h (eksperiment 8), dok je najniža vrednost TI (0,0231) dobijena pri uslovima od 350 bar, 40 °C i protoka CO₂ od 0,3 kg/h (eksperiment 12).

Iz prikazanih rezultata se vidi da je ulje iz semena maline visoko kvalitetno u pogledu odnosa PUFA/SFA, kao i ostalih parametara funkcionalnosti, te se ovako dobijeno ulje može upotrebljavati u ljudskoj ishrani u vidu dodatka funkcionalnoj hrani.

4.1.4. Sadržaj tokoferola

Ulje dobijeno iz semena maline je veoma značajan izvor tokoferola, značajnih bioaktivnih jedinjenja, poznatih po antioksidativnim svojstvima (Kozłowska i dr., 2016; Oomah i dr., 2000). Sadržaj α -, γ - i δ -izomera tokoferola, kao i ukupni sadržaj tokoferola (TTC) određeni u uljima sve tri sorte maline, prikazan je u tabeli 11. Prema prikazanim rezultatima, γ -TOC je najzastupljeniji izomer u svim uzorcima. Najviši sadržaj ovog izomera nađen je u ulju dobijenom ekstrakcijom etanolom iz sorte Miker (156,62 mg/100 g), dok je najniža vrednost dobijena iz sorte Polka ekstrakcijom dihlormetanom i MeOH (11,17 mg/100 g). Slično u poređenju sa uljima iz semena sorti Vilamet i Polka, najviši sadržaj α -TOC je dobijen u uzorcima ulja iz semena sorte Miker (14,93–128,72 mg/100 g), svim metodama ekstrakcije. U poređenju sa sadržajem α - i γ -tokoferola, sadržaj δ -izomera (δ -TOC) bio je najniži u svim uljima dobijenim svim primenjenim metodama ekstrakcije osim u uljima dobijenim ekstrakcijom hloroformom i ekstrakcijom smešom dihlormetana i MeOH. Takođe, ulja ekstrahovana iz semena sorte Miker su imala najviši sadržaj tokoferola, u poređenju sa uljima ekstrahovanim iz semena druge dve ispitivane sorte (Tabela 11). Količine svih identifikovanih tokoferola u ovoj doktorskoj disertaciji bile su više u poređenju sa drugim istraživanjima (Bushman i dr., 2004), dok β -izomer nije otkriven ni u jednom uzorku, što je u

skladu sa prethodnim istraživanjima (Oomah i dr., 2000). Razlike između sadržaja tokoferola u zavisnosti od primenjene metode ekstrakcije se verovatno mogu objasniti prisustvom nelipidnih materija u ekstraktima dobijenim ekstrakcijom hloroformom i smešom dihlormetana i MeOH koje smanjuju koncentracije tokoferola u uzorcima (Oomah i dr., 2000).

Sadržaj α -, γ - i δ -TOC, kao i ukupni sadržaj tokoferola, dobijen optimizacijom SFE sa ugljen-dioksidom prikazani su u tabeli 12. Najniži sadržaj α -TOC (48,92 mg/100 g) je dobijen pri srednjim uslovima, dakle 300 bar, 50 °C i 0,3 kg/h (eksperiment 13), dok je najniži sadržaj γ -TOC (108,82 mg/100 g) i δ -TOC (6,43 mg/100 g) dobijen pri uslovima od 350 bar, 50 °C i protoku CO₂ od 0,4 kg/h (eksperiment 8). Najviša količina α -TOC (83,34 mg/100 g) i γ -TOC (162,99 mg/100 g) je dobijena pri uslovima od 250 bar, 50 °C i protoku CO₂ od 0,2 kg/h (eksperiment 5). Najviša vrednost za δ -izomer (12,22 mg/100 g) dobijena je pri uslovima od 250 bar, 60 °C i protoku CO₂ od 0,3 kg/h (eksperiment 6). Istraživanje koje su sprovedli Yang i dr. (2011) pri uslovima od 350 bar, 50 °C i protoku CO₂ od 0,4 kg/h pokazuje značajno viši sadržaj α -TOC (70 mg/100 g) i γ -TOC (320 mg/100 g) od sadržaja prikazanih u tabeli 12. Takođe, ovo istraživanje je pokazalo da je sadržaj δ -TOC (10 mg/100 g) sličan sa sadržajem ovog izomera prikazanom u tabeli 12. Rezultati eksperimentalno dobijenih vrednosti za α -, γ - i δ -TOC, kao i za TTC, fitovani su kvadratnim polinomskim modelom (jednačine (7)-(10)). Procenjeni koeficijenti polinomskog modela drugog reda za sadržaj tokoferola predstavljani su u tabeli 7. Izračunati koeficijent određivanja (R^2) iznosio je 0,9340 za α -TOC, 0,9326 za γ -TOC i 0,9652 za δ -TOC, dok je R^2 za TTC iznosio 0,9462. Prilagođeni koeficijent određivanja ($AdjR^2$) iznosio je 0,8492 za α -TOC, 0,8460 za γ -TOC, 0,9205 za δ -TOC i 0,8770 za TTC. Nedostatak fitovanja nije bio signifikantan ($p > 0,05$), što sugeriše da primenjeni polinomski model drugog reda predstavlja dobru aproksimaciju eksperimentalnih rezultata. S obzirom na relativno nizak CV (6,50 % za α -TOC, 5,36 % za γ -TOC, 6,27 % za δ -TOC i 5,05 % za TTC), potvrđena je dobra ponovljivost ispitivanih sistema. Jednačine prediktivnog modela za α -TOC, γ -TOC i δ -TOC kao i za TTC sa zanemarenim koeficijentima koji nisu statistički značajni bile su sledeće:

$$\alpha\text{-TOC} = 55,39 - 8,19X_1 - 4,69X_2 - 6,33X_3 + 3,86X_{12} + 4,84X_{13} + 4,79X_{23} + 5,12X_1^2 \quad (7)$$

$$\gamma\text{-TOC} = 120,36 - 17,75X_1 - 10,08X_3 + 9,16X_1^2 + 10,17X_2^2 \quad (8)$$

$$\delta\text{-TOC} = 7,54 - 1,81X_1 + 0,58X_2 - 1,18X_3 - 0,59X_{12} + 1,19X_2^2 + 1,05X_3^2 \quad (9)$$

$$\text{TTC} = 183,29 - 27,75X_1 - 17,59X_3 + 10,72X_{23} + 14,65X_1^2 + 14,96X_2^2 \quad (10)$$

Tabela 11. Uticaj metoda ekstrakcije i sorte maline na sadržaj tokoferola u uljima

Metoda ekstrakcije	Sorta	α -TOC (mg/100 g)	γ -TOC (mg/100 g)	δ -TOC(mg/100 g)	TTC (mg/100 g)
Ekstrakcija hloroformom	Vilamet	9,11 \pm 0,44 ^{1a}	28,67 \pm 2,18 ^{1b}	18,65 \pm 0,57 ^{2c}	56,40 \pm 2,30 ^{2b}
	Polka	8,24 \pm 0,91 ^{1a}	26,74 \pm 1,45 ^{1a}	15,28 \pm 0,47 ^{1b}	50,26 \pm 3,73 ^{1b}
	Miker	17,98 \pm 1,12 ^{2a}	33,81 \pm 4,19 ^{2b}	27,52 \pm 2,11 ^{3b}	79,22 \pm 4,12 ^{3b}
Ekstrakcija dihlormetanom i metanolom	Vilamet	6,79 \pm 0,19 ^{1a}	12,15 \pm 0,15 ^{1a}	12,90 \pm 0,22 ^{1b}	31,84 \pm 0,33 ^{1a}
	Polka	7,95 \pm 0,35 ^{1a}	11,17 \pm 0,53 ^{1a}	12,22 \pm 1,81 ^{1ab}	31,34 \pm 1,05 ^{1a}
	Miker	14,93 \pm 0,87 ^{2a}	21,37 \pm 0,12 ^{2a}	18,96 \pm 1,67 ^{2a}	55,26 \pm 2,12 ^{2a}
Ekstrakcija etanolom	Vilamet	37,22 \pm 15,15 ^{1b}	121,39 \pm 20,89 ^{1d}	8,82 \pm 1,09 ^{1a}	167,43 \pm 37,09 ^{1c}
	Polka	49,50 \pm 3,69 ^{2b}	129,59 \pm 10,85 ^{2d}	10,95 \pm 0,75 ^{1a}	190,06 \pm 15,25 ^{2d}
	Miker	128,72 \pm 36,90 ^{3d}	156,62 \pm 56,57 ^{3d}	29,90 \pm 12,09 ^{2b}	315,25 \pm 105,55 ^{3e}
Hladno ceđenje	Vilamet	63,01 \pm 3,98 ^{2d}	91,41 \pm 3,74 ^{2c}	26,11 \pm 1,12 ^{1d}	180,53 \pm 5,58 ^{2d}
	Polka	55,14 \pm 8,33 ^{1c}	84,19 \pm 3,51 ^{1b}	26,38 \pm 1,07 ^{1c}	165,71 \pm 12,81 ^{1c}
	Miker	88,49 \pm 12,71 ^{3b}	112,62 \pm 21,73 ^{3c}	31,21 \pm 4,48 ^{2b}	232,32 \pm 28,12 ^{3d}
Ekstrakcija <i>n</i> -heksanom po Soxhlet-u	Vilamet	63,70 \pm 0,22 ^{2d}	128,71 \pm 3,72 ^{2d}	6,76 \pm 0,11 ^{1a}	199,18 \pm 3,68 ^{2a}
	Polka	56,57 \pm 0,50 ^{1c}	118,21 \pm 1,44 ^{1c}	8,72 \pm 0,28 ^{1a}	183,51 \pm 1,32 ^{1d}
	Miker	107,33 \pm 1,12 ^{3c}	117,42 \pm 2,81 ^{1c}	17,88 \pm 0,43 ^{2a}	242,63 \pm 2,72 ^{3d}
Ekstrakcija superkritičnim ugljen dioksidom*	Vilamet	55,82 \pm 6,36 ^{1c}	120,18 \pm 9,72 ^{3d}	7,36 \pm 0,53 ^{1a}	183,37 \pm 16,60 ^{1d}
	Polka	57,79 \pm 5,58 ^{1c}	115,11 \pm 10,33 ^{2c}	8,47 \pm 0,60 ^{1a}	181,38 \pm 16,49 ^{1d}
	Miker	89,60 \pm 13,73 ^{2b}	104,20 \pm 16,06 ^{1c}	18,96 \pm 1,71 ^{2a}	212,77 \pm 28,09 ^{2c}

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD, n = 3. Različita slova ukazuju na značajne razlike između primenjenih tehnika ekstrakcije (sorta = konst.), dok različiti brojevi ukazuju na značajne razlike između sorti (metoda ekstrakcije = konst.) prema Tukey-ovom HSD testu (p < 0,05).

* Ekstrakcija superkritičnim ugljen-dioksidom je izvršena na srednjim vrednostima parametara (300 bar, 50 °C i 0,3 kg/h)

Tabela 12. Uticaj procesnih parametara SFE na sadržaj tokoferola i antioksidativnu aktivnost ulja dobijenog iz semena sorte Vilamet

Eksperiment*	α -TOC (mg/100 g)	γ -TOC (mg/100 g)	δ -TOC (mg/100 g)	TTC (mg/100 g)	DPPH [*] (μ mol/g)
1	76,78	152,95	10,39	240,13	9,66
2	80,28	158,99	9,78	249,05	10,75
3	53,75	123,66	8,20	185,63	7,21
4	56,32	126,22	6,95	189,50	8,82
5	83,34	162,99	11,92	258,26	11,96
6	63,39	160,85	12,22	236,47	11,45
7	53,71	127,01	9,26	189,99	9,50
8	51,59	108,82	6,43	166,85	7,98
9	61,43	128,43	7,86	197,74	8,81
10	53,72	121,87	8,33	183,93	11,28
11	57,10	122,63	7,42	187,17	8,59
12	57,75	112,15	6,88	176,80	8,26
13	48,92	109,47	6,80	165,19	8,55
14	57,60	134,04	11,64	203,29	10,20
15	61,80	135,33	8,71	205,85	10,58
16	52,94	114,98	6,45	174,38	9,46
17	65,46	145,12	10,41	221,00	10,75

*Eksperimentalni uslovi su prikazani u tabeli 2

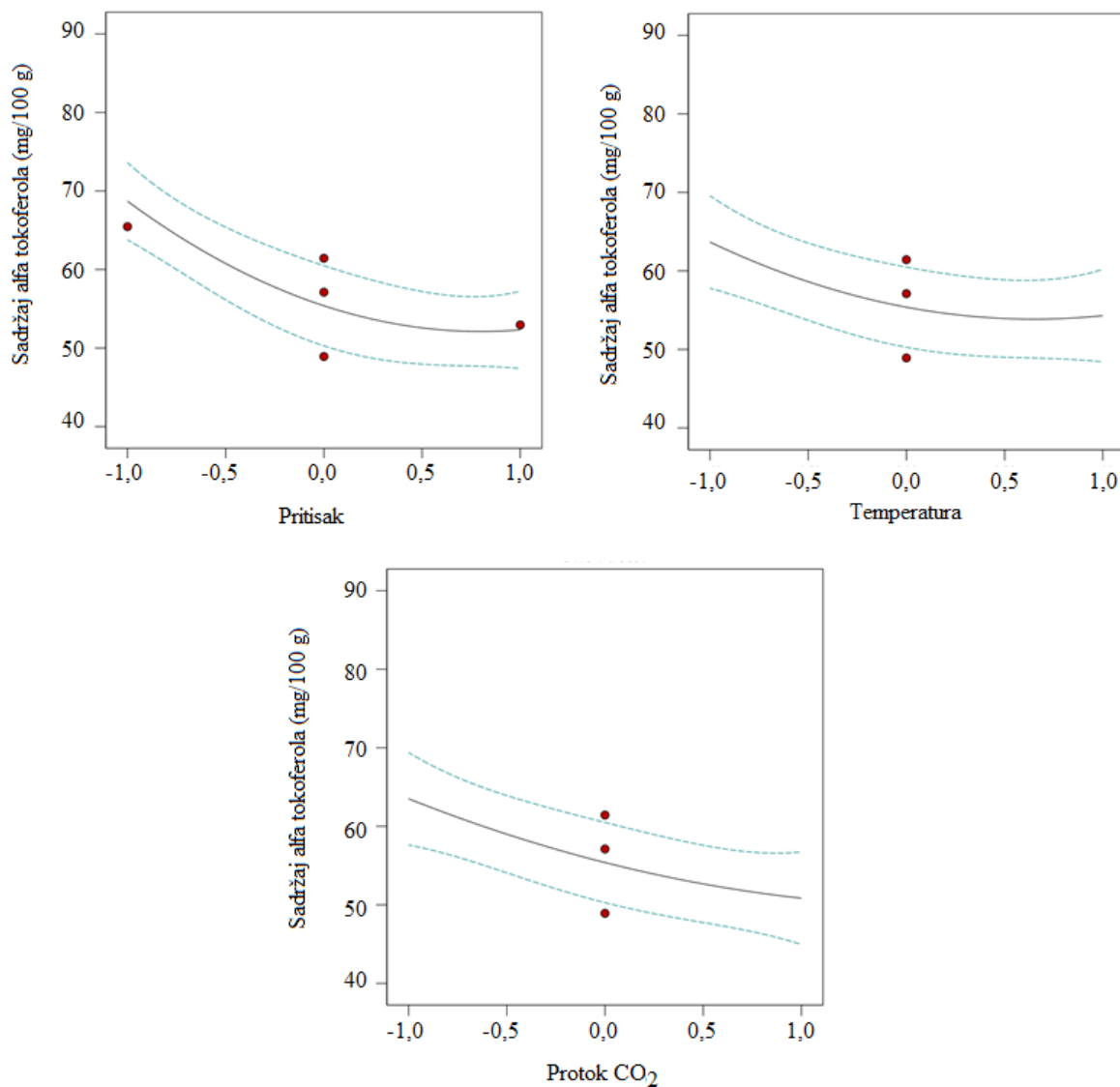
Što se tiče TTC, najveći sadržaj (258,26 mg/100 g) je dobijen pri uslovima od 250 bar, 50 °C i protoku CO₂ od 0,2 kg/h (eksperiment 5), dok je najniža vrednost (165,19 mg/100 g) dobijena pri uslovima od 300 bar, 50 °C i protoku CO₂ od 0,3 kg/h (srednji uslovi, eksperiment 13), što je prikazano u tabeli 12.

Na osnovu rezultata RSM može se zaključiti da su linearni faktori pritiska i protoka CO₂ imali veliki uticaj na sadržaj α -TOC, γ -TOC i δ -TOC, kao i na TTC, linearni faktor temperature imao je značajan uticaj na sadržaj α -TOC i δ -TOC, dok na γ -TOC i TTC nije imao značajan uticaj (Slike 20-23).

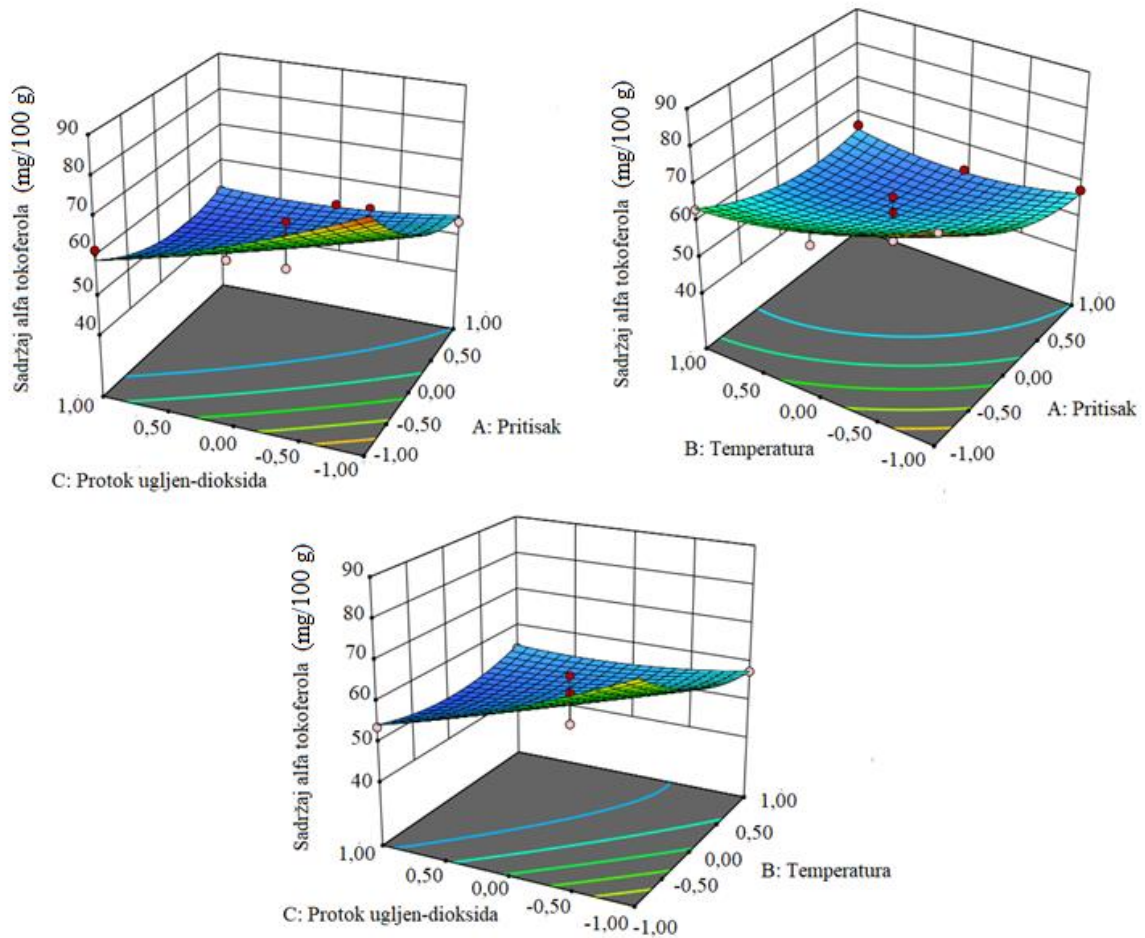
Rezultati pokazuju da su najviše koncentracije svakog izomera tokoferola, kao i sadržaj ukupnih tokoferola, dobijene pri nižoj vrednosti pritiska, dok povećanje pritiska dovodi do nižih prinosa tokoferola. Ovo se može objasniti pretpostavkom da je ekstrakcija tokoferola povezana sa ekstrakcijom drugih jedinjenja sadržanih u matriksu, što je verovatna posledica koekstrakcije nekih drugih jedinjenja slične polarosti zajedno sa tokoferolima (de Lucas i dr., 2002).

Interakcija sva tri faktora ima značajan uticaj na ekstrahovanu količinu α -TOC (Slika 21), interakcija pritiska i temperature ima umereno značajan uticaj na efikasnost SFE δ -TOC (Slika 23), slično kao interakcija temperature i protoka CO_2 na TTC (Slika 24), dok nijedna interakcija parametara nema uticaj na sadržaj γ -TOC (jednačina 8).

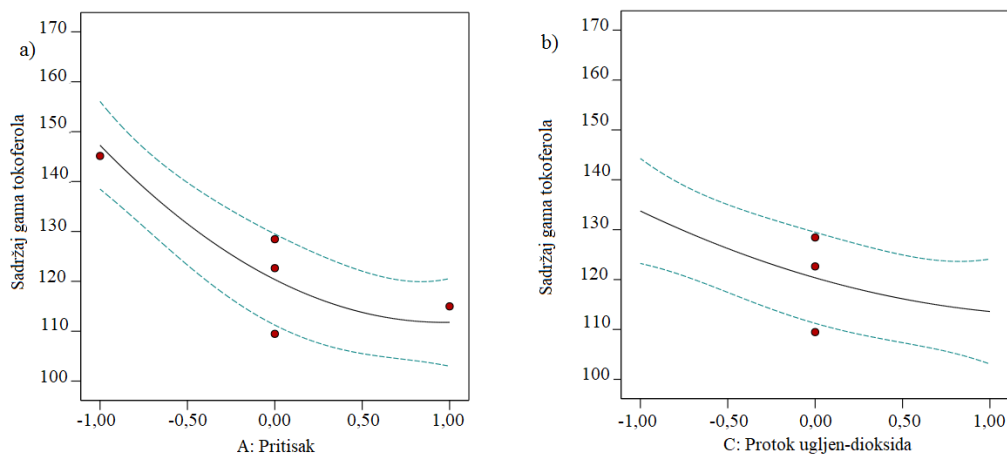
Kvadratni članovi pritiska dovode do značajnih promena sadržaja svih tokoferola i sadržaja ukupnih tokoferola, izuzev δ -TOC, dok kvadratni članovi temperature imaju značajan uticaj na γ - i δ -TOC i TTC, ali u slučaju α -TOC ne dovode do značajnih promena.



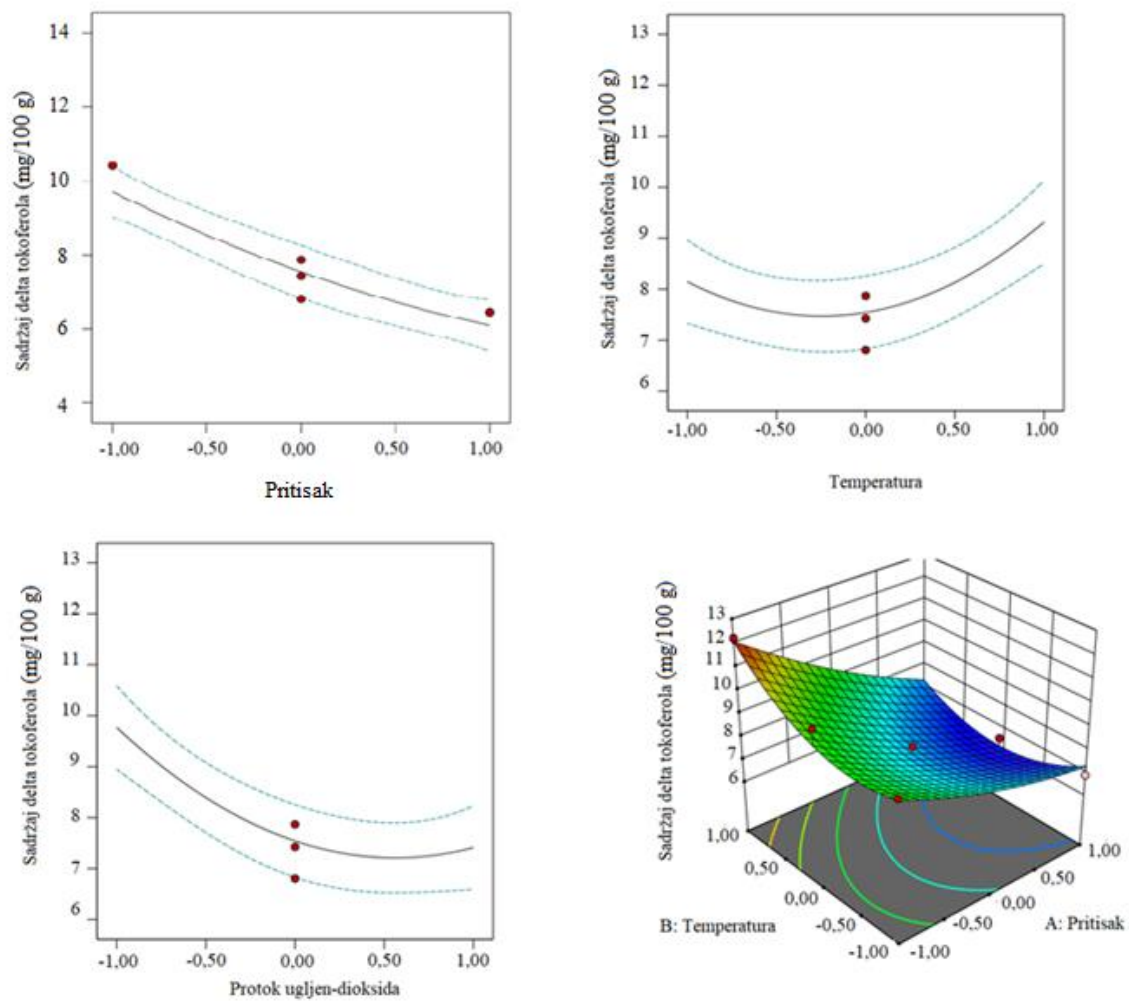
Slika 20. Uticaj linearnih članova jednačine 7 na sadržaj α -TOC u ekstraktu ulja semena maline sorte Vilamet dobijenom pomoću SFE



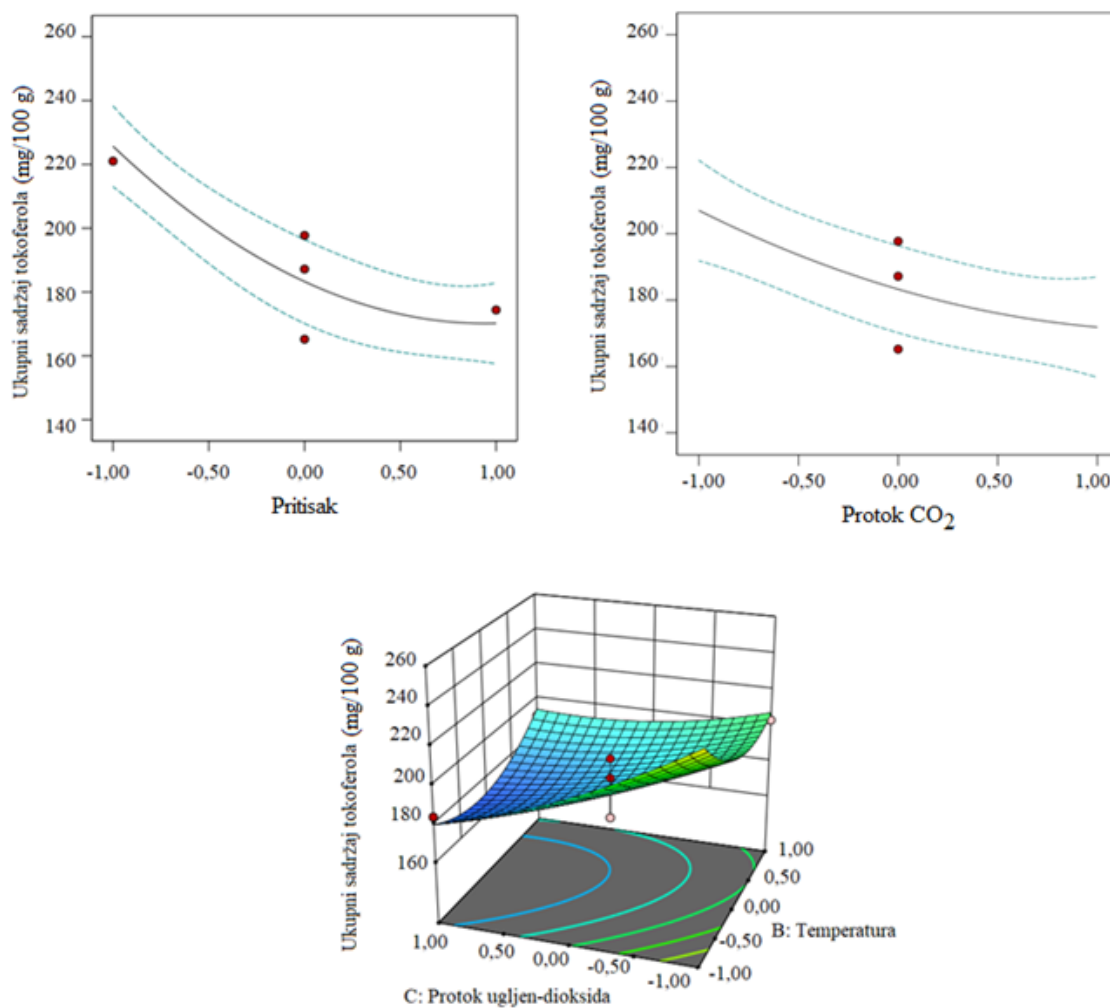
Slika 21. Uticaj interakcije parametara (pritisak, temperatura i protok) na sadržaj α -TOC u ekstraktu ulja semena maline sorte Vilamet dobijenom pomoću SFE



Slika 22. Uticaj linearnih članova jednačina 8 (pritisak i protok ugljen-dioksida) na sadržaj γ -TOC: a) pritisak i b) protok ugljen-dioksida u ekstraktu ulja semena maline sorte Vilamet dobijenom pomoću SFE



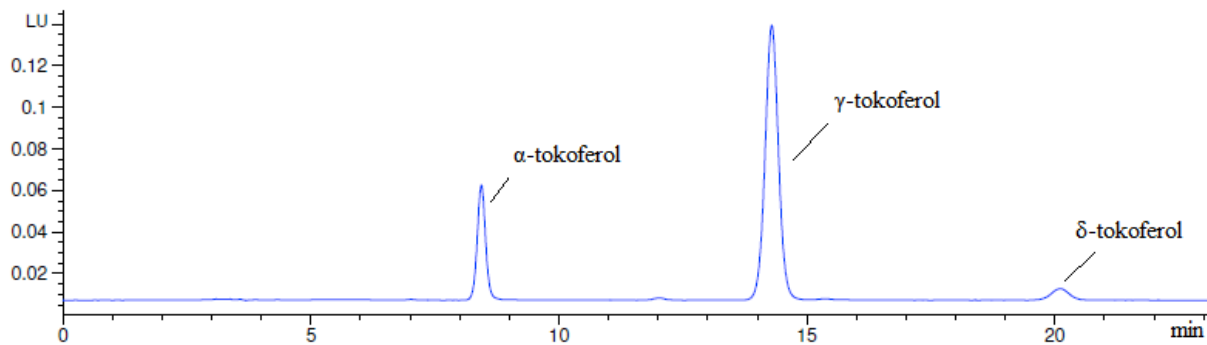
Slika 23. Uticaj linearnih članova jednačina 9 i interakcije članova na sadržaj δ -TOC u ekstraktu ulja semena maline sorte Vilamet dobijenom pomoću SFE



Slika 24. Uticaj linearnih članova i interakcije članova jednačine 10 (protok CO₂ i temperatura) na sadržaj ukupnih tokoferola u ekstraktu ulja semena maline sorte Vilamet dobijenom pomoću SFE

Kvadratni član protoka CO₂ ispoljio je značajan uticaj samo na sadržaj δ-TOC (jednačina 9).

Hromatogram tokoferola u ulju semena maline sorte Vilamet dobijen SFE ugljen-dioksidom pri optimalnim uslovima prikazan na slici 25.



Slika 25. HPLC-DAD hromatogram tokoferola u ulju semena maline sorte Vilamet dobijen SFE ugljen-dioksidom pri optimalnim uslovima (340 bar, 51 °C i 0,4 kg/h)

4.1.5. Antioksidativna aktivnost ulja

Antioksidativna aktivnost ulja određena je primenom *in vitro* testa antioksidativne aktivnosti na DPPH[•]. S obzirom da se ulja dobijena ekstrakcijom *n*-heksanom i smešom dihlormetana i MeOH ne mogu koristiti u ljudskoj ishrani, ovaj test je rađen na uljima dobijenim preostalim tehnikama ekstrakcije. Rezultati ovog testa prikazani su u tabeli 13 i na slici 26.

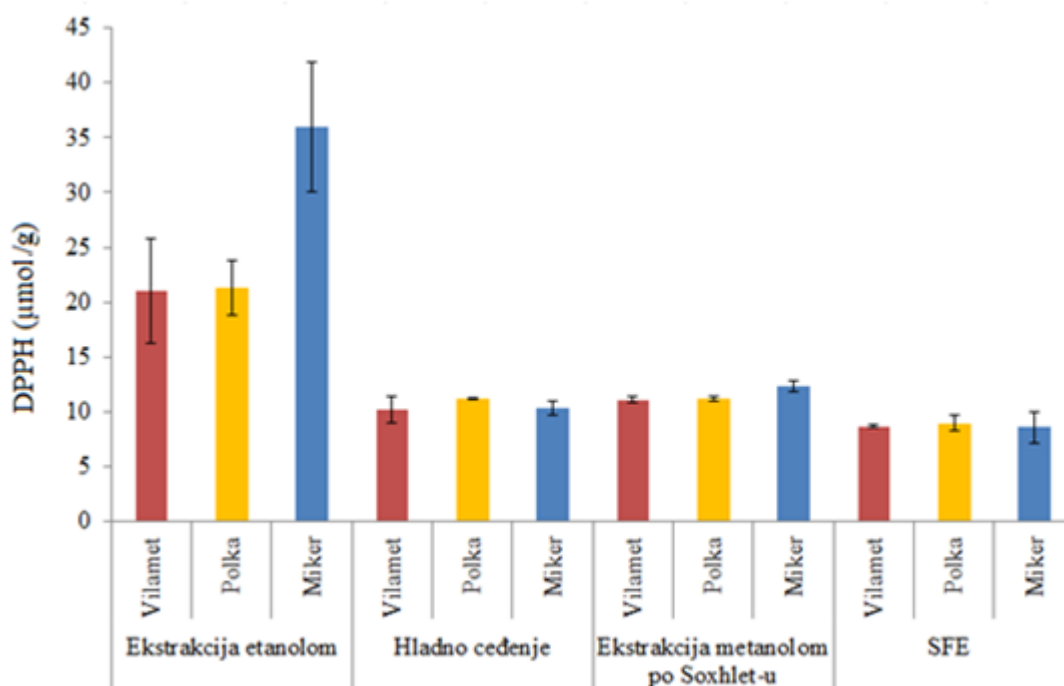
Tabela 13. Uticaj metoda ekstrakcije i sorte maline na antioksidativnu aktivnost na DDPH radikale u dobijenim uljima.

Metoda	Sorta	DPPH [•] (μmol/g)
Ekstrakcija etanolom	Vilamet	21,06 ± 4,79 ^{1c}
	Polka	21,33 ± 2,50 ^{1c}
	Miker	35,95 ± 5,96 ^{2d}
Hladno ceđenje	Vilamet	10,20 ± 1,26 ^{1b}
	Polka	11,16 ± 0,08 ^{2b}
	Miker	10,32 ± 0,64 ^{1b}
Ekstrakcija metodom po Soxhlet-u	Vilamet	11,12 ± 0,24 ^{1b}
	Polka	11,16 ± 0,24 ^{1b}
	Miker	12,29 ± 0,51 ^{2c}
SFE*	Vilamet	8,65 ± 0,14 ^{1a}
	Polka	8,99 ± 0,69 ^{1a}
	Miker	8,62 ± 1,43 ^{1a}

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD, *n* = 3. Različita slova ukazuju na značajne razlike u antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata dobijenih primenom različitih tehnika ekstrakcije (sorta = konst.). Različiti brojevi ukazuju na značajne razlike između sorti (metoda ekstrakcije = konst.) prema Tukey-ovom HSD testu (*p* < 0,05).

* SFE ugljen-dioksidom je izvršena pri srednjim vrednostima parametara (300 bar, 50 °C i 0,3 kg/h)

Slobodni radikali su uključeni u nekoliko metaboličkih poremećaja odgovornih za bolesti ćelija, što dalje implicira na njihov uticaj na izazivanje mnogih bolesti kao što su rak, kardiovaskularne bolesti, stvaranje katarakte, pa čak i na normalan proces starenja (Miguel, 2010). Hrana ima primarnu ulogu u prevenciji proizvodnje slobodnih radikala koji uzrokuju oksidativni stres. Optimalnim unosom antioksidanasa kroz hranu, moguće je sprečiti pojavu oksidativnog stresa i njegove posledice. Poznate su prednosti ishrane bogate voćem i povrćem, zbog relativno visokog sadržaja antioksidanasa. Prema tome, ishrana bogata antioksidativnim i drugim komplementarnim mikronutrijentima smanjuju učestalost pojave karcinoma, kardiovaskularnih i degenerativnih bolesti (Hu, 2003).



Slika 26. Antioksidativna aktivnost ulja dobijenih primenom različitih ekstrakcionih tehnika

Rezultati prikazani u tabeli 13 i na slici 26 ukazuju na to da najjače antioksidativno dejstvo imaju ulja dobijena ekstrakcijom sa etanolom kao ekstrakcionim sredstvom, uzimajući u obzir ulja dobijena iz semena sve tri ispitivane sorte maline. Takođe, najveću antioksidativnu aktivnost je pokazalo ulje dobijeno iz semena sorte Miker (35,95 µmol/g) ekstrahovano etanolom. Ovakvi rezultati su i očekivani, s obzirom da su osim tokoferola, nosioci antioksidativnog delovanja i polifenolna jedinjenja. Uzimajući u obzir polarnost etanola kao rastvarača i polarnost polifenolnih jedinjenja sadržanih u semenu maline, najveća količina polifenola je ekstrahovana sa uljem, za razliku od drugih ekstrakcionih sredstava, te je stoga ovo ulje pokazalo najjače antioksidativno dejstvo.

Poređenjem sa antioksidativnom aktivnošću ulja koja su u našoj zemlji najčešće u upotrebi, suncokretovog i maslinovog, koja imaju antioksidativnu aktivnost 2,16 $\mu\text{mol/g}$, ulje semena maline je pokazalo značajno veću antioksidativnu aktivnost (Tijan, 2018). U poređenju sa antioksidativnom aktivnošću ulja drugih biljaka, na primer uljem muskatnog oraščića (16,46–31,69 $\mu\text{mol/g}$), uljem bele slačice (4,21–7,39 $\mu\text{mol/g}$), uljem anisa (3,44–12,52 $\mu\text{mol/g}$) i uljem korijandera (2,24–4,96 $\mu\text{mol/g}$), ulje dobijeno ekstrakcijom iz semena sve tri ispitivane sorte maline je pokazalo sličnu ili veću aktivnost (Kozłowska i dr., 2016).

Antioksidativna aktivnost merena DPPH testom nije obuhvaćena optimizacijom zato što nema slaganja između rezultata dobijenih polinomom drugog reda i eksperimentalno dobijenih podataka. U tabeli 12 prikazana je antioksidativna aktivnost ulja dobijenog SFE ugljen-dioksidom, pri različitim vrednostima pritiska, temperature i protoka ugljen-dioksida. Najviša vrednost je dobijena pri uslovima od 250 bar, 50 °C i protoku ugljen-dioksida od 0,2 kg/h (eksperiment 5), dok je najniža vrednost dobijena pri uslovima od 350 bar, 50 °C i protoku ugljen-dioksida od 0,2 kg/h (eksperiment 3).

4.1.6. Optimizacija ekstrakcije ulja pomoću metode odzivne površine i eksperimentalna validacija

Kako je prethodno navedeno, optimizacija ekstrakcije je izvršena pomoću Box-Behnken eksperimentalnog dizajna sa RSM. Rezultati su pokazali da bi optimizacija na osnovu sadržaja tokoferola dovela do znatno nižeg prinosa ulja. Stoga je, bez obzira na njihovu saglasnost sa kvadratnim polinomskim modelom (jednačine (7)-(10)), kao i u pogledu zadovoljavanja saglasnosti prinosa ulja sa ovim modelom i sa ekonomske tačke gledišta, odlučeno da se SFE ugljen-dioksidom optimizuje prema maksimalnom prinosu ulja. Dobijeni optimalni uslovi za ekstrakciju ulja su sledeći: pritisak od 340 bar, temperatura od 51 °C i protok CO₂ 0,4 kg/h. Da bi se uporedili eksperimentalni rezultati sa predviđenim rezultatima na osnovu polinomnog modela drugog reda, ulju dobijenom pri optimalnim uslovima ekstrakcije su određeni prinos, sadržaj individualnih i ukupnih tokoferola, masnokiselinski sastav, indeksi funkcionalnosti i antioksidativna aktivnost (Tabela 14). Dobijene vrednosti svih zavisno promenljivih su u predviđenim intervalima pri 95 % nivou poverenja i prema tome se može zaključiti da je optimizacija uspešno obavljena.

Tabela 14. Predviđene vrednosti RSM i eksperimentalno dobijene vrednosti za *Y*, sadržaj TOC, antioksidativno delovanje na DPPH radikale, masnokiselinski sastav i indekse funkcionalnosti ulja dobijene iz semena maline sorte Vilamet

Zavisno promenljiva	Predviđena vrednost	Dobijena vrednost	Interval pri 95 % nivou poverenja
<i>Y</i> (%)	18,85	18,64±0,23	15,80 – 20,64
α-TOC (mg/100 g)	51,70	49,65±3,35	41,63 – 57,70
γ-TOC (mg/100 g)	108,84	110,42±13,64	91,16 – 119,22
δ-TOC (mg/100 g)	6,33	6,26±0,54	5,04 – 7,12
TTC (mg/100 g)	166,84	166,34±17,54	140,87 – 182,04
DPPH (μmol/g)	8,63	9,12±1,21	6,46 – 9,96
16:0 (%)	2,49	2,48±0,03	2,19 – 2,67
18:0 (%)	0,72	0,68±0,001	0,53 – 0,84
18:1(9) (%)	12,63	12,92±0,03	11,59 – 13,23
18:2(6) (%)	49,42	48,61±0,16	48,87 – 49,73
18:3(3) (%)	34,62	35,12±0,14	32,95 – 35,56
PUFA/SFA	26,11	26,46±0,33	22,42 – 28,26
H/H	38,75	38,97±0,48	34,45 – 41,23
AI	0,103	0,102±0,001	0,090 – 0,110
TI	0,024	0,023±0,0003	0,020 – 0,026

4.1.7. Oksidativna stabilnost ulja

Oksidativna stabilnost ulja je određena Rancimatnim testom i dobijene vrednosti su prikazane u tabeli 15. Test se temelji na ubrzanom kvarenju ulja pri povišenim temperaturama uz konstantan dovod vazduha, pri čemu se indukcionni period određuje na osnovu količine izdvojenih kratkolančanih isparljivih organskih kiselina. Indukcionni period daje informaciju o otpornosti ulja ka oksidovanju, što znači da što je indukcionni period duži ulje se može smatrati stabilnijim. Da bi se smatralo da je ulje stabilno ovaj indukcionni period mora biti duži od 3 h (Sarin i dr., 2009). Iz rezultata prikazanih u tabeli 15 se vidi da sorta maline nema značajan uticaj na oksidativnu stabilnost ulja dobijenog SFE ugljen-dioksidom, pri optimalnim uslovima. Takođe, u poređenju sa uljima drugih kultura, kao što su suncokretovo ulje (2,54 h), ulje kukuruzne klice (4,79 h), ulje semena grožđa (2,64 h), ulje uljane repice (4,30 h) i sojino ulje (3,27 h) (Volmut i dr., 2009), može se videti sličnost u oksidativnoj stabilnosti.

Tabela 15. Oksidativna stabilnost ulja ekstrahovanih superkritičnim ugljen-dioksidom pri optimalnim uslovima

Sorta	Oksidativna stabilnost (h)
Vilamet	3,73 ± 0,25 ^a
Polka	3,71 ± 0,22 ^a
Miker	3,78 ± 0,19 ^a

Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost ± SD, $n = 3$. Ista slova ukazuju da razlike u oksidativnoj stabilnosti statistički nisu značajne prema Tukey-ovom HSD testu ($p < 0,05$).

4.1.8. Antimikrobna aktivnost ulja

Testovi na antimikrobnu aktivnost ulja su rađeni na Gram+ i Gram- bakterijama. Međutim, upotrebom navedene metodologije, ni u jednom slučaju nije utvrđena antimikrobna aktivnost ulja semena nijedne ispitivane sorte maline. Razlog tome može biti slaba rastvorljivost u vodi, međutim u ovom slučaju postoji prostor za eventualna buduća istraživanja koja bi se proširila na veći broj testiranih mikroorganizama.

4.2. Karakterizacija polifenolnih ekstrakata

Tokom proteklih godina velika pažnja istraživača je posvećena polifenolima koji su sadržani u biljnim vrstama. Ovi sekundarni biljni metaboliti, prirodno prisutni u voću i povrću, deo su naše svakodnevne ishrane. Fenoli su jedinjenja sa širokim spektrom struktura, od jednostavnih, koje sadrže jedan hidrosilovani aromatični prsten do visoko složenih polimernih supstanci. Stoga je poznavanje polifenolnog profila ekstrakta veoma značajno u smislu upotrebe ekstrakta kao potencijalnog funkcionalnog dodatka hrani.

Polifenoli i među njima EA su, kako je već navedeno, ekstrahovani upotrebom četiri različite metode ekstrakcije. S obzirom da je metodom UAE dobijena najveća količina EA i najveći RC ekstrakata, ova metoda je optimizovana u cilju dobijanja najveće količine EA i najvećeg RC ekstrakata. Ekstrakti su podvrgnuti analizama određivanja sadržaja EA, RC i polifenolnog profila pomoću LC-MS/MS. Bioaktivnost polifenolnih ekstrakata je određena antioksidativnim, antimikrobnim i antiproliferativnim testovima.

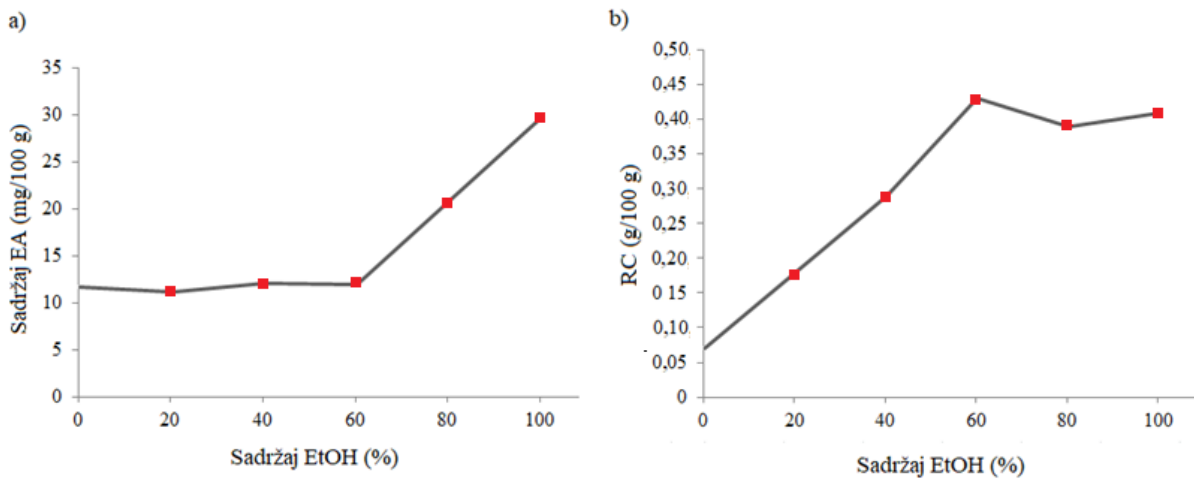
4.2.1. Sadržaj elaginske kiseline

Sve je veće interesovanje za prirodne izvore jedinjenja koja bi se mogla koristiti za prevenciju i lečenje različitih bolesti. Izvesno je da hrana koja sadrži elaginsku kiselinu pored ostalih bioloških aktivnosti, poseduje i antiproliferativna svojstva. Prethodne studije sugerišu

da je antiproliferativna aktivnost maline pretežno povezana sa elaginskom kiselinom i elagitaninima (Juranić i dr., 2005). Zbog toga je sadržaj EA i elagitanina jedan od glavnih parametara kvaliteta maline, a odabir sorti sa većim količinama ovih jedinjenja važan je zadatak. Takođe, ranija istraživanja koja su sprovedeli Daniel i dr. (1989) ukazuju na to da je sadržaj slobodne EA u semenu maline izrazito mali u odnosu na sadržaj elagitanina, te je, kako bi se povećao sadržaj EA bilo neophodno izvršiti hidrolizu elagitanina. S obzirom da je polifenolni ekstrakt dobijen nakon hidrolize neupotrebljiv za ljudsku upotrebu, zadatak je bio da se dobije što veća količina slobodne EA iz semena maline navedene tri sorte, upotrebom „zelenih” ekstrakcionih tehnika.

Kako bi se došlo do optimalne polarnosti rastvarača, odnosno odnosa etanola i vode, urađena je serija eksperimenata. Prethodno je izvedena ekstrakcija polifenola i metanolom kao ekstrakcionim sredstvom, ali s obzirom da je sadržaj EA u oba slučaja bio sličan (48,54 mg/100 g), kao i da je metanol mnogo toksičniji po životnu sredinu od etanola i da ga ne bi trebalo upotrebljavati ukoliko je cilj dobijanje jestivog proizvoda, odlučeno je da se kao ekstrakciono sredstvo koristi etanol. Sadržaj EA dobijen čvrsto-tečnom ekstrakcijom različitim odnosima etanola i vode je prikazan na slici 27. S obzirom da je etanol korišćen kao rastvarač u svim ekstrakcionim metodama, čvrsto-tečna ekstrakcija je imala za cilj određivanje optimalnog odnosa etanola i vode, kako bi se nakon ostalih ekstrakcija (MAE, UAE i ASE) dobila najveća količina EA. Iz priloženih rezultata se vidi da se sa povećanjem sadržaja etanola, odnosno smanjenjem polarnosti rastvarača, povećava sadržaj EA u ekstraktima. Međutim, sa ekonomske tačke gledišta, za ostale ekstrakcije, korišćen je rastvarač koji sadrži 80 % etanola i 20 % vode.

Sadržaj EA u ekstraktima primenom svih ispitanih metoda ekstrakcije prikazan je u tabeli 16. Kao što je i očekivano, najveća količina ekstrahovane EA je dobijena nakon čvrsto-tečne ekstrakcije kiselog hidrolizata pomoću MeOH. Razlog tome je značajno manja količina slobodne EA, u odnosu na vezanu, u poređenju sa rezultatima dobijenim nakon ostalih metoda ekstrakcije. Iz prikazanih rezultata se vidi da postoje značajne razlike između ekstrakata EA dobijenih čvrsto-tečnom ekstrakcijom u odnosu na koncentraciju EA dobijene alternativnim metodama. Upotreba niske frekvencije kod UAE doprinela je većem prinosu EA u odnosu na konvencionalnu metodu.



Slika 27. Sadržaj elaginske kiseline (a) i redukcionu kapacitet (b) dobijeni čvrsto-tečnom ekstrakcijom pri različitim odnosima etanola i vode u obezmašćenom semenu maline sorte Vilamet

Tabela 16. Redukcioni kapacitet i sadržaj elaginske kiseline u ekstraktima obezmašćenog semena maline sorte Vilamet dobijenim svim ispitivanim metodama ekstrakcije

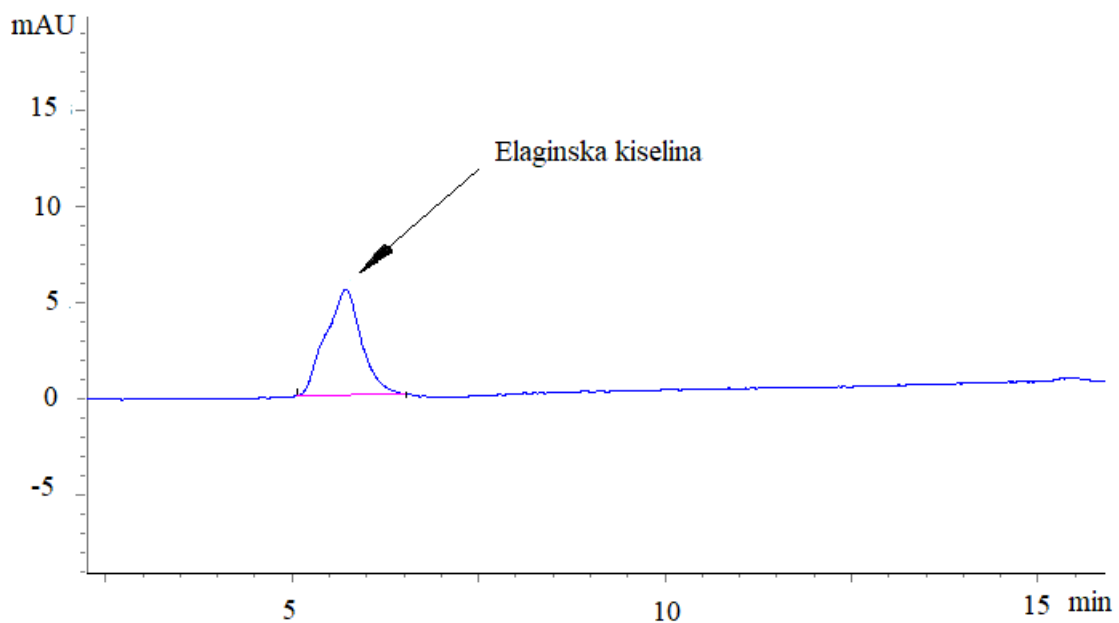
Metoda ekstrakcije	Redukcioni kapacitet (g/100 g uzorka)	Sadržaj elaginske kiseline (mg/100 g uzorka)
Mikrotalasna ekstrakcija 80 % etanolom	2,49 ± 0,03 ^b	35,36 ± 0,99 ^b
Ekstrakcija rastvaračem pod pritiskom 80 % etanolom	2,58 ± 0,07 ^b	32,83 ± 1,56 ^b
Ultrazvučna ekstrakcija 80 % etanolom*	2,62 ± 0,02 ^b	36,36 ± 0,63 ^b
Čvrsto-tečna ekstrakcija kiselog hidrolizata pomoću MeOH	0,38 ± 0,14 ^a	831,42 ± 88,18 ^c
Čvrsto-tečna ekstrakcija 80 % etanolom	0,39 ± 0,09 ^a	20,96 ± 1,48 ^a

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD, $n = 3$. Različita slova u istoj koloni ukazuju na značajne razlike između primenjene tehnike ekstrakcije prema Tukey-ovom HSD testu ($p < 0,05$).

* UAE je izvedena na centralnoj tački (80 % etanol, 10 min, 15 cm³/g, 60 °C)

Takođe, primenom mikrotalasne ekstrakcije značajno je povećan prinos EA u odnosu na klasičnu čvrsto-tečnu ekstrakciju uz upotrebu 80 % etanola. Isto tako, povećanjem pritiska i temperature, u slučaju ekstrakcije rastvaračem pod pritiskom, povećava se rastvorljivost supstanci, te je prinos EA zbog toga veći nego kod konvencionalne metode. Uzimajući u obzir da upotreba MeOH i HCl za ekstrakciju daje ekstrakte koji kao takvi nisu pogodni za ljudsku upotrebu, kao i rezultate dobijene nakon ostalih metoda ekstrakcije (Tabela 16), UAE se pokazala kao najpogodnija za ekstrakciju slobodne EA, s obzirom da je tom ekstrakcionom metodom dobijena najveća količina EA (36,36 mg/100 g).

Svi dobijeni rezultati su bili značajno viši u poređenju sa rezultatima koji su prezentovani u prethodnim istraživanjima Bobinaite i dr. (2012), koji su ekstrahovali slobodnu elaginsku kiselinu upotrebom MeOH i u kojima se sadržaj EA kretao u rasponu od 2,0 do 5,5 mg/100 g. Hromatogram EA dobijene UAE pri optimalnim uslovima je prikazan na slici 28.



Slika 28. HPLC-DAD hromatogram elaginske kiseline ekstrakta obezmašćenog semena maline sorte Vilamet, dobijenog UAE pri optimalnim uslovima (58 °C, 15 min, 17,8 mg/dm³ i 80 % EtOH)

4.2.2. Redukcioni kapacitet

Redukcioni kapacitet ekstrakata dobijenih čvrsto-tečnom ekstrakcijom sa različitim odnosima etanola i vode je prikazan na slici 27. Rezultati ukazuju na to da menjanje polarnosti rastvarača dovodi do različitog RC u ekstraktima. S druge strane, rezultati istraživanja Bobinaite i dr. (2015) su pokazala da postoje značajne razlike u RC u zavisnosti od sorte

maline. Zatim, utvrđeno je da različita podneblja na kojima su gajene maline, uzimajući u obzir brojne faktore koji mogu uticati na RC, nemaju značajan uticaj na RC kada su iste sorte maline u pitanju (Bobinaite i dr., 2015).

RC u ekstraktima za sve korišćene metode ekstrakcije je prikazan u tabeli 16. Jasno se vidi da značajno veći RC imaju ekstrakti dobijeni ultrazvučnom i mikrotalasnom ekstrakcijom, kao i primenom rastvarača pod pritiskom, u poređenju sa čvrsto-tečnom ekstrakcijom kiselog hidrolizata pomoću MeOH i čvrsto-tečnom ekstrakcijom pomoću EtOH. Istraživanja sprovedena od strane Park i dr. (2014) koji su seme obezmašćivali *n*-heksanom a potom fenolnu frakciju ekstrahovali upotrebom MeOH pokazuju značajno veći RC u semenu maline (27,1-78,8 g/100 g). Što se tiče rezultata prikazanih u tabeli 16, najveći RC je dobijen UAE (2,62 g/100 g), dok je najmanji RC dobijen čvrsto-tečnom ekstrakcijom kiselog hidrolizata pomoću MeOH (0,38 g/100 g) i čvrsto-tečnom ekstrakcijom uz upotrebu 80 % EtOH kao rastvarača (0,39 g/100 g). Imajući to u vidu, kao i rezultate sadržaja EA, odlučeno je da se metoda UAE optimizuje primenom RSM u cilju dobijanja najveće količine EA i najvećeg RC.

4.2.3. Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije pomoću metode odzivne površine i eksperimentalna validacija

Uticaj parametara procesa optimizacije UAE (Tabela 3) na sadržaj EA i RC u ekstraktima dobijenim iz obezmašćenog semena maline sorte Vilamet, prikazani su u tabeli 17. Kao što se može videti, najviši sadržaj EA (45,62 mg/100 g; eksperiment 8) dobijen je pri sledećim eksperimentalnim uslovima: temperatura 80 °C, trajanje ekstrakcije 5 min, odnos rastvarač/čvrsta supstanca 25 cm³/g, 60 % etanol, dok je najniži sadržaj EA (22,52 mg/100 g; eksperiment 15) dobijen pri eksperimentalnim uslovima: temperatura 40 °C, trajanje ekstrakcije 5 min, odnos rastvarač/čvrsta supstanca 25 cm³/g, 100 % EtOH.

Tabela 17. Efekti procesnih parametara UAE na RC i sadržaj EA u ekstraktima dobijenim iz obezmašćenog semena maline sorte Vilamet

Eksperiment*	Redukcioni kapacitet (g/100 g)	Sadržaj EA (mg/100 g)
1	0,67	33,01
2	1,21	23,56
3	1,08	39,05
4	1,18	29,12
5	1,12	42,12
6	1,39	40,74
7	1,42	35,34
8	0,85	45,62
9	1,39	44,19
10	1,42	37,48
11	1,20	42,18
12	1,19	41,11
13	1,53	31,94
14	1,02	40,37
15	1,16	22,52
16	1,13	31,73
17	1,54	34,07
18	1,30	24,61
19	1,35	40,99
20	1,44	38,83
21	1,15	44,14
22	0,93	36,54
23	1,03	35,41
24	1,26	29,92
25	1,40	34,18
26	1,65	38,74
27	1,39	28,49

*Eksperimentalni uslovi su prikazani u tabeli 3

Kao što je prikazano u tabeli 18, izračunati koeficijent determinacije iznosio je 0,8589, dok je prilagođeni koeficijent determinacije iznosio 0,6382. Nedostatak fitovanja nije bio

značajan ($p>0,05$), pa primenjeni model predstavlja prihvatljivu aproksimaciju eksperimentalnih rezultata. Na osnovu relativno niske vrednosti koeficijenta varijacije (6,76), potvrđena je dobra ponovljivost proučavanih sistema. Iz tabele 19 se takođe može videti da linearni članovi sva četiri parametra imaju značajan uticaj na sadržaj EA i njihov uticaj je prikazan na slici 29.

Tabela 18. Procenjeni koeficijenti fitovanja polinomskog drugog reda za sadržaj RC i EA u ekstraktima dobijenim iz obezmašćenog semena maline sorte Vilamet

Članovi	RC (g/100 g uzorka)	EA (mg/100 g uzorka)
β_0	1,42	40,66
Linearni		
β_1	0,077**	-1,12***
β_2	0,050***	-2,66*
β_3	-0,064**	-1,18***
β_4	0,028	1,20***
Interakcija		
β_{12}	-0,14*	1,98*
β_{13}	-0,016	-0,68
β_{14}	-0,018	0,27
β_{23}	0,074**	-1,53**
β_{24}	0,003	-1,97*
β_{34}	-0,021	4,56*
Kvadratni		
β_{11}	0,17**	-4,71*
β_{22}	-0,004	0,39
β_{33}	-0,18**	-4,50**
β_{44}	-0,25*	1,51
R^{2a}	0,8915	0,8589
Adj R^{2b}	0,7650	0,6382
CV ^c	8,72	6,76
p_m - vrednost ^d	0,0008	0,0001
p_{if} - vrednost ^e	0,0961	0,4391

Visko značajan * $p<0,01$.

Značajan ** $0,01 \leq p < 0,05$.

Umereno značajan *** $0,05 \leq p < 0,1$.

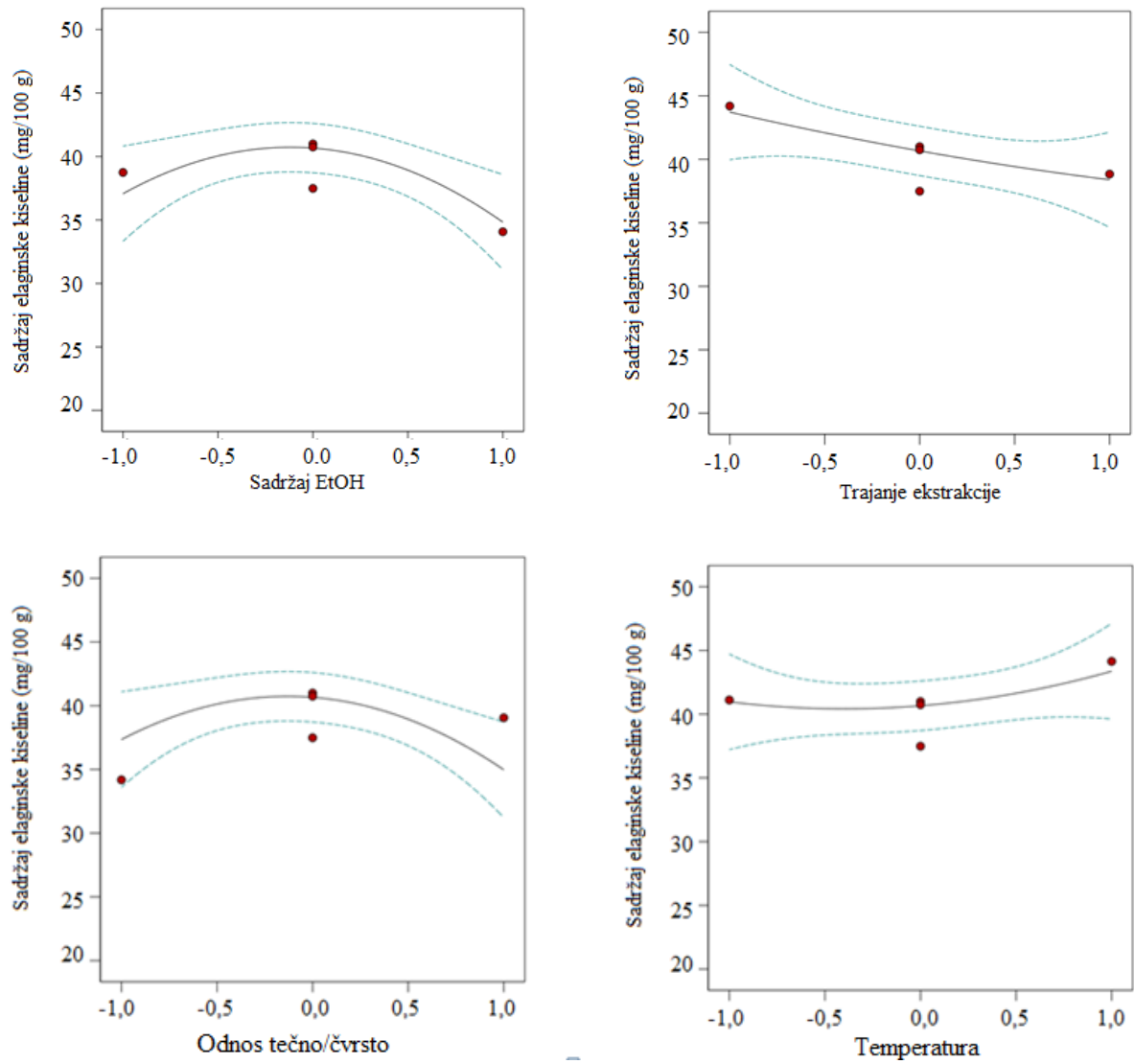
^aKoeficijent determinacije.

^bPrilagođeni koeficijent determinacije.

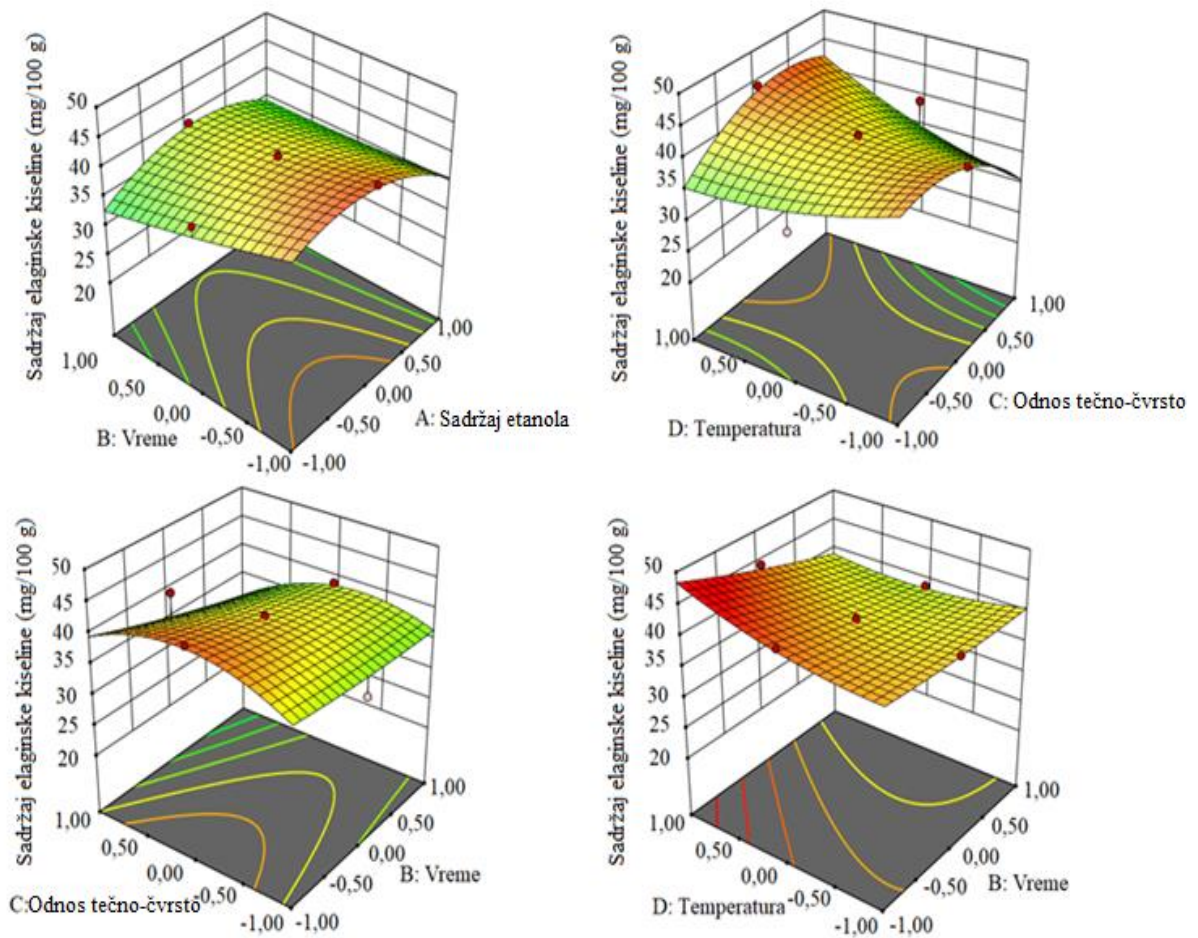
^cKoeficijent varijanse (%).

^dVerovatnoća F-vrednosti za model.

^eVerovatnoća F-vrednosti za nedostatak fitovanja.



Slika 29. Uticaj linearnih članova jednačine 11 na sadržaj elaginske kiseline



Slika 30. Uticaj interakcije članova jednačine 11 na sadržaj elaginske kiseline

Na sadržaj EA u ekstraktu, značajan uticaj ima linearni faktor temperature (Slika 29), što znači da se sa povećanjem temperature povećava prinos EA, iz razloga što se povećava pristup ekstrakcionog sredstva u pore matriksa, te je lakše ekstrahovati željeno jedinjenje. Takođe, interakcija koncentracije i trajanja ekstrakcije etanolom, trajanja ekstrakcije i odnosa rastvarač/čvrsta supstanca, trajanja ekstrakcije i temperature i odnosa rastvarač/čvrsta supstanca i temperature imaju značajan uticaj na sadržaj EA (Slika 30). Zatim, kvadratni članovi koncentracije etanola i odnosa rastvarač/čvrsta supstanca imaju značajan uticaj na sadržaj EA, dok ostali parametri nemaju signifikantni uticaj na sadržaj EA u ekstraktima. Rezultati pokazuju značajan uticaj dužine trajanja ekstrakcije na sadržaj EA, odnosno

smanjenjem dužine trajanja ekstrakcije povećava se koncentracija EA u ekstraktima. Jednačina prediktivnog modela (jednačina (11)) za EA sa zanemarenim koeficijentima koji nisu bili signifikantni bila je sledeća:

$$EA = 40,66 - 1,12X_1 - 2,66X_2 - 1,18X_3 + 1,20X_4 + 1,98X_{12} - 1,53X_{23} - 1,97X_{24} + 4,56X_{34} - 4,71X_1^2 - 4,50X_3^2 \quad (11)$$

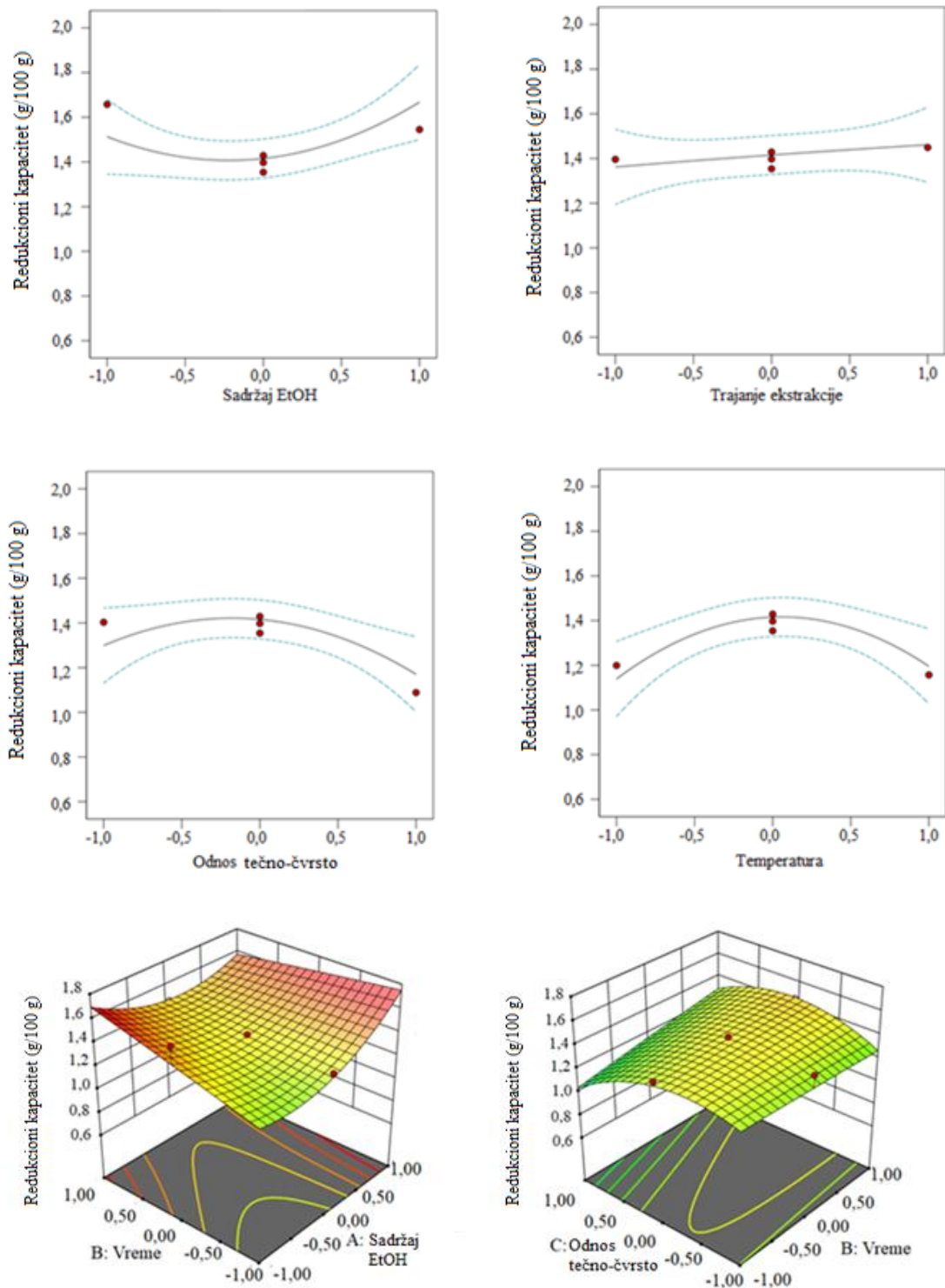
Uticaj parametara procesa optimizacije UAE (Tabela 3) na RC u uzorcima, prikazani su takođe u tabeli 17. Kao što je prikazano, najveći RC (1,65 g/100 g uzorka, eksperiment 26) postignut je nakon ekstrakcije na 60 °C, u trajanju ekstrakcije od 30 min, odnosa rastvarača/čvrste supstance 20 cm³/g i upotrebom 60 % etanola. S druge strane, najmanji RC (0,67 g/100 g uzorka, eksperiment 1) dobijen je nakon ekstrakcije na 40 °C, u trajanju ekstrakcije od 15 min, odnosa rastvarač/čvrsta supstanca od 30 cm³/g i upotrebom 60 % etanola. Eksperimentalno dobijeni RC fitovan je kvadratnim polinomskim modelom (jednačina (12)), a procenjeni koeficijenti su prikazani u tabeli 18. Imajući u vidu da je EA stabilna na višim temperaturama, može se zaključiti da sa povećanjem temperature raste i prinos EA. Isto tako, polarnost ekstrakcionog sredstva ima značajan uticaj na prinos EA. Nađeno je da je optimalan odnos etanol/voda 4:1 (v/v).

Izračunati koeficijent determinacije iznosio je 0,8915, dok je prilagođeni koeficijent determinacije bio 0,7650 (Tabela 18). Nedostatak fitovanja nije bio signifikantan ($p > 0,05$), pa primenjeni model predstavlja dobru aproksimaciju eksperimentalnih rezultata. Prema RSM može se videti da linearni članovi koncentracije etanola, trajanje ekstrakcije i odnosa rastvarač/čvrsta supstanca imaju značajan uticaj, dok temperature na kojoj se izvodi ekstrakcija nema značajan uticaj na RC. Rezultati ukazuju da upotreba rastvarača sa 60 % etanola dovodi do većeg RC. Ovo se može objasniti sličnom polarnošću rastvarača i ciljnih jedinjenja. Interakcija koncentracije etanola i trajanja ekstrakcije, kao i interakcija trajanja ekstrakcije i odnosa rastvarač/čvrsta supstanca, dovodi do značajnih promena RC za razliku od preostale dve interakcije (Slika 31). Kvadratni članovi sadržaja etanola, odnosa rastvarač/čvrsta supstanca i temperature imali su značajan uticaj na RC.

$$RC = 1,42 + 0,077X_1 + 0,050X_2 - 0,064X_3 - 0,14X_{12} + 0,074X_{23} + 0,17X_1^2 - 0,18X_3^2 - 0,25X_4^2 \quad (12)$$

Za razliku od prinosa EA, temperatura ekstrakcije nema značajan uticaj na RC. S druge strane, podešavanjem polarnosti rastvarača, odnosno odnosa etanol/voda može se značajno

uticati na povećanje njihovog sadržaja, pa rezultati pokazuju da se povećanjem sadržaja etanola, povećava i RC.



Slika 31. Uticaj linearnih članova i interakcije članova jednačine 12 na RC

Parametri optimalnih uslova UAE elaginske kiseline i RC bili su temperatura od 58 °C, trajanje ekstrakcije od 15 min, odnos rastvarač/čvrsta supstanca od 17,8 cm³/g i upotreba 80 % etanola. Da bi se optimizacija eksperimentalno validovala, ekstrakti dobijeni pri optimalnim uslovima su testirani na RC i sadržaj EA. Usled dobrog poklapanja eksperimentalno dobijenih i metodologijom predviđenih vrednosti RC i EA, može se zaključiti da je optimizacija izvršena uspešno (Tabela 19).

Tabela 19. Predviđene vrednosti RSM i eksperimentalno dobijene vrednosti RC i sadržaja elaginske kiseline u ekstraktu obezmašćenog semena maline sorte Vilamet dobijenom primenom UAE

Zavisno promenljiva	Predviđena vrednost	Dobijena vrednost	Interval pri 95 % nivou poverenja
RC (g/100 g uzorka)	1,415	1,367	1,33 – 1,50
Sadržaj EA (mg/100 g uzorka)	40,66	43,05	38,72 – 42,60

Nakon uspešno sprovedene optimizacije pomoću RSM, određen je sadržaj EA i u ekstraktima dobijenim UAE pri optimalnim uslovima iz preostale 2 sorte. Objedinjeni rezultati sadržaja EA u ekstraktima sve tri sorte su prikazani u tabeli 20.

Tabela 20. Sadržaj elaginske kiseline u ekstraktima sve tri sorte dobijenim pomoću UAE pri optimalnim uslovima

Sorta	Sadržaj EA (mg/100 g)
Vilamet	43,05 ± 0,59 ^a
Polka	44,29 ± 0,17 ^a
Miker	46,76 ± 1,03 ^b

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD, $n = 3$. Različita slova ukazuju na značajne razlike u sadržaju EA u ekstraktima različitih sorti semena maline prema Tukey-ovom HSD testu ($p < 0,05$).

Kao što se može videti iz rezultata prikazanih u tabeli 20, sadržaj EA se kretao od 43,05 mg/100 g, do 46,76 mg/100 g u zavisnosti od sorte. Najveći sadržaj EA dobijen pomoću UAE pri optimalnim uslovima je sadržao ekstrakt sorte Miker, dok između ekstrakata sorti Vilamet i Polka ne postoje statistički značajne razlike.

4.2.4. Fenolni profil ekstrakta

Fenolini profil ekstrakata dobijenih iz sve tri sorte određen je pomoću LC-MS/MS. U tabelama 21 a-c prikazani su fenolni profili ekstrakata semena maline sve tri sorte. U semenima sve tri ispitivane sorte je detektovan veliki broj fenolnih jedinjenja za koje je poznato da imaju niz bioloških jedinjenja (Li i dr. 2014). U uzorcima je detektovano ukupno 41 različito fenolno jedinjenje i u tabelama 21 a-c je prikazano koja su jedinjenja detektovana u kojim ekstraktima dobijenim različitim metodama ekstrakcije i u različitim sortama maline.

Iz tabele 21a se vidi da je detektovano 6 fenolnih kiselina u koje spadaju elaginska, ferulna, galna, hlorogenska, kafena i kumarna kiselina. Fenolne kiseline su prisutne u našoj ishrani u različitim namirnicama i zbog svojih bioaktivnih svojstava, detaljno se proučavaju i postoje dokazi o njihovoj ulozi u prevenciji autoimunih bolesti (Rashmi i Negi, 2020). Osim toga, fenolne kiseline se istražuju zbog antialergijskih, antimikrobnih, kardioprotektivnih, antikancerogenih i antidijabetičkih svojstava (Anantharaju i dr., 2016; Kumar i Goel, 2019).

Zatim, iz tabele 21b se vidi da se u ekstraktima nalaze različiti flavonoidi, kao što su katehin i epikatehin, kemferol i kvercetin, kao i katehin dimer, poznat i kao procijanidin B. Sadržaj flavonoida je direktno povezan sa ekstrakcionom metodom, odnosno pH-vrednošću sredine. Prisustvo flavonoida u hrani utiče na parametre kvaliteta hrane, kao što su gorčina, kiselost, slatkoća, aroma i boja. Uticaj flavonoida na funkcionalnost hrane se ogleda u vidu pozitivnog dejstva na zdravlje, odnosno flavonoidi imaju antioksidativno i antikarcinogeno dejstvo, a takođe ispoljavaju i kardiopreventivno, antimikrobno, antivirusno i neuro-zaštitno delovanje (Aron i Kennedy, 2008).

Takođe, prisutan je i veliki broj antocijana i antocijanidina (Tabela 21c). Značaj antocijana u ljudskoj ishrani se ogleda u tome što ljudi koji konzumiraju veće količine hrane bogate antocijaninima imaju smanjen rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti (Kay i dr., 2009). Hromatogram na kome je prikazan polifenolni profil ekstrakta dobijenog UAE pri optimalnim uslovima iz semena maline sorte Vilamet je prikazan na slici 31.

Tabela 21a. Detektovane fenolne kiseline u ispitivanim ekstraktima primenom LC-MS/MS

Jedinjenje	Retenciono			Uzorak									
	vreme (min)	Prekursor jon (m/z)	Produkt jon (m/z)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Elaginska kiselina	18,63	165,1013	101,3014	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
Ferulna kiselina	9,56	149,5521	139,1481	d	d	d	nd	nd	d	d	d	d	d
Galna kiselina	13,32	127,5114	109,1745	d	nd	nd	d	d	d	d	d	d	d
Hlorogenska kiselina	15,65	355,2802	163,9814	d	d	d	nd	nd	d	d	d	d	d
Kafena kiselina	36,32	181,8385	163,9882	d	d	d	d	d	d	d	d	d	nd
Kumarna kiselina	16,32	103,0878	123,3232	d	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	d	d

d - detektovan, nd - nije detektovan, 1 - Ekstrakt semena sorte Vilamet dobijen čvrsto-tečnom ekstrakcijom kiselog hidrolizata pomoću MeOH, 2 - Ekstrakt semena sorte Polka dobijen čvrsto-tečnom ekstrakcijom kiselog hidrolizata pomoću MeOH, 3 - Ekstrakt semena sorte Miker dobijen čvrsto-tečnom ekstrakcijom kiselog hidrolizata pomoću MeOH, 4 - Ekstrakt semena sorte Vilamet dobijen UAE pri optimalnim uslovima, 5 - Ekstrakt semena sorte Polka dobijen UAE pri optimalnim uslovima, 6 - Ekstrakt semena sorte Miker dobijen UAE pri optimalnim uslovima, 7 - Ekstrakt semena sorte Vilamet dobijen ASE, 8 - Ekstrakt semena sorte Vilamet dobijen MAE, 9 - Ekstrakt semena sorte Vilamet dobijen čvrsto-tečnom ekstrakcijom, 10 - Ekstrakt semena sorte Vilamet dobijen UAE pri srednjim uslovima

Tabela 21b. Detektovani flavonoidi u ispitivanim ekstraktima primenom LC-MS/MS

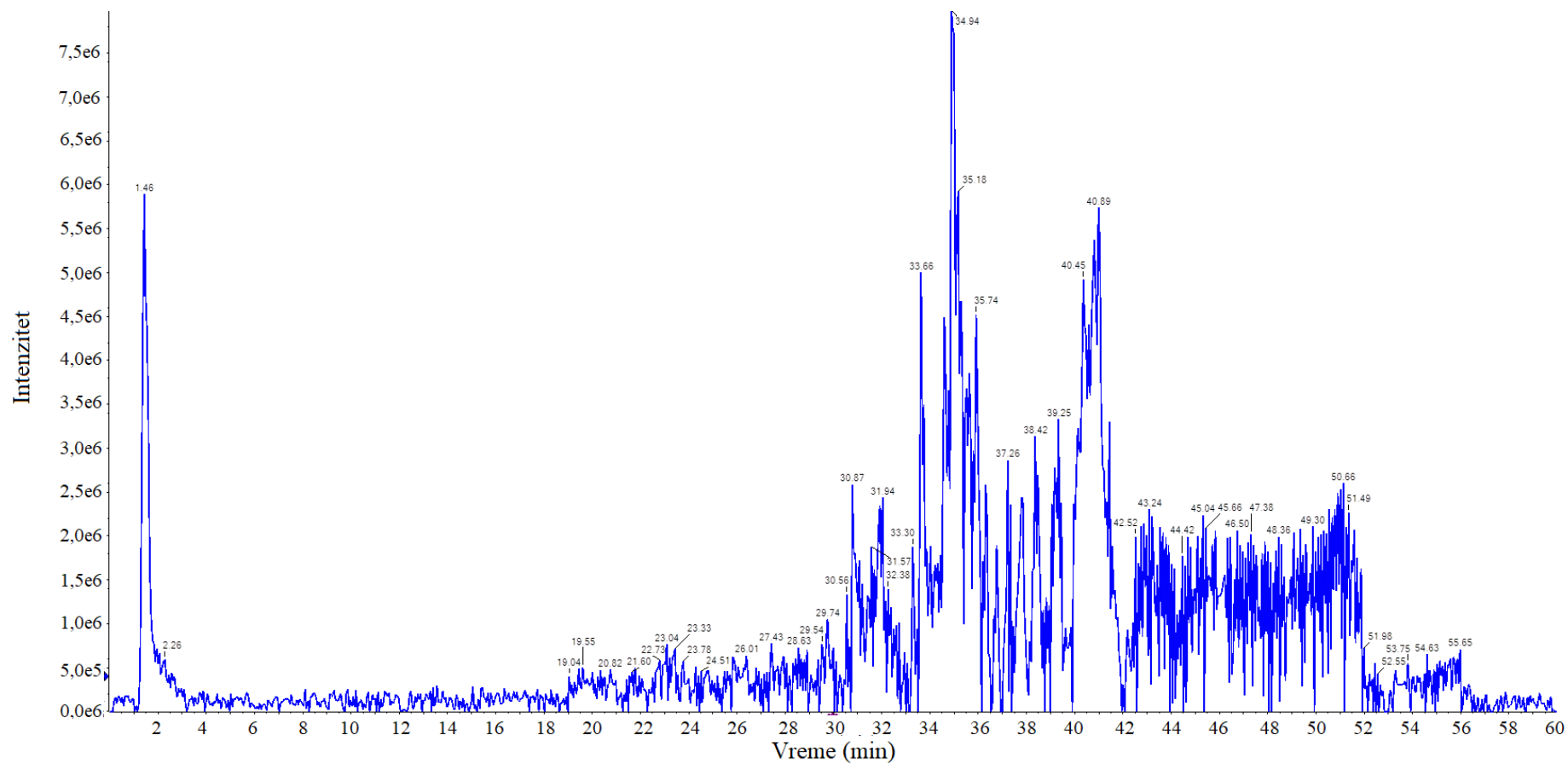
Jedinjenje	Retenciono			Uzorak									
	vreme (min)	Prekursor jon (m/z)	Produkt jon (m/z)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Epikatehin	10,32	289,5685	245,0842	d	d	d	nd	d	d	d	d	d	d
Fizetin	18,65	213,4379	139,0087	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
Katehin	25,30	139,0792	123,1212	d	nd	nd	d	d	d	nd	d	d	d
Katehin dimer	26,32	289,0438	125,6281	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
Kemferol	16,32	487,2653	287,1222	d	d	d	nd	d	d	d	nd	d	nd
Kemferol-3-glukurozid-7,4-diramnozid	15,56	588,8521	215,5251	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
Kemferol-glukuronid	14,32	593,4080	285,3694	d	d	nd	d	d	d	d	d	d	nd
Kemferol-malonil-heksozid	16,56	515,0803	274,0121	d	d	d	nd	d	d	d	d	d	d
Kemferol-ramnozid-diheksosid	17,01	515,1379	325,3231	d	nd	nd	d	d	d	nd	nd	nd	nd
Kemferol-diheksosid	16,44	518,1514	287,2852	d	d	nd	d	d	d	d	d	d	d
Kemferol-ramnozid	15,32	575,2322	252,0191	d	d	d	nd	d	d	d	nd	d	nd
Kvercetin	36,39	301,6185	151,8237	d	d	d	d	d	d	d	d	d	nd
Kvercetin-arabinozid	36,85	355,3487	147,3417	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
Kvercetin-diheksosid	35,63	345,1283	175,1474	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
Kvercetin-3-(6-o-galoilgalaktozid)	34,52	365,1364	185,3449	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
Kvercetin-glukuronozid	33,32	385,0433	201,0062	d	d	d	d	d	d	d	nd	d	d
Kvercetin-heksozid	36,35	355,2776	198,1954	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
Kvercetin-malonil-heksozid	34,52	365,0222	187,7822	nd	d	d	nd	d	d	d	d	d	d
Miricetin	19,65	151,2469	108,3229	d	d	d	d	d	d	d	nd	d	nd
Naringenin	21,32	235,4685	124,5924	d	d	nd	d	d	d	d	d	d	d
Ramnetil-glukuronozid	45,12	420,1541	179,6961	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
Ramnetil-malonil-heksozid	44,36	485,0097	198,0891	nd	nd	d	d	d	d	d	d	d	nd

Legenda ista kao u tabeli 21a.

Tabela 21c. Detektovani antocijani i antocijanidini u ispitivanim ekstraktima primenom LC-MS/MS

Jedinjenje	Retenciono			Uzorak									
	vreme (min)	Prekursor jon (m/z)	Produkt jon (m/z)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cijanidin-heksozil-pentozid	32,52	302,5345	125,5156	d	d	d	d	d	nd	d	d	d	d
Cijanidin-pentozid	33,61	315,6191	136,1571	d	nd	nd	nd	nd	nd	d	d	d	nd
Cijanidin-ramnetin-diheksozid	36,32	356,1842	109,1251	d	nd	d	d	d	d	d	nd	d	nd
Delfinidin-heksozid	19,65	303,1252	229,9954	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
Delfinidin-pentozid	24,32	300,2325	157,2322	nd	nd	d	nd	d	d	d	d	d	d
Delfinidin-ramnetin-heksozid	26,52	356,5632	241,2312	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
Hrizantemin	50,25	449,1253	128,6344	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
Malvidin-acetilheksozid	24,25	271,1625	105,1242	d	nd	nd	d	d	d	d	d	d	d
Malvidin-arabinozid	24,53	296,6325	102,5206	d	d	d	d	d	nd	d	d	nd	nd
Malvidin	25,36	328,6618	152,5254	d	d	nd	d	d	d	d	d	d	d
Pelargonidin	23,25	356,0011	241,2268	nd	d	d	d	d	d	d	nd	d	nd
Petunidin	46,33	386,2563	165,1452	d	nd	nd	d	d	d	nd	nd	d	d
Petunidin-pentozid	45,55	402,0451	125,5948	d	d	d	d	d	d	d	nd	d	nd

Legenda ista kao u tabeli 21a.

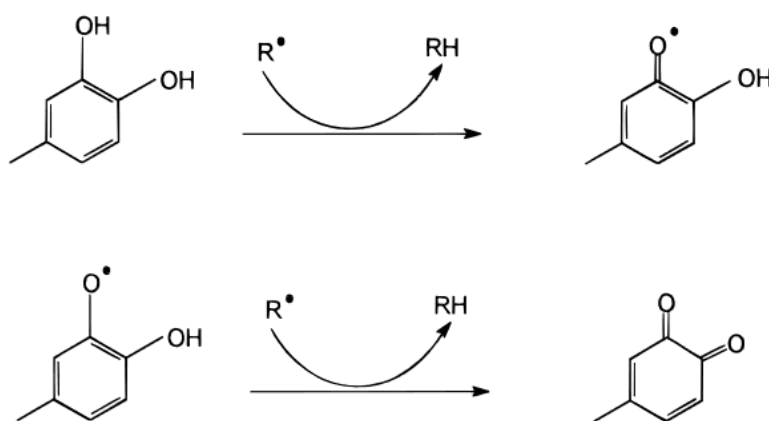


Slika 32. LC-MS/MS TIC hromatogram ekstrakta obezmašćenog semena maline sorte Vilamet dobijenog UAE pri optimalnim uslovima (58 °C, 15 min, 17,8 cm³/g i 80 % EtOH)

Sa hromatograma prikazanog na slici 32 se vidi da se pikovi mnogih detektovanih jedinjenja ne ističu previše u odnosu na šum bazne linije, te se može zaključiti da su prisutni samo u tragovima. To može značiti da biološka aktivnost ekstrakta potiče od polifenola sa retencionim vremenima između 30,87 do 51,49 min.

4.2.5. Antioksidativna aktivnost ekstrakta

Visok unos voća, povrća i integralnih žitarica, bogatih polifenolima, direktno je povezan sa smanjenjem rizika od mnogih hroničnih bolesti, uključujući rak, kardiovaskularne bolesti, hroničnu upalu i mnoge degenerativne bolesti (Tsao, 2010). Istraživanja koja su sprovedli Wang i dr. (1996) su pokazala da su mnoge od ovih bolesti povezane sa oksidativnim stresom. Fitohemikalije, posebno polifenoli, prevashodno doprinose ukupnim antioksidativnim aktivnostima voća. Utvrđeno je da su polifenoli snažni antioksidansi koji mogu neutralisati slobodne radikale donirajući elektron ili atom vodonika. Visoko konjugovani sistem i određeni obrasci hidroksilacije, poput 3-hidroksi grupe u flavonolima, smatraju se važnim u antioksidativnim aktivnostima. Antioksidativna aktivnost polifenola se ogleda u tome što sprečavaju stvaranje slobodnih radikala inhibirajući stvaranje ili intenzivirajući deaktiviranje prekursora slobodnih radikala, što doprinosi smanjenju brzine oksidacije. Najčešće deluju kao hvatači slobodnih radikala lančanih reakcija peroksidacije lipida (prekidači lanca). Prekidači lanca doniraju elektron slobodnom radikalu, neutrališući radikale i sami postajući stabilni (manje reaktivni) radikali, zaustavljajući tako lančane reakcije (Slika 33) (Pietta, 2000; Tsao, 2010).



Slika 33. Reakcija antioksidativne aktivnosti polifenola na slobodne radikale (Pietta, 2000)

U svrhu procene ukupne antioksidativne aktivnosti, razvijeno je nekoliko *in vitro* antioksidativnih testova. Međutim, mora se biti oprezan kada se antioksidativna aktivnosti procenjuje na *in vitro* modelima. Sa stanovišta hemije, molekuli polifenola, nakon što doniraju atom vodonika ili elektron, sami postaju slobodni radikali i ako su prisutni u dovoljnoj količini mogu potencijalno da izazovu prooksidativne aktivnosti. Međutim, s obzirom da su ovi nastali radikali mnogo manje reaktivni, pitanje je da li će se takva prooksidativna aktivnost javiti u *in vivo* sistemima i naneti štetu čoveku, što upućuje na potrebu za daljim istraživanjima (Halliwell, 2008).

U tabeli 22 i na slici 34 prikazani su rezultati *in vitro* antioksidativnih testova dobijenih na uzorcima koji su ekstrahovani pri optimalnim uslovima UAE iz semena sve tri ispitivane sorte maline.

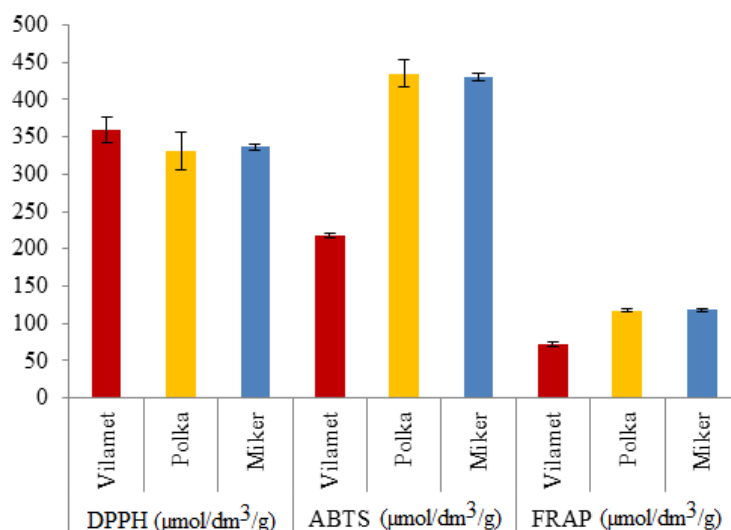
Tabela 22. Rezultati *in vitro* antioksidativnih testova polifenolnih ekstrakata tri sorte semena maline dobijeni primenom UAE pri optimalnim uslovima

Sorta/Test	DPPH ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3/\text{g}$)	ABTS ⁺ ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3/\text{g}$)	FRAP ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3/\text{g}$)
Vilamet	$359,8 \pm 17,6^b$	$217,4 \pm 3,0^a$	$71,9 \pm 3,0^a$
Polka	$330,8 \pm 25,9^a$	$434,9 \pm 18,7^b$	$117,1 \pm 1,9^b$
Miker	$336,4 \pm 3,7^a$	$430,3 \pm 4,6^b$	$118,3 \pm 2,0^b$

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD, $n = 3$. Različita slova u istoj koloni ukazuju na značajne razlike između sorti prema Tukey-ovom HSD testu ($p < 0,05$).

Na osnovu rezultata DPPH testa, se može zaključiti da najviše antioksidativno dejstvo ima polifenolni ekstrakt iz semena sorte Vilamet, dok su dejstva ekstrakata iz semena druge dve ispitivane sorte značajno manja. S druge strane, upoređujući rezultate druga dva testa, ekstrakti iz semena maline sorte Vilamet imaju značajno nižu antioksidativnu aktivnost u odnosu na druge dve ispitivane sorte. Prema istraživanjima Del Bo i dr. (2015) koji su ispitali ulogu polifenolnih jedinjenja kao antioksidanasa koji štite od najčešćih bolesti povezanih sa oksidativnim stresom, poput kardiovaskularnih bolesti, upala, raka i neurodegenerativnih bolesti, pokazala su da bobičasto voće i njihovi proizvodi igraju korisnu ulogu kao antioksidansi kod ljudi i u *in vitro* i *in vivo* modelima koristeći ih kao dodatak ishrani. S druge strane, rezultati nekih istraživanja su pokazali da fenolna jedinjenja imaju i prooksidativnu aktivnost. Međutim, nijedan neželjeni ili toksični efekat nije povezan sa konzumacijom ovih ekstrakata, što može sugerisati da su fenolni antioksidansi koji se nalaze u bobicama prirodni pokloni za ljudsko zdravlje (Kulling i Rawel, 2008). U odnosu na rezultate DPPH testa kojim je testirano antioksidativno delovanje ulja (Tabela 13),

polifenolni ekstrakti imaju mnogo više antioksidativno dejstvo, što se može objasniti višom antioksidativnom aktivnošću polifenola u poređenju sa tokoferolima, kao i koncentracijom istih u ekstraktima ulja. Takođe, poređenjem rezultata sa rezultatima istraživanja koje su sproveli Koca i Karadeniz (2009), ekstrakti dobijeni iz kupine i borovnice imaju sličnu ili nižu antioksidativnu aktivnost od ekstrakata semena maline dobijenu FRAP testom (35,05–70,41 $\mu\text{mol/g}$ za kupine i 7,41–57,92 $\mu\text{mol/g}$ za borovnice). Jedan od dokaza antioksidativnog dejstva polifenola iz različitog voća jeste i ranije istraživanje sprovedeno od strane Mertens-Talcott i dr. (2006), koji su ispitivali antioksidativno dejstvo polifenola poreklom iz nara i koje je pokazalo značajnu antioksidativnu aktivnost polifenola iz ovog izvora.



Slika 34. Antioksidativna aktivnost ekstrakata semena tri sorte maline dobijene primenom UAE pri optimalnim uslovima (58 °C, 15 min, 17,8 mL/g i 80% EtOH)

Takođe, veoma je važno napomenuti da se potencijalno antioksidativno dejstvo biljnih ekstrakata koji sadrže polifenolna jedinjenja *in vivo*, ne može sa sigurnošću povezati sa rezultatima *in vitro* eksperimenata, jer oni ne uzimaju u obzir apsorpciju, metaboličke transformacije i interakcije za koje je poznato da utiču na biološka svojstva polifenolnih jedinjenja (Lotito i Frei, 2004).

4.2.6. Antimikrobna aktivnost ekstrakta

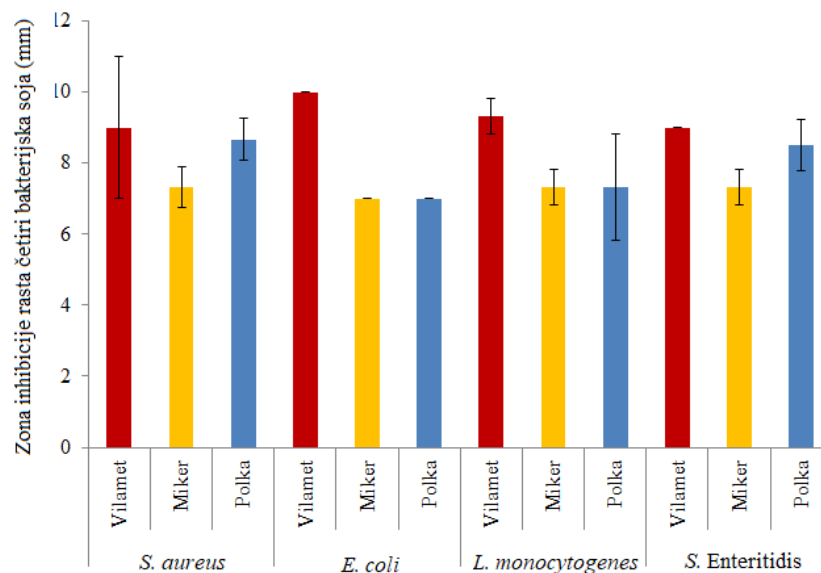
Fenolne kiseline, u koje spada i EA, su slabe kiseline koje mogu da disosuju na ćelijskoj membrani pri biološkoj pH-vrednosti od 6,8–7,2. Ova disocijacija fenola se predlaže

kao važan mehanizam pomoću kojeg EA ispoljava svoju antimikrobnu aktivnost (Vattem i Shetty, 2005). EA svoju antimikrobnu aktivnost može ispoljiti inhibicijom rasta mikroorganizama, heliranjem metalnih jona koji su kritični za rast i metabolizam mikroba ili inhibicijom kritičnih funkcija bakterijske membrane, kao što su jonski kanali i proteolitička aktivnost (Vattem i Shetty, 2005). Stoga je potencijalno antimikrobno delovanje polifenolnog ekstrakta bio važan segment istraživanja. Ekstrakti EA dobijeni UAE pri optimalnim uslovima, iz ostatka semena sve tri ispitivane sorte su podvrgnuti testovima kako bi se utvrdila potencijalna antimikrobna aktivnost. Antimikrobno dejstvo je određeno na četiri bakterijska soja i rezultati su prikazani u tabeli 23 i na slici 35.

Tabela 23. Antimikrobno delovanje polifenolnih ekstrakata ekstrahovanog pri optimalnim uslovima UAE

Sorta	Zona inhibicije rasta četiri bakterijska soja (mm)			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. Enteritidis</i>
Vilamet	9,00±2,00 ^a	10,00±0,00 ^b	9,33±0,578 ^b	9,00±0,00 ^a
Miker	7,33±0,58 ^a	7,00±0,00 ^a	7,33±0,58 ^a	7,33±0,58 ^a
Polka	8,67±0,58 ^a	7,00±0,00 ^a	7,33±1,52 ^a	8,50±0,71 ^a

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD, $n = 3$. Različita slova u istoj koloni ukazuju na značajne razlike između sorti prema Tukey-ovom HSD testu ($p < 0,05$).



Slika 35. Antimikrobno delovanje polifenolnih ekstrakata dobijenih UAE pri optimalnim uslovima (58 °C, 15 min, 17,8 cm³/g i 80 % EtOH)

Polifenolni ekstrakti iz semena sve tri ispitivane sorte maline, dobijeni UAE pri optimalnim uslovima su pokazali antimikrobno delovanje na svim ispitivanim bakterijskim sojevima. Međutim, rezultati koji su dobijeni ne impliciraju na izrazito veliku antimikrobnu aktivnost, s obzirom da su sve zone inhibicije bile manje od 12 mm. Naime u slučaju da je zona inhibicije manja od 12 mm, smatra se da je bakterijska kultura rezistentna na supstancu kojom je tretirana (Fuchs, 1989). Istraživanje koje su sproveli Ghudhaib i dr. (2010) pokazuju da je u zavisnosti od koncentracije EA, kao i testiranog bakterijskog soja, zona inhibicije od 8 do 20 mm.

4.2.7. Antiproliferativno dejstvo polifenolnog ekstrakta

Možda jedna od najvažnijih osobina EA jeste njena antiproliferativna aktivnost. Istraživanja Seeram i dr. (2005) na odabranim ćelijskim linijama su pokazala da EA ispoljava antikancerogena svojstva, dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa i apoptoze tumorskih ćelija i sprečava nastanak i rast tumora kod životinja. Sprečavanje nastanka različitih tipova karcinoma delovanjem EA odvija se putem nekoliko mehanizama. Dokazano je da EA sprečava prevođenje policikličnih aromatičnih ugljovodonika, nitrozo jedinjenja i aflatoksina B1, u oblike koji mogu dovesti do razvoja karcinoma. Takođe, EA dovodi do tzv. detoksikacije kancerogena stimulisanjem aktivnosti specifičnih enzima, ili vezivanjem za reaktivne metaboličke oblike kancerogena i njihovim prevođenjem u komplekse koji ne mogu da reaguju sa ćelijskom DNK. Takođe, EA svoju antikancerogenu aktivnost ispoljava tako što se vezuje za i pokriva delove DNK koji mogu da reaguju sa kancerogenima ili njihovim metabolitima (Maas i dr., 1991).

Rezultati *in vitro* testova na antiproliferativnu aktivnost ekstrakata i standarda EA su prikazani u tabeli 24. Antiproliferativno dejstvo je testirano na tri humane ćelijske linije i to: karcinoma grlića materice (HeLa), adenokarcinoma dojke (MCF7) i fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5). Testirani su polifenolni ekstrakti dobijeni pomoću UAE pri optimalnim uslovima, za sve tri sorte, kao i ekstrakti ukupne EA dobijene čvrsto-tečnom ekstrakcijom kiselog hidrolizata pomoću MeOH, takođe za sve tri ispitivane sorte. S obzirom da je prinos EA bio značajno veći nakon hidrolize (ukupni sadržaj EA), cilj je bio da se uporedi biološko dejstvo EA dobijene obema metodama.

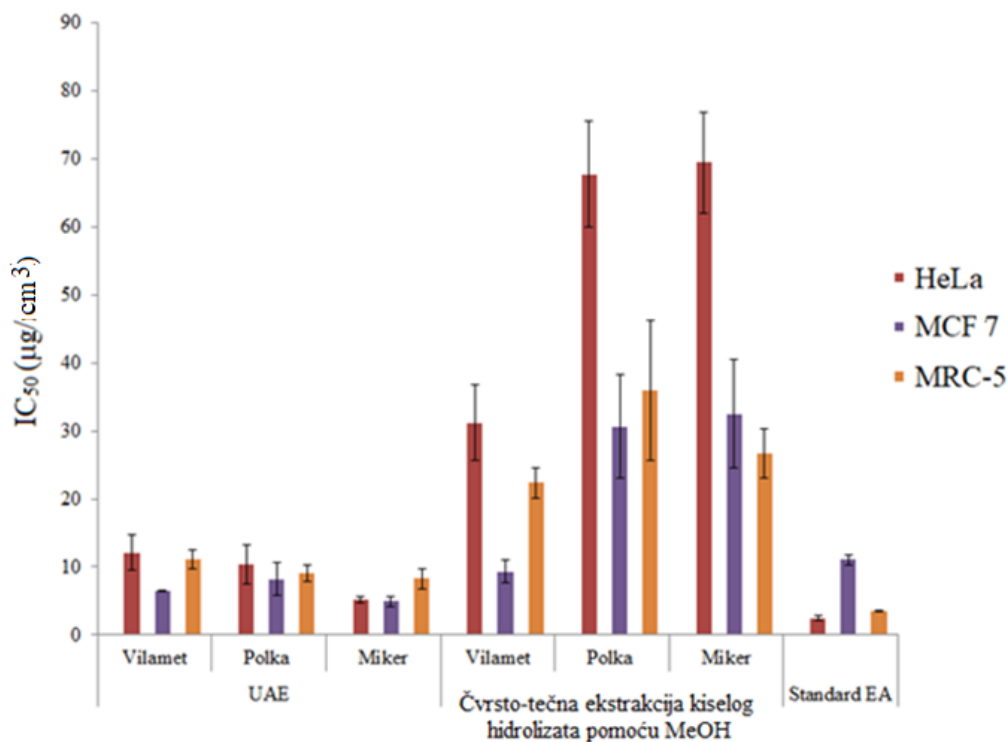
Tabela 24. Antiproliferativno dejstvo polifenolnih ekstrakata različitih sorti maline dobijenih UAE tehnikom pri optimalnim uslovima i čvrsto-tečno ekstrakcijom kiselog hidrolizata pomoću MeOH

Metoda ekstrakcije	Sorta	IC ₅₀ (µg/cm ³)		
		HeLa	MCF7	MRC-5
UAE	Vilamet	12,12±2,67 ^{b2}	6,47±0,07 ^{ab1,2}	11,11±1,42 ^{b1}
	Polka	10,29±2,87 ^{b2}	8,19±2,42 ^{b2}	8,98±1,20 ^{b1}
	Miker	5,19±0,49 ^{a1}	4,92±0,70 ^{a1}	8,24±1,41 ^{b1}
Čvrsto-tečna ekstrakcija kiselog hidrolizata pomoću MeOH	Vilamet	31,22±5,58 ^{c1}	9,32±1,65 ^{b1}	22,33±2,26 ^{c1}
	Polka	67,69±7,79 ^{d2}	30,66±7,59 ^{c2}	35,93±10,24 ^{d2}
	Miker	69,43±7,48 ^{d2}	32,49±7,97 ^{c2}	26,72±3,63 ^{c1}
Standard	Elaginska kiselina	2,47±0,40 ^a	11,02±0,75 ^b	3,43±0,08 ^a

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD, $n = 4$. Različiti brojevi u istoj koloni ukazuju na značajne razlike između sorti (tehnika ekstrakcije = konst), različita slova u istoj koloni ukazuju na značajne razlike između primenjene tehnike ekstrakcije prema Tukey-ovom HSD testu ($p < 0,05$).

Antiproliferativno dejstvo ekstrakata zavisilo je od sorte, metode ekstrakcije i ćelijske linije. Iz tabele 24 i sa slike 36 se može videti da su značajno veće antiproliferativno dejstvo pokazali polifenolni ekstrakti dobijeni upotrebom UAE tehnike u poređenju sa ekstraktima dobijenim čvrsto-tečnom ekstrakcijom kiselog hidrolizata pomoću MeOH, na svim ispitivanim ćelijskim linijama. Takođe, iz rezultata se vidi da je ekstrakt sorte Miker, dobijen tehnikom UAE imao najvišu aktivnost na sve tri ćelijske linije u poređenju sa ostalim sortama. Najniže vrednosti IC₅₀, odnosno najizraženiji antiproliferativni efekti dobijeni su na ćelijskoj liniji MCF7 (Tabela 24). Aktivnost svih ekstrakata je upoređena sa aktivnošću standardnog rastvora EA. Standard EA je pokazao izuzetnu antiproliferativnu aktivnost. Na MCF7 ćelijskoj liniji, koja se pokazala kao najosetljivija na delovanje EA, ispitani ekstrakti su pokazali veću aktivnost u poređenju sa standardnim rastvorom EA, najverovatnije usled prisustva drugih polifenolnih jedinjenja i njihovog sinergističkog delovanja sa EA.

Poređenjem antiproliferativne aktivnosti polifenolnih ekstrakata sa standardnim rastvorima komercijalnih hemoterapeutika sa dokaznim jakim antiproliferativnim dejstvom kao što su Doksorubicin[®] (0,25–0,40) i Gemcitabin[®] (0,04–0,13), vidi se da ovi hemoterapeutici imaju značajno višu antiproliferativnu aktivnost na ovim ćelijskim linijama (Četojević-Simin i dr., 2015).



Slika 36. IC₅₀ vrednosti a) polifenolnih ekstrakata dobijenih UAE ekstrakcijom i čvrsto-tečnom ekstrakcijom kiselog hidrolizata pomoću MeOH i b) standarda EA na Hela, MCF7 i MRC-5 ćelijskim linijama

S obzirom da je sadržaj EA u ekstraktima dobijenim čvrsto-tečnom ekstrakcijom kiselog hidrolizata pomoću MeOH značajno veći nego u ekstraktima dobijenim UAE tehnikom, bilo je očekivano da ovi ekstrakti pokažu znatno jaču antiproliferativnu aktivnost. Međutim, prema prikazanim rezultatima to nije bio slučaj. Razlog tome može biti mogućnost da se usled hidrolize, iz ekstrakta gube pojedina jedinjenja npr. galna kiselina (Tabela 21a), s obzirom na njihovu nestabilnost na visokim temperaturama (Volf i dr., 2014). Ovakvi rezultati dobijaju na značaju i iz razloga što ekstrakti dobijeni čvrsto-tečnom ekstrakcijom kiselog hidrolizata MeOH, zbog sadržaja metanola i hlorovodonične kiseline, ne mogu da se koriste u ljudskoj upotrebi, za razliku od ekstrakata dobijenih UAE tehnikom. Zbog svega navedenog polifenolni ekstrakt dobijen iz sorte Miker je izdvojen kao odličan kandidat za upotrebu u ishrani, kao funkcionalni sastojak sa snažnim i selektivnim antiproliferativnim delovanjem.

5. Zaključak

Glavni cilj ovog istraživanja bio je valorizacija semena tri sorte maline koje je kao nusproizvod, odnosno otpad, zaostalo nakon industrijske proizvodnje voćne pulpe, a u cilju dobijanja visokokvalitetnog ulja, sa optimalnim odnosom $\omega-6/\omega-3$ masnih kiselina i sadržajem vitamina E, kao i fenolnog ekstrakta koji sadrži visoke koncentracije EA. Takođe, cilj je bio i utvrditi potencijalno biološko dejstvo ulja i fenolnog ekstrakta. Ekstrakcija ulja je izvršena primenom konvencionalnih tehnika (ekstrakcija dihlormetanom i metanolom, etanolom, hloroformom, ekstrakcija po Soxhlet-u *n*-heksanom i hladno ceđenje) i savremene tehnike ekstrakcije (ekstrakcija superkričnim ugljen-dioksidom). Nakon izvedenih ekstrakcija se može zaključiti da je najveći prinos bio dobijen nakon savremene tehnike ekstrakcije, te je SFE optimizovana u cilju dobijanja najvećeg prinosa, $\omega-3$ masnih kiselina i tokoferola. Za određivanje optimalnih uslova ekstrakcije korišćen je Box-Behnken eksperimentalni dizajn sa metodom odzivne površine. Utvrđeno je da su optimalni uslovi ekstrakcije pritisak od 340 bar, temperatura od 51 °C i protok CO₂ od 0,4 kg/h. Dobijeni rezultati prinosa, sadržaja $\omega-3$ masnih kiselina i tokoferola u ekstraktu dobijenim pri ovim uslovima su pokazali da je proces ekstrakcije dobro opisan i optimalni parametri odgovarajući, jer je dobro poklapanje predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti određenih parametara. Nije bilo značajne razlike u pogledu prinosa ulja iz semena sve tri sorte ekstrahovanih pri ovim uslovima.

Takođe, ekstrakcija polifenola iz obezmašćenog semena maline iz sve tri sorte je izvedena upotrebom četiri ekstrakcione tehnike i to čvrsto-tečne ekstrakcije (pomoću EtOH i MeOH nakon kisele hidrolize), koja se smatra konvencionalnom, kao i ultrazvučne, mikrotalasne i ekstrakcije rastvaračem pod pritiskom, koje se smatraju alternativnim. Na osnovu postignutih, zaključeno je da je najveći prinos polifenola i EA dobijen primenom UAE, te je ista i optimizovana u cilju dobijanja najvećeg sadržaja EA i najvećeg RC. Kao i u slučaju ulja, za određivanje optimalnih parametara ekstrakcije korišćen je Box-Behnken eksperimentalni dizajn sa metodom odzivne površine. Optimalni uslovi UAE su bili temperatura od 58 °C, trajanje ekstrakcije od 15 min, odnos rastvarač/čvrsta supstanca od 17,8 cm³/g i upotreba 80 % etanola, pri čemu su dobijene koncentracije EA 43,05 mg/100 g uzorka, kao i RC 1,367 g/100 g uzorka. Eksperimentima koji su izvedeni nakon optimizacije, zaključeno je da je dobro poklapanje eksperimentalno dobijenih i predviđenih rezultata, te se može zaključiti da su optimalni parametri odgovarajući i proces ekstrakcije dobro opisan.

Kada se uzmu u obzir semena sve tri sorte maline, nije bilo značajnih razlika u pogledu sadržaja EA i RC.

Ekstrakti ulja dobijeni pri optimalnim uslovima UAE, podvrgnuti su eksperimentima za određivanje sadržaja masnih kiselina i tokoferola, kao i *in vitro* antioksidativnim i antimikrobnim testovima. Ono što se može zaključiti iz podataka o masnokiselinskom sastavu, je da je ulje semena maline izuzetno bogato polinezasićenim masnim kiselinama, čiji je odnos sa zasićenim masnim kiselinama bio $26,46 \pm 0,33$, te da ovakav odnos $\omega-6/\omega-3$ masnih kiselina sadržanih u ulju znatno utiče na kvalitet ulja koje se može upotrebljavati kao dodatak ljudskoj ishrani i može se porediti sa nekim drugim kvalitetnim uljima. Takođe, sadržaj tokoferola (α -TOC $49,65 \pm 3,35$, γ -TOC $110,42 \pm 13,64$, i δ -TOC $6,26 \pm 0,54$ mg/100 g) značajno doprinosi kvalitetu ovako dobijenog ulja, što dobija na značaju gledajući rezultate *in vitro* antioksidativnog dejstva ulja na slobodne radikale ($9,12 \pm 1,21$ $\mu\text{mol/g}$). Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da ulje semena maline ima značajnu antioksidativnu aktivnost, čiji su tokoferoli nosioci. S druge strane, korišćenom metodologijom, nije utvrđena značajna antimikrobna aktivnost ulja.

Fenolni ekstrakti obezmašćenog semena dobijeni pri optimalnim uslovima UAE su pokazali visok sadržaj EA (43,05 mg/100 g uzorka) i ne značajno visok RC (1,367 g/100 g uzorka). S obzirom da se EA u semenu nalazi najčešće u obliku hidrolizujućih elagitanina, bilo je očekivano da se najveći sadržaj EA dobije nakon hidrolize ($831,42 \pm 88,18$ mg/100 g uzorka). Međutim upotreba metanola i hlorovodonične kiseline dovodi do dobijanja ekstrakata koji se ne smeju koristiti u ljudskoj ishrani. Takođe, eksperimenti su doveli do zaključka da se u obezmašćenom semenu nalazi velik broj flavonola, flavona, flavan-3-ola i fenolnih kiselina. Ovakav sastav ekstrakta upućuje na značajne biološke aktivnosti, što se *in vitro* antioksidativnim, antimikrobnim i antiproliferativnim testovima i pokazalo. Rezultatima dobijenim testovima antioksidativne aktivnosti potvrđena je visoka antiradikalska aktivnost. Takođe je utvrđena i značajna antimikrobna aktivnost na svim ispitanim bakterijskim kulturama. Što se tiče antiproliferativnih aktivnosti, eksperimenti su pokazali da polifenolni ekstrakti dobijeni pomoću UAE tehnike, pri optimalnim uslovima pokazuju značajnu aktivnost prema svim ispitivanim ćelijskim linijama, dok hidrolizovani ekstrakti antiproliferativnu aktivnost ispoljavaju u manjoj meri.

Uzimajući u obzir rezultate istraživanja, može se zaključiti da se savremene ekstrakcione tehnike za ekstrakciju kako ulja, tako i polifenola, mogu uspešno koristiti za

dobijanje visokokvalitetnih ekstrakata koji se mogu upotrebljavati kao dodatak ishrani i suplementima.

6. Literatura

- Abu-Samra, A., Morris, J. S., Koirtyohann, S. R. (1975). Wet ashing of some biological samples in a microwave oven. *Analytical Chemistry*, 47(8), 1475-1477.
- Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragan, L. A., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N. (2008). Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(2), 189-199. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1276-2>
- Alam, M. N., Bristi, N. J., Rafiquzzaman, M. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Alfei, S., Turrini, F., Catena, S., Zunin, P., Grilli, M., Pittaluga, A. M., Boggia, R. (2019). Ellagic acid a multi-target bioactive compound for drug discovery in CNS? A narrative review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 183, e111724. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111724>
- Anantharaju, P. G., Gowda, P. C., Vimalambike, M. G., Madhunapantula, S. V. (2016). An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutrition Journal*, 15(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0217-2>
- AOAC (1995). AOAC Official Method 991.43 Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fibre in Foods. *Cereal Foods*.
- AOAC (2000). AOAC Official Method 945.16/2000 Oil in Cereal.
- AOAC (2005). AOAC (2005) Ash of Flour (Direct Method), Method 923.03. In: Official Methods of Analysis, 18th Edition, AOAC International Publisher, Gaithersburg.
- Aron, P. M., Kennedy, J. A. (2008). Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(1), 79-104. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700137>
- Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O. E., Pilosof, A. M. R. (2012).

- Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 463-472. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.018>
- Ashokkumar, M. (2015). Applications of ultrasound in food and bioprocessing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 25(1), 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.08.012>
- Astrup, A., Dyerberg, J., Elwood, P., Hermansen, K., Hu, F. B., Jakobsen, M. U., Kok, F. J., Krauss, R. M., Lecerf, J. M., LeGrand, P., Nestel, P., Risérus, U., Sanders, T., Sinclair, A., Stender, S., Tholstrup, T., Willett, W. C. (2011). The role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease: Where does the evidence stand in 2010? *American Journal of Clinical Nutrition*, 93(4), 684-688. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.004622>
- Ayim, I., Ma, H., Alenyorege, E. A., Ali, Z., Donkor, P. O. (2018). Influence of ultrasound pretreatment on enzymolysis kinetics and thermodynamics of sodium hydroxide extracted proteins from tea residue. *Journal of Food Science and Technology*, 55(3), 1037-1046. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-3017-6>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Azzi, A. (2007). Molecular mechanism of α -tocopherol action. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1), 16-21. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.013>
- Barbehenn, R. V., Jones, C. P., Hagerman, A. E., Karonen, M., Salminen, J. P. (2006). Ellagitannins have greater oxidative activities than condensed tannins and galloyl glucoses at high pH: Potential impact on caterpillars. *Journal of Chemical Ecology*, 32(10), 2253-2267. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9143-7>
- Barch, D. H., Rundhaugen, L. M., Stoner, G. D., Pillay, N. S., Rosche, W. A. (1996). Structure - Function relationships of the dietary anticarcinogen ellagic acid. *Carcinogenesis*, 17(2), 265-269. <https://doi.org/10.1093/carcin/17.2.265>
- Beerman, C., Jelinek, J., Reinecker, T., Hauenschild, A., Boehm, G., Klor, H. U. (2003). Short term effects of dietary medium-chain fatty acids and n-3 long-chain

- polyunsaturated fatty acids on the fat metabolism of healthy volunteers. *Lipids in Health and Disease*, 2(10), 1-10.
- Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 1996(239), 70-76.
- Beretta, G., Rossoni, G., Santagati, N. A., Facino, R. M. (2009). Anti-ischemic activity and endothelium-dependent vasorelaxant effect of hydrolysable tannins from the leaves of *Rhus coriaria* (Sumac) in isolated rabbit heart and thoracic aorta. *Planta Medica*, 75(14), 1482-1488. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1185797>
- Bermúdez-Aguirre, D., Mobbs, T., Barbosa-Cánovas, G. V. (2011). Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing. Chapter 3 in Biological systems engineering department, Center for nonthermal processing of food, Washington State University, Pullman, WA 99164-6120, USA. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7472-3>
- Berquin, I. M., Edwards, I. J., Chen, Y. Q. (2008). Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. *Cancer Letters*, 269(2), 363-377. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.044>
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escalera, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- Blondeau, N., Lipsky, R. H., Bourourou, M., Duncan, M. W., Gorelick, P. B., Marini, A. M. (2015). Alpha-linolenic acid: An omega-3 fatty acid with neuroprotective properties - Ready for use in the stroke clinic? *BioMed Research International*, 2015, e519830. <https://doi.org/10.1155/2015/519830>
- Bobinaite, Ramun, Viškelis, P., Venskutonis, P. R. (2012). Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus spp.*) cultivars. *Food Chemistry*, 132(3), 1495-1501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.137>
- Bobinaite, Ramune, Viškelis, P., Venskutonis, P. R. (2015). Chemical composition of raspberry (*Rubus spp.*) cultivars. In *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00029-5>

- Bonilla, F., Mayen, M., Merida, J., Medina, M. (1999). Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chemistry*, 66(2), 209-215. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00046-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00046-1)
- Box, G. E. P., & Behnken, D. W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2(4), 455-475.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 28, 25-30.
- Brigelius-Flohé, R., & Traber, M. G. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*, 13(10), 1145-1155. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.10.1145>
- Brown, B. G., Crowley, J. (2005). Is there any hope for vitamin E? *Journal of the American Medical Association*, 293(11), 1387-1390. <https://doi.org/10.1001/jama.293.11.1387>
- Burg, P., Mašan, V., Rutkowski, K. (2017). Evaluation of the pressing process during oil extraction from grape seeds, *Slovak Journal of Food Sciences*, 11(1), 1-6.
- Burton, G. W., Ingold, K. U. (1981). Autoxidation of biological molecules. 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants *in vitro*. *Journal of the American Chemical Society*, 103(21), 6472-6477. <https://doi.org/10.1021/ja00411a035>
- Bushman, B. S., Phillips, B., Isbell, T., Ou, B., Crane, J. M., Knapp, S. J. (2004). Chemical composition of caneberry (*Rubus spp.*) seeds and oils and their antioxidant potential. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7982-7987. <https://doi.org/10.1021/jf049149a>
- Busto, R., Serna, J., Perianes-Cachero, A., Quintana-Portillo, R., García-Seisdedos, D., Canfrán-Duque, A., Paino, C. L., Lerma, M., Casado, M. E., Martín-Hidalgo, A., Arilla-Ferreiro, E., Lasunción, M. A., Pastor, Ó. (2018). Ellagic acid protects from myelin-associated sphingolipid loss in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1863(9), 958-967. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.05.009>
- Butinar, B., Bučar-Miklavčič, M., Mariani, C., Raspor, P. (2011). New vitamin E isomers (gamma-tocomonoenol and alpha-tocomonoenol) in seeds, roasted seeds and roasted

- seed oil from the Slovenian pumpkin variety “Slovenska golica.” *Food Chemistry*, 128(2), 505-512. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.072>
- Çakaloğlu, B., Özyurt, V. H., Ötleş, S. (2018). Cold press in oil extraction. A review. *Ukrainian Food Journal*, 7(4), 640-654. <https://doi.org/10.24263/2304-974x-2018-7-4-9>
- Cequier-Sánchez, E., Rodríguez, C., Ravelo, Á. G., Zárata, R. (2008). Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4297-4303. <https://doi.org/10.1021/jf073471e>
- Četojević-Simin, D., Svirčev, Z., Baltić, V. V. (2009). In vitro cytotoxicity of cyanobacteria from water ecosystems of Serbia. *Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 14(2), 289—294.
- Četojević-Simin, D., Velićanski, A., Cvetković, D., Markov, S., Četković, G., Tumbas Šaponjac, V., Vulić, J., Čanadanović-Brunet, J., Đilas, S. (2015). Bioactivity of Meeker and Willamette raspberry (*Rubus idaeus* L.) pomace extracts. *Food Chemistry*. 166 (2015) 407–413
- Chan, C. H., Yusoff, R., Ngoh, G. C., Kung, F. W. L. (2011). Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*, 1218(37), 6213-6225. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.040>
- Chapkin, R. S., Seo, J., McMurray, D. N., Lupton, J. R. (2008). Mechanisms by which docosahexaenoic acid and related fatty acids reduce colon cancer risk and inflammatory disorders of the intestine. *Chemistry and Physics of Lipids*, 153(1), 14-23. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2008.02.011>
- Chavarro, J. E., Stampfer, M. J., Li, H., Campos, H., Kurth, T., Ma, J. (2007). A prospective study of polyunsaturated fatty acid levels in blood and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 16(7), 1364-1370. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-1033>
- Chemat, F., Zill-E-Huma, Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>

- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Chen, L., Teng, H., Xie, Z., Cao, H., Cheang, W. S., Skalicka-Woniak, K., Georgiev, M. I., Xiao, J. (2018). Modifications of dietary flavonoids towards improved bioactivity: An update on structure-activity relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(4), 513-527. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1196334>
- Cho, H., Jung, H., Lee, H., Yi, H. C., Kwak, H. K., Hwang, K. T. (2015). Chemopreventive activity of ellagitannins and their derivatives from black raspberry seeds on HT-29 colon cancer cells. *Food and Function*, 6(5), 1675-1683. <https://doi.org/10.1039/c5fo00274e>
- Cooney, R. V., Franke, A. A., Harwood, P. J., Hatch-Pigott, V., Custer, L. J., Mordan, L. J. (1993). γ -Tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: Superiority to α -tocopherol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(5), 1771-1775. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.5.1771>
- Cunha, V. M. B., Silva, M. P., Sousa, S. H. B., Bezerra, P. N., Menezes, E. G. O., Silva, N. J. N., Banna, D. A. D. S., Araújo, M. E., Carvalho Junior, R. N. de. (2019). Bacaba-de-leque (*Oenocarpus distichus* Mart.) oil extraction using supercritical CO₂ and bioactive compounds determination in the residual pulp. *Journal of Supercritical Fluids*, 144(October 2018), 81-90. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.10.010>
- Daniel, E. M., Krupnick, A. S., Heur, Y. H., Blinzler, J. A., Nims, R. W., Stoner, G. D. (1989). Extraction, stability, and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2(4), 338-349. [https://doi.org/10.1016/0889-1575\(89\)90005-7](https://doi.org/10.1016/0889-1575(89)90005-7)
- De Lucas, A., Martinez de la Ossa, E., Rincón, J., Blanco, M. A., Gracia, I. (2002). Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves. *Journal of Supercritical Fluids*, 22(3), 221-228. [https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(01\)00132-2](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(01)00132-2)
- De Souza, R. J., Mente, A., Maroleanu, A., Cozma, A. I., Ha, V., Kishibe, T., Uleryk, E., Budyłowski, P., Schünemann, H., Beyene, J., Anand, S. S. (2015). Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease,

- and type 2 diabetes: Systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ*, 351, 1-16. <https://doi.org/10.1136/bmj.h3978>
- Del Bo, C., Martini, D., Porrini, M., Klimis-Zacas, D., Riso, P. (2015). Berries and oxidative stress markers: An overview of human intervention studies. *Food and Function*, 6(9), 2890-2917. <https://doi.org/10.1039/c5fo00657k>
- Dimić, E. B., Vujasinović, V. B., Radočaj, O. F., Pastor, O. P. (2012). Characteristics of blackberry and raspberry seeds and oils. *Acta Periodica Technologica*, 43, 1-9. <https://doi.org/10.2298/APT1243001D>
- Domínguez Díaz, L., Fernández-Ruiz, V., Cámara, M. (2020). The frontier between nutrition and pharma: The international regulatory framework of functional foods, food supplements and nutraceuticals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(10), 1738-1746. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1592107>
- Doyon, M., Labrecque, J. A. (2008). Functional foods: A conceptual definition. *British Food Journal*, 110(11), 1133-1149. <https://doi.org/10.1108/00070700810918036>
- Dron, A., Guyer, D. E., Gage, D. A., Lira, C. T. (1997). Yield and quality of onion flavor oil obtained by supercritical fluid extraction and other methods. *Journal of Food Process Engineering*, 20(2), 107-124. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.1997.tb00414.x>
- Dunford, N. T., & Zhang, M. (2003). Pressurized solvent extraction of wheat germ oil. *Food Research International*, 36(9-10), 905-909.
- El Gharras, H. (2009). Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12), 2512-2518. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x>
- Endres, S., Caterina, R., Schmidt, E. B., Kristensen, S. D. (1995). n-3 polyunsaturated fatty acids: update 1995. *European Journal of Clinical Investigation*, 25(9), 629-638. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1995.tb01978.x>
- Erdman, J. W., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J. T., Folts, J., Harnly, J., Hollman, P., Keen, C. L., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G., Burrowes, J. (2007). Flavonoids and heart health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC. *Journal of*

Nutrition, 137(3). <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.718s>

European Scientific Committee on Food, C. of the E. C. (1993). Reports of the Scientific Committee for Food: Nutrient and Energy Intakes for the European Community; Office for Official Publications of the European Communities: Luxembourg. In *Reports of the Scientific Committee for Food (Thirty-first series)*. European Commission, Luxembourg. (Vol. 31st).

Ewers, E. (1908). Determination of the starch content by a polarimetric method. *Z Öffentl Chem*, 14, 150-157.

FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#data> (pristupljeno 12.06.2019.).

Fuchs, P. C. (1989). In vitro antimicrobial activity and susceptibility testing of ofloxacin. Current status. *The American Journal of Medicine*, 87(6C), 10S—13S. <http://europepmc.org/abstract/MED/2690614>

Gambuś, H., Gambuś, F., Pastuszka, D., Wrona, P., Ziobro, R., Sabat, R., Mickowska, B., Nowotna, A., Sikora, M. (2009). Quality of gluten-free supplemented cakes and biscuits. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(SUPPL.4), 31-50. <https://doi.org/10.1080/09637480802375523>

Ganzler, K., Salgo, A., Valko, K. (1986). Microwave extraction - A novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography*, 1986(371), 299-306. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00048-X>

Ghudhaib, K. K., Hanna, E. R., Jawad, A. H. (2010). Effect of ellagic acid on some types of pathogenic bacteria. *Journal of Al-Nahrain University Science*, 13(2), 79-85. <https://doi.org/10.22401/jnus.13.2.09>

Giroto, F., Alibardi, L., Cossu, R. (2015). Food waste generation and industrial uses: A review. *Waste Management*, 45, 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.06.008>

Goodarznia, I., Eikani, M. H. (1998). Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils: Modeling and simulation. *Chemical Engineering Science*, 53(7), 1387-1395. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(97\)90445-0](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(97)90445-0)

Gouveia, L., Coutinho, C., Mendonca, E., Batista, A. P., Sousa, I., Bandarra, N., Raymundo, A. (2008). Functional biscuits with PUFA- ω 3 from *Isochrysis galbana*. *Journal of the*

Science of Food and Agriculture, 88, 891-896. <https://doi.org/10.1002/jsfa>

Goyens, P. L. L., Spilker, M. E., Zock, P. L., Katan, M. B., Mensink, R. P. (2006). Conversion of α -linolenic acid in humans is influenced by the absolute amounts of α -linolenic acid and linoleic acid in the diet and not by their ratio. *American Journal of Clinical Nutrition*, 84(1), 44-53. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.1.44>

Gutiérrez, L. F., Ratti, C., Belkacemi, K. (2008). Effects of drying method on the extraction yields and quality of oils from quebec sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) seeds and pulp. *Food Chemistry*, 106(3), 896-904. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.058>

Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(2), 107-112. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.01.028>

Hao, J., Han, W., Huang, S., Xue, B., Deng, X. (2002). Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L. *Separation and Purification Technology*, 28(3), 191-196. [https://doi.org/10.1016/S1383-5866\(02\)00043-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5866(02)00043-6)

Hegsted, D. M., Ausman, L. M., Johnson, J. A., Dallal, G. E. (1993). Dietary fat and serum experimental data. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(6), 875-883.

Herrero, M., Cifuentes, A., Ibañez, E. (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae - A review. *Food Chemistry*, 98(1), 136-148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.058>

HMSO (1994). Nutritional aspects of cardiovascular disease (report on health and social subjects No. 46).

Hu, F. B. (2003). Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: An overview. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3 SUPPL.), 544-551. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.3.544s>

International Organization for Standardization (ISO). ISO 6886:2016. (2016). Animal and vegetable fats and oils-Determination of oxidative stability (Accelerated Oxidation Test). *ISO: Geneva, Switzerland*

- Jain, S., Sharma, M.P. (2011). Measurement of the oxidation stability of biodiesel using modified Karl Fischer apparatus. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 899-905
- Jee Joo, K. (1978). Studies on chemical composition of raspberry (Free amino acids, non-volatile organic acids and sugar). *Journal of Nutrition and Health*, 11(3), 21-24.
- Johansson, A., Laakso, P., Kallio, H. (1997). Characterization of seed oils of wild, edible Finnish berries. *Zeitschrift Fur Lebensmitteluntersuchung Und -Forschung A*, 204(4), 300-307. <https://doi.org/10.1007/s002170050081>
- Joint WHO/FAO Expert Consultation (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *WHO Technical Report Series no. 916. Geneva: World Health Organization*. pp. 89-90.
- Judé, S., Roger, S., Martel, E., Besson, P., Richard, S., Bougnoux, P., Champeroux, P., Le Guennec, J. Y. (2006). Dietary long-chain omega-3 fatty acids of marine origin: A comparison of their protective effects on coronary heart disease and breast cancers. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 90(1-3), 299-325. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2005.05.006>
- Juranic, Z., Zizak, Z., Tasic, S., Petrovic, S., Nidzovic, S., Lepasovic, A., Stanojkovic, T. (2005). Antiproliferative action of water extracts of seeds or pulp of five different raspberry cultivars. *Food Chemistry*, 93(1), 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.041>
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3954-3962. <https://doi.org/10.1021/jf990146l>
- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L. Å. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31(7), 671-701. <https://doi.org/10.1007/BF02522884>
- Kaneto, H., Katakami, N., Matsuhisa, M., Matsuoka, T. A. (2010). Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*, e453892. <https://doi.org/10.1155/2010/453892>

- Kanmaz, E. Ö. (2014). Subcritical water extraction of phenolic compounds from flaxseed meal sticks using accelerated solvent extractor (ASE). *European Food Research and Technology*, 238(1), 85-91. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-2088-5>
- Kay, C. D., Kroon, P. A., Cassidy, A. (2009). The bioactivity of dietary anthocyanins is likely to be mediated by their degradation products. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, 92-101. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800461>
- Khuri, A. I., Mukhopadhyay, S. (2010). Response surface methodology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2(2), 128-149. <https://doi.org/10.1002/wics.73>
- Kim, I. H., Kim, C. J., You, J. M., Lee, K. W., Kim, C. T., Chung, S. H., Tae, B. S. (2002). Effect of roasting temperature and time on the chemical composition of rice germ oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(5), 413-418. <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0498-2>
- Kim, M. J., Sutton, K. L., Harris, G. K. (2015). Raspberries and related fruits. In *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed.). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00586-9>
- Kjeldahl, J. (1883). Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. 366-382.
- Koca, I., Karadeniz, B. (2009). Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. *Scientia Horticulturae*, 121(4), 447-450. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.03.015>
- Kondo, T., Kano, E. (1988). Effect of free radicals induced by ultrasonic cavitation on cell killing. *International Journal of Radiation Biology*, 54(3), 475-486. <https://doi.org/10.1080/09553008814551841>
- Koponen, J. M., Happonen, A. M., Mattila, P. H., Törrönen, A. R. (2007). Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1612-1619. <https://doi.org/10.1021/jf062897a>
- Kosmala, M., Zduńczyk, Z., Juśkiewicz, J., Jurgoński, A., Karlińska, E., Macierzyński, J., Jańczak, R., Rój, E. (2015). Chemical composition of defatted strawberry and raspberry

- seeds and the effect of these dietary ingredients on polyphenol metabolites, intestinal function, and selected serum parameters in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(11), 2989-2996. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00648>
- Kozłowska, M., Gruczyńska, E., Ścibisz, I., Rudzińska, M. (2016). Fatty acids and sterols composition, and antioxidant activity of oils extracted from plant seeds. *Food Chemistry*, 213, 450-456. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.102>
- Kryževičiute, N., Kraujalis, P., Venskutonis, P. R. (2016). Optimization of high pressure extraction processes for the separation of raspberry pomace into lipophilic and hydrophilic fractions. *Journal of Supercritical Fluids*, 108, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.10.025>
- Kulling, S. E., Rawel, H. M. (2008). Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) - A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Medica*, 74(13), 1625-1634. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1088306>
- Kumar, N., Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 24, e00370. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>
- Landete, J. M. (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, 44(5), 1150-1160. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.027>
- Lang, Q., Wai, C. M. (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - a practical review. *Talanta*, 53, 771-782. <https://doi.org/10.1021/ie000228v>
- Larrosa, M., García-Conesa, M. T., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A. (2010). Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 513-539. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.005>
- Ledina, T., Bulajić, S., Đorđević, J. (2018). Metode za određivanje antimikrobne rezistencije kod mikroorganizama u hrani. *Veterinarski žurnal Republike Srpske*, 18(1) 207–224. <https://doi.org/10.7251/vetj18012071>
- Letellier, M., Budzinski, H. (1999). Original articles microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis*, 27, 259-271.

- Li, A.N., Li, S., Zhang, Y.J., Xu, X.R., Chen, Y.M, Li, H.B. (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 2014(6), 6020-6047. doi:10.3390/nu6126020
- Li, Q., Wang, M., Tan, L., Wang, C., Ma, J., Li, N., Li, Y., Xu, G., Li, J. (2005). Docosahexaenoic acid changes lipid composition and interleukin-2 receptor signaling in membrane rafts. *Journal of Lipid Research*, 46(9), 1904-1913. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500033-JLR200>
- Liu, G., Xu, X., Hao, Q., Gao, Y. (2009). Supercritical CO₂ extraction optimization of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 42(9), 1491-1495. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.04.011>
- Lotito, S. B., Frei, B. (2004). Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: Contrasting in vitro and in vivo effects. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(2), 201-211. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.10.005>
- Luff, G., Schoorl, W. (1929). Suiker titratie. *Chem Weekbl*, 26, 130-134.
- Maas, J. L., Galletta, G. J., Stoner, G. D. (1991). Ellagic acid, an anticarcinogen in fruits, especially in strawberries: A review. *HortScience*, 26(1), 10-14. <https://doi.org/10.21273/hortsci.26.1.10>
- Määttä-Riihinen, K. R., Kamal-Eldin, A., Törrönen, A. R. (2004). Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6178-6187. <https://doi.org/10.1021/jf049450r>
- Maheshwari, P., Nikolov, Z. L., White, T. M., Hartel, R. (1992). Solubility of fatty acids in supercritical carbon dioxide. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69(11), 1069-1076. <https://doi.org/10.1007/BF02541039>
- Majewski, M., Kucharczyk, E., Kaliszan, R., Markuszewski, M., Fotschki, B., Juśkiewicz, J., Borkowska-Sztachañska, M., Ognik, K. (2020). The characterization of ground raspberry seeds and the physiological response to supplementation in hypertensive and normotensive rats. *Nutrients*, 12(6) 1630. <https://doi.org/10.3390/nu12061630>

- Marić, B., Abramović, B., Ilić, N., Krulj, J., Kojić, J., Perović, J., Bodroža-Solarov, M., Teslić, N. (2020). Valorization of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) seeds as a source of health beneficial compounds: Extraction by different methods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(10) e14744. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14744>
- Mazurek, B., Chmiel, M., Górecka, B. (2017). Fatty acids analysis using gas chromatography-mass spectrometer detector (GC/MSD) - Method validation based on berry seed extract samples. *Food Analytical Methods*, 10(8), 2868-2880. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0834-1>
- McEntee, M. F., Ziegler, C., Reel, D., Tomer, K., Shoieb, A., Ray, M., Li, X., Neilsen, N., Lih, F. B., O'Rourke, D., Whelan, J. (2008). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids enhance hormone ablation therapy in androgen-dependent prostate cancer. *American Journal of Pathology*, 173(1), 229-241. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070989>
- Menendez, J. A., Vazquez-Martin, A., Ropero, S., Colomer, R. L. R. (2006). HER2 (erbB-2)-targeted effects of the ω -3 polyunsaturated. Fatty acid α -linolenic acid (ALA; 18:3n-3) in breast cancer cells: the „fat features“, of the „Mediterranean diet“ as an „anti-HER2 cocktail“, *Clinical and Translational Oncology*, 8(11), 812-820.
- Mertens-Talcott, S. U., Jilma-Stohlawetz, P., Rios, J., Hingorani, L., Derendorf, H. (2006). Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8956-8961. <https://doi.org/10.1021/jf061674h>
- Miguel, M. G. (2010). Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25, 291-312. <https://doi.org/10.1002/ffj>
- Munné-Bosch, S. (2005). The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 162(7), 743-748. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.04.022>
- Musialik, M., Litwinienko, G. (2005). Scavenging of DPPH[•] radicals by vitamin E is accelerated by its partial ionization: The role of sequential proton loss electron transfer. *Organic Letters*, 7(22), 4951-4954. <https://doi.org/10.1021/ol051962j>
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., Geoffrey Vining, G., Borrer, C. M., Kowalski, S. M. (2004). Response surface methodology: A retrospective and literature survey. *Journal of*

Quality Technology, 36(1), 53-78. <https://doi.org/10.1080/00224065.2004.11980252>

National Committee. Clinical Laboratory Standards. (1999). Performance standards for antimicrobial disc susceptibility test. Approved Standard. *NCCLS Publication M2-A5*, Villanova, PA, USA.

Nayak, B., Dahmoune, F., Moussi, K., Remini, H., Dairi, S., Aoun, O., Khodir, M. (2015). Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from Citrus sinensis peels. *Food Chemistry*, 187, 507-516. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.081>

NIH, National Institutes of Health. Nutrient recommendations: Dietary reference intakes (DRI). Available online: https://ods.od.nih.gov/HealthInformation/Dietary_Reference_Intakes.aspx (pristupljeno 01.06.2021.).

Nikolić, M. (2019). Ekstrakcija flavonoida iz biljne vrste *Anethum graveolens* L. Uticaj različitih parametara procesa, kinetika termodinamika, Master rad. *Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu*.

Nile, S. H., Park, S. W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30(2), 134-144. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.04.007>

Obeso, J. A., Rodriguez-Oroz, M. C., Goetz, C. G., Marin, C., Kordower, J. H., Rodriguez, M., Hirsch, E. C., Farrer, M., Schapira, A. H. V., Halliday, G. (2010). Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nature Medicine*, 16(6), 653-661. <https://doi.org/10.1038/nm.2165>

Oomah, B. D., Mazza, G. (1999). Health benefits of phytochemicals from selected Canadian crops. *Trends in Food Science and Technology*, 10(6-7), 193-198. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00055-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00055-2)

Oomah, B. D., Ladet, S., Godfrey, D. V., Liang, J., Girard, B. (2000). Characteristics of raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil. *Food Chemistry*, 69(2), 187-193. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00260-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00260-5)

Otašević, B., Protić, A., Golubović, J., Zečević, M., Cerović, M., Bralović, L. (2014). Razvoj metode čvrsto-tečne ekstrakcije za prečišćavanje mikofenolne kiseline iz uzoraka salive.

Arhiv Za Farmaciju, 64(3), 247-260. <https://doi.org/10.5937/arhfarm1403247O>

- Ouahchi, K., Arita, M., Kayden, H., Hentati, F., Hamida, M. Ben, Sokol, R., Arai, H., Inoue, K., Mandel, J. L., Koenig, M. (1995). Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the α -tocopherol transfer protein. *Nature Genetics*, 9(2), 141-145. <https://doi.org/10.1038/ng0295-141>
- Palmquist, D. L. (2009). Omega-3 fatty acids in metabolism, health, and nutrition and for modified animal product foods. *Professional Animal Scientist*, 25(3), 207-249. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)30713-0](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30713-0)
- Pan, W. H. T., Chang, C. C., Su, T. T., Lee, F., Fuh, M. R. S. (1995). Preparative supercritical fluid extraction of pyrethrin I and II from pyrethrum flower. *Talanta*, 42(11), 1745-1749. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(95\)01657-0](https://doi.org/10.1016/0039-9140(95)01657-0)
- Park, M., Cho, H., Jung, H., Lee, H., Hwang, K. T. (2014). Antioxidant and anti-inflammatory activities of tannin fraction of the extract from black raspberry seeds compared to grape seeds. *Journal of Food Biochemistry*, 38(3), 259-270. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12044>
- Parry, J., Yu, L. (2004). Fatty acid content and antioxidant properties of cold-pressed black raspberry seed oil and meal. *Journal of Food Science*, 69(3), 189-193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb13356.x>
- Parry, J., Su, L., Luther, M., Zhou, K., Peter Yurawecz, M., Whittaker, P., Yu, L. (2005). Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry, and blueberry seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 566-573. <https://doi.org/10.1021/jf048615t>
- Pavlić, B. (2017). Valorizacija sporednog proizvoda žalfije (*Salvia officinalis* L.) u cilju dobijanja bioaktivnih jedinjenja savremenim tehnikama ekstrakcije. *Doktorska Disertacija*. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
- Pavlić, B., Vidović, S., Vladić, J., Radosavljević, R., Zeković, Z. (2015). Isolation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil by green extractions versus traditional techniques. *Journal of Supercritical Fluids*, 99, 23-28. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.01.029>

- Pavlić, B., Kaplan, M., Bera, O., Oktem Olgun, E., Canli, O., Milosavljević, N., Antić, B., Zeković, Z. (2019). Microwave-assisted extraction of peppermint polyphenols - Artificial neural networks approach. *Food and Bioproducts Processing*, 118, 258-269. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.09.016>
- Pavlić, B., Pezo, L., Marić, B., Peić-Tukuljac, L., Zeković, Z., Bodroža-Solarov, M., Teslić, N. (2020). Supercritical fluid extraction of raspberry seed oil: Experiments and modelling. *Journal of Supercritical Fluids*, 157, e104687. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104687>
- Pieszka, M., Tombarkiewicz, B., Roman, A., Migdał, W., Niedziółka, J. (2013). Effect of bioactive substances found in rapeseed, raspberry and strawberry seed oils on blood lipid profile and selected parameters of oxidative status in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(3), 1055-1062. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.09.007>
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035-1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509>
- Pike, L. J. (2006). Rafts defined: A report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *Journal of Lipid Research*, 47(7), 1597-1598. <https://doi.org/10.1194/jlr.E600002-JLR200>
- Pinto, R. H. H., Sena, C., Santos, O. V, Da Costa, W. A., Rodrigues, A. M. C., Carvalho Junior, R. N. (2018). Extraction of bacaba (*Oenocarpus bacaba*) oil with supercritical CO₂: Global yield isotherms, fatty acid composition, functional quality, oxidative stability, spectroscopic profile and antioxidant activity. *Grasas Y Aceites*, 69(2), 1-8. <https://doi.org/10.3989/gya.0883171>
- Polesello, S., Lovati, F., Rizzolo, A., Rovida, C. (1993). Supercritical fluid extraction as a preparative tool for strawberry aroma analysis. *Journal of High Resolution Chromatography*, 16(9), 555-559. <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240160911>
- Ponder, A., Hallmann, E. (2019). Phenolics and carotenoid contents in the leaves of different organic and conventional raspberry (*Rubus idaeus* L.) cultivars and their *in vitro* activity. *Antioxidants*, 8(10) 458. <https://doi.org/10.3390/antiox8100458>
- Popović, S., Čolović, D., Ikonić, P., Tasić, T., Kostadinović, L., Lević, J. (2017). Influence of

- temperature regime in gas chromatography on polyunsaturated fatty acid determination in Petrovská klobasá. *Romanian Biotechnological Letters*, 22(4), e12812. <https://e-repository.org/rbl/vol.22/iss.4/16.pdf>
- Priego-Capote, F., Luque De Castro, M. D. (2004). Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. *Trends in Analytical Chemistry*, 23(9), 644-653. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.06.006>
- Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Meier, C., Kahkonen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oksman-Caldentey, K. M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90(Tietotie 2), 494-507.
- Raatz, S. K., Conrad, Z., Jahns, L. (2018). Trends in linoleic acid intake in the United States adult population: NHANES 1999-2014. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 133, 23-28. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2018.04.006>
- Rabadán, A., Pardo, J. E., Gómez, R., Álvarez-Ortí, M. (2018). Influence of temperature in the extraction of nut oils by means of screw pressing. *Lwt*, 93, 354-361. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.061>
- Radosavljević, K. (2008). The market chain of fruit production in Serbia - A case study of raspberry and sour cherry cultivation. *Economic Annals*, 53(177), 103-121. <https://doi.org/10.2298/EKA0877103R>
- Ramić, M., Vidović, S., Zeković, Z., Vladić, J., Cvejic, A., Pavlić, B. (2015). Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from Aronia melanocarpa by-products from filter-tea factory. *Ultrasonics Sonochemistry*, 23, 360-368. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.002>
- Rashmi, H. B., Negi, P. S. (2020). Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. *Food Research International*, 136, e109298. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109298>
- Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L., Porter, N. L., Avdalovic, N., Pohl, C. (1996). Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68(6), 1033-1039. <https://doi.org/10.1021/ac9508199>
- Rombaut, N., Savoie, R., Thomasset, B., Castello, J., Van Hecke, E., Lanoisellé, J. L.

- (2015). Optimization of oil yield and oil total phenolic content during grape seed cold screw pressing. *Industrial Crops and Products*, 63, 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.001>
- Rostagno, M. A., Palma, M., Barroso, C. G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012(2), 119-128. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01184-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01184-1)
- Saini, R. K., Keum, Y. S. (2016). Tocopherols and tocotrienols in plants and their products: A review on methods of extraction, chromatographic separation, and detection. *Food Research International*, 82, 59-70. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.025>
- Sanderson, B. (2004). Applied sonochemistry- the uses of power ultrasound in chemistry and processing. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 79(2), 207-208. <https://doi.org/10.1002/jctb.957>
- Šarić, B. (2016). Iskorišćenje tropa borovnice i maline u formulaciji bezglutenskog keksa sa dodatkom vrednošću. *Doktorska Disertacija*. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
- Sarin, R., Sharma, M., Khan, A. A. (2009). Studies on *Guizotia abyssinica* L. oil: Biodiesel synthesis and process optimization. *Bioresource Technology*, 100(18), 4187-4192. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.072>
- Savić, Lj. (2014). Extraction of herbal drugs: comparative extraction of circular and extraction with supercritical carbon dioxide. *Matières Médicales Recueil Des Travaux*, 34, 93-104.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287-306. <https://doi.org/10.1080/1040869059096>
- Schagen, S. K., Zampeli, V. A., Makrantonaki, E., Zouboulis, C. C. (2012). Discovering the link between nutrition and skin aging. *Dermato-Endocrinology*, 4(3) 298-307. <https://doi.org/10.4161/derm.22876>
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Henning, S. M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M. G., Heber, D. (2005). *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with

- other polyphenols as found in pomegranate juice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(6), 360-367. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.01.006>
- Sen, C. K., Khanna, S., Roy, S. (2006). Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. *Life Sciences*, 78(18), 2088-2098. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.12.001>
- Seppanen, C. M., Song, Q., Saari Csallany, A. (2010). The antioxidant functions of tocopherol and tocotrienol homologues in oils, fats, and food systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(5), 469-481. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1526-9>
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, J. C., Bryan, M., Wu, Y. (2003). Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *Journal of Food Agriculture & Environment*, 1(2), 42-47.
- Shrikhande, A. J. (2000). Wine by-products with health benefits. *Food Research International* 33(2000) 469-474.
- Simopoulos A P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56(8), 365-379. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00253-6](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00253-6)
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107-1112.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R. (2007). Principles of Instrumental Analysis, Thomson Brooks/Cole, Belmont.
- Stanišić, S. (1987). *Tehnološke operacije 1*. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Stashenko, E. E., Puertas, M. A., Combariza, M. Y. (1996). Volatile secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained by simultaneous steam distillation-solvent extraction and supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 752(1-2), 223-232. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00480-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00480-3)
- Subroto, E., Manurung, R., Heeres, H. J., Broekhuis, A. A. (2015). Mechanical extraction of oil from *Jatropha curcas* L. kernel: Effect of processing parameters. *Industrial Crops and Products*, 63, 303-310. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.018>

- Tanaka, Y., Goto, K., Matsumoto, Y., Ueoka, R. (2008). Remarkably high inhibitory effects of docosahexaenoic acid incorporated into hybrid liposomes on the growth of tumor cells along with apoptosis. *International Journal of Pharmaceutics*, 359(1-2), 264-271. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.03.045>
- Tansey, M. G., Goldberg, M. S. (2010). Neuroinflammation in Parkinson's disease: Its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiology of Disease*, 37(3), 510-518. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.11.004>
- Teng, H., Lin, Q., Li, K., Yuan, B., Song, H., Peng, H., Yi, L., Wei, M. C., Yang, Y. C., Battino, M., Cespedes Acuña, C. L., Chen, L., Xiao, J. (2017). Hepatoprotective effects of raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) seed oil and its major constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 110, 418-424. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.09.010>
- Teslić, N., Bojanić, N., Rakić, D., Takači, A., Zeković, Z., Fišteš, A., Bodroža-Solarov, M., Pavlić, B. (2019). Defatted wheat germ as source of polyphenols - Optimization of microwave-assisted extraction by RSM and ANN approach. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 143(2019), e107634. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.107634>
- Thiele, J. J., Hsieh, S. N., Ekanayake-Mudiyanselage, S. (2005). Vitamin E: critical review of its current use in cosmetic and clinical dermatology. *Dermatologic Surgery: Official Publication for American Society for Dermatologic Surgery*, 31, 805-813. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2005.31724>
- Tijan, P. (2018). Antioksidativna aktivnost tokoferolnog ekstrakta dobivenog iz različitih vrsta ulja - Završni rad. *Medicinski Fakultet, Sveučilište u Rijeci*.
- Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., Mason, T. J. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(2), 137-142. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(00\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(00)00033-X)
- Traber, M. G. (2007). Vitamin E regulatory mechanisms. *Annual Review of Nutrition*, 27, 347-362. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093819>
- Traber, M. G., Sokol, R., Ringel, S., Neville, H., Cheryl, T., Kayden, H. (1978). Lack of tocopherol in peripheral nerves of vitamin E - deficient patients with peripheral neuropathy. *New England Journal of Medicine*, 262-317.

- Tripathi, A. D., Mishra, R., Maurya, K. K., Singh, R. B., Wilson, D. W. (2019). Estimates for world population and global food availability for global health. In *The Role of Functional Food Security in Global Health*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813148-0.00001-3>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Uitterhaegen, E., Evon, P. (2017). Twin-screw extrusion technology for vegetable oil extraction: A review. *Journal of Food Engineering*, 212, 190-200. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.06.006>
- Uysal, S., Zengin, G., Locatelli, M., Bahadori, M. B., Mocan, A., Bellagamba, G., Luca, E. De, Mollica, A., Aktumsek, A. (2017). Cytotoxic and enzyme inhibitory potential of two potentilla species (*P. speciosa* L. and *P. reptans* Willd.) and their chemical composition. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00290>
- Valfré, F., Caprino, F., Turchini, G. M. (2003). The health benefit of seafood. *Veterinary Research Communications*, 27(SUPPL. 1), 507-512. <https://doi.org/10.1023/B:VERC.0000014208.47984.8c>
- Vattem, D. A., Shetty, K. (2005). Biological functionality of ellagic acid: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 29(3), 234-266. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2005.00031.x>
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.014>
- Vinayagam, R., Xiao, J., Xu, B. (2017). An insight into anti-diabetic properties of dietary phytochemicals. *Phytochemistry Reviews*, 16(3), 535-553. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9496-2>
- Volf, I., Ignat, I., Neamtu, M., Popa, V. I. (2014). Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols. *Chemical Papers*, 68(1), 121-129. <https://doi.org/10.2478/s11696-013-0417-6>
- Volmut, K., Benčić, Đ., Moslavac, T. (2009). Oksidacijska stabilnost biljnih ulja s dodatkom

- antioksidansa. *Glasnik Zaštite Bilja*, 32(6), 136-145.
- Wang, H., Cao, G., Prior, R. L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), 701-705. <https://doi.org/10.1021/jf950579y>
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., Duan, Y., Ma, H., Luo, X. (2018). Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops - A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, 538-549. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.018>
- Xiang, L., Xing, D., Lei, F., Wang, W., Xu, L., Nie, L., Du, L. (2008). Effects of season, variety, and processing method on ellagic acid content in pomegranate leaves. *Tsinghua Science and Technology*, 13(4), 460-465. [https://doi.org/10.1016/S1007-0214\(08\)70074-9](https://doi.org/10.1016/S1007-0214(08)70074-9)
- Yang, B., Ahotupa, M., Määttä, P., Kallio, H. (2011). Composition and antioxidative activities of supercritical CO₂-extracted oils from seeds and soft parts of northern berries. *Food Research International*, 44(7), 2009-2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.025>
- Yang, C. S., Luo, P., Zeng, Z., Wang, H., Malafa, M., Suh, N. (2020). Vitamin E and cancer prevention: Studies with different forms of tocopherols and tocotrienols. *Molecular Carcinogenesis*, 59(4), 365-389. <https://doi.org/10.1002/mc.23160>
- Yao, J., Chen, J., Yang, J., Hao, Y., Fan, Y., Wang, C., Li, N. (2021). Free, soluble-bound and insoluble-bound phenolics and their bioactivity in raspberry pomace. *Lwt*, 135(2020), e109995. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109995>
- Yin, J. Z., Wang, A. Q., Wei, W., Liu, Y., Shi, W. H. (2005). Analysis of the operation conditions for supercritical fluid extraction of seed oil. *Separation and Purification Technology*, 43(2), 163-167. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2004.10.016>
- Zafrilla, P., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F. A. (2001). Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3651-3655. <https://doi.org/10.1021/jf010192x>
- Zeković, Z., Pintać, D., Majkić, T., Vidović, S., Mimica-Dukić, N., Teslić, N., Versari, A.,

- Pavlić, B. (2017). Utilization of sage by-products as raw material for antioxidants recovery—Ultrasound versus microwave-assisted extraction. *Industrial Crops and Products*, 99, 49-59. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.01.028>
- Zhang, X., Ahuja, J. K. C., Burton-Freeman, B. M. (2019). Characterization of the nutrient profile of processed red raspberries for use in nutrition labeling and promoting healthy food choices. *Nutrition and Healthy Aging*, 5(3), 225-236. <https://doi.org/10.3233/NHA-190072>
- Zhao, G., Etherton, T. D., Martin, K. R., Vanden Heuvel, J. P., Gillies, P. J., West, S. G., Kris-Etherton, P. M. (2005). Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(3), 909-917. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.204>

Biografija



Boško Marić je rođen 14. januara 1991. u Sremskoj Mitrovici, od oca Duška i majke Mirjane. Osnovnu školu “Sveti Sava”, kao i srednju medicinsku školu “Draginja Nikšić” završio je u Sremskoj Mitrovici. Osnovne akademske studije hemije na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu je upisao 2009. godine i završio 2013. sa prosečnom ocenom 8,28 i stekao zvanje Diplomirani hemičar.

Iste godine je upisao Master akademske studije - Analitička hemija na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu, koje je završio 2014. sa prosečnom ocenom 9,57 i stekao zvanje Master hemije. Nakon završenih master studija, 2017. godine upisao je doktorske akademske studije hemije. Od početka doktorskih studija, angažovan je kao istraživač na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Zaposlen je na Naučnom institutu za prehrambene tehnologije, Univerziteta u Novom Sadu u zvanju istraživač-saradnik. Član je Srpskog hemijskog društva - Hemijskog društva Vojvodine. Zamenik je vodećeg analitičara za određivanje pesticida i zamenik je odgovornog lica za nabavku proizvoda i usluga na Naučnom institutu za prehrambene tehnologije, Univerziteta u Novom Sadu. U svom istraživačkom radu bavi se valorizacijom nusproizvoda iz prehrambene industrije u cilju dobijanja bioaktivnih jedinjenja i njihovoj primeni u ljudskoj ishrani.

Novi Sad

18.02.2022.

Boško Marić

Spisak radova i saopštenja

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima **M21**

1. Pavlič, B., Pezo, L., **Marić, B.**, Peić-Tukuljac, L., Zeković, Z., Bodroža-Solarov, M., Teslić, N. (2019). Supercritical fluid extraction of raspberry seed oil: Experiments and modeling, *Journal of Supercritical Fluids*, 130, 104687, ISSN 0896-8446.
2. **Marić, B.**, Pavlič, B., Čolović, D., Abramović, B., Zeković, Z., Bodroža-Solarov, M., Ilić, N., Teslić, N. (2020). Recovery of high content ω -3 fatty acid oil from raspberry (*Rubus idaeus* L.) seeds: Chemical composition and functional quality, *LWT - Food Science and Technology*, 130, 109627, ISSN 0023-6438.
3. Bodroža-Solarov, M., Grobelnik-Mlakar, S., Pezo, L., Keleman, S., Ilin, S., **Marić, B.**, Filipčev, B. (2021). Identification of biomarkers in hydrosoluble extracts from spelt and wheat cultivated in different production systems, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101, 3413-3421, ISSN: 0022-5142.

Radovi u međunarodnim časopisima **M23**

1. Ugrenović, V., Bodroža-Solarov, M., Pezo, L., Đisalov, J., Popović, V., **Marić, B.**, Filipović, V. (2018). Analysis of spelt variability (*Triticum spelta* L.) grown in different conditions of Serbia by organic conditions, *Genetika*, **50**, (2), 635-646.
2. Popović, B., Štajner, D., Ždero-Pavlović, R., Bodroža-Solarov, M., Ugrenović, V., **Marić, B.**, Kalenjuk, B., Pezo, L. (2019). Comparison between organic and conventional spelt and wheatgrass juice, *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, **64** (4), 514-522, ISSN 0324-5853.
3. **Marić, B.**, Abramović, B., Ilić, N., Krulj, J., Kojić, J., Perović, J., Bodroža-Solarov, M., Teslić, N. (2020). Valorization of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) seeds as a source of health beneficial compounds: Extraction by different methods, *Journal of Food Processing and Preservation*, 2020, 14744, ISSN 1745-4549.

Radovi u časopisima međunarodnog značaja verifikovanog posebnom odlukom **M24**

1. **Marić, B.D.**, Bodroža-Solarov, M.I., Ilić, N.M., Kojić, J.S., Krulj, J.A. (2018). Influence of different extrusion temperatures on the stability of ellagic acid from raspberry seeds, *Food and Feed Research*, **45** (1), 19-25.

2. Šimurina, O.D., Filipčev, B.V., **Marić, B.D.**, Cvetković, B.R., Bodroža Solarov, M.I. (2018). Comparative study on the physico-chemical, textural and thermal properties of instant porridges based on spelt and oats, *Food and Feed Research*, **45** (1), 27-35.
3. Perović, J., **Marić, B.**, Teslić, N., Kojić, J., Krulj, J., Filipčev, B., Ilić, N., Bodroža-Solarov, M. (2019). Physico-chemical properties of corn-based snack fortified with raspberry seeds, *Food and Feed Research*, 46, 61-71, ISSN: 2217-5369.
4. Zečević, M., Pezo, L., Bodroža-Solarov, M., Brlek, T., Krulj, J., Kojić, J., **Marić, B.** (2019). A business model in agricultural production in Serbia, developing towards sustainability, *Economics of Agriculture*, 66, 437-456.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini **M33**

1. Kojić J., Ilić, N., Banjac, V., Kojić, P., **Marić, B.**, Krulj, J., Bodroža - Solarov, M. Effect of extrusion conditions on resistant starch from the whole grain spelt flour, 5. International Congress Engineering, Environment and Materials in Processing Industry, Jahorina: Faculty of Technology, Zvornik, 15-17. mart 2017, pp.407-413, UDK: 664,2:664,641.
2. Krulj, J., Ćurčić, N., Bočarov-Stanić, A., Kojić, J., Perović, J., **Marić, B.**, Bodroža-Solarov, M.: Morphological and molecular characterisation of *Aspergillus flavus* isolates from common wheat and spelt grains in Serbia, IV International Congress Food Technology, Quality and Safety, pp. 399-403, Novi Sad, Serbia, 23-25. oktobar 2018.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu **M34**

1. **Marić, B.**, Filipović, V., Nićetin, M., Filipović, J., Ačanski, M., Pastor, K.: Process efficiency of celery root osmotic treatment in molasses, The International Bioscience Conference and the 6th International PSU-UNS Bioscience Conference - IBSC 2016, Conference Proceedings, pp. 291-292, Novi Sad, Serbia, 19-21. septembar 2016.
2. Ačanski, M., Dimić, E., Vujasinović, V., Pastor, K., Suđi, J., Vujić, Đ., **Marić, B.**: Distinguishing extra-virgin olive oil from sunflower oil using a new method, III International Congress Food Technology, Quality and Safety, Book of Abstracts, p. 45, Novi Sad, Serbia, 25-27. oktobar 2016.
3. Perović, J., **Marić, B.**, Teslić, N., Kojić, J., Krulj, J., Ćurčić, N., Bodroža-Solarov, M.: Raspberry seed supplemented snack: The effect of different extrusion condition on the

physicochemical properties, IV International Congress Food Technology, Quality and Safety, Book of Abstracts, p. 90, Novi Sad, Serbia, 23-25. oktobar 2018.

4. Ćurčić, N., Krulj, J., Bočarov-Stanić, A., **Marić, B.**, Perović, J., Kojić, J., Bodroža-Solarov, M.: Identification of the most important *Aspergillus* species by a PCR-RFLP method, IV International Congress Food Technology, Quality and Safety, Book of Abstracts, p. 163, Novi Sad, Serbia, 23-25. oktobar 2018.

5. Ćurčić, N., Krulj, J., Bočarov-Stanić, A., Perović, J., **Marić, B.**, Kojić, J., Bodroža-Solarov, M.: PCR-RFLP on β -tubulin and calmodulin gene as a tool for rapid identification of the most important species of *Aspergillus*, IV International Congress Food Technology, Quality and Safety, Book of Abstracts, p. 164, Novi Sad, Serbia, 23-25. oktobar 2018.

6. **Marić, B.**, Bodroža-Solarov, M., Ilić, N., Abramović, B., Krulj, J., Kojić, J., Milenković, S.: Determination of ellagic acid in raspberry seeds, IV International Congress Food Technology, Quality and Safety, Book of Abstracts, p. 188, Novi Sad, Serbia, 23-25. oktobar 2018.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u celini **M63**

1. Ačanski, M., Dimić, E., Vujasinović, V., Pastor, K., Suđi, J., Vujić, Đ., **Marić, B.**: Homogeneity of the samples of extra-virgin olive oil on the Serbian market, Production and Processing of Oilseeds, Proceedings of the 57th Oil Industry Conference, pp. 115-121, Herceg Novi, Montenegro, 19-24. jun 2016.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu **M64**

1. **Marić, B.**, Abramović, B., Pavlić, B., Peić-Tukuljac, L., Ilić, N., Čolović (Ivanov), D., Bodroža-Solarov, M., Zeković, Z., Teslić, N., Fatty acids profile of raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil: Optimization of supercritical fluid extraction. International Conference on Advanced Production and Processing, Novi Sad, 10-11 oktobar 2019., p. 68, ISBN 978-86-6253-102-54.

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укорицити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Валоризација семена малине као потенцијалног извора биоактивних једињења за примену у функционалној храни и суплементима
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Научни институт за прехранбене технологије, Универзитет у Новом Саду б) Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду в) Институт за онкологију Војводине, Сремска Каменица г) Универзитет природних наука, Варшава, Пољска
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске академске студије хемије на Природно-математичком факултету, Универзитета у Новом Саду Истраживања обухваћена овом докторском дисертацијом део су пројекта под називом: <i>Нови производи од цереалија и псеудоцереалија у органској производњи</i> (ИИИ 46005) финансираног од стране Министарства науке, просвете и технолошког развоја Републике Србије у периоду до 2019. године. Од 2020. године истраживање је настављено у оквиру пројекта број 451-03-68/2020-14/200222 истог Министарства.
1. Опис података
<p>1.1 Врста студије</p> <p>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</p> <p>Докторска дисертација</p> <p>1.2 Врсте података</p> <p><input checked="" type="radio"/> а) квантитативни</p> <p><input type="radio"/> б) квалитативни</p>

1.3. Начин прикупљања података

- a) анкете, упитници, тестови
- б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи
- в) генотипови: навести врсту _____
- г) административни подаци: навести врсту _____
- д) узорци ткива: навести врсту _____
- ђ) снимци, фотографије: навести врсту _____
- е) текст, навести врсту преглед литературе
- ж) мапа, навести врсту _____
- з) остало: описати лабораторијски експерименти и мерења

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

- а) Excel фајл, датотека .xlsx; .csv
- б) SPSS фајл, датотека _____
- в) PDF фајл, датотека .pdf
- г) Текст фајл, датотека .docx
- д) JPG фајл, датотека .jpg; .tiff
- е) Остало, датотека .orj; .css

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- а) број варијабли 12
- б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) велики број

1.3.3. Поновљена мерења

- а) да
- б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) временски размак између поновљених мера је дефинисан примењеном методом

- б) варијабле које се више пута мере односе се на испитиване карактеристике анализираних једињења
- в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

Да

Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

- експеримент, анализа физичко-хемијских карактеристика и биолошки тестови екстрахованих једињења
- корелационо истраживање: регресиона и мултиваријантна анализа прикупљених експерименталних података
- анализа текста: прикупљање података из литературе
- д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

HPLC-DAD, LC-MS, GC-FID, UV-Vis спектрофотометар, дензитометар, читач микроплочица

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

- а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да Не

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? _____
- б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не
- в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података
- _____

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Статистичком проценом добијених резултата, одбацавањем екстремних резултата и поређењем експерименталних и теоријских података

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Статистичком контролом изведеног резултата

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијум докторских дисертација на Универзитету у Новом Саду.

3.1.2. URL адреса <https://cris.uns.ac.rs/searchDissertations.jsf>

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

- а) Да
- б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____
- в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? _____

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да Не

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- a) Подаци нису у отвореном приступу
 - b) Подаци су анонимизирани
 - ц) Остало, навести шта
-
-

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

a) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Уз претходну комуникацију и писмено одобрење власника података

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима: Добијањем шифре од власника података за приступ подацима који су похрањени на Репозиторијуму Универзитета у Новом Саду

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство - некомерцијално

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Бошко Марић, e-mail: bosko.maric@fins.uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Бошко Марић, e-mail: bosko.maric@fins.uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Бошко Марић, e-mail: bosko.maric@fins.uns.ac.rs