

# Utjecaj veličine plodova jagode (*Fragaria ananassa* × *Duch.*) na bioaktivni sastav i antioksidacijski potencijal

---

Šoštarić, Ines

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:286112>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, travanj 2024

Ines Šoštarić

**UTJECAJ VELIČINE PLODOVA  
JAGODE (*Fragaria ananassa* ×  
Duch.) NA BIOAKTIVNI SASTAV I  
ANTIOKSIDACIJSKI  
POTENCIJAL**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević, te uz pomoć Anice Bebek Markovinović, mag. ing.



Ovo istraživanje provedeno je u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta „Tehnologija preprekama i 3D printanje za ekološki prihvatljivu proizvodnju funkcionalnih voćnih sokova (3D-SustJuice)“ (IP-2019-04-2105), voditeljice izv. prof. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević.

## ZAHVALA

*Prvotno bih se htjela zahvaliti mentorici profesorici Danijeli na uloženom vremenu i trudu oko izrade ovog diplomskog rada. Veliko Vam hvala na angažmanu, na svakom savjetu te lijepoj i motivirajućoj riječi koju ste mi uputili.*

*Također, zahvaljujem se doktorandici Anici na svojoj pomoći oko izrade eksperimentalnog dijela rada te na motivaciji za daljnji rad i napredak u karijeri.*

*Posebno zahvaljujem roditeljima te najdražem „bruderu“ za svu pruženu ljubav, razumijevanje i podršku kroz cijelo moje školovanje. Hvala vam na svemu, hvala što ste moj najveći oslonac i motivacija da se uvijek trudim i vjerujem u sebe.*

*I za kraj, jedna posebna zahvala za moje najbolje prijatelje bez vas ne bi bilo isto. Hvala vam na svakom druženju, smijehu, lijepoj riječi i motivaciji. Hvala što ste me bodrili i vjerovali u mene čak i kad ja nisam. Sve vas mnogo cijenim i volim!*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za kemiju i tehnologiju voća i povrća

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Diplomski sveučilišni studij:** Prehrambeno inženjerstvo

## UTJECAJ VELIČINE PLODOVA JAGODE (*Fragaria ananassa* × Duch.) NA BIOAKTIVNI SASTAV I ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL

*Ines Šoštarić*, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0113147269

**Sažetak:** U ovom je radu ispitan utjecaj veličine plodova (<15 g, 15-30 g, >30 g) jagode sorte 'Albion' na bioaktivni sastav i antioksidacijski potencijal u svježim plodovima i 3D ispisanim proizvodima. U svim uzorcima su spektrofotometrijski određene koncentracije ukupnih fenola, flavonoida, flavanola, hidrokisicimernih kiselina, kondenziranih tanina i monomernih antocijana, te antioksidacijski potencijal DPPH i FRAP metodama. Različite mase plodova značajno utječu na udio bioaktivnih spojeva pri čemu svježiji plodovi manje mase (<15 g) imaju najveći udio ukupnih fenola i antocijana. Slično, 3D ispisani proizvodi od plodova mase <15 g su imali veće udjele ukupnih fenola, flavonoida te antocijana u odnosu na 3D proizvode proizvedene od plodova većih masa. Ipak, antioksidacijski kapacitet određen DPPH i FRAP metodama nije se razlikovao u ovisnosti od mase plodova ni u svježim, kao ni u 3D ispisanim proizvodima. U zaključku, dobiveni rezultati ukazuju na važnost veličine plodova u proizvodnji 3D funkcionalnih proizvoda na bazi jagode.

**Glavne riječi:** veličina plodova, jagoda (*Fragaria ananassa* × Duch.), bioaktivni spojevi, antioksidacijski potencijal, 3D ispis

**Rad sadrži:** 58 stranica, 6 slika, 6 tablica, 112 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević

**Pomoć pri izradi:** Anica Bebek Markovinović, mag. ing., doc. dr. sc. Predrag Putnik i prof. dr. sc. Boris Duralija

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Marija Badanjak (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević (mentor)
3. doc. dr. sc. Predrag Putnik, Sveučilište Sjever (član)
4. prof. dr. sc. Suzana Rimac Brnčić (zamjena)

**Datum obrane:** 05.04.2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Chemistry and Technology of Fruits and Vegetables**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Engineering

### INFLUENCE OF STRAWBERRY (*Fragaria ananassa* × Duch.) FRUIT SIZE ON BIOACTIVE COMPOSITION AND ANTIOXIDANT POTENTIAL

*Ines Šoštarić*, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0113147269

**Abstract:** In this study, the influence of fruit size (< 15 g, 15-30 g, > 30 g) of the strawberry cultivar 'Albion' on the bioactive composition and antioxidant potential of fresh fruit and 3D printed products (3DP) was investigated. The concentrations of total phenols, flavonoids, flavanols, hydroxycinnamic acids, condensed tannins and monomeric anthocyanins, and antioxidant potential (DPPH, FRAP) were determined spectrophotometrically. Fresh fruit with a lower weight (< 15 g) had the highest proportion of total phenols and anthocyanins. Similarly, 3DP made from fruit weighing < 15 g had higher levels of total phenolics, flavonoids and anthocyanins than 3DP made from higher mass fruit. However, the antioxidant capacity determined by the DPPH and FRAP methods did not differ between fresh and 3DP as a function of fruit weight. In summary, the results obtained indicate the importance of fruit size in the production of functional strawberry-based 3DP.

**Keywords:** fruit size, strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.), bioactive compounds, antioxidant potential, 3D print

**Thesis contains:** 58 pages, 6 figures, 6 tables, 112 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in:** The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** Danijela Bursać Kovačević, PhD, Associate Professor

**Technical support and assistance:** Anica Bebek Markovinović, MSc, Predrag Putnik, PhD, Assistant professor, and Boris Duralija, PhD, Full professor

#### Reviewers:

1. Marija Badanjak, PhD, Associate professor (president)
2. Danijela Bursać Kovačević, PhD, Associate professor (mentor)
3. Predrag Putnik, PhD, Assistant professor, University North (member)
4. Suzana Rimac Brnčić, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 05.04.2024.



## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. JAGODA ( <i>FRAGARIA ANANASSA</i> × <i>DUCH.</i> ) .....	2
2.2. FIZIKALNO-KEMIJSKI SASTAV JAGODE .....	3
2.3. BIOAKTIVNI POTENCIJAL JAGODE .....	4
2.4. ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA JAGODE .....	7
2.5. NEKI OD ČIMBENIKA UTJECAJA NA KVALITETU JAGODE .....	9
2.5.1. Sortiment .....	10
2.5.2. Skladištenje .....	12
2.5.3. Prerada .....	14
2.5.4. Utjecaj veličine ili mase plodova na kvalitetu .....	15
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	16
3.1. MATERIJALI .....	16
3.2. METODE RADA .....	16
3.2.1. Priprema ekstrakata iz svježih plodova jagoda .....	16
3.2.2. Priprema 3D ispisanih proizvoda od jagoda .....	17
3.2.3. Određivanje pH vrijednosti u 3D ispisanim uzorcima .....	19
3.2.4. Određivanje topljive suhe tvari (% Brix) .....	20
3.2.5. Priprema ekstrakata iz 3D ispisanih uzoraka .....	20
3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje bioaktivnih spojeva .....	21
3.2.6.1. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola .....	21
3.2.6.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida .....	24
3.2.6.3. Spektrofotometrijsko određivanje hidrosicimetnih kiselina i flavonola .....	26
3.2.6.4. Određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom .....	28
3.2.6.5. Spektrofotometrijsko određivanje monomernih antocijana .....	30
3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta .....	32
3.2.7.1. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) metoda .....	32
3.2.7.2. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power Assay) metoda .....	35
3.3. OBRADA PODATAKA .....	37
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	38
4.1. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA SVJEŽIH PLODOVA JAGODA I 3D ISPISANIH PROIZVODA NA BAZI JAGODA .....	38

4.2. BIOAKTIVNA SVOJSTVA SVJEŽIH PLODOVA JAGODA I 3D ISPISANIH PROIZVODA NA BAZI JAGODA .....	39
4.3. UTJECAJ MASE PLODOVA JAGODE NA BIOAKTIVNA SVOJSTVA SVJEŽIH PLODOVA JAGODA I 3D ISPISANIH PROIZVODA NA BAZI JAGODA .....	42
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>46</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>47</b>

# 1. UVOD

Jagoda (*Fragaria x ananassa* Duch.) je jedna od omiljenih voćnih vrsta diljem svijeta zbog svog okusa i bogatog nutritivnog sastava. Najčešće se konzumira svježa i uzgaja se u mnogim zemljama diljem svijeta s različitim klimatskim zonama, ali najviše prevladava uzgoj u umjerenom klimatskom pojasu (Fan i sur., 2021). Kvaliteta jagoda ovisi o mnogim čimbenicima, kao što su sorta, mjesto uzgoja, okolišni uvjeti, uvjeti uzgoja, vrijeme berbe, stupanj zrelosti te uvjeti rukovanja i skladištenja nakon berbe (Hernandez-Martínez i sur., 2023). Ujednačen oblik i masa ploda, uz boju i okus, najvažniji su čimbenici kvalitete jagoda i prihvatljivosti ovog voća kod potrošača. Voće koje ne udovoljava tržišnom standardu se može definirati promjerom manjim od 18-22 mm (Capocasa i sur., 2017) ili minimalnom težinom od 4-12 g (Menzel, 2021). Takvo voće može činiti do 17 % ukupnih prinosa kod nekih kultivara (Salazar i sur., 2016). Međutim, ovi tržišni standardi vrijede samo za jagode namijenjene potrošnji u svježem stanju, tako da se mali plodovi još uvijek mogu koristiti za preradu u različite druge proizvode poput sokova ili želiranih proizvoda. Dobar su izvor mnogih bioaktivnih tvari, poput vitamina, minerala, vlakana te polifenolnih spojeva. Također jagode su poznate po svojim dobrobitima za ljudsko zdravlje zbog svog antikancerogenog, protuupalnog, kardioprotektivnog, antimikrobnog te antioksidacijskog djelovanja (Newerli-Guz, 2023).

Stoga je cilj ovog rada bio ispitati utjecaj veličine plodova jagode (*Fragaria ananassa* × Duch.) na bioaktivni sastav i antioksidacijski potencijal u svježim plodovima i prerađenim u 3D ispisane funkcionalne proizvode. Provedeno je spektrofotometrijsko određivanje bioaktivnih spojeva te su utvrđene koncentracije ukupnih fenola, flavonoida, flavonola, hidroksicimetnih kiselina, polimernih proantocijanidina i monomernih antocijana. Pored toga, u svim ispitivanim uzorcima određen je i antioksidacijski potencijal pomoću DPPH i FRAP metode.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. JAGODA (*FRAGARIA ANANASSA* × *DUCH.*)

Jagoda (*Fragaria ananassa* × *Duch.*) je višegodišnja zeljasta biljka koja pripada porodici *Rosaceae* i rodu *Fragaria*. Najčešće je konzumirana kultura jagodastog voća u cijelom svijetu i cijenjena je zbog svog jedinstvenog okusa i nutritivne vrijednosti. Predstavlja jednu od najvažnijih prehrambenih biljaka u svijetu, s dvostruko većom globalnom proizvodnjom u usporedbi sa ostalim jagodastim voćem (Liston i sur., 2014). Prvenstveno se konzumira zbog svog jedinstvenog okusa i arome, ali također ima različite benefite za ljudsko zdravlje (Newerli-Guz, 2023; Miller i sur., 2019). Vrste roda *Fragaria* su poznate i konzumirane tisućama godina, pronalaze se diljem sjeverne hemisfere, kao i u nekim područjima Južne Amerike. U povijesti jagode su se konzumirale na pretkolumbijskim mjestima, u narodima Picunche i Mapuche (Čile) u staroj Kini i drevnom Rimu (Fierascu i sur., 2020; Liston i sur., 2014).

Postoje mnogi hibridi i kultivari koji predstavljaju razne ploidije u rasponu od diploidnih ( $2n = 2x = 14$ ) do dekaploidnih ( $2n = 10x = 70$ ). Većinu pripadnika roda *Fragaria* karakterizira poliploidija i njihov uzgoj u umjerenim zonama svijeta. Osim toga, drugi članovi obitelji *Rosaceae* (kao što su jabuka, šljiva, kruška i drugi) klimakterijske su prirode; međutim, jagoda je neklimakterijska voćna vrsta budući da je sazrijevanje ploda gotovo neovisno o biosintezi etilena (Azam i sur., 2019). Sve vrste roda *Fragaria* dijele neke zajedničke karakteristike: trajnice su niskog rasta, s obično zimzelenim i trolisnim lišćem, oprašuju se kukcima, s bijelim aktinomorfim cvjetovima (obično s 5 latica). Mnogi kultivari su trajnice koje se razlikuju u svojim potrebama za fotoperiodom, što dovodi do različitih vremena berbe (Petran, 2016). Suvremeni kultivirani plod jagode je oktoploidni hibrid ( $8n$ ) u genetskom sastavu, koji sadrži 56 kromosoma. Ovaj hibrid nastao je uspješnim križanjem čileanske jagode (*Fragaria chiloensis*) i sjevernoameričke jagode (*Fragaria virginiana*) 1780. godine u SAD-u (Azam i sur., 2019). Među 247 sorti koje su poznate, samo nekoliko predstavlja komercijalni interes: *Fragaria x ananassa* Duchesne (oktoploidni hibrid, poznat kao vrtna jagoda, podrijetlom iz sjeverne Amerike) i, u manjoj mjeri, *Fragaria vesca* L. (diploidna vrsta, poznata kao šumska jagoda, porijeklom sa sjeverne hemisfere) te *Fragaria chiloensis* (L.) Mill. (oktoploidna vrsta, poznata kao čileanska jagoda, porijeklom iz sjeverne, pacifičke i južne Amerike) (Fierascu i sur., 2020; Liston i sur., 2014).

Što se tiče uzgoja jagoda, Poljska ima najveću površinu pod uzgojem jagoda; međutim, zahvaljujući tehnološkom napretku i prednostima klimatskih uvjeta, SAD i Kina su najveći svjetski proizvođači jagoda (Azam i sur., 2019). Njihova proizvodnja dosegla je 9,22 milijuna

tona u 2017. godini. Uz Kinu (40,3 % ukupne svjetske proizvodnje) i SAD (15,7 %) najveći proizvođači jagoda su: Meksiko (7,14 %), Egipat (4,42 %), Turska (4,34 %), Španjolska (3,9 %), Republika Koreja (2,28 %), Poljska, Ruska Federacija, Maroko, Japan, Njemačka, Velika Britanija i Italija (između 1 i 2 %) (FAO, 2017). Ova masovna proizvodnja neizbježno dovodi do velikih količina otpada koji se može dalje iskoristavati u više područja, uključujući medicinu, kozmetiku i prehrambenu industriju (Sato i sur., 2019).

## 2.2. FIZIKALNO-KEMIJSKI SASTAV JAGODE

Prema svom nutritivnom sastavu, koji uključuje značajne količine ugljikohidrata, vitamina, vlakana i minerala, jagode predstavljaju nutritivno i biološki vrijednu sirovinu. U plodovima jagoda nalaze se mono i disaharidi, uključujući glukozu i fruktozu koje prevladavaju u odnosu na saharozu (Nour i sur., 2017). Jagoda je važan izvor bioaktivnih spojeva zbog visokih razina vitamina C, folata i polifenolnih spojeva (Newerli-Guz i sur., 2023; Afrin i sur., 2016). Plodovi jagode su niskokalorični (32 kcal/100 g) i sadrže značajnu količinu vode (preko 80 %) (Newerli-Guz i sur., 2023). Prije svega, njezin sadržaj dijetalnih vlakana i fruktoze može pridonijeti reguliranju razine šećera u krvi usporavanjem probave, a njezin sadržaj vlakana također pridonosi kontroli unosa kalorija (Giampieri i sur., 2012).

Veliko zanimanje za jagode se razvilo zbog izuzetno visokog sadržaja vitamina C, što ih čini važnim izvorom ovog vitamina u ljudskoj prehrani (Newerli-Guz, 2023; Carr i Maggini, 2017). Vitamin C igra važnu ulogu u mnogim metaboličkim funkcijama. Antioksidans je koji štiti tijelo od štetnog djelovanja slobodnih radikala te štiti imunološki sustav, smanjuje težinu alergijskih reakcija i pomaže u borbi protiv infekcija (Carr i Maggini, 2017). Iako u manjoj mjeri, jagode su dobar izvor i nekoliko drugih vitamina, kao što su tiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, vitamin K, vitamin A i vitamin E. Jagode su također bogate manganom, tako da porcija jagode (osam srednjih plodova, što odgovara približno 144 g) može osigurati više od 20 % dnevnog odgovarajućeg unosa ovog minerala. Ista količina jagoda može osigurati oko 5 % odgovarajućeg unosa kalija i kvalificirana je kao dobar izvor joda, magnezija, bakra, željeza i fosfora (Giampieri i sur., 2012). Također, značajan je i sadržaj folata u jagodama, te su jagode u usporedbi s ostalim voćnim vrstama, jedan od najbogatijih prirodnih izvora ovog esencijalnog mikronutrijenta; u rasponu od 20 do 25 mg/100 g svježe mase (engl. *Fresh Weight, FW*). Prema dostupnim podacima (Tulipani i sur., 2008), zanimljiv je unos folata konzumacijom jagoda. Na primjer, 250 g jagoda (s 60 mg folata u prosjeku) može osigurati 30 % dnevne preporučene

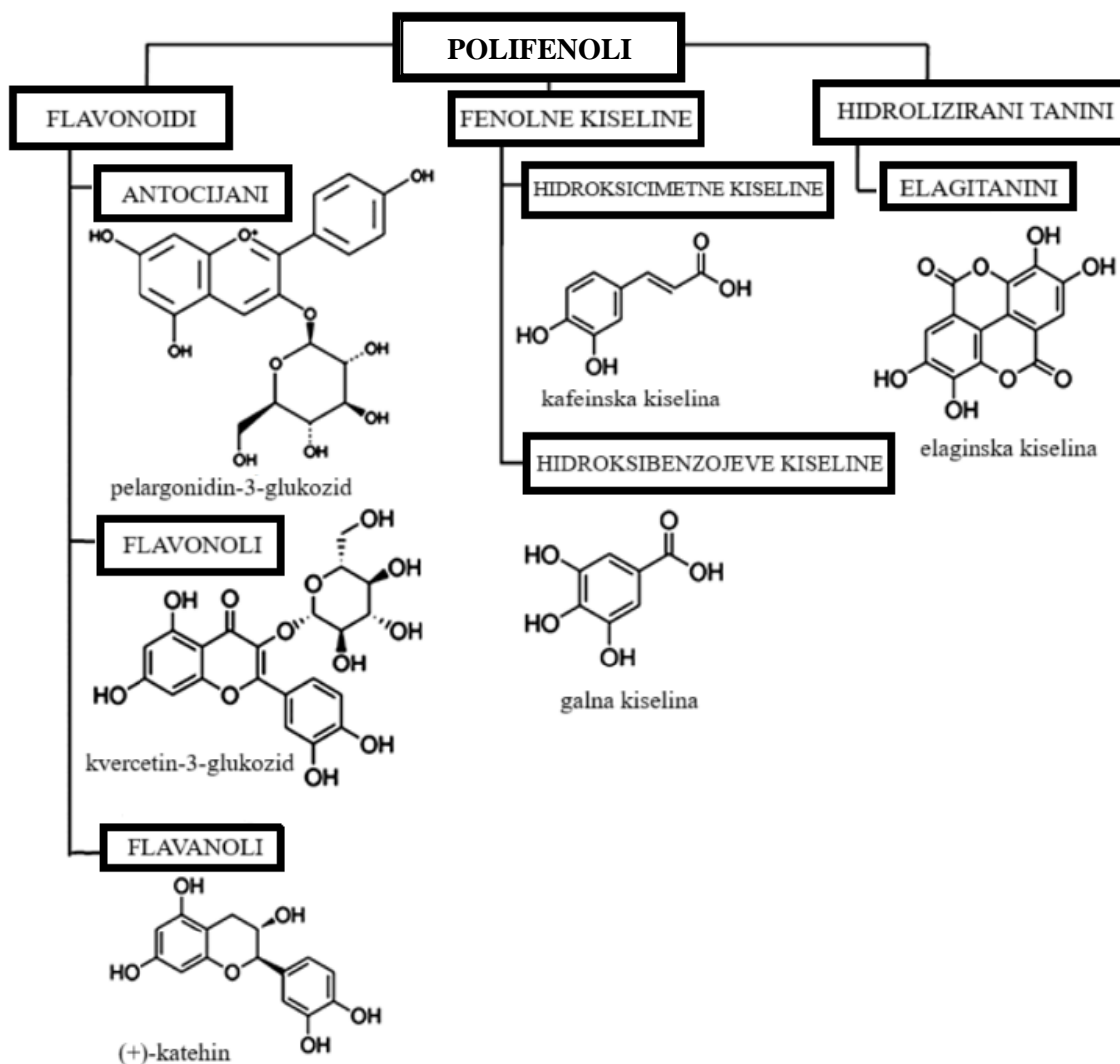
količine folata u Europi i SAD-u. Osim vrijednog nutritivnog sastava, jagode sadrže niz nenutritivnih komponenata kao što su polifenolne fitokemikalije (flavonoidi, fenolne kiseline, lignani i tanini) (Newerli-Guz i sur., 2023; Afrin i sur., 2016; Tulipani i sur., 2008).

Aromatski profil jagode je veoma složen jer obiluje mnogim hlapljivim spojevima. Aroma značajno pridonosi okusu, što izravno utječe na komercijalnu kvalitetu jagoda. Karakteristični hlapljivi spojevi jagode sastoje se od furanona, poput 2,5-dimetil-4-hidroksi-3(2H)-furanona i 4-metoksi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona; estera, uključujući etil butanoat, etil heksanoat, metil butanoat i metil heksanoat; sumpornih spojeva kao što je metantioi, i terpenoida uključujući linalool i nerolidol (Abouelenein i sur., 2023; Yan i sur., 2018). Aroma jagode predstavlja dobar primjer kompleksne voćne arome. Do danas je uočeno više od 360 hlapljivih kemikalija u aromatskom profilu svježih jagoda (Abouelenein i sur., 2023; Schwieterman i sur., 2013). Vrste i koncentracije hlapljivih tvari u jagodama razlikuju se ovisno o njihovoj sorti i zrelosti (Yan i sur., 2018). Međutim, esteri su najzastupljeniji hlapljivi spojevi u jagodama, s čak 131 različitom sastavnicom, a koje čine 25–90 % svih hlapljivih tvari jagoda. Esteri su također glavni izvor voćnih i cvjetnih mirisa u jagodama, a sadržaj estera može biti osnova za klasifikaciju različitih hlapljivih uzoraka (Abouelenein i sur., 2023; Yan i sur., 2018; Dong i sur., 2013). Iako furanoni, sumporni spojevi, terpenoidi i neki drugi spojevi pokazuju znatno manje količine u usporedbi s esterima, ovi spojevi pokazuju značajne učinke na hlapljive tvari jagode.

### **2.3. BIOAKTIVNI POTENCIJAL JAGODE**

Zbog svog kemijskog sastava jagode su bogat izvor bioaktivnih spojeva (engl. *Bioactive Compounds*, BAC) uključujući vitamine, minerale, vlakna te polifenolne spojeve koji mogu modificirati metaboličke i fiziološke funkcije organizma (Newerli-Guz i sur., 2023). BAC jagode pokazuju biološku aktivnost u *in vitro* i *in vivo* studijama, što ukazuje na moguću prevenciju nekoliko kroničnih degenerativnih stanja (Battino i sur., 2021; Miller i sur., 2019; Forbes-Hernandez i sur., 2015). Fitokemikalije jagoda uglavnom se sastoje od različitih skupina polifenolnih spojeva koji imaju mnoge neesencijalne funkcije u biljkama i veliki biološki potencijal kod ljudi (Fierascu i sur., 2020). Glavnu skupinu polifenolnih spojeva (slika 1) predstavljaju flavonoidi (uglavnom antocijani, s manjim doprinosom flavonola i flavanola), zatim hidrolizirani tanini (elagitanini i galotanini) i fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline), s kondenziranim taninima (proantocijanidinima) u manjoj mjeri (Fierascu i sur., 2020; Afrin i sur., 2016). Fenolni spojevi imaju snažno biološko djelovanje

(slika 2) od antikancerogenog do protuupalnog, neuroprotektivnog te antioksidacijskog djelovanja (Afrin i sur., 2016; Giampieri i sur., 2012).



**Slika 1.** Kemijska struktura glavnih polifenola jagode (prema Afrin i sur., 2016)

Najzastupljeniji polifenolni spojevi u jagodama su antocijani (Newerli-Guz i sur., 2023; Urün i sur., 2021; Fierascu i sur., 2020). Odgovorni su za plavu, ljubičastu i crvenu boju mnogih biljnih tkiva (Smeriglio i sur., 2016). U kožici jagode crvena boja je posljedica biosinteze i nakupljanja antocijana (Amini i sur., 2017). U različitim sortama jagoda, više je od 25 različitih antocijanskih pigmenta, od kojih je glavni pelargonidin-3-glukozid koji ima protuupalni učinak, dok su u manjoj mjeri zastupljeni cijanidin-3-glukozid i pelargonidin-3-rutinozid (Sirijan i sur., 2020; Duarte i sur., 2018; Nour i sur., 2017). Mnoge studije su odredile ukupni sadržaj antocijana, izvještavajući o vrijednostima u rasponu od 150 do 600 mg/kg FW (Sirijan i sur., 2020; Afrin i sur., 2016; Giampieri i sur., 2012).



**Slika 2.** Zdravstveni učinci jagoda u kliničkim studijama (prema Afrin i sur., 2016)

U jagodama su prisutni i elagitanini (ET) koji predstavljaju različite kombinacije galne kiseline i heksahidroksidifenske kiseline s glukozom, sa širokim rasponom struktura kao što su monomeri (tj. glikozidi elaginske kiseline (EA)), oligomeri (tj. sanguin H-6, najtipičniji ET u jagoda) i kompleksni polimeri. Zajedno s galotanimima nazivaju se hidroliziranim taninima, a nakon hidrolize otpuštaju elaginsku kiselinu, iako se mogu proizvesti i drugi metaboliti koji su karakteristični za pojedinačne ET (tj. galaginska kiselina) (Enomoto, 2021; Giampieri i sur., 2012). ET imaju antikancerogena, antimutagena, antidijabetička, antibakterijska i antimikotična svojstva (Sharifi-Rad i sur., 2022; Enomoto, 2021). Dnevna porcija jagoda koja sadrži oko 250 g osigurava unos od 39-167 mg ET, ovisno o kultivaru (Gasperotti i sur., 2015). U studiji Koponen i sur. (2007), 33 namirnice koje se često konzumiraju u Finskoj analizirane su na sadržaj ET. Elagitaninski spojevi detektirani su samo u plodovima iz obitelji *Rosaceae* (nordijska kupina, malina, šipak, krkavina i jagoda), u rasponu od 21,7 do 83,2 mg/100 g (FW), dok su slobodni derivati EA određeni u rasponu od 0,7 do 4,3 mg/100 g (FW). Druge studije su izvijestile o sadržaju ET u jagodama od 25 do 59 mg/100 g u svježim uzorcima (Aaby i sur., 2007; Skupien i Oszmianski, 2004).

Jagode također posjeduju manji sadržaj drugih fenolnih spojeva, kao što su flavonoli (tj. kaempferol-3-malonilglukozid i kvercetin) i fenolne kiseline (tj. hidroksibenzojeve kiseline i derivati kafeinske kiseline) (Giampieri i sur., 2014; Giampieri i sur., 2012). Sadržaj i sastav flavonola predmet je brojnih istraživanja, a ovi spojevi identificirani su kao derivati kvercetina



i kampferola, a najzastupljeniji su derivati kvercetina. Acilirani flavonoli kao što su kvercetin i kaempferol-3-malonilglukozid i kaempferol-kumaroilglukozid također su pronađeni u nekim kultivarima jagoda (Alvarez-Suarez i sur., 2014; Aaby i sur., 2007). Flavonoli su jedini spojevi flavonoida koji se prirodno ne pojavljuje kao glikozidi. U jagodama se nalaze u monomernim (katehini) i polimernim oblicima koji se nazivaju kondenzirani tanini ili procijanidini. Iako nisu u velikoj mjeri zastupljeni, procijanidini se često nalaze u mezokarpu i sjemenkama jagode. Zbog različitih fizioloških aktivnosti posjeduju antioksidacijska, antimikrobna, antialergijska i antihipertenzivna svojstva te inhibiraju aktivnost nekih fizioloških enzima i receptora (Dasiman i sur., 2022; Giampieri i sur., 2012). Zahvaljujući prisutnosti flavonoida, jagode smanjuju stupanj oksidacije LDL kolesterola (Newerli-Guz i sur., 2023). Jagode također sadrže niz fenolnih kiselina koje su zastupljene kao derivati hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina (tj. galne kiseline) (Newerli-Guz i sur., 2023; Fierascu i sur., 2020; Giampieri i sur., 2012).

#### **2.4. ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA JAGODE**

Glavni spojevi pronađeni u vrstama roda *Fragaria* (antocijani i neantocijaninski fenolni spojevi) poznati su po svojim antioksidacijskim svojstvima (Braga i sur., 2018; Fierascu i sur., 2018). Pineli i sur. (2011) su proveli studiju na dvije sorte *Fragaria* × *ananassa* Duch. 'Osogrande' i 'Camino Real', u vezi s korelacijom između bioaktivnog sastava i antioksidacijske aktivnosti (utvrđene pomoću DPPH i FRAP testa) u acetonskim ekstraktima dobivenim iz plodova voća različitih faza zrelosti (1/2 zrelosti ili zelene, 3/4 zrelosti ili ružičaste i potpuno zrele ili crvene). Iako su, kao što se i očekivalo, razine antocijana bile više u crvenom mezokarpu koje je potpuno zrelo, najveća antioksidacijska aktivnost, za oba kultivara i oba testa, određena je u plodovima nižeg stupnja zrelosti. Jedinu iznimku predstavljaju rezultati DPPH testa za sortu 'Osogrande' (za koju su najbolji rezultati dobiveni za plodove pune zrelosti); međutim, razlike između rezultata DPPH testa za kultivar u tri faze sazrijevanja nisu bile statistički značajne. Razlike između rezultata mogu se objasniti različitim mehanizmima testova (Fierascu i sur., 2018). Međutim uočena je mnogo bolja korelacija između ukupnog sadržaja polifenola i vitamina C. Sorta 'Osogrande' pokazuje značajnija antioksidacijska svojstva (povezana s višim razinama ukupnog sadržaja fenolne i elaginske kiseline, posebno u ružičastim i crvenim plodovima). Zbog različite polarnosti polifenolnih spojeva zaključeno je kako je etanol, između ostalih, otapalo s najvećim prinosom ispitivanih komponenti i da su, među dijelovima biljke, najbolji rezultati (predstavljani kao Trolox ekvivalenti - TE po gramu ili ekstraktu i po 100 g svježe težine biljke - FW) dobiveni za ekstrakte cvijeća (1460,1 μMol

TE/g ekstrakta), odnosno za bočne ogranke (krunu) (6212,3  $\mu\text{Mol TE}/100\text{g FW}$ ). Lišće stolona također je pokazalo vrlo dobro antioksidacijsko djelovanje. Pojedinačne spojeve (uključujući polifenolne glikozide, flavonske glukuronide i lignanske glikozide) izolirali su Yang i sur. (2016) iz plodova *Fragaria x ananassa* Duch. 'Falandi' i testirali su antioksidacijska svojstva. Najbolji rezultati dobiveni su za flavon glukuronide (u ABTS i DPPH testovima), odnosno za lignan glikozide (u FRAP testu). Uzimajući u obzir rezultate dobivene za pozitivnu kontrolu korištenu u antioksidacijskim testovima (askorbinska kiselina), autori su sugerirali kako ispitivani polifenolni spojevi imaju važnu ulogu u ukupnim antioksidacijskim svojstvima biljke. Suprotno drugim studijama, Chaves i sur. (2017) su pokazali korelaciju između ukupnog sadržaja antocijana i antioksidacijskog potencijala plodova jagoda, u studiji na sedam kultivara. Iz provedenog istraživanja zaključeno je kako je antioksidacijski potencijal biljaka povezan s ukupnim antocijanima, a ne s ukupnim sadržajem fenola. Nowicka i sur. (2019) su objavili studiju o varijacijama u sastavu i antioksidacijskim svojstvima 90 kultivara *Fragaria x ananassa* Duch. tijekom dvije godine proizvodnje. Rezultati su otkrili ne samo da se za neke kultivare može smatrati da imaju superiorna antioksidacijska svojstva ('Roxana', 'Gigaline', 'Selvik', 'Eratina', 'Siria', 'Dagol' i druge), već i, s obzirom na fitokemijski profil, da su glavni spojevi odgovorni za djelovanje tanini, posebice elagitanini i procijanidini.

Zbog sve veće potražnje, jagode se često komercijaliziraju kao prerađeni proizvodi. Učinak sušenja voća na antioksidacijski potencijal *Fragaria x ananassa* Duch. 'Diamante' predstavili su Méndez-Lagunas i sur. (2017). Antioksidacijska analiza provedena na sušenom voću (DPPH testom) potvrdila je 74,7 % gubitka antioksidacijske aktivnosti tijekom termičke obrade na 50 °C, dok je obrada na 60 °C dovela do 66,2 % gubitka aktivnosti. Rezultati su pokazali da, osim temperature, vrijeme toplinske obrade ima jači učinak na antioksidacijsku aktivnost (jer su na višoj temperaturi potrebna kraća razdoblja temperaturnog izlaganja). Slično, nekoliko istraživanja je provedeno u vezi s promjenama antioksidacijske aktivnosti (određene korištenjem ORAC i DPPH testova) tijekom različitih faza proizvodnje pirea (Álvarez-Fernández i sur., 2014). Iako je zabilježeno blago smanjenje antioksidacijskih svojstava (statistički značajno samo za korak pasterizacije), autori preporučuju pire od jagoda kao odličan izvor antioksidansa. Antioksidacijski potencijal jagoda mogao bi brzo pronaći industrijsku primjenu, kao što je bio slučaj s drugim antioksidansima biljnog podrijetla (Kebede i Admassu, 2019; Lourenço i sur., 2019) u, na primjer, mesnoj industriji, kao što su nedavno istražili Lorenzo i sur. (2018), za produljenje roka trajanja različitih proizvoda (kao što su kobasice ili svinjske polpete). Može se primijetiti da većina autora pripisuje antioksidacijski potencijal ukupnom sadržaju polifenola, a posebno nekim klasama spojeva, kao što su antocijani, flavan-

3-oli ili tanini. Uzimajući u obzir pojedinačne vrste, plodovi jagode pokazali su antioksidacijska svojstva u DPPH testu između 76,73 - 100 mg/mL (IC<sub>50</sub>) za različite sorte (najbolji rezultati dobiveni su za kultivar 'Camarosa') (Chaves i sur., 2017) ili između 300 i 1300 µM TE/100 g FW, kod većih istraživanja (obuhvaća 90 kultivara) (Nowicka i sur., 2019). Također, s obzirom na razlike između antioksidacijskog potencijala različitih dijelova biljke, za metanolne ekstrakte *F. chiloensis* najbolja aktivnost je bila primijećena kod plodova, dok je za etanolne ekstrakte najveća vrijednost primijećena u bočnim ograncima (kruni) (6213,3 µMol trolox Equivalent/ 100 g FW). *Fragaria vesca* uglavnom je procijenjena u smislu antioksidacijske aktivnosti lišća, korijena ili vegetativnih dijelova, s antioksidacijskim potencijalom u rasponu od 13,46 mg/L do približno 140 mg/L (IC<sub>50</sub>), što uvelike ovisi o izvoru biljnog materijala i primijenjenoj tehnici ekstrakcije (Dias i sur., 2015; Zugic i sur., 2014).

## 2.5. NEKI OD ČIMBENIKA UTJECAJA NA KVALITETU JAGODE

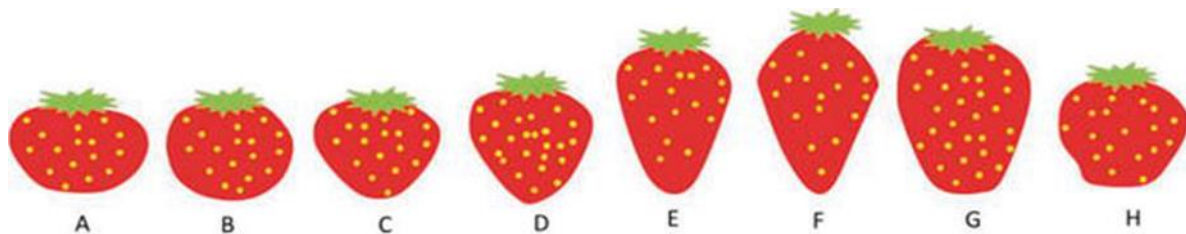
Sastav polifenola u jagodama varira tijekom njihovog rasta i faza sazrijevanja, a u većini slučajeva pulpa nezrelog voća sadrži više polifenolnih spojeva i ima veći antioksidacijski kapacitet od pulpe zrelog voća (Lyu i sur., 2023; Bebek Markovinović i sur., 2022). Profil antocijana također se mijenja tijekom sazrijevanja, ali sa suprotnom tendencijom. Zapravo, u svim kultivarima antocijani se akumuliraju u crvenoj fazi, podudarajući se s crveno obojenim plodovima, dok se male količine nalaze u ružičastim plodovima, a nimalo u zelenim plodovima (Tulipani i sur., 2011; Kosar i sur., 2004). Antioksidacijski kapacitet varira tijekom razdoblja zrenja (engl. *Total Antioxidant Capacity, TAC*) te se postupno smanjuje tijekom zrelosti i to smanjenje je strogo povezano sa smanjenjem sadržaja tanina, dok se polarni nefenolni antioksidansi, poput vitamina C, tek neznatno povećavaju nakon sazrijevanja (Tulipani i sur., 2011; Olsson i sur., 2004). Štoviše, genetska pozadina i uvjeti okoliša igraju važnu ulogu u karakteristikama jagode, jer sadržaj mikronutrijenata i fitokemikalija može uvelike varirati od sorte do sorte i ovisi o uzgojnoj praksi (Krüger i sur., 2021; Urün i sur., 2021; Giampieri i sur., 2012). Konkretno, sadržaj flavonoida je značajno viši u voću nakon skladištenja što bi se moglo pripisati fenolnom metabolizmu voća nakon berbe (Tulipani i sur., 2010; Ayala-Zavala i sur., 2004). Skladištenje pozitivno utječe na antioksidacijski kapacitet jagoda jer složene reakcije koje se odvijaju unutar njih tijekom razdoblja nakon berbe mogu olakšati stvaranje spojeva s povećanim antioksidacijskim kapacitetom, čak i kada su svojstva voća kao što su okus i miris već znatno pogoršana (Piljac-Žegarac i Šamec, 2011).

Općenito, TAC raste tijekom skladištenja (Tulipani i sur., 2010) ili ostaje stabilan (Piljac-Žegarac i Šamec, 2011; Kevers i sur., 2007), a dulje vrijeme izloženosti i viša temperatura skladištenja povećavaju antioksidacijski kapacitet (Jin i sur., 2011; Ayala-Zavala i sur., 2004). Iako se jagode obično konzumiraju kao svježe voće, na tržištu su dostupni mnogi prerađeni proizvodi poput sokova, nektara, pirea, džema i želea. Dokazano je da prerada voća utječe na antioksidacijske spojeve. Općenito, studije su pokazale kako je ukupni sadržaj fenola (engl. *Total Phenolic Compounds*, TPC) i ukupnih antocijana (engl. *Total Anthocyanins*, TA) smanjen u usporedbi sa svježim voćem, a stupanj smanjenja je usko povezan s vremenom proizvodnje i koracima obrade, kao što je toplinska obrada (Bursać Kovačević i sur., 2009; Hartmann i sur., 2008; Klopotek i sur., 2005). Ovi kriteriji mogu biti korisni za prehrambenu industriju kako bi se izbjegle faze prerade i obrade proizvoda koji uvelike smanjuju kvalitetu izvornog voća.

#### 2.5.1. Sortiment

Među antocijanima prisutnim u plodovima jagode, pelargonidin-3-O-glukozid predstavlja više od 80 % ukupnog sadržaja antocijana. Međutim, zabilježena je i značajna varijacija u sadržaju antocijana među različitim kultivarima (Aaby i sur., 2012; Buendía i sur., 2010; Skupien i Oszmianski, 2004). Chaves i suradnici (2017) procijenili su kemijski profil antocijana i fenolnih spojeva sedam različitih kultivara jagoda. Ukupni sadržaj polifenola određen je Folin-Ciocalteu (Singleton i sur., 1999) i Fast Blue BB (Medina, 2011 a,b) testovima. Ukupan sadržaj polifenola izmjeren Folin-Ciocalteu testom bio je jednak ili viši od onog izmjerenog Fast Blue BB testom, što se može objasniti nespecifičnom kvantifikacijom Folin-Ciocalteu testa, na koju mogu utjecati nefenolni spojevi (Medina, 2011 a,b). Utvrđene su značajne razlike ( $p > 0,05$ ) kod kultivara jagoda za TPC određivanog pomoću Folin-Ciocalteu i Fast Blue BB testova. Među analiziranim plodovima jagode 'Monte Rey' je pokazao najviši TPC u obje metode. Također, istraživanje nije otkrilo nikakve razlike između TPC-a pomoću ova dva testa, osim za sorte jagoda 'Albion', 'Monte Rey' i 'San Andreas', koje su pokazale veće TPC-ove Folin-Ciocalteu testom (Chaves i sur., 2017). Ova se razlika može objasniti utjecajem razdoblja berbe i klimatskih uvjeta, kao što je naznačeno u brojnim citiranim studijama (Harakotr i sur., 2014; Voća i sur., 2014; Hernanz i sur., 2007). Ukupni sadržaj antocijana je mjeren pH diferencijalnom i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). pH diferencijalna metoda je glavna metoda spektrofotometrijskog određivanja monomernih antocijana jer je brza i učinkovita (Lee i sur.,

2008; Giusti i Wrolstad, 2001). Ova je metoda pokazala široku varijaciju u sadržaju ukupnih monomernih antocijana u plodovima jagoda, što je vjerojatno djelomično povezano s genetskim karakteristikama kultivara (Chaves i sur., 2017). Kao što je prikazano na slici 3 ovisno o karakteristikama pojedine sorte i genetskom sastavu, dobiva se plod različitih morfoloških karakteristika. Ukupni sadržaj antocijana mjeren pH diferencijalnom metodom izdvojio je 'Camarosu' kao kultivar s najvećim sadržajem monomernih antocijana, dok su 'Portola' i 'Camino Real' bili kultivari koji su pokazali najnižu vrijednost. Uz to 'Camarosa' je također imala najveći sadržaj antocijana određen pomoću HPLC analize (Chaves i sur., 2017). Ukupan sadržaj antocijana bio je veći u određivanju HPLC metodom, nego uz pH diferencijalnu metodu, što se može objasniti nižom osjetljivošću spektrofotometrijskog testa u usporedbi s kromatografskom analizom. Kapacitet hvatanja radikala DPPH ( $EC_{50}$ ) pokazao je slabu korelaciju s TPC ( $r = -0,48$ ), ali jaku korelaciju s TAC ( $r = -0,93$ ), što ukazuje na to kako se antioksidacijski potencijal kultivara jagoda može pripisati uglavnom njihovom ukupnom sadržaju antocijana (Chaves i sur., 2017). Rezultati pokazuju varijabilnost kemijskog sastava u ovisnosti o kultivaru jagoda. Poznavanje ove varijabilnosti može biti korisno za odabir kultivara bogatih bioaktivnim spojevima, ili čak u usmjeravanju oplemenjivanja biljaka, potičući razvoj novih kultivara s kvalitetnijim plodovima.



**Slika 3.** Podjela plodova jagoda prema morfološkim karakteristikama na oblike: A) spljošten; B) kuglasti; C) kuglasti konus; D) stožasti; E) dugi stožac; F) s vratom; G) dugi klin i H) kratki klin (prema Azam i sur., 2019)

### 2.5.2. Skladištenje

Skladištenje nakon berbe može utjecati na razinu antocijana, polifenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet u voću i povrću. Plodovi jagode nakon berbe su vrlo kratkog roka trajanja, uglavnom zbog relativno visokog sadržaja vode i visoke metaboličke aktivnosti. Stoga bi se jagode trebale konzumirati dan ili dva nakon berbe budući da se smanjenje bioaktivnih spojeva poput folata, askorbinske kiseline i antocijana događa čak i nakon jednog dana skladištenja u hladnjaku (Octavia i Choo, 2017). Ayala-Zavala i sur. (2004) su proveli istraživanje kako bi se istražili učinci različitih temperatura na ukupne polifenole, ukupne antocijane i antioksidacijski kapacitet, kao i na glavne sastojke arome i kvalitetu plodova jagoda tijekom skladištenja nakon berbe. Na ukupni sadržaj antocijana značajno su utjecali temperatura i vrijeme skladištenja. Sadržaj antocijana se smanjio u plodu jagode čuvanom na 0 °C i 5 °C tijekom prvih 5 dana. U međuvremenu, sadržaj antocijana u voću skladištenom na 10 °C postupno se povećavao tijekom razdoblja skladištenja i dostigao svoje najveće vrijednosti pred kraj razdoblja skladištenja. Ukupni fenolni spojevi stalno su se povećavali u bobicama pohranjenim na 10 °C i 5 °C. Međutim, plodovi jagoda skladišteni na 0 °C zadržali su konstantnu vrijednost ukupnih fenolnih spojeva tijekom perioda skladištenja. Na proizvodnju aromatskih spojeva znatno su utjecali vrijeme skladištenja i temperatura. Općenito, jagode pohranjene na 10 °C ili 5 °C proizvele su više razine hlapljivih tvari od onih pohranjenih na 0 °C. Zaključno, jagode pohranjene na 0 °C zadržale su prihvatljivu ukupnu kvalitetu tijekom skladištenja od dva tjedna, međutim, voće pohranjeno na temperaturama višim od 0 °C pokazalo je veći sadržaj aromatičnih spojeva. Iako je ukupna kvaliteta bila bolje održavana na 0 °C, viša temperatura skladištenja od 10 °C pozitivno je poboljšala antioksidacijski kapacitet i proizvodnju aromatskih spojeva.

Tehnologije pakiranja su važne kako bi se ispunili zahtjevi produljenog roka trajanja i kako bi se smanjio dodatak aditiva. Jagode su vrlo metabolički aktivne i mogu propasti u relativno kratkom vremenu, čak i bez prisutnosti patogena koji uzrokuju truljenje (DeEll, 2006). Hlađenje je najčešći i dobro korišten način odgađanja sazrijevanja i kvarljivosti plodova (Zhao i sur, 2019; Peng i Sutton, 1991). Hlađenje popraćeno modificiranom atmosferom tijekom transporta ili skladištenja (Peng i Sutton, 1991) također pokazuje dobre rezultate. Pakiranje u modificiranoj atmosferi (engl. *Modified atmosphere packaging*, MAP) se koristi kako bi se spriječilo narušavanje teksture i usporila respiracija svježih plodova jagoda (Zhao i sur., 2019) održavajući razine ugljičnog dioksida između 10 i 30 %, dok razina od 30 % može uzrokovati neprijatan okus (Peng i Sutton, 1991). Istraživanjem koji su proveli Ozkaya i sur. (2009)

ustanovljeno je kako modificirana atmosfera nije utjecala na topljivu suhu tvar (engl. *Soluble Solid Content, SSC*), kiselost, pH, čvrstoću, boju, te sadržaj fruktoze i saharoze nakon skladištenja jagoda pri 0 °C. U MAP skladištenom voću povećao se samo sadržaj glukoze. Kvaliteta plodova se promijenila nakon jednog dana na 20 °C: SSC, čvrstoća i sadržaj glukoze su se smanjili, jagode su promijenile boju; ali nisu zabilježene razlike između pakiranja u dvije atmosfere pri ovim parametrima. MAP je dobro utjecao na jagode nakon skladištenja, omogućivši značajno smanjenje gubitka mase plodova i smanjenje propadanja jagoda i nakon jednog dana držanja plodova na 20 °C. Vrijeme skladištenja utjecalo je na kvalitetu jagoda jer je povećanje ovog parametra rezultiralo smanjenjem SSC-a, kiselosti, razine sadržaja glukoze i saharoze, dok se sadržaj fruktoze povećao. Rezultati su pokazali da MAP može biti koristan za smanjenje gubitka mase i sprječavanje truljenja.

Jestivi premazi mogu pružiti alternativu za produljenje vijeka trajanja svježeg voća nakon berbe. Jestivi premazi izrađeni su od prirodnih spojeva, koji su biorazgradivi i jestivi, kako bi zadovoljili brigu o okolišu i odgovorili na potražnju potrošača (Chettri i sur., 2023; Yan i sur., 2019). Mnogi biološki materijali uključujući polisaharide, proteine, lipide i njihove derivate koriste se za pripremu jestivih premaza (Yaashikaa i sur., 2023; Salehi, 2020). Karboksimetil celuloza (engl. *Carboxymethyl cellulose, CMC*) naširoko se koristi u svježim proizvodima zbog svoje netoksičnosti, biokompatibilnosti, biorazgradivosti, hidrofilnosti i dobre sposobnosti stvaranja filma. CMC premaz također pomaže u održavanju viših razina ukupnih polifenola i ukupnih antocijana u jagodama u usporedbi s netretiranim uzorcima (Gol i sur., 2013). Hitozan je prirodni polisaharid dobiven deacetilacijom hitina iz ljuštura rakova (Moura i sur., 2011). Potencijalno je korišten i kao jestivi premaz i kao aktivni omot zbog svojih netoksičnih i antimikrobnih svojstava (Zhang i sur., 2021). Zabilježeno je da su jestivi premazi na bazi hitozana produžili rok trajanja jagoda i održali nutritivnu kvalitetu jagoda u usporedbi s neobloženom kontrolom (Duran i sur., 2016; Han i sur., 2004.). Jestivi premaz značajno sprječava gubitak težine i propadanje, a također zadržava malu količinu voćnog šećera, održava čvrstoću jagoda, poboljšava njihovu kvalitetu i svojstva skladištenja zato što ovaj premaz usporava metabolizam održavajući rok trajanja (Yan i sur., 2019).

### 2.5.3. Prerada

Kako svježije jagode nisu dostupne na tržištu tijekom cijele godine te zbog njihove dobrobiti za ljudsko zdravlje, potrošači pribjegavaju konzumaciji jagoda kroz različite prerađene proizvode kao što su džemovi ili sokovi. Tako su Levaj i sur. (2012) proveli istraživanje kako bi utvrdili mogu li džemovi predstavljati dobar izvor bioaktivnih spojeva. Preradom u džem od jagode mijenja se sadržaj važnih bioaktivnih spojeva prisutnih u početnom plodu jagode. Rezultati su pokazali da je prerada u džem utjecala na gubitke flavonoida za 14-66 %. Tijekom prerade voća u džemove sadržaj ukupnih fenola se smanjio u svim uzorcima džema za 37 - 70 %. Utvrđene su značajne razlike u količini antocijana među različitim vrstama jagoda. Prerada jagoda u džem zahtijeva tretmane na visokim temperaturama koji mogu promijeniti i oštetiti boju gotovog proizvoda (Martinsen i sur., 2020). Receptura pekmeza, postupci obrade, vrsta staklenke, uvjeti skladištenja i rok trajanja važni su čimbenici za kvalitetu džema. Dobiveni rezultati pokazuju da se kultivari s višim udjelom antocijana brže razgrađuju tijekom prerade. U usporedbi sa svježim plodom jagode, džemovi također predstavljaju zamjetan izvor antioksidacijskih spojeva. Dakle, postupak prerade je imao veći utjecaj na smanjenje svih bioaktivnih spojeva, dok nije imao izraženiji utjecaj na smanjenje antioksidacijskog kapaciteta (Levaj i sur., 2012).

Što se tiče prerade jagoda u sokove, utvrđeno je da je nusproizvod jagode koji ostaje nakon prerade voća u sok izvrstan izvor bioaktivnih spojeva sa snažnim antioksidacijskim potencijalom (Bebek Markovinović i sur., 2022; Villamil-Galindo i sur., 2021). Preradom ploda jagode u sok dolazi do značajnog gubitka fenolnih spojeva (Salazar-Orbea i sur., 2023). Većina fenolnih spojeva, uključujući antocijane, bolje je očuvana u nusproizvodu nego u soku (Bebek Markovinović i sur., 2022; Hartmann i sur., 2008; Aaby i sur., 2005). Najveći udio svih BAC utvrđen je u nusproizvodima jagode, a najmanji u voćnim sokovima što ukazuje na veliku važnost korištenja nusproizvoda jagode u proizvodnji hrane. Što se tiče senzorske analize, svježije voće se nije razlikovalo od odgovarajućih sokova ni po jednom ispitivanom senzorskom parametru, što potvrđuje da senzorna percepcija nije bila narušena tijekom prerade svježeg voća u sok (Bebek Markovinović i sur., 2022).



#### 2.5.4. Utjecaj veličine ili mase plodova na kvalitetu

Ujednačena veličina ploda, kao i sastav, čimbenici su koji utječu na kvalitetu ploda i prihvatljivost voća kod potrošača (Simkova i sur., 2023). Veličina ploda povezana je s veličinom cvjetova i na nju utječu temperaturni uvjeti (Menzel, 2021). Čak i unutar istog kultivara, veličina može varirati ako se uzgaja na različitim lokacijama (Krüger i sur., 2012). Na temelju prethodnih studija (Wang i sur., 2021; Enomoto i sur., 2018), distribucija antocijana i šećera je neravnomjerna u jagodama. Dok su antocijani prisutniji u kori, šećera ima više u unutarnjem dijelu ploda. Budući da omjer kože i mesa može biti različit ovisno o veličini jagode, to može uzrokovati razliku u ukupnom sastavu i posljedično utjecati na organoleptičku i nutritivnu kvalitetu ploda. Simkova i sur. (2023) su proučavali dvije različite sorte ('Lycia' i 'Clery') s različitim karakterističnim oblicima, a za svaku su definirane tri kategorije veličine. Razlike su pokazale da su velike jagode imale veći udio askorbinske kiseline i šećera, dok su mali plodovi imali veći udio antocijana. S druge strane, veličina nije značajno utjecala na fizikalne parametre i aktivnost enzima odgovornih za enzimatsko posmeđivanje. Mali plodovi obično se označavaju kao netržišni za svježju potrošnju, ali se još uvijek mogu koristiti za daljnju preradu, a rezultati su pokazali da mali plodovi ipak trebaju dati željenu boju budući da su antocijani prisutni u velikim količinama. Dakle, mali plodovi mogu poslužiti kao dobar izvor antioksidansa zbog visokog udjela antocijana te mogu biti pogodni za daljnju preradu zbog nižeg udjela askorbinske kiseline i većeg udjela antocijana. Što se tiče nutritivne vrijednosti, nedostatak bi mogao biti niži udio askorbinske kiseline, no visok udio askorbinske kiseline može imati negativan učinak na postojanost boje kod pirea od jagoda. Osim toga, na temelju rezultata, ne bi trebala postojati nikakva razlika u stabilnosti boje zbog slične enzimske aktivnosti. Iako je udio šećera veći u velikim plodovima, razlike u omjeru šećer/kiselina u većini slučajeva nisu toliko značajne, što pokazuje da bi mali plod ipak trebao dati sličan okus krupnijem plodu (Simkova i sur., 2023).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

Cilj eksperimentalnog rada bio je analizirati utjecaj veličine plodova jagode (*Fragaria ananassa* × Duch.) na bioaktivni sastav i antioksidacijski potencijal. U eksperimentu su korištene jagode sorte Albion i to u 3 različite veličine plodova (do 15 g, 15-30 g i iznad 30 g) (tablica 1). Jagode su dobavljene od tvrtke Jagodar-HB d.o.o. iz Donje Lomnice u Zagrebačkoj Županiji. Prije same upotrebe, jagode su oprane i uklonjene su im peteljke. Potom su usitnjene štapnim mikserom kako bi se dobile homogene kaše s ujednačenim veličinama čestica. Kaše su potom korištene za pripremu ekstrakata iz svježih plodova. Također, navedene kaše su korištene i za 3D ispis, te su isti uzorci podvrgnuti ekstrakciji. U svim ekstraktima provedeno je spektrofotometrijsko određivanje BAC i antioksidacijskog kapaciteta. U konačnici, analizirano je ukupno 6 uzoraka: ekstrakti svježih uzoraka jagode (A, B i C), te ekstrakti 3D ispisanih uzoraka (3D-A, 3D-B, 3D-C) (tablica 1).

**Tablica 1.** Uzorci korišteni u eksperimentima

Broj uzorka	Vrsta uzorka	Masa plodova	Šifra
1	Kaša	< 15 g	A
2	Kaša	15-30 g	B
3	Kaša	> 30 g	C
4	3D-ispisani proizvod	< 15 g	3D-A
5	3D-ispisani proizvod	15-30 g	3D-B
6	3D-ispisani proizvod	> 30 g	3D-C

#### 3.2. METODE RADA

##### 3.2.1. Priprema ekstrakata iz svježih plodova jagoda

*Aparatura i pribor:*

- Ultrazvučna kupelj (DT 514 H SONOREX DIGITEC 13,5 L, 860 W, 40 kHz, Bandelin electronic, Njemačka)
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL
- Erlenmeyerova tikvica sa šlifom, volumena 50 mL

- Stakleni lijevak, filter papir
- Plastične falkonice volumena 50 mL

*Otapala:*

- Mravlja kiselina 98 % p.a. (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Metanol za HPLC  $\leq 99,9$  % (Honeywell, Riedel-de-Haën TM, Francuska)
- 1 %-tna mravlja kiselina u 80 %-tnom metanolu (v/v)

Priprema: 80 %-tni metanol se pripremi tako da se 800 mL metanola prenese u odmjernu tikvicu od 1 L te nadopuni destiliranom vodom do oznake. U drugu odmjernu tikvicu od 1 L otpipetira se 10 mL mravlje kiseline i nadopuni do oznake prethodno pripremljenim 80 %-tnim metanolom.

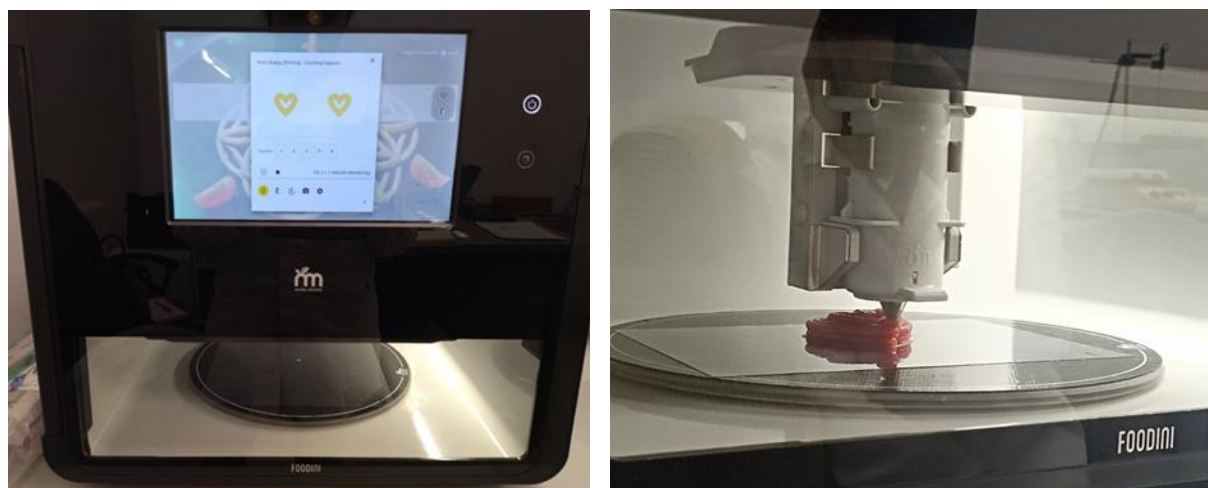
Postupak ekstrakcije: Jagode se usitne i homogeniziraju štapnim mikserom kako bi se pripremila kaša jagode. Odvažuje se 5 g uzorka kaše od jagode u Erlenmeyerovu tikvicu sa šlifom volumena 50 mL te se nadoda 20 mL ekstrakcijskog otapala (1 % mravlja kiselina u 80 %-tnom metanolu, v/v). Tako pripremljena smjesa ekstrahira se u ultrazvučnoj kupelji pri 50 °C tijekom 15 min. Po provedenoj ekstrakciji ekstrakti se profiltriraju u odmjerne tikvice volumena 25 mL i nadopune ekstrakcijskim otapalom do oznake, te skladište na 4 °C do provedbe analiza.

### 3.2.2. Priprema 3D ispisanih proizvoda od jagoda

Za svaki uzorak kaše jagode (A, B i C) ispisan je po jedan 3D proizvod. Nastavno na objavljene rezultate Bebek Markovinović i sur. (2023), škrob koji se koristio je pšenični škrob (Denes Natura Kft., Pečuh, Mađarska) u udjelu od 15 %, a program 3D ispisa je program 2. Smjesa jagode i škroba u udjelu od 15 % zagrijavala se do konstantne temperature pri kojoj je došlo do procesa želatinizacije škroba, odnosno postizanja adekvatne konzistencije smjese pogodne za 3D ispis (slika 4). Za 3D ispis smjese korišten je Foodini 3D pisac (Natural Machines, Barcelona, Španjolska) (slika 5) koji radi na principu ekstruzije.



**Slika 4.** Zagrijane smjese za 3D ispis (*vlastita fotografija*)



**Slika 5.** Foodini 3D pisač (*vlastita fotografija*)

U ovom eksperimentu su korištene kapsule volumena 100 mL s promjerom mlaznica od 4 mm. Odabir željenog oblika i ostalih parametara ispisa postavljeni su putem Foodini Creator Software-a na računalu. Za 3D ispis odabran je oblik srca ispisan u tri sloja dimenzija 53 mm × 51 mm × 12 mm (duljina × širina × visina) (slika 6).



**Slika 6.** 3D ispisani uzorak 3D-A (*vlastita fotografija*)

### 3.2.3. Određivanje pH vrijednosti u 3D ispisanim uzorcima

#### *Aparatura i pribor:*

- pH-metar (FiveEasy, Mettler-Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Kombinirana pH-elektroda (LE438, Mettler-Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Staklena čaša, volumena 25 mL
- Tehnička vaga Kern (PCB 2500-2, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Pipeta, volumena 5 mL
- Stakleni štapić

#### *Otapala i reagensi:*

- Destilirana voda

Priprema uzorka: 5 g uzorka dobivenog 3D ispisom odvažuje se u čaši od 25 mL te se doda 5 mL destilirane vode i homogenizira pomoću staklenog štapića.

Postupak određivanja: pH-metar potrebno je prije prvog mjerenja izbaždariti puferima poznatih pH vrijednosti. Uzorku se pH vrijednost određuje uranjanjem elektrode i očitavanjem pH vrijednosti.

### 3.2.4. Određivanje topljive suhe tvari (% Brix)

Određivanje se temelji na direktnom očitavanju topljive suhe tvari na digitalnom refraktometru (AOAC, 2000).

#### *Aparatura i pribor:*

- digitalni refraktometar (ATAGO PAL-3, Atago Co., LTD, Tokyo, Japan)
- staklene čašice volumena 50 mL
- staničevina
- Mikropipeta Eppendorf 1000  $\mu$ L

#### *Postupak mjerenja*

Prije početka svakog mjerenja refraktometar je potrebno baždariti prema destiliranoj vodi na nultu vrijednost pri 20 °C. Mikropipetom se otpipetira 0,3 mL uzorka koji se izravno nanese na staklenu prizmu uređaja te se pritiskom na tipku „start“ izravno očita vrijednost topljive suhe tvari. Mjerenja u svim uzorcima provedena su u paralelnim određivanjima.

### 3.2.5. Priprema ekstrakata iz 3D ispisanih uzoraka

Ekstrakcija 3D ispisanih uzoraka potpomognuta je ultrazvukom visoke snage te se provodi primjenom ultrazvučnog procesora (UP400St, Hielscher Ultrasound Technology, Njemačka) (slika 8). Djelovanjem ultrazvuka nastaju kavitacijski mjehurići koji razbijaju staničnu strukturu materijala, omogućavajući tako bolje prodiranje otapala u matriks, što posljedično povećava prijenos mase i skraćuje trajanje ekstrakcije. Kao ekstrakcijsko otapalo korištena je vodena otopina metanola (80 %, v/v) s 1 %-tnom mravljom kiselinom (v/v).

#### *Aparatura i pribor:*

- Ultrazvučni procesor (UP400St, Hielscher Ultrasound Technology, Njemačka)
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Odmjerne tikvice, volumena 50 mL, 1 L
- Menzura, volumena 50 mL, 1 L
- Pipeta, volumena 10 mL
- Stakleni lijevak, filter papir
- Plastične falkonice volumena 50 mL

- Staklene čaše, volumena 100 mL
- Metalna špatula

*Otapala i reagensi:*

- Mravlja kiselina 98 % p.a. (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Metanol za HPLC  $\leq 99,9$  % (Honeywell, Riedel-de-Haën TM, Francuska)
- 1 %-tna mravlja kiselina u 80 %-tnom metanolu (v/v)

Priprema: 80 %-tni metanol priprema se u odmjernoj tikvici od 1 L tako da se u nju prenese 800 mL metanola te se nadopuni destiliranom vodom do oznake. U drugu se odmjernu tikvicu od 1 L prenese 10 mL mravlje kiseline i nadopuni se do oznake s prethodno pripremljenim 80 %-tnim metanolom.

Postupak ekstrakcije: Na analitičkoj vagi u staklenu čašu od 100 mL odvažuje se 10 g 3D ispisanog uzorka te se nadoda 40 mL ekstrakcijskog otapala. Pripremljena smjesa se ekstrahira pomoću ultrazvučnog procesora, a zadani parametri ekstrakcije su: amplituda 50 %, puls 100 % i ekstrakcijsko vrijeme 5 minuta. Nakon provedene ekstrakcije, ekstrakt se od taloga odvoji u odmjernu tikvicu od 50 mL preko staklenog lijevka i filter papira, a potom se nadopuni do oznake ekstrakcijskim otapalom. Dobiveni ekstrakti se prebace u plastične falkonice volumena 50 mL te se uzorci čuvaju na 4 °C do provedbe ostalih analiza.

U svim ekstraktima su spektrofotometrijski određivani bioaktivni spojevi i antioksidacijski kapacitet kako slijedi: ukupni fenoli, ukupni flavonoidi, hidroksicimetne kiseline, flavonoli, kondenzirani tanini, monomerni antocijani, DPPH i FRAP.

### 3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje bioaktivnih spojeva

#### 3.2.6.1. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja: Određivanje ukupnih fenola provodi se u metanolnom ekstraktu uzorka primjenom modificirane spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 725 nm (Yuan i sur., 2018).

### *Aparatura i pribor:*

- UV/VIS Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastična lađica za vaganje, špatula
- Pipete, volumena 5 mL, 10 mL
- Mikropipete Eppendorf, volumena 200  $\mu$ L i 1000  $\mu$ L
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 100 mL, 1000 mL
- Staklena čaša volumena 200 mL
- Staklena menzura od 100 mL i 1 L
- Stakleni lijevak, filter papir

### *Otapala i reagensi:*

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens), 5x razrijeđen (Fisher Scientific UK, Loughborough, Velika Britanija)
- Etanol 96 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Otopina natrijevog karbonata, 7,5 % (w/v)

Priprema: Odvažuje se 75 g anhidrida natrijeva karbonata u staklenoj čaši te se pomoću destilirane vode kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 1000 mL te destiliranom vodom nadopuni do oznake.

- Standard galne kiseline 97,5 - 102,5 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Otopina standarda galne kiseline 5 g/L

Priprema: Odvažuje se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

Priprema uzorka: Ekstrakti se pripremaju kako je opisano u poglavljima 3.2.1. i 3.2.5.

Postupak određivanja: U epruvetu se otpipetira redom 400  $\mu$ L ekstrakta, 400  $\mu$ L F.C. reagensa (koji je prethodno razrijeđen s destiliranom vodom 5x) i 4 mL 7,5 %-tne otopine natrijevog karbonata. Reakcijska smjesa stoji 20 minuta na sobnoj temperaturi te se mjeri apsorbancija pri



valnoj duljini od 725 nm. Određivanje se provodi u paraleli, a kao slijepa proba koristi se ekstrakcijsko otapalo. Uzorci ekstrakata plodova i 3D ispisanih proizvoda jagode razrjeđuju se ekstrakcijskim otapalom 4x (100 µL ekstrakta + 300 µL ekstrakcijskog otapala).

### *Izračunavanje*

Izrada baždarnog pravca: Za izradu baždarnog pravca odvaže se 500 mg galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerne tikvici od 100 mL i nadopuni se destiliranom vodom do oznake. Od te otopine galne kiseline (5 g/L) rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 25 mL tako da se otpipetira redom 50, 125, 250, 500, 750 i 1250 µL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se ista nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 10, 25, 50, 100, 150, 250 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 400 µL otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodaje 400 µL F.C. reagensa (koji je 5x razrijeđen) i 4 mL 7,5 %-tnog natrijeva karbonata (w/v). Na isti način se pripremi slijepa proba, ali se umjesto otopine standarda uzima destilirana voda. Uzorci stoje 20 minuta na sobnoj temperaturi, a nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 725 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 725 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (1):

$$y = 0,0078x - 0,0032 \quad R^2 = 0,9983 \quad [1]$$

gdje je: y- apsorbancija uzorka pri 725 nm

x- koncentracija galne kiseline (mg/L)

### 3.2.6.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida

Princip određivanja: Određivanje ukupnih flavonoida provodi se u metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijskim kloridom i kalijevim acetatom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 415 nm (Chang i sur., 2002).

#### *Aparatura i pribor:*

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Pipete, volumena 5 mL, 10 mL
- Mikropipete Eppendorf od 200, 1000 i 5000  $\mu$ L
- Odmjerne tikvice, volumena 25, 100 i 1000 mL
- Menzura, volumena 100 mL i 1000 mL
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Plastične lađice za vaganje, špatula

#### *Otapala i reagensi:*

- Etanol 96 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Metanol za HPLC  $\leq$  99,9 % (Honeywell, Riedel-de-Haën TM, Francuska)
- Aluminijski klorid, 98,5 %, anhidrid (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Aluminijski klorid, 10 % (w/v)

Priprema: 10 g aluminijskog klorida se otopi u 10 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- Kalijev acetat, 99 %, anhidrid (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Kalijev acetat, 1 M

Priprema: 9,845 g kalijevog acetata otopi se u 10 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- Standard kvercetin, 95 %, hidrat (Acros Organics, Kina)
- Otopina standarda kvercetina, 200 mg/L

Priprema: Odvaže se 20 mg standarda kvercetina u platičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 200 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom. Iz alikvotne otopine prirede se redom razrijeđenja od 10, 25, 50, 75, 100 i 150 mg/L.

Priprema uzorka: Ekstrakti se pripremaju kako je opisano u poglavljima 3.2.1. i 3.2.5.

Postupak određivanja: U staklenu epruvetu otpipetira se redom 0,5 mL ekstrakta, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijskog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju te se umjesto 10 %-tnog aluminijskog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

#### *Izračunavanje*

Izrada baždarenog pravca: Potrebno je pripremiti otopinu standarda kvercetina koncentracije 200 mg/L. Od te otopine standarda pripreme se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 25 mL tako da se otpipetira redom 1,25; 3,125; 6,25; 9,375; 12,5; 18,75 mL alikvota standardne otopine kvercetina u svaku tikvicu i potom se nadopune do oznake 100 %-tnim metanolom. Koncentracije kvercetina u tim tikvicama iznose 10, 25, 50, 75, 100 i 150 mg/L. Također se za analizu uzima i alikvotna otopina standarda koncentracije 200 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se redom 0,5 mL otopine standarda, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijskog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100%-tni metanol te se umjesto 10 %-tnog aluminijskog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanese koncentracije kvercetina (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 415 nm.

Koncentracija ukupnih flavonoida izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (2):

$$y = 0,0064x - 0,0362 \quad R^2 = 0,9998 \quad [2]$$

gdje je: y – apsorbancija pri 415 nm,

x – koncentracija kvercetina (mg/L).

### 3.2.6.3. Spektrofotometrijsko određivanje hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Princip određivanja: U metanolnom ekstraktu uzoraka provodi se spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm i 360 nm (Howard i sur., 2003).

#### *Aparatura i pribor:*

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene i kvarcne kivete
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Mikropipete Eppendorf od 200, 1000 i 5000  $\mu$ L
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1 L
- Menzura, volumena 100 mL i 1000 mL
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Plastična ladica za vaganje, špatula

#### *Otapala i reagensi:*

- Koncentrirana klorovodična kiselina 37 % (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Etanol 96 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična otopina 1 g/L HCl u 96 % etanolu (v/v)

Priprema: 0,227 mL 37 %-tne koncentrirane klorovodične kiseline se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni 96 %-tnim etanolom do oznake.

- Klorovodična otopina 2 g/L HCl u vodi (v/v)

Priprema: 0,454 mL 37 %-tne koncentrirane klorovodične kiseline se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te se nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- Standard kvercetin hidrat 95 % (Acros Organics, Kina)
- Otopina standarda kvercetina 600 mg/L

Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda kvercetina u koncentraciji 600 mg/L. Odvažuje se 60 mg standarda kvercetina u plastičnoj ladici za vaganje te se pomoću 30 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

- Klorogenska kiselina, min. 95 %-tna (Alfa aesar, ThermoFisher, Kandel, Njemačka)
- Standard klorogenske kiseline koncentracije 600 mg/L

Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda klorogenske kiseline u koncentraciji 600 mg/L. Odvaži se 60 mg standarda klorogenske kiseline u plastičnoj ladici za vaganje te se pomoću 30 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

Priprema uzorka: Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u poglavljima 3.2.1. i 3.2.5.

Postupak određivanja: U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL ekstrakta, 250 µL 1 g/L HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm, dok se za određivanje ukupnih flavanola apsorbancija mjeri na 360 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

#### *Izračunavanje*

Izrada baždarnog pravca: Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za klorogensku kiselinu, dok se kvantifikacija ukupnih flavonola provodi pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kvercetin.

#### **Klorogenska kiselina**

Iz alikvotne otopine standarda 600 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja: 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 i 500 mg/L na način da se iz otopine alikvota otpipetira redom: 0,416; 1,042; 2,083; 3,125; 4,166; 6,25; 8,333; 12,5 i 20,833 mL i nadopuni 100 %-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 25 mL. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto standarda uzima 100 %-tni metanol.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL otopine standarda, 250 µL 1 g/L HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm u kvarcnim kivetama. Koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (3):

$$y = 0,0025x - 0,0038 \quad R^2 = 0,9996 \quad [3]$$

gdje je: y – apsorbancija pri 320 nm,

x – koncentracija klorogenske kiseline (mg/L).

## Kvercetin

Iz alikvotne otopine standarda 600 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja: 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 i 500 mg/L na način da se iz otopine alikvota otpipetira redom: 0,416; 1,042; 2,083; 3,125; 4,166; 6,25; 8,333; 12,5; 16,666 i 20,833 mL i nadopuni 100 %-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 25 mL. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto standarda uzima 100 %-tni metanol.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL otopine standarda, 250 µL 1 g/L HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih flavonola apsorbancija se mjeri na 360 nm u staklenim kivetama. Koncentracija ukupnih flavanola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (4):

$$y = 0,0026x + 0,0083 \quad R^2 = 0,9995 \quad [4]$$

gdje je: y – apsorbancija pri 360 nm,

x – koncentracija kvercetina (mg/L).

### 3.2.6.4. Određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom

Princip određivanja: Princip određivanja polimernih proantocijanidina temelji se na specifičnosti spojeva iz skupine flavan-3-ola da reagiraju s vanilinom uslijed čega nastaju obojeni spojevi koji se kvantitativno određuju mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 500 nm (Sun i sur., 1998).

*Aparatura i pribor:*

- Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Mikropipete Eppendorf volumena 100 µL i 1000 µL
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL, 50 mL, 100 mL i 1000 mL
- Menzure, volumena 100 mL i 1000 mL
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Plastične ladice za vaganje, špatula

- Stakleni lijevak, filter papir
- Staklene čaše volumena 50 mL, 100 mL i 250 mL

*Otapala i reagensi:*

- Metanol za HPLC  $\leq 99,9\%$  (Honeywell, Riedel-de-Haën<sup>TM</sup>, Francuska)
- Vanilin, 99% (ThermoFisher, Kandel, Njemačka)
- 1 %-tna metanolna otopina vanilina

Priprema: 1 g vanilina se u odmjerne tikvici od 100 ml nadopuni 100 %-tnim metanolom do oznake.

- Koncentrirana H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 96% (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- 25 %-tna otopina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Priprema: 13,02 mL 96 %-tne H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> prenese se u odmjernu tikvicu od 50 mL u koju je prethodno dodano malo 100 %-tnog metanola (cca 20 mL). Tikvica se obavezno drži u hladnoj vodenoj kupelji, a koncentrirana H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se dodaje u malim obrocima. Po dodatku cijelog volumena kiseline, tikvica se do oznake nadopuni 100 %-tnim metanolom.

- Standard katehina (5 g/L)

Priprema: Odvažuje se 500 mg standarda katehina u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

Priprema uzorka: Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u poglavljima 3.2.1. i 3.2.5.

Postupak određivanja: U staklenu epruvetu otpipetira se redom 2,5 mL 1 %-tnog vanilina, 2,5 mL 25 %-tne otopine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 1 mL ekstrakta. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci ostave stajati 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 500 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

*Izračunavanje*

Izrada baždarnog pravca: Za pripremu baždarnog pravca pripremi se alikvotna otopina standarda katehina koncentracije 5 g/L (5000 mg/L). Od te otopine prirede se slijedeća

razrijeđenja: 10, 30, 60, 90 i 120 mg/L na način da se otpipetira redom: 50, 150, 300, 450 i 600 µL alikvotne otopine u odmjerne tikvice od 25 mL, te se do oznake nadopune 100 %-tnim metanolom.

Iz svake tikvice otpipetira se 1 mL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje 2,5 mL 1 %-tnog vanilina i 2,5 mL 25 %-tne otopine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Uzorci se ostave stajati 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 500 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima metanol.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije katehina (mg/100 mL), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 500 nm. Koncentracija polimernih proantocijanidina izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (5):

$$y = 0,0053x - 0,0124 \quad R^2 = 0,9985 \quad [5]$$

gdje je: y- apsorbancija uzorka pri 500 nm

x- koncentracija katehina (mg/L)

### 3.2.6.5. Spektrofotometrijsko određivanje monomernih antocijana

Princip određivanja: Kvantitativno određivanje monomernih antocijana zasniva se na svojstvu antocijana da pri promjeni pH vrijednosti reverzibilno mijenjaju svoju kemijsku strukturu pri čemu dolazi do promjene apsorpcijskog spektra. Sniženje pH otopine izaziva povećanje apsorpcije i obrnuto, a koncentracija antocijana proporcionalna je razlici apsorbcija u otopinama kod dva različita pH pri valnoj dužini maksimalne apsorpcije za pojedine antocijane (AOAC, 1990).

*Aparatura i pribor:*

- Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- pH metar Mettler-Toledo FiveEasy F20 (Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Švicarska)
- Staklena čaša, stakleni lijevak, filter papir
- Staklene kivete
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastična ladica za vaganje, špatula



- Mikropipete Eppendorf, volumena 1000  $\mu\text{L}$  i 5000  $\mu\text{L}$
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1000 mL

*Otapala i reagensi:*

- Klorovodična kiselina 37 % (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Kalij klorid 99,0-100,5 % (ThermoFisher GmbH, Kandel, Njemačka)
- Kalij kloridni pufer pH 1,0 (kalij klorid 0,025 M)

Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje odvažuje se 1,86 g kalijeva klorida (KCl) koji se kvantitativno prenese u staklenu čašu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom, te se doda 960 mL deionizirane vode i odvaga se otopi. Pripremljenoj otopini izmjeri se pH, i podesi na vrijednost 1,0 ( $\pm 0,05$ ) s klorovodičnom kiselinom (37 % HCl), čiji utrošak približno iznosi 10 mL. Kada je otopina podešena na pH 1,0 prebaci se u odmjernu tikvicu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom, te do oznake nadopuni deioniziranom vodom.

- Natrij acetat anhidrid 99 % (ThermoFisher GmbH, Kandel, Njemačka)
- Natrij acetatni pufer 4,5 (natrijev acetat, 0,4 M)

Priprema: U staklenoj čaši volumena 100 mL odvažuje se 54,43 g natrijeva acetata trihidrata ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) koji se kvantitativno prenese u staklenu čašu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom, te se doda 930 mL deionizirane vode i odvaga se otopi. Pripremljenoj otopini izmjeri se pH, i podesi na vrijednost 4,5 ( $\pm 0,05$ ) s klorovodičnom kiselinom (37 % HCl), čiji utrošak približno iznosi 35 mL. Kada je otopina podešena na pH 4,5 prebaci se u odmjernu tikvicu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom, te do oznake nadopuni deioniziranom vodom.

Priprema uzorka: Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u poglavljima 3.2.1. i 3.2.5.

Postupak određivanja: Reakcija se postavlja u staklenim epruvetama na način da se za mjerenje jednog uzorka pripreme po dvije epruvete i označe se oznakama pufera (npr. za isti uzorak se na jednu epruvetu napiše pH 1, a na drugu pH 4,5). U svaku se epruvetu potom otpipetira po 1 mL pripremljenog ekstrakta (ili uzorka), a potom se u jednu epruvetu nadoda 4 mL pufera pH 1,0, a u drugu 4 mL pufera pH 4,5. Nakon 20 minuta, pripremljenim reakcijskim otopinama, mjeri se apsorbanacija pri 520 nm i 700 nm, uz deioniziranu vodu kao slijepu probu. Ukoliko su

pripremljene reakcijske otopine mutne, poželjno je prije spektrofotometrijskog mjerenja provesti centrifugiranje ili filtriranje kako bi se uklonile čestice mutnoće.

Izračunavanje:

Koncentracija monomernih antocijana u uzorku izračunava se kao ekvivalent pelargonidin-3-glukozida (mg/L) prema formuli (6):

$$\frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l} \quad [6]$$

gdje je:

$$A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}=1,0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}=4,5}$$

MW = molekulska masa (za pelargonidin-3-glukozid  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{ClO}_{10}$  = 468,8 g/mol)

DF = faktor razrjeđenja

$10^3$  = faktor za preračunavanje g u mg

$\epsilon$  = molarni apsorpcijski ekstinkcijski koeficijent (za Pel-3-Glc 31600 L mol/cm u otapalu 1 % HCl/MeOH)

l = debljina kivete (1 cm)

### 3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

#### 3.2.7.1. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) metoda

Princip određivanja: DPPH• je stabilan radikal zbog delokalizacije slobodnog elektrona na aromatskim prstenovima. Apsorpcijski maksimum postiže pri 517 nm. U reakciji s antioksidansom koji je donor elektrona, dolazi do redukcije DPPH• radikala i sparivanja nesparenog elektrona s vodikom antioksidansa (DPPH-H). Reakcija rezultira smanjenjem apsorpcije te prijelaza iz ljubičaste u žutu boju. Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona (Prior i sur., 2005; Braca i sur., 2001).

#### *Aparatura i pribor:*

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL i 10 mL
- Mikropipete Eppendorf od 200, 1000 i 5000  $\mu$ L
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 100 mL
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Plastična lađica za vaganje, špatula

#### *Otapala i reagensi:*

- Metanol za HPLC  $\leq 99,9$  % (Honeywell, Riedel-de-Haën <sup>TM</sup>, Francuska)
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) (Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD)
- Otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) 0,5 mM u 100 % metanolu

Priprema: 0,02 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala odvažuje se u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu te nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. DPPH je potrebno čuvati na tamnome u zatvorenoj tikvici.

- Standard Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) (Biosynth s.r.o., Bratislava, Slovačka)
- Otopina Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) 0,02 M

Priprema: Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 0,02 M otopina Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) tako da se odvažuje 500 mg Trolox u plastičnoj lađici za vaganje. Odvaga se kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu i nadopuni metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. Otopinu Trolox potrebno je čuvati na tamnom (tikvica se zamota u aluminijsku foliju) i koristi se uvijek svježe pripremljena otopina standarda.

Priprema uzorka: Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u poglavljima 3.2.1. i 3.2.5.

Postupak određivanja: Postupak određivanja provodi se prema metodi za određivanje AA u ekstraktima gloga (Shortle i sur., 2014). U epruvetu se otpipetira 1,5 mL ekstrakta te 3 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za kontrolu je potrebno otpipetirati 1,5 mL 100 %-tnog metanola te 3 mL 0,5 mM otopine DPPH. Od izmjerene apsorbancije kontrole potrebno je oduzeti apsorbanciju uzorka. Za slijepu probu u epruvetu se ulije 4,5 mL 100 %-tnog metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.

Ukoliko izmjerene apsorbancije prelaze vrijednost 1,0 ekstrakte uzoraka je potrebno razrijediti na način da izmjerene apsorbancije u razrijeđenim ekstraktima iznose od 0,1 do 0,9.

#### *Izračunavanje*

Izrada baždarnog pravca za Trolox: Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 0,02 M otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina). Od 0,02 M otopine Troloxa pripreme se razrijeđenja u koncentracijama 125, 150, 200, 400 i 600  $\mu\text{M}$  na način da se redom otpipetira 156; 187,5; 250; 500 i 750  $\mu\text{L}$  u odmjerne tikvice od 25 mL, te se iste do oznake nadopune 100 %-tnim metanolom.

U epruvetu se odpipetira 1,5 mL odgovarajuće otopine Troloxa te 3 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za kontrolu je potrebno otpipetirati 1,5 mL 100 %-tnog metanola te 3 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se otpipetira 4,5 mL 100 %-tnog metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm, uz 100 %-tni metanol kao slijepu probu. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac pomoću računala (program Microsoft Office Excel) s vrijednostima koncentracije Troloxa ( $\mu\text{M}$ ) na apscisi i vrijednostima apsorbancije na ordinati. Iz pripadajuće jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijski kapacitet uzoraka određen DPPH metodom (7):

$$y = -0,0037x + 2,3781 \quad R^2 = 0,9902 \quad [7]$$

gdje je: y – apsorbancija pri 517 nm,

x – koncentracija Troloxa ( $\mu\text{M}$ ).

### 3.2.7.2. FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power Assay*) metoda

Princip određivanja: Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom temelji se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tris-2-piridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridiltriazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Benzie, 1996).

#### *Aparatura i pribor:*

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Tehnička vaga Kern (PCB 2500-2, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Mikropipete Eppendorf od 200, 1000 i 5000  $\mu$ L
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL, 25 mL, 100 mL i 1 L
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Plastična lađica za vaganje, špatula

#### *Otapala i reagensi:*

- Metanol za HPLC  $\leq 99,9$  % (Honeywell, Riedel-de-Haën <sup>TM</sup>, Francuska)
- Standard Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) (Biosynth s.r.o., Bratislava, Slovačka)
- Otopina Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina), 1 mM

Priprema: Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 1 mM otopina Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) tako da se odvaže 0,025 g Trolox. Odvaga se otopi u 100 %-tnom metanolu i nadopuni metanolom u odmjerne tikvici od 100 mL.

- Klorovodična kiselina, 37 %-tna (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Klorovodična kiselina, 40 mM

Priprema: Otpipetira se 330  $\mu$ L 37 %-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom u odmjerne tikvici od 100 mL.

- TPTZ-a (2,4,6-tris-2-piridil-s-triazin) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- TPTZ-a (2,4,6-tris-2-piridil-s-triazin), 10 mM

Priprema: Odvaži se 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuni do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom.

- Željezo (III)-klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Željezo (III)-klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ), 20 mM otopina

Priprema: Odvaži se 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake s destiliranom vodom.

- Glacijalna octena kiselina,  $\geq 99,8\%$  (Honeywell, Fluka™, Seelze, Njemačka)
- Natrijev acetat trihidrat otporan prema kalijevu permanganatu (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6

Priprema: Odvaži se 3,1 g natrij-acetat trihidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L, u koju se potom otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

- FRAP reagens

Priprema: U staklenoj čaši volumena 50 mL pripremi se FRAP reagens na način da se pomiješa 25 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.

Prije početka rada sve reagense (uključujući i standarde) potrebno je inkubirati na 37 °C.

Priprema uzorka: Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u poglavlju 3.2.1. i 3.2.5.

Postupak određivanja: U staklene epruvete redom se otpipetira 600  $\mu\text{L}$  ekstrakta i 4500  $\mu\text{L}$  FRAP reagensa, dobro se promiješa te 10 minuta termostatira na temperaturi 37 °C. Zatim se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje otapalo u kojem je uzorak ekstrahiran. Ukoliko izmjerene apsorbancije prelaze vrijednost 1,0 ekstrakte uzorka je potrebno razrijediti na način da izmjerene apsorbancije u razrijeđenim ekstraktima iznose od 0,1 do 0,9.

### *Izračunavanje*

Izrada baždarnog pravca za Trolox: Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 1 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) tako da se odvaži 0,025 g Troloxa. Odvaga se otopi u 100 %-tnom metanolu i nadopuni metanolom u odmjerneju tikvici od 100 mL.

Od 1 mM otopine Troloxa pripreme se razrijeđenja u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 125 i 150  $\mu\text{M}$  na način da se redom otpipetira 0,25; 0,625; 1,25; 2,5; 3,125; 3,75 i 5 mL u odmjerneju tikvice od 25 mL, te se iste do oznake nadopune 100 %-tnim metanolom.

U staklene epruvete redom se otpipetira 600  $\mu\text{L}$  otopine standarda i 4500  $\mu\text{L}$  FRAP reagensa, dobro se promiješa te 10 minuta termostatira na temperaturi 37 °C (vodena kupelj od rotavapora). Zatim se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje 100 %-tni metanol.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije nacrtava se baždarni pravac pomoću računala (program Microsoft Office Excel) s vrijednostima koncentracije Troloxa ( $\mu\text{M}$ ) na apscisi i vrijednostima apsorbancije nanesenim na ordinati. Iz pripadajuće jednadžbe pravca izračunava se antioksidacijski kapacitet uzoraka određen FRAP metodom (8):

$$y = 0,005x - 0,0081 \quad R^2=0,9992 \quad [8]$$

gdje je: y – apsorbancija pri 593 nm,

x – koncentracija Troloxa ( $\mu\text{M}$ ).

### **3.3. OBRADA PODATAKA**

Dobiveni rezultati obrađeni su u programu Statistica 12. Statistička značajnost utjecaja procesnih parametara na parametre deskriptivne statistike određena je multifaktorskom analizom varijance (MANOVA). Rezultati su smatrani statistički značajnima ukoliko je  $p \leq 0,05$  (95 % -tna razina signifikantnosti).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Ekperimentalnim radom analizirano je 6 uzoraka u paralelnim određivanjima (ekstrakti svježih uzoraka jagode A, B i C te ekstrakti 3D ispisanih uzoraka 3D-A, 3D-B, 3D-C). Varijable koje su tijekom istraživanja izmjerene te potom statistički obrađene obuhvaćaju vrijednosti topljive suhe tvari i pH te koncentraciju bioaktivnih spojeva te antioksidacijskog kapaciteta određenog primjenom DPPH i FRAP metode. Rezultati statističke obrade podataka prikazani su u tablici 2, tablici 3, tablici 4, tablici 5 te tablici 6.

### 4.1. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA SVJEŽIH PLODOVA JAGODA I 3D ISPISANIH PROIZVODA NA BAZI JAGODA

U svim analiziranim uzorcima su provedena fizikalno-kemijska ispitivanja kako bi se utvrdile vrijednosti topljive suhe tvari i pH. Nakon provedene statističke obrade rezultata utvrđeno je kako postoje varijacije između topljive suhe tvari i pH vrijednosti u svježim plodovima jagoda, kao i u 3D ispisanim proizvodima na bazi jagode (tablica 2). U svježim plodovima jagode nema statistički značajne razlike u topljivoj suhoj tvari među plodovima mase <15 g te plodova mase u rasponu od 15-30 g. Isto tako, uočeno je kako vrijednost topljive suhe tvari kod plodova mase <15 g i onih mase >30 g nije statistički značajna. Jedina razlika uočena je između plodova mase od 15-30g i plodova >30 g gdje je vidljivo kako svježi plodovi jagoda u rasponu od 15-30 g imaju veću vrijednost topljive suhe tvari ( $9,40 \pm 0,17$  mg/100 g) u odnosu na one čija je masa >30 g ( $8,75 \pm 0,17$  mg/100 g). Međutim, gledajući 3D ispisane proizvode utvrđeno je kako nema statistički značajne razlike u topljivoj suhoj tvari ovisno o masi jagoda koje su korištene za ispis 3D proizvoda, stoga se može zaključiti kako masa jagoda u proizvodnji 3D ispisanih proizvoda ne utječe značajno na vrijednosti topljive suhe tvari.

Gledajući pH vrijednosti kod svježih plodova jagoda različitih masa utvrđeno je kako nema statistički značajne razlike između plodova jagoda mase 15-30 g i plodova >30 g, a za koje su utvrđene veće pH vrijednosti u usporedbi s plodovima jagoda mase <15 g. Dobiveni rezultati upućuju da plodovi veće mase (>15 g) imaju veću vrijednost pH u odnosu na plodove manje mase (<15 g). Za razliku od svježih plodova, u 3D ispisanim proizvodima ne postoji statistički značajna razlika u pH vrijednostima u ovisnosti o masi plodova jagoda koje su korištene za 3D ispis proizvoda od jagode. Uzimajući u obzir izmjerene pH vrijednosti utvrđeno je kako dobivene vrijednosti odgovaraju rezultatima koje su dobili Simkova i sur. (2023) čije su vrijednosti bile u rasponu od 3,30 do 3,82 u svježim plodovima. Isti autori su utvrdili



vrijednosti topljive suhe tvari u svježim plodovima jagode u rasponu od 7,89 kod malih plodova do 9,08 kod velikih plodova; te je uočeno kako su vrijednosti nešto niže u odnosu na rezultate dobivene ovim istraživanjem.

**Tablica 2.** Rezultati za topljivu suhu tvar i pH vrijednost u svježim jagodama i 3D ispisanim proizvodima na bazi jagode

Izvor varijacije		Topljiva suha tvar (%)	pH
Svježi plodovi	<b>n</b>	$p = 0,02^{\dagger}$	$p = 0,03^{\dagger}$
<15 g	4	$9,09 \pm 0,17^{a,b}$	$3,41 \pm 0,01^b$
15-30 g	4	$9,40 \pm 0,17^a$	$3,47 \pm 0,01^a$
>30 g	4	$8,75 \pm 0,17^b$	$3,45 \pm 0,01^a$
3D ispisani proizvodi		$p = 0,98^{\ddagger}$	$p \leq 0,01^{\dagger}$
<15 g	4	$31,39 \pm 0,68^a$	$3,49 \pm 0,00^a$
15-30 g	4	$31,22 \pm 0,68^a$	$3,57 \pm 0,00^a$
>30 g	4	$31,41 \pm 0,68^a$	$3,60 \pm 0,00^a$

\*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na  $p \leq 0,05$

#### 4.2. BIOAKTIVNA SVOJSTVA SVJEŽIH PLODOVA JAGODA I 3D ISPISANIH PROIZVODA NA BAZI JAGODA

Nakon provedenog spektrofotometrijskog određivanja bioaktivnih spojeva dobiveni su rezultati statistički obrađeni i prikazani u tablici 3.

Prosječna vrijednost ukupnih polifenolnih spojeva u svježim i 3D ispisanim uzorcima iznosi  $126,33 \pm 1,01$  mg/100 g dok su među analiziranim podskupinama fenolnih spojeva najzastupljeniji kondenzirani tanini ( $86,75 \pm 0,55$  mg/100 g), slijede ih hidroksicimetne kiseline ( $52,74 \pm 0,53$  mg/100 g) potom flavonoli ( $31,34 \pm 0,39$  mg/100 g) te na poslijetku ukupni flavonoidi s najnižom srednjom vrijednosti ( $6,24 \pm 0,07$  mg/100 g).

U ovisnosti o vrsti proizvoda utvrđeno je kako postoje varijacije u bioaktivnom sastavu između svježih plodova jagoda i 3D ispisanih proizvoda. Dakle, svježi plodovi sadrže veći udio ukupnih fenolnih spojeva ( $146,54 \pm 1,43$  mg/100 g) u odnosu na 3D ispisane proizvode ( $106,12 \pm 1,43$  mg/100 g). Gledajući podskupine fenolnih spojeva, u svježim su plodovima određeni veći udjeli ukupnih flavonoida i kondenziranih tanina u odnosu na 3D ispisane proizvode. Udio ukupnih flavonoida (engl. *Total Flavonoids*, TF) u svježim je plodovima iznosio  $6,82 \pm 0,09$  mg/100 g, dok je u 3D ispisanim proizvodima određeno  $5,66 \pm 0,09$  mg/100 g. Udio

kondenziranih tanina (engl. *Condensed Tannins*, CT) iznosi  $103,14 \pm 0,78$  mg/100 g u svježim plodovima, dok kod 3D ispisanih proizvoda iznosi  $70,36 \pm 0,78$  mg/100 g. Varijacija je vidljiva i kod sadržaja hidroksicimetnih kiselina i flavonola kojih je u višim udjelima određeno u 3D ispisanim uzorcima u odnosu na svježe plodove. Tako je udio hidroksicimetnih kiselina (engl. *Hydroxycinnamic Acids*, HCA) u 3D ispisanim proizvodima iznosio  $64,05 \pm 0,74$  mg/100 g u odnosu na svježe plodove, gdje je određen udio HCA od  $41,44 \pm 0,74$  mg/100 g.

Međutim, uspoređujući utjecaj mase plodova jagoda na bioaktivni sastav, utvrđeno je kako različita masa utječe na različite udjele bioaktivnih spojeva. Tako je vidljivo kako plodovi mase <15 g imaju najveći udio ukupnih fenolnih spojeva ( $134,02 \pm 1,76$  mg/100 g) u odnosu na plodove mase u rasponu od 15-30 g ( $122,23 \pm 1,76$  mg/100 g) i plodova mase >30 g ( $122,75 \pm 1,76$  mg/100 g) među kojima nema statistički značajne razlike. Što se tiče podskupina fenolnih spojeva jedina statistički značajna razlika uočena je u udjelima kondenziranih tanina, kojih je najviše određeno u plodovima jagoda mase <15 g ( $92,97 \pm 0,96$  mg/100 g), zatim su slijedile jagode s masom >30 g ( $85,77 \pm 0,96$  mg/100 g), dok je najmanji udio uočen kod jagoda mase od 15-30 g ( $81,52 \pm 0,96$  mg/100 g). Kod ostalih polifenolnih spojeva, uključujući hidroksicimetne kiseline, flavonole te ukupne flavonoide nisu uočene statistički značajne razlike u udjelima navedenih komponenata u ovisnosti o različitim masama plodova jagoda.

**Tablica 3.** Udjeli polifenolnih spojeva u svježim i 3D ispisanim proizvodima na bazi jagode u ovisnosti o vrsti proizvoda i masi plodova jagode

Izvor varijacije	N	TPC	HCA	FL	TF	CT
<b>Vrsta proizvoda</b>		$p \leq 0,01^\dagger$	$p \leq 0,01^\dagger$	$p \leq 0,01^\dagger$	$p \leq 0,01^\dagger$	$p \leq 0,01^\dagger$
Svježi plodovi	6	$146,54 \pm 1,43^a$	$41,44 \pm 0,74^b$	$24,09 \pm 0,55^b$	$6,82 \pm 0,09^a$	$103,14 \pm 0,78^a$
3D proizvodi	6	$106,12 \pm 1,43^b$	$64,05 \pm 0,74^a$	$38,59 \pm 0,55^a$	$5,66 \pm 0,09^b$	$70,36 \pm 0,78^b$
<b>Masa</b>		$p \leq 0,01^\dagger$	$p = 0,12^\ddagger$	$p = 0,98^\ddagger$	$p = 0,07^\ddagger$	$p \leq 0,01^\dagger$
<15 g	4	$134,02 \pm 1,76^a$	$53,91 \pm 0,91^a$	$31,39 \pm 0,68^a$	$6,52 \pm 0,12^a$	$92,97 \pm 0,96^a$
15-30 g	4	$122,23 \pm 1,76^b$	$50,78 \pm 0,91^a$	$31,22 \pm 0,68^a$	$6,14 \pm 0,12^a$	$81,52 \pm 0,96^c$
>30 g	4	$122,75 \pm 1,76^b$	$53,54 \pm 0,91^a$	$31,41 \pm 0,68^a$	$6,07 \pm 0,12^a$	$85,77 \pm 0,96^b$
<b>Prosjeck</b>	12	$126,33 \pm 1,01$	$52,74 \pm 0,53$	$31,34 \pm 0,39$	$6,24 \pm 0,07$	$86,75 \pm 0,55$

\*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na  $p \leq 0,05$ . TPC – ukupni fenolni spojevi (mg/100 g); HCA – hidroksicimetne kiseline (mg/100 g); FL - flavonoli (mg/100 g); TF – ukupni flavonoidi (mg/100 g); CT – kondenzirani tanini (mg/100 g)

Rezultati udjela monomernih antocijana i antioksidacijski kapacitet u svježim i 3D ispisanim proizvodima na bazi jagode u ovisnosti o vrsti proizvoda i masi plodova jagode prikazani su u tablici 4. Udio monomernih antocijana veći je u svježim plodovima ( $18,81 \pm 0,21 \text{ mg}/100 \text{ g}$ ) u odnosu na 3D ispisanu proizvode ( $13,89 \pm 0,21 \text{ mg}/100 \text{ g}$ ). Uzimajući u obzir različite mase plodova jagoda utvrđeno je kako najveću vrijednost monomernih antocijana imaju plodovi mase  $<15 \text{ g}$  ( $17,74 \pm 0,26 \text{ mg}/100 \text{ g}$ ), dok kod plodova mase u rasponu od  $15\text{-}30 \text{ g}$  i plodova mase  $>30 \text{ g}$  nije uočena statistički značajna razlika.

Uspoređujući antioksidacijske kapacitete utvrđena je varijabilnost u ovisnosti o primijenjenoj metodi. Tako je primjenom DPPH metode veći antioksidacijski kapacitet uočen kod 3D ispisanih proizvoda ( $299,06 \pm 0,21 \mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$ ) u odnosu na svježe plodove ( $295,73 \pm 0,21 \mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$ ). Primjenom FRAP metode, zamijećen je obrnut trend, te tako svježi plodovi jagoda imaju veću vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ( $1030,80 \pm 17,26 \mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$ ) u odnosu na 3D ispisanu proizvode ( $862,00 \pm 17,26 \mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$ ). Komparacijom mase plodove jagoda i antioksidacijskog kapaciteta primijećeno je kako različita masa plodova jagoda nije statistički značajno djelovala na antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom. Međutim, primjenom FRAP metode uočeno je kako je vrijednost antioksidacijskog kapaciteta veća kod plodova mase  $<15 \text{ g}$  i mase  $>30 \text{ g}$ , među kojima nema statistički značajne razlike, u odnosu na mase jagoda u rasponu od  $15\text{-}30 \text{ g}$  koje pokazuju manju vrijednost antioksidacijskog kapaciteta.

Prosječna vrijednost monomernih antocijana u svježim i 3D ispisanim proizvodima na bazi jagode iznosi  $16,35 \pm 0,15 \text{ mg}/100 \text{ g}$ . Prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta mjerenog DPPH metodom iznosi  $297,39 \pm 0,15 \mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$ , dok vrijednost antioksidacijskog kapaciteta mjerenog FRAP metodom iznosi  $946,38 \pm 12,21 \mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$ . Kako bi se osigurala viša razina točnosti rezultata te odredila njihova korelacija i sljedivost, Thaipong i sur. (2006) su uspoređivali ABTS, DPPH, FRAP i ORAC metode analize antioksidacijskog kapaciteta te zaključili kako je potrebno provoditi barem dva navedena testa. Autori također ističu važnost razumijevanja mehanizma svake metode te odabira najprikladnijih prije provedbe analiza antioksidacijskog kapaciteta (Thaipong i sur., 2006).

**Tablica 4.** Udjeli monomernih antocijana i antioksidacijski kapacitet u svježim i 3D ispisanim proizvodima na bazi jagode u ovisnosti o vrsti proizvoda i masi plodova jagode

Izvor varijacije	n	ANT	DPPH	FRAP
<b>Vrsta proizvoda</b>		$p \leq 0,01^\dagger$	$p \leq 0,01^\dagger$	$p \leq 0,01^\dagger$
Svježi plodovi	6	$18,81 \pm 0,21^a$	$295,73 \pm 0,21^b$	$1030,80 \pm 17,26^a$
3D ispisani proizvodi	6	$13,89 \pm 0,21^b$	$299,06 \pm 0,21^a$	$862,00 \pm 17,26^b$
<b>Masa</b>		$p \leq 0,01^\dagger$	$p = 0,22^\ddagger$	$p = 0,02^\dagger$
<15 g	4	$17,74 \pm 0,26^a$	$297,40 \pm 0,26^a$	$966,93 \pm 21,14^a$
15-30 g	4	$15,93 \pm 0,26^b$	$297,76 \pm 0,26^a$	$875,17 \pm 21,14^b$
>30 g	4	$15,38 \pm 0,26^b$	$297,02 \pm 0,26^a$	$997,03 \pm 21,14^a$
<b>Prosjek</b>	12	$16,35 \pm 0,15$	$297,39 \pm 0,15$	$946,38 \pm 12,21$

\*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na  $p \leq 0,05$ . ANT – Monomerni antocijani (mg/100g); Antioksidacijski kapacitet izmjeren DPPH metodom ( $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$ ); Antioksidacijski kapacitet izmjeren FRAP metodom ( $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$ )

#### 4.3. UTJECAJ MASE PLODOVA JAGODE NA BIOAKTIVNA SVOJSTVA SVJEŽIH PLODOVA JAGODA I 3D ISPISANIH PROIZVODA NA BAZI JAGODA

Na temelju rezultata prikazanih u tablici 5 je utvrđeno kako postoje varijacije u bioaktivnim svojstvima svježih plodova i 3D ispisanih proizvoda na bazi jagoda u ovisnosti o različitim masama plodova. Kod svježih plodova jagoda primijećeno je kako postoje varijacije u sadržaju ukupnih fenolnih spojeva u ovisnosti o masi plodova. Tako su veću vrijednost pokazali plodovi mase >30 g ( $154,71 \pm 2,62 \text{ mg}/100 \text{ g}$ ) u odnosu na plodove mase <15 g ( $147,13 \pm 2,62 \text{ mg}/100 \text{ g}$ ). Zanimljivo je kako se udio ukupnih fenolnih spojeva (engl. *Total Phenolic Compounds*, TPC) u plodovima mase 15-30 g statistički značajno ne razlikuje u odnosu na plodove mase <15 g te one >30 g. Promatrajući podskupine fenolnih spojeva primijećeno je kako na udio hidroksicimtnih kiselina, flavonola i kondenziranih tanina statistički značajno nije utjecala različita masa plodova jagoda. Jedinu iznimku predstavljaju ukupni flavonoidi kod kojih je utvrđen veći udio u plodovima mase <15 g ( $106,4 \pm 1,36 \text{ mg}/100 \text{ g}$ ) i mase >30 g ( $105,29 \pm 1,36 \text{ mg}/100 \text{ g}$ ), dok je kod plodova mase u rasponu od 15-30 g utvrđen manji udio ukupnih flavonoida ( $97,74 \pm 1,36 \text{ mg}/100 \text{ g}$ ).

Usporedno, kod 3D ispisanih proizvoda primijećeno je kako postoje varijacije u udjelu ukupnih fenolnih spojeva te ukupnih flavonoida u istom slijedu kao i kod svježih plodova. Tako je utvrđeno kako najveću vrijednost ukupnih fenolnih spojeva kod 3D ispisanih proizvoda imaju oni proizvedeni od plodova jagoda mase <15 g ( $120,90 \pm 2,34 \text{ mg}/100 \text{ g}$ ), zatim ih slijede

proizvodi od plodova jagoda mase od 15-30 g ( $106,67 \pm 2,34$  mg/100 g) te naposljetku proizvodi od plodova mase  $>30$  g ( $90,80 \pm 2,34$  mg/100 g). Ovdje se može primijetiti degradacija u ovisnosti o masi plodova, dakle što je veća masa plodova jagoda to je manji udio ukupnih fenolnih spojeva u 3D ispisanim proizvodima. Uzimajući u obzir podskupine fenolnih spojeva, vidljivo je da vrijednosti ukupnih flavonoida variraju u ovisnosti o masi plodova. Tako 3D tiskani proizvodi od plodova mase  $<15$  g imaju najveću vrijednost ukupnih flavonoida ( $79,54 \pm 1,36$  mg/100 g), dok između plodova mase od 15-30 g i onih  $>30$  g nema statistički značajne razlike. Međutim, isto kao i kod svježih plodova, tako i kod 3D ispisanih proizvoda nema statistički značajne razlike u vrijednostima hidroksicimetnih kiselina, flavonola i kondenziranih tanina u ovisnosti o masi plodova.

Na temelju rezultata prikazanih u tablici 6 vidljivo je kako masa plodova jagode utječe na udjele monomernih antocijana i antioksidacijski kapacitet u svježim i 3D ispisanim proizvodima na bazi jagode. Uočeno je kako kod svježih plodova najveći udio antocijana određen u plodovima najmanje mase ( $< 15$  g), dok među plodovima iz kategorija 15-30g i  $>30$ g nije bilo statistički značajnih razlika u udjelima monomernih antocijana. Sličan trend uočen je i među 3D ispisanim proizvodima, gdje je najveća vrijednost monomernih antocijana utvrđena kod proizvoda od plodova jagode mase  $<15$  g ( $15,96 \pm 0,30$  mg/100 g), pri čemu se sadržaj antocijana nije značajno razlikovao za 3D ispisane proizvode načinjene od jagoda iz kategorija 15-30 g ( $13,42 \pm 0,30$  mg/100 g) i  $>30$  g ( $12,28 \pm 0,30$  mg/100 g). Iz ovih rezultata je vidljivo da se uslijed prerade sadržaj antocijana smanjuje, što je u skladu s literaturnim podacima gdje se navodi da su antocijani kemijski izrazito nestabilni spojevi podložni razgradnji pod utjecajem temperature, svjetlosti, pH, kisika i mnogih drugih čimbenika (Wu i sur., 2018). Veliki gubitak antocijana u hrani povezan je s reakcijom razgradnje tijekom procesa zagrijavanja hrane (Jiang i sur., 2019).

**Tablica 5.** Utjecaj mase plodova jagode na udjele polifenolnih spojeva u svježim i 3D ispisanim proizvodima na bazi jagode

Izvor varijacije		N	TPC	HCA	FL	TF	CT
			p = 0,05 <sup>†</sup>	p = 0,08 <sup>‡</sup>	p = 0,66 <sup>‡</sup>	p = 0,54 <sup>‡</sup>	p = 0,03 <sup>†</sup>
Svježi Plodovi	<15g	2	147,13 ± 2,62 <sup>b</sup>	41,89 ± 1,29 <sup>a</sup>	23,91 ± 0,96 <sup>a</sup>	106,40 ± 1,36 <sup>a</sup>	6,93 ± 0,16 <sup>a</sup>
	15-30g	2	137,79 ± 2,62 <sup>a,b</sup>	37,52 ± 1,29 <sup>a</sup>	23,67 ± 0,96 <sup>a</sup>	97,74 ± 1,36 <sup>b</sup>	6,60 ± 0,16 <sup>a</sup>
	>30g	2	154,71 ± 2,62 <sup>a</sup>	44,90 ± 1,29 <sup>a</sup>	24,68 ± 0,96 <sup>a</sup>	105,29 ± 1,36 <sup>a</sup>	6,95 ± 0,16 <sup>a</sup>
			p ≤ 0,01 <sup>†</sup>	p = 0,19 <sup>‡</sup>	p = 0,66 <sup>‡</sup>	p = 0,54 <sup>‡</sup>	p = 0,01 <sup>†</sup>
3D ispisani proizvodi	<15g	2	120,90 ± 2,34 <sup>a</sup>	65,93 ± 1,29 <sup>a</sup>	38,87 ± 0,96 <sup>a</sup>	79,54 ± 1,36 <sup>a</sup>	6,11 ± 0,16 <sup>a</sup>
	15-30g	2	106,67 ± 2,34 <sup>b</sup>	64,03 ± 1,29 <sup>a</sup>	38,77 ± 0,96 <sup>a</sup>	65,29 ± 1,36 <sup>b</sup>	5,68 ± 0,16 <sup>a</sup>
	>30g	2	90,80 ± 2,34 <sup>c</sup>	62,18 ± 1,29 <sup>a</sup>	38,14 ± 0,96 <sup>a</sup>	66,25 ± 1,36 <sup>b</sup>	5,19 ± 0,16 <sup>a</sup>
<b>Prosjek</b>		12	126,33 ± 1,01	52,74 ± 0,53	31,34 ± 0,39	6,24 ± 0,07	86,75 ± 0,55

\*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na  $p \leq 0,05$ . TPC – ukupni fenolni spojevi (mg/100 g); HCA – hidroksicimetne kiseline (mg/100 g); FL - flavonoli (mg/100 g); TF – ukupni flavonoidi (mg/100 g); CT – kondenzirani tanini (mg/100 g)

Mogući uzrok razlike sadržaja monomernih antocijana u svježim i 3D tiskanim uzorcima je osjetljivost antocijana na povišenu temperaturu kojoj je smjesa za 3D ispis bila izložena uslijed zagrijavanja kako bi se dobila željena homogena konzistencija. Pretpostavka je u skladu s drugim istraživanjima u kojima je utvrđeno smanjenje antocijana u rasponu od 5 % do 44 % u pasteriziranim jagodama, pireima i pulpi jagoda (Salazar-Orbea i sur., 2021). Također, Marszałek i sur. (2015) su zabilježili razgradnju antocijana (oko 43 %) nakon konvencionalne termičke obrade kod pirea od jagoda zagrijavanog na 90 °C tijekom 15 minuta. Isto tako, primjećeno je kako nema statistički značajne razlike u antioksidacijskim kapacitetima određivanim DPPH i FRAP metodama neovisno o masi plodova niti kod svježih plodova niti kod 3D ispisanih proizvoda.

**Tablica 6.** Utjecaj mase plodova jagode na udjele monomernih antocijana i antioksidacijski kapacitet u svježim i 3D ispisanim proizvodima na bazi jagode

Izvor varijacije			ANT	DPPH	FRAP
Svježi plodovi		n	p = 0,26 <sup>‡</sup>	p = 0,26 <sup>‡</sup>	p = 0,08 <sup>‡</sup>
	<15g	2	19,51 ± 0,41 <sup>a</sup>	295,77 ± 0,37 <sup>a</sup>	1004,00 ± 29,90 <sup>a</sup>
	15-30g	2	18,43 ± 0,41 <sup>b</sup>	296,40 ± 0,37 <sup>a</sup>	963,53 ± 29,90 <sup>a</sup>
	>30g	2	18,48 ± 0,41 <sup>b</sup>	295,01 ± 0,37 <sup>a</sup>	1124,70 ± 29,90 <sup>a</sup>
			p ≤ 0,01 <sup>†</sup>	p = 0,26 <sup>‡</sup>	p = 0,08 <sup>‡</sup>
3D ispisani proizvodi	<15g	2	15,96 ± 0,30 <sup>a</sup>	299,02 ± 0,37 <sup>a</sup>	929,84 ± 29,90 <sup>a</sup>
	15-30g	2	13,42 ± 0,30 <sup>b</sup>	299,12 ± 0,37 <sup>a</sup>	786,81 ± 29,90 <sup>a</sup>
	>30g	2	12,28 ± 0,30 <sup>b</sup>	299,02 ± 0,37 <sup>a</sup>	869,34 ± 29,90 <sup>a</sup>
<b>Prosjek</b>		12	16,35 ± 0,15	297,39 ± 0,15	946,38 ± 12,21

\*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na p ≤ 0,05. ANT – monomerni antocijani (mg/100g); Antioksidacijski kapacitet izmjeren DPPH metodom (μmol TE/100 g); Antioksidacijski kapacitet izmjeren FRAP metodom (μmol TE/100 g)

## 5. ZAKLJUČCI

1. Različita masa plodova jagoda utječe na vrijednosti topljive suhe tvari i pH u svježim plodovima, dok u 3D ispisanim proizvodima masa plodova značajno ne utječe na navedene parametre.
2. Neovisno o masi plodova, svježi plodovi jagoda sadrže veći udio ukupnih fenola, flavonoida, antocijana i kondenziranih tanina u usporedbi s 3D ispisanim proizvodima, dok 3D ispisani proizvodi sadrže veće udjele hidroksicimetnih kiselina i flavonola.
3. Masa plodova značajno utječe na udjele bioaktivnih spojeva u svježim plodovima jagode. Tako plodovi mase <15 g imaju najveći udio ukupnih fenola i antocijana, u usporedbi s plodovima masa 15-30 g i >30g.
4. Veličina plodova jagoda značajno utječe i na bioaktivni sastav 3D ispisanih proizvoda pri čemu su proizvodi pripremljeni od plodova mase <15 g imali veće udjele ukupnih fenola, flavonoida te antocijana u odnosu na 3D ispisane proizvode proizvedene od plodova jagode masa 15-30 g i >30g.
5. Razlika u masi plodova jagode nije značajno utjecala na antioksidacijski kapacitet određen DPPH i FRAP metodama niti kod svježih plodova jagode, niti kod 3D ispisanih plodova jagode. Ipak, primjenom DPPH metode određen je veći antioksidacijski kapacitet u 3D ispisanim proizvodima, dok je primjenom FRAP metode određen veći antioksidacijski kapacitet u svježim plodovima jagode.
6. U zaključku, prema rezultatima ovog istraživanja, za preradu jagoda u funkcionalne 3D ispisane proizvode poželjno je odabrati jagode najmanje mase (< 15 g) obzirom su se iskazale većim bioaktivnim potencijalom kako u svježem obliku, tako i u preradi.



## 6. LITERATURA

Aaby K, Ekeberg D, Skrede G (2007) Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* **55**, 4395–406. <https://doi.org/10.1021/jf0702592>

Aaby K, Mazur S, Nes A, Skrede G (2012) Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chem* **132**, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.037>

Aaby K, Skrede G, Wrolstad RE (2005) Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria x ananassa*). *J Agric Food Chem* **53**, 4032–40. <https://doi.org/10.1021/jf048001o>

Abouelenein D, Acquaticci L, Alessandrini L, Borsetta G, Caprioli G, Mannozi C i sur. (2023) Volatile profile of strawberry fruits and influence of different drying methods on their aroma and flavor: a review. *Molecules* **28**, 5810. <https://doi.org/10.3390/molecules28155810>

Afrin S, Gasparini M, Forbes-Hernandez TY, Reboredo-Rodriguez P, Mezzetti B, Varela-López A i sur. (2016) Promising Health Benefits of the Strawberry: A Focus on Clinical Studies. *J Agric Food Chem* **64**, 4435–4449. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00857>

Álvarez-Fernández MA, Hornedo-Ortega R, Cerezo AB, Troncoso AM, García-Parrilla MC (2014) Effects of the strawberry (*Fragaria x ananassa*) purée elaboration process on non-anthocyanin phenolic composition and antioxidant activity. *Food Chem* **164**, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.116>

Alvarez-Suarez JM, Mazzoni L, Forbes-Hernandez TY, Gasparini M, Sabbadini S, Giampieri F (2014) The effects of pre-harvest and post-harvest factors on the nutritional quality of strawberry fruits: A review. *J Berry Res* **4**, 1-10. <http://dx.doi.org/10.3233/JBR-140068>

Amini AM, Muzs K, Spencer JP, Yaqoob P (2017) Pelargonidin-3-O-glucoside and its metabolites have modest anti-inflammatory effects in human whole blood cultures. *Nutr Res* **46**, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2017.09.006>

AOAC. Official Methods of Analysis (1990) Changes in Official Methods of Analysis Made at the Annual Meeting. Supplement (Vol 15) Association of Official Analytical Chemists.

- Ayala-Zavala JF, Wang SY, Wang CY, González-Aguilar GA (2004) Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *LWT-Food Sci Technol* **37**, 687-695. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.03.002>
- Azam M, Ejaz S, Rehman RN, Khan M, Qadri R (2019) Postharvest quality management of strawberries. U: Asao T, Asaduzzaman MD (ured.) Strawberry-Pre-and Post-Harvest Management Techniques for Higher Fruit Quality. IntechOpen, London, str. 59-81
- Battino M, Giampieri F, Cianciosi D, Ansary J, Chen X, Zhang D, Forbes-Hernández T (2021) The roles of strawberry and honey phytochemicals on human health: A possible clue on the molecular mechanisms involved in the prevention of oxidative stress and inflammation. *Phytomedicine* **86**, 153170. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153170>
- Bebek Markovinović A, Putnik P, Duralija B, Krivohlavek A, Ivešić M, Mandić Andačić I, Bursać Kovačević D (2022) Chemometric valorization of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. 'Albion' for the production of functional juice: The impact of physicochemical, toxicological, sensory, and bioactive value. *Foods* **11**, 640. <https://doi.org/10.3390/foods11050640>
- Benzie IFF (1996) An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clin Biochem* **29**, 111-116. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(95\)02013-6](https://doi.org/10.1016/0009-9120(95)02013-6)
- Braca A, De Tommasi N, Di Bari L, Pizza C, Politi M, Morelli I (2001) Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *J Nat Prod* **64**, 892-895. <https://doi.org/10.1021/np0100845>
- Braga ARC, Murador DC, de Souza Mesquita LM, Rosso VV (2018) Bioavailability of anthocyanins: Gaps in knowledge, challenges and future research. *J Food Compos Anal* **68**, 31–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.031>
- Buendía B, Gil MI, Tudela JA, Gady AL, Medina JJ, Soria C, Tomás-Barberán FA (2010) HPLC-MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. *J Agric Food Chem* **58**, 3916–3926. <https://doi.org/10.1021/jf9030597>
- Bursać Kovačević D, Levay B, Dragovic-Uzelac V (2009) Free radical scavenging activity and phenolic content in strawberry fruit and jam. *Agric Consp* **74**, 155–9.

- Capocasa F, Balducci F, Martellini C, Albanesi A (2017) Yield and fruit quality of strawberry cultivars grown in organic farming in the mid-Adriatic area. *Acta Hort* **1156**, 619–626. <https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2017.1156.91>.
- Carr AC i Maggini S (2017) Vitamin C and Immune Function. *Nutrients* **9**, 1211. <https://doi.org/10.3390/nu9111211>
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* **10**, 178-182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
- Chaves VC, Calvete E, Reginatto FH (2017) Quality properties and antioxidant activity of seven strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) cultivars. *Sci Horticult* **225**, 293–298. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.07.013>
- Chettri S, Sharma N, Mohite AM (2023) Edible coatings and films for shelf-life extension of fruit and vegetables. *Biomater Adv* 213632. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213632>
- Dasiman R, Nor NM, Eshak Z, Mutalip SSM, Suwandi NR, Bidin H (2022) A review of procyanidin: Updates on current bioactivities and potential health benefits. *Biointerface Res Appl Chem* **12**, 5918-5940. <https://doi.org/10.33263/BRIAC125.59185940>
- DeEll J (2006) Postharvest Handling and Storage of Strawberries. Fresh Market Quality Program Lead/OMFRA. Ministry of Agriculture Food and Rural Affairs, Ontario.
- Dias MI, Barros L, Oliveira MBPP, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR (2015) Phenolic profile and antioxidant properties of commercial and wild *Fragaria vesca* L. roots: A comparison between hydromethanolic and aqueous extracts. *Ind Crop Prod* **63**, 125–132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.021>
- Dong J, Zhang Y, Tang X, Jin W, Han Z (2013) Differences in volatile ester composition between *Fragaria × ananassa*, and *F. vesca*, and implications for strawberry aroma patterns. *Sci Hort* **150**, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.11.001>
- Duarte LJ, Chaves VC, dos Santos Nascimento MVP, Calvete E, Li M, Ciruolo E i sur. (2018) Molecular mechanism of action of Pelargonidin-3-O-glucoside, the main anthocyanin responsible for the anti-inflammatory effect of strawberry fruits. *Food Chem* **247**, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.015>

- Duran M, Aday MS, Zorba NND, Temizkan R, Büyükcan MB, Caner C (2016) Potential of antimicrobial active packaging ‘containing natamycin, nisin, pomegranate and grape seed extract in chitosan coating’ to extend shelf life of fresh strawberry. *Food Bioprod Process* **98**, 354–363. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2016.01.007>
- Enomoto H, Sato K, Miyamoto K, Ohtsuka A, Yamane H (2018) Distribution analysis of anthocyanins, sugars, and organic acids in strawberry fruits using matrix-assisted laser desorption/ionization-imaging mass spectrometry. *J Agric Food Chem* **66**, 4958–4965. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00853>.
- Fan Z, Hasing T, Johnson TS, Garner DM, Schwieterman ML, Barbey CR i sur. (2021) Strawberry sweetness and consumer preference are enhanced by specific volatile compounds. *Hortic Res* **8**, 66. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00664-2>
- FAO (2017) FAO- Food and Agriculture Organization <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Pristupljeno 22.09.2023.)
- Fierascu RC, Ortan A, Fierascu IC, Fierascu I (2018) In vitro and in vivo evaluation of antioxidant properties of wild-growing plants. A short review. *Curr Opin Food Sci* **24**, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.08.006>
- Fierascu RC, Temocico G, Fierascu I, Ortan A, Babeanu NE (2020) *Fragaria* genus: Chemical composition and biological activities. *Molecules* **25**, 498. <https://doi.org/10.3390/molecules25030498>
- Forbes-Hernandez TY, Gasparini M, Afrin S, Bompadre S, Mezzetti B, Quiles JL i sur. (2015) The healthy effects of strawberry polyphenols: which strategy behind antioxidant capacity? *Food Sci Nut* **0**, 1–14. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1051919>
- Gasperotti M, Masuero D, Mattivi F, Vrhovsek U (2015) Overall dietary polyphenol intake in a bowl of strawberries: The influence of *Fragaria spp.* in nutritional studies. *J Funct Foods* **18**, 1057–1069. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.08.013>
- Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Battino M (2014) Strawberry and human health: Effects beyond antioxidant activity. *J Agric Food Chem* **62**, 3867–3876. <https://doi.org/10.1021/jf405455n>

- Giampieri F, Tulipani S, Alvarez-Suarez JM, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M (2012) The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition* **28**, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.009>
- Giusti MM, Wrolstad RE (2001) Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Curr Protoc Food Anal Chem* <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>
- Gol NB, Patel PR, Rao TVR (2013) Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biol Technol* **85**, 185–195. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.06.008>
- Han C, Zhao Y, Leonard SW, Traber MG (2004) Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria x ananassa*) and raspberries (*Rubus idaeus*). *Postharvest Biol Technol* **33**, 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.01.008>
- Harakotr B, Suriharn B, Tangwongchai R, Scott MP, Lertrat K (2014) Anthocyanins and antioxidant activity in coloured waxy corn at different maturation stages. *J Funct Foods* **9**, 109–118. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.012>
- Hartmann A, Patz CD, Andlauer W, Dietrich H, Ludwig M (2008) Influence of processing on quality parameters of strawberries. *J Agric Food Chem* **56**, 9484–9489. <https://doi.org/10.1021/jf801555q>
- Hernandez-Martínez NR, Blanchard C, Wells D, Salazar-Gutierrez MR (2023) Current state and future perspectives of commercial strawberry production: a review. *Sci Hortic* **312**, 111893. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2023.111893>
- Hernanz D, Recamales AF, Meléndez-Martínez AJ, González-Miret ML, Heredia FJ (2007) Assessment of the differences in the phenolic composition of five strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in two different soilless systems. *J Agric Food Chem* **55**, 1846–1852. <https://doi.org/10.1021/jf063189s>
- Howard LR, Clark JR, Brownmiller C (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J Sci Food Agr* **83**, 1238–1247. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1532>

- Jiang T, Mao Y, Sui LS, Yang N, Li SY, Zhu ZZ, Wang CT, Yin S, He JR, He Y (2019) Degradation of anthocyanins and polymeric color formation during heat treatment of purple sweet potato extract at different pH. *Food Chem* **274**, 460-470. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.141>
- Jin P, Wang SY, Wang CY, Zheng Y (2011) Effect of cultural system and storage temperature on antioxidant capacity and phenolic compounds in strawberries. *Food Chem* **124**, 262–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2004.03.002>
- Kebede M i Admassu S (2019) Application of antioxidants in food processing industry: Options to improve the extraction yields and market value of natural products. *Adv Food Techno Nutr Sci* **5**, 38–49. <https://doi.org/10.17140/AFTNSOJ-5-155>
- Kevers C, Falkowski M, Tabart J, Defraigne JO, Dommès J, Pincemail J (2007) Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. *J Agric Food Chem* **55**, 8596–603. <https://doi.org/10.1021/jf071736j>
- Klopotek Y, Otto K, Bohm V (2005) Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* **53**, 5640–6. <https://doi.org/10.1021/jf047947v>
- Koponen JM, Happonen AM, Törrönen AR (2007) Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *J Agric Food Chem* **55**, 1612–9. <https://doi.org/10.1021/jf062897a>
- Kosar M, Kafkas E, Paydas S, Baser K (2004) Phenolic composition of strawberry genotypes at different maturation stages. *J Agric Food Chem* **52**, 1586–9. <https://doi.org/10.1021/jf035093t>
- Krüger E, Josuttis M, Nestby R, Toldam-Andersen TB, Carlen C, Mezzetti B (2012) Influence of growing conditions at different latitudes of Europe on strawberry growth performance, yield and quality. *J Berry Res* **2**, 143–157. <https://doi.org/10.3233/JBR-2012-036>.
- Krüger E, Will F, Kumar K, Celejewska K, Chartier P, Masny A, Sønsteby A (2021) Influence of post-flowering climate conditions on anthocyanin profile of strawberry cultivars grown from north to south Europe. *Appl Sci* **11**, 1326. <https://doi.org/10.3390/app11031326>

- Lee J, Rennaker C, Wrolstad RE (2008) Correlation of two anthocyanin quantification: HPLC and spectrophotometric methods. *Food chemistry* **110**, 782-786. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.010>
- Levaj B, Bursać Kovačević D, Bituh M, Dragović-Uzelac V (2012) Influence of jam processing upon the contents of phenolics and antioxidant capacity in strawberry fruit (*Fragaria ananassa*× Duch.). *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **7**, 18-22.
- Liston A, Cronn R, Ashman TL (2014) *Fragaria*: A genus with deep historical roots and ripe for evolutionary and ecological insights. *Am J Bot* **101**, 1686–1699. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400140>
- Lorenzo JM, Pateiro M, Domínguez R, Barba FJ, Putnik P, Bursać Kovačević D, Shpigelman A, Granato D, Franco D (2018) Berries extracts as natural antioxidants in meat products: A review. *Food Res Int* **106**, 1095–1104. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.005>
- Lourenço SC, Moldão-Martins M, Alves VD (2019) Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules* **24**, 4132. <https://doi.org/10.3390/molecules24224132>
- Lyu X, Agar OT, Barrow CJ, Dunshea FR, Suleria HA (2023) Phenolic compounds profiling and their antioxidant capacity in the peel, pulp, and seed of Australian grown avocado. *Antioxidants* **12**, 185. <https://doi.org/10.3390/antiox12010185>
- Marszałek K, Mitek M, Skąpska S (2015) Effect of continuous flow microwave and conventional heating on the bioactive compounds, colour, enzymes activity, microbial and sensory quality of strawberry purée. *Food Bioprocess Technol* **8**, 1864-1876. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1543-7>
- Martinsen BK, Aaby K, Skrede G (2020) Effect of temperature on stability of anthocyanins, ascorbic acid and color in strawberry and raspberry jams. *Food Chemistry* **316**, 126297. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126297>
- Medina MB (2011a) Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. *J Funct Foods* **3**, 79–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2011.02.007>
- Medina MB (2011b) Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. *J Agric Food Chem* **59**, 1565–1571. <https://doi.org/10.1021/jf103711c>

- Méndez-Lagunas L, Rodríguez-Ramírez J, Cruz-Gracida M, Sandoval-Torres S, Barriada-Bernal G (2017) Convective drying kinetics of strawberry (*Fragaria x ananassa*): Effects on antioxidant activity, anthocyanins and total phenolic content. *Food Chem* **230**, 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.010>
- Menzel C (2021) Higher temperatures decrease fruit size in strawberry growing in the subtropics. *Horticulturae* **7**, 34. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7020034>
- Miller K, Feucht W, Schmid M (2019) Bioactive compounds of strawberry and blueberry and their potential health effects based on human intervention studies: A brief overview. *Nutrients* **11**, 1510. <https://doi.org/10.3390/nu11071510>
- Moura CMD, Moura JMD, Soares NM, Pinto LADA (2011) Evaluation of molar weight and deacetylation degree of chitosan during chitin deacetylation reaction: used to produce biofilm. *Chem Eng Process* **50**, 351–355. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2011.03.003>
- Newerli-Guz J, Śmiechowska M, Drzewiecka A, Tylingo R (2023) Bioactive Ingredients with Health-Promoting Properties of Strawberry Fruit (*Fragaria x ananassa* Duchesne). *Molecules* **28**, 2711. <https://doi.org/10.3390/molecules28062711>
- Nour V, Trandafir I, Cosmulescu S (2017) Antioxidant Compounds, Nutritional Quality and Colour of Two Strawberry Genotypes from *Fragaria x ananassa*. *Erwerbs-Obstbau* **59** <https://doi.org/10.1007/s10341-016-0307-5>
- Nowicka A, Kucharska AZ, Sokół-Łętowska A, Fecka I (2019) Comparison of polyphenol content and antioxidant capacity of strawberry fruit from 90 cultivars of *Fragaria x ananassa* Duch. *Food Chem* **270**, 32–46. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.015>
- Octavia L i Choo WS (2017) Folate, ascorbic acid, anthocyanin and colour changes in strawberry (*Fragaria x annanasa*) during refrigerated storage. *LWT* **86**, 652–659. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.049>
- Olsson ME, Ekvall J, Gustavsson KE, Nilsson J, Pillai D, Sjo-Holm I i sur. (2004) Antioxidants, low molecular weight carbohydrates, and total antioxidant capacity in strawberries (*Fragaria x ananassa*): effects of cultivar, ripening, and storage. *J Agric Food Chem* **52**, 2490–8. <https://doi.org/10.1021/jf030461e>



Ozkaya O, Dündar O, Scovazzo GC, Volpe G (2009) Evaluation of quality parameters of strawberry fruits in modified atmosphere packaging during storage. *Afr J Biotechnol* **8** <https://doi.org/10.4314/AJB.V8I5.59961>

Peng G i Sutton JC (1991) Evaluation of microorganism for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Can J Plant Pathol* **13**, 247-257. <https://doi.org/10.1080/07060669109500938>

Petran AJ (2016) Performance and impact of strawberry (*Fragaria x ananassa*) season extension in the United States Upper Midwest using organic practices. (doktorski rad), University of Minnesota, Minneapolis, Sjedinjene Američke Države <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.82341>

Piljac-Žegarac J i Šamec D (2011) Antioxidant stability of small fruits in postharvest storage at room and refrigerator temperatures. *Food Res Int* **44**, 345–50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.039>

Pineli LLO, Moretti CL, dos Santos MS, Campos AB, Brasileiro AV, Cordova AC, Chiarello MD (2011) Antioxidants and other chemical and physical characteristics of two strawberry cultivars at different ripeness stages. *J Food Compos Anal* **24**, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.05.004>

Prior RL, Wu XL, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agr Food Chem* **53**, 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>

Salazar SM, Coll Y, Viejobueno J, Manchado F, Habana L (2016) Response of strawberry plants to the application of brassinosteroid under field conditions. *Rev Agronomica Del Noroeste Argent* **36**, 37.

Salazar-Orbea GL, García-Villalba R, Bernal MJ, Hernández A, Tomás-Barberán FA, Sánchez-Siles LM (2023) Stability of phenolic compounds in apple and strawberry: Effect of different processing techniques in industrial set up. *Food Chem* **401**, 134099. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134099>

Salazar-Orbea GL, García-Villalba R, Tomás FA, Sánchez-Siles LM (2021) Review: High–pressure processing vs. thermal treatment: effect on the stability of polyphenols in strawberry and apple products. *Foods* **10**, 2919. <https://doi.org/10.3390/foods10122919>

Salehi F (2020) Edible coating of fruits and vegetables using natural gums: A review. *Int J of Fruit Sci* **20**, S570-S589. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1746730>

Sato T, Ikeya Y, Adachi SI, Yagasaki K, Nihei KI, Itoh N (2019) Extraction of strawberry leaves with supercritical carbon dioxide and entrainers: Antioxidant capacity, total phenolic content, and inhibitory effect on uric acid production of the extract. *Food Bioprod Process* **117**, 160–169. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2019.07.003>

Schwieterman ML, Colquhoun TA, Jaworski EA, Bartoshuk LM, Gilbert JL, Tieman DM i sur. (2013) Strawberry flavor: diverse chemical compositions, a seasonal influence, and effects on sensory perception. *PLoS One* **9**, e88446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088446>

Sharifi-Rad J, Quispe C, Castillo CMS, Caroca R, Lazo-Vélez MA, Antonyak H i sur. (2022) Ellagic Acid: A Review on Its Natural Sources, Chemical Stability, and Therapeutic Potential. *Oxidative Med Cell Longev* **2022** <https://doi.org/10.1155/2022/3848084>

Shortle E, O'Grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci* **98**, 828-834. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.001>

Simkova K, Veberic R, Hudina M, Cvelbar Weber N, Smrke T, Grohar MC, Jakopic J (2023) Quantification and Distribution of Primary and Secondary Metabolites in the Inner and Outer Parts of Strawberry Fruit. *Horticulturae* **9**, 605. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9050605>

Simkova K, Veberic R, Hudina M, Grohar MC, Ivancic T, Smrke T, Jakopic J (2023) Berry size and weight as factors influencing the chemical composition of strawberry fruit. *J Food Compos Anal* **123**, 105509. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105509>

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Oxid Antioxid Part* **299**, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

Sirijan M, Pipattanawong N, Saeng-on B, Chaiprasart P (2020) Anthocyanin content, bioactive compounds and physico-chemical characteristics of potential new strawberry cultivars rich in anthocyanins. *J Berry Res* **10**, 397-410. <http://dx.doi.org/10.3233/JBR190487>

Skupien K, Oszmianski J (2004) Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria ananassa* x Duch.) grown in northwest Poland. *Eur Food Res Technol* **219**, 66–70. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-004-0918-1>

- Smeriglio A, Galati EM, Monforte MT, Lanuzza F, D'Angelo V, Circosta C (2016) Polyphenolic compounds and antioxidant activity of cold-pressed seed oil from finola cultivar of *Cannabis sativa* L. *Phytother Res* **30**, 1298-307. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.5623>.
- Sun BS, Ricardo-da-Silva JM, Spranger I (1998) Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J Agr Food Chem* **46**, 4267-4274. <https://doi.org/10.1021/jf980366j>
- Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal* **19**, 669-675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
- Tulipani S, Marzaban G, Herndl A, Laimer M, Mezzetti B, Battino M (2011) Influence of environmental and genetic factors on health-related compounds in strawberry. *Food Chem* **124**, 906–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.018>
- Tulipani S, Romandini S, Alvarez Suarez JM, Capocasa F, Mezzetti B, Busco F (2008) Folate content in different strawberry genotypes and folate status in healthy subjects after strawberry consumption. *Biofactors* **34**, 47–55. <https://doi.org/10.1002/biof.5520340106>
- Tulipani S, Romandini S, Capocasa F, Mezzetti B, Battino MB (2010) The nutritional quality of strawberry (*Fragaria x ananassa*) after short-refrigeration: genetic influences. *Funct Plant Sci Biotech* **4**, 84–9. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2012.706294>
- Urün I, Attar SH, Sönmez DA, Gündeşli MA, Ercişli S, Kafkas NE, Duralija B. (2021) Comparison of polyphenol, sugar, organic acid, volatile compounds, and antioxidant capacity of commercially grown strawberry cultivars in Turkey. *Plants* **10**, 1654. <https://doi.org/10.3390/plants10081654>
- Villamil-Galindo E, Van de Velde F, Piagentini AM (2021) Strawberry agro-industrial by-products as a source of bioactive compounds: Effect of cultivar on the phenolic profile and the antioxidant capacity. *Bioresour Bioprocess* **8**, 61. <http://dx.doi.org/10.1186/s40643-021-00416-z>
- Voća S, Žlabur JŠ, Dobričević N, Jakobek L, Šeruga M, Galic A, Pliestic S (2014) Variation in the bioactive compound content at three ripening stages of strawberry fruit. *Molecules* **19**, 10370–10385. <https://doi.org/10.3390/molecules190710370>

- Wang J, Yang E, Chaurand P, Raghavan V (2021) Visualising the distribution of strawberry plant metabolites at different maturity stages by MALDI-TOF imaging mass spectrometry. *Food Chem* **345**, 128838. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.128838>.
- Wu HY, Yang KM, Chiang PY (2018) Roselle Anthocyanins: Antioxidant Properties and Stability to Heat and pH. *Molecules* **26** <https://doi.org/10.3390/molecules23061357>
- Yaashikaa PR, Kamalesh R, Kumar PS, Saravanan A, Vijayasri K, Rangasamy G (2023) Recent advances in edible coatings and their application in food packaging. *Food Res Int* **173**, 113366. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113366>
- Yan J, Luo Z, Ban Z, Lu H, Li D, Yang D i sur. (2019) The effect of the layer-by-layer (LBL) edible coating on strawberry quality and metabolites during storage. *Postharvest Biol Technol* **147**, 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.09.002>
- Yan JW, Ban ZJ, Lu HY, Li D, Poverenov E, Luo ZS, Li L (2018) The aroma volatile repertoire in strawberry fruit: A review. *J Sci Food Agric* **98**, 4395-4402. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9039>
- Yang D, Xie H, Jiang Y, Wei X (2016) Phenolics from strawberry cv. Falandi and their antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities. *Food Chem* **194**, 857–863. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.091>
- Yuan B, Danao MGC, Stratton JE, Weier SA, Weller CL, Lu M (2018) High pressure processing (HPP) of aronia berry purée: Effects on physicochemical properties, microbial counts, bioactive compounds, and antioxidant capacities. *Innov Food Sci Emerg* **47**, 249-255. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.03.009>
- Zhang X, Ismail BB, Cheng H, Jin TZ, Qian M, Arabi SA, Guo M (2021) Emerging chitosan-essential oil films and coatings for food preservation-A review of advances and applications. *Carbohydr Polym* **273**, 118616. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118616>
- Zhao X, Xia M, Wei X, Xu C, Luo Z, Mao L (2019) Consolidated cold and modified atmosphere package system for fresh strawberry supply chains. *Lwt* **109**, 207-215. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.032>
- Zugic A, Đorđević S, Arsić I, Marković G, Živković J, Jovanović S, Tadić V (2014) Antioxidant activity and phenolic compounds in 10 selected herbs from Vrujci Spa, Serbia. *Ind Crop Prod* **52**, 519–527. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.027>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja INES ŠOŠTARIĆ izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis