

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Tijana D. Ilić

**HEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST
PLODOVA *LYCIUM BARBARUM* L. I
L. RUTHENICUM MURR. (SOLANACEAE)
GAJENIH U SRBIJI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2025.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Tijana D. Ilić

**CHEMICAL COMPOSITION AND
BIOLOGICAL ACTIVITY OF *LYCIUM
BARBARUM* L. AND
L. RUTHENICUM MURR. (SOLANACEAE)
FRUITS GROWN IN SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025.

Mentor

dr sc. Bojana Vidović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Članovi komisije

dr sc. Mirjana Marčetić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

dr sc. Dragana Božić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

dr sc. Jelena Đuriš, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

dr sc. Brižita Đorđević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

dr sc. Gordana Zdunić, naučni savetnik
Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“

U Beogradu, _____

Zahvalnica

Najveći deo ove doktorske disertacije je urađen u laboratoriji Katedre za bromatologiju Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Eksperimenti su, takođe, realizovani u laboratorijama Katedre za farmakognoziju, Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju i Katedre za mikrobiologiju i imunologiju Farmaceutskog fakulteta, Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta, kao i u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ i Institutu za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“.

Zahvaljujem se svim uzgajivačima plodova godži sa lokaliteta u Beogradu, Nišu, Subotici, Smederevu, Rumi i Požegi, koji su mi omogućili pristup uzorcima plodova i sporednih proizvoda, bez čije pomoći istraživanje ne bi bilo moguće.

Prof. dr **Bojani Vidović**, koja je rukovala ovom disertacijom, dugujem posebnu zahvalnost. Ovom prilikom joj se najiskrenije zahvaljujem na uloženoj energiji, predanosti, efikasnosti, savetima i sugestijama, kao i na svestranoj pomoći u svim fazama izrade i pisanja ove doktorske disertacije.

Prof. dr **Mirjani Marčetić** zahvaljujem se na stručnim savetima i korisnim predlozima koji su značajno unapredili kvalitet ovog istraživanja. Prof. dr **Dragani Božić** zahvaljujem se na njenom izuzetnom doprinosu, kao i na preciznim i korisnim sugestijama tokom finalizacije rada. Takođe, duboko poštovanje i zahvalnost upućujem prof. dr **Jeleni Đuriš**, koja je nesebično delila svoja laboratorijska iskustva, davala dragocene savete i sugestije. Posebno sam zahvalna prof. dr **Brižiti Đorđević** na razumevanju, strpljenju i nesebičnoj podršci, kao i na iskrenim životnim savetima i ohrabrenju koji su mi mnogo značili tokom celokupnog procesa rada. Veliku zahvalnost dugujem i dr **Gordani Zdunić** na izuzetnoj saradnji, stručnoj pomoći i konstruktivnim sugestijama koje su bile neprocenjive prilikom završnih faza rada.

Zahvalnost izražavam i svim kolegama i saradnicima sa Katedre za bromatologiju, kao i dragim prijateljima i kolegama sa drugih odeljaka, koji su svojim savetima, radom i entuzijazmom dali veliki doprinos ovom istraživanju. Posebno hvala istraživačima saradnicima **Nemanji Krgoviću** i dr **Ani Ćirić**, naučnim saradnicima dr **Stevanu Samardžiću**, dr **Ljubošu Ušjaku** i dr **Urošu Čakaru**, višem naučnom saradniku dr **Margariti Dodevskoj**, stručnom saradniku **Igoru Kodranovu**, asistentu sa doktoratom dr **Stefanu Kolašincu**, prof. dr **Ivani Đuričić**, **Milanu Milenkoviću** i mom bratu **Stevi** na zajedničkom naučno-istraživačkom radu, njihovim korisnim sugestijama i doprinosima u realizaciji ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost izražavam svim svojim prijateljima koji su, svakodnevno i sa puno ljubavi, bili uz mene, pružajući mi snagu i podršku pri svakom koraku mog naučnog puta.

Na kraju, najviše se zahvaljujem svojoj porodici, koja je bila moj najveći oslonac tokom celokupnog procesa. Najdublju zahvalnost dugujem svojim roditeljima, **mami Jugi** i **tati Draganu, Duletu** i **Daniju**, koji su mi u svakom trenutku pružali neizmernu veru, ljubav, strpljenje i podršku. Hvala vam što ste uvek uz mene, što se iskreno radujete svakom mom uspehu i što znam da u svakom trenutku mogu da se oslonim na vas. Bez vaše nesebične podrške ne bih mogla da istrajem do kraja.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem mami i tati!

Hemijski sastav i biološka aktivnost plodova *Lycium barbarum* L. i *L. ruthenicum* Murr. (Solanaceae) gajenih u Srbiji

Sažetak

Osim primene u tradicionalnoj ishrani i medicini azijskih zemalja, plodovi vrsta *Lycium* (Solanaceae), poznati kao godži, kao i njihovi proizvodi se danas koriste u ishrani širom sveta. S obzirom na rastuće potrebe, vrste *Lycium* se sve više uzgajaju u Evropi, uključujući i Srbiju. U ovoj doktorskoj disertaciji izvršena je sveouhvatna analiza hemijskog sastava i bioaktivnog potencijala crvenih (*Lycium barbarum* L.), žutih (*L. barbarum* var. *auranticarpum*) i crnih (*Lycium ruthenicum* Murr.) plodova godži, kao i sporednih proizvoda prerade crvenih plodova godži (pulpe i pogače) gajenih u Srbiji.

Analiza osnovnog nutritivnog sastava, sadržaja minerala, masnih kiselina, fitosterola i polifenola izvršena je standardnim, spektrofotometrijskim i hromatografskim metodama, dok su sadržaji bioaktivnih jedinjenja, kao i antioksidativni, antienzimski, antibakterijski i prebiotski potencijali u ekstraktima godži plodova određeni spektrofotometrijskim i vizuelnim metodama. Za optimizaciju procesa ekstrakcije odabranih sastojaka plodova i sporednih proizvoda prerade plodova godži korišćeni su *Plackett-Burman* i *Box-Behnken* eksperimentalni dizajn.

Postoje značajne varijacije u hemijskom sastavu i biološkoj aktivnosti između plodova godži različitih biljnih vrsta, kao i između plodova godži sa različitih lokaliteta u Srbiji. Žuti plodovi godži imaju izraženiji antimikrobni potencijal, a crni plodovi godži se osim najizraženijeg antioksidativnog efekta, odlikuju i izraženim prebiotskim svojstvima. Analiza hemijskog sastava, kao i antioksidativni i antienzimski potencijal crvenih plodova godži, kao i njihovih sporednih proizvoda, nakon optimizacije ekstrakcije, ukazuju na mogućnost njihove primene u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

Ključne reči: plod godži; nusproizvodi plodova godži; bioaktivna jedinjenja; biološke aktivnosti; optimizacija

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Bromatologija

Chemical composition and biological activity of *Lycium barbarum* L. i *L. ruthenicum* Murr. (Solanaceae) fruits grown in Serbia

Abstract

In addition to its use in Asian nutrition and traditional medicine, the fruits of the *Lycium* species (Solanaceae), known as goji berries, and their products are now used as food all over the world. Given the growing needs, there is rising interest in *Lycium* species cultivation in Europe, including Serbia. In this doctoral dissertation, a comprehensive analysis of the chemical composition and bioactive potential of red (*Lycium barbarum* L.), yellow (*L. barbarum* var. *auranticarpum*), and black (*Lycium ruthenicum* Murr.) goji berries, as well as by-products of red goji berries processing (pulp and press cake) grown in Serbia, was performed.

The analysis of the proximate composition, minerals, fatty acids, phytosterols, and polyphenols was performed using standard, spectrometric, and chromatographic methods, while the contents of bioactive compounds, as well as antioxidant anti-enzymatic, antibacterial, and prebiotic potentials in goji berries extracts, were determined using spectrophotometric and visual methods. The Plackett-Burman and Box-Behnken experimental design was used to optimize the extraction process of selected components of the fruits and by-products of goji fruit processing.

There are significant variations in the chemical composition and biological activity between goji fruits of different plant species and between goji fruits from different locations in Serbia. Yellow goji fruits have a more pronounced antimicrobial potential, and black goji fruits, in addition to a more pronounced antioxidant effect, are also characterized by pronounced prebiotic properties. Analysis of the chemical composition, the antioxidant and antienzyme potential of red goji fruits, and their by-products after optimization of the extraction indicate the possibility of their application in the food and pharmaceutical industries.

Key words: goji berries; waste of goji berries; bioactive compounds; biological activities; optimisation;

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Bromatology

SPISAK SKRAĆENICA

AA	L-Askorbinska kiselina
AA-2 β G	2-O- β -D-glukopiranozil-L-askorbinska kiselina
α -Amy	α -Amilaza
ABTS ⁺⁺	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
ABTS ⁺⁺ test	Sposobnost neutralizacije ABTS ⁺⁺ radikal katjona
AChE	Acetilholinesteraza
ACI	Antioksidativni kompozitni indeks
ADA	Američko udruženje dijetetičara
α -Gls	α -Glukozidaza
AI	Indeks aterogenosti
AOAC	Asocijacija zvaničnih hemičara analitičara
BBD	<i>Box-Behnken</i> dizajn
BG	Crveni plod godži sa lokaliteta Beograd
BSFTA	bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamid
C3G	Cijanidin-3-O-glukozid
CE	Katehin ekvivalent
Cox	Izračunata oksidativnost
CUPRAC	Sposobnost redukcije bakar (II) jona
DoE	Eksperimentalni dizajn
DPPH [*]	2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil
DPPH [*] test	Sposobnost neutralizacije DPPH [*] radikala
<i>dw</i>	Suva materija
FAME	Metil-estri masnih kiselina
FAO	Organizacija za hranu i poljoprivredu
FDA	Uprava za hranu i lekove
FRAP	Sposobnost redukcije gvožđe (III) jona
<i>fw</i>	Sveža masa uzorka
GAE	Ekvivalent galne kiseline
Glu	Ekvivalent glukoze
HE	Ekvivalent hiperozida
IO β K	Test inhibicije obezbojavanja β -karotena
LB	Crveni plod godži
LBa	Žuti plod godži
LBP	<i>L. barbarum</i> polisaharidi
LC	<i>Lycium chinense</i> Mill.
LOX	Lipooksigenaza
LR	Crni plod godži
LRP	<i>L. ruthenicum</i> polisaharidi
MAC	Sadržaj ukupnih monomernih antocijana
MIC	Minimalna inhibitorna koncentracija
MNMK	Mononezasićene masne kiseline
NDV	Nerastvorna dijetna vlakna
NI	Crveni plod godži sa lokaliteta Niš
NMK	Nezasićene masne kiseline
NRV	Nutritivna referentna vrednost
OFAT	Univarijantni pristup optimizacije

OS	Oksidativna stabilnost
PB	<i>Plackett-Burman</i> dizajn
PNMK	Polinezasićene masne kiseline
PYE	Ekvivalent pirogalola
RASFF	Sistem brzog uzbunjivanja i obaveštavanja za hranu i hranu za životinje
RDA	Preporučeni dnevni unos
RDV	Rastvorna dijetna vlakna
RNS	Reaktivne vrste azota
ROS	Reaktivne vrste kiseonika
RSM	Metodologija površine odgovora
RU	Crveni plod godži sa lokaliteta Ruma
SCFA	Kratkolančane masne kiseline
SD	Crveni plod godži sa lokaliteta Smederevo
SU	Crveni plod godži sa lokaliteta Subotica
TA	Titrirana kiselost
TAcy	Sadržaj ukupnih antocijana
TCC	Sadržaj ukupnih karotenoida
TE	Ekvivalent troloksa
TFC	Sadržaj ukupnih flavonoida
TI	Indeks trombogenosti
TIA	Tirozinaza
TPC	Sadržaj ukupnih polifenola
TSS	Ukupna rastvorljiva suva materija
TT	Sadržaj ukupnih tanina
UDV	Ukupna dijetna vlakna
WHO	Svetska zdravstvena organizacija
ZMK	Zasićene masne kiseline

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE RODA <i>LYCIUM</i>	1
1.2. RASPROSTRANJENOST PLODOVA GODŽI	3
1.3. UPOTREBA PLODOVA GODŽI	4
1.4. SPOREDNI PROIZVODI PRERADE PLODOVA GODŽI	5
1.5. NUTRITIVNE KARAKTERISTIKE PLODOVA GODŽI	6
1.5.1. Osnovni nutritivni sastav	6
1.5.2. Masne kiseline.....	7
1.5.3. Fitosteroli	8
1.5.4. Vitamini	9
1.5.5. Mineralne materije	10
1.5.6. Organske kiseline	10
1.5.7. Senzorne karakteristike	10
1.6. BIOAKTIVNA JEDINJENJA PLODOVA GODŽI.....	11
1.6.1. Polisaharidi.....	11
1.6.2. Karotenoidi.....	11
1.6.3. Fenolna jedinjenja	12
1.6.3.1. Fenolkarboksilne kiseline	14
1.6.3.2. Flavonoidi.....	14
1.6.3.3. Kumarini.....	17
1.6.4. Alkaloidi.....	17
1.7. BIOLOŠKA AKTIVNOST PLODOVA GODŽI	17
1.7.1. Antioksidativna aktivnost	17
1.7.2. Hipoglikemijski efekti.....	19
1.7.3. Neuroprotektivni efekti	20
1.7.4. Antiinflamatorni efekti.....	20
1.7.5. Antimikrobni efekti.....	21
1.7.6. Prebiotski potencijal.....	21
1.8. POTENCIJALNI RIZICI KONZUMIRANJA PLODOVA GODŽI.....	23
1.9. OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE BIOLOŠKI AKTIVNIH JEDINJENJA IZ PLODOVA GODŽI	24
1.9.1. Ekstrakcija biološki aktivnih jedinjenja.....	24
1.9.2. Eksperimentalni dizajn.....	25
1.9.3. Statistička procena modela.....	26
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	28
3. EKSPERIMENTALNI DEO	29

3.1. HEMIHALIJE, REAGENCI I STANDARDI.....	29
3.2. MATERIJAL	30
3.2.1. Priprema uzoraka	32
3.2.2. Priprema vodenometanolnih ekstrakata	32
3.3. Analiza hemijskog sastava plodova godži	32
3.3.1. Nutritivni sastav i energetska vrednost	32
3.3.2. Određivanje masnih kiselina	33
3.3.3. Određivanje fitosterola.....	34
3.3.4. Određivanje sadržaja 2- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glukopiranozil- <i>L</i> -askorbinske kiseline	34
3.3.5. Određivanje mineralnih materija	35
3.3.5.1. Određivanje nutritivne referentne vrednosti	35
3.4. Analiza fizičko-hemijskih parametara plodova godži	35
3.4.1. Određivanje pH vrednosti	35
3.4.2. Određivanje ukupne rastvorljive suve materije	35
3.4.3. Određivanje titrirane kiselosti	35
3.5. Analiza bioaktivnih jedinjenja u plodovima godži	36
3.5.1. Određivanje sadržaja ukupnih polisaharida	36
3.5.2. Određivanje sadržaja ukupnih karotenoida	36
3.5.3. Određivanje polifenolnih jedinjenja.....	37
3.5.3.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola	37
3.5.3.2. Hromatografska analiza profila polifenolnih jedinjenja	37
3.5.4. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida.....	39
3.5.5. Određivanje sadržaja ukupnih antocijana	39
3.5.5.3. Hromatografska analiza antocijana.....	40
3.5.6. Određivanje sadržaja ukupnih tanina	41
3.6. Analiza bioloških aktivnosti plodova godži.....	41
3.6.1. Antioksidativna aktivnost	41
3.6.1.1. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH [•] radikala.....	41
3.6.1.2. Određivanje sposobnosti neutralizacije ABTS ^{•+} radikala.....	42
3.6.1.3. Određivanje sposobnosti redukcije jona gvožđa (FRAP metoda)	43
3.6.1.4. Određivanje sposobnosti redukcije jona bakra (CUPRAC metoda).....	44
3.6.1.5. Određivanje inhibicije obezbojavanja β -karotena	45
3.6.1.6. Izračunavanje antioksidativnog kompozitnog indeksa (ACI)	46
3.6.2. Antienzimski aktivnost.....	47
3.6.2.1. Određivanje inhibicije α -amilaze.....	47
3.6.2.2. Određivanje inhibicije α -glukozidaze.....	48
3.6.2.3. Određivanje inhibicije acetilholinesteraze.....	48
3.6.2.4. Određivanje inhibicije tirozinaze.....	49

3.6.2.5. Inhibicija enzima 15-lipooksigenaze	50
3.6.3. Antimikrobna aktivnost.....	50
3.6.4. Prebiotska aktivnost	51
3.7. OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE.....	52
3.7.1. Ekstrakcija.....	52
3.7.2. Skrining parametara ekstrakcije.....	52
3.7.3. Optimizacija ekstrakcije.....	53
3.7.4. Statistička analiza rezultata optimizacije	56
3.8. STATISTIČKA ANALIZA	57
4. REZULTATI I DISKUSIJA	58
4.1. Prva faza istraživanja	58
4.1.1. Nutritivni sastav i energetska vrednost plodova LB, LBa i LR.....	58
4.1.2. Masno-kiselinski sastav plodova LB, LBa i LR	61
4.1.3. Sastav fitosterola plodova LB	64
4.1.4. Mineralni sastav plodova LB, LBa i LR	66
4.1.5. Sadržaj 2- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glukopiranozil- <i>L</i> -askorbinske kiseline u plodovima LB, LBa i LR	70
4.1.6. Fizičko-hemijski parametri plodova LB, LBa i LR	71
4.1.7. Bioaktivna jedinjenja plodova LB, LBa i LR	71
4.2. Druga faza istraživanja.....	77
4.2.1. Antioksidativna aktivnost plodova LB, LBa i LR	77
4.2.2. Antienzimski aktivnost plodova LR.....	79
4.2.3. Antimikrobna aktivnost plodova LB, LBa i LR	82
4.2.4. Prebiotski potencijal plodova LR.....	85
4.3. Treća faza istraživanja	86
4.3.1. Skrining faktora koji utiču na ekstrakciju TPC, TFC i antioksidativnu aktivnost.....	86
4.3.2. Optimizacija ekstrakcije primenom metodologije površine odgovor	88
4.3.2.1. Statistička procena modela	88
4.3.2.2. Analiza uticaja odabranih nezavisnih varijabli na sadržaj TPC	91
4.3.2.3. Analiza uticaja odabranih nezavisnih varijabli na sadržaj TFC	92
4.3.2.4. Analiza uticaja odabranih nezavisnih varijabli na vrednosti ACI	93
4.4. Četvrta faza istraživanja.....	96
4.4.1. Nutritivni sastav i energetska vrednost sporednih proizvoda prerade plodova LB.....	96
4.4.2. Masno-kiselinski sastav sporednih proizvoda prerade plodova LB.....	97
4.4.3. Mineralni sastav sporednih proizvoda prerade plodova LB	98
4.4.4. Bioaktivna jedinjenja sporednih proizvoda prerade plodova LB.....	99
4.4.5. Biološke aktivnosti sporednih proizvoda prerade plodova LB	100
4.4.5.1. Antioksidativna aktivnost sporednih proizvoda prerade plodova LB.....	100
4.4.5.2. Antienzimski aktivnost sporednih proizvoda prerade plodova LB.....	101

4.4.6. Optimizacija procesa ekstrakcije pogače	102
4.4.6.1. Skrining faktora koji utiču na ekstrakciju TPC i ACI u pogači.....	102
4.4.6.2. Optimizacija ekstrakcije primenom metodologije površine odgovora	104
4.4.6.2.1. Statistička procena modela	104
4.4.6.2.2. Analiza uticaja odabranih nezavisnih varijabli na sadržaj TPC u pogači	106
4.4.6.2.3. Analiza uticaja odabranih nezavisnih varijabli na sadržaj TFC u pogači	107
4.4.6.2.4. Analiza uticaja odabranih nezavisnih varijabli na ACI pogače	107
4.4.6.2.5. Analiza uticaja odabranih nezavisnih varijabli na LBP i TCC u pogači	107
4.4.7. Optimizacija procesa ekstrakcije pulpe.....	108
4.4.7.1. Skrining faktora koji utiču na ekstrakciju TPC, TFC i ACI u pulpi.....	108
4.4.7.2. Optimizacija ekstrakcije primenom metodologije površine odgovor	109
4.4.7.2.1. Statistička procena modela	109
4.4.7.2.2. Analiza uticaja odabranih nezavisnih varijabli na TPC u pulpi.....	111
4.4.7.2.3. Analiza uticaja odabranih nezavisnih varijabli na TFC u pulpi.....	112
4.4.7.2.4. Antienzijske aktivnosti optimizovanog ekstrakta pulpe	113
5. ZAKLJUČAK	114
5.1. Zaključci prve faze istraživanja	114
5.2. Zaključci druge faze istraživanja	115
5.3. Zaključci treće faze istraživanja.....	116
5.4. Zaključci četvrte faze	116
5.5. Sveobuhvatni zaključak	117
6. LITERATURA.....	118
7. BIOGRAFIJA AUTORA.....	136

1. UVOD

1.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE RODA *LYCIUM*

Konzumiranje bobičastog voća postaje sve popularnije u savremenoj ishrani. Pored nutritivnog značaja, bobičasto voće sadrži širok spektar bioaktivnih jedinjenja, koja pokazuju značajan potencijal za unapređenje zdravlja ljudi. Među egzotičnim voćem, plodovi vrsta *Lycium* (Solanaceae), poznati pod nazivom godži, su poslednjih decenija na globalnom tržištu predstavljeni kao „superhrana“ ili „supervoće“, što povećava interes za istraživanjima njihovog hemijskog sastava, zdravstvenih efekata, kao i potencijalnu primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (1–3).

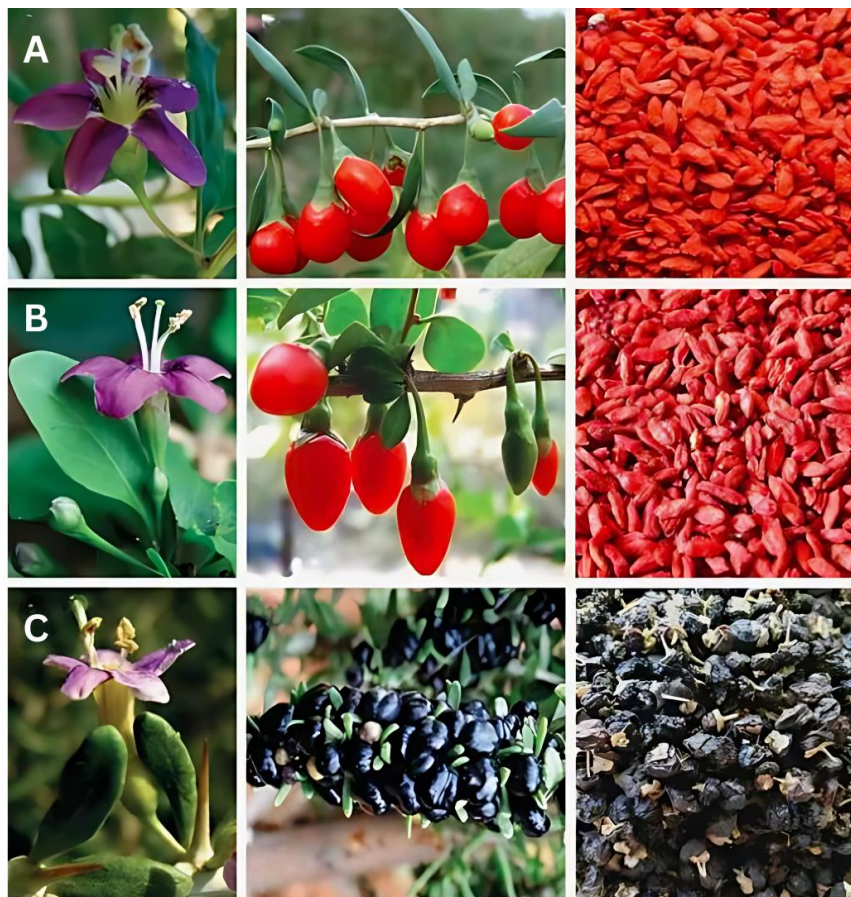
Porodica pomoćnica (Solanaceae) obuhvata oko 100 rodova i 2500 vrsta, čime je svrstana među tri najvažnije biljne porodice, odmah nakon Poaceae i Fabaceae. U porodicu Solanaceae spadaju mnoge ekonomski važne biljne vrste kao što su paradajz (*Solanum lycopersicum* L.), krompir (*Solanum tuberosum* L.), patlidžan (*Solanum melongena* L.), paprika (*Capsicum annuum* L.). Biljke poput duvana (*Nicotiana tabacum* L.), dature (*Datura innoxia* Mill.), velebilje (*Atropa belladonna* L.) i ašvagande (*Withania somnifera* L.), imaju dobro poznata lekovita svojstva, dok se neke druge, poput petunije (*Petunia* spp.) i krumpirovog grma (*Lycianthes rantonnetii* (Carrière) Bitter), koriste kao ukrasne biljke (4,5). Rod *Lycium* takođe pripada porodici Solanaceae i obuhvata oko 100 biljnih vrsta, među kojima su najpoznatije i najviše ispitivane *Lycium chinense* Mill. (LC) i *Lycium barbarum* L. (LB). Vrsta LB je prvi put opisana od strane Carla Linnaeus 1753. godine, dok je vrstu LC imenovao Philip Miller, 15 godina kasnije. Plodovi ovih biljaka, poznati kao godži, vučje bobice (engl. *wolfberry*) ili kineske bobice (kin. *goukizi*), imaju dugu istoriju primene u tradicionalnoj medicini i ishrani stanovnika azijskih zemalja (6–8). Najveći broj dostupnih literaturnih podataka se odnosi na hemijski sastav, biološku aktivnost i primenu plodova ove dve biljne vrste. Poslednjih godina sve veći broj istraživanja je usmeren i na proučavanje drugih *Lycium* vrsta, kao što je *L. ruthenicum* Murray (LR) (9). Naučna klasifikacija roda *Lycium* prikazana je u Tabeli 1.

Tabela 1. Naučna klasifikacija roda *Lycium* (1)

Domen	<i>Eukaryota</i>
Carstvo	<i>Plantae</i>
Vrsta	<i>Spermatophyta</i>
Podvrsta	<i>Angiospermae</i>
Klasa	<i>Dicotyledonae</i>
Red	<i>Solanes</i>
Porodica	<i>Solanaceae</i>
Rod	<i>Lycium</i>

Vrste roda *Lycium* dele zajedničke morfološke karakteristike. Sve su višegodišnji listopadni drvenasti grmovi, visine od 20 do 200 cm, sa trnovitim granama. Listovi su sivozeleni, mesnati, kopljastog ili subcilindričnog oblika, naizmenično raspoređeni, pojedinačni ili u grupama, dužine 0,5–5 cm i širine 0,5–7 mm. Cvetovi su ljubičasti, pojedinačni ili grupisani, sa zvonastom čašicom dužine 3–5 mm i 2–5 režnjeva. Iako su ove karakteristike uobičajene, različite *Lycium* vrste pokazuju morfološke varijacije, naročito u obliku, boji i ukusu plodova (10,11).

Na **Slici 1.** prikazane su morfološke karakteristike cvetova, kao i svežih i osušenih plodova LC, LB i LR.



Slika 1. Morfološke karakteristike cvetova i plodova LC (A), LB (B) i LR (C)

Pored morfoloških karakteristika, genetski markeri pružaju dodatne dokaze o specifičnosti različitih *Lycium* vrsta. Razlike u ekspresiji regulatornih i strukturnih gena, kao i nivo transkripcije gena za enzime, mogu uticati na fenotipske razlike u biosintezi bioaktivnih jedinjenja između plodova LR i LB (12).

1.2. RASPROSTRANJENOST PLODOVA GODŽI

Kina je najveći svetski proizvođač plodova godži, sa godišnjom proizvodnjom od oko 300 000 tona (13). Glavne proizvodne regije pripadaju različitim klimatskim zonama, uključujući: monsunsku regiju (*Hebei*), polusušnu regiju (*Ningxia*, *Gansu* i *Inner Mongolia*), visoravni (*Qinghai*) i sušne regije (*Xinjiang*). Specifični klimatski i ekološki uslovi, doprinose razlikama u senzornim i hemijskim karakteristikama plodova godži, što je od ključnog značaja za njihov kvalitet i komercijalnu vrednost (**Slika 2**) (14).



Slika 2. Glavne proizvodne regije plodova godži u Kini (15)

Od 1961. godine plantaže iz regiona *Ningxia* imaju status nacionalnog značaja za uzgoj plodova godži. U ovom regionu se proizvodi oko 45 % od ukupnog prinosa plodova godži u Kini (15–17). U gradu *Yinchuan*, *Ningxia*, se nalazi naučni institut koji se isključivo bavi istraživanjem plodova godži i sponzorisan je od strane države (16). *Ningxia* je prepoznata kao *daodi* region, što podrazumeva da plodovi potiču iz specifične germplazme, uzgajaju se na određenoj geografskoj lokaciji i obrađuju posebnim tradicionalnim tehnologijama. Ovakvi plodovi su visoko cenjeni zbog kvaliteta i dugogodišnje reputacije (3,15). Međutim, morfološke analize ukazuju da se plodovi iz polusušnih regiona značajno ne razlikuju od godži plodova iz drugih regiona, što posledično povećava rizik od falsifikovanja porekla godži plodova (15).

Vrste *Lycium* se uglavnom uzgajaju u sušnim i polusušnim regionima, za koje su karakteristični ekstremni uslovi, kao što su velika nadmorska visina, intenzivno sunčevo zračenje i slano-alkalno zemljište. Ovi ekološki uslovi podstiču biosintezu i akumulaciju različitih primarnih i sekundarnih biljnih metabolita (1,9,18). Zahvaljujući visokoj otpornosti na so, sušu, niske temperature, snažne vetrove i zagađenje naftom, *Lycium* vrste se koriste za kontrolu erozije zemljišta i obnavljanje degradiranih ekosistema (19). Rastuća globalna potražnja za godži plodovima dovela je do globalne ekspanzije uzgoja LB uključujući Indiju, Koreju, Japan i druge azijske zemlje (16), kao i na područja sa umerenom kontinentalnom klimom. Smatra se da uzgoj godži plodova u Evropi datira od XVIII veka (1). Prema dostupnim literaturnim podacima, plodovi godži se uzgajaju širom evropskih zemalja, uključujući Italiju (20), Grčku (21), Poljsku (22), Rumuniju (23), Švajcarsku

(24), Portugal (25), Severnu Makedoniju (26), Sloveniju (27), kao i Srbiju (28). U Evropskoj uniji, trenutno se po površinama uzgoja Rumunija smatra vodećom zemljom proizvodnje plodova godži (29).

1.3. UPOTREBA PLODOVA GODŽI

Različiti delovi biljaka roda *Lycium*, uključujući plodove, listove, cvetove, mlade izdanke i koru korena imaju dugu istoriju primene u tradicionalnoj ishrani i u medicinske svrhe (3). Prvi zapisi o lekovitim svojstvima ovih biljaka potiču iz najstarije kineske farmakopeje „*Shen Nong Ben Cao Jing*“, u kojoj su klasifikovani među najcenjenijim biljkama zbog efikasnosti i bezbednosti dugotrajne upotrebe (1,30). Plodovi godži su najčešće korišćeni u obliku tonika, tinktura i praškova za ublažavanje tegoba, kao što su problemi sa vidom, srcem, neplodnost, suvi kašalj, bolovi u stomaku i glavobolja, kao i za prevenciju i lečenje različitih bolesti poput dijabetesa, hipertenzije, umora, nesаницe i disfunkcije jetre (3,9,31).

Kineska farmakopeja Narodne Republike Kine propisuje terapijsku upotrebu plodova i kore LB i LC, pri čemu preporučena doza za sušeni plod LB iznosi 5-12 g (32,33). Osim u kineskoj medicini, plodovi vrsta roda *Lycium* koriste se tradicionalno i u medicinskim praksama u Koreji, Vijetnamu, Japanu i Tibetu (1). Plodovi vrsta roda *Lycium* obuhvaćeni su brojnim farmakopejama širom sveta, uključujući deseto izdanje Evropske farmakopeje, koje obuhvata isključivo sušene plodove LB (34). Zahtevi i kriterijumi za ispitivanje kvaliteta plodova godži se značajno razlikuju prema farmakopejama, a dodatno su definisani i međunarodnim standardom (35).

Za razliku od plodova LC, koji se uglavnom koriste u suvom obliku i kuvaju pre konzumiranja, plodovi LB i LR se, zahvaljujući većem sadržaju šećera i prihvatljivijim senzorskim svojstvima, konzumiraju sveži. Međutim, visok sadržaj vode ograničava stabilnost i dužinu čuvanja, te se plodovi godži suše ili se koriste za pripremu sokova, vina, čajeva, džemova, ali i kao dodatak prehrambenim proizvodima, poput sladoleda, marmelade, sosova, salata, piva, pekarskih i mlečnih proizvoda (1,7,20,29,36).

Danas su plodovi godži dostupni na globalnom tržištu funkcionalne hrane, kao namirnice ili kao dodaci ishrani. Ministarstvo zdravlja Italije je uvrstilo plodove godži na listu namirnica sa antioksidativnim svojstvima, što doprinosi njihovoj upotrebi kao aktivnih sastojaka dijetetskih suplemenata (36). Poslednjih godina, upotreba prirodnih pigmenata u industriji prehrambenih boja značajno je povećana, što se pripisuje rastućoj svesti o ekološkim opasnostima i potencijalnim nuspojavama sintetskih supstanci koje se koriste kao prehrambene boje. Posledično, sastojci plodova godži, posebno antocijani iz plodova LR, imaju potencijal za upotrebu kao prehrambene boje prirodnog porekla (19,37).

Iako plodovi godži nemaju dugu istoriju upotrebe u Evropi, nisu regulisani zakonodavstvom Evropske Unije o novoj hrani. Stoga ne postoje ograničenja ili posebni zakonski uslovi za njihovu upotrebu u prehrambenoj industriji (38).

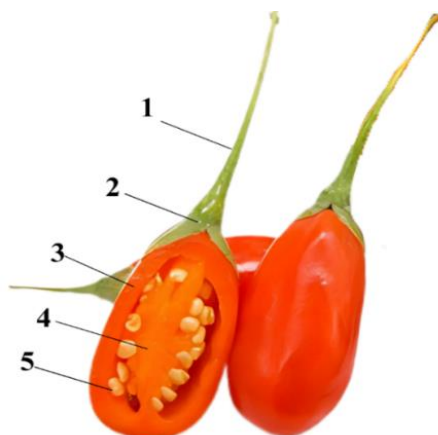
1.4. SPOREDNI PROIZVODI PRERADE PLODOVA GODŽI

U Evropskoj uniji godišnje se generiše oko 88 miliona tona otpada od hrane, što se dovodi u vezu sa velikim ekonomskim troškovima (39). Prema podacima Organizacije za hranu i poljoprivredu (engl. *Food and Agriculture Organisation*, FAO), oko jedna trećina hrane se gubi ili baca, što iznosi oko 1,6 milijardi tona godišnje. Otpad tokom prerade voća i povrća uključuje koru, kominu, cvetove, stabljike, listove, semena i pulpu, i predstavlja peti najznačajniji izvor otpada hrane, čineći oko 8 % ukupnog prehrambenog otpada (39,40). Pored ekonomskih troškova, značajni su i negativni uticaji na životnu sredinu (41). Industrijski sektor se suočava sa izazovom prelaska na ekološki održive protokole obrade. Nusproizvodi se danas često prerađuju u stočnu hranu ili poljoprivredni kompost, gde otpad biljnog porekla ima širu primenu zbog visokog sadržaja celuloze i lignina. Celuloza i hemiceluloza iz biljnog otpada mogu se razgraditi enzimima i zatim fermentisati u etanol pomoću mikroorganizama, dok lignin putem pirolize i aerobne degradacije proizvodi vodonik i metan. Takođe, ovaj proces omogućava proizvodnju enzima i bioplastike. Anaerobna digestija biljnog otpada generiše električnu energiju, toplotu i biodubrivo, dok spaljivanjem može doći do formiranja hidrogelova (42). Najperspektivniji pristup upravljanjem otpadom uključuje korišćenje nusproizvoda, kao sirovina za dobijanje bioaktivnih jedinjenja koja se dalje mogu koristiti kao dodaci hrani, kozmetički sastojci, prehrambene boje i konzervansi (2).

Zbog visokog sadržaja vode, stabilnost i trajanje svežih plodova godži su ograničeni. S toga se na tržištu plodovi godži nalaze kao sušeni plodovi ili u obliku matičnih i koncentrovanih sokova. Tokom procesa proizvodnje godži sokova stvara se značajna količina nusproizvoda koji se uglavnom odbacuju, uključujući epikarp i semenke (oko 10 kg na 90 kg soka), dok tokom ceđenja ulja iz semenki nastaje značajna količina pogače (41,43). Međutim, ovi nusproizvodi prerade plodova godži mogu biti značajan izvor dijetnih vlakana i drugih bioaktivnih jedinjenja (44). Potreba za ekonomskim i ekološkim iskorišćenjem nusproizvoda plodova godži je sve izraženija u savremenoj prehrambenoj industriji, jer omogućava razvoj funkcionalnih proizvoda sa dodatnom nutritivnom vrednošću. Na primer, inkorporiranje nusproizvoda plodova godži u pekarske proizvode, može pružiti koristi i potrošačima i proizvođačima, ne samo zbog njihove nutritivne vrednosti, već i zbog ekonomske prednosti, usled eliminacije troškova odlaganja (41). Osim nutritivnih i potencijalnih zdravstvenih koristi, nusproizvodi i njihovi izolovani bioaktivni sastojci se sve više koriste kao funkcionalni dodaci u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, zahvaljujući svojstvima kojima poboljšavaju stabilnost i senzorne karakteristike proizvoda (2).

1.5. NUTRITIVNE KARAKTERISTIKE PLODOVA GODŽI

Zahvaljujući napretcima u razvoju instrumentalnih tehnika, složen hemijski sastav plodova godži se detaljno proučava poslednjih godina. Iz različitih delova plodova godži (**Slika 3**), do sada je izolovano i identifikovano više od 350 hemijskih jedinjenja.



Slika 3. Delovi ploda LB: 1 – drška ploda; 2- listići čašice; 3- epikarp; 4- pulpa; 5- semenke (47)

Međutim, hemijski profil plodova godži se može značajno razlikovati u zavisnosti od geografskog porekla, načina uzgoja i klimatskih uslova. Plodovi godži su dobar izvor nutrijenata, uključujući lipide, proteine, vlakna, vitamin C i mineralne materije, kao i brojnih nenutritivnih bioaktivnih jedinjenja, poput polisaharida, karotenoida i fenolnih jedinjenja (1,21,45,46). Zahvaljujući atraktivnoj boji, slatko-ljutom ukusu, nutritivnom i biološkom značaju, plodovi godži se smatraju funkcionalnom hranom, kao i značajnom sirovinom u proizvodnji inovativnih prehrambenih i kozmetičkih proizvoda (7).

1.5.1. Osnovni nutritivni sastav

Sveži plodovi godži se karakterišu visokim sadržajem vode i niskim sadržajem lipida, što za posledicu ima nisku energetska vrednost (48). Zbog visokog sadržaja vode, dužina čuvanja svežih plodova godži je ograničena na oko nedelju dana na sobnoj temperaturi ili nekoliko nedelja u frižideru, zbog čega se plodovi najčešće suše, različitim tehnikama sušenja (2). Suvi plodovi godži mogu se čuvati i do godinu dana, na tamnom, suvom i hladnom mestu (49). Suva materija u plodovima godži se uglavnom sastoji od ugljenih hidrata, a zatim proteina, lipida i mineralnih materija. Energetska vrednost sušenog voća je oko četiri puta veća u poređenju sa svežim plodovima (48). Ugljeni hidrati su najzastupljeniji nutrijenti u plodovima godži, sa sadržajem šećera preko 50 % (18).

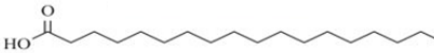
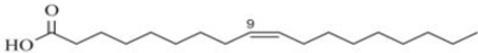
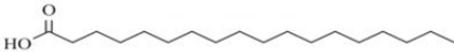
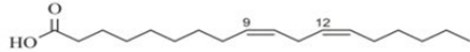
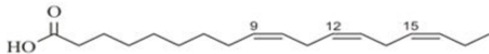
Ukupan sadržaj šećera određuje kvalitet plodova godži, jer utiče na morfološke osobine i slatkoću. Tokom sazrevanja plodova, dolazi do kontinuiranog povećanja sadržaja fruktoze i glukoze, dok se sadržaj saharoze smanjuje (50). Plodovi LC imaju niži sadržaj ukupnih šećera u poređenju sa plodovima LB, što doprinosi razlikama u ukusu između plodova ovih vrsta (21). Sadržaj fruktoze i glukoze se smatra značajnim parametrom za razlikovanje plodova LB koji potiču iz različitih regiona (18). Najzastupljeniji šećer u plodovima LR je glukoza, dok su fruktoza i saharoza prisutne u manjim količinama (51). Kvantitativne razlike u sadržaju šećera ne zavise samo od stepena zrelosti plodova, već i od biljnih vrsta, klimatskih uslova i agronomskih praksi koje se primenjuju u različitim regionima (24,52).

Plodovi godži se smatraju dobrim izvorom nesvarljivih ugljenih hidrata, odnosno dijetnih vlakana. Dijetna vlakna se prema rastvorljivosti dele na rastvorna (kao što su pektini, gume i sluzi) i nerastvorna (poput celuloze, lignina i određenih polimera hemiceluloze) (53). Odnos nerastvornih i rastvornih dijetnih vlakana u plodovima godži je oko 3:1 (48). Veći unos dijetnih vlakana povezan je sa mnogim zdravstvenim koristima, uključujući prevenciju dijabetesa, gojaznosti, kardiovaskularnih i gastrointestinalnih bolesti. Zbog toga Svetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*, WHO) i FAO preporučuju dnevni unos od najmanje 25 g dijetnih vlakana (54). Brojne epidemiološke studije ukazuju da je suboptimalan unos vlakana značajan nutritivni faktor rizika (55). Konzumiranjem 30 g sušenih plodova godži se može obezbediti više od 10 % preporučenog dnevnog unosa dijetnih vlakana. Zahvaljujući prosečnom sadržaju ukupnih vlakana koji je veći od 6 g/100g, sušeni plodovi godži ispunjavaju zahteve za nutritivnu izjavu „bogat izvor vlakana“, što ih čini pogodnim za proizvodnju namirnica obogaćenih vlaknima (56).

Prema literaturnim podacima, sadržaj proteina u plodovima godži je značajno veći u odnosu na druge vrste bobičastog voća (45). Uprkos značajnim varijacijama u zavisnosti od vrste i geografskog porekla, plodovi godži se smatraju izvorom slobodnih aminokiselina, koje čine 1,0-2,7 %. Pored *L*-aminokiselina, plodovi sadrže i neproteinske aminokiseline, kao što su γ -aminobuterna kiselina, taurin, betain, hidroksiprolin i citrulin, koje imaju specifične metaboličke funkcije (18,33,57). Prolin i serin su dominantne aminokiseline u plodovima LB, dok esencijalne aminokiseline čine 17–30 % ukupnih slobodnih aminokiselina. Sadržaj baznih aminokiselina (arginina, lizina i histidina) i redukujućih šećera, koji su ključni za *Maillard*-ovu reakciju, se često koriste kao kriterijum za optimizaciju procesa sušenja plodova godži. U plodovima LR, glavne aminokiseline su asparagin i arginin, dok su glutamin, asparaginska kiselina i serin zastupljeni u manjim količinama (18). Leucin, metionin, izoleucin i fenilalanin su značajno više zastupljeni u plodovima LR (9).

1.5.2. Masne kiseline

Masne kiseline predstavljaju osnovne komponente lipida, koje imaju ključnu ulogu u strukturi i funkciji ćelijskih membrana, kao i u skladištenju energije. Njihova hemijska struktura se sastoji od dugih lanaca ugljenika i vodonika sa karboksilnom grupom na jednom kraju, što ih čini neophodnim za mnoge biološke procese. Masne kiseline se dele na zasićene (engl. *Saturated fatty acid*, ZMK), koje nemaju dvostruke veze, i nezasićene, koje sadrže jednu (engl. *Monounsaturated fatty acid*, MNMK) ili više dvostrukih veza (**Slika 4**).

ZASIĆENE MASNE KISELINE	NEZASIĆENE MASNE KISELINE
 Palmitinska kiselina (heksadekanska)	 Oleinska kiselina (9-oktadekaenska)
 Stearinska kiselina (oktadekanska)	 Linolna kiselina (9,12-oktadekadienska)
	 α-Linolenska kiselina (9,12,15-oktadekatrienska)

Slika 4. Strukture najzastupljenijih masnih kiselina u plodovima godži (9)

Dugolančane polinezasićene masne kiseline (engl. *Polyunsaturated fatty acid*, PNMK), poput omega-3 (ω -3) i omega-6 (ω -6) masnih kiselina, poznate su po svojim zdravstvenim efektima, uključujući smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti. Dijetarni unos masnih kiselina je od velikog značaja, jer one imaju ključnu ulogu u regulaciji inflamatornih procesa i funkciji imunskog sistema (58).

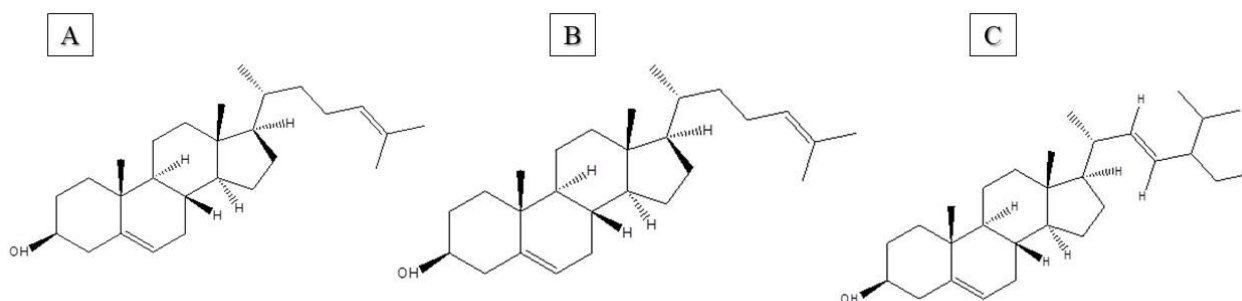
Iako plodovi godži imaju nizak sadržaj ukupnih masti odlikuju se povoljnim profilom masnih kiselina. Masno-kiselinski profil plodova LB se karakteriše niskim sadržajem ZMK, a visokim sadržajem MNMK i PNMK. Najzastupljenije masne kiseline u plodovima LB su linolna kiselina, zatim oleinska, palmitinska i stearinska kiselina, koje čine oko 95 % od ukupnog sadržaja masnih kiselina (29). Sličan sastav masnih kiselina utvrđen je i u plodovima LR (59).

Esencijalna linolna kiselina, koja pripada ω -6 seriji, predstavlja dominantnu PNMK u plodovima LB. Organski uzgajani plodovi LB su bogatiji izvor linolne kiseline u poređenju sa drugim vrstama bobičastog voća, kao što su borovnice, *acai* bobice i brusnica. Dodatno, α -linolenska kiselina, esencijalna masna kiselina ω -3 serije, prisutna je u značajnim količinama. Zahvaljujući sadržaju linolne i α -linolenske kiseline plodovi godži se smatraju novim dijetarnim izvorima esencijalnih masnih kiselina (60,61). Takođe, povoljan odnos PNMK i ZMK, kao i drugih lipidnih indeksa, sugerišu da plodovi i ulja plodova godži imaju antiaterogeni i antitrombogeni potencijal (26).

1.5.3. Fitosteroli

Fitosteroli su triterpenoidi, tetraciklična jedinjenja biljnog porekla, strukturno slična holesterolu, zbog čega su poznati i pod nazivom biljni steroli. Najveće koncentracije fitosterola nalaze se u nerafinisanim biljnim uljima. Iako se apsorbuju u malim količinama, fitosteroli imaju sposobnost intestinalne inhibicije apsorpcije holesterola, uključujući i recirkulišući endogeno sintetisani holesterol, što doprinosi njihovim hipolipidemijskim efektima (62). Pored hipolipemijskog efekta, epidemiološke i kliničke studije ukazuju na antiinflamatorni, antioksidativni i antikancerogeni potencijal fitosterola (9,63). Procenjeni dijetarni unos fitosterola iznosi između 100 i 400 mg dnevno (64).

Plodovi godži smatraju se značajnim dijetarnim izvorom fitosterola, prvenstveno β -sitosterola (**Slika 5**) (20). Međutim, utvrđene su značajne razlike u ukupnom sadržaju i profilu fitosterola među plodovima LB različitog geografskog porekla, što ukazuje da sastav fitosterola može biti koristan parametar za autentifikaciju plodova godži (61,65). Pored β -sitosterola, u plodovima LR u većim količinama su zastupljeni kampesterol i stigmasterol (59).



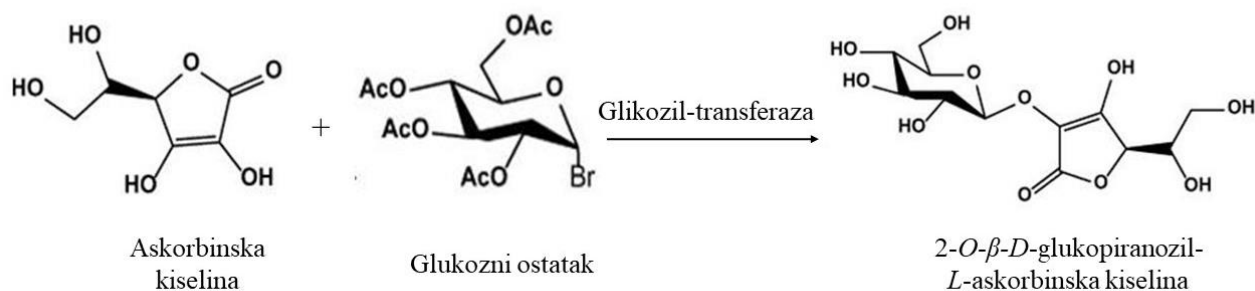
Slika 5. Najzastupljeniji fitosteroli u plodovima godži (A- β -sitosterol; B-dezmosterol; C-stigmasterol) (9)

1.5.4. Vitamini

Vitamini su esencijalni mikronutrijenti neophodni za normalno funkcionisanje humanog organizma. Osnovna podela je na hidrosolubilne (vitamini B kompleksa i vitamin C), koji se rastvaraju u vodi i ne deponuju u organizmu i liposolubilne (vitamini A, D, E i K), koji se rastvaraju u mastima i mogu se deponovati u jetri i masnom tkivu (66).

Plodovi godži predstavljaju izvor *L*-askorbinske kiseline (engl. *Ascorbic Acid*, AA), odnosno vitamina C. Pored antioksidativne uloge, AA je kofaktor nekoliko enzima i učestvuje u apsorpciji gvožđa (67). Budući da je biosinteza AA u biljkama strogo regulisana, sadržaj AA varira među plodovima različitih vrsta, sorti i varijeteta. Takođe, sadržaj vitamina C zavisi od abiotičkih faktora (svetlost i temperatura) (68), kao i od procesa berbe i rukovanja plodovima nakon berbe (69). Prema literaturnim podacima, prosečan sadržaj vitamina C u plodovima godži iznosi 30-60 mg/100 g, što je uporedivo sa sadržajem vitamina C u citrusnom voću (6,33). Preporučeni dnevni unos (engl. *Recommended Dietary Allowance*, RDA) predstavlja količinu nutrijenata koja je potrebna da zadovolji dnevne potrebe većine zdravih osoba određene starosti i pola. Uzimajući u obzir RDA vrednost za vitamin C koja iznosi 80 mg/dan (70), konzumiranjem 100 g plodova LB obezbedio se unos od oko 60 % RDA. U poređenju sa plodovima LB, plodovi LC sadrže znatno veće količine vitamina C (71).

Plodovi godži sadrže stabilan derivat vitamina C, 2-*O*- β -*D*-glukopiranozil-*L*-askorbinsku kiselinu (AA-2 β G) koji ima provitaminsku aktivnost. Sadržaj AA-2 β G iznosi oko 0,2– 0,3 % u svežim plodovima i oko 0,5 % u sušenim plodovima (7,72). Provitamin AA-2 β G se sintetiše u biljkama pri čemu se na AA dodaje glukozni ostatak u enzimski katalizovanoj reakciji u kojoj učestvuje glikozil-transferaza (Slika 6). Ovaj proces omogućava stvaranje glukoznog estra askorbinske kiseline, čime se povećava termička stabilnost jedinjenja i njegova sposobnost neutralizacije slobodnih radikala, u poređenju sa AA i njenim sintetskim derivatom (AA-2 α G) (10,14,24). Nakon konzumiranja plodova godži, AA-2 β G hidrolizuje u intestinalnom traktu pod dejstvom enzima glukozidaze, oslobađajući aktivni oblik, tj. *L*-askorbinsku kiselinu (73).



Slika 6. Biosinteza 2-*O*- β -*D*-glukopiranozil-*L*-askorbinske kiseline (AA-2 β G) (74)

Plodovi LB predstavljaju izvor liposolubilnog vitamina E, koji ima izraženo antioksidativno svojstvo, koje ostvaruje inhibicijom lipidne peroksidacije u ćelijskim membranama (29). Najzastupljeniji oblik vitamina E u plodovima LB je α -tokoferol, dok je β -tokoferol prisutan u manjim količinama (48). U plodovima LR, osim α -tokoferola, od vitamina B kompleksa u većim količinama su zastupljeni kobalamin (vitamin B₁₂), riboflavin (vitamin B₂) i tiamin (vitamin B₁) (51).

1.5.5. Mineralne materije

Minerali su esencijalni mikronutrijenti, koji učestvuju u različitim metaboličkim procesima u organizmu. Dele se na makromineralne, koji su potrebni u većim količinama, kao što su kalcijum, magnezijum, natrijum, kalijum, fosfor i sumpor, i mikromineralne ili elemente u tragovima, uključujući gvožđe, cink, selen i bakar, koji su potrebni u manjim količinama. Plodovi godži se smatraju značajnim izvorom i makro- i mikroelemenata sa visokom bioraspoloživostu (75). Mineralni sastav plodova LB odlikuje se visokim sadržajem kalijuma, fosfora, magnezijuma i kalcijuma (48,76). Najzastupljeniji mikroelementi u plodovima LB su gvožđe, cink, bakar i mangan (48,76,77). Sličan profil makro- i mikroelemenata imaju i plodovi LR (51).

Sadržaj minerala se razlikuje između plodova godži koji potiču iz različitih geografskih regija (76,77). Ove razlike se mogu objasniti specifičnim sastavom zemljišta, klimatskim uslovima i agrotehničkim merama (20,51,78). Organska đubriva obogaćuju zemljište hranljivim materijama, ubrzavajući akumulaciju minerala od strane biljaka. Na ovaj način se može objasniti veći sadržaj mineralnih materija u organski uzgajanim plodovima godži u poređenju sa plodovima iz konvencionalnog uzgoja (46).

Sa nutritivnog aspekta, namirnica se može smatrati izvorom mineralnih materija ako je njihov sadržaj najmanje 15 % RDA (70). Prema literaturnim podacima, sveži plodovi LB su izvor kalijuma i bakra (48). Sušeni plodovi godži u količini od 28-30 g ispunjavaju kriterijum za nutritivnu izjavu „dobar izvor“ gvožđa i cinka (46,76).

1.5.6. Organske kiseline

Organske kiseline značajno utiču na organoleptičke osobine i potencijalne zdravstvene koristi plodova godži (22). Pored AA plodovi godži sadrže i druge organske kiseline. Najzastupljenija organska kiselina (> 58%) u zrelih plodovima LB je limunska kiselina (50). Istraživanja ukazuju na značajan sadržaj hininske kiseline (6) i sukcininske kiseline (79,80), dok su jabučna, fumarna, oksalna i šikiminska kiselina prisutne u manjim količinama (7,29).

1.5.7. Senzorne karakteristike

Izgled, boja, oblik i veličina plodova, kao i njihov ukus, predstavljaju ključne faktore koji utiču na izbor voća od strane potrošača. Sadržaj, kao i međusobni odnos šećera i organskih kiselina, značajno utiču na senzorne karakteristike i svežeg i prerađenog voća (50,81). Specifični profili šećera i organskih kiselina utiču na senzorni kvalitet i komercijalnu vrednost različitih plodova godži. Plodovi LB imaju visok odnos šećera i kiselina u poređenju sa drugim vrstama samoniklog i gajenog bobičastog voća (27). Zahvaljujući većem sadržaju ukupnih šećera i nižoj ukupnoj kiselosti, plodovi LB imaju slađi ukus u odnosu na plodove drugih *Lycium* vrsta, uključujući LR (17).

1.6. BIOAKTIVNA JEDINJENJA PLODOVA GODŽI

Plodovi različitih vrsta roda *Lycium* sadrže veliki broj bioaktivnih jedinjenja koja, pojedinačno ili u kombinaciji, doprinose različitim biološkim aktivnostima. Američko udruženje dijetetičara (engl. *American Dietetic Association*, ADA) definiše bioaktivne sastojke hrane kao: „fiziološki aktivne sastojke u hrani ili dijetetskim suplementima, dobijene iz životinjskih i biljnih izvora, koji zadovoljavaju osnovne nutritivne potrebe i dokazano doprinose očuvanju zdravlja i bezbedni su za ljudsku ishranu“ (7). Najzastupljenija bioaktivna jedinjenja u plodovima LB i LR su polisaharidi, karotenoidi, fenolna jedinjenja i fitosteroli, koji ispoljavaju antioksidativne, hipoglikemijske, hipolipemijske, imunostimulatorne i retinoprotektivne efekte (7,33). Bioaktivni sastav plodova godži zavisi od različitih faktora, uključujući vrstu plodova, geografsko poreklo i klimatske uslove. Tokom sazrevanja plodova dolazi do fizioloških, biohemijskih i molekularnih promena, zbog čega zrelost predstavlja jedan od najvažnijih faktora koji utiče na kvantitativni i kvalitativni sadržaj bioaktivnih jedinjenja plodova godži (29).

1.6.1. Polisaharidi

Polisaharidi predstavljaju najviše proučavana bioaktivna jedinjenja plodova roda *Lycium*. U odnosu na druge genotipove, plodovi LB sadrže najveće količine ukupnih polisaharida (engl. *L. barbarum polysacharrides*, LBP), koji čine 5-8 % sušenih plodova (7,17,82). U istraživačke svrhe, sadržaj LBP se može povećati i do 23 % suve materije (33). Polisaharidi LR (engl. *L. ruthenicum polysacharrides*, LRP) čine 10-17 % suve materije ploda. Sadržaj LRP u samoniklim plodovima je veći u odnosu na gajene plodove LR (9,19,51).

Osnovni profil monosaharida LBP uključuje ksilozu, glukozu, arabinozu, ramnozu, manozu, galaktozu, fukozu, galakturonsku kiselinu i glukuronsku kiselinu (83). Monosaharidi su povezani glikozidnim vezama, najčešće formiranim između pozicija C1 i C4 ili C1 i C6 na glukoznim jedinicama, što omogućava formiranje razgranatih struktura. Glavne strukturne osnove LBP uključuju (1→6)- β -D-galaktopiranozil i (1→4)- α -D-galaktopiranozil-uronske kiseline (84,85).

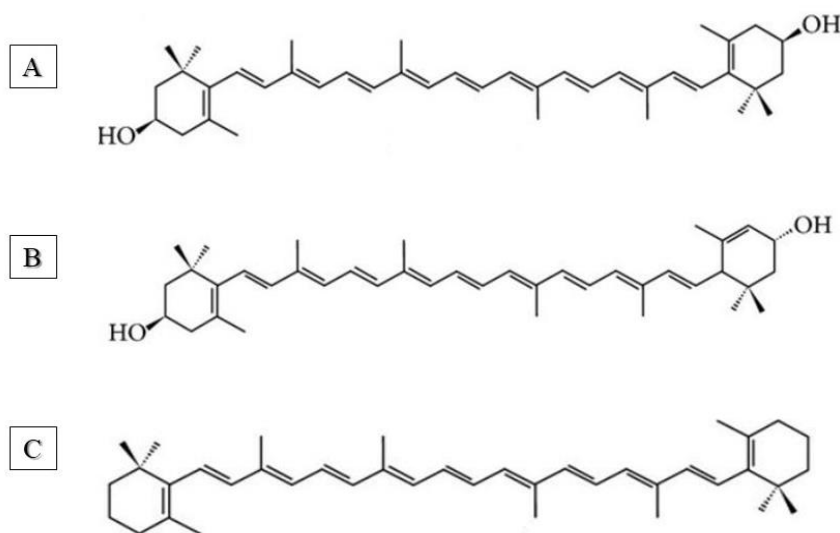
Na biosintezu i akumulaciju LBP značajno utiču vrsta i sadržaj šećera tokom sazrevanja plodova (50). Sadržaj LBP se smatra jednim od ključnih parametara za procenu kvaliteta LB i njegovu potencijalnu primenu u medicinske svrhe ili kao funkcionalnog sastojka u prehrambenoj industriji (86).

Biološka aktivnost polisaharida zavisi od njihovih strukturnih karakteristika, koje uključuju molekulsku masu, vrstu i odnos monosaharida, vrstu glikozidnih veza i konformaciju polisaharidnih lanaca (84,87). Među različitim komponentama LBP, posebno se u pogledu bioloških efekata ističu glikoproteini sa glikan-O-serin glikopeptidnom strukturom i galakturonska kiselina (83).

1.6.2. Karotenoidi

Karotenoidi su značajna grupa lipofilnih sekundarnih metabolita koji pripadaju porodici terpenoida. Na osnovu hemijske strukture, razlikuju se dve glavne grupe karotenoida: karoteni, koji se sastoje isključivo od ugljenika i vodonika i mogu biti ciklični (npr. α -karoten i β -karoten) ili linearni (npr. likopen), i ksantofile, koji sadrže najmanje jedan atom kiseonika (npr. lutein, zeaksantin i β -kriptoksantin). Dodatno, karotenoidi se mogu podeliti na karotenoide sa provitamin A aktivnošću (npr. β -karoten i β -kriptoksantin) i karotenoide bez provitamin A aktivnosti (npr. likopen i lutein) (88). Iako humani organizam ne može da sintetiše karotenoide ne postoje preporuke za njihov preporučeni dnevni unos.

Karotenoidi su odgovorni za crveno-narandžastu boju plodova LB, a njihov sadržaj iznosi od 0,03 % do 0,5 % suve mase ploda (7,89). Za razliku od plodova LB i LC, prisustvo karotenoida nije utvrđeno u plodovima LR (9). Odsustvo karotenoida u plodovima LR se objašnjava nedostatkom biosinteze hromoplasta i pojačanom ekspresijom enzima karotenoid dioksigenaze 4, koji dovodi do konstantne razgradnje karotenoida (90). U plodovima LB je identifikovano 11 slobodnih karotenoida i sedam karotenoidnih estara (91), uključujući luteoksantin i epoksi ksantofil estre (76). U nezrelim plodovima roda *Lycium* preovlađuju slobodni karotenoidi, dok zreli plodovi sadrže uglavnom esterifikovane karotenoide (14). Zeaksantin-dipalmitat koji čini oko 80 % ukupnih karotenoida u zrelih plodovima godži ima bolju bioraspoloživost u odnosu na neesterifikovani zeaksantin (92,93). Od ostalih identifikovanih karotenoida u plodovima LB prisutni su i β -kriptoksantin, neoksantin i β -karoten (94–96). Sadržaj zeaksantina u plodovima LB je veći nego u drugim namirnicama bogatim zeaksantinom, kao što je žumance (97). Zeaksantin se nakon apsorpcije uglavnom akumulira u retini, a njegovi antioksidativni i retinoprotektivni efekti su od značaja za prevenciju starosne makularne degeneracije i katarakte koje su povezane sa starenjem (89). Sadržaj karotenoida se koristi i kao indikator kvaliteta plodova LB tokom skladištenja i industrijske prerade (98). Takođe, karotenoidi iz plodova godži se mogu koristiti kao prirodne boje u različitim namirnicama, dijetetskim suplementima i farmaceutskim proizvodima (99). Najzastupljeniji karotenoidi u plodovima LB prikazani su na **Slici 7**.

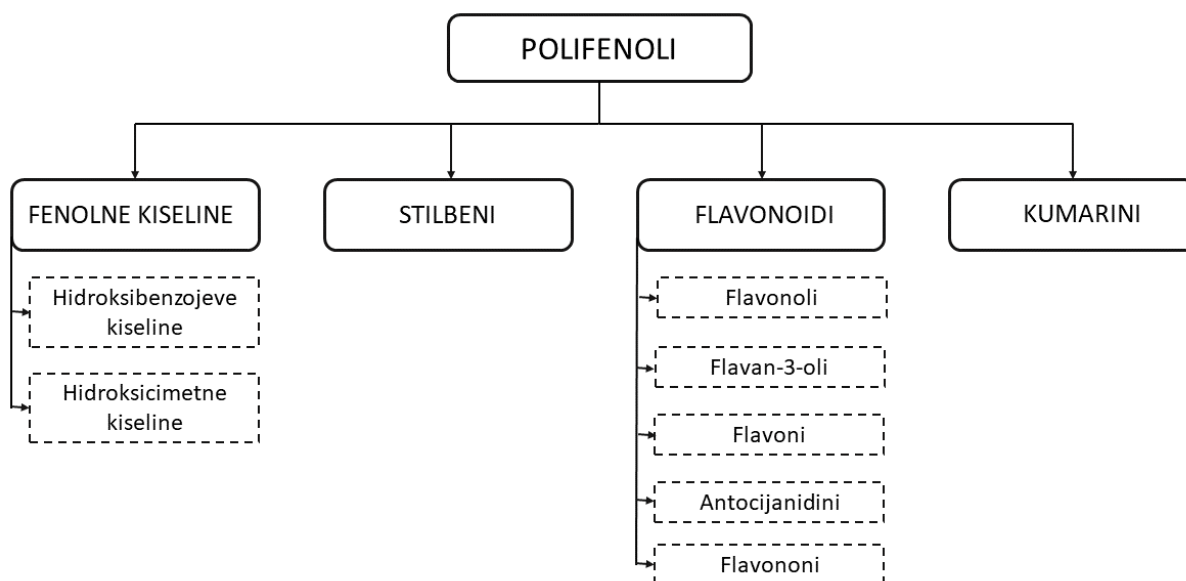


Slika 7. Najzastupljeniji karotenoidi u plodovima LB (A–zeaksantin; B–lutein; C– β -karoten) (9)

1.6.3. Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja čine veliku grupu strukturno različitih biljnih metabolita. Zbog pozitivnog uticaja na ljudsko zdravlje fenolna jedinjenja se intenzivno proučavaju poslednjih decenija (100). Polifenolna jedinjenja imaju značajnu ulogu u rastu i razvoju biljaka, zaštiti od biotskog i abiotskog stresa, kao i od patogena i infekcija. Pored zaštitnih efekata na biljke, polifenolna jedinjenja utiču na organoleptičke osobine i biološku aktivnost namirnica (29).

Do sada je utvrđeno prisustvo više od 8000 različitih fenolnih jedinjenja, koja se mogu grupisati na osnovu sličnosti u hemijskoj strukturi, biološkim funkcijama i izvorima. Na osnovu hemijske strukture, polifenoli se dele na: fenolkarboksilne kiseline, flavonoide, tanine, stilbene i kumarine (**Slika 8**) (101).



Slika 8. Podela polifenola (101)

Strukturna različitost fenolnih jedinjenja proizilazi iz razlika u biosintetskim putevima u koje su uključeni specifični enzimi, što rezultuje formiranjem različitih fenolnih struktura. Vrste roda *Lycium* bogate su fenolnim jedinjenjima. Do sada je identifikovano oko 200 polifenola. Međutim, postoje značajne razlike u pogledu ukupnog sadržaja i profila polifenolnih jedinjenja u plodovima godži. Sadržaj ukupnih polifenola, kao i pojedinačnih fenolnih jedinjenja zavisi od geografskog porekla, klimatskih uslova, načina uzgoja, kao i od analitičkih faktora, kao što su izbor rastvarača i metoda korišćenih za ekstrakciju (1,94,102).

1.6.3.1. Fenolkarboksilne kiseline

Fenolkarboksilne kiseline čine značajnu grupu polifenola, koje su u prirodi najčešće prisutne u konjugovanom obliku. Na osnovu hemijske strukture, fenolkarboksilne kiseline se mogu podeliti na derivate hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (**Slika 9**). Hidroksicimetne kiseline su dominantnije i poseduju izraženiju antioksidativnu aktivnost u poređenju sa hidroksibenzojevim kiselinama. Antioksidativni potencijal fenolkarboksilnih kiselina i njihovih derivata zavisi od broja i položaja hidroksilnih grupa na aromatičnom prstenu, načina vezivanja, kao i od vrste prisutnih supstituenata (103).



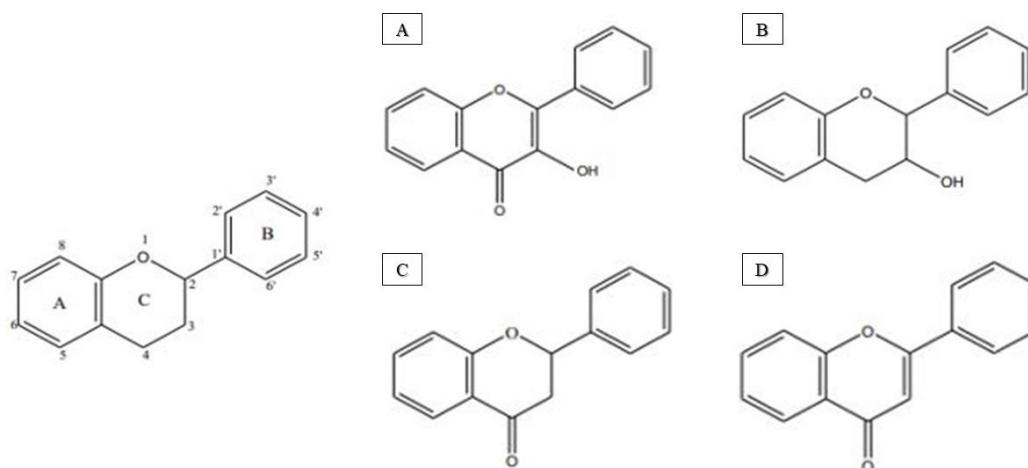
Derivati hidroksibenzojeve kiseline	R ₁	R ₂	R ₃	Derivati hidroksicimetne kiseline	R ₁	R ₂	R ₃
Galna kiselina	OH	OH	OH	Kafena kiselina	OH	OH	H
Vanilinska kiselina	OCH ₃	OH	H	Ferulinska kiselina	OCH ₃	OH	H
<i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina	H	OH	H	Sinapinska kiselina	OCH ₃	OH	OCH ₃

Slika 9. Struktura derivata hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline zastupljenih u plodovima godži (105)

U plodovima roda *Lycium* identifikovano je prisustvo različitih fenolkarboksilnih kiselina, kao što su galna, hlorogenska, kafena, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina. Takođe, utvrđeno je prisustvo kafeoilhininske, vanilinske, 2,4-dihidroksibenzojeve, siringinske i protokatehinske kiseline. Poznato je da ove kiseline imaju izražena antioksidativna svojstva (7,89,104).

1.6.3.2. Flavonoidi

Flavonoidi su polifenolna klasa jedinjenja, koji uz karotenoide i hlorofil, značajno doprinose karakterističnim bojama voća i povrća. Ova polifenolna jedinjenja su najčešće zastupljena u formi glikozida, gde su hidroksilne grupe fenolnih jedinjenja povezane sa različitim šećerima. Proces biosinteze flavonoida započinje iz aromatičnih aminokiselina, kao što su fenilalanin i tirozin, a rezultira formiranjem strukture sa tri prstena (C6-C3-C6), pri čemu su dva fenolna benzenova prstena spojena piranskim prstenom. Na osnovu oksidacionog stanja centralnog C-prstena, flavonoidi se klasifikuju u šest glavnih grupa: flavoni, flavonoli, flavanoli, flavanoni, izoflavoni i antocijanidini (106). Osnovna struktura flavonoida i najvažnijih podklasa je prikazana na **Slici 10**.

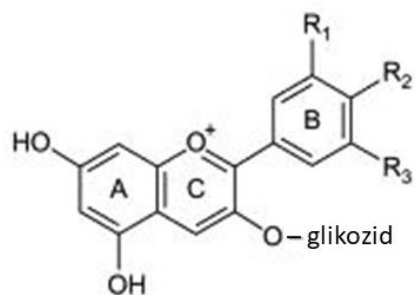


Slika 10. Osnovna struktura flavonoida i glavnih podklasa (A–flavonol; B–flavan-3-ol; C–flavanon; D–flavon) (106)

Flavonoidi su najzastupljenija grupa fenolnih jedinjenja u plodovima roda *Lycium*. Među njima se izdvajaju flavonoli, kao što su heterozidi kemferola, kvercetina i miricetina, pri čemu su najdominantniji kvercetin-ramno-di-heksozid i rutin (83,89,104). Flavanoni, uključujući hesperidin i heterozide naringenina, prisutni su u LB i LR plodovima (107). Flavoni, poput heterozida apigenina i luteolina, nalaze se samo u plodovima LB, a dihidrohalkon (florelin) isključivo u plodovima LR. Flavan-3-oli, poput katehina i epikatehina, kao i tanini, prisutni su u manjim količinama i njihova koncentracija opada tokom sazrevanja plodova godži (104).

Antioksidativna svojstva flavonoida zavise od broja i položaja hidroksilnih grupa na B prstenu, pri čemu dve hidroksilne grupe u orto položaju pokazuju najizraženiju antioksidativnu aktivnost. Dodatno, molekuli flavonoida sa jednostrukim vezama između C2 i C3 atoma imaju veću fleksibilnost i pokazuju bolju sposobnost neutralizacije slobodnih radikala u poređenju sa onima koji sadrže dvostruke veze. Pored neutralizacije slobodnih radikala, flavonoidi pokazuju sposobnost heliranja metalnih jona, što dodatno doprinosi njihovoj antioksidativnoj aktivnosti (25,108).

Heterozidi antocijanidina, poznati kao antocijani, predstavljaju važnu grupu flavonoida koji su odgovorni za mnoge pozitivne biološke aktivnosti biljaka. Osnovna struktura antocijana je fenilovani benzopiran, poznat kao flavilijum katjon, sa skeletom C6-C3-C6 (**Slika 11**).



Antocijani	R ₁	R ₂	R ₃
Delfinidin	OH	OH	OH
Malvidin	OCH ₃	OH	OCH ₃
Petunidin	OCH ₃	OH	OH
Peonidin	OCH ₃	OH	H

Slika 11. Osnovna struktura antocijana i najvažniji predstavnici (116)

Stabilnost antocijana zavisi od različitih faktora, uključujući pH vrednost, temperaturu, svetlost, organske kiseline, metale, kao i vezane šećere (9,109,110). Antocijani imaju najveću stabilnost u kiselom medijumu, obično pri pH vrednostima između 1 i 3. Boja antocijana varira u zavisnosti od pH vrednosti; u kiseloj sredini preovlađuje crvena, a u baznoj sredini plava boja. Takođe, broj hidroksilnih grupa na B prstenu utiče na boju antocijana; veći broj hidroksilnih grupa doprinosi plavoj boji, a prisustvo glikozida crvenoj boji (111).

Plodovi LR sadrže antocijane poput heterozida petunidina, malvidina, delfinidina, pelargonidina, peonidina i cijanidina, koji su odgovorni za njihovu karakterističnu tamno-ljubičastu boju. Odsustvo antocijana u plodovima drugih vrsta roda *Lycium* pretpostavlja se da je rezultat inaktivacije gena povezanih sa sintezom antocijana (19,104,112). Sušeni plodovi LR sadrže do 3 % antocijana, što je značajno veća koncentracija u poređenju sa drugim vrstama bobičastog voća (113). Osim medicinske primene, antocijani iz plodova LR se mogu koristiti i kao sredstvo za bojenje (9). Za razliku od derivata cijanidina, koji su dominantni antocijani u drugim vrstama bobičastog voća, plodovi LR sadrže acilovane derivate petunidina, kao što je petunidin-3-O-rutinozil-(*trans-p*-kumaroil)-5-O-glukozid (114). Antocijani se mogu acilovati fenolkarboksilnim kiselinama, poput *p*-kumarinske, kafene i ferulinske kiseline, što doprinosi povećanju njihove stabilnosti, posebno prema UV zračenju i niskim temperaturama. Profil antocijana u sušenim i svežim plodovima LR se razlikuje usled razlaganja antocijana tokom procesa sušenja. Derivati cijanidina se nalaze samo u sušenim plodovima LR, dok su u svežim plodovima uglavnom zastupljeni antocijani sa 5-O-glukozidnom strukturom (115).

1.6.3.3. Kumarini

Kumarini su sekundarni metaboliti koji doprinose karakterističnim senzornim osobinama biljaka. U plodovima godži je identifikovano prisustvo kumarina, poput umbeliferona, skopoletina i eskuletina. Ovi sastojci ne samo da doprinose karakterističnom mirisu, već doprinose i različitim biološkim aktivnostima plodova godži, uključujući antioksidativnu, antienzimsku i antimikrobnu aktivnost (9).

1.6.4. Alkaloidi

Alkaloidi predstavljaju veliku grupu organskih jedinjenja. Sadrže najmanje jedan atom azota unutar heterocikličnog prstena. Prema hemijskoj strukturi, alkaloidi se mogu klasifikovati u različite podgrupe, kao što su indolni, hinolinski, izohinolinski, pirolidinski, piridinski, pirolizidinski i tropanolni alkaloidi (117). Iz plodova LR izolovan je i identifikovan veći broj alkaloida, uključujući amide hidroksicimetnih kiselina (118). Takođe, identifikovano je oko 80 spermidinskih i sperminskih alkaloida u plodovima vrsta roda *Lycium* (9,83). Iako neki tropanolni alkaloidi, poput atropina i hiosciamina, mogu izazvati neželjene efekte, njihove koncentracije u vrstama roda *Lycium* su niske i značajno ispod toksičnih koncentracija.

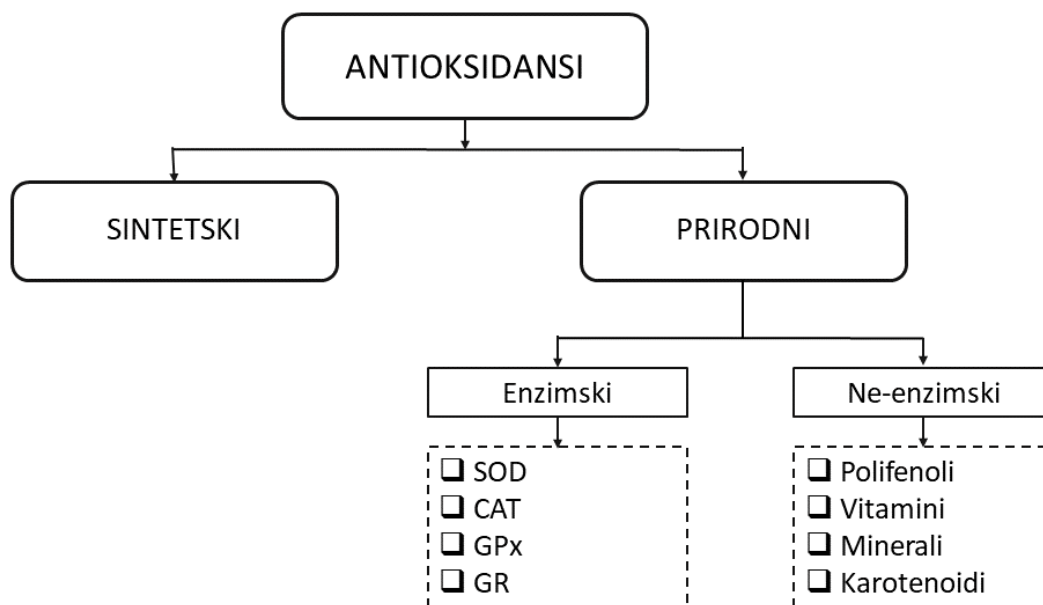
1.7. BIOLOŠKA AKTIVNOST PLODOVA GODŽI

Rezultati brojnih *in vitro* i *in vivo* studija na eksperimentalnim životinjama, kao i kliničkih studija ukazali su na različite biološke aktivnosti plodova roda *Lycium*. Ove aktivnosti uključuju antioksidativne, antiinflamatorne, antimikrobne, imunostimulatorne, antidijabetske, neuroprotektivne, antikancerogene i prebiotske efekte (7,33,45,104). Korisna svojstva konzumiranja plodova godži se pripisuju pojedinačnim ili sinergističkim efektima polisaharida, karotenoida i fenolnih jedinjenja (104,119). Pored ovih glavnih bioaktivnih sastojaka, biološkom potencijalu plodova godži doprinose i peptidi, dijetna vlakna, fitosteroli, masne kiseline, organske kiseline, alkaloidi, vitamini i minerali (7,83).

1.7.1. Antioksidativna aktivnost

Slobodni radikali su joni, atomi i molekuli sa jednim ili više nesparenih elektrona, što doprinosi njihovoj izraženoj i neselektivnoj reaktivnosti. Najvažnije grupe slobodnih radikala uključuju reaktivne vrste kiseonika (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS), reaktivne vrste azota (engl. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) i reaktivne vrste sumpora (engl. *Reactive Sulphur Species*, RSS). ROS i RNS mogu biti u radikalskom i neradikalskom obliku. Najčešći radikalski oblici uključuju superoksid anjonski radikal ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal ($OH^{\bullet}$), hidroperoksilni radikal ($HOO^{\bullet}$), peroksilni radikal ($ROO^{\bullet}$) i azot-monoksidni radikal ($NO^{\bullet}$), dok su neradikalski oblici singletni kiseonik (1O_2), vodonik-peroksid (H_2O_2) i peroksinitrit anjon ($ONOO^-$). Najveće količine slobodnih radikala nastaju u mitohondrijama, kao nusprodukt sinteze adenozin trifosfata (120). Međutim, stvaranju slobodnih radikala u organizmu doprinose i spoljašnji faktori kao što su zagađenje, UV zračenje, stres, konzumacija alkohola i cigareta, izloženost teškim metalima i pesticidima, određeni lekovi, kao i metabolički procesi (121). U niskim ili umerenim koncentracijama, ROS i RNS učestvuju u procesima kao što su ćelijska proliferacija, apoptoza i regulacija genske ekspresije (122). Na primer, $O_2^{\bullet-}$ i azot- $NO^{\bullet}$ u niskim koncentracijama učestvuju kao signalni molekuli u ćelijskim putevima, dok H_2O_2 deluje kao signalni molekul i prekursor za stvaranje drugih reaktivnih vrsta, poput hipohlorne kiseline ($HClO$).

Antioksidansi su supstance koje mogu usporiti, sprečiti ili eliminisati oštećenja molekula izazvana delovanjem slobodnih radikala (123). Aktivnost antioksidanasa se može ostvariti na različite načine, uključujući inhibiciju oksidativnih reakcija, sprečavanje propagacije autooksidacije, deaktivaciju singlet-kiseonika, sinergističko delovanje sa drugim antioksidansima, redukciju H_2O_2 u stabilnija jedinjenja, heliranje metalnih jona poput gvožđa i bakra u stabilne oblike i inhibiciju prooksidativnih enzima (124). Antioksidansi se mogu klasifikovati na nekoliko načina, pri čemu je osnovna klasifikacija na prirodne i sintetske antioksidanse. Iako su sintetski antioksidansi često efikasniji, neki od njih su povezani sa štetnim efektima na zdravlje ljudi, što povećava interesovanje za prirodnim alternativama (125). Prirodni antioksidansi dalje se dele na endogene i egzogene (**Slika 12**).



Slika 12. Podela antioksidanasa (128)

Endogeni antioksidansi, koji se stvaraju u organizmu, mogu biti enzimski ili neenzimski. Enzimski antioksidansi, kao što su superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation-reduktaza (GR) i glutation-peroksidaza (GPx), čine prvu liniju odbrane, transformišući reaktivni $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 u vodu i kiseonik (126). Neenzimski endogeni antioksidansi pružaju dodatnu zaštitu brzim neutralisanjem slobodnih radikala. Egzogeni antioksidansi se unose hranom i uključuju različite klase jedinjenja poput glutaciona, AA, α -tokoferola, dijetnih vlakana, minerala i polifenola, koji su ključni za zaštitu ćelija od oksidativnog oštećenja (127).

Međutim, kada količina ROS prevaziđe zaštitni kapacitet endogenih antioksidativnih enzima i neenzimskih antioksidanasa dolazi do pojave oksidativnog stresa (2,29,122). Oksidativni stres je usko povezan sa procesom starenja i razvojem brojnih patoloških stanja, kao što su kardiovaskularne bolesti, karcinomi, inflamatorne bolesti, dijabetes, reumatoidni artritis, neurodegenerativne i autoimunske bolesti (6,129). Kada endogeni antioksidativni sistemi nisu dovoljno efikasni da spreče oksidativna oštećenja izazvana oksidativnim stresom, potrebna je suplementacija antioksidansima (122). Najveći doprinos antioksidativnom kapacitetu namirnica, posebno voća i povrća, imaju fenolna jedinjenja, karotenoidi, tokoferol, polisaharidi i AA (2,22,130).

Plodovi godži sadrže različita bioaktivna jedinjenja, a njihova antioksidativna aktivnost se povezuje sa prisustvom polisaharida, karotenoida, flavonoida i AA-2 β G (7,131,132). Ova jedinjenja ispoljavaju sinergističke, aditivne ili u retkim slučajevima antagonističke efekte. Smatra se da su antioksidativni efekti bioaktivnih sastojaka plodova godži posredovani različitim mehanizmima, kao što su uklanjanje slobodnih radikala putem prenosa atoma vodonika ili doniranjem elektrona, heliranjem metala ili interakcijom sa drugim antioksidansima (108,133). Pored toga, flavonoidi i druga fenolna jedinjenja mogu stimulisati ekspresiju antioksidativnih enzima, kao što su CAT, GPx i SOD, čime se sprečava formiranje ROS (33,104,112,134). Zbog sadržaja različitih bioaktivnih jedinjenja i različitih mehanizama antioksidativnog delovanja, za određivanje antioksidativne aktivnosti plodova godži se primenjuju različite metode. Najčešće korišćeni testovi uključuju procenu neutralizacije radikala, kao što su 2,2'-difetil-1-pikrilhidrazil (DPPH[•]) i 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS^{•+}), zatim određivanje redukcionog potencijala na osnovu sposobnosti redukcije gvožđa (engl. *ferric reducing antioxidant power*, FRAP) i bakarnih jona (engl. *cupric reducing antioxidant capacity*, CUPRAC), kao i inhibiciju lipidne peroksidacije (inhibicija obezbojenja β -karotena) (29).

1.7.2. Hipoglikemijski efekti

Dijabetes melitus je hronični metabolički poremećaj uzrokovan nedovoljnom proizvodnjom insulina ili smanjenom sposobnošću njegovog delovanja, što onemogućava održavanje koncentracije glukoze u krvi (29,104). Dijabetes melitus tip 1 nastaje kao posledica autoimunog oštećenja β -ćelija pankreasa koje proizvode insulin, što rezultira potpunim nedostatkom ovog hormona i zahteva doživotnu terapiju insulinom. Nasuprot tome, dijabetes melitus tip 2 je najzastupljeniji oblik, često povezan sa gojaznošću i sedentarnim načinom života. Ovaj tip dijabetesa karakteriše insulinska rezistencija i u osnovi lečenja je promena stila života i načina ishrane (104,135,136). Uprkos značajnom napretku u istraživanju i lečenju hiperglikemije, dijabetes predstavlja globalni zdravstveni problem. Prema podacima WHO, više od 830 miliona ljudi boluje od dijabetesa (137). S obzirom na brojne komplikacije povezane sa ovom bolešću, terapija lekovima je često neophodna, međutim, može biti i skupa, teško dostupna i sa potencijalnim neželjenim dejstvima (22). Enzimi, kao što su pankreasna α -amilaza (engl. *α -amylase*, α -Amy) i intestinalna α -glukozidaza (engl. *α -glucosidase*, α -Gls), razgrađuju složene ugljene hidrate do monosaharida, zbog čega se intenzivno proučavaju inhibitori ovih enzima i njihovi izvori (22).

Smatra se da su LBP ključni bioaktivni sastojci odgovorni za hipoglikemijski potencijal plodova LB, što je potvrđeno brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama (7,29). Inozitol, metabolit manoze dobijen iz LBP, povećava ekspresiju transportera glukoze 4 (engl. *Glucose transporter 4*, GLUT4) i glukokinaze, čime poboljšava insulinsku osetljivost i metabolizam glukoze (138). Pored toga, hipoglikemijski efekat može biti povezan sa sadržajem rutina i AA (139,140). Digestijom antocijana plodova LR može se pojačati biološka aktivnost, uključujući antioksidativnu sposobnost i inhibiciju enzima α -Gls i α -Amy (86,141). Ova svojstva doprinose smanjenju hiperglikemije i

olakšavaju konverziju glukoze u glikogen u jetri, dok istovremeno smanjuju markere oksidativnog stresa (9).

1.7.3. Neuroprotektivni efekti

Neurodegenerativne bolesti, poput *Alchajmer*-ove bolesti, karakterišu se progresivnom kognitivnom disfunkcijom i oštećenjem neurona. Prema podacima WHO više od 55 miliona ljudi širom sveta pati od demencije (142). Iako tačan uzrok bolesti nije u potpunosti razjašnjen, veruje se da inflamacija i akumulacija ROS u mozgu dovode do mitohondrijalne disfunkcije i apoptoze neuronskih ćelija. Pored toga, nakupljanje amiloidnih plakova, posebno amiloid-beta proteina između nervnih ćelija, može dovesti do poremećaja ponašanja i kognitivnih disfunkcija (29,104).

Enzim acetilholinesteraza (engl. *acetylcholinesterase*, AChE) ima ključnu ulogu u razgradnji neurotransmitera acetilholina, koji je esencijalan za prenos signala između nervnih ćelija. Povećana aktivnost AChE smanjuje dostupnost acetilholina u sinapsama, što ometa komunikaciju između neurona i doprinosi razvoju neurodegenerativnih bolesti. Inhibitori AChE koriste se za usporavanje progresije ovih bolesti. Istraživanja su pokazala da ekstrakti plodova LR i LB ispoljavaju inhibitorna svojstva prema AChE. Sinergistički efekti polifenola sa vitaminima C i E doprinose zaštiti od neurodegeneracije, što se pripisuje njihovoj antioksidativnoj aktivnosti, uključujući i regeneraciju endogenih antioksidanasa (102,143). Pored toga, neuroprotektivni efekti se pripisuju i LBP, kao i dikafeoilsperriminima i spermidinima, koji stimulišu proliferaciju i očuvanje neurona u hipokampusu (10,29). Ekstrakt antocijana pripremljen od plodova LR, u dozi od 80 mg/kg, poboljšao je pamćenje kod eksperimentalnih životinja, uz značajno smanjenje oksidativnog stresa i inflamacije u hipokampusu (144,145).

1.7.4. Antiinflamatorni efekti

Inflamacija predstavlja kompleksan biološki odgovor organizma na štetne stimulanse, uključujući patogene, oštećene ćelije ili iritanse. Inflamatorni odgovor započinje aktivacijom urođenog imuniteta, oslobađanjem efektorskih molekula, inhibicijom specifičnih enzima i produkcijom proinflamatornih medijatora, kao što su faktor nekroze tumora- α (TNF- α), interleukini (IL), i nuklearni faktor kapa β (NF- $\kappa\beta$) (146). U fiziološkim uslovima, inflamacija predstavlja zaštitni proces koji omogućava uklanjanje uzročnika oštećenja i započinjanje procesa regeneracije. Međutim, hronična inflamacija i nekontrolisana produkcija proinflamatornih citokina su povezani sa različitim oboljenjima, uključujući kardiovaskularne, autoimunske i neurodegenerativne bolesti (147).

Lipooksigenaze (engl. *lipoxxygenase*, LOX) su enzimi uključeni u proces peroksidacije lipida i klasifikuju se prema pozicionoj specifičnosti oksigenacije PNMK, kao što su arahidonska, linolna, α -linolenska, γ -linolenska kiselina, eikozapentaenska i dokozaheksaenska kiselina. Enzim 15-lipooksigenaza (engl. *15-lipoxxygenase*, 15-LOX) je ključan u oksidaciji PNMK na 15-tom ugljenikovom atomu, što dovodi do formiranja proinflamatornih eikozanoida, uključujući leukotriene, koji imaju važnu ulogu u modulaciji inflamatornog odgovora. Enzim je eksprimiran u različitim ćelijama uključujući retikulocite, eozinofile, dendritske ćelije, makrofage, epitelne ćelije disajnih puteva, vaskularne i ćelije pankreasnih ostrvaca. Prekomerna aktivnost LOX enzima povezana je sa razvojem i progresijom upalnih stanja, uključujući aterosklerozu, neurodegenerativne bolesti i različite oblike karcinoma. Inhibicija 15-LOX smatra se potencijalno važnom strategijom za kontrolu oksidativnog stresa i smanjenje inflamacije (148,149).

Vrste roda *Lycium* prepoznate su kao prirodni izvori antiinflamatornih jedinjenja, među kojima se ističu polisaharidi i polifenoli, a njihova *in vitro* i *in vivo* efikasnost procenjena je na nekoliko životinjskih modela. Utvrđeno je da hidrosolubilni arabinogalaktan polisaharid iz plodova LR, označen kao LRGP3, značajno inhibira ekspresiju iNOS, proizvodnju azot-monoksida i inflamatornih citokina u RAW264 ćelijama. Antiinflamatorna aktivnost ovog polisaharida posredovana je NF- κ B-iNOS-NO signalnim putem, pri čemu ključnu ulogu ima galaktanski skelet (150,151). Osim toga, prisutni antocijani dovode do smanjenja inflamatornih markera, kao što su TNF- α , ciklooksigenaza-2, NF- κ B i IL-1 β . Ekstrakti plodova LB, bogati polifenolima, pokazuju značajnu inhibiciju 15-LOX, što se pripisuje antioksidativnim svojstvima fenolnih jedinjenja, koja sprečavaju lipidnu peroksidaciju i formiranje reaktivnih proinflamatornih jedinjenja. Prisustvo polisaharida i karotenoida u plodovima godži dodatno doprinosi smanjenju inflamatornih procesa, kroz podršku antiinflamatornim zaštitnim mehanizmima (7,22,57).

1.7.5. Antimikrobni efekti

Mikrobni agensi obuhvataju različite vrste mikroorganizama, koji mogu izazvati infekcije ili bolesti kod ljudi, životinja i biljaka. Glavne kategorije mikrobnih agenasa su bakterije, virusi, gljivice, paraziti i prioni. Bakterije su jednoćelijski organizmi koji se dele na Gram-pozitivne i Gram-negativne, na osnovu strukture ćelijske membrane i debljine peptidoglikanskog sloja. Gram-pozitivne bakterije imaju debeli sloj peptidoglikana koji zadržava ljubičastu boju tokom bojenja po Gramu, dok Gram-negativne bakterije imaju tanji sloj peptidoglikana, uz dodatnu spoljašnju membranu koja sadrži lipopolisaharide. Ova strukturna razlika utiče na njihovu otpornost na antibiotike, pri čemu su Gram-negativne bakterije često otpornije, zbog prisustva spoljašnje membrane koja otežava prodiranje antimikrobnih lekova. Takođe, Gram-negativne bakterije često sadrže efikasne efluks pumpe koje aktivno izbacuju antibiotike iz ćelije, dok je kod obe grupe bakterija rezistencija na antibiotike posledica genetskih mutacija (152,153).

Sekundarni metaboliti biljaka, kao što su fenolkarboksilne kiseline, flavonoidi i karotenoidi, ispoljavaju antimikrobno dejstvo putem interakcije sa ekstracelularnim i rastvorljivim proteinima mikroorganizama, što rezultira narušavanjem strukture ćelijske membrane, uklanjanjem metalnih jona i inhibicijom enzima. Antimikrobna aktivnost polifenolnih jedinjenja može se dodatno objasniti njihovim specifičnim strukturnim karakteristikama, kao i uticajem pH vrednosti i koncentracije natrijum-hlorida, što dovodi do fizioloških promena u mikroorganizmima i na kraju do ćelijske smrti (25,154). Hlorogenska kiselina, jedna od glavnih fenolkarboksilnih kiselina u plodovima godži, ostvaruje bakteriostatski i baktericidni efekat prema *Escherichia coli* (154). Istraživanja pokazuju da ekstrakti plodova godži deluju na *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, što ukazuje na njihov potencijalni značaj kod infekcija izazvanih antibiotik-rezistentnim bakterijama. Pored antimikrobnih svojstva, plodovi godži ispoljavaju i snažna antioksidativna svojstva, što ublažava inflamaciju izazvanu mikroorganizmima (155).

1.7.6. Prebiotski potencijal

Prebiotici su nedigestibilni ugljeni hidrati koji selektivno podstiču rast i aktivnost probiotičkih bakterija, poput *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, čime modulišu crevnu mikrobiotu i doprinose opštem zdravlju organizma (156). Mehanizam delovanja prebiotika obuhvata fermentaciju od strane crevnih bakterija, pri čemu dolazi do stvaranja kratkolančanih masnih kiselina (engl. *short-chain fatty acids*, SCFA), poput butirata, propionata i acetata. SCFA imaju pozitivan efekat na enterocite, poboljšanje imuniteta i smanjenje inflamacije. Prebiotski potencijal plodova godži se uglavnom pripisuje polisaharidima i fenolnim jedinjenjima (104).

Studije su potvrdile da LBP iz plodova LB doprinose modulaciji crevne mikrobiote, stimulisanjem selektivnog rasta probiotskih bakterija i povećanjem koncentracije imunoloških markera, kao što su TGF- β , IL-6 i IgA u debelom crevu (157,158). Pored LBP, antocijani iz plodova LR ispoljavaju pozitivan efekat na crevnu mikrobiotu, stimulišući rast korisnih bakterija i sintezu SCFA (159,160). U *in vivo* ispitivanjima na miševima, antocijani iz LR su poboljšali strukturni integritet crevne barijere i rast probiotskih bakterija (161).

1.8. POTENCIJALNI RIZICI KONZUMIRANJA PLODOVA GODŽI

Plodovi godži imaju dugotrajnu istoriju upotrebe u azijskim zemljama. U SAD i Evropi, plodovi godži i njihovi proizvodi dostupni su kao hrana i dodaci ishrani (7,33,89). Kliničke studije su potvrdile bezbednost upotrebe plodova godži u dozama koje se koriste u tradicionalnoj medicini. Međutim, potencijalnu opasnost po zdravlje može predstavljati prisustvo toksičnih sastojaka poput tropanolnih alkaloida, kao i hemijskih kontaminanata, uključujući teške metale (olovo, kadmijum, arsen, živa, bakar), pesticide (organohlorni, organofosforni i triazolni) i sulfite (8).

Postoje kontroverzni podaci o sadržaju atropina u plodovima godži. U jednoj studiji iz 1989. godine utvrđen je sadržaj atropina u koncentraciji od 0,95 % u uzorcima plodova godži iz Indije. Međutim, kasnija istraživanja su ukazala na značajno niže koncentracije oko 19 µg/kg, što je ispod minimalnih toksičnih koncentracija atropina (7,13,33,162,163). Od 2009. do 2017. godine, prema izveštajima Uprave za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) i Sistema brzog uzbunjivanja i obaveštavanja za hranu i hranu za životinje (engl. *Rapid Alert System for Food and Feed*, RASFF), 208 uzoraka plodova godži uvezenih u SAD i EU bilo je kontaminirano pesticidima ili sumporom, uključujući i one označene kao organski godži (164,165). Poznato je da organska proizvodnja može smanjiti nivo izloženosti toksičnim hemikalijama (46). Međutim neka istraživanja ukazuju da plodovi godži uzorkovani sa plantaža sadrže veće količine pesticida u odnosu na kupljene iz supermarketa, pri čemu je izloženost toksičnim metalima opasnija nego pesticidima (163).

Iako se smatra bezbednim za korišćenje, zabeleženi su slučajevi hepatotoksičnosti koji su povezani sa konzumiranjem plodova godži (166,167). Takođe, pojedini proteini u plodovima godži kod određenih osoba mogu izazvati alergijske reakcije (168,169), uključujući anafilaksu (170,171). Pokazano je da postoji visoka unakrsna reaktivnost između plodova godži i drugih vrsta iz porodice Solanaceae, poput breskvi, paradajza i duvana, što doprinosi relativno većoj učestalosti alergijskih reakcija na plodove godži u evropskoj populaciji (7).

Interakcije između plodova godži i određenih lekova mogu biti klinički značajne. Istovremena upotreba plodova godži sa varfarinom, oralnim kumarinskim antikoagulansom, može povećati rizik od krvarenja (172). Takođe, zabeleženo je da je konzumiranje infuza od plodova godži kod starije pacijentkinje dovelo do ispoljavanja toksičnih efekata antiaritmika flekainidina (173). Smatra se da potencijalni mehanizmi ove interakcije uključuju inhibiciju enzima CYP2C9 (33).

Prema tradicionalnim kineskim medicinskim izvorima, trudnice i osobe sa određenim zdravstvenim stanjima, poput dijareje, groznice, artritisa i težih inflamatornih oboljenja, treba da budu oprezne pri upotrebi plodova godži (33).

1.9. OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE BIOLOŠKI AKTIVNIH JEDINJENJA IZ PLODOVA GODŽI

1.9.1. Ekstrakcija biološki aktivnih jedinjenja

Zbog potencijalnog značaja i primene, veliki broj istraživanja je usmeren na identifikaciju najefikasnijih metoda za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz svežih i/ili sušenih biljaka ili njihovih delova. Pored izbora adekvatne metode, od ključnog značaja je odabir rastvarača i definisanje optimalnih uslova procesa ekstrakcije, kao što su temperatura, dužina ekstrakcije, intenzitet mešanja i odnos biljnog materijala i rastvarača. Izolovana bioaktivna jedinjenja se dalje mogu koristiti u istraživačke svrhe, ali i kao sirovine u kozmetičkoj, farmaceutskoj, hemijskoj i prehrambenoj industriji (174,175).

Pravilna priprema biljnog materijala podrazumeva sušenje i usitnjavanje. Sušenjem se smanjuje sadržaj vlage i doprinosi očuvanju mikrobiološke ispravnosti materijala, čime se obezbeđuje dugoročno skladištenje. Usitnjavanjem se povećava kontaktna površina, čime se ubrzava ekstrakcija aktivnih jedinjenja. Step en usitnjenosti zavisi od vrste biljnog materijala i metode ekstrakcije, te je često neophodna optimizacija ovog parametra. Takođe, za povećanje prinosa bioaktivnih jedinjenja, biljni materijal može biti podvrgnut različitim predtretmanima, kao što su enzimski tretmani ili primena mikrotalasa (176).

Ekstrakti se mogu pripremati korišćenjem tradicionalnih metoda poput maceracije, destilacije, perkolacije i digestije, ili savremenim, ekološki prihvatljivijim, „zelenim“ metodama, poput ultrazvučne ili mikrotalasne ekstrakcije, te ekstrakcije superkritičnim fluidima. Izbor odgovarajuće metode zavisi od karakteristika biljnog materijala i bioaktivnih jedinjenja, ali i njihovih prednosti i ograničenja (177).

Tradicionalne metode ekstrakcije se često koriste zbog jednostavnosti izvođenja, kompatibilnosti sa različitim rastvaračima i niskih troškova opreme. Ograničenja ovih metoda uključuju dužinu trajanja ekstrakcije, veliku potrošnju organskih rastvarača, niske prinose i nedovoljnu selektivnost. Takođe, visoke temperature koje se koriste u nekim tradicionalnim metodama mogu dovesti do degradacije osetljivih bioaktivnih jedinjenja. Nasuprot tome, savremene metode ekstrakcije su ekološki prihvatljivije, selektivnije, energetski i vremenski efikasnije za izolaciju polarnih bioaktivnih jedinjenja. Dodatno, kod ovih metoda se smanjuje ili eliminiše upotreba toksičnih rastvarača, ne koriste se visoke temperature tokom ekstrakcije, čime se smanjuje rizik od degradacije osetljivih bioaktivnih jedinjenja (174,178).

Ekstrakcija rastvaračem je među najčešće korišćenim metodama u izolaciji bioaktivnih jedinjenja, pri čemu je izbor rastvarača od ključnog značaja. Najčešće korišćeni rastvarači su voda, etanol, metanol, aceton, propilen-glikol, hloroform, etil-acetat i heksan. Idealan rastvarač treba da bude lako dostupan, selektivan, bezbedan (netoksičan, nezapaljiv i neeksplozivan), hemijski stabilan, ekonomski isplativ, kao i niske tačke ključanja, odgovarajuće viskoznosti i površinskog napona (179). Voda je finansijski povoljan, lako dostupan, netoksični i ekološki prihvatljiv rastvarač, koji se lako reciklira. Međutim, njena primena je ograničena niskom selektivnošću, nemogućnošću rastvaranja manje polarnih jedinjenja, kao i visokim energetskim zahtevima za njeno uklanjanje (180). Etanol, sa druge strane, pokazuje visoku selektivnost i nisku toksičnost, i može stabilizovati biološki aktivna jedinjenja inhibicijom enzima koji ih razgrađuju. Međutim, njegova zapaljivost, cena i mogućnost prisustva metanola kao nečistoće predstavljaju ograničenja. Za ekstrakciju nepolarnih jedinjenja često se koriste hloroform, benzen i etar, dok se za polarna jedinjenja najčešće primenjuju voda, ili njene mešavine sa metanolom ili etanolom. Kombinacija

polarnih i nepolarnih rastvarača može povećati selektivnost ekstrakcije specifičnih bioaktivnih jedinjenja (180).

1.9.2. Eksperimentalni dizajn

Optimizacija procesa ekstrakcije biološki aktivnih jedinjenja predstavlja ključni korak u razvoju novih lekova, suplemenata i funkcionalnih namirnica. Efikasnost i stabilnost ovih jedinjenja zavise od različitih faktora, uključujući hemijski sastav, primenjenu metodu ekstrakcije, kao i interakcije sa drugim komponentama. Tradicionalni univarijantni pristup optimizacije, poznat kao metoda „jedan faktor u vremenu“ (engl. *One Factor at a Time*, OFAT), analizira uticaj svakog pojedinačnog faktora, ali zahteva veliki broj eksperimenata, što čini proces vremenski, resursno i finansijski zahtevnim. Pored toga, OFAT pristup ne omogućava analizu interakcija između faktora. Nasuprot tome, višefaktorske metode optimizacije koriste eksperimentalne dizajne za simultano ispitivanje više faktora, čime se smanjuje broj potrebnih eksperimenata, štede vreme i resursi, uz detaljan uvid u međusobne interakcije faktora (181).

Eksperimentalni dizajn (engl. *Design of Experiments*, DoE) je strukturirani metodološki pristup koji omogućava planiranje i sprovođenje eksperimenata, kako bi se identifikovale matematičke veze između faktora (nezavisnih promenljivih) i ispitivanih odgovora (zavisnih promenljivih) unutar definisanog eksperimentalnog prostora, uz minimalan broj potrebnih eksperimenata (182). Jedna od najčešće korišćenih višefaktorskih metoda u ovom procesu je metodologija površine odgovora (engl. *Response Surface Methodology*, RSM), koja se zasniva na eksperimentalnom dizajnu i predstavlja grafički prikaz matematičkog modela.

Dizajn eksperimenata za karakterizaciju i optimizaciju sistema se sprovodi kroz faze skrininga i optimizacije. U situacijama sa velikim brojem faktora, kada nema dovoljno literaturnih podataka, koristi se skrining metod za selekciju značajnih faktora. Najčešće se u te svrhe primenjuje *Plackett-Burman* dizajn (PB), razvijen od strane R.L. *Plackett*-a i J.P. *Burman*-a. Ovaj frakcioni faktorski dizajn varira faktore na dva nivoa, nižem (-1) i višem (+1), omogućavajući ispitivanje kvantitativnih i kvalitativnih uticaja faktora, pri čemu zanemaruje interakcije među njima. Ovakav pristup omogućava brzu i efikasnu identifikaciju ključnih varijabli za dalju analizu i optimizaciju, značajno smanjujući kompleksnost narednih istraživačkih faza. Međutim, kako se interakcije između faktora ne uzimaju u obzir, ovaj dizajn nije pogodan za istraživanje kompleksnih sistema kod kojih su interakcije faktora presudne za razumevanje ponašanja sistema. Takođe, ne omogućava analizu nelinearnih efekata (183).

Box-Behnken dizajn (BBD), razvijen od strane *George Box*-a i *Donald Behnken*-a, jedan je od najčešće korišćenih metoda za optimizaciju procesa istraživanja bioaktivnih jedinjenja. Namenjen je za optimizaciju procesa sa više faktora i analizu nelinearnih odnosa između faktora i odgovora. BBD se zasniva na rotacionom dizajnu, koji se karakteriše izvođenjem eksperimenata na srednjim vrednostima nivoa faktora, a ne na ekstremnim vrednostima. Na ovaj način se omogućava preciznija procena optimizovanih uslova, istovremeno smanjujući rizik od eksperimentalnih grešaka i oštećenja opreme ili materijala. Prednosti ovog dizajna uključuju istraživanje kvadratnih efekata uz relativno mali broj eksperimentalnih tačaka. Međutim, BBD nije idealan za eksperimente koji zahtevaju ekstremne uslove, jer ne obuhvata sve tačke u prostoru (184).

Kombinacija PB i BBD dizajna pruža sveobuhvatan pristup u optimizaciji ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja. PB dizajn služi kao inicijalni skrining, efikasno identifikujući ključne faktore koji najviše utiču na proces, dok BBD dizajn omogućava finu optimizaciju kroz procenu nelinearnih efekata i interakciju između ovih varijabli. Ovaj integrisani pristup omogućava precizno

modelovanje i maksimizaciju prinosa ciljnih bioaktivnih jedinjenja, minimizirajući vreme i resurse potrebne za izvođenje eksperimenata (185).

1.9.3. Statistička procena modela

Rezultati dobijeni primenom dizajna eksperimenata najčešće se procenjuju primenom RSM, koja koristi matematičke i statističke tehnike za modelovanje zavisnosti između faktora i odgovora. Ova zavisnost se može izraziti polinomskom jednačinom:

$$y = f(X_1, 2, 3 \dots n) + \varepsilon \quad (1)$$

- y – zavisna promenljiva (odgovor)
- x – nezavisna promenljiva (faktor)
- n – broj faktora
- f – funkcija
- ε – statistička greška

Koristeći navedenu jednačinu, omogućava se kvantifikacija uticaja svakog faktora i identifikacija optimalnih uslova za postizanje željenih vrednosti odgovora, čime se olakšava interpretacija podataka i donošenje zaključaka o optimalnim uslovima procesa.

Kako bi se omogućilo direktno poređenje faktora koji se razlikuju po jedinicama i opsezima vrednosti, koristi se kodiranje vrednosti prema sledećoj jednačini (186):

$$X = \frac{(X_i - X_0)}{\Delta X} \quad (2)$$

- X – kodirana vrednost faktora
- X_i – stvarna vrednost
- X_0 – srednji nivo
- ΔX – razlika između susednih nivoa

Najčešće se koriste polinomi prvog i drugog reda za opisivanje zavisnosti odgovora u modeliranju, dok se polinomi višeg reda ređe primenjuju zbog složenosti. Kvadratna jednačina koja opisuje predviđeni odgovor u procesu optimizacije može se prikazati na sledeći način (184):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^4 \beta_{ij} X_i X_j \quad (3)$$

- β_0 – odsečak
- β_i – linearni koeficijent
- β_{ii} – kvadratni koeficijent
- β_{ij} – koeficijent interakcije
- $X_i X_j$ – interakcije
- X_i^2 – kvadratni efekti

Koeficijenti modela se određuju primenom metode najmanjih kvadrata, dok se njihova statistička značajnost procenjuje Studentovim t-testom ili F-testom. Vrednosti koeficijenata ukazuju na relativni uticaj pojedinačnih faktora na sistem, dok predznak koeficijenata (pozitivan ili negativan) ukazuje da li porast faktora povećava ili smanjuje odgovor. Kvadratni članovi modela izražavaju zakrivljenost površine odgovora, dok interakcioni koeficijenti ukazuju na međusobno dejstvo faktora. Statistička relevantnost celokupnog modela se takođe procenjuje korišćenjem t-testa ili F-testa, dok koeficijent determinacije (R^2) ukazuje na usklađenost modela sa eksperimentalnim podacima, pri čemu vrednost 1 označava potpunu usklađenost. *Lack of Fit* test ispituje odstupanje između stvarnih i predviđenih vrednosti, što pomaže u prepoznavanju potencijalnih uzroka odstupanja, bilo zbog eksperimentalnih grešaka ili ograničenja modela. Model se smatra validnim ako je statistički značajan, uz uslov da *Lack of Fit* nije značajan, što se procenjuje analizom varijanse (187).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj ove doktorske disertacije je bila procena hemijskog sastava i biološke aktivnosti plodova vrsta roda *Lycium* uzgajanih u Srbiji, kao i sporednih proizvoda koji nastaju tokom njihove prerade. Istraživanje je sprovedeno u četiri faze kojima je obuhvaćeno:

1) Ispitivanje hemijskih i nutritivnih karakteristika svežih i/ili liofilizovanih plodova *L. barbarum* i *L. ruthenicum* gajenih u Srbiji;

2) Procena *in vitro* bioloških aktivnosti (antioksidativne, antienzimске, antimikrobne i prebiotske) vodenometanolnih ekstrakata plodova godži;

3) Optimizacija procesa ekstrakcije odabranih bioaktivnih sastojaka plodova godži i biološka karakterizacija dobijenih ekstrakata;

4) Analiza hemijskog sastava, optimizacija procesa ekstrakcije i procena biološke aktivnosti sporednih proizvoda prerade plodova godži (*L. barbarum*) nakon ceđenja soka (pulpa) i nakon ceđenja ulja iz semena (pogača).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. HEMIHALIJE, REAGENCI I STANDARDI

Korišćene hemikalije bile su analitičkog stepena čistoće.

- Većina korišćenih standarda i hemikalija nabavljena je od proizvođača *Sigma-Aldrich* (Darmštat, Nemačka): reagensi za procenu antioksidativne aktivnosti: 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ), 2,2'-difetil-1-pikrilhidrazil (DPPH), 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonska kiselina (ABTS), neokuproin, bakar-hlorid, natrijum-acetat, β -karoten, *Folin-Ciocalteu* reagens, natrijum-karbonat, kalijum-peroksodisulfat, gvožđe-(III)-hlorid-6-hidrat, amonijum-acetat; reagensi i standardi za procenu antienzimске aktivnosti [α -amilaza, α -glukozidaza, acetilholinesteraza, *L*-tirozin, dinitrosalicilna kiselina, tris(hidroksimetil)aminometan, 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina, *p*-nitro- β -D-glukopiranozid, akarboza, galantamin, kalijum-natrijum-tartarat]. Od istog proizvođača su nabavljeni i standardi polifenolnih jedinjenja (hlorogenska kiselina, kafena kiselina, ferulinska kiselina, rutin, kemferol, kvercetin i katehin), rastvarači (metanol, hlorovodonična kiselina, sumporna kiselina, hloroform, aceton, heksan, fenol, etar, etil-acetat), kao i kalijum-hidroksid, natrijum-hidroksid, natrijum-sulfat, natrijum-hlorid, aluminijum-(III)-hlorid, natrijum-nitrit, bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamid (BSTFA).
- Enzimski kit za određivanje ukupnog sadržaja dijetnih vlakana nabavljen je od proizvođača *Megazyme International* (K-TDFR, Wicklow, Irska).
- Reagensi korišćeni za određivanje sadržaja minerala uključuju Multi-Element Plasma Standard Solution 4 (Specture®, Alfa Aesar, John Mutthey Company), Major Elements Stock (EPA Method Standard, VHG Labs), 6020A ICS Stock (EPA Method Standard, VHG Labs), Mercury Standard (Merck) i Arsen Standard (Merck).
- Standard kojične kiseline nabavljen je od kompanije *Avena Lab* (Vršac, Srbija).
- Galna kiselina, glukoza, natrijum dihidrogen-fosfat, natrijum hidrogen-fosfat, linolna kiselina i acetilholin-jodid nabavljeni su od proizvođača *Acros Organics* (Gel, Belgija), dok su etanol, glacijalna sirćetna kiselina i Tween 20 nabavljeni od kompanije *Fischer Chemicals* (Masačusets, SAD).
- Svi standardni sojevi mikroorganizama nabavljeni su od proizvođača *American Type Culture Collection* (ATCC) (Manasas, SAD), a *Mueller-Hinton* i *Sabourud* bujoni od kompanije *Lab M Limited* (Beri, UK).

3.2. MATERIJAL

U okviru ove doktorske disertacije, analizirani su uzorci plodova roda *Lycium*, sakupljeni u fazi potpune zrelosti. Analizirani su uzorci plodova *Lycium barbarum* L., crvene boje (LB), plodovi *L. barbarum* var. *auranticarpum*, „Amber Sweet Goji”, žute boje (LBa), kao i crni plodovi *Lycium ruthenicum* Murray (LR) (Tabela 2). Plodovi LBa i LR, prikupljeni su sa privatne plantaže „Goji-Ljuba i sinovi“ u Nišu, koja je jedini uzgajivač ovih biljnih vrsta u Srbiji. Sporedni proizvodi prerade plodova godži (LB), dobijeni nakon ceđenja soka (pulpa) i ulja iz semena (pogača) dobijeni su sa plantaže u Beogradu.

Plodovi roda *Lycium* identifikovani su na Katedri za botaniku, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i zavedeni su pod brojevima HFF_4306, HFF_4307 i HFF_4308. Podaci o uzorcima, oznakama, lokalitetima i godini sakupljanja ispitivanih plodova roda *Lycium* prikazani su u Tabeli 2.

Tabela 2. Podaci o analiziranim plodovima roda *Lycium*

Takson	Opis	Oznaka	Plantaža	Godina berbe
<i>Lycium barbarum</i>	Crveni plod	SU	Subotica	2020
		SD	Smederevo	2020
		PŽ	Požega	2020
		BG	Beograd	2020
		NI	Niš	2019;2020
		RU	Ruma	2020
<i>Lycium barbarum</i> var. <i>auranticarpum</i>	Žuti plod	LBa	Niš	2019
<i>Lycium ruthenicum</i> Murray	Crni plod	LR	Niš	2019;2020
Sporedni proizvodi prerade plodova				
<i>Lycium barbarum</i>	Ostatak nakon ceđenja ploda	Pulpa	Beograd	2020
<i>Lycium barbarum</i>	Ostatak nakon ceđenja ulja iz semena	Pogača	Beograd	2020

Plodovi LB sakupljeni sa plantaža iz različitih regiona u Srbiji: Vojvodina (Subotica i Ruma), južna Srbija (Niš), beogradski region (Beograd i Smederevo) i zapadna Srbija (Požega), predstavljeni su na **Slici 13**.



Slika 13. Lokaliteti plantaža u Srbiji sa kojih potiču analizirani plodovi vrsta *Lycium*

3.2.1. Priprema uzoraka

Plodovi različitih *Lycium* vrsta su nakon sakupljanja čuvani na temperaturi 4°C do analize. Uzorci plodova LB prikupljeni sa različitih plantaža su liofilizovani, na temperaturi od -40°C i pod pritiskom od 0,02 mBar, pomoću liofilizatora *Elbi LS500* model (Valjevo, Srbija). Nakon liofilizacije, uzorci i sporedni proizvodi prerade plodova su usitnjeni korišćenjem mlina (*Bosch*, Nemačka), vakuumirani u plastičnim kesama i čuvani na -20°C do analize.

3.2.2. Priprema vodenometanolnih ekstrakata

Sveži i/ili liofilizovani uzorci i sporedni proizvodi prerade plodova ekstrahovani su postupkom maceracije na sobnoj temperaturi, zaštićeni od svetlosti, tokom 24 h. Odnos droga:rastvarač iznosio je 1:10 (m/v), a kao rastvarač korišćena je mešavina metanola i vode (80/20; v/v). Dobijeni ekstrakti su filtrirani, a metanol je uklonjen uparavanjem pod sniženim pritiskom na 45°C pomoću rotacionog vakuum uparivača (*Buchi Rotavapor R-100*, Flavil, Švajcarska). Dobijeni suvi vodenometanolni ekstrakti su čuvani na +4°C u frižideru.

3.3. Analiza hemijskog sastava plodova godži

3.3.1. Nutritivni sastav i energetska vrednost

U uzorcima svežih i/ili liofilizovanih plodova godži, kao i sporednim proizvodima prerade plodova godži, analizirani su sadržaj vlage, pepela, ukupnih masti i proteina prema standardnim metodama Asocijacije zvaničnih hemičara analitičara (engl. *Association of Official Analytical Chemists*, AOAC) (188). Sadržaj vlage određen je gravimetrijskom metodom sušenjem uzoraka do konstantne mase u sušnici na 105°C (AOAC 925.09), dok je sadržaj pepela određen žarenjem uzoraka na temperaturi od 600°C do postizanja konstantne mase (AOAC 923.03). Sadržaj proteina određen je indirektnom metodom po *Kjeldahl*-u (AOAC 968.06, 992.15), dok je sadržaj masti određen gravimetrijskom metodom po *Soxhlet*-u, uz upotrebu hloroforma kao rastvarača (AOAC 989.05). Sadržaj rastvornih (engl. *Soluble Dietary Fiber*, RDV) i nerastvornih dijetnih vlakana (engl. *Insoluble Dietary Fiber*, NDV) određen je enzimsko-gravimetrijskom AOAC metodom 991.43, korišćenjem enzimskog kita za određivanje ukupnih dijetnih vlakana (*K-TDFR; Megazime International*, Wicklow, Irska) (189). Sadržaj ukupnih dijetnih vlakana (engl. *Total Dietary Fiber*, UDV) predstavlja zbir sadržaja NDV i RDV. Sadržaj ugljenih hidrata izračunat je računskim putem, oduzimanjem % sadržaja prethodno određenih jedinjenja od 100. Rezultati su izraženi kao g/100 g sveže (engl. *fresh weight*, fw) ili g/100 g suve materije (engl. *dry weight*, dw) plodova. Energetska vrednost je dobijena računskim putem (190):

$$\text{Energija, kJ} = 37 \times (\text{g masti}) + 17 \times (\text{g proteina} + \text{g ugljenih hidrata}) + 8 \times (\text{g UDV}) \quad (4)$$

3.3.2. Određivanje masnih kiselina

Transesterifikacija masnih kiselina u isparljive metil-estre masnih kiselina (engl. *Fatty Acid Methyl Esters*, FAME) izvršena je prema postupku koji su opisali *Blasi i saradnici* (60). Oko 1,5 g uzorka ekstrahovano je mešavinom hloroforma i metanola (2:1, v/v), u ultrazvučnom kupatilu tokom jednog sata. Nakon izdvajanja i filtracije hloroformski ekstrakt je ispiran sa 50 mL destilovane vode, a zatim 3 puta sa po 20 mL heksana u levku za odvajanje. Gornji heksanski sloj je filtriran kroz anhidrovani natrijum-sulfat, a transesterifikacija je vršena pomoću heksana i 2M KOH u metanolu. Nakon centrifugiranja na 3000 obrtaja u minuti (rpm), tokom 1 minuta, uklonjen je gornji heksanski sloj, koji je korišćen za dalju kvalitativnu i kvantitativnu analizu masnih kiselina.

FAME u plodovima i sporednim proizvodima prerade plodova godži, određeni su korišćenjem gasne hromatografije (*Agilent Technologies, Agilent 7890 GC Chem Station Operation*, SAD) u kombinaciji sa plameno-jonizujućim detektorom (GC-FID) prema prethodno opisanoj proceduri (191). Separacija FAME izvršena je na kapilarnoj koloni CP-Sil88 (100 m x 0,25 mm) sa debljinom stacionarne faze 0,2 µm (*SUPELCO, Bellefonte, PA, SAD*). Brzina protoka helijuma kao gasa nosača podešena je na 1,0 mL/min, dok je protok dodatnog gasa (azot) bio 25 mL/min. Injektovana zapremina uzorka iznosila je 1 µL sa „split“ odnosom 20:1. Radna temperatura injektora bila je 250°C, a detektora 270°C. Inicijalna temperatura kolone je podešena na 80°C, a zatim je povećavana za 4°C/min do dostizanja 220°C, gde se održala 5 min. Pod istim uslovima, temperatura je povećana do 240°C, gde se održala 10 minuta. Analiza je ukupno trajala 55 minuta. Identifikacija masnih kiselina izvršena je poređenjem retencionih vremena komponenata hromatograma sa standardnom FAME mešavinom (*Supelco FAME Mix, Bellefonte, PA, SAD*), dok je kvantifikacija bazirana na površinama pikova.

Profili masnih kiselina izraženi su kao procenat (%) ZMK, MNMK, PNMK i nezasićenih (engl. *Unsaturated Fatty Acids*, NMK) masnih kiselina.

Oksidativna stabilnost procenjena je na osnovu vrednosti indeksa izračunate oksidativnosti (engl. *Calculated OXidizability*, Cox) i oksidativne stabilnosti (engl. *Oxidative Susceptibility*, OS), korišćenjem sledećih formula (192,193):

$$Cox = \frac{C18:1 + 10,3 \times C18:2 + 21,6 \times C18:3}{100} \quad (5)$$

$$OS = MNMK + 45 \times C18:2 + 100 \times C18:3 \quad (6)$$

Dodatno izračunati su različiti indeksi: PNMK/ZMK, indeks aterogenosti (engl. *Atherogenicity index*, AI) i indeks trombogenosti (engl. *Thrombogenicity index*, TI), primenom sledećih formula (193):

$$\frac{PNMK}{ZMK} = \frac{\text{polinezasićene masne kiseline}}{\text{zasićene masne kiseline}} \quad (7)$$

$$AI = \frac{4 \times C14:0 + C16:0 + C18:0}{MNMK + PNMK} \quad (8)$$

$$TI = \frac{C14:0 + C16:0 + C18:0}{0,5 \times MNMK + 0,5 \times \omega - 6 + 3 \times \omega - 3 + (\omega - 3/\omega - 6)} \quad (9)$$

3.3.3. Određivanje fitosterola

Liofilizovani plodovi LB (1,5 g) su ekstrahovani heksanom (15 mL) u ultrazvučnom kupatilu tokom 1 h, nakon čega su heksanski ekstrakti filtrirani i upareni (*Buchi Rotavapor R-100*, Flavil, Švajcarska). Ostatak nakon uparavanja je zatim saponifikovan mešavinom 50 % kalijum hidroksida (5 mL) i etanola (30 mL) na temperaturi od 90°C, tokom 60 minuta. Nesaponifikovane frakcije ekstrahovane su petroletrom (3 × 50 mL), zatim ispirane 10 % etanolom (3 × 50 mL) i filtrirane kroz anhidrovani Na₂SO₄. Nakon uklanjanja rastvarača, nesaponifikovane frakcije (5 mg/mL rastvora u dihlorometanu, 300 µL), tretirane su bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamidom (BSTFA) (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, SAD; 200 µL) na 60°C, tokom 60 minuta, radi dobijanja isparljivih trimetilsilil (TMS) derivata. Uzorci su analizirani u roku od 6 h nakon derivatizacije.

Profil fitosterola analiziran je metodom gasne hromatografije pomoću Agilent 6890N (*Agilent Technologies*, Palo Alto, Kalifornija, SAD) sa split/splitless injektorom, FID detektorom i kapilarnom kolonom (30 m × 0,25 mm, debljina stacionarne faze 0,25 µm), kao i Agilent 5975C instrumenta sa masenim selektivnim detektorom (MSD). Brzina protoka helijuma kao gasa nosača podešena je na 1,0 mL/min. Zapremina injektovanog uzorka iznosila je 1 µL, uz „split“ odnos 1:10. Eksperimentalni uslovi obuhvatali su temperaturni program od 60 do 280°C sa linearnim porastom temperature od 3°C/min, a konačna temperatura održavana je 20 minuta. Temperatura injektora postavljena je na 200°C, dok su FID detektor i MSD radili na 300°C, odnosno 250°C, u režimu elektronskog udara (EI) sa snagom od 70 eV.

Identifikacija jedinjenja vršena je poređenjem masenih spektara sa podacima iz biblioteka: *Wiley Libraries* 8th edition i *NIST/NBS* 05, kao i dostupnim literaturnim podacima (59,194). Identifikacija stigmasterola, β -sitosterola (oba Val-de-Reuil, Francuska) i β -amirina (*Sigma-Aldrich*) potvrđena je korišćenjem komercijalnih standarda, dok je kvantifikacija bazirana na površini pikova dobijenih FID analizom.

3.3.4. Određivanje sadržaja 2-O- β -D-glukopiranozil-L-askorbinske kiseline

Sadržaj 2-O- β -D-glukopiranozil-L-askorbinske kiseline (AA-2 β G), derivata AA, u plodovima godži određen je tečnom hromatografijom visokih performansi (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC), prema prethodno opisanoj proceduri (195). Oko 2,5 g uzorka je odmereno, preneto u erlenmajer i pomešano sa 32 mL 0,1 M H₂SO₄. Nakon ultrazvučne ekstrakcije od 30 minuta, pH vrednost rastvora je podešena na 4,5 pomoću natrijum-acetata, a zatim je smeša preneti u normalni sud od 50 mL i dopunjena destilovanom vodom. Nakon filtracije kroz Whatman filter papir No. 1 (0,45 µm), uzorci su analizirani tečnom hromatografijom Agilent 1200 (*Agilent Technologies*, Santa Clara, Kalifornija, SAD), opremljenom detektorom sa diodnim nizom (DAD). Razdvajanje komponenti izvršeno je na koloni *Zorbax Eclipse XDB* (150 mm × 4,6 mm, veličina čestica 5 µm). Gradijentno eluiranje uključivalo je dve mobilne faze: vodu sa 0,1 % trifluorosirćetnom kiselinom i acetonitril sa 0,1 % trifluorosirćetnom kiselinom, uz protok od 1,3 mL/min. Kvantifikacija je obavljena na talasnoj dužini od 245 nm, a rezultati su izraženi kao mg AA-2 β G na 100 g svežih ili 100 g suve materije plodova.

3.3.5. Određivanje mineralnih materija

Sadržaj mineralnih materija u plodovima i sporednim proizvodima prerade plodova godži, određen je nakon mikrotalasne digestije pomoću *Berghof*-ovog instrumenta SpeedWave XPERT, prema prethodno opisanoj metodi (77). Odmereno je oko 0,8 g uzorka i pomešano sa smešom 5 mL azotne kiseline (65 %) i 2 mL vodonik-peroksida (35 %). Dobijeni rastvori su filtrirani, preneti u normalne sudove od 50 mL i razblaženi ultra čistom vodom. Koncentracije makroelemenata (K, Na, Ca, Mg, P, S) kvantifikovane su korišćenjem optičkog emisijonog spektrometra sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES), model Thermo Fischer iCAP6300 Duo (Kembridž, UK), dok su mikroelementi (Fe, Zn, Cu, Mn, Cr, Mo) analizirani ICP-MS uređajem (Kembridž, UK). Kalibracija instrumenata obavljena je standardnim serijama pripremljenim korišćenjem internih standarda poznatih koncentracija, razblaživanjem komercijalnih standarda za kalibraciju Multi-Element Plasma Standard Solution 4 (Specture®, Alfa Aesar, John Mutthey Company), Major Elements Stock (EPA Method Standard, VHG Labs), 6020A ICS Stock (EPA Method Standard, VHG Labs), Mercury Standard (Merck) i Arsen Standard (Merck). Rezultati su izraženi u mg ili µg na 100 g uzorka, u odnosu na standardne rastvore poznatih koncentracija analizirane istovremeno sa uzorcima.

3.3.5.1. Određivanje nutritivne referentne vrednosti

U cilju procene nutritivnog potencijala, vršeno je izračunavanje procenta nutritivne referentne vrednosti (NRV) za minerale u analiziranim uzorcima na sledeći način:

$$\% NRV = \frac{\text{Sadržaj mineralnih materija}}{NRV} \times 100 \quad (10)$$

3.4. Analiza fizičko-hemijskih parametara plodova godži

3.4.1. Određivanje pH vrednosti

pH vrednosti hidrometanolnih ekstrakata svežih plodova godži određene su direktnom potenciometrijskom metodom, pomoću pH metra (*Wissenschaftlich-Technische Werkstätten*, Vajlhajm, Nemačka).

3.4.2. Određivanje ukupne rastvorljive suve materije

Količina ukupne rastvorljive suve materije (engl. *Total Soluble Solids*, TSS) u svežim plodovima godži, izražena kao °Brix, određena je korišćenjem ručnog refraktometra sa automatskom temperaturnom kompenzacijom (*HI 96811 Digital Brix Refractometer*, *Hanna Instruments*®, Vunsoket, SAD) (SRPS EN 12143:2005) (196).

3.4.3. Određivanje titrirane kiselosti

Određivanje titrirane kiselosti (engl. *Titrateable Acidity*, TA) određeno je prema protokolu, SRPS EN 12147:2005 (197). Odmereni uzorci pomešani su sa 10 mL vode i zagrevani na vodenom kupatilu 30 minuta. Nakon hlađenja, dopunjeni su destilovanom vodom do 50 mL. Zapremina od 10

mL uzorka titrirana je rastvorom 0,1 M NaOH, uz dodatak fenol-ftaleina kao indikatora. Rezultati su izraženi kao procenat limunske kiseline u svežim plodovima godži. Takođe, izračunat je odnos TSS/TA.

3.5. Analiza bioaktivnih jedinjenja u plodovima godži

3.5.1. Određivanje sadržaja ukupnih polisaharida

Sadržaj ukupnih polisaharida (engl. *L. barbarum polysacharrides*, LBP) u plodovima godži i sporednim proizvodima prerade plodova LB određen je prema proceduri opisanoj u Kineskoj farmakopeji (32). Ukratko, 0,5 g uzorka ekstrahovano je sa 40 mL etra na sobnoj temperaturi tokom 20 minuta, a potom 1 h u ultrazvučnom kupatilu (*Model LBS 2, FALC Instruments*, Treviglio, Italija). Nakon toga, supernatanti su dekantovani, a ostatak je osušen i zatim ponovo rastvoren u 20 mL 80 % metanola. Nakon ultrazvučne ekstrakcije tokom 1 h, supernatanti su dekantovani, a osušeni ostatak rastvoren u 50 mL ključale destilovane vode. Ekstrakcija je nastavljena na sobnoj temperaturi 2 h, a zatim 1 sat u ultrazvučnom kupatilu. Nakon toga, rastvor je centrifugiran na 4000 rpm tokom 10 minuta (*Model Z 206 A, HERMLE Labortechnik GmbH*, UK). Dobijeni supernatanti (500 μ L) su pomešani sa 1 mL 5 % rastvora fenola, 1,5 mL destilovane vode i 5 mL koncentrovane sumporne kiseline. Nakon inkubacije od 10 minuta na sobnoj temperaturi i 15 minuta na 40°C, vrednosti apsorpcije su izmerene na talasnoj dužini od 490 nm (*LLG-uniSPEC 2 Spectrophotometer*, Meckenheim, Nemačka). Kalibraciona kriva je konstruisana korišćenjem standardnog vodenog rastvora D-glukoze u koncentracijama od 0,01 do 1,0 mg/L, a rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenata glukoze (Glu) na g suve materije plodova ili 100 g sporednih proizvoda prerade plodova godži.

3.5.2. Određivanje sadržaja ukupnih karotenoida

Sadržaj ukupnih karotenoida (engl. *Total Carotenoid Content*, TCC) u liofilizovanim plodovima LB određen je spektrofotometrijskom metodom, uz određene modifikacije (198). Oko 0,5 g uzorka ekstrahovano je sa 10 mL 80 % acetona, tokom 10 minuta, u ultrazvučnom kupatilu (*Model Z 206 A, HERMLE Labortechnik GmbH*, UK). Nakon filtracije, apsorpcije supernatanta merene su na tri različite talasne dužine, 450, 663,2 i 646,8 nm, na spektrofotometru, model *LLG-uniSPEC 2* (Meckenheim, Nemačka). Rezultati su izraženi kao mg TCC na g suve materije plodova korišćenjem sledećih jednačina:

$$Ch - a = 12,25 \times A_{663,2} - 279 \times A_{646,8} \quad (11)$$

$$Ch - b = 21,5 \times A_{646,8} - 5,1 \times A_{663,2} \quad (12)$$

$$TCC = \frac{100 \times A_{470} - 1,82 \times Ch - a - 85,2 \times Ch - b}{198} \quad (13)$$

- $Ch - a$ – hlorofil a
- $Ch - b$ – hlorofil b

Ukupni sadržaj karotenoida u svežim plodovima LB, LBa i LR određen je spektrofotometrijskom metodom, prema ranije opisanom postupku (199). Ukratko, nakon ekstrakcije smešom acetona i heksana (4:6, v/v), smeša je homogenizovana i centrifugirana, a apsorbancije supernatanta izmerene na četiri talasne dužine 453, 505, 645 i 663 nm, pomoću UV-VIS spektrofotometra (*Thermo Scientific Evolution 201*, Voltam, SAD). Rezultati su dobijeni računskim putem i predstavljeni kao mg TCC na 100 g svežih plodova.

$$TCC = 0,216 A_{663} - 1,22 A_{645} - 0,304 A_{505} + 0,452 A_{453} \quad (14)$$

3.5.3. Određivanje polifenolnih jedinjenja

3.5.3.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola (engl. *Total Phenolic Content*, TPC) u svežim LB, LBa, LR plodovima, liofilizovanim LB plodovima i sporednim proizvodima prerade plodova LB, određen je korišćenjem komercijalnog *Folin-Ciocalteu* reagensa, koji se sastoji od fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, prema metodi koju je opisao Attard (200). U mikrotitracionu ploču su dodata različita razblaženja uzorka (10 µL), *Folin-Ciocalteu* reagens (100 µL) koji je prethodno razblažen destilovanom vodom u odnosu 1:9 (v/v) i vodeni rastvor 7,5 % Na₂CO₃ (80 µL). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi i tamnom mestu tokom 1 h, izmerene su apsorbancije reakcione smeše na talasnoj dužini od 630 nm, koristeći ELISA čitač (*ELx800 Absorbance Microplate Reader*, BIOTEK, USA). Sadržaj ukupnih polifenola izračunat je korišćenjem kalibracione krive pripremljene sa galnom kiselinom (0,1 g/L) u opsegu koncentracija 10-80 mg/L. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata galne kiseline (engl. *Gallic Acid Equivalent*, GAE) na 100 g svežih plodova ili na g suve materije plodova. Za sporedne proizvode prerade plodova LB rezultati su izraženi kao mg GAE/100 g.

3.5.3.2. Hromatografska analiza profila polifenolnih jedinjenja

Kvalitativni i kvantitativni sastav polifenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima liofilizovanih plodova LB analiziran je korišćenjem HPLC sistema. Aparatura se sastoji od hromatografa (*Agilent 100*, *Agilent Technologies*, Santa Klara, Kalifornija, SAD) opremljenog degaserom, binarnom pumpom (G1312A), kolonom *Zorbax Eclipse XDB-C18* (4,6 mm x 250 mm sa veličinom čestica 5 µm) i fotodiodnim detektorom (DAD) (G1315B). Suvi vodenometanolni ekstrakti liofilizovanih plodova godži su rastvoreni u metanolu (10 mg/mL) i eluirani gradijentnim dvofaznim sistemom pri brzini protoka od 0,8 mL/min i temperaturi od 25°C. Mobilna faza se sastoji od faze A – voda:fosforna kiselina (99,97 : 0,03, v/v), pH 2,75 i faze B – 10 % A u acetonitrilu. Gradijentni profil je bio: 0 min 90 % A, 10 % B; 5–15 min 75 % A, 25 % B; 20 min 70 % A, 30 % B; 25 min 50 % A, 50 % B; 30 min 30 % A, 70 % B i 35 min 90 % A, 10 % B. Zapremina injektovanog uzorka iznosila je 50 µL, temperatura 25 °C i pritisak 80 bara. Fenolkarboksilne kiseline detektovane su na talasnoj dužini od 250 nm, a flavonoidi na 320 nm. Kvalitativna analiza je izvršena poređenjem retencionih vremena spektara uzoraka sa retencionim vremenima komercijalnih standarda. Za svako jedinjenje (hlorogenska kiselina, galna kiselina, kafena kiselina, ferulinska kiselina, rutin, kemferol i kvercetin) pripremljene su serije standardnih rastvora, a kalibracione krive su konstruisane kao zavisnost površine pika od koncentracije. Kvantitativna analiza polifenolnih jedinjenja dobijena je računski na osnovu površine pika uzoraka i jednačine linearne zavisnosti standardnih rastvora.

Linearnost, limiti detekcije (LOD) i limiti kvantifikacije (LOQ) komercijalnih standarda procenjeni su u skladu sa smernicama Međunarodne konferencije za harmonizaciju (201):

$$LOD = 3,3 \times \frac{SDb}{a} \quad (15)$$

$$LOQ = 10 \times \frac{SDb}{a} \quad (16)$$

- SDb – standardna devijacija odsečka na ordinati
- a – nagib kalibracione krive

Jednačine kalibracionih kriva, r^2 , LOD i LOQ standarda polifenolnih jedinjenja su prikazane u **Tabeli 3**.

Tabela 3. Jednačine kalibracionih kriva, r^2 , LOD i LOQ standarda polifenolnih jedinjenja

Standard	Jednačina kalibracione krive	r^2	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)
Fenolkarboksilne kiseline				
Hlorogenska kiselina	$y = 19157x + 129,35$	0,9999	0,10	0,32
Galna kiselina	$y = 22298x + 255,2$	0,9954	0,17	0,56
Kafena kiselina	$y = 51077x + 196,38$	0,9985	0,17	0,58
Ferulinska kiselina	$y = 30937x - 83,79$	0,9991	0,10	0,33
Flavonoidi				
Rutin	$y = 21278x - 134,53$	0,9987	0,06	0,18
Kemferol	$y = 134,20x + 1246,32$	0,9983	0,09	0,31
Kvercetin	$y = 44,59x + 882,07$	0,9976	0,12	0,39

Kvalitativna analiza fenolnih jedinjenja u metanolnom ekstraktu plodova LR je izvršena korišćenjem LC-MS sistema, koji se sastoji od hromatografa (*Agilent 1260/6130*, *Agilent Technologies*, Valdbron, Nemačka), injektora (G1329B), kvaternarne pumpe (G1311B), degasera (G1311B), kolone (G1316A), detektora fotodiodnog niza (G4212B) i kvadrupolnog detektora mase (6130). Uzorci su rastvoreni u metanolu u koncentraciji 10 mg/mL, i filtrirani kroz membranske filtere veličina pora 0,45 μ m. Injektovana zapremina uzorka je 5 μ L. Razdvajanje je postignuto na koloni reverzne faze (*Zorbax SB-Ak*, 3 $\times$ 150 mm, veličina čestica 3,5 μ m, *Agilent Technologies*) na 25°C. Mobilna faza se sastojala od 0,1 % vodenog rastvora mravlje kiseline (A) i acetonitrila (B) sa protokom od 0,35 mL/min. Korišćen je sledeći program eluiranja: 5–25 % B (0–20 min), 25–90 % B (20–24 min), 90 % B (24–25 min), i povratak na 5 % B (25–30 min). UV spektri jedinjenja su snimljeni u opsegu od 190–640 nm, dok su UV hromatogrami snimljeni na 210, 270, 320, 350 i 530 nm. Jonizacija je sprovedena API-ES metodom, sa opsegom skeniranja masa od 100–1200 m/z , i naponom fragmentora od 100 ili 250 V. Parametri komore za raspršivanje su uključivali protok gasa za sušenje 10 mL/min, temperaturu od 350°C, pritisak nebulizatora od 40 psi, i kapilarni napon od 3500 V. Analiza derivata hidroksicimetne kiseline obavljena je u negativnom režimu, dok su antocijani analizirani u pozitivnom režimu. Podaci su obrađeni korišćenjem *ChemStation* softvera Rev. B.04.03-SP1, a identifikacija jedinjenja je izvršena poređenjem UV i MS spektra sa relevantnim literaturnim podacima (112,202–206).

3.5.4. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida (engl. *Total Flavonoid Content*, TFC) u svežim plodovima LB, LBa, LR određen je spektrofotometrijskom metodom prema Evropskoj farmakopeji 7.0 (207). Uzorci suvih vodenometanolnih ekstrakata su ekstrahovani smešom acetona, urotropina i HCl, nakon čega je gornji sloj, koji sadrži flavonoide, ekstrahovan četiri puta etil-acetatom. Spojeni etil-acetatni slojevi su isprani vodom, a zatim im je dodat aluminijum-(III)-hlorid i rastvor 5 % glacijalne sirćetne kiseline u metanolu. Apsorbancije rastvora su izmerene na talasnoj dužini od 425 nm (*uniSPEC 2*, *LLG Labvare*, Turnov, Češka Republika), u odnosu na slepu probu koju čini rastvor bez AlCl₃.

Ukupni sadržaj flavonoida, izražen kao mg ekvivalenta hiperozida (HE) na 100 g svežih plodova, izračunat je prema sledećoj formuli:

$$\% \text{ Flavonoida} = \frac{A \times 1,25}{m} \quad (17)$$

- A – apsorbancija ispitivanog rastvora na 425 nm
- m – masa ekstrakta u gramima

Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima liofilizovanih plodova LB i sporednim proizvodima prerade plodova LB određen je spektrofotometrijskom metodom, koja se zasniva na stvaranju kompleksa flavonoid-aluminijum (208). U mikrotitracionu ploču dodati su razblaženi ekstrakti (10 µL), rastvor 10 % AlCl₃ (30 µL), 5 % NaNO₂ (30 µL), 1M NaOH (20 µL) i 200 µL destilovane vode. Nakon mešanja, apsorbancija reakcione smeše merena je na 490 nm pomoću ELISA čitača (*BIOTEK, ELx800 Absorbance Microplate Reader, USA*). Sadržaj ukupnih flavonoida izračunat je pomoću standardne krive konstruisane upotrebom katehina (1 g/L) u opsegu koncentracija 100-800 mg/L. Rezultati su izraženi kao mg katehin ekvivalenta (engl. *Catechin Equivalent*, CE) na g suve materije plodova LB, ili na 100 g sporednih proizvoda prerade plodova godži.

3.5.5. Određivanje sadržaja ukupnih antocijana

Sadržaj ukupnih antocijana (engl. *Total Anthocyanins Content*, TAcy) u svežim plodovima LB, LBa i LR određen je spektrofotometrijskom metodom opisanoj u Evropskoj farmakopeji 7.0 (207). Uzorci suvih vodenometanolnih ekstrakata su hidrolizovani 0,1 % (v/v) rastvorom HCl u metanolu. Intenzitet apsorbancije dobijenih rastvora je izmeren na talasnoj dužini od 528 nm (*UniSPEC 2*, *LLG Labvare*, Turnov, Češka Republika).

Sadržaj antocijana, izražen preko cijanidin-3-glukozid hlorida (engl. *Cyanidin-3-glucoside*, C3G), izračunat je korišćenjem formule:

$$\% \text{ Antocijana} = \frac{A \times 5000}{718 \times m} \quad (18)$$

- A – apsorbancija rastvora na 528 nm
- m – masa ekstrakta u gramima

Sadržaj ukupnih monomernih antocijana (engl. *Total Monomeric Anthocyanin Content*, MAC) u ekstraktu plodova LR određen je pH diferencijalnom kolorimetrijskom metodom, zasnovanoj na reverzibilnoj promeni boje rastvora, pri promeni pH sredine. Na pH 1,0 antocijani su u obojenom oksonijum obliku, dok na pH 4,5 preovlađuje bezbojni hemiketalni oblik. Razlika u apsorbanciji između talasnih dužina 520 nm i 700 nm proporcionalna je koncentraciji antocijana u uzorku. Rezultati su izraženi kao mg C3G na g uzorka, korišćenjem sledeće formule (209):

$$MAC = \frac{A \times M \times DF \times 10^3}{\varepsilon \times l} \quad (19)$$

- $A = [(A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1}] - [(A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4,5}]$
- M – molekulska masa cijanidin-3-glukozida (449,2 g/mol)
- DF – faktor razblaženja
- ε – molarni ekstinkcioni koeficijent (26900 L/mol cm)
- l – dužina optičkog puta kivete (cm)

3.5.5.3. Hromatografska analiza antocijana

Antocijanski aglikoni u plodovima LR identifikovani su i kvantifikovani HPLC metodom uz neznatne modifikacije, prema prethodno opisanoj proceduri (210). Oko 1 g uzorka plodova LR ekstrahovano je sa 10 mL mešavine rastvarača metanol:voda:37 % HCl = 50:33:17 (v/v/v), u ultrazvučnom kupatilu 20 minuta. Ekstrakt je filtriran kroz filter papir (0,45 μm), a zatim hidrolizovan 60 minuta u vodenom kupatilu na 100°C. Nakon brzog hlađenja, analize su izvršene na HPLC sistemu (HP serije 1090, Kalifornija, SAD) opremljenom DAD detektorom. Razdvajanje jedinjenja je izvršeno na reverzno-faznoj koloni *Lichrospher RP-18* (250 x 4 mm, veličina čestica 5 μm). Mobilne faze se sastoje od rastvora A (10 % vodeni rastvor mravlje kiseline) i rastvarača B (acetonitril). Ekstrakti su razdvojeni gradijentnim eluiranjem prema sledećoj šemi: 1 % B (0–0,5 min), 1–7 % B (0,5–1 min), 7 % B (1–4 min), 7–10 % B (4–7,5 min), 10–14 % B (7,5–11,5 min), 14 % B (11,5–15,5 min), 14–18 % B (15,5–18,5 min), i 18 % B (18,5–22 min). Protok mobilne faze bio je konstantan i podešen na 1 mL/min, a detekcija je sprovedena na talasnim dužinama: 290, 350 i 520 nm. Delfinidin i petunidin su kvantifikovani korišćenjem kalibracionih krivi autentičnih standarda (*Ektrasynthese*, Francuska). Rezultati su izraženi kao mg po gramu suve materije plodova LR.

3.5.6. Određivanje sadržaja ukupnih tanina

Ukupni sadržaj tanina (engl. *Total Tannins Content*, TT) u ekstraktima svežih plodova LB, LBa i LR određen je spektrofotometrijskom metodom, prema proceduri opisanoj u Evropskoj farmakopeji 7.0 (207). Ova metoda se zasniva na osobini fenolnih jedinjenja da u reakciji sa *Folin-Ciocalteu*-ovim reagensom u baznoj sredini formiraju obojeni kompleks, čija se apsorbcija meri na talasnoj dužini od 760 nm. Nakon inicijalnog merenja sadržaja ukupnih polifenola, uzorci su tretirani kožom u prahu, koja adsorbuje tanine, a zatim je određen sadržaj neadsorbovanih polifenola. Sadržaj ukupnih tanina je izračunat iz razlike sadržaja ukupnih polifenola pre tretmana (A_1) i sadržaja polifenola koji ne adsorbuju na kožni prah (A_2), prema sledećoj formuli:

$$\% \text{ Tanina} = \frac{62,5 \times (A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 \times m_1} \quad (20)$$

- m_1 – masa ekstrakta u gramima
- m_2 – masa pirogalola u gramima
- A_1 – apsorbcija ukupnih polifenola
- A_2 – apsorbcija polifenola koji ne adsorbuju na kožni prah
- A_3 – apsorbcija pirogalola

Rezultati su izraženi kao mg pirogalola (engl. *Pyrogallol Equivalents*, PYE) na 100 g svežih plodova.

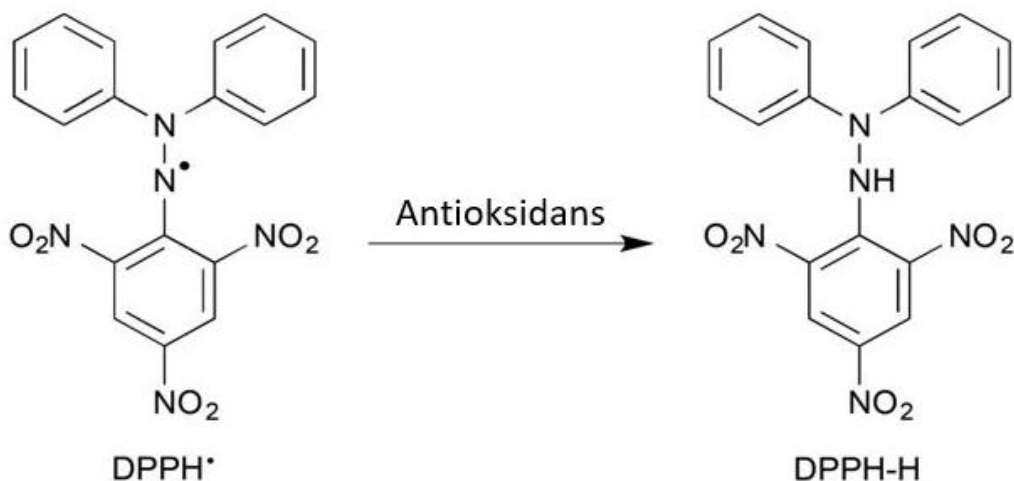
3.6. Analiza bioloških aktivnosti plodova godži

3.6.1. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativni potencijal vodenometanolnih i vodenoetanolnih ekstrakata plodova i sporednih proizvoda prerade plodova godži procenjen je primenom pet različitih *in vitro* mikrometoda. Za procenu antiradikalske aktivnosti korišćeni su testovi sa 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH[•]) i 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonska kiselina (ABTS^{•+}) radikalom, za procenu redukcionih sposobnosti analiziranih ekstrakata korišćene su metode sposobnosti redukcije Fe³⁺ jona (FRAP metoda) i Cu²⁺ (CUPRAC metoda), dok je za procenu inhibicije lipidne peroksidacije korišćena metoda inhibicija obezbojavanja β -karotena (IO β K).

3.6.1.1. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH[•] radikala

Metoda se zasniva na redukciji ljubičastog DPPH[•] radikala (2,2'-difenil-1-pikrilhidrazila), koji primanjem protona prelazi u žuto obojeni difenilpikrilhidrazin (**Slika 14**), i određena je prema metodi koji su opisali *Norma i saradnici* (211).

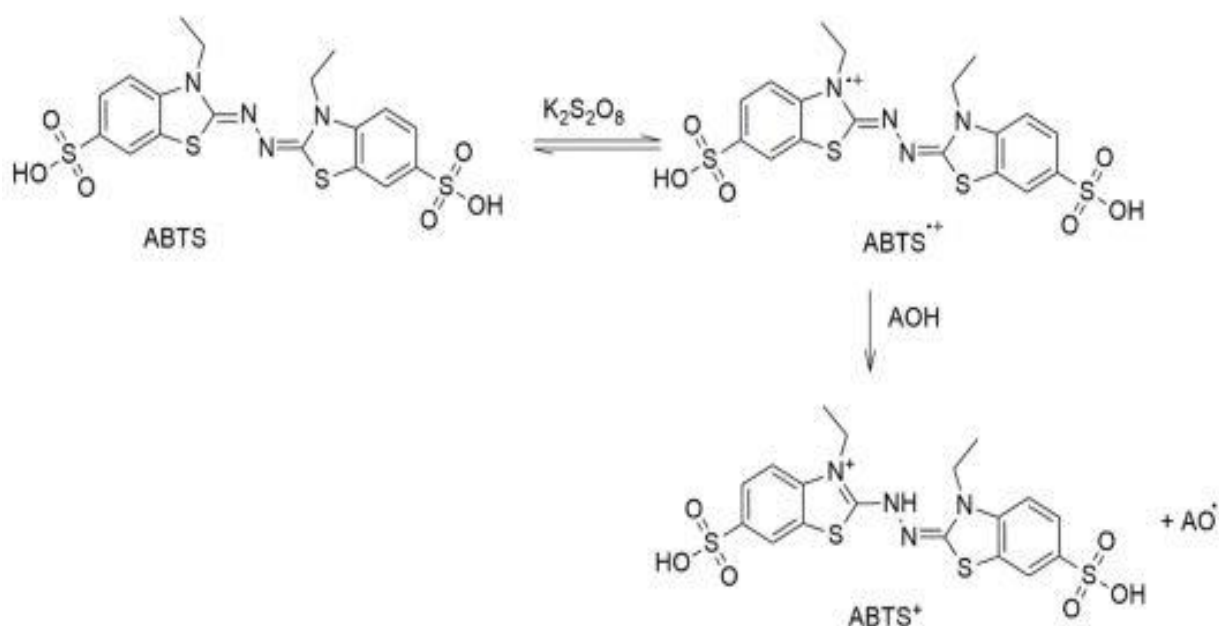


Slika 14. Mehanizam reakcije neutralizacije DPPH• radikala (212)

Radni rastvor, koji je zbog nestabilnosti pripremljen neposredno pre upotrebe, sadržao je etanolni rastvor DPPH ($1,86 \times 10^{-4}$ mol/L) i 0,1 M acetatni pufer (pH = 4,3), u odnosu 2:1 (v/v). U bazenčice mikrotitracione ploče dodato je po 7 μ L razblaženih vodenometanolnih i vodenoeetalnih ekstrakata plodova godži i sporednih proizvoda prerade plodova godži i 193 μ L radnog rastvora DPPH. Nakon inkubacije od 30 minuta, na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svetlosti, izvršeno je merenje apsorbancija na talasnoj dužini od 490 nm, u odnosu na slepu probu, korišćenjem čitača mikrotitracionih ploča (*ELk800 Absorbance Microplate Reader*, BIOTEK, Santa Klara, Kalifornija, SAD). Step en inhibicije obezbojavanja DPPH radikala izračunat je na osnovu standardne krive, konstruisane korišćenjem 2 mM Troloksa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2 karboksilna kiselina) u etanolu, u opsegu koncentracija 0,2-0,7 mmol/L. Rezultati su izraženi kao μ mol troloks ekvivalenta (engl. *Trolox Equivalent*, TE) na 100 g svežih ili 100 g suve materije plodova godži, kao i na 100 g sporednih proizvoda prerade plodova godži.

3.6.1.2. Određivanje sposobnosti neutralizacije ABTS^{•+} radikala

Procena neutralizacije ABTS^{•+} radikala koja se zasniva na reakciji obezbojavanja plavo obojenog ABTS^{•+} radikala (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonska kiselina) sa antioksidativnim jedinjenjima (**Slika 15**), određena je prema metodi koji su opisali *Re i saradnici* (213).

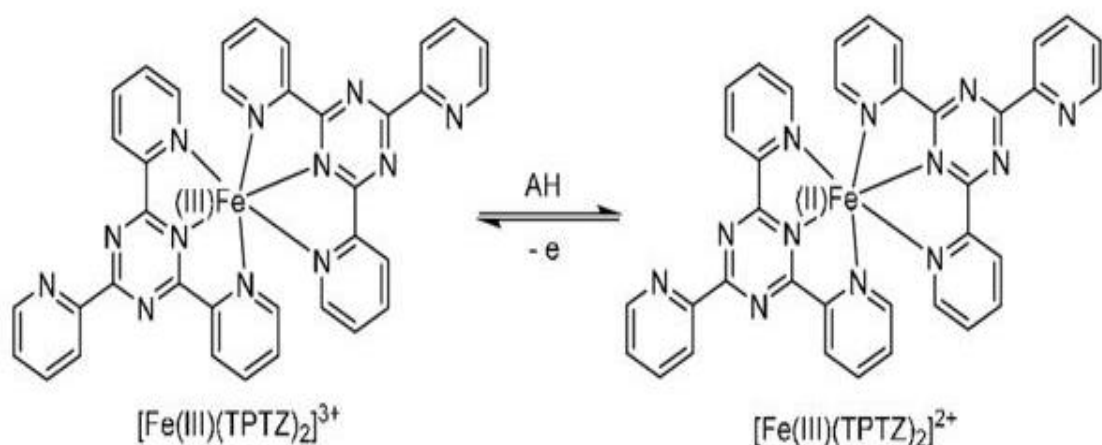


Slika 15. Mehanizam reakcije neutralizacije ABTS^{•+} radikala (214)

Osnovni ABTS^{•+} rastvor pripremljen je mešanjem jednakih zapremina fosfatnog rastvora ABTS (14 mM) i kalijum-peroksodisulfata (4,9 mM). Dobijeni plavo-zeleni rastvor inkubiran je 12-16 sati na tamnom mestu. Radni rastvor ABTS je pripremljen razblaženjem osnovnog rastvora 5 mM fosfatnim puferom (pH = 7,4), u odnosu 1:80 v/v, pri čemu je apsorbancija dobijenog rastvora na 734 nm bila u opsegu $0,7 \pm 0,02$. U bazenčiće mikrotitracione ploče je dodato po 20 μ L razblaženih vodenometanolnih i vodenoehtanolnih analiziranih ekstrakata plodova i sporednih proizvoda prerade plodova godži i 280 μ L radnog rastvora ABTS. Nakon inkubacije od 5 minuta, na temperaturi od 30°C, izvršeno je merenje apsorbancije na talasnoj dužini od 630 nm (*ELk800 Absorbance Microplate Reader, BIOTEK, Santa Klara, Kalifornija, SAD*), u odnosu na slepu probu. Kalibraciona kriva konstruisana je na osnovu apsorbancija Troloks rastvora u etanolu, u opsegu koncentracija od 0,2-1,5 mmol/L. Rezultati su izraženi kao mmol TE na 100 g svežih plodova ili sporednih proizvoda prerade plodova godži i kao μ mol TE na 100 g suve materije plodova LB.

3.6.1.3. Određivanje sposobnosti redukcije jona gvožđa (FRAP metoda)

Sposobnost redukcije Fe³⁺ jona izvršena je metodom koju su opisali *Benzie & Strain*, uz određene modifikacije (215). Ova metoda se zasniva na redukciji kompleksa [Fe-(III)-(TPTZ)₂]⁺³ do intenzivno plavo obojenog kompleksa [Fe(II)-(TPTZ)₂]⁺² (**Slika 16**).

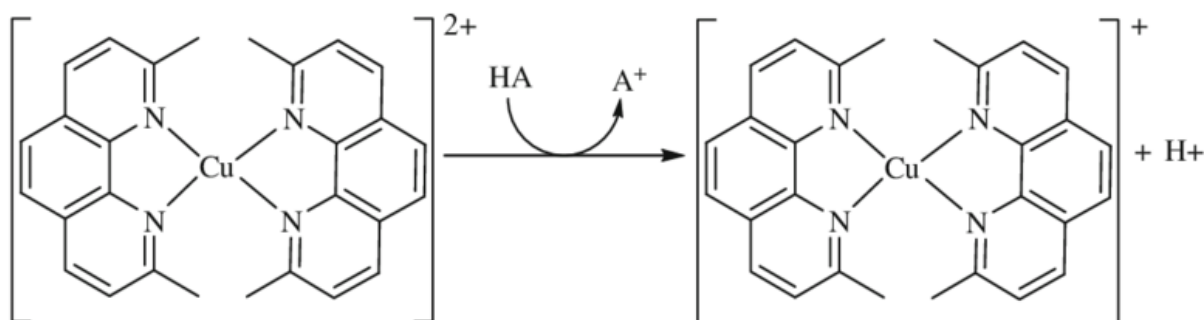


Slika 16. Sposobnost redukcije Fe^{3+} jona (216)

Radni FRAP rastvor pripremljen je mešanjem 300 mM acetatnog pufera ($\text{pH} = 3,6$), 10 mM TPTZ rastvora (2,4,6-tripiridil-s-triazin) u 40 mM HCl i 20 mM $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ u odnosu 10:1:1 (v/v/v). U bazenčice mikrotitracione ploče je dodato po 20 μL razblaženih vodenometanolnih i vodenometanolnih ekstrakata plodova i sporednih proizvoda prerade plodova godži i 280 μL radnog rastvora FRAP. Nakon inkubacije od 40 minuta, na temperaturi od 37°C , izvršeno je merenje apsorbancije na talasnoj dužini od 630 nm (*ELk800 Absorbance Microplate Reader, BIOTEK, Santa Klara, Kalifornija, SAD*), u odnosu na slepu probu. Kalibraciona kriva je konstruisana na osnovu vrednosti apsorbancija različitih koncentracija Troloksa (0,1-0,8 mmol/L) u etanolu, a rezultati su izraženi kao $\mu\text{mol TE}$ na 100 g svežih plodova godži ili 100 g suve materije plodova godži i kao mmol TE na 100 g sporednih proizvoda prerade plodova godži.

3.6.1.4. Određivanje sposobnosti redukcije jona bakra (CUPRAC metoda)

Metoda se zasniva na sposobnosti antioksidanasa da redukuju Cu^{+2} do Cu^+ , i određena je metodom koju su opisali *Apak i saradnici* (217). Joni bakra (Cu^{+2}) formiraju bezbojni helatni kompleks sa neokuproinom (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), Cu(II)-Nc (bis-(neokuproin)-bakar(II)). U prisustvu redukcionih sredstava, Cu(II)-Nc prelazi u narandžasto obojen kompleks Cu(I)-Nc , koji ima maksimum apsorbancije na 450 nm (**Slika 17**).

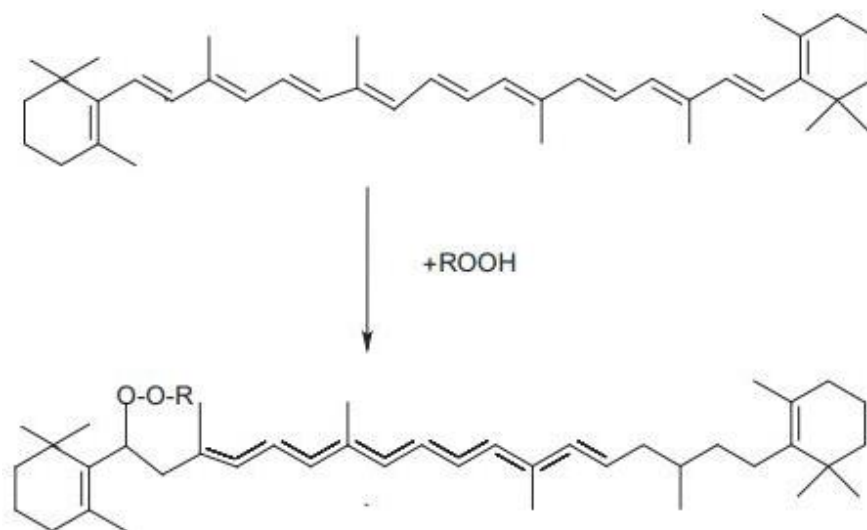


Slika 17. Sposobnost redukcije Cu^{2+} jona (218)

U bazečice mikrotitracione ploče dodato je po 67 μL razblaženih vodenometanolnih i vodenometanolnih ekstrakata plodova i sporednih proizvoda prerade plodova godži, 61 μL rastvora CuCl_2 (0,01 M), 61 μL 1 M amonijum-acetata ($\text{pH} = 7$) i 61 μL rastvora neokuproina. Nakon inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi, izvršeno je merenje apsorbancije na talasnoj dužini od 450 nm (*ELk800 Apsorbance Microplate Reader*, BIOTEK, Santa Klara, Kalifornija, SAD), u odnosu na slepu probu. Kalibraciona kriva je konstruisana na osnovu apsorbancije rastvora Troloksa u etanolu, u opsegu koncentracija 0,1–0,8 mmol/L. Rezultati su izraženi kao $\mu\text{mol TE}$ na 100 g svežih plodova ili 100 g suve materije plodova godži i kao mmol TE na 100 g sporednih proizvoda prerade plodova godži.

3.6.1.5. Određivanje inhibicije obezbojavanja β -karotena

Metoda se zasniva na praćenju smanjenja intenziteta narandžasto-žute boje β -karotena, usled njegove oksidacije izazvane peroksil-radikalom, nastalim oksidacijom linolne kiseline i odrađena je prema prethodno opisanoj metodi (219). Dodatak ekstrakta koji sadrži antioksidanse usporava proces obezbojavanja β -karotena (**Slika 18**).



Slika 18. Mehanizam reakcije inhibicije obezbojavanja β -karotena (220)

Radni rastvor pripremljen je rastvaranjem 4 mg β -karotena u 1 mL hloroforma. Nakon uparavanja hloroforma, uz pomoć vakuum uparivača (*Buchi Rotavapor R-100*, Flavil, Švajcarska) na temperaturi od 40 $^{\circ}\text{C}$, dodato je 360 mg Tween 20, 50 μL linolne kiseline i 25 mL destilovane vode. Slepna proba je pripremljena na identičan način, ali bez dodatka β -karotena. U bazečice mikrotitracione ploče je dodato po 25 μL razblaženih metanolnih ekstrakata plodova godži i 200 μL radnog rastvora. Merenje apsorbancije je vršeno u nultom minutu (A_0) i nakon 120 minuta (A_{120}), na talasnoj dužini od 450 nm (*ELk800 Apsorbance Microplate Reader*, BIOTEK, Santa Klara, Kalifornija, SAD).

Procenat inhibicije obezbojavanja β -karotena ($IO\beta K$) izračunat je korišćenjem sledeće formule:

$$\% Inhibicije = \frac{A_{120}}{A_0} \times 100 \quad (21)$$

- A_{120} – apsorbancija izmerena u 120 minutu
- A_0 – apsorbancija izmerena u 0 minutu

3.6.1.6. Izračunavanje antioksidativnog kompozitnog indeksa (ACI)

U cilju sveobuhvatne procene antioksidativne aktivnosti vodenometanolnih i vodenoetanolnih ekstrakata plodova i sporednih proizvoda prerade plodova godži, kao i njihove komparativne analize, izračunate su vrednosti antioksidativnog kompozitnog indeksa (engl. *Antioxidant Composite Index*, ACI). Na osnovu dobijenih vrednosti za testove DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC i $IO\beta K$ izračunati su odgovarajući indeksi, gde je vrednost 100 dodeljena najvišem rezultatu u svakom pojedinačnom testu. Srednja vrednost dobijenih indeksa predstavlja antioksidativni kompozitni indeks i izražava se u %.

$$ACI (\%) = \frac{\text{rezultat za uzorak}}{\text{najbolji rezultat}} \times 100 \quad (22)$$

3.6.2. Antienzimski aktivnost

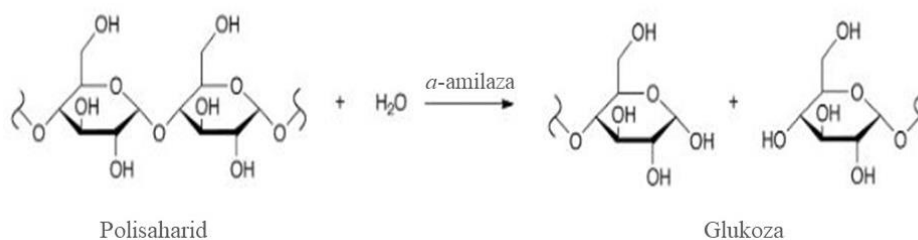
Suvi vodenometanolni i vodenometanolni ekstrakti uzoraka plodova i sporednih proizvoda prerade plodova godži su rastvoreni u odgovarajućem puferu, a inhibitorna aktivnost je određivana *in vitro* na enzime: α -amilazu, α -glukozidazu, tirozinazu i acetilholinesterazu. Antiinflamatorna aktivnost uzorka suvog vodenometanolog ekstrakta plodova LR ispitana je na enzim 15-LOX. Rezultati su izraženi kao IC_{50} vrednosti, koje su izračunate pomoću sledeće jednačine:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{(Ak - Au)}{Ak} \times 100 \quad (23)$$

- Ak – apsorbancija kontrole
- Au – apsorbancije analiziranih uzoraka pri različitim koncentracijama

3.6.2.1. Određivanje inhibicije α -amilaze

Pod uticajem enzima α -amilaze (α -Amy), dolazi do razgradnje skroba, složenog ugljenog hidrata, do redukujućih disaharida, odnosno maltoze, kao i monosaharida glukoze. Dodavanjem reagensa za razvijanje boje nastaje žuto-narandžasto obojenje čiji se intenzitet određuje spektrofotometrijski. Intenzitet apsorbancije direktno je srazmerna aktivnosti enzima, odnosno količini redukujućih šećera (**Slika 19**).

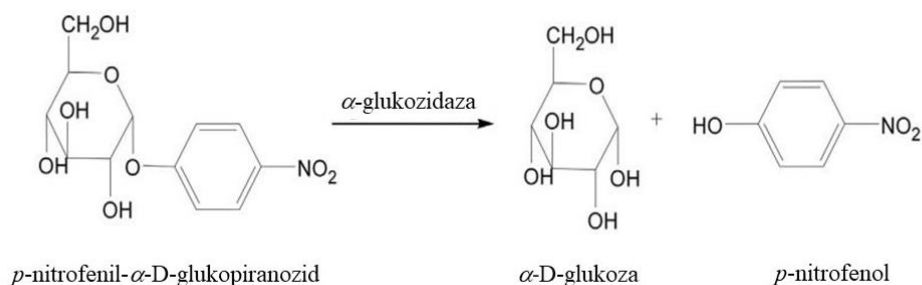


Slika 19. Reakcija hidrolize polisaharida pod dejstvom enzima α -amilaze (221)

Ispitivanje inhibitornog potencijala različitih koncentracija vodenometanolnih i vodenometanolnih ekstrakata plodova i sporednih proizvoda plodova godži na enzim α -Amy izvršeno je korišćenjem prethodno opisane metode (221), uz određene modifikacije. Analizirani ekstrakti su razblaženi u fosfatnom puferu ($pH = 6,9$) i pomešani sa rastvorom enzima α -Amy (tip VI-B, ≥ 10 jedinica/mg čvrste supstance). Rastvori su inkubirani u staklenim epruvetama na $37^\circ C$ tokom 15 minuta. Zatim je dodat rastvor skroba (1,0 %) i inkubacija je nastavljena dodatnih 10 minuta. Nakon dodatka reagensa za bojenje, 3,5-dinitro salicilne kiseline, inkubacija je nastavljena 15 minuta na $100^\circ C$. Apsorbancije su merene na 540 nm (*UniSPEC 2*, *LLG Labvare*, Turnov, Češka Republika). Akarboza je korišćena kao pozitivna kontrola.

3.6.2.2. Određivanje inhibicije α -glukozidaze

Enzim α -glukozidaza (α -Gls) katalizuje reakciju konverzije supstrata, *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranozida do D-glukoze i žuto obojenog *p*-nitrofenola (**Slika 20**).

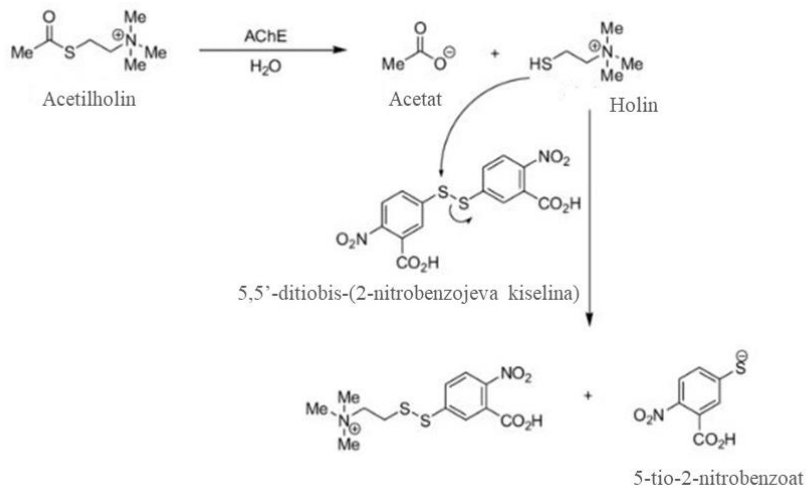


Slika 20. Reakcija delovanja enzima α -glukozidaze (222)

Ispitivanje inhibitorne aktivnosti različitih koncentracija vodenometanolnih i vodenometanolnih ekstrakata plodova i sporednih proizvoda plodova godži na enzim α -Gls izvršeno je korišćenjem prethodno opisane metode (223), uz određene modifikacije. U analizirane uzorke razblažene u fosfatnom puferu (pH = 5,0), dodat je rastvor supstrata *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranozida u fosfatnom puferu (pH = 5,0). Nakon inkubacije u staklenim epruvetama na 37°C tokom 10 minuta, dodat je rastvor enzima α -Gls u fosfatnom puferu (tip I, ≥ 10 jedinica/mg čvrste supstance) i inkubacija je nastavljena 30 minuta. Reakcija je prekinuta dodavanjem 0,2 M rastvora Na_2CO_3 (pH = 10), a apsorbancije dobijenih rastvora su izmerene na talasnoj dužini od 405 nm (*UniSPEC 2, LLG Labvare, Turnov, Češka Republika*). Akarboza je korišćena kao pozitivna kontrola.

3.6.2.3. Određivanje inhibicije acetilholinesteraze

Metoda se zasniva na hidrolizi acetilholin-jodida pod dejstvom enzima acetilholinesteraze (AChE) do acetata i holina. Oslobođeni holin reaguje sa 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojevom kiselinom) pri čemu nastaje žuto obojeni 5-tio-2-nitrobenzoat (**Slika 21**).

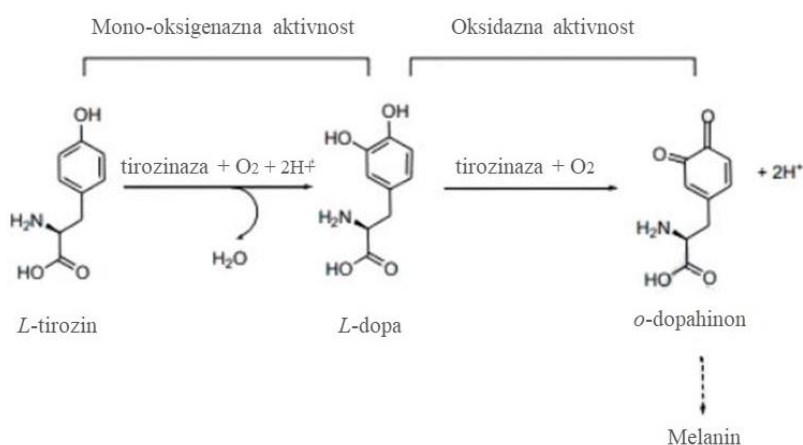


Slika 21. Reakcija hidrolize acetilholina katalizovana enzimom acetilholinesterazom (224)

Ispitivanje inhibitorne aktivnosti različitih koncentracija analiziranih vodenometanolnih i vodenometanolnih ekstrakata plodova i sporednih proizvoda plodova godži na enzim AChE izvršeno je korišćenjem modifikovane metode koju su prethodno opisali *Ellman i saradnici* (225). Serijska razblaženja analiziranih uzoraka i rastvor enzima AChE (tip VI-S, ≥ 222 jedinice/mg čvrste supstance) u Tris-HCl puferu (pH = 8,0) su inkubirani u staklenim epruvetama na 37°C tokom 15 minuta. Nakon dodatka supstrata (acetilholin jodid) i hromogena (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina), smeša je inkubirana ponovo 30 minuta na 37°C. Apsorbancije su izmerene na talasnoj dužini od 412 nm (*UniSPEC 2, LLG Labvare, Turnov, Češka Republika*). Galantamin je korišćen kao pozitivna kontrola.

3.6.2.4. Određivanje inhibicije tirozinaze

Enzim tirozinaza (TIA) katalizuje oksidaciju *L*-tirozina do *L*-dihidroksifenilalanina (DOPA), a zatim do *o*-dopahinona, koji je blago ružičaste boje (**Slika 22**).

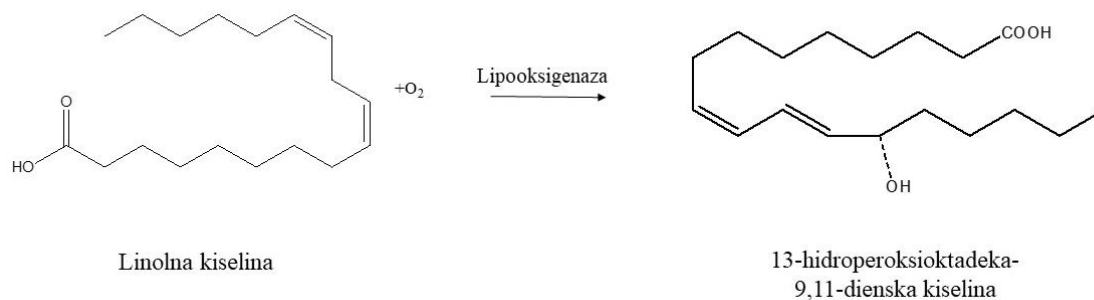


Slika 22. Reakcija oksidacije *L*-tirozina do *o*-dopahinona pod dejstvom enzima tirozinaze (226)

Ispitivanje inhibitorne aktivnosti različitih koncentracija analiziranih vodenometanolnih i vodenometanolnih ekstrakata plodova godži i njihovih sporednih produkata na enzim tirozinazu određeno je korišćenjem modifikovane metode koju su prethodno opisali *No i saradnici* (227). Serija razblaženja analiziranih uzoraka i rastvor enzima tirozinaze (≥ 1000 jedinica/mg čvrste supstance) u fosfatnom puferu (pH = 6,6) su pomešani i inkubirani u mikrotitracionoj ploči na 30°C, tokom 10 minuta. Zatim je dodat rastvor supstrata (*L*-tirozin) u fosfatnom puferu (pH = 6,6) i inkubacija je vršena dodatnih 30 minuta. Apsorbancije rastvora su izmerene na 490 nm (*ELk800 Apsorbance Microplate Reader, BIOTEK, Santa Klara, Kalifornija, SAD*). Kao pozitivna kontrola korišćena je kojična kiselina.

3.6.2.5. Inhibicija enzima 15-lipooksigenaze

Enzim lipooksigenaza katalizuje oksidaciju linolne kiseline do hidroperoksioktadeka-9,11-dienske kiseline (**Slika 23**) (228).



Slika 23. Reakcija oksidacije linolne kiseline pod dejstvom enzima lipooksigenaze (228)

Ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti vodenometanolnih ekstrakata plodova LR na enzim 15-LOX iz soje, izvršeno je korišćenjem komercijalnog kompleta *Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay* (CAY-760700-96, *Cayman Chemical*, SAD). Različita razblaženja uzoraka, pripremljenih u 0,1 M Tris-HCl puferu (pH = 7,4) pomešana su sa rastvorom enzima. Nakon dodavanja supstrata (linolna kiselina) i hromogena, apsorbancije su izmerene na 490 nm (*ELk800 Absorbance Microplate Reader*, *BIOTEK*, Santa Klara, Kalifornija, SAD).

3.6.3. Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost suvih vodenometanolnih ekstrakata plodova godži testirana je na osam laboratorijskih kontrolnih sojeva mikroorganizama (KWIK-STIK™, Microbiologics, Saint Cloud, MN, USA): tri Gram-pozitivne bakterije: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) i *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); četiri Gram-negativne bakterije: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (NCIMB 8267), *Salmonella enterica* (NCTC 6017) i *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), i gljivicu *Candida albicans* (ATCC 24433). Minimalne inhibitorne koncentracije (engl. *minimum inhibitory concentration*, MIC) ekstrakata određene su testom mikrodilucije u skladu sa smernicama Evropskog komiteta za ispitivanje osetljivosti na antimikrobne lekove (229).

Mikroorganizmi su pripremljeni u fiziološkom rastvoru prema *McFarland* standardu (0,5) (Bio-Merieux, Marcy l'Etoile, Francuska), dok su analizirani ekstrakti rastvoreni u DMSO i zatim razblaženi u opsegu od 125–2000 mg/mL u *Mueller-Hinton* bujonu za bakterije (MHB, Lab M Limited, Bury, UK) i *Sabouraud*-dekstroznom bujonu za *C. albicans* (SDB, Lab M Limited, Bury, UK). Mikrotitracione ploče sa duplikatima razblaženja ekstrakata su inokulisane sa 5×10^5 CFU/mL mikroorganizama i inkubirane na 35 ± 1 °C u trajanju od 24 sata.

Detekcija MIC vrednosti izvršena je dodavanjem rezazurina (7-hidroksi-3H-fenoksazin-3-on 10-oksidi), redoks indikatora koji menja boju iz plave u ružičastu kada su prisutni živi mikroorganizmi (*Sigma-Aldrich-Merck KGaA*, Darmštadt, Nemačka). Rezultati su predstavljeni kao MIC, odnosno najniža koncentracija ekstrakta koja inhibira rast mikroorganizama. U istraživanje su uključene pozitivne i negativne kontrole za dodatnu pouzdanost eksperimenata.

3.6.4. Prebiotska aktivnost

Potencijalna prebiotska aktivnost suvih vodenometanolnih ekstrakata plodova LR ispitivana je na četiri probiotska soja Gram-pozitivnih bakterija: *Lactobacillus plantarum* Lp 299v, *Limosilactobacillus reuteri* Protectis (DSM 17938), *Lactobacillus rhamnosus* GG i *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ST-21; dva soja gljivica *Saccharomyces boulardii*, i dve mešavine probiotskih sojeva laktobacila/bifidobakterija: *Lactobacillus helveticus*, *L. rhamnosus* i *Bifidobacterium longum* (MIX1) i njihove kombinacije sa *Saccharomyces boulardii* (MIX2). Kulture probiotskih sojeva uzgajanih na odgovarajućim medijumima (*Sabouraud Dektrose* agar za *S. boulardii* i agar za laktobacile) suspendovane su u fiziološkom rastvoru prema *McFarland* standardu (0,5) i potom razblažene do inokuluma od 5×10^5 CFU/mL. Vodenometanolni ekstrakti plodova LR rastvoreni su u DMSO i razblaženi u opsegu od 0,312 do 5 mg/mL. Razblaženi uzorci su dodati u triplicatu u bazenčiće mikrotitracione ploče i inokulisani sa 5×10^5 CFU/mL mikroorganizama, uporedo sa pozitivnim i negativnim kontrolama.

Mikrotitracione ploče inkubirane su između 20 i 48 h na 35°C u aerobnim ili mikroaerofilnim uslovima, a optička gustina je merena na 600 nm za bakterije i 530 nm za gljivice pomoću ELISA čitača mikrotitracionih ploča (*Multiskan™ FC Microplate Photometer*, *Thermo Fisher Scientific*, SAD). Rezultati su izraženi kao procenat stimulacije rasta u prisustvu ekstrakata, u poređenju sa kontrolnim grupama (100 %), koristeći sledeću jednačinu:

$$\% \text{ prebiotskog efekta} = \frac{OD \text{ uzorak}}{OD \text{ pozitivna kontrola}} \times 100 \quad (24)$$

3.7. OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE

3.7.1. Ekstrakcija

Liofilizovani i usitnjeni plodovi godži ili sporedni proizvodi njihove prerade (0,5 g) ekstrahovani su odgovarajućom količinom rastvarača (5–40 mL) u termostatisanom vodenom kupatilu (*Grant, model LSB 18, UK*) koristeći PB za fazu skrininga i BBD za fazu optimizacije.

3.7.2. Skrining parametara ekstrakcije

Ekstrakcija liofilizovanih plodova godži i sporednih proizvoda njihove prerade izvršena je upotrebom etanola u koncentracijama od 50 % i 96 % (v/v), na temperaturama od 25 °C ili 60 °C tokom 30 ili 180 minuta. Odnos droge i rastvarača je bio 1:10 ili 1:80 (m/v). Tokom ekstrakcije, deo uzoraka je mešan, dok su drugi bili podvrgnuti tretmanu ultrazvukom snage 40 kHz. Dodatno, neki uzorci su pre procesa ekstrakcije podvrgnuti postupku maceracije na sobnoj temperaturi, u trajanju od 30 minuta. Nakon završetka ekstrakcije, svi uzorci su filtrirani kroz filter papir.

Postupci ekstrakcije za plodove godži i sporedne proizvode njihove prerade realizovani su koristeći PB, prema matrici prikazanoj u **Tabeli 4**. Ispitan je uticaj sedam nezavisnih varijabli, koje uključuju temperaturu, vreme, odnos između droge i rastvarača, tretman ultrazvukom, koncentraciju etanola, mešanje i prethodnu maceraciju ili veličinu čestica.

Tabela 4. PB matrica prema kojoj su izvedeni eksperimenti za plodove LB i pulpu (X_1 – temperatura, X_2 – vreme, X_3 – odnos između droge i rastvarača, X_4 – tretman ultrazvukom, X_5 – koncentracija etanola, X_6 – mešanje, X_7 – prethodna maceracija) i pogaču (X_1 – temperatura, X_2 – vreme, X_3 – odnos između droge i rastvarača, X_4 – koncentracija etanola, X_5 – tretman ultrazvukom, X_6 – veličina čestica, X_7 – mešanje)

X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7
-1	-1	-1	1	-1	1	1
1	-1	-1	-1	1	-1	1
1	1	-1	-1	-1	1	-1
-1	1	1	-1	-1	-1	1
1	-1	1	1	-1	-1	-1
-1	1	-1	1	1	-1	-1
-1	-1	1	-1	1	1	-1
1	1	1	1	1	1	1

U **Tabeli 5** prikazane su realne i kodirane vrednosti ispitivanih faktora za plodove LB i pulpu, dok su vrednosti za pogaču prikazane u **Tabeli 6**. Kao zavisne varijable određeni su sadržaji ukupnih polifenola (TPC) i ukupnih flavonoida (TFC) i procenjena je *in vitro* antioksidativna aktivnost, upotrebom pet različitih testova, na osnovu kojih je izračunat antioksidativni kompozitni indeks (ACI).

Tabela 5. Nezavisne varijable u okviru PB dizajna za plodove LB i pulpu

Nezavisne varijable	Jedinica	Simbol	Kodirane vrednosti	
			-1	+1
Temperatura	°C	X ₁	25	60
Vreme	min	X ₂	30	180
Odnos droga/rastvarač	<i>m/v</i>	X ₃	1:10	1:80
Tretman ultrazvukom	kHz	X ₄	0	40
Koncentracija etanola	% (v/v)	X ₅	50	96
Mešanje	rpm	X ₆	0	200
Prethodna maceracija	min	X ₇	bez	sa

Tabela 6. Nezavisne varijable u okviru PB dizajna za pogaču

Nezavisne varijable	Jedinica	Simbol	Kodirane vrednosti	
			-1	+1
Temperatura	°C	X ₁	25	60
Vreme	min	X ₂	30	180
Odnos droga/rastvarač	<i>m/v</i>	X ₃	1:10	1:80
Koncentracija etanola	% (v/v)	X ₄	50	96
Tretman ultrazvukom	kHz	X ₅	0	40
Veličina čestica	mm	X ₆	<0,75	>0,75
Mešanje	rpm	X ₇	0	200

3.7.3. Optimizacija ekstrakcije

Efekti nezavisnih varijabli analizirani su prema sledećem linearnom modelu:

$$y = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 \dots + A_nX_n \quad (25)$$

- *y* – zavisna varijabla
- *A*₀ – konstanta
- *A*₁ do *A*_n – koeficijenti linearne regresije
- *X*₁, *X*₂, *X*₃...*X*_n – ispitivani faktori

Dalji eksperimenti za plodove LB i pulpu su sprovedeni prema centralnom kompozitnom dizajnu. Nakon faze skrininga, tri nezavisne varijable (A – koncentracija etanola, B – odnos između droge i rastvarača i C – vreme) odabrane su za dalju analizu i varirane na tri nivoa, čime je omogućena analiza interakcija i kvadratnih efekata. Ekstrakcija je izvedena upotrebom različitih koncentracija etanola (40–80 %, v/v) u trajanju od 30 do 90 minuta, pri čemu je odnos između droge i rastvarača variran između 1:20 i 1:60, m/v. Prethodna maceracija u trajanju od 30 minuta, temperatura od 40°C i mešanje održavani su konstantno. Mereni odgovori bili su isti kao u prethodnoj fazi skrininga. Dizajn je obuhvatao 15 eksperimenata nasumično postavljenih sa tri ponavljanja u centralnoj tački, koji su predstavljeni u **Tabeli 7**.

Tabela 7. Uslovi eksperimenata u fazi optimizacije za plodove LB i pulpu

<i>N</i> ^o	A	B	C
1	40 (-1)	20 (-1)	60 (0)
2	80 (1)	20 (-1)	60 (0)
3	40 (-1)	60 (1)	60 (0)
4	80 (1)	60 (1)	60 (0)
5	40 (-1)	40 (0)	30 (-1)
6	80 (1)	40 (0)	30 (-1)
7	40 (-1)	40 (0)	90 (1)
8	80 (1)	40 (0)	90 (1)
9	60 (0)	20 (-1)	30 (-1)
10	60 (0)	60 (1)	30 (-1)
11	60 (0)	20 (-1)	90 (1)
12	60 (0)	60 (1)	90 (1)
13	60 (0)	40 (0)	60 (0)
14	60 (0)	40 (0)	60 (0)
15	60 (0)	40 (0)	60 (0)

A–koncentracija etanola (%); B–odnos droga/rastvarač (m/v); C–vreme trajanja (min)

Dalji eksperimenti za pogaču sprovedeni su prema centralnom kompozitnom dizajnu. Četiri nezavisne varijable (A – koncentracija etanola, B – temperatura, C – vreme i D – odnos između droge i rastvarača) odabrane nakon faze skrininga, varirane su na tri nivoa, čime je omogućena analiza interakcija i kvadratnih efekata. Ekstrakcija je izvedena upotrebom etanola različitih koncentracija (40–80 %, v/v) u trajanju od 30 do 180 minuta, na temperaturama između 25 i 60°C, pri čemu je odnos između droge i rastvarača variran od 1:50 do 1:80 (m/v). Mereni su isti odgovori kao u prethodnoj fazi skrininga. Dizajn je obuhvatao 27 nasumičnih eksperimenata, uz tri ponavljanja u centralnoj tački, koji su predstavljeni u **Tabeli 8**.

Tabela 8. Uslovi eksperimenata u fazi optimizacije za pogaču

N°	A	B	C	D
1	40 (-1)	25 (-1)	105 (0)	65 (0)
2	80 (1)	25 (-1)	105 (0)	65 (0)
3	40 (-1)	60 (1)	105 (0)	65 (0)
4	80 (1)	60 (1)	105 (0)	65 (0)
5	60 (0)	42,5 (0)	30 (-1)	50 (-1)
6	60 (0)	42,5 (0)	180 (1)	50 (-1)
7	60 (0)	42,5 (0)	30 (-1)	80 (1)
8	60 (0)	42,5 (0)	180 (1)	80 (1)
9	40 (-1)	42,5 (0)	105 (0)	50 (-1)
10	80 (1)	42,5 (0)	105 (0)	50 (-1)
11	40 (-1)	42,5 (0)	105 (0)	80 (1)
12	80 (1)	42,5 (0)	105 (0)	80 (1)
13	60 (0)	25 (-1)	30 (-1)	65 (0)
14	60 (0)	60 (1)	30 (-1)	65 (0)
15	60 (0)	25 (-1)	180 (1)	65 (0)
16	60 (0)	60 (1)	180 (1)	65 (0)
17	40 (-1)	42,5 (0)	30 (-1)	65 (0)
18	80 (1)	42,5 (0)	30 (-1)	65 (0)
19	40 (-1)	42,5 (0)	180 (1)	65 (0)
20	80 (1)	42,5 (0)	180 (1)	65 (0)
21	60 (0)	25 (-1)	105 (0)	50 (-1)
22	60 (0)	60 (1)	105 (0)	50 (-1)
23	60 (0)	25 (-1)	105 (0)	80 (1)
24	60 (0)	60 (1)	105 (0)	80 (1)
25	60 (0)	42,5 (0)	105 (0)	65 (0)
26	60 (0)	42,5 (0)	105 (0)	65 (0)
27	60 (0)	42,5 (0)	105 (0)	65 (0)
28	60 (0)	42,5 (0)	105 (0)	65 (0)
29	60 (0)	42,5 (0)	105 (0)	65 (0)

A–koncentracija etanola (%); B–temperatura (°C); C–vreme trajanja (min); D–odnos droga/rastvarač (m/v)

Dobijeni rezultati analizirani su korišćenjem metodologije površine odgovora (RSM). Kvadratni polinomski modeli koji opisuju uticaj nezavisnih varijabli na zavisne varijable, izraženi su sledećom jednačinom:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j}^K \beta_{ij} X_i X_j \quad (26)$$

- Y – zavisna varijabla
- β_0 – konstanta modela
- β_i – koeficijent za linearni efekat nezavisne varijable X_i
- β_{ii} – koeficijent za kvadratni efekat nezavisne varijable X_i
- β_{ij} – koeficijent za interakciju između varijabli X_i i X_j
- X_i i X_j – nezavisne varijable

3.7.4. Statistička analiza rezultata optimizacije

Koeficijenti u kvadratnom polinomnom modelu izračunati su višestrukom linearnom regresijom, a finalne jednačine izvedene su korišćenjem softvera *Design-Expert* 8.06 (probna verzija, State-Ease Inc., Minneapolis, MN, SAD). Kvalitet modela procenjen je koeficijentom determinacije (R^2), dok je statistička značajnost potvrđena F-testom. Značaj pojedinačnih nezavisnih promenljivih i njihovih međusobnih interakcija analiziran je primenom analize varijanse (ANOVA) sa nivoom značajnosti $p < 0,05$. Najpouzdaniji model ima najviši koeficijent determinacije (R^2), koji pokazuje koliki deo varijabilnosti odgovora može biti objašnjen varijacijama faktora. Model se smatra validnim ako je $p < 0,05$, dok vrednost za *Lack of Fit* sa $p > 0,05$ ukazuje na eksperimentalne greške, a ne na neadekvatnost modela. Validacija modela izvedena je kroz pet ponavljanja.

3.8. STATISTIČKA ANALIZA

Sve analitičke procedure izvedene su u triplikatu, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija. Za analizu razlika između plodova godži različitih biljnih vrsta, kao i između uzoraka plodova LB sa različitih lokaliteta, primenjena je jednofaktorska ANOVA. *Tuckey's* post hoc test korišćen je za određivanje statistički značajnih razlika između srednjih vrednosti ($p < 0,05$). Za procenu razlika u sporednim proizvodima prerade plodova godži primenjen je Studentov t-test. Statističke analize izvedene su upotrebom softverskog paketa SPSS verzije 26.0 (SPSS, Inc., Čikago, IL, SAD).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Prva faza istraživanja

U okviru prve faze ispitivanja izvršena je analiza hemijskog sastava i nutritivnih karakteristika svežih plodova LB, LBa i LR sa plantaže u Nišu, kao i liofilizovanih plodova LB sa različitih lokaliteta u Srbiji.

4.1.1. Nutritivni sastav i energetska vrednost plodova LB, LBa i LR

Nutritivni sastav i energetska vrednost svežih plodova LB, LBa i LR prikazani su u **Tabeli 9**.

Tabela 9. Nutritivni sastav i energetska vrednost svežih plodova LB, LBa i LR

	LB	LBa	LR
Nutritivni sastav			
Energetska vrednost (kJ/100 g fw)	394 ± 6 ^a	353 ± 11 ^b	246 ± 6 ^c
Vlaga (%)	75,3 ± 0,34 ^b	77,5 ± 0,73 ^b	84,2 ± 0,36 ^a
Pepeo (%)	0,84 ± 0,07 ^a	0,88 ± 0,09 ^a	0,63 ± 0,05 ^a
Ukupne masti (%)	1,15 ± 0,08 ^a	0,83 ± 0,06 ^b	0,71 ± 0,03 ^b
Ukupni proteini (%)	1,98 ± 0,06 ^a	2,24 ± 0,30 ^a	1,68 ± 0,01 ^a
Dostupni ugljeni-hidrati (%)	16,9 ± 0,15 ^a	15,1 ± 0,80 ^b	9,91 ± 0,29 ^c
UDV ¹ (%)	3,63 ± 0,25 ^a	3,34 ± 0,17 ^a	2,76 ± 0,21 ^b
NDV ² (%)	2,73 ± 0,16 ^a	2,68 ± 0,10 ^a	2,17 ± 0,15 ^b
RDV ³ (%)	0,90 ± 0,09 ^a	0,66 ± 0,07 ^b	0,59 ± 0,08 ^b

LB–*L. barbarum* L.; LBa–*L. barbarum* var. *auranticarpum*; LR–*L. ruthenicum* Murr.; ¹UDV–ukupna dijetna vlakna; ²NDV–nerastvorna dijetna vlakna; ³RDV–rastvorna dijetna vlakna; fw–sveža masa uzorka; različita slova u istom redu ukazuju na statističku značajnost prema *Tuckey's* testu ($p < 0,05$)

U svim analiziranim plodovima godži utvrđen je visok sadržaj vlage, pri čemu su plodovi LR sadržali značajno veći sadržaj vlage u poređenju sa ostalim analiziranim uzorcima ($p < 0,05$). Posledično, plodovi LR imaju najnižu energetska vrednost. Energetska vrednost svežih plodova LR je za 38 % niža od plodova LB i oko 30 % od plodova LBa. Međutim, visok sadržaj vode ograničava rok trajanja i čuvanja svežih plodova. Zbog toga se najveće količine svežih plodova godži (oko 90 %) suše ili prerađuju u sok, vino, čaj, prah ili tablete (31,33). U plodovima LB utvrđen je značajno veći sadržaj ukupnih masti u poređenju sa plodovima ostalih vrsta ($p < 0,05$), dok se vrednosti sadržaja proteina i pepela nisu značajno razlikovale među plodovima različitih *Lycium* vrsta ($p > 0,05$), iako je nešto veći sadržaj proteina određen u plodovima LBa. Sadržaj UDV je bio sličan u plodovima LB i LBa i značajno veći od sadržaja koji je određen u plodovima LR. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima prethodnih studija u kojima je utvrđeno da su dijetna vlakna, drugi najzastupljeniji makronutrijent u plodovima godži (48,51). S obzirom da plodovi LB i LBa sadrže više od 3 g dijetnih vlakana na 100 g, ispunjavaju kriterijume za nutritivnu izjavu „izvor vlakana“ (190).

Nutritivni sastav plodova godži, osim od vrste, zavisi i od brojnih drugih faktora. Nutritivni sastav i energetska vrednost liofilizovanih plodova LB sa različitih lokaliteta u Srbiji prikazani su u **Tabeli 10**.

Kao što je i očekivano, analiza uzoraka plodova LB sa različitih lokaliteta ukazala je na značajne razlike u nutritivnom sastavu ($p < 0,05$), koje se mogu objasniti uticajima faktora životne sredine i različitim agrotehničkim praksama, uključujući karakteristike zemljišta, klimatske uslove i tehnike đubrenja (26,230). Za produženje roka trajanja i očuvanje kvaliteta plodova godži nakon berbe mogu se primeniti različite metode (67). U ovom istraživanju izabrana je metoda sušenja zamrzavanjem, odnosno liofilizacija. Na ovaj način se značajno smanjuje sadržaj vlage, čime se utiče na mikrobiološku stabilnost i produžava rok trajanja, bez značajnog uticaja na hemijski sastav plodova godži (102).

Ukupni pepeo je varirao između 3,07 % i 4,05 %. Dobijeni rezultati ukazuju da plodovi LB sa različitih lokaliteta imaju različit sadržaj mineralnih materija, ali i ukupnih lipida. U poređenju sa literaturnim podacima, sadržaj ukupnih lipida u analiziranim uzorcima plodova LB je bio za oko 1,5 puta veći (48). Razlike u sadržajima ukupnih lipida u liofilizovanim plodovima LB utvrđene u različitim studijama se mogu objasniti primenom različitih rastvarača korišćenih za ekstrakciju lipida (29,46). Za razliku od ostalog voća, npr. jagode, kupine, maline, borovnice, brusnica i ribizle, koje se odlikuje niskim sadržajem proteina (231), sadržaj proteina u plodovima LB varirao je između 11,8 % i 17,7 %. Utvrđeni sadržaj proteina čini liofilizovane plodove LB pogodnim za primenu kao nutritivno bogate užine (232).

Sadržaj NDV u plodovima LB bio je od 7,17 % do 12,5 %, dok je sadržaj RDV varirao od 2,71 % do 6,37 %. Na osnovu sadržaja UDV koji je bio u rasponu od 11 % do 18,9 % liofilizovani plodovi LB sa različitih lokaliteta mogu se smatrati hranom „bogatim vlaknima“ (56). Ove nutritivne karakteristike čine plodove LB pogodnim za obogaćivanje namirnica vlaknima, što je od značaja u formulaciji funkcionalnih prehrambenih proizvoda (41). Energetska vrednost liofilizovanih plodova LB je u skladu sa rezultatima dobijenim u drugim istraživanjima (48, 233).

Tabela 10. Nutritivni sastav i energetska vrednost liofilizovanih plodova LB

	SU	SD	PŽ	BG	NI	RU
Nutritivni sastav						
Energetska vrednost (kJ/100 g <i>dw</i>)	357 ± 0,11 ^d	342 ± 1,72 ^a	342 ± 1,33 ^a	351 ± 2,65 ^c	356 ± 2,23 ^d	346 ± 1,03 ^b
Vlaga (%)	10,1 ± 0,07 ^c	11,9 ± 0,12 ^d	10,4 ± 0,07 ^c	7,68 ± 0,29 ^a	8,33 ± 0,26 ^b	7,28 ± 0,47 ^a
Pepeo (%)	4,05 ± 0,14 ^c	3,07 ± 0,08 ^a	3,32 ± 0,15 ^a	3,81 ± 0,19 ^{b,c}	3,30 ± 0,21 ^a	3,65 ± 0,12 ^b
Ukupne masti (%)	8,96 ± 0,11 ^c	4,76 ± 0,39 ^c	5,29 ± 0,57 ^d	5,86 ± 0,12 ^e	4,87 ± 0,07 ^a	5,58 ± 0,25 ^b
Ukupni proteini (%)	14,4 ± 0,13 ^c	14,0 ± 0,47 ^a	15,7 ± 0,05 ^{a,b}	17,7 ± 0,21 ^b	11,8 ± 0,16 ^a	13,5 ± 0,05 ^b
Dostupni ugljeni-hidrati (%)	46,7 ± 0,54 ^a	55,2 ± 0,48 ^d	50,5 ± 1,43 ^{b,c}	49,0 ± 1,47 ^b	60,7 ± 0,27 ^e	51,1 ± 0,11 ^c
UDV ¹	15,8 ± 0,33 ^{b,c}	11,0 ± 0,10 ^a	14,8 ± 0,25 ^b	16,0 ± 0,27 ^c	11,1 ± 0,07 ^a	18,9 ± 0,23 ^d
NDV ²	11,6 ± 0,15 ^c	8,31 ± 0,35 ^b	10,8 ± 0,58 ^c	11,3 ± 0,60 ^c	7,17 ± 0,69 ^a	12,5 ± 0,17 ^d
RDV ³	4,29 ± 0,62 ^b	2,71 ± 0,22 ^a	4,03 ± 0,22 ^b	4,8 ± 0,22 ^b	3,91 ± 0,59 ^b	6,37 ± 0,50 ^c

SU–Subotica; SD–Smederevo; PŽ–Požega; BG–Beograd; NI–Niš; RU–Ruma; ¹UDV–ukupna dijetna vlakna ²NDV–nerastvorna dijetna vlakna; ³RDV–rastvorna dijetna vlakna; *dw*–suva masa uzorka; različita slova u istom redu ukazuju na statističku značajnost prema *Tuckey's* testu ($p < 0,05$)

4.1.2. Masno-kiselinski sastav plodova LB, LBa i LR

Korišćenjem GC-FID metode, identifikovano je prisustvo devet masnih kiselina u lipidnom profilu plodova godži. Relativni sadržaj masnih kiselina (% od ukupnih masnih kiselina), odnos pojedinih klasa masnih kiselina i lipidni indeksi u svežim plodovima LB, LBa i LR su predstavljeni u **Tabeli 11**.

Tabela 11. Sastav masnih kiselina i lipidni indeksi u svežim plodovima LB, LBa i LR

Masne kiseline		Uzorak		
		LB	LBa	LR
C14:0	Miristinska kiselina	0,34 ± 0,02 ^c	0,49 ± 0,03 ^b	0,91 ± 0,02 ^a
C14:1	Miristooleinska kiselina	0,44 ± 0,02 ^b	0,33 ± 0,01 ^c	0,71 ± 0,02 ^a
C16:0	Palmitinska kiselina	17,64 ± 0,07 ^b	11,76 ± 0,08 ^c	20,42 ± 0,04 ^a
C16:1	Palmitooleinska kiselina	0,69 ± 0,04 ^c	0,70 ± 0,02 ^b	1,36 ± 0,03 ^a
C17:0	Heptadekanoinska kiselina	0,37 ± 0,02 ^a	0,33 ± 0,03 ^a	nd
C18:0	Stearinska kiselina	3,03 ± 0,06 ^b	4,25 ± 0,05 ^c	6,93 ± 0,03 ^a
C18:1ω-9	Oleinska kiselina	23,55 ± 0,09 ^a	21,58 ± 0,08 ^b	17,13 ± 0,05 ^c
C18:2ω-6	Linolna kiselina	52,08 ± 0,08 ^b	59,38 ± 0,13 ^a	49,45 ± 0,03 ^c
C18:3ω-3	α-Linolenska kiselina	1,87 ± 0,11 ^b	1,19 ± 0,02 ^c	3,11 ± 0,03 ^a
Σ ZMK	Zasićene MK	21,38 ± 0,13 ^b	16,83 ± 0,18 ^c	28,26 ± 0,08 ^a
Σ MNMK	Mononezasićene MK	24,68 ± 0,03 ^a	22,61 ± 0,07 ^b	19,20 ± 0,04 ^c
Σ PNMK	Polinezasićene MK	53,94 ± 0,04 ^b	60,58 ± 0,11 ^a	52,55 ± 0,01 ^c
Σ NMK	Nezasićene MK	78,63 ± 0,01 ^b	83,18 ± 0,04 ^a	71,75 ± 0,05 ^c
PNMK/ZMK	Polinezasićene/Zasićene	2,52 ± 0,01 ^b	3,59 ± 0,04 ^a	1,86 ± 0,01 ^c
Lipidni indeksi				
AI	Indeks aterogenosti	0,28 ± 0,00 ^b	0,22 ± 0,00 ^c	0,43 ± 0,00 ^a
Cox	Izračunata oksidativnost	6,00 ± 0,01 ^b	6,59 ± 0,01 ^a	5,94 ± 0,00 ^c

LB–*L. barbarum* L.; LBa–*L. barbarum* var. *auranticarpum*; LR–*L. ruthenicum* Murr.; nd–nije detektovano; različita slova u istom redu ukazuju na statističku značajnost prema *Tuckey's* testu ($p < 0,05$).

Najzastupljenije masne kiseline u analiziranim plodovima godži su linolna, oleinska, palmitinska i stearinska kiselina. Ove masne kiseline čine oko 95 % ukupnih masnih kiselina. Slični sastavi masnih kiselina su utvrđeni za plodove LB u Italiji (20,61), Grčkoj (21), Turskoj (233), Severnoj Makedoniji (26), kao i za plodove LR uzgajane u Kini (77). Međutim, nema literaturnih podataka o sastavu masnih kiselina u plodovima LBa.

Uprkos sličnom kvalitativnom sastavu, utvrđene su značajne kvantitativne razlike u masnim kiselinama između različitih plodova godži. Ove razlike su uticale na značajne varijacije u sadržajima ZMK, MNMK i PNMK. Plodovi LR su imali najveći sadržaj ZMK, dok su plodovi LBa imali najveći sadržaj PNMK. Najdominantnija masna kiselina u svim plodovima godži je bila linolna kiselina, sa sadržajem oko 50 %. Procentualna zastupljenost palmitinske kiseline, kao najzastupljenije ZMK, iznosila je od 11,8 % do 20,4 %, dok je sadržaj stearinske kiseline bio značajno niži u rasponu od 3,0 do 6,9 %. Prisustvo heptadekanoične kiseline je utvrđeno samo u plodovima LB i LBa. Sadržaj oleinske kiseline u plodovima godži iznosio je od 17,1 % do 23,6 %, pri čemu je najveći sadržaj bio u plodovima LB.

Odnos PNMK i ZMK se smatra parametrom kvaliteta ulja. Uzimajući u obzir potencijalne zdravstvene efekte različitih klasa masnih kiselina, odnos PNMK/ZMK treba da bude veći od 0,45 (234). Odnos PNMK/ZMK u plodovima godži bio je iznad ove vrednosti, pri čemu je najveća vrednost utvrđena za LBa plodove. Takođe, ovaj uzorak se odlikuje i najnižom vrednošću indeksa aterogenosti. U pogledu oksidativne stabilnosti, najnižu Cox vrednost je imalo ulje ploda LR, koje sadrži najmanje količine PNMK. Iako su ulja plodova LB i LBa imala veće Cox vrednosti, njihova oksidativna stabilnost se može smatrati zadovoljavajućom.

Sastav masnih kiselina (% od ukupnih masnih kiselina) i lipidni indeksi liofilizovanih plodova LB sa različitih lokaliteta u Srbiji predstavljeni su u **Tabeli 12**.

Tabela 12. Sastav masnih kiselina i lipidni indeksi liofilizovanih plodova LB

Masne kiseline		Uzorak					
		SU	SD	PŽ	BG	NI	RU
C16:0	Palmitinska kiselina	12,5 ± 0,09 ^c	13,8 ± 0,48 ^e	17,8 ± 0,15 ^f	12,9 ± 0,02 ^d	9,40 ± 0,04 ^b	7,38 ± 0,04 ^a
C18:0	Stearinska kiselina	3,30 ± 0,16 ^c	3,01 ± 0,05 ^b	3,47 ± 0,13 ^d	3,01 ± 0,07 ^b	2,75 ± 0,01 ^a	2,86 ± 0,04 ^{a,b}
C18:1 ω -9	Oleinska kiselina	14,0 ± 0,02 ^b	20,3 ± 0,15 ^c	11,8 ± 0,16 ^a	20,5 ± 0,21 ^c	24,4 ± 0,29 ^d	23,0 ± 0,12 ^e
C18:2 ω -6	Linolna kiselina	61,7 ± 0,13 ^d	57,1 ± 0,07 ^b	56,5 ± 0,27 ^a	57,1 ± 0,16 ^b	59,6 ± 0,34 ^c	64,6 ± 0,14 ^e
C18:3 ω -3	α -Linolenska kiselina	4,64 ± 0,12 ^d	3,61 ± 0,27 ^b	10,4 ± 0,07 ^f	6,56 ± 0,16 ^e	3,89 ± 0,05 ^c	2,17 ± 0,08 ^a
Σ ZMK	Zasićene MK	15,8 ± 0,05 ^c	16,8 ± 0,30 ^d	21,2 ± 0,02 ^e	15,9 ± 0,04 ^c	12,2 ± 0,02 ^b	10,3 ± 0,00 ^a
Σ PNMK	Polinezasićene MK	66,3 ± 0,01 ^c	60,7 ± 0,14 ^a	66,9 ± 0,14 ^d	63,6 ± 0,01 ^b	63,5 ± 0,21 ^b	66,7 ± 0,04 ^{c,d}
Σ NMK	Nezasićene MK	80,3 ± 0,06 ^b	81,0 ± 0,10 ^c	78,7 ± 0,10 ^a	84,1 ± 0,03 ^d	87,9 ± 0,16 ^e	89,8 ± 0,03 ^f
PNMK/ZMK	Polinezasićene/Zasićene	4,19 ± 0,04 ^d	3,62 ± 0,03 ^b	3,15 ± 0,03 ^a	3,99 ± 0,02 ^c	5,22 ± 0,04 ^e	6,51 ± 0,01 ^f
AI	Indeks aterogenosti	0,20 ± 0,00 ^d	0,21 ± 0,01 ^e	0,27 ± 0,00 ^f	0,19 ± 0,00 ^c	0,14 ± 0,00 ^b	0,11 ± 0,00 ^a
TI	Trombogeni indeks	0,31 ± 0,00 ^d	0,34 ± 0,02 ^f	0,32 ± 0,00 ^e	0,27 ± 0,00 ^c	0,23 ± 0,00 ^b	0,20 ± 0,00 ^a
Cox	Izračunata oksidativnost	7,50 ± 0,01 ^d	6,86 ± 0,05 ^a	8,18 ± 0,03 ^e	7,50 ± 0,04 ^d	7,22 ± 0,02 ^b	7,35 ± 0,03 ^c
OS	Oksidativna stabilnost	3255 ± 6,06 ^d	2951 ± 24,2 ^a	3592 ± 13,7 ^e	3244 ± 20,7 ^d	3094 ± 11,3 ^b	3145 ± 12,9 ^c

SU–Subotica; SD–Smederevo; PŽ–Požega; BG–Beograd; NI–Niš; RU–Ruma; različita slova u istom redu ukazuju na statističku značajnost prema Tuckey's testu ($p < 0,05$)

Dobijeni rezultati analize masno-kiselinskog sastava su pokazali da su analizirani uzorci plodova LB imali visok sadržaj NMK, koji je bio u rasponu od 78,7 % do 89,8 %. Najzastupljenije masne kiseline su linolna kiselina, zatim oleinska i α -linolenska kiselina. Sadržaj ZMK je bio relativno nizak u rasponu između 10,3 % i 21,2 %. Prisustvo esencijalnih masnih kiselina, linolne i α -linolenske kiseline, dodatno ukazuje na nutritivni značaj plodova LB.

Sadržaj NMK, koji predstavlja zbir MNMK i PMK, u analiziranim uzorcima plodova LB je veći u poređenju sa rezultatima za plodove LB u Grčkoj (21) i Portugalu (25), dok je u skladu sa rezultatima za plodove LB u Severnoj Makedoniji (26) i Italiji (20). Ove razlike se mogu objasniti analitičkim faktorima, kao i različitim klimatskim uslovima (20,230). Ranije je utvrđeno da je prosečna godišnja temperatura u inverznoj korelaciji sa sadržajem masnih kiselina sa 18 ugljenikovih atoma (235). Generalno, veći sadržaji oleinske, linolne i α -linolenske kiseline u plodovima godži u poređenju sa drugim voćem, poput banana, jabuka i brusnice (236), ukazuju na njihove specifične nutritivne prednosti.

U analiziranim plodovima LB, odnos PNMK/ZMK ukazuje na vrlo povoljan profil masnih kiselina, dok niske vrednosti AI i TI dodatno ukazuju na antiaterogeni i antitrombogeni potencijal godži plodova. Lipidni indeksi utvrđeni za plodove LB u Srbiji su u skladu sa literaturnim podacima za godži plodove iz Italije (20), ali su povoljniji u poređenju sa plodovima godži iz Grčke, Mongolije, Brazila i Kine (21,230).

4.1.3. Sastav fitosterola plodova LB

Korišćenjem GC-FID/MSD, identifikovano je i kvantifikovano deset fitosterola, u liofilizovanim plodovima LB sa različitih lokaliteta u Srbiji, koji su predstavljeni u **Tabeli 13**.

Tabela 13. Sastav fitosterola u liofilizovanim plodovima LB (GC-FID/MSD)

Fitosteroli (%)	Uzorak					
	SU	SD	PŽ	BG	NI	RU
Holesterol	10 ± 0,6 ^e	4,0 ± 0,1 ^a	6,1 ± 1,0 ^c	8,9 ± 0,0 ^d	5,0 ± 0,1 ^b	6,8 ± 0,6 ^c
24-Metilenholesterol	4,1 ± 0,2 ^c	4,4 ± 0,1 ^c	4,7 ± 0,2 ^d	2,3 ± 0,1 ^a	5,6 ± 0,0 ^e	3,6 ± 0,3 ^b
Kampesterol	5,3 ± 0,7 ^a	6,2 ± 0,1 ^b	4,9 ± 0,6 ^a	5,1 ± 0,0 ^a	6,8 ± 0,1 ^b	5,3 ± 0,4 ^a
Stigmasterol	3,2 ± 0,6 ^a	8,0 ± 0,2 ^e	4,4 ± 0,5 ^{b,c}	3,6 ± 0,6 ^{a,b}	6,1 ± 0,1 ^c	5,2 ± 0,8 ^d
24-Metildezmosterol	16 ± 1,8 ^{b,c}	14 ± 0,6 ^{a,b}	17 ± 2,3 ^c	13 ± 0,9 ^a	17 ± 0,2 ^c	14 ± 0,1 ^{a,b}
β-amirin	2,8 ± 0,7 ^{a,b}	3,5 ± 0,5 ^b	3,4 ± 0,6 ^b	3,1 ± 0,1 ^b	2,4 ± 0,2 ^{a,b}	1,9 ± 1,2 ^a
β-sitosterol	24 ± 5,8 ^{b,c}	19 ± 0,5 ^{a,b}	18 ± 1,3 ^a	26 ± 0,2 ^c	19 ± 0,1 ^{a,b}	23 ± 2,3 ^{a,b,c}
Δ ⁵ -avenasterol	16 ± 1,8 ^{a,b}	18 ± 0,9 ^{b,c}	15 ± 2,5 ^a	16 ± 0,2 ^{a,b}	20 ± 0,1 ^c	15 ± 1,5 ^a
Gramisterol	2,6 ± 1,3 ^a	3,8 ± 1,5 ^b	2,3 ± 0,1 ^a	2,6 ± 0,4 ^a	5,4 ± 0,0 ^a	2,3 ± 0,6 ^a
Cistrostadienol	3,1 ± 1,8 ^{a,b}	4,0 ± 0,1 ^{a,b}	0,9 ± 0,3 ^a	2,9 ± 0,9 ^{a,b}	3,7 ± 0,0 ^b	4,1 ± 1,7 ^b
Ukupni identifikovani steroli	92 ± 4,3 ^{a,b}	93 ± 2,5 ^{a,b}	86 ± 7,6 ^a	92 ± 0,8 ^{a,b}	98 ± 0,0 ^b	90 ± 3,6 ^{a,b}
% sterola u nesaponifikovanoj frakciji	63 ± 1,1 ^{c,d}	48 ± 2,9 ^b	27 ± 6,0 ^a	62 ± 1,5 ^{c,b}	63 ± 0,7 ^d	57 ± 2,8 ^c

SU–Subotica; SD–Smederevo; PŽ–Požega; BG–Beograd; NI–Niš; RU–Ruma; različita slova u istom redu ukazuju na statističku značajnost prema *Tuckey's* testu ($p < 0,05$)

Prema literaturnim podacima, prisustvo fitosterola doprinosi kardioprotektivnim svojstvima plodova LB (20). Najzastupljeniji su bili β -sitosterol (18–26 %), Δ^5 -avenasterol (15–20 %) i 24-metildezmosterol (13–17 %). Ostali steroli su bili zastupljeni u manjim količinama (≤ 10 %). U analiziranim plodovima LB određen je i holesterol (4–10 % ukupnog sadržaja sterola). Međutim, njegov sadržaj u nesaponifikovanoj frakciji je veoma nizak (oko 0,005–0,03 %). Naime, potrebno je konzumirati oko 2 kg sušenih plodova LB, da bi se ostvario unos holesterola koji je ekvivalentan njegovom sadržaju u jednom jajetu (oko 200 mg holesterola).

Literaturni podaci ukazuju da fitosteroli mogu biti od značaja za utvrđivanje geografskog porekla plodova LB (61). U ranijim istraživanjima je pokazano da je β -sitosterol najzastupljeniji u plodovima godži poreklom iz Italije (20,61), dok plodovi godži iz Kine i Mongolije sadrže značajne količine Δ^5 -avenasterola i $\Delta^{5,23}$ -stigmastadienola (61). Za razliku od prethodnih istraživanja, u plodovima LB iz Srbije utvrđeno je prisustvo 24-metildezmosterola, što može biti od potencijalnog značaja za identifikaciju plodova LB poreklom iz Srbije.

4.1.4. Mineralni sastav plodova LB, LBa i LR

Minerali imaju strukturnu, kao i brojne regulatorne uloge u organizmu. Ovi esencijalni mikronutrijenti se ne mogu sintetisati u organizmu i neophodno ih je unositi putem hrane. U svežim plodovima LB, LBa i LR utvrđeno je prisustvo ukupno 14 minerala. Sadržaj makro- i mikroelemenata u svežim analiziranim plodovima godži je dat u **Tabeli 14**.

Tabela 14. Mineralni sastav svežih plodova LB, LBa i LR

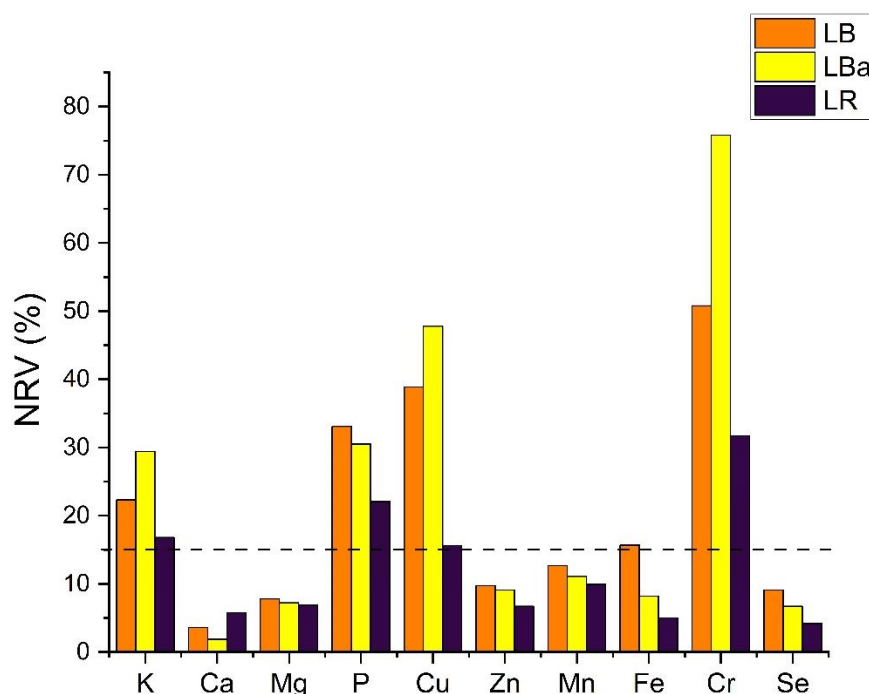
		NRV	LB	LBa	LR
Makroelementi (mg/100 g fw)					
Natrijum	Na	/	74,6 ± 1,19 ^b	51,1 ± 0,30 ^c	79,6 ± 0,57 ^a
Kalijum	K	2000 mg	445,1 ± 5,48 ^b	588,4 ± 0,74 ^a	337,0 ± 1,55 ^c
Kalcijum	Ca	800 mg	29,0 ± 0,41 ^b	15,3 ± 0,12 ^c	46,3 ± 0,34 ^a
Magnezijum	Mg	375 mg	29,2 ± 0,43 ^a	27,2 ± 0,12 ^b	25,9 ± 0,48 ^c
Fosfor	P	700 mg	231,5 ± 3,89 ^a	214,0 ± 0,96 ^b	154,8 ± 0,85 ^c
Sumpor	S	/	35,9 ± 0,36 ^b	41,2 ± 0,17 ^a	22,7 ± 0,14 ^c
Mikroelementi (mg/100 g fw)					
Bakar	Cu	1 mg	0,39 ± 0,02 ^b	0,48 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,01 ^c
Cink	Zn	10 mg	0,97 ± 0,02 ^a	0,91 ± 0,01 ^b	0,67 ± 0,01 ^c
Mangan	Mn	2 mg	0,25 ± 0,01 ^a	0,22 ± 0,01 ^b	0,19 ± 0,01 ^c
Gvožđe	Fe	14 mg	2,20 ± 0,03 ^a	1,15 ± 0,01 ^b	0,70 ± 0,01 ^c
Hrom	Cr	40 µg	0,02 ± 0,01 ^b	0,03 ± 0,01 ^a	0,01 ± 0,01 ^c
Kobalt	Co	/	nd	0,24 ± 0,01	0,02 ± 0,00
Selen	Se	55 µg	0,006 ± 0,00 ^a	0,004 ± 0,00 ^a	0,002 ± 0,00 ^a
Bor	B	/	0,37 ± 0,12 ^a	0,37 ± 0,01 ^a	0,25 ± 0,01 ^b

LB–*L. barbarum* L.; LBa–*L. barbarum* var. *auranticarpum*; LR–*L. ruthenicum* Murr.; NRV–nutritivna referentna vrednost; nd–nije detektovano; fw–sveža masa uzorka; različita slova u istom redu ukazuju na statističku značajnost prema Tuckey's testu ($p < 0,05$)

Dobijeni rezultati ukazuju da sadržaj minerala značajno varira između različitih plodova godži. Mineralni sastav LB i LBa prema opadajućem sadržaju je bio: $K > P > Na > S > Mg > Ca > Fe > Zn > Cu > Mn > Cr > B > Se$. Sadržaj kalcijuma i gvožđa u plodovima LB je bio oko dva puta veći u odnosu na plodove LBa. Takođe, plodovi LB sadržali su značajno veće količine natrijuma u odnosu na plodove LBa. Međutim, plodovi LBa su sadržali veće količine kalijuma i kalcijuma u poređenju sa plodovima LB.

U odnosu na plodove LB i LBa, mineralni sastav plodova LR je pokazao određene razlike. Za plod LR je utvrđen sledeći sastav minerala: $K > P > Na > Ca > Mg > S > Fe > Zn > B > Mn > Cu > Cr > Se$. Ovi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima (51). Osim natrijuma i kalcijuma, sadržaj minerala u plodovima LR je bio niži u poređenju sa plodovima LB i LBa.

Uzimajući u obzir sadržaj minerala u 100 g plodova godži u odnosu na nutritivne referentne vrednosti (NRV) za odrasle osobe, analizirani uzorci plodova godži su sadržali kalijum, fosfor, bakar i hrom u količinama većim od 15 % NRV (**Slika 24**), na osnovu čega se mogu smatrati „dobrim izvorom“ ovih minerala. Sadržaj gvožđa u plodovima LB je bio oko pet puta veći u odnosu na plodove LB italijanskog porekla (20,48).



Slika 24. Sadržaj minerala u svežim plodovima LB, LBa i LR u poređenju sa nutritivnim referentnim vrednostima (NRV)

Rezultati analize makrominerala (K, Na, Ca, Mg, P, i S) i mikrominerala (Fe, Zn, Cu, Mn, Cr, Mo) liofilizovanih plodova LB sa šest različitih lokaliteta u Srbiji predstavljani su u **Tabeli 15**.

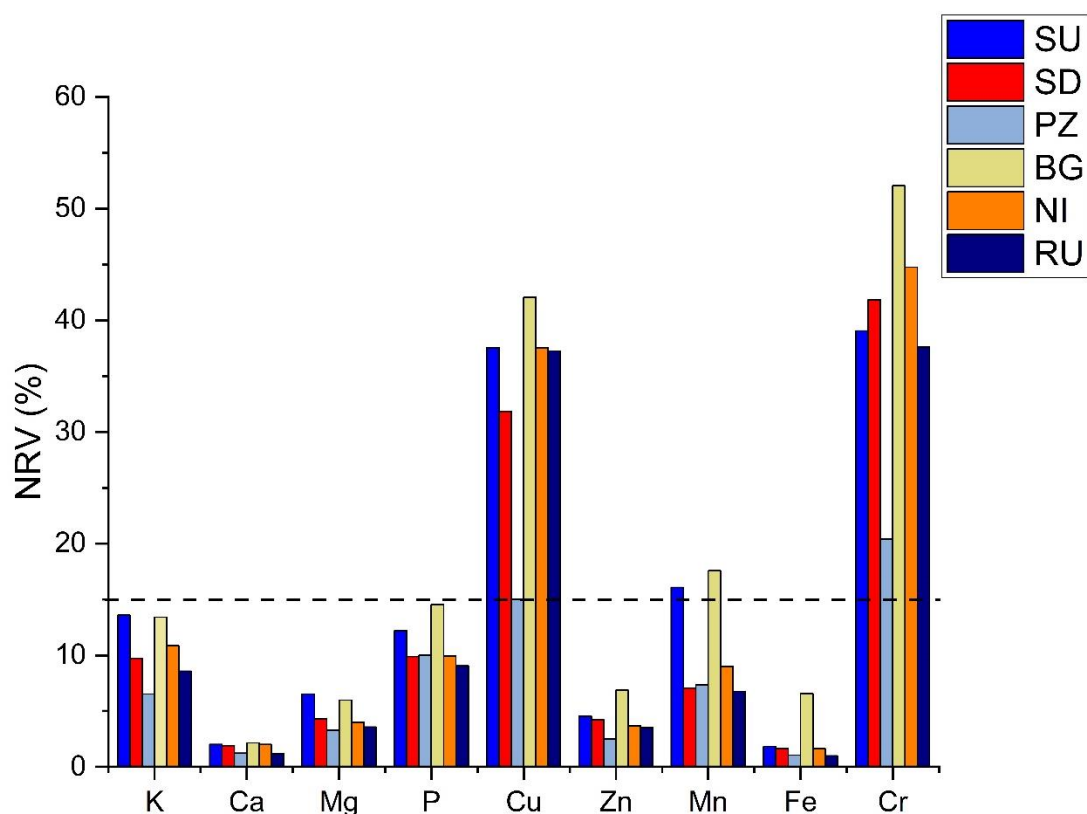
Tabela 15. Mineralni sastav liofilizovanih plodova LB

	SU	SD	PŽ	BG	NI	RU	Srednja vrednost
Makroelementi (mg/100 g dw)							
K	904 ± 0,07 ^f	648 ± 0,19 ^c	435 ± 0,18 ^a	893 ± 1,06 ^e	722 ± 1,30 ^d	571 ± 0,51 ^b	695 ± 172
Na	195 ± 0,04 ^b	243 ± 0,35 ^e	182 ± 0,24 ^b	189 ± 0,10 ^b	194 ± 1,45 ^b	175 ± 1,15 ^b	196 ± 3,85
Ca	53,2 ± 0,19 ^d	50,7 ± 0,04 ^c	32,8 ± 0,06 ^b	57,5 ± 0,22 ^e	53,0 ± 0,43 ^c	31,0 ± 0,39 ^a	46,4 ± 10,8
Mg	81,5 ± 0,05 ^f	53,7 ± 0,28 ^d	40,6 ± 0,27 ^a	74,6 ± 0,32 ^e	49,7 ± 0,50 ^c	44,4 ± 0,48 ^b	57,4 ± 15,7
P	284 ± 0,08 ^e	230 ± 0,45 ^b	233 ± 0,40 ^d	339 ± 0,31 ^f	232 ± 1,27 ^c	211 ± 0,15 ^a	254 ± 45,0
S	143 ± 0,08 ^e	90,2 ± 0,16 ^b	102 ± 0,11 ^d	145 ± 0,63 ^f	88,6 ± 0,35 ^a	91,5 ± 0,05 ^c	110 ± 25,1
Mikroelementi (mg/100 g dw)							
Fe	0,86 ± 0,02 ^b	0,78 ± 0,00 ^b	0,49 ± 0,02 ^a	3,06 ± 0,05 ^c	0,77 ± 0,15 ^b	0,46 ± 0,10 ^a	1,07 ± 0,93
Zn	1,51 ± 0,04 ^c	1,41 ± 0,02 ^c	0,83 ± 0,03 ^a	2,29 ± 0,14 ^d	1,22 ± 0,10 ^b	1,17 ± 0,02 ^b	1,40 ± 0,47
Cu	1,25 ± 0,02 ^{b,c}	1,06 ± 0,02 ^b	0,50 ± 0,03 ^a	1,40 ± 0,17 ^c	1,25 ± 0,04 ^{b,c}	1,24 ± 0,22 ^{a,b}	1,12 ± 0,32
Mn	1,07 ± 0,01 ^c	0,47 ± 0,01 ^a	0,49 ± 0,04 ^a	1,17 ± 0,02 ^d	0,60 ± 0,01 ^b	0,45 ± 0,01 ^a	0,71 ± 0,30
Cr (µg)	52,0 ± 0,17 ^{b,c}	55,7 ± 0,66 ^{c,d}	27,2 ± 3,36 ^a	69,3 ± 3,19 ^e	59,6 ± 3,72 ^d	50,1 ± 0,28 ^b	52,3 ± 13,4
Mo (µg)	27,0 ± 0,19 ^c	9,50 ± 0,02 ^a	55,0 ± 7,42 ^d	69,7 ± 3,69 ^e	26,3 ± 3,20 ^c	17,7 ± 3,03 ^b	34,4 ± 22,0

SU– Subotica; SD– Smederevo; PŽ– Požega; BG– Beograd; NI– Niš; RU– Ruma; dw– suva masa uzorka; različita slova u istom redu ukazuju na statističku značajnost prema *Tuckey's* testu ($p < 0,05$)

Kalijum je najzastupljeniji makroelement u svim analiziranim uzorcima, a slede ga fosfor, natrijum, sumpor, magnezijum i kalcijum. Prosečan sadržaj mikroelemenata u plodovima LB prati sledeći redosled: Zn > Cu > Fe > Mn > Cr > Mo. Ovaj profil minerala sličan je profilu plodova LB iz Kine (237), dok su vrednosti niže u poređenju sa uzorcima iz Severne Makedonije, osim za S (26). Sadržaji minerala u sušenim plodovima LB iz Italije su u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju, pri čemu su za P i Cu zabeležene niže, a za Ca i Fe više vrednosti (48). Varijacije među uzorcima mogu se pripisati različitim uslovima životne sredine, tehnikama đubrenja i metodama uzgoja (20,233).

Na osnovu preporučenog dnevnog unosa hranljivih materija prema Uredbi (EU) br. 1169/2011 i kriterijuma za nutritivne izjave Uredba (EZ) br. 1924/2006 (56,70), 30 g liofilizovanih plodova LB iz Srbije može se smatrati izvorom Cu i Cr (**Slika 25**).



Slika 25. Sadržaj minerala u liofilizovanim plodovima LB (30 g) sa različitih lokaliteta u poređenju sa nutritivnim referentnim vrednostima (NRV)

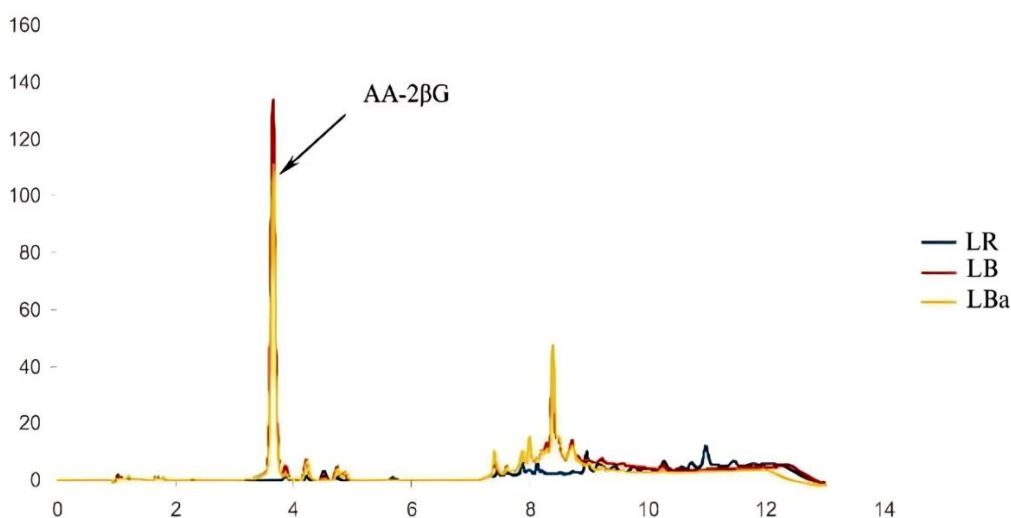
Dobijeni rezultati za sadržaj Cu su u skladu sa ranijim istraživanjima (26,48), dok su vrednosti sadržaja Cr niži u poređenju sa literaturnim podacima (26).

4.1.5. Sadržaj 2-O- β -D-glukopiranozil-L-askorbinske kiseline u plodovima LB, LBa i LR

Plodovi godži predstavljaju značajan izvor mikronutrijenata, uključujući vitamine, kao što su tiamin, riboflavin i vitamin C (6,7). Prema literaturnim podacima, prosečan sadržaj vitamina C u svežim plodovima LB iznosi oko 50 mg/100 g, odnosno oko 60 % NRV (6,70). U prethodnim studijama, sadržaj vitamina C u plodovima LB je iznosio između 30 i 60 mg/100 g u zavisnosti od sorte i regiona uzgoja (20,28,48,71). Međutim, sadržaj vitamina C u plodovima određenih sorti LB je bio i do deset puta niži (22,78), što se može objasniti genotipskim razlikama, klimatskim uslovima, kao i primenjenim postupcima pre i nakon sakupljanja plodova (69).

Pored AA, plodovi LB sadrže i AA-2 β G, provitamin vitamina C (72,73), sa antioksidativnim svojstvima (238). Procenjuje se da AA-2 β G čini oko 0,5 % sušenih plodova, što je uporedivo sa sadržajem AA u svežem limunu (73). Sadržaj AA-2 β G u plodovima LB u Švajcarskoj bio je u korelaciji sa sadržajem šećera i u rasponu od 0,35 do 2,79 mg/g (24). U svežim plodovima LB određen je veći sadržaj AA-2 β G (33,4 mg/100 g) u odnosu na sveže plodove LBa (24,2 mg/100 g), dok njegovo prisustvo nije utvrđeno u plodovima LR.

Na **Slici 26**, su prikazani hromatogrami AA-2 β G u svežim plodovima godži.



Slika 26. Sadržaj AA-2 β G dobijen tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom (245 nm)

4.1.6. Fizičko-hemijski parametri plodova LB, LBa i LR

Fizičko-hemijski parametri (TSS, TA, njihov odnos (TSS/TA) i pH vrednosti), kao indikatori senzornog kvaliteta su predstavljeni u **Tabeli 16**.

Tabela 16. Fizičko-hemijski parametri u svežim plodovima LB, LBa i LR

Parametar	Uzorak		
	LB	LBa	LR
TA (% limunske kiseline)	0,70 ± 0,07 ^a	0,70 ± 0,06 ^a	0,89 ± 0,08 ^b
pH	4,71 ± 0,04 ^a	4,71 ± 0,02 ^a	4,56 ± 0,01 ^b
TSS (°Brix)	16,73 ± 0,12 ^a	14,97 ± 0,06 ^b	9,43 ± 0,06 ^c
TSS/TA	22,44 ^a	22,54 ^a	10,69 ^b

LB–*L. barbarum* L.; LBa–*L. barbarum* var. *auranticarpum*; LR–*L. ruthenicum* Murr.; TA–titrirana kiselost; TSS–ukupna rastvorljiva suva materija; različita slova u istom redu ukazuju na statističku značajnost prema *Tuckey's* testu ($p < 0,05$)

Vrednosti Brix° koje odražavaju sadržaj TSS, bile su u rasponu od 9,43 % (LR) i 16,73 % (LB) ($p < 0,05$). Najveća titrirana kiselost i najniža pH vrednost su utvrđeni za plodove LR. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima, koji su pokazali niže vrednosti TSS i veću TA u plodovima LR u poređenju sa drugim genotipovima (17). Odnos TSS/TA je bio dvostruko veći u uzorcima plodova LB i LBa u poređenju sa plodovima LR, što ukazuje na izraženiji sladak ukus plodova LB u odnosu na plodove LR.

4.1.7. Bioaktivna jedinjenja plodova LB, LBa i LR

Sadržaj bioaktivnih jedinjenja u svežim plodovima LB, LBa i LR prikazani su u **Tabeli 17**.

Tabela 17. Sadržaj bioaktivnih jedinjenja u svežim plodovima LB, LBa i LR

Bioaktivno jedinjenje	Uzorak		
	LB	LBa	LR
TCC (mg/100g)	41,71 ± 1,23 ^a	3,60 ± 0,02 ^b	nd
TPC (mg GAE/100g)	162,4 ± 11,5 ^a	176,3 ± 13,0 ^a	295,7 ± 18,8 ^b
TFC (mg HE/100g)	214,2 ± 28,6 ^b	335,5 ± 27,1 ^a	27,40 ± 4,76 ^c
TAcy (mg C3G/100g)	nd	nd	196,0 ± 10,5
TT (mg PYE/100g)	0,31 ± 0,02 ^b	0,33 ± 0,02 ^b	0,63 ± 0,03 ^a

LB–*L. barbarum* L.; LBa–*L. barbarum* var. *auranticarpum*; LR–*L. ruthenicum* Murr.; TCC–sadržaj ukupnih karotenoida; TPC–sadržaj ukupnih polifenola; TFC–sadržaj ukupnih flavonoida; TAcy–sadržaj ukupnih antocijana; TT–sadržaj ukupnih tanina; GAE–ekvivalent galne kiseline; HE–ekvivalent hiperozida; C3G–ekvivalent cijanidin-3-glukozida; PYE–ekvivalent pirogalola; nd–nije detektovano; različita slova u istom redu ukazuju na statističku značajnost prema *Tuckey's* testu ($p < 0,05$)

TCC je bio značajno veći u plodovima LB u poređenju sa plodovima LBa, dok njihovo prisustvo u plodovima LR nije utvrđeno. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa ranijim istraživanjem, koje je pokazalo da LB sadrže velike količine karotenoida, posebno zeaksantina, dok u zrelih plodovima LR njihovo prisustvo nije utvrđeno (90). Dodatno, literaturni podaci ukazuju na razlike u sadržaju TCC između plodova različitih *Lycium* vrsta (17,95).

Literaturni podaci ukazuju na značajne razlike u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu polifenola između plodova godži. Sadržaj TPC i TT u plodovima LR je bio oko dva puta veći u poređenju sa plodovima LB i LBa. Plodovi LR su imali najniži sadržaj TFC. Međutim, za razliku od plodova LR, prisustvo antocijana nije utvrđeno u plodovima LB i LBa.

Poznato je da se ukupni sadržaj polifenola značajno razlikuje između plodova godži različitih vrsta (15). Dodatno, uočene razlike među literaturnim podacima o sadržaju ukupnih polifenola, mogu se objasniti različitim klimatskim uslovima, karakteristikama zemljišta (239), kao i primenjenim metodama ekstrakcije (79).

Ukupni sadržaj monomernih antocijana u liofilizovanim plodovima LR, kao i kvantifikacija fenolnih jedinjenja dobijenih HPLC-DAD analizom nakon hidrolize, prikazani su u **Tabeli 18**.

Tabela 18. Sadržaj ukupnih antocijana i polifenolnih jedinjenja u liofilizovanim plodovima LR analiziranih HPLC-DAD metodom

Bioaktivno jedinjenje (mg/g dw)	
MAC (mg C3G/g dw)	7,50 ± 0,16
Petunidin	5,81 ± 0,35
Delfinidin	0,34 ± 0,08
Kafena kiselina	23,91 ± 0,30
<i>p</i> -kumarinska kiselina	3,32 ± 0,23

MAC–sadržaj ukupnih monomernih antocijana; C3G–ekvivalent cijanidin-3-glukozida; dw–suva masa ploda;

Dobijeni rezultati potvrđuju da je plod LR bogat izvor antocijana (130). Petunidin je najzastupljeniji antocijan, dok je delfinidin prisutan u tragovima, a sadržaj kafene kiseline i njenih derivata je značajno veći u odnosu na sadržaj *p*-kumarinske kiseline. Ovi rezultati su u skladu sa profilom antocijana koji je određen u plodovima LR u Kini (17).

Analizom HPLC-DAD-ESI-MS identifikovano je ukupno dvanaest bioaktivnih jedinjenja u ekstraktu liofilizovanih plodova LR. Prisustvo šest glikozida antocijana, uključujući delfinidin, malvidin, i četiri derivata petunidina, kao i fenolne kiseline poput hlorogenske i dikafeoilhininske kiseline predstavljeno je u **Tabeli 19**.

Tabela 19. Polifenolna jedinjenja u liofilizovanim plodovima LR (HPLC-DAD-ESI-MS)

t_R (min)	UV λ_{max} (nm)	Režim jonizaci je	Molekularni jon (m/z)	Fragmentni jon (m/z)	Polifenolna jedinjenja
12.7	280	N	634	472, 350, 308	<i>N,N</i> -bis-dihidrokafeoil-spermidin-heksoza
13.8	282	N	472	350, 308	<i>N,N</i> -bis-dihidrokafeoil-spermidin
14.1	296 sh, 326	N	353	191, 179, 135	Hlorogenska kiselina
14.9	294, 532	P	1095	933, 479, 317	Petunidin 3-glukozil- <i>p</i> -kumarolrutinozid-5-glukozid
15.8	290, 320	N	470	334, 308, 291	Dihidrokafeoil-kafeoil spermidin izomer 1
16.0	288, 318	N	470	334, 308, 291	Dihidrokafeoil-kafeoil spermidin izomer 2
17.9	294, 308, 530	P	919	757, 465, 303	Delfinidin 3- <i>p</i> -kumarolrutinozid-5-glukozid
			949	787, 641, 479, 317	Petunidin 3-kafeoilrutinozid-5-glukozid
19.5	292, 308, 532	P	933	771, 479, 317	Petunidin 3- <i>p</i> -kumarolrutinozid-5-glukozid
21.2	296, 308, 530	P	947	785, 493, 331	Malvidin 3- <i>p</i> -kumarolrutinozid-5-glukozid
23.0	294, 312, 532	P	771	317	Petunidin 3- <i>p</i> -kumarolrutinozid
24.5	296 sh, 328	N	515	353, 191, 179, 135	Dikafeoilhininska kiselina

t_R –retenciono vreme; N –negativni; P –pozitivni;

Fenolna jedinjenja u plodovima LR se sastoje od aglikona i šećernih komponenti acilovanih *p*-kumarinskom ili kafenom kiselinom. Najzastupljenije fenolno jedinjenje u plodovima LR je derivat petunidina, što je u skladu sa literaturnim podacima o hemijskom sastavu plodova LR iz azijskih zemalja (112,206). Podaci o sastavu polifenola u plodovima LR uzgajanim u evropskim zemljama su veoma ograničeni. Sličan profil antocijana je utvrđen u plodovima u Severnoj Makedoniji (203). Ranija istraživanja su pokazala da derivati petunidina čine preko 95 % antocijana u plodovima LR. Za ova jedinjenja je karakteristična 3,5-diglikozilacija i acilacija fenolkarboksilnim kiselinama, kao što su ferulinska, *p*-kumarinska i kafena, kao i prisustvo *cis*- i *trans*-izomera (238,240). Među njima, najzastupljeniji je petunidin 3-*p*-kumaroilrutinozid-5-*O*-glukozid (19). Acilacija antocijana poboljšava njihovu foto- i termostabilnost i pozitivno utiče na biološku aktivnost (241). Prema literaturnim podacima, sastav antocijana se značajno razlikuje između svežih i sušenih plodova LR (115,242). Za razliku od svežih i zamrznutih plodova, sušeni plodovi ne sadrže 5-*O*-glukozid derivate, dok je prisustvo pelargonidina utvrđeno u sušenim plodovima (115). Takođe, profil antocijana plodova LR zavisi i od drugih faktora, poput stepena zrelosti i sorte (241,243).

Pored antocijanskih glikozida, u uzorku LR su identifikovani i derivati hidroksicimetne kiseline, uključujući hlorogensku i dikafeoilhininsku kiselinu, kao i spermidine. Analiza ekstrakta, pre i nakon hidrolize, utvrdila je prisustvo hidroksicimetne kiseline u plodovima LR, uglavnom u vezanom obliku. Tokom prolaska kroz gastrointestinalni trakt ove fenolkarboksilne kiseline se mogu osloboditi iz svojih konjugata, hidrolizom pod uticajem enzima i usled razlika u pH vrednostima, čime postaju dostupne za apsorpciju ili lokalno delovanje. Sa nutritivnog aspekta, prilikom procene unosa hidroksicinamata potrebno je uzeti u obzir ne samo slobodne fenolkarboksilne kiseline, već i njihove glikozide i deposite, koji mogu doprineti antioksidativnim i antiinflamatornim efektima (244,245).

U prethodnim istraživanjima je utvrđeno da plodovi LR iz Kine sadrže značajne količine hlorogenske kiseline 0,578-2,151 mg/g (246) i 238,59 mg/g (247) za koju je poznato da ima antioksidativna i antiinflamatorna svojstva (248). Derivati spermidina su zastupljeni u obliku konjugata sa dihidrokafenom ili kafenom kiselinom, slobodnom ili u kompleksima sa heksozom, što doprinosi njihovoj stabilnosti (203).

Sadržaj bioaktivnih jedinjenja i sastav polifenola (HPLC-DAD) u liofilizovanim plodovima LB su prikazani u **Tabeli 20**.

Tabela 20. Sadržaj bioaktivnih jedinjenja i polifenolni sastav (HPLC-DAD) u liofilizovanim plodovima LB

Bioaktivna jedinjenja	Uzorak						Srednja vrednost
	SU	SD	PŽ	BG	NI	RU	
TPC (mg GAE/g)	2,43 ± 0,20 ^b	2,80 ± 0,05 ^c	2,48 ± 0,07 ^b	3,06 ± 0,12 ^d	2,18 ± 0,04 ^a	2,41 ± 0,09 ^b	2,56 ± 0,31
Fenolkarboksilne kiseline ¹ (µg/g ekstrakta)							
Hlorogenska	736 ± 217 ^{a,b}	555 ± 9,4 ^a	1907 ± 99,1 ^c	965 ± 92,6 ^b	818 ± 147 ^b	942 ± 54,4 ^b	987,2
Galna	13,7 ± 4,29 ^a	390 ± 6,21 ^c	50,9 ± 9,12 ^a	1455 ± 53,4 ^d	424 ± 20,3 ^c	329 ± 3,48 ^b	444,8
Kafena	335 ± 46,0 ^c	167 ± 3,86 ^b	nd ^a	580 ± 131 ^d	236 ± 22,1 ^{b,c}	291 ± 19,5 ^c	321,8
Ferulinska	244 ± 87,1 ^b	nd ^a	342 ± 37,5 ^b	354 ± 144 ^b	nd ^a	nd ^a	313,3
TFC (mg CE/g)	1,92 ± 0,09 ^e	0,34 ± 0,05 ^a	1,42 ± 0,05 ^d	1,07 ± 0,06 ^c	0,54 ± 0,05 ^b	0,34 ± 0,04 ^a	0,94 ± 0,61
Flavonoidi ² (µg/g ekstrakta)							
Rutin	nd ^a	451 ± 6,28 ^c	nd ^a	319 ± 20,8 ^b	650 ± 24,7 ^d	1087 ± 65,2 ^e	626,8
Kemferol	nd ^a	422 ± 9,39 ^c	nd ^a	114 ± 0,00 ^b	576 ± 33,3 ^d	981 ± 34,4 ^e	523,3
Kvercetin	689 ± 57,0 ^c	n.d. ^a	532 ± 27,5 ^b	1025 ± 192 ^d	385 ± 14,5 ^b	nd ^a	657,8
TCC (mg/g)	8,70 ± 0,01 ^e	6,81 ± 0,00 ^c	13,1 ± 0,03 ^f	4,87 ± 0,05 ^a	5,50 ± 0,06 ^b	8,14 ± 0,10 ^d	7,85 ± 2,79
LBP (mg Glu/g)	224 ± 2,35 ^b	297 ± 7,04 ^e	311 ± 5,28 ^f	165 ± 13,8 ^a	258 ± 3,13 ^d	238 ± 3,13 ^c	248 ± 50,0
AA-2βG (mg/100g)	15,7 ± 0,17 ^b	80,3 ± 1,15 ^d	13,1 ± 0,52 ^a	12,6 ± 0,63 ^a	70,6 ± 1,75 ^c	11,8 ± 0,66 ^a	34,03 ± 30,3

nd –nije detektovano; TPC–sadržaj ukupnih polifenola; TFC–sadržaj ukupnih flavonoida; TCC–sadržaj ukupnih karotenoida; LBP–*Lycium barbarum* polisaharidi; AA-2βG– 2-O-β-D glukopiranozil-L-askorbinska kiselina; GAE– ekvivalent galne kiseline; CE– ekvivalent katehina; Glu– ekvivalent glukoze; ¹–snimljeno na 250 nm; ²–snimljeno na 320 nm; SU–Subotica; SD–Smederevo; PŽ–Požega; BG–Beograd; NI–Niš; RU–Ruma; različita slova u istom redu ukazuju na statističku značajnost prema *Tuckey*'s testu ($p < 0,05$)

Kao što je i očekivano, sadržaj bioaktivnih jedinjenja se značajno razlikuje između plodova LB sa različitim lokaliteta ($p < 0,05$). Ove razlike se mogu objasniti delovanjem različitih faktora, uključujući i klimatske uslove. Poznato je da toplotni stres utiče na povećanje sinteze bioaktivnih jedinjenja (22,102). Sadržaj TPC u plodovima LB sa različitim lokaliteta je bio u rasponu od 2,18 mg GAE/g (NI) do 3,06 mg GAE/g (BG), dok je TFC bio u rasponu od 0,34 (SD, RU) do 1,92 mg CE/g (SU). Rezultati za sadržaj TPC su u skladu sa literaturnim podacima za sadržaj TPC u plodovima LB u Turskoj (2,17-4,48 mg/g) (130) i Švajcarskoj (0,71-2,94 mg/g) (24), ali su niži u odnosu na plodove LB u Rumuniji (11,6-15,7 mg/g) (23) i Grčkoj (6,9-10,9 mg/g) (1). Međutim, sadržaj TFC je veći u poređenju sa uzorcima plodova LB iz Bugarske (0,019-0,057 mg/g) (249).

U pogledu polifenolnog sastava, utvrđeno je prisustvo ukupno sedam fenolnih jedinjenja. Najzastupljenije fenolkarboksilne kiseline su bile hlorogenska i galna, dok je prisustvo ferulinske kiseline (SU, PŽ, BG), kemferola (SD, BG, NI, RU) i kvercetina (SU, PŽ, BG, NI) utvrđeno samo u nekim uzorcima. Pored toga što doprinosi organoleptičkim svojstvima plodova godži, hlorogenska kiselina ispoljava antioksidativna, antikancerogena i antiinflamatorna svojstva, kroz inhibiciju *NF- κ B* signalnog puta (22,83). Prisustvo rutina, kao značajnog parametra kvaliteta plodova LB (34), utvrđeno je u uzorcima SD, BG, NI i RU. Slični rezultati su utvrđeni u svežim plodovima LB iz Kine (17). Kvercetin-3-*O*-rutinozid i *p*-kumarinska kiselina su bili najzastupljenija polifenolna jedinjenja u plodovima LB u Portugalu (25), dok su ferulinska kiselina i rutin bili najzastupljeniji u plodovima LB u Švajcarskoj (24).

Zeaksantin i njegovi estri, su dominantni karotenoidi u plodovima LB. Osim što su odgovorni za karakterističnu crveno-narandžastu boju plodova LB, karotenoidi doprinose njihovim antioksidativnim i drugim biološkim svojstvima (95). Sadržaj TCC u liofilizovanim plodovima LB je bio u rasponu od 4,87 (BG) i 13,1 mg/g (PŽ). Ovaj sadržaj je uporediv sa sadržajem karotenoida u drugim namirnicama, koje se smatraju dobrim izvorima karotenoida, kao što je šargarepa (540,9-763,7 μ g/g) (250). U poređenju sa literaturnim podacima, sadržaj TCC je bio više od 2 puta veći u poređenju sa plodovima LB iz Italije (76) i Poljske (22).

U svim plodovima LB utvrđen je visok sadržaj LBP, koji se smatraju jednim od najznačajnijih kategorija bioaktivnih jedinjenja u plodovima LB (21). Sadržaj LBP u analiziranim uzorcima je u skladu sa literaturnim podacima za plodove LB u Severnoj Makedoniji (212-370 mg/g) (26), niži u poređenju sa plodovima LB u Grčkoj (370-490 mg/g) (21), a veći u odnosu na plodove LB u Kini (23,62-42,45 mg/g) (94).

Sadržaj AA-2 β G je bio u rasponu od 11,8 do 80,3 mg/100 g, što je uporedivo sa literaturnim podacima za plodove LB uzgajane u Švajcarskoj (40-279 mg/100g) (24), a ukazuje na veći sadržaj AA-2 β G u plodovima LB u Srbiji u odnosu na plodove LB u Poljskoj (2,39-6,24 mg/100g) (22). Na sadržaj AA-2 β G značajno utiču faktori životne sredine i uslovi skladištenja. Dok izloženost svetlosti povećava, visoke temperature i dužina čuvanja smanjuju sadržaj vitamina C u plodovima godži (67,230,251).

4.2. Druga faza istraživanja

U okviru druge faze istraživanja izvršena je analiza *in vitro* bioloških aktivnosti (antioksidativne, antienzijske, antimikrobne i prebiotske) vodenometanolnih ekstrakata svežih plodova godži i liofilizovanih plodova godži sa različitih lokaliteta u Srbiji.

4.2.1. Antioksidativna aktivnost plodova LB, LBa i LR

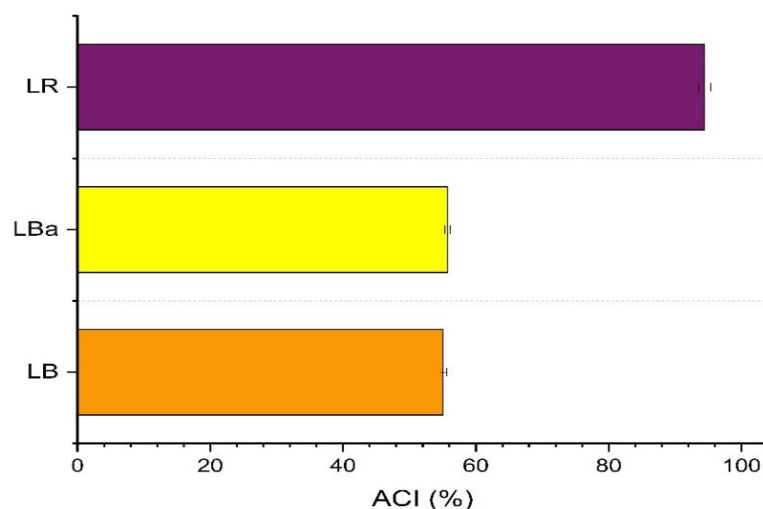
Antioksidativni potencijal vodenometanolnih ekstrakata procenjen je na osnovu sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala (DPPH, ABTS), redukcione sposobnosti (FRAP, CUPRAC) i inhibicije lipidne peroksidacije (inhibicija obezbojavanja β -karotena). Dobijeni rezultati za ekstrakte svežih plodova LB, LBa i LR su prikazani u **Tabeli 21**.

Tabela 21. Antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata svežih plodova LB, LBa i LR

Antioksidativna aktivnost	Uzorci		
	LB	LBa	LR
FRAP ($\mu\text{mol TE}/100\text{g}$)	$532,4 \pm 21,1^b$	$578,5 \pm 21,8^b$	$1943,9 \pm 18,3^a$
CUPRAC ($\mu\text{mol TE}/100\text{g}$)	$616,7 \pm 3,3^b$	$742,7 \pm 8,9^b$	$1057,4 \pm 7,1^a$
DPPH ($\mu\text{mol TE}/100\text{g}$)	$452,6 \pm 3,8^b$	$443,6 \pm 4,1^b$	$1022,5 \pm 3,6^a$
ABTS ($\text{mmol TE}/100\text{g}$)	$12,9 \pm 0,7^b$	$14,4 \pm 0,9^b$	$28,4 \pm 1,5^a$
IO β K (%)	$22,0 \pm 2,6^a$	$18,6 \pm 1,7^{a,b}$	$15,9 \pm 2,5^b$

LB–*L. barbarum* L.; LBa–*L. barbarum* var. *auranticarpum*; LR–*L. ruthenicum* Murr.; IO β K–inhibicija obezbojavanja β -karotena; TE–ekvivalent troloksa; različita slova u istom redu ukazuju na statističku značajnost prema *Tuckey's* testu ($p < 0,05$)

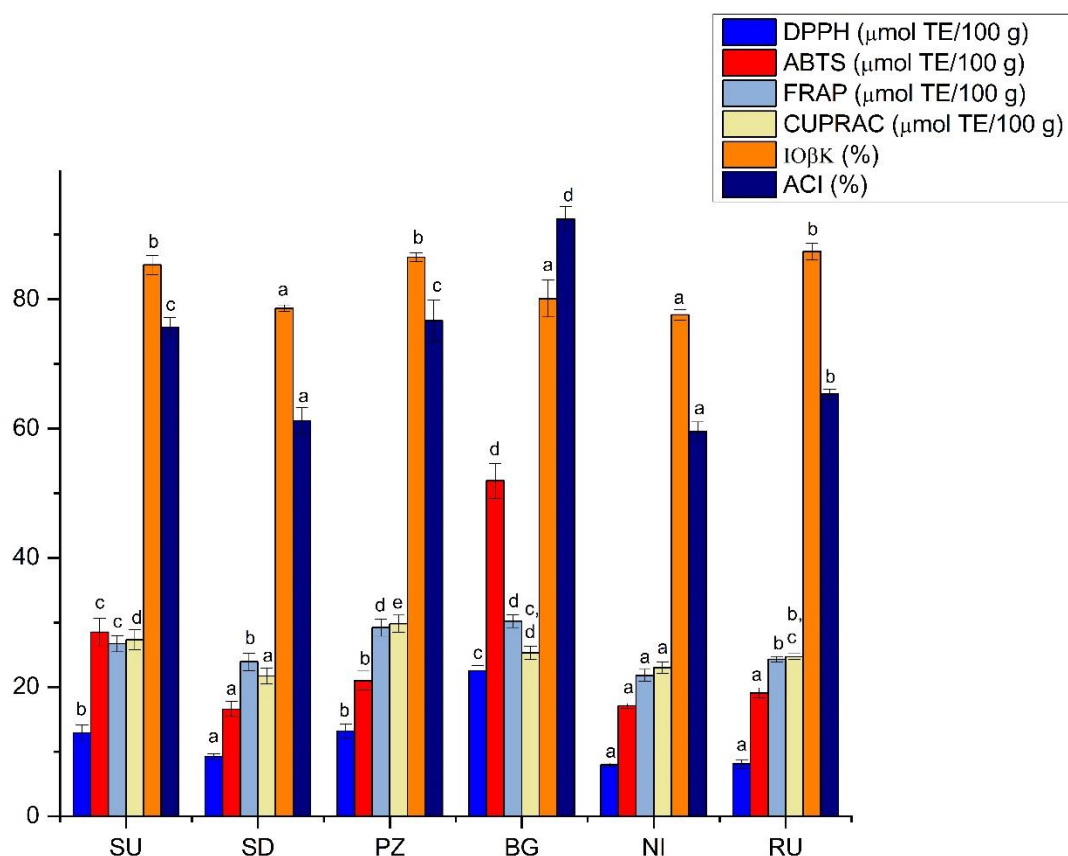
Metanolni ekstrakti plodova LR su pokazali najizraženiju redukcionu aktivnost (FRAP, CUPRAC) i sposobnost neutralizacije slobodnih radikala (DPPH, ABTS), dok je za ekstrakte plodova LB i LBa utvrđen veći kapacitet inhibicije lipidne peroksidacije. Na osnovu vrednosti ACI indeksa, pokazano je da su plodovi LR imali skoro 1,7 puta veći antioksidativni potencijal u odnosu na plodove LB i LBa (**Slika 27**).



Slika 27. Antioksidativni kompozitni indeks (ACI) svežih plodova LB, LBa i LR

Ovaj rezultat je u skladu sa ranijim istraživanjima koja su pokazala da plodovi LR imaju izraženiju antioksidativnu aktivnost u odnosu na plodove LB (130,252). Literaturni podaci ukazuju da antioksidativnom potencijalu plodova godži najviše doprinose polisaharidi i fenolna jedinjenja, posebno antocijani (51,246,248). U ranijem istraživanju je utvrđena direktna povezanost između sadržaja TPC i antioksidativne aktivnosti, određene korišćenjem DPPH, ABTS i FRAP testova (51,206).

Antioksidativna aktivnost vodenometanolonih ekstrakata liofilizovanih plodova LB procenjena korišćenjem testova: DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC i IO β K, i izračunati ACI indeksi, su predstavljeni na **Slici 28**.



Slika 28. Antioksidativna aktivnosti vodenometanolnih ekstrakata liofilizovanih plodova LB sa različitih lokaliteta (različita slova ukazuju na statističku značajnost prema *Tuckey's* testu ($p < 0,05$))

Antioksidativni potencijal plodova LB može se pripisati prisustvu različitih bioaktivnih jedinjenja, poput polifenola, karotenoida, polisaharida, vitamina, kao i njihovim međusobnim sinergističkim efektima (29,102,230,233). Statistički značajne razlike u antioksidativnom potencijalu plodova LB sa različitih lokaliteta se mogu objasniti utvrđenim razlikama u njihovom polifenolnom sastavu. Slični rezultati su utvrđeni za plodove LB iz Rumunije (102). Brojne studije su ukazale na značajan doprinos fenolnih jedinjenja antioksidativnoj aktivnosti plodova LB (21,24,29,233). U ovom istraživanju, uzorci u kojima je utvrđen najveći sadržaj TPC, kao i prisustvo hlorogenske kiseline, kafene kiseline i derivata kvercetina, pokazali su izraženije antioksidativne efekte. Razlike u literaturnim podacima o antioksidativnoj aktivnosti plodova LB mogu se objasniti razlikama u postupcima ekstrakcije, kao i različitim referentnim standardima korišćenim za izražavanje antioksidativne aktivnosti (22,24,102).

4.2.2. Antienzimski aktivnost plodova LR

Antocijani iz LR plodova prepoznati su kao ključna bioaktivna jedinjenja odgovorna za njihovu antienzimsku aktivnost, prvenstveno zbog snažnih antioksidativnih svojstava. Njihove specifične funkcionalne grupe, poput hidroksilnih grupa na aromatičnim prstenovima, omogućavaju interakciju sa aktivnim mestima enzima, što značajno doprinosi inhibiciji enzimskih aktivnosti (253). Antienzimski potencijal metanolnog ekstrakta liofilizovanih plodova LR procenjen je na osnovu sposobnosti inhibicije enzima: 15-lipooksigenaze, α -amilaze, α -glukozidaze, tirozinaze i acetilholinesteraze, a dobijeni rezultati su prikazani u **Tabeli 22**.

Tabela 22. Antienzimski aktivnost metanolnog ekstrakta liofilizovanih plodova LR

Enzim	LR	Pozitivna kontrola*
Antiinflamatorna aktivnost (IC₅₀ µg/mL ekstrakta)		
15-Lipooksigenaza	62,67 ± 0,91	/
Antienzimski aktivnost (IC₅₀ mg/mL ekstrakta)		
α -Amilaza	6,56 ± 0,27 ^a	5,17 ± 0,16 ^b
α -Glukozidaza	7,28 ± 0,15 ^a	110 ± 10,0 ^b
Tirozinaza	5,32 ± 0,05 ^a	16,43 ± 0,23 ^b
Acetilholinesteraza	5,28 ± 0,10 ^a	0,45 ± 0,06 ^b

* –rezultati izraženi u µg/mL

Lipooksigenaze su enzimi koji imaju značajnu ulogu u inflamatornim procesima, jer katalizuju sintezu leukotriena i lipoksina iz arahidonske kiseline (254). Literaturni podaci ukazuju da sastojci iz biljnih ekstrakata mogu delovati kao inhibitori LOX enzima. Međutim, njihov potencijal može varirati od slabog do veoma izraženog inhibitornog efekta (255). Prema literaturnim podacima, antiinflamatorna svojstva plodova LR se mogu pripisati polisaharidima i antocijanima (150,256). Ranije istraživanje je pokazalo da su ekstrakti plodova LR pokazali veću antiinflamatornu aktivnost u poređenju sa ekstraktima plodova LB, na osnovu stepena inhibicije enzima ciklooksigenaze-2, kao i sinteze azotnog oksida i ekspresije proinflamatornih citokina u LPS-stimulisanim BV2 mikroglialnim ćelijama (257).

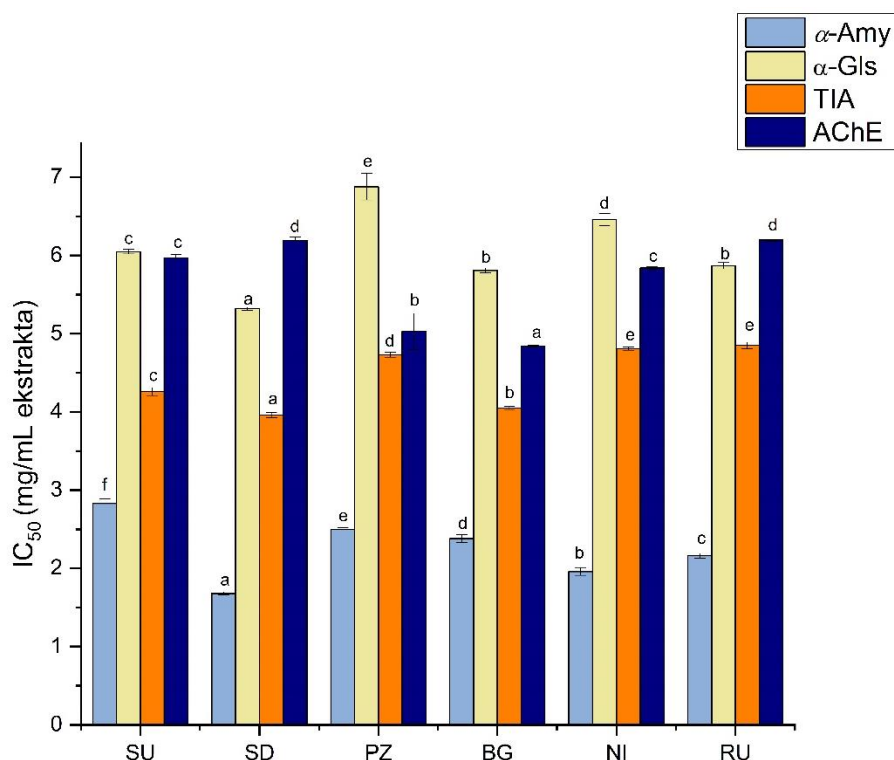
Dijabetes melitus je hronični metabolički poremećaj karakterisan povećanom koncentracijom glukoze u krvi i predstavlja globalni zdravstveni problem zbog komplikacija koje može izazvati kod pacijenata (29). U ljudskom organizmu ugljeni hidrati iz hrane podležu hidrolizi pomoću enzima pankreasne α -amilaze i intestinalne α -glukozidaze, koji su ključni u razgradnji oligosaharida i disaharida u monosaharide (22). Biljke i njihova bioaktivna jedinjenja ispitani su kao potencijalni inhibitori α -amilaze i α -glukozidaze, međutim, antidijabetski potencijal plodova *Lycium* iz Srbije još uvek nije detaljno istražen. Inhibicijom ovih enzima može se usporiti povećanje koncentracije glukoze u krvi nakon obroka, čime se smanjuje rizik od postprandijalne hiperglikemije, što je značajno za kontrolu dijabetes melitusa tipa 2. Metanolni ekstrakt plodova LR pokazao je izraženiju inhibiciju na aktivnost α -amilaze u poređenju sa α -glukozidazom, ali su obe inhibitorne aktivnosti slabije u poređenju sa akarbozom, kao kontrolnim inhibitorom (**Tabela 22**). Prethodne studije su utvrdile *in vitro* antidijabetski potencijal ekstrakata plodova LB (22,23) i LC (258). Do sada nema dostupnih literaturnih podataka o efektima ekstrakata plodova LR na inhibiciju antidijabetskih enzima. Međutim, postoje literaturni podaci da antocijani iz LR inhibiraju α -glukozidazu u kulturama ćelija *Saccharomyces cerevisiae* i *Caco-2*, sa IC₅₀ vrednostima od 1,32-1,57 µg/mL i 25,3 µg/mL, koje su uporedive sa akarbozom (259,260). Takođe, pokazano je da se tokom digestije stimuliše inhibitorni efekat antocijana na α -glukozidazu, što je verovatno posledica formiranja stabilnog tercijarnog kompleksa antocijanidin- α -glukozidaza-supstrat (260). Osim antocijana, u prethodnim istraživanjima je pokazano da fenilpropanoidi iz plodova LR, kao što je

etil-*p*-trans-kumarat, inhibiraju α -glukozidazu, sa stepenom inhibicije koji je sličan akarbozi (261). Sličan efekat je utvrđen i za pektine izolovane iz plodova LR (262).

Inhibicija acetilholinesteraze, enzima koji je uključen u razgradnju neurotransmitera acetilholina, prepoznata je kao potencijalna strategija od značaja kod neurodegenerativnih bolesti (263). Iako je metanolni ekstrakt plodova LR inhibirao AChE (IC_{50} vrednost $5,28 \pm 0,10$ mg/mL), stepen inhibicije je značajno niži u poređenju sa pozitivnom kontrolom, galantaminom. Međutim, prethodna istraživanja su ukazala na izraženiji inhibitorski efekat metanolnih ekstrakta plodova LB na AChE (23). Prema literaturnim podacima, inhibitorski efekti plodova LB se mogu pripisati karotenoidima, naročito zeaksantinu (239). U prethodnom istraživanju izvršeno je ispitivanje AChE inhibitorne aktivnosti 26 derivata fenilpropanoida izolovanih iz plodova LR. Međutim, nijedno od ispitivanih jedinjenja nije pokazalo inhibitorne efekte na aktivnost AChE (261).

Tirozinaza je enzim uključen u biosintezu melanina, čija prekomerna sinteza može dovesti do hiperpigmentacije, fotokarcinogeneze kože, kao i neurodegenerativnih oštećenja (264). Kao i kod ostalih antienzimskih aktivnosti, ekstrakt LR plodova pokazao je slabiju anti-tirozinaznu aktivnost u poređenju sa pozitivnom kontrolom, kojičnom kiselinom. Dobijeni rezultat je za oko 1,8 puta niži u odnosu na ranije utvrđeni inhibitorski efekat vodenog ekstrakta plodova LR, pripremljenog uz dodatak hlorovodonične kiseline, na enzim tirozinazu ($IC_{50} = 2,95 \pm 0,02$ mg/mL). Pored toga, u istoj studiji je izvršeno pročišćavanje antocijana iz plodova LR, koji su pokazali za oko dva puta izraženiji efekat na inhibiciju enzima tirozinaze u poređenju sa neprečišćenim ekstraktom, ali slabiji u poređenju sa kojičnom kiselinom (265).

Antienzimski potencijal metanolnih ekstrakta liofilizovanih plodova LB je prikazan na **Slici 29**.



Slika 29. Antienzimski potencijal metanolnih ekstrakata liofilizovanih plodova LB sa različitih lokaliteta (različita slova ukazuju na statističku značajnost prema *Tuckey's* testu ($p < 0,05$))

Analizirani metanolni ekstrakti plodova LB su pokazali oko dva puta izraženiji inhibicioni potencijal prema α -amilazi (IC_{50} je bio u rasponu od 1,68 do 2,83 mg/mL) u poređenju sa α -glukozidazom (IC_{50} je bio rasponu između 5,32 do 6,88 mg/mL). Međutim, inhibitorne aktivnosti na oba enzima su bile slabije u poređenju sa pozitivnom kontrolom. IC_{50} vrednosti za akarbozu su iznosile 5,27 μ g/mL za α -amilazu i 110 μ g/mL za α -glukozidazu. Izraženiji inhibicioni efekat ekstrakata plodova LB na enzim α -amilazu je u skladu sa prethodnim istraživanjem (22). Međutim, postoje podaci o izraženijoj inhibicionoj aktivnosti ekstrakata plodova LB prema enzimu α -glukozidazi u odnosu na α -amilazu (266). Neke studije su ukazale da su LBP primarno odgovorni za hipoglikemijske efekte plodova LB (102,266). Takođe, postoje podaci o potencijalnim sinergističkim efektima LBP, AA i rutina (10,139). Antienzimski efekat LBP se ostvaruje formiranjem kompleksa sa naelektrisanim regionom enzima, čime se sprečava difuzija molekula glukoze do aktivnog mesta enzima i dalja hidroliza složenih ugljenih hidrata (266). Dodatno, smatra se da i karotenoidi, posebno zeaksantin, mogu doprineti hipoglikemijskim efektima plodova LB (230).

Metanolni ekstrakti liofilizovanih plodova LB pokazali su antitirozinaznu aktivnost, sa rasponima IC_{50} vrednosti od 3,96 do 4,85 mg/mL, što je slabiji efekat u poređenju sa kojičnom kiselinom (IC_{50} 16,43 μ g/mL). Suprotno ovim rezultatima, u prethodnom istraživanju je utvrđena povezanost između sadržaja hlorogenske kiseline i inhibicije tirozinaze (267). Razlike u antitirozinaznoj aktivnosti plodova LB sa različitih lokaliteta su u skladu sa varijacijama utvrđenim za metanolne ekstrakte plodova LB iz različitih regiona Rumunije (23). Metanolni ekstrakti plodova LB su pokazali inhibicioni efekat na acetilholinesterazu, a IC_{50} vrednosti su bile u rasponu od 4,84 do 6,20 mg/mL. Svi analizirani ekstrakti su pokazali značajno slabiji inhibicioni efekat na acetilholinesterazu u poređenju sa galantaminom (IC_{50} 0,45 μ g/mL). Najizraženiji inhibicioni efekat

na acetilholinesterazu je utvrđen za ekstrakt plodova LB (BG) koji se odlikuje visokim sadržajem ukupnih polifenola, pre svega galne, kafene i ferulinske kiseline, zatim kvercetina, kao i visokim sadržajem TCC i LBP. Prema dostupnim literaturnim podacima, inhibitorna aktivnost ekstrakata plodova LB se pripisuje i prisustvu karotenoida (239).

4.2.3. Antimikrobna aktivnost plodova LB, LBa i LR

Antimikrobni potencijal metanolnih ekstrakta svežih plodova LB, LBa i LR ispitivan je na tri Gram-pozitivne i četiri Gram-negativne bakterije, kao i na gljivicu *Candida albicans*. Dobijeni rezultati su prikazani u **Tabeli 23**.

Tabela 23. Antimikrobna aktivnost svežih plodova LB, LBa i LR

Mikroorganizmi	MIC						
	LB	LBa	LR	AM	COL	CIP	FCZ
	mg/mL			µg/mL			
Gram-pozitivne bakterije							
<i>Staphylococcus aureus</i>	>2,0	>2,0	>2,0	4 (S)	N/A	0,001(S)	N/A
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	>2,0	>2,0	>2,0	8 (S)	N/A	0,001(S)	N/A
<i>Enterococcus faecalis</i>	>2,0	>2,0	>2,0	N/A	N/A	2 (S)	N/A
Gram-negativne bakterije							
<i>Escherichia coli</i>	>2,0	>2,0	>2,0	8 (S)	0,5 (S)	0,125 S)	N/A
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>2,0	2,0	>2,0	4 (S)	1 (S)	0,250(S)	N/A
<i>Salmonella abony</i>	2,0	2,0	>2,0	4 (S)	0,5 (S)	0,125(S)	N/A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,0	2,0	>2,0	16 (S)	1 (S)	0,001(S)	N/A
Gljivica							
<i>Candida albicans</i>	2,0	2,0	>2,0	N/A	N/A	N/A	2 (S)

LB– *L. barbarum* L.; LBa– *L. barbarum* var. *auranticarpum*; LR– *L. ruthenicum* Murr.; MIC– minimalna inhibitorna koncentracija; AM– amikacin; COL– kolistin; CIP– ciprofloksacin; FCZ– flukonazol; S–senzitivna; N/A–nije primenljivo

Najizraženija antimikrobna aktivnost utvrđena je za ekstrakt plodova LBa, koji je u koncentraciji od 2 mg/mL inhibirao rast tri Gram-negativne bakterije (*C. pneumoniae*, *S. aboni* i *P. aeruginosa*), kao i gljivicu *C. albicans*. Prethodno istraživanje je pokazalo da metanolni ekstrakt plodova godži inhibira rast Gram-pozitivnih (MIC 2,5–5 mg/mL) i Gram-negativnih bakterija (MIC 2,5–20 mg/mL) (25). Izraženiji antimikrobni potencijal ekstrakta plodova LBa u odnosu na ekstrakte plodova LB i LR je u skladu sa rezultatima prethodnog istraživanja i može se pripisati većem sadržaju ukupnih flavonoida (268). Pored flavonoida, antimikrobna aktivnost ekstrakata plodova godži se može pripisati i masnim kiselinama i karotenoidima (269). Izraženiji antibakterijski potencijal ekstrakta plodova LBa u odnosu na druge analizirane ekstrakte se može objasniti većim sadržajem nezasićenih masnih kiselina, posebno linolne kiseline. Suprotno ekstraktima plodova LB i LBa, ekstrakt plodova LR, koji je bogat antocijanima, nije pokazao inhibitorni efekat na rast mikroorganizama, u ispitivanim koncentracijama (0,125–2 mg/mL). Literaturni podaci ukazuju da antocijani ne podležu digestiji u intestinalnom traktu, već fermentišu do SCFA koje stupaju u interakciju sa crevnom mikrobiotom (160) i doprinose antiinflamatornim efektima u gastrointestinalnom traktu (270).

Rezultati antimikrobnog potencijala metanolnih ekstrakata liofilizovanih plodova LB sa različitih lokaliteta u Srbiji su prikazani u **Tabeli 24**.

Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da metanolni ekstrakti plodova LB ispoljavaju blagi do umereni antimikrobni potencijal. Antimikrobna aktivnost plodova LB se može pripisati bioaktivnim jedinjenjima, kao što su fenolkarboksilne kiseline. Smatra se da ovi bioaktivni sastojci interaguju sa proteinima, narušavaju integritet membrana mikroorganizama i inhibiraju njihove esencijalne enzime (29).

Literaturni podaci su pokazali da hlorogenska kiselina, u dozno-zavisnim koncentracijama ispoljava baktericidno dejstvo prema *Escherichia coli* (154). Umerena antimikrobna aktivnost ekstrakata plodova LB na *Staphylococcus* spp. i enterobakterije, poput *E. coli*, ima poseban značaj s obzirom da su ove bakterije uzročnici crevnih infekcija koje su posledica konzumiranja kontaminirane hrane. Dodatno, u jednom istraživanju je pokazano da dodatak plodova LB u dimljene riblje kobasice, može produžiti njihov rok trajanja, što se pripisuje antimikrobnom potencijalu sastojaka plodova LB (271).

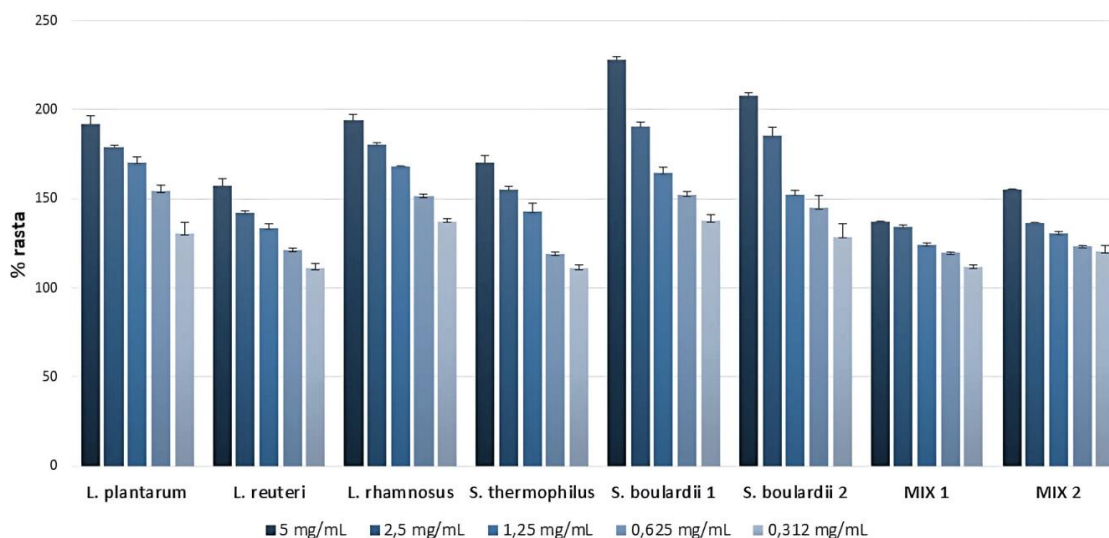
Tabela 24. Antimikrobni potencijal metanolnih ekstrakta plodova LB

Mikroorganizmi	MIC									
	SU	SD	PŽ	BG	NI	RU	AM	COL	CIP	FCZ
	mg/mL					µg/mL				
Gram-pozitivne bakterije										
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	10	10	20	10	20	4 (S)	N/A	0,001(S)	N/A
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	10	10	20	10	10	8 (S)	N/A	0,001(S)	N/A
<i>Enterococcus faecalis</i>	>20	10	20	>20	20	>20	N/A	N/A	2 (S)	N/A
Gram-negativne bakterije										
<i>Escherichia coli</i>	20	10	10	10	10	10	8 (S)	0.5 (S)	0,125 S)	N/A
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	10	10	10	10	10	4 (S)	1 (S)	0,250(S)	N/A
<i>Salmonella abony</i>	20	20	20	20	20	20	4 (S)	0,5 (S)	0,125(S)	N/A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>20	>20	>20	>20	>20	>20	16 (S)	1 (S)	0,001(S)	N/A
Gljivica										
<i>Candida albicans</i>	20	20	20	>20	>20	20	N/A	N/A	N/A	2 (S)

SU–Subotica; SD–Smederevo; PŽ–Požega; BG–Beograd; NI–Niš; RU–Ruma; MIC– minimalna inhibitorna koncentracija; AM–amikacin; COL–kolistin; CIP–ciprofloksacin; FCZ–flukonazol; S–senzitivna; N/A–nije primenljiv

4.2.4. Prebiotski potencijal plodova LR

Prebiotici su nedigestibilni ugljeni hidrati koji selektivno podstiču rast i aktivnost probiotičkih bakterija, poput *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, čime modulišu crevnu mikrobiotu i doprinose opštem zdravlju organizma (272). Pored ugljenih hidrata, polifenoli i njihovi metaboliti takođe imaju sposobnost da selektivno moduliraju crevnu mikrobiotu (273,274). Ovi prebiotski efekti polifenola su povezani sa njihovim antioksidativnim i antiinflamatornim efektima (275). S obzirom da metanolni ekstrakt plodova LR (0,125-2 mg/mL) nije pokazao inhibitornu aktivnost na rast Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, kao ni na gljivicu *Candida albicans*, u cilju ispitivanja selektivnosti njegovog delovanja ispitivan je prebiotski potencijal. Dobijeni rezultati su prikazani na **Slici 30**.



Slika 30. Prebiotski potencijal metanolnog ekstrakta plodova LR na različite probiotičke mikroorganizme (MIX 1–*Lactobacillus helveticus*, *L. rhamnosus* i *Bifidobacterium longum*; MIX 2–*Lactobacillus helveticus*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *Saccharomyces boulardii*)

Pokazano je da metanolni ekstrakt plodova LR u koncentracijama od 0,3 do 5,0 mg/mL, na dozno-zavisan način pospešuje rast probiotičkih sojeva mikroorganizama, u rasponu od 111,4 % do 229,2 % u odnosu na kontrolu. Posebno izražen prebiotski potencijal je utvrđen na rast *Saccharomyces boulardii*, čiji rast je stimulisan 2,8 puta u poređenju sa kontrolom. Utvrđeni prebiotski efekti ekstrakta plodova LR se mogu pripisati antocijanima, što je u skladu sa literaturnim podacima (276). Istraživanja na animalnim modelima su pokazala da antocijani iz plodova LR modulacijom crevne mikrobiote, mogu pozitivno uticati na regulaciju telesne mase i smanjenje rizika od gojaznosti (277,278).

4.3. Treća faza istraživanja

Kako bi se dobio detaljniji uvid u biološku aktivnost ekstrakata plodova LB, u ovoj fazi istraživanja izvršena je optimizacija procesa ekstrakcije odabranih bioaktivnih sastojaka plodova LB, kao i biološka karakterizacija dobijenih ekstrakata.

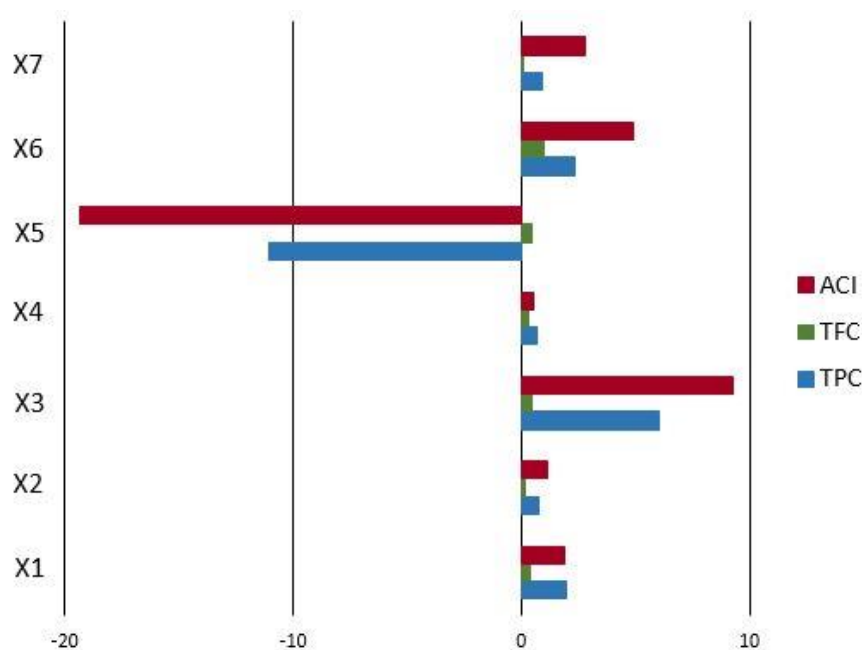
4.3.1. Skrining faktora koji utiču na ekstrakciju TPC, TFC i antioksidativnu aktivnost

Skrining test je sproveden sa ciljem identifikacije glavnih faktora koji utiču na sadržaj ukupnih polifenola (TPC) i flavonoida (TFC), kao i na rezultate *in vitro* antioksidativne aktivnosti, izražene kroz vrednosti antioksidativnog kompozitnog indeksa (ACI) za plodove LB, a rezultati su predstavljeni u **Tabeli 25** i grafički (**Slika 31**).

Tabela 25. Sadržaji ukupnih polifenola (TPC) i ukupnih flavonoida (TFC), kao i vrednosti antioksidativnog kompozitnog indeksa (ACI) u toku faze skrininga za plodove LB

X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	TPC	TFC	ACI
-1	-1	-1	1	-1	1	1	24,21	1,18	81,34
1	-1	-1	-1	1	-1	1	2,78	0,13	27,76
1	1	-1	-1	-1	1	-1	35,03	1,58	90,86
-1	1	1	-1	-1	-1	1	22,09	0,39	62,48
1	-1	1	1	-1	-1	-1	22,82	1,64	49,27
-1	1	-1	1	1	-1	-1	2,72	0,31	27,50
-1	-1	1	-1	1	1	-1	2,91	3,08	27,92
1	1	1	1	1	1	1	7,22	4,90	46,39

X₁ – temperatura; X₂ – vreme; X₃ – odnos između droge i rastvarača; X₄ – tretman ultrazvukom; X₅ – koncentracija etanola; X₆ – mešanje; X₇ – prethodna maceracija; TPC –sadržaj ukupnih polifenola (mg GAE/g); TFC –sadržaj ukupnih flavonoida (mg CE/g); ACI –antioksidativni kompozitni indeks (%)



Slika 31. Uticaj ispitivanih faktora (X_1 – temperatura, X_2 – vreme, X_3 – odnos između droge i rastvarača, X_4 – tretman ultrazvukom, X_5 – koncentracija etanola, X_6 – mešanje, X_7 – prethodna maceracija) na ekstrakciju TPC, TFC i ACI za plodove LB

Dobijeni rezultati su pokazali da povećanje temperature (X_1) ima pozitivan uticaj na ekstrakciju fenolnih jedinjenja (**Slika 31**). Ovaj efekat se može objasniti olakšanim oslobađanjem polifenola iz biljnog materijala, usled narušavanja strukture ćelijskih zidova, povećane permeabilnosti i ubrzane difuzije u rastvarač. Takođe, povećanje temperature smanjuje viskoznost rastvarača, čime se omogućava brži prenos mase i povećava efikasnost ekstrakcije (279,280). Osim toga, povećanje TPC doprinosi izraženijoj antioksidativnoj aktivnosti ekstrakta plodova LB (281). Međutim, prekomerno povećanje temperature može dovesti do degradacije termolabilnih bioaktivnih jedinjenja usled oksidacije, enzimske degradacije ili razgradnje. Stoga je važno odrediti optimalnu temperaturu koja omogućava maksimalan prinos polifenola uz očuvanje njihove strukture i antioksidativnog potencijala (209). Vreme ekstrakcije (X_2) nije pokazalo značajan uticaj na sadržaj TPC i TFC, kao ni na vrednosti ACI. Zbog toga je u narednim fazama eksperimenata primenjeno najkraće vreme ekstrakcije od 30 minuta. Kraća dužina procesa ekstrakcije ima brojne prednosti u pogledu energetske efikasnosti, ekonomičnosti i smanjenja rizika od degradacije termolabilnih bioaktivnih jedinjenja, povećavajući kvalitet ekstrakata (282). U prethodnoj studiji optimizacije ekstrakcije plodova LB je takođe pokazano povećanje prinosa ekstrakcije sa produženjem vremena ekstrakcije sa 10 na 30 minuta. Međutim, daljim produženjem vremena ekstrakcije prinos ekstrakcije se smanjio, što se može objasniti hidrolizom i delimičnom degradacijom bioaktivnih jedinjenja plodova LB (283).

Različiti odnosi droge i rastvarača imaju značajan uticaj na prinos ekstrakta. Stoga optimalan odnos droge i rastvarača obezbeđuje postizanje maksimalne ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja (284). Kao ključni parametar u procesu optimizacije, odnos droga/rastvarač (X_3), direktno utiče na ukupni sadržaj TPC, TFC i antioksidativnu aktivnost u dobijenim ekstraktima. Povećanjem zapremine rastvarača stvara se veći gradijent koncentracije između biljnog materijala i rastvarača, čime se pospešuje difuzija i ekstrakcija bioaktivnih jedinjenja. Povećanjem zapremine rastvarača se smanjuje zasićenost sistema, sprečava inhibicija ekstrakcije usled prezasićenja jedinjenjima. Međutim, nakon dostizanja ravnotežnog stanja, dalji porast prinosa ekstrakcije se zaustavlja, zbog čega je neophodno definisati optimalan odnos droge i rastvarača. Upotreba velikih

količina rastvarača može značajno povećati troškove i kompleksnost kasnijih faza koje uključuju uklanjanje rastvarača (184,283).

Pokazano je da veća koncentracija etanola (X_5) negativno utiče na vrednosti sadržaja TPC, a pozitivno na TFC. Zbog toga je bilo važno odrediti optimalnu koncentraciju etanola, kako bi se postigao maksimalni prinos ekstrakcije ciljnih bioaktivnih jedinjenja. Povećanje koncentracije etanola može negativno uticati na sadržaj TPC usled denaturacije ili precipitacije određenih polifenolnih jedinjenja, čime se smanjuje njihova rastvorljivost. Dodatno, veća koncentracija etanola može ubrzati oksidaciju polifenola, što dovodi do gubitaka bioaktivnih jedinjenja i smanjenja kvaliteta ekstrakta.

Tretman ultrazvukom (X_4), mešanje (X_6) i prethodna maceracija (X_7) su dovele do značajnog poboljšanja prinosa ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja, kao i antioksidativne aktivnosti dobijenih ekstrakata, zbog čega su ovi faktori uključeni u dalji proces optimizacije. Tretman ultrazvukom kroz mehaničke efekte ultrazvučnih talasa, povećava permeabilnost ćelijskih membrana i olakšava difuziju polifenola u rastvarač, čime se povećava antioksidativni potencijal dobijenih ekstrakata (283). Kontinuirano mešanje tokom procesa ekstrakcije doprinosi ravnomernijoj distribuciji rastvarača i poboljšanja kontakta sa biljnim materijalom, dok prethodna maceracija omogućava duže izlaganje biljnog materijala rastvaraču, što dodatno pospešuje oslobađanje i stabilnost polifenolnih jedinjenja.

Na osnovu rezultata dobijenih tokom faze skrininga, utvrđeno je da su najznačajniji faktori koji utiču na sadržaj bioaktivnih jedinjenja (TPC i TFC) i antioksidativni potencijal (ACI): vreme trajanja ekstrakcije (X_2), odnos između droge i rastvarača (X_3) i koncentracija etanola (X_5). Ovi parametri su dodatno optimizovani primenom metodologije površine odgovora. Eksperimenti su izvedeni nakon početne maceracije od 30 minuta, pri konstantnoj temperaturi od 40°C i uz kontinuirano mešanje, kako bi se postigli optimalni uslovi za efikasnu ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja.

4.3.2. Optimizacija ekstrakcije primenom metodologije površine odgovora

4.3.2.1. Statistička procena modela

Statistička analiza značajnosti modela, sprovedena primenom analize varijanse (ANOVA), omogućila je identifikaciju značajnih faktora, što je prikazano u **Tabeli 26**. Kvadratni modeli koji opisuju uticaj ispitivanih faktora na ekstrakciju ukupnih polifenola (TPC), flavonoida (TFC) i antioksidativni potencijal (ACI) u plodovima godži pokazali su se kao statistički značajni ($p < 0,05$). Visoki koeficijenti determinacije (R^2) za TPC (0,97), TFC (0,92) i ACI (0,99) ukazuju na dobro slaganje između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti, što ukazuje na pouzdanost modela. Pored toga, statistički neznačajni rezultati za „*Lack of Fit*“ test ($p > 0,05$) potvrđuju da ovi modeli adekvatno opisuju zavisnost između ispitivanih faktora i odgovora.

Tabela 26. Statistički parametri nakon prilagođavanja eksperimentalnih podataka kvadratnim modelima

	df	Suma kvadrata	Srednji kvadrat	F-vrednost	p-vrednost
TPC					
Model	4	108,12	27,03	74,48	<0,0001
A – Koncentracija etanola	1	12,55	12,55	34,58	0,0002
B – Odnos droga/rastvarač	1	83,92	83,92	231,21	<0,0001
A ²	1	8,09	8,09	22,28	0,0008
B ²	1	4,36	4,36	12	0,0061
Ukupna greška	10	3,63	0,36		
<i>Lack of Fit</i>	8	3,11	0,39	1,48	0,4641
Eksperimentalna greška	2	0,52	0,26		
Ukupno	14	111,75			
R ²	0,97				
TFC					
Model	4	0,99	0,25	29,65	<0,0001
A – Koncentracija etanola	1	0,63	0,63	75,14	<0,0001
B – Odnos droga/rastvarač	1	0,19	0,19	22,29	0,0008
A ²	1	0,10	0,10	12,46	0,0055
B ²	1	0,061	0,061	7,26	0,0226
Ukupna greška	10	0,083	8,35*10 ⁻³		
<i>Lack of Fit</i>	8	0,049	6,08*10 ⁻³	0,35	0,8850
Eksperimentalna greška	2	0,035	0,017		
Ukupno	14	1,07			
R ²	0,92				
ACI					
Model	3	3250,08	1083,36	497,78	<0,0001
A – Koncentracija etanola	1	33,25	33,25	15,28	0,0024
B – Odnos droga/rastvarač	1	3188,81	3188,81	1465,19	<0,0001
B ²	1	28,01	28,01	12,87	0,0043
Ukupna greška	11	23,94	2,18		
<i>Lack of Fit</i>	9	19,79	2,20	1,06	0,5754
Eksperimentalna greška	2	4,15	2,07		
Ukupno	14	3274,02			
R ²	0,99				

TPC–sadržaj ukupnih polifenola; TFC–sadržaj ukupnih flavonoida; ACI–antioksidativni kompozitni indeks; R²–koeficijent determinacije

Rezultati eksperimenata u skladu sa BBD dizajnom za TPC, TFC i ACI za plodove LB su predstavljeni u **Tabeli 27**.

Tabela 27. Rezultati optimizacije ekstrakcije u skladu sa BBD dizajnom za plodove LB

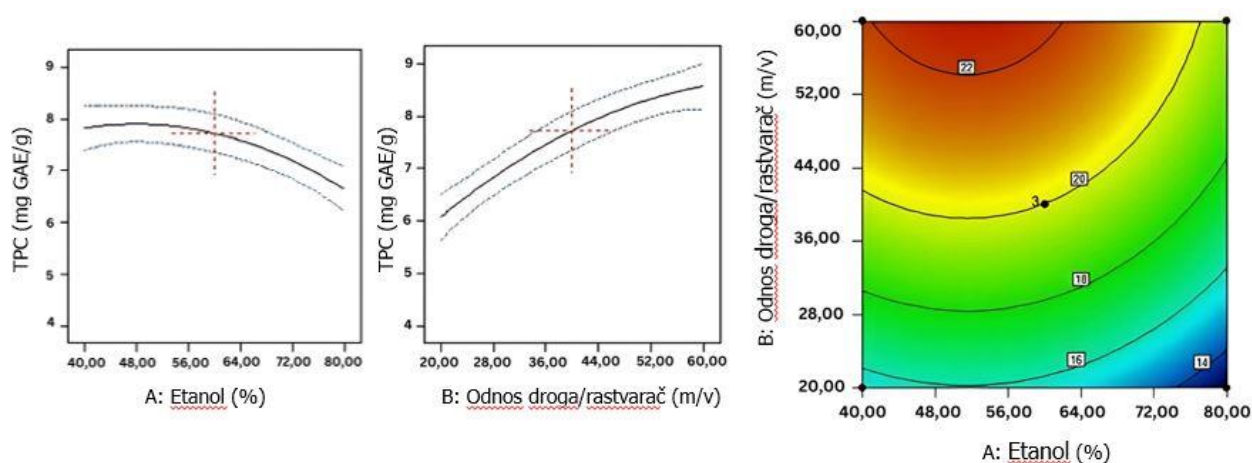
N°	Nezavisne varijable			Odgovori		
	A	B	C	TPC	TFC	ACI
1	40 (-1)	20 (-1)	60 (0)	15,53	0,91	50,24
2	80 (1)	20 (-1)	60 (0)	13,01	1,26	46,32
3	40 (-1)	60 (1)	60 (0)	21,36	1,10	88,11
4	80 (1)	60 (1)	60 (0)	19,48	1,76	86,84
5	40 (-1)	40 (0)	30 (-1)	19,56	1,04	75,68
6	80 (1)	40 (0)	30 (-1)	17,82	1,59	68,55
7	40 (-1)	40 (0)	90 (1)	20,43	1,02	73,57
8	80 (1)	40 (0)	90 (1)	16,55	1,69	69,58
9	60 (0)	20 (-1)	30 (-1)	14,85	0,88	48,62
10	60 (0)	60 (1)	30 (-1)	22,04	1,16	90,91
11	60 (0)	20 (-1)	90 (1)	16,31	0,94	49,66
12	60 (0)	60 (1)	90 (1)	22,73	1,18	88,70
13	60 (0)	40 (0)	60 (0)	19,78	1,34	69,18
14	60 (0)	40 (0)	60 (0)	19,42	1,08	71,76
15	60 (0)	40 (0)	60 (0)	20,43	1,25	71,58

A–koncentracija etanola (%); B–odnos droga/rastvarač (*m/v*); C–vreme trajanja (min); TPC–sadržaj ukupnih polifenola (mg GAE/g); TFC–sadržaj ukupnih flavonoida (mg CE/g); ACI–antioksidativni kompozitni indeks (%)

4.3.2.2. Analiza uticaja odabranih nezavisnih varijabli na sadržaj TPC

Analiza uticaja odabranih nezavisnih varijabli (koncentracija etanola, odnos droga/rastvarač i vreme trajanja) na sadržaj ukupnih polifenola (TPC) pokazala je da je sadržaj ekstrahovanih TPC bio u rasponu od 13,01 do 22,73 mg GAE/g, pri čemu je maksimalni sadržaj TPC postignutim primenom 60% (v/v) etanola, tokom 90 minuta ekstrakcije, uz optimalni odnos droga/rastvarač od 1:60 (m/v) (Tabela 27). Prema literaturnim podacima, slične vrednosti TPC (17,92 mg GAE/g) su dobijene tokom procesa ekstrakcije na temperaturi od 89,38°C, koncentraciji etanola od 70% i vremenu ekstrakcije od 13 minuta (209). U drugom istraživanju, maksimalni sadržaj TPC postignut je nakon ekstrakcije na temperaturi od 60°C, pri čemu se sa daljim povećanjem temperature sadržaj TPC smanjivao, verovatno usled termičke degradacije termolabilnih fenolnih jedinjenja (283).

Uticaj ispitivanih faktora na sadržaj ukupnih polifenola (TPC) za plodove LB je predstavljen na Slici 32.



Slika 32. Uticaji koncentracije etanola i odnosa droga/rastvarač na TPC za plodove LB

Matematička jednačina, koja opisuje ovu zavisnost korišćenjem kodiranih vrednosti faktora, je:

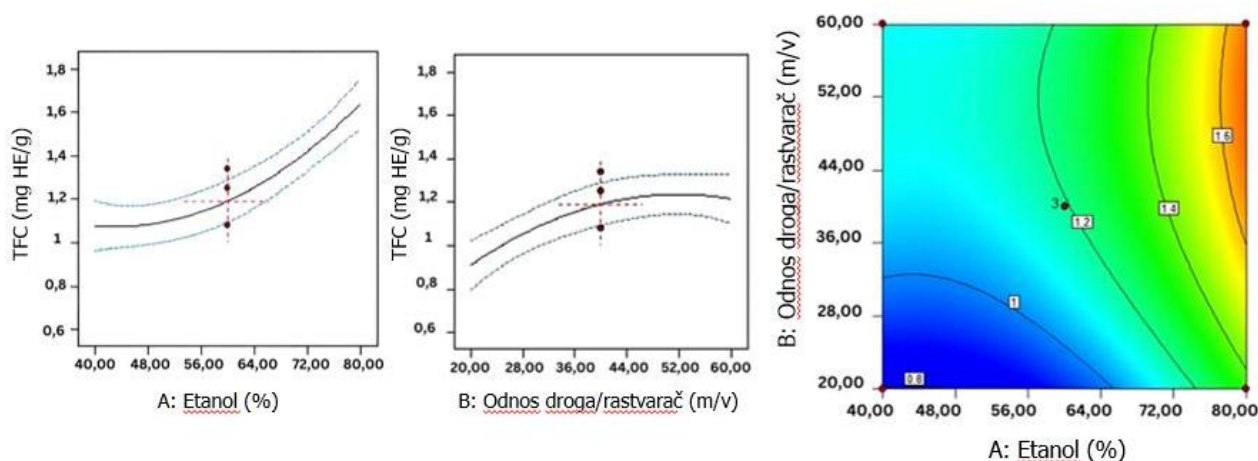
$$TPC (mg GAE/g droge) = 19,98 - 1,25 \times A + 3,24 \times B - 1,48 \times A^2 - 1,08 \times B^2 \quad (27)$$

Rezultati su pokazali značajan uticaj koncentracije etanola, odnosa droga/rastvarač i njihov kvadratni efekat na vrednosti TPC. Odnos droga/rastvarač je imao značajan pozitivan uticaj, dok je povećanje koncentracije etanola negativno uticalo na sadržaj ukupnih polifenola. Prethodna istraživanja su takođe pokazala da je optimalna koncentracija etanola za ekstrakciju polifenola iz plodova LB između 50-70 %, pri čemu sa povećanjem koncentracije dolazi do smanjenja sadržaja TPC (209).

4.3.2.3. Analiza uticaja odabranih nezavisnih varijabli na sadržaj TFC

Analiza uticaja odabranih nezavisnih varijabli (koncentracija etanola, odnos droga/rastvarač i vreme trajanja) na ekstrakciju ukupnih flavonoida (TFC) pokazala je da su dobijeni sadržaji TFC za plodove LB bili između 0,88 i 1,76 mg CE/g. Najveće vrednosti TFC su dobijene upotrebom 80% (v/v) etanola, tokom 60 minuta, pri odnosu droga/rastvarač 1:60 (m/v) (Tabela 27).

Uticaj faktora na sadržaj ukupnih flavonoida (TFC) za plodove LB je predstavljen na Slici 33.



Slika 33. Uticaji koncentracije etanola i odnosa droga/rastvarač na TFC za plodove LB

Matematička jednačina, koja opisuje ovu zavisnost korišćenjem kodiranih vrednosti faktora, glasi:

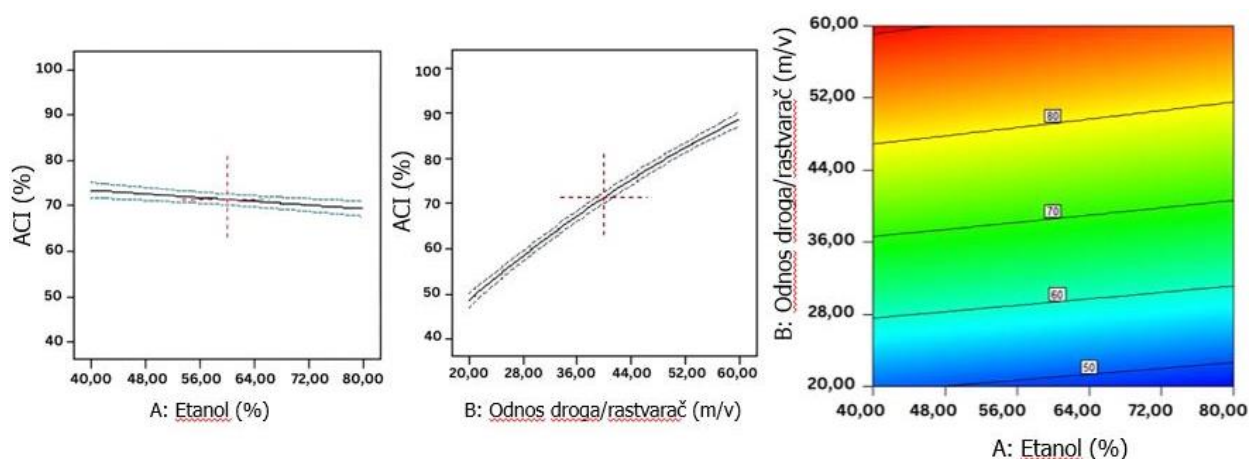
$$TFC (mg CE/g droge) = 1,19 + 0,28 \times A + 0,15 \times B + 0,17 \times A^2 - 0,13 \times B^2 \quad (28)$$

Rezultati su pokazali da značajan uticaj na vrednosti TFC u ekstraktima plodova LB imaju koncentracija etanola, odnos droga/rastvarač i njihov kvadratni efekat vremena, pri čemu su koncentracija etanola i odnos droga/rastvarač pokazali pozitivan uticaj.

4.2.3.4. Analiza uticaja odabranih nezavisnih varijabli na vrednosti ACI

Analiza uticaja odabranih nezavisnih varijabli (koncentracija etanola, odnos droga/rastvarač i vreme trajanja) na rezultate *in vitro* testova ispitivanja antioksidativne aktivnosti, izražene kao vrednosti ACI indeksa za plodove LB su bile u opsegu 46,32 i 90,91 %. Najviše ACI vrednosti su postignute upotrebom 60% (v/v) etanola, tokom 30 minuta, pri čemu je odnos droga/rastvarač bio 1:60 (m/v) (Tabela 27).

Uticaj faktora na vrednosti ACI ekstrakata plodova LB su prikazani na Slici 34.



Slika 34. Uticaji koncentracije etanola i odnosa droga/rastvarač na ACI za plodove LB

Matematička jednačina, koja opisuje ovu zavisnost korišćenjem kodiranih vrednosti faktora, je:

$$ACI(\%) = 71,41 - 2,04 \times A + 19,96 \times B - 2,74 \times B^2 \quad (29)$$

Rezultati su pokazali značajan uticaj koncentracije etanola, odnosa droga/rastvarač i kvadratnog efekta odnosa droga/rastvarač na vrednosti ACI. Odnos droga/rastvarač je imao višestruko izraženiji pozitivan uticaj, dok je povećanje koncentracije etanola negativno uticalo na antioksidativnu aktivnost ekstrakata.

Na osnovu dobijenih rezultata optimizacije ekstrakcije predloženo je da se ekstrakcija plodova LB izvede pod sledećim definisanim uslovima: ekstrakcija 60% etanolom, uz prethodnu maceraciju od 30 minuta na sobnoj temperaturi, pri odnosu droga/rastvarač od 1:60 i vremenu ekstrakcije od 30 minuta uz konstantno mešanje tokom ovog procesa.

Dobijeni rezultati bioaktivnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti dobijenih ekstrakata plodova LB pod optimizovanim uslovima ekstrakcije su predstavljeni u **Tabeli 28**.

Tabela 28. Bioaktivna jedinjenja i antioksidativna aktivnosti LB plodova nakon optimizacije procesa ekstrakcije

Uzorak	TPC	HK	KK	FK	TFC	LBP	ACI
SU	25,40	19,78±0,30	3,84±2,03	27,01±5,34	1,05	708,33	98,55
SD	21,67	nd	6,77±3,25	28,57±0,51	0,72	1061,97	77,15
PZ	15,47	3,24±0,56	nd	14,68±2,64	0,59	681,52	70,21
BG	24,36	5,26±0,25	11,55±7,77	13,42±1,37	0,63	850,76	79,10
NI	22,70	10,41±2,62	nd	12,06±0,61	0,58	822,58	75,15
RU	17,23	4,10±2,87	nd	16,43±0,38	0,53	575,00	69,34

SU–Subotica; SD–Smederevo; PZ–Požega; BG–Beograd; NI–Niš; RU–Ruma; TPC–sadržaj ukupnih polifenola (mg GAE/g); HK–hlorogenska kiselina (mg/g); KK–kafena kiselina (mg/g); FK–ferulinska kiselina (mg/g); TFC–sadržaj ukupnih flavonoida (mg CE/g); LBP–sadržaj ukupnih polisaharida (mg Glu/g); ACI–antioksidativni kompozitni indeks (%); nd–nije detektovano

Rezultati analize hemijskog sastava i antioksidativnog potencijala plodova LB sa šest lokaliteta u Srbiji ukazuju na značajne razlike pre i nakon optimizacije postupka ekstrakcije. Pre optimizacije, ekstrakcija je sprovedena korišćenjem metanola kao rastvarača, uz odnos droga/rastvarač od 1:10 (*m/v*) i trajanju od 24 sata. Iako su ovi rezultati omogućili osnovni uvid u sadržaj bioaktivnih sastojaka i biološku aktivnost dobijenih ekstrakata plodova godži, korišćena metoda ekstrakcije nije bila optimalna, što je ograničilo prinos bioaktivnih jedinjenja, naročito TPC i LBP (**Tabela 20**).

Optimizacija postupka ekstrakcije sprovedena korišćenjem 60% etanola, povećanim odnosom droga/rastvarač na 1:60 (*m/v*) i skraćanjem trajanja na 30 minuta, značajno je povećala prinos bioaktivnih jedinjenja i antioksidativni potencijal ispitanih uzoraka. Najveći sadržaji TPC i TFC zabeleženi su kod uzorka SU, dok su uzorci PŽ i RU imali najniže vrednosti. U pogledu sadržaja LBP, uzorak SD se izdvojio sa najvišim vrednostima, dok je uzorak RU pokazao najniži sadržaj. Očekivano, najsnažniji antioksidativni potencijal (ACI) zabeležen je kod uzorka SU, a najslabiji kod uzorka RU i PŽ. Uprkos utvrđenim varijacijama između ekstrakata plodova sa različitih lokaliteta, dobijeni rezultati jasno ukazuju na povećanje antioksidativnog potencijala ekstrakata godži plodova nakon optimizovanog postupka ekstrakcije.

Dobijeni rezultati antienzijske aktivnosti dobijenih ekstrakata plodova LB pod optimizovanim uslovima ekstrakcije su predstavljeni u **Tabeli 29**.

Tabela 29: Antienzijska aktivnosti LB plodova nakon optimizacije procesa ekstrakcije

Uzorak	Antienzijska aktivnost (IC ₅₀ mg/mL ekstrakta)			
	α -Amilaza	α -Glukozidaza	Tirozanaza	Acetilholinesteraza
SU	2,56 ± 0,04	4,02 ± 0,05	3,13 ± 0,02	4,82 ± 0,02
SD	1,60 ± 0,02	3,72 ± 0,05	2,63 ± 0,02	5,14 ± 0,01
PŽ	2,30 ± 0,06	4,53 ± 0,03	3,44 ± 0,03	4,71 ± 0,03
BG	2,12 ± 0,01	3,96 ± 0,03	2,73 ± 0,03	4,30 ± 0,01
NI	2,08 ± 0,03	4,34 ± 0,05	3,73 ± 0,03	4,73 ± 0,07
RU	1,94 ± 0,01	4,07 ± 0,13	3,90 ± 0,07	5,49 ± 0,11

SU–Subotica; SD–Smederevo; PŽ–Požega; BG–Beograd; NI–Niš; RU–Ruma

Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da ekstrakti plodova LB pripremljeni pod definisanim uslovima ekstrakcije pokazuju izraženiju antienzijsku aktivnost, u poređenju sa metanolnim ekstraktima bez procesa optimizacije ekstrakcije.

4.4. Četvrta faza istraživanja

U okviru četvrte faze istraživanja izvršena je analiza hemijskog sastava sporednih proizvoda prerade plodova LB, uključujući pulpu (nastalu nakon ceđenja soka) i pogaču (ostatak nakon ceđenja ulja iz semena). Takođe, izvršena je optimizacija procesa ekstrakcije, kao i analiza antioksidativnih i antienzimskih aktivnosti ekstrakata sporednih proizvoda prerade plodova LB.

4.4.1. Nutritivni sastav i energetska vrednost sporednih proizvoda prerade plodova LB

Nutritivni sastav i energetska vrednost sporednih proizvoda prerade plodova godži prikazani su u **Tabeli 30**.

Tabela 30. Nutritivni sastav i energetska vrednost sporednih proizvoda prerade plodova LB

	Pulpa	Pogača
Nutritivni sastav		
Energetska vrednost (kJ/100g)	1484 ± 12,6 ^a	1737 ± 6,73 ^b
Vlaga (%)	12,2 ± 0,42 ^a	10,6 ± 0,12 ^b
Pepeo (%)	5,05 ± 0,14 ^a	2,93 ± 0,08 ^b
Ukupne masti (%)	3,82 ± 0,35 ^a	13,3 ± 0,47 ^b
Ukupni proteini (%)	16,8 ± 0,17 ^a	19,6 ± 0,09 ^b
Dostupni ugljeni-hidrati	62,2 ± 0,25 ^a	53,6 ± 0,73 ^b
UDV ¹	51,17 ± 0,73 ^a	59,84 ± 0,27 ^b
NDV ²	44,66 ± 0,53 ^a	52,40 ± 0,13 ^b
RDV ³	6,51 ± 0,20 ^a	7,44 ± 0,14 ^b

¹UDV–ukupna dijetna vlakna; ²NDV–nerastvorna dijetna vlakna; ³RDV–rastvorna dijetna vlakna; različita slova u istom redu ukazuju na statističku značajnost ($p < 0,05$)

Analizirani sporedni proizvodi prerade plodova LB pokazuju značajne razlike u osnovnom nutritivnom sastavu i energetske vrednosti ($p < 0,05$). Nutritivni profil nusproizvoda zavisi od vrste voća, primenjenih tehnoloških postupaka i sezonskih varijacija. Ostaci iz procesa prerade voća, uglavnom sadrže veće količine ugljenih hidrata, uz manji sadržaj proteina i masti (285). Energetska vrednost pulpe je bila statistički značajno manja ($p < 0,05$) u poređenju sa pogačom, što je i očekivano zbog visokog sadržaja masti koji zaostaje nakon ekstrakcije ulja iz semenki godži. Sadržaj ukupnog pepela, koji ukazuje na sadržaj minerala, značajno je veći u pulpi, nego u pogači. Ukupni sadržaj masti u pogači je bio oko 3,5 puta veći nego u pulpi. Sadržaj ukupnih proteina u pulpi je iznosio 16,8 %, dok je u pogači bio 19,6 %. Određeni sadržaji proteina u sporednim proizvodima prerade plodova LB su veći u odnosu na literaturne podatke o sadržaju proteina u nusproizvodima kupine i borovnice (286, 287). Takođe, dobijene razlike u sadržaju proteina između pulpe i pogače su u skladu sa literaturnim podacima (288). Ugljeni-hidrati su najzastupljeniji sastojci u sporednim proizvodima prerade plodova LB. Sadržaj NDV i RDV u pulpi i pogači iznosio je 6,51 % i 44,66 %, odnosno 7,44 % i 52,40 %, što ove nusproizvode svrstava u kategoriju „bogatih izvora vlakana“ (56). S obzirom da nusproizvodi prehrambene industrije postaju sve važniji izvori proteina i dijetnih vlakana, ovi rezultati ukazuju na povoljan nutritivni profil nusproizvoda prerade plodova LB i njihov potencijalni značaj u proizvodnji obogaćenih namirnica.

4.4.2. Masno-kiselinski sastav sporednih proizvoda prerade plodova LB

Identifikovano je prisustvo pet masnih kiselina u sporednim proizvodima prerade plodova LB. Relativni sadržaj masnih kiselina (% od ukupnih masnih kiselina), odnos pojedinih klasa masnih kiselina i lipidni indeksi u sporednim proizvodima prerade plodova LB su predstavljeni u **Tabeli 31**.

Tabela 31. Sastav masnih kiselina i lipidni indeksi u sporednim proizvodima prerade plodova LB

Masne kiseline (%)		Uzorak	
Skraćenice	Naziv	Pulpa	Pogača
C16:0	Palmitinska kiselina	17,03 ± 0,15 ^c	6,42 ± 0,01 ^e
C18:0	Stearinska kiselina	3,87 ± 0,09 ^c	3,38 ± 0,01 ^b
C18:1 ω -9	Oleinska kiselina	24,98 ± 0,18 ^b	15,61 ± 0,17 ^c
C18:2 ω -6	Linolna kiselina	42,29 ± 0,43 ^d	72,17 ± 0,22 ^b
C18:3 ω -3	α -Linolenska kiselina	11,86 ± 0,24 ^d	1,65 ± 0,03 ^b
Σ ZMK	Zasićene MK	20,91 ± 0,09 ^c	9,80 ± 0,02 ^d
Σ PNMK	Polinezasićene MK	54,15 ± 0,22 ^c	73,82 ± 0,24 ^a
Σ NMK	Nezasićene MK	79,13 ± 0,08 ^b	89,43 ± 0,07 ^c
PNMK/ZMK	Polinezasićene/Zasićene	2,59 ± 0,02 ^d	7,53 ± 0,04 ^b
AI	Indeks aterogenosti	0,26 ± 0,00 ^d	0,11 ± 0,00 ^e
TI	Indeks trombogenosti	0,30 ± 0,00 ^d	0,20 ± 0,00 ^f
Oksidativna stabilnost i bezbednost ulja			
Cox	Izračunata oksidativnost	7,17 ± 0,02 ^d	7,95 ± 0,03 ^a
OS	Oksidativna stabilnost	3114 ± 9,30 ^d	3428 ± 11,6 ^a

Različita slova u istom redu ukazuju na statističku značajnost ($p < 0,05$)

Uprkos sličnim profilima masnih kiselina, zapažene su značajne razlike u relativnim procentima pojedinačnih masnih kiselina među ispitivanim nusproizvodima. Pulpa sadrži veći udeo palmitinske i oleinske kiseline u poređenju sa pogačom, dok pogača ima značajno veći procenat linolne kiseline. Slični rezultati rezultati su utvrđeni za pulpu i semenke vrste *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. uzgajane u Tunisu (289). Linolna kiselina dominira i u nusproizvodima grožđa sa sadržajem od približno 60 % (290). Veći sadržaj ZMK u pulpi, koje su otporne na oksidaciju, ukazuje na mogućnost primene u formulacijama koje zahtevaju duži rok trajanja. Sa druge strane, visok sadržaj NMK u pogači, doprinosi nutritivnoj vrednosti i ovaj nusproizvod čini pogodnim za primenu kao funkcionalnog sastojka u namirnicama.

Odnos PNMK i ZMK, koji optimalno treba da bude najmanje 0,5 je značajno veći u pogači u poređenju sa pulpom. Lipidni indeksi, AI i TI, ukazuju dodatno na povoljne lipidne profile analiziranih nusproizvoda. Dobijene vrednosti za AI i TI podržavaju antiaterogeni i antitrombogeni potencijal nusproizvoda plodova godži, pri čemu niže vrednosti ovih indeksa u pogači ukazuju na potencijalno povoljniji efekat u odnosu na pulpu. Ovo je u skladu sa rezultatima dobijenim za plodove LB sa lokaliteta u Beogradu, od kojih potiču ovi nusproizvodi (291).

Pogača pokazuje nešto viši Cox indeks u poređenju sa pulpom, što ukazuje na veću sklonost oksidaciji, usled većeg sadržaja PNMK, naročito linolne kiseline. Međutim, oksidativna stabilnost pogače ostaje relativno visoka, što je korisno za skladištenje. Studije na nusproizvodima borovnice pokazuju da proizvodi bogati ω -6 masnim kiselinama imaju viši Cox indeks, ali se njihova stabilnost može poboljšati dodatkom antioksidanasa. Nusproizvodi prerade plodova godži, posebno pogača bi se mogli optimizovati dodavanjem prirodnih antioksidanasa, čime bi se produžio rok trajanja i poboljšala nutritivna vrednost u funkcionalnim prehrambenim proizvodima (292).

4.4.3. Mineralni sastav sporednih proizvoda prerade plodova LB

Sadržaj makro- i mikrominerala u sporednim proizvodima prerade plodova godži je predstavljen u **Tabeli 32**.

Tabela 32. Mineralni sastav sporednih proizvoda prerade plodova LB

Naziv	Skraćenica	Pulpa	Pogača
Makroelementi (mg/100g)			
Natrijum	Na	57,54 ± 23,12 ^b	121,4 ± 26,01 ^c
Kalijum	K	1661,3 ± 18,96 ^b	724,8 ± 4,9 ^a
Kalcijum	Ca	59,34 ± 0,71 ^b	67,17 ± 0,80 ^c
Magnezijum	Mg	98,35 ± 4,51 ^a	72,42 ± 5,33 ^b
Fosfor	P	500,5 ± 6,76 ^a	654,6 ± 5,23 ^b
Sumpor	S	204,3 ± 2,81 ^b	229,7 ± 2,76 ^a
Mikroelementi (mg/100g)			
Bakar	Cu	1,39 ± 0,00 ^b	1,12 ± 0,00 ^a
Cink	Zn	2,69 ± 0,02 ^a	2,71 ± 0,02 ^b
Mangan	Mn	0,67 ± 0,00 ^a	0,34 ± 0,00 ^b
Gvožđe	Fe	5,71 ± 0,02 ^a	2,45 ± 0,00 ^b
Hrom	Cr	0,04 ± 0,01 ^b	0,03 ± 0,00 ^a
Kobalt	Co	0,003 ± 0,00	nd
Selen	Se	nd	0,004 ± 0,00 ^a
Bor	B	1,24 ± 0,01 ^a	0,63 ± 0,01 ^a

nd–nije detektovano; NRV–nutritivna referentna vrednost; različita slova u istom redu ukazuju na statističku značajnost ($p < 0,05$)

Statistički značajne razlike su utvrđene u mineralnom sastavu između sporednih proizvoda prerade plodova godži. Kalijum je bio najzastupljeniji makroelement u oba analizirana nusproizvoda, što je potvrđeno i u drugim nusproizvodima plodova, poput jabuka, grožđa i banana (285,293). Pulpa zadržava veći deo minerala karakterističnih za plod, uključujući značajne koncentracije gvožđa, koje ima esencijalnu ulogu u enzimskim procesima i sintezi hemoglobina. Sporedni sastojci plodova borovnice i crnog grožđa takođe sadrže gvožđe, ali u nižim koncentracijama, što može biti posledica varijacija u sadržaju mikroelemenata između plodova različitih biljnih vrsta (294).

Sadržaj minerala, fosfora i sumpora, je bio veći u pogači u poređenju sa pulpom, što je verovatno povezano sa razlikama u lipidnim sastavima ovih proizvoda. Prisustvo fosfora, značajnog za sintezu fosfolipida i membranskih struktura utvrđeno je u visokim koncentracijama u semenkama susama (295). Minerali, kao što su Na, Ca i Zn prisutni su u većim količinama u semenkama nego u plodovima, što je u skladu sa rezultatima ovog istraživanja (288). Prisustvo sumpora u pulpi i pogači može imati korisne efekte u detoksikaciji organizma, podržavajući enzimske procese u zaštiti od oksidativnog stresa. Sumpor igra značajnu ulogu u sintezi glutaciona, esencijalnog antioksidansa u ćelijama, čime dodatno doprinosi biološkoj vrednosti ovih nusproizvoda (296).

4.4.4. Bioaktivna jedinjenja sporednih proizvoda prerade plodova LB

Plodovi roda *Lycium* predstavljaju bogat izvor polifenolnih jedinjenja koja ispoljavaju brojne biološke aktivnosti, uključujući antioksidativni potencijal. Na sadržaj TPC i TFC značajno utiču različiti faktori, među kojima značajan uticaj ima vrsta i koncentracija rastvarača za ekstrakciju. U cilju procene vrste rastvarača na sadržaj bioaktivnih jedinjenja, TPC, TFC i LBP, izvršena je analiza ekstrakata koja su dobijena upotrebom tri različita rastvarača: vode, 70 % etanola i 70 % metanola. Dobijeni rezultati su prikazani u **Tabeli 33**.

Tabela 33. Bioaktivna jedinjenja u sporednim proizvodima prerade plodova LB upotrebom različitih rastvarača

Bioaktivna jedinjenja	Rastvarač	Pulpa	Pogača
TPC (mg GAE/100g)	Voda	555,10 ± 16,84 ^a	91,73 ± 5,06 ^b
	70% etanol	346,55 ± 57,79 ^a	206,55 ± 40,28 ^b
	70% metanol	502,13 ± 12,09 ^a	244,75 ± 11,62 ^b
TFC (mg CE/100g)	Voda	38,79 ± 2,05 ^a	34,24 ± 1,39 ^b
	70% etanol	31,67 ± 3,70 ^a	36,21 ± 5,19 ^b
	70% metanol	29,39 ± 5,07 ^a	17,73 ± 3,39 ^b
LBP (mg Glu/100g)	Voda	433,38 ± 14,12 ^a	151,53 ± 39,56 ^b
	70% etanol	610,92 ± 86,87 ^a	240,32 ± 36,11 ^b
	70% metanol	397,95 ± 52,68 ^a	177,89 ± 6,03 ^b

TPC– sadržaj ukupnih polifenola; TFC– sadržaj ukupnih flavonoida; LBP– sadržaj ukupnih polisaharida; GAE–ekvivalent galne kiseline; CE–ekvivalent katehina; Glu–ekvivalent glukoze; različita slova u istom redu ukazuju na statističku značajnost ($p < 0,05$)

Dobijeni rezultati potvrđuju da izbor rastvarača značajno utiče na ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz sporednih proizvoda prerade plodova godži. Voda se pokazala kao najefikasniji rastvarač u pogledu sadržaja TPC u ekstraktima pulpe, dok je u ekstraktima pogače najveći sadržaj TPC imao ekstrakt dobijen upotrebom 70% metanola. *Ozkan i saradnici* (2019) su takođe utvrdili statistički značajne razlike u sadržaju TPC između vodenih i metanolnih ekstrakata plodova godži (252). U prethodnom istraživanju, oko osam puta veći sadržaj TPC je određen u etil-acetatnom u poređenju sa vodenim ekstraktom plodova godži, što dodatno potvrđuju razlike između ekstrakata dobijenih upotrebom različitih rastvarača (297). U ovom istraživanju, veći sadržaj TPC je određen u ekstraktima pulpe u poređenju sa ekstraktima pogače.

Vrsta rastvarača, osim na sadržaj TPC, imala je značajan uticaj na sadržaj TFC. Vodeni ekstrakti pulpe su pokazali najveće vrednosti sadržaja TFC, dok značajne razlike nisu utvrđene između ekstrakata dobijenih upotrebom 70 % etanola i 70% metanola. Sadržaj TFC u metanolnim ekstraktima pogače je bio oko 2 puta niži u poređenju sa etanolnim i vodenim ekstraktima. Ovi podaci mogu biti od značaja prilikom odabira rastvarača za pripremu ekstrakata sa visokim sadržaj flavonoida, koji imaju izražena antioksidativna i antimikrobna svojstva (297). Prema literaturnim podacima, sadržaj TFC u plodovima godži varira između 220-1100 mg CE/100g, dok u semenu iznosi 26-237 mg CE/100g, što ukazuje na niži doprinos semena TFC (9-22 %) u poređenju sa pulpom (78-91 %) (252).

Sporedni proizvodi prerade plodova godži, kao značajan izvor polisaharida, mogu imati potencijalni značaj kao prebiotski sastojci u formulaciji funkcionalnih namirnica (2). Najveći sadržaj LBP je određen u etanolnim ekstraktima pulpe i pogače, što ukazuje na sposobnost etanola da efikasno ekstrahuje polisaharide. Vodeni i metanolni ekstrakti su pokazali niži sadržaj LBP u poređenju sa etanolnim ekstraktima.

4.4.5. Biološke aktivnosti sporednih proizvoda prerade plodova LB

4.4.5.1. Antioksidativna aktivnost sporednih proizvoda prerade plodova LB

Antioksidativni potencijal vodenih, etanolnih i metanolnih ekstrakata sporednih proizvoda prerade plodova godži procenjen je na osnovu sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala (DPPH, ABTS) i redukcionog potencijala (FRAP, CUPRAC), a dobijeni rezultati su prikazani u **Tabeli 34**.

Tabela 34. Antioksidativna aktivnost vodenih, etanolnih i metanolnih ekstrakata sporednih proizvoda prerade plodova LB

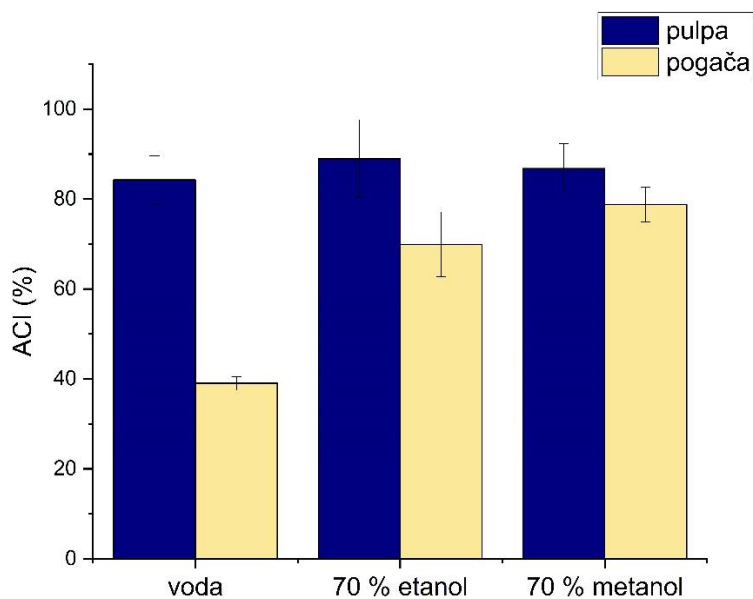
Antioksidativna aktivnost	Rastvarač	Pulpa	Pogača
DPPH ($\mu\text{mol TE}/100\text{g}$)	Voda	$581,51 \pm 42,13^a$	$228,65 \pm 42,71^b$
	70% etanol	$502,66 \pm 24,68^a$	$434,58 \pm 29,23^b$
	70% metanol	$1814,41 \pm 62,09^a$	$621,79 \pm 25,78^b$
ABTS ($\text{mmol TE}/100\text{g}$)	Voda	$27,02 \pm 8,07^a$	$11,91 \pm 5,76^b$
	70% etanol	$28,01 \pm 3,27^a$	$25,37 \pm 3,99^b$
	70% metanol	$45,81 \pm 2,86^a$	$19,46 \pm 2,83^b$
FRAP ($\text{mmol TE}/100\text{g}$)	Voda	$1,06 \pm 0,14^a$	$0,46 \pm 0,02^b$
	70% etanol	$0,54 \pm 0,05^a$	$0,37 \pm 0,04^b$
	70% metanol	$0,58 \pm 0,05^a$	$0,58 \pm 0,01^b$
CUPRAC ($\text{mmol TE}/100\text{g}$)	Voda	$2,86 \pm 0,16^a$	$1,65 \pm 0,78^b$
	70% etanol	$2,70 \pm 0,56^a$	$1,84 \pm 0,35^b$
	70% metanol	$2,82 \pm 0,37^a$	$1,68 \pm 0,53^b$

TE–ekvivalent troloksa; različita slova u istom redu ukazuju na statističku značajnost ($p < 0,05$)

Antioksidativna aktivnost oba nusproizvoda može se pripisati polifenolima, flavonoidima i drugim antioksidativnim jedinjenjima. Ove aktivnosti su uporedive sa literaturnim podacima o antioksidativnom potencijalu nusproizvoda borovnice, brusnice i grožđa (287,298,299).

Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti vodenih, etanolnih i metanolnih ekstrakata nusproizvoda pokazala su značajne razlike između pulpe i pogače, kao i između ekstrakata dobijenih korišćenjem različitih rastvarača. Ekstrakti pulpe su pokazali bolju antioksidativnu aktivnost u svim korišćenim testovima, što je u skladu sa ranijim istraživanjem u kome je utvrđena veća antioksidativna aktivnost pulpe u poređenju sa semenom i plodom godži (252). Najefikasniji u pogledu antiradikalske DPPH i ABTS aktivnosti je bio 70 % metanolni ekstrakt pulpe, a najizraženija redukciona aktivnost (FRAP i CUPRAC) je utvrđena za vodeni ekstrakt pulpe. Suprotno, 70% etanolni ekstrakt pogače je pokazao veće vrednosti u ABTS i CUPRAC testu, a metanolni ekstrakt pogače za rezultate DPPH i FRAP testova. Antiradikalske aktivnosti metanolnih i etanolnih ekstrakata pogače, određene DPPH testom, su imale slične vrednosti u poređenju sa antiradikalnim aktivnostima vodenometanolnog ekstrakta ploda godžija (**Tabela 21**). Suprotno, rezultati dobijeni u ABTS testu za metanolni ekstrakt pogače niži je u poređenju sa antiradikalnim aktivnostima metanolnog ekstrakta celih plodova godžija (297). Sa druge strane, metanolni ekstrakt pulpe je pokazao oko četiri puta snažniju antioksidativnu aktivnost procenjenju DPPH, ABTS i CUPRAC testovima, u poređenju sa metanolnim ekstraktom svežih plodova LB (**Tabela 21**).

Na **Slici 35** su prikazani uticaji rastvarača na antioksidativni kompozitni indeks ekstrakata sporednih proizvoda prerade godži plodova.

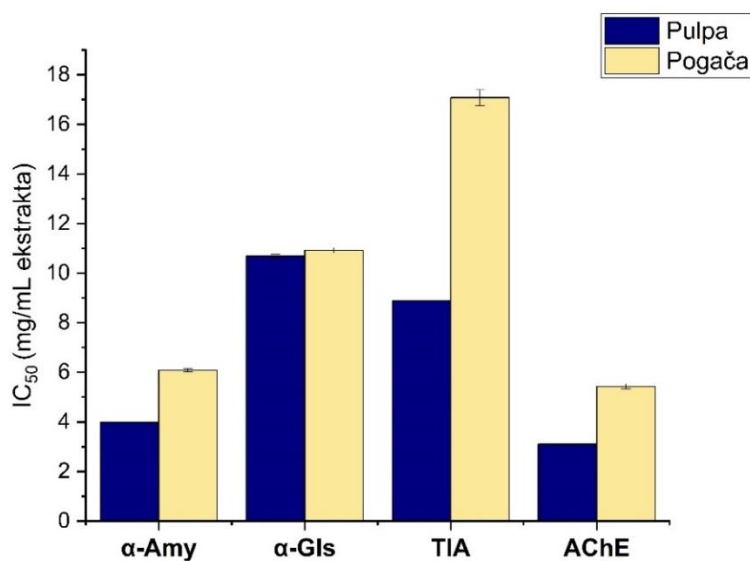


Slika 35. Uticaj rastvarača na antioksidativni kompozitni indeks (ACI)

Najčešće korišćeni rastvarači, poput vode, metanola i etanola, omogućavaju selektivnu ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja, što direktno utiče na efikasnost antioksidativnog potencijala dobijenih ekstrakata. Metanolni ekstrakti, kako pulpe tako i pogače, su pokazali veće vrednosti ACI u poređenju sa vodenim i etanolnim ekstraktima.

4.4.5.2. Antienzimski aktivnost sporednih proizvoda prerade plodova LB

Antienzimski potencijal metanolnih ekstrakata sporednih proizvoda prerade plodova godži procenjen je na osnovu sposobnosti inhibicije enzima: α -amilaze, α -glukozidaze, tirozinaze i acetilholinesteraze, a dobijeni rezultati su prikazani na **Slici 36**.



Slika 36. Antienzimski potencijal metanolnih ekstrakata sporednih proizvoda prerade plodova LB (α -Amy– α -amilaza; α -Gls– α -glukozidaza; TIA–tirozinaza; AChE–acetilholinesteraza)

Analiza inhibicije enzima pokazala je razlike u antienzimskoj aktivnosti između nusproizvoda plodova godži, pri čemu su ekstrakti pulpe pokazali snažniji antienzimski potencijal na sve ispitivane enzime u poređenju sa ekstraktima pogače. Ovo se može objasniti većim sadržajem bioaktivnih jedinjenja, kao što su polifenoli i polisaharidi, u metanolnom ekstraktu pulpe u poređenju sa metanolnim ekstraktom pogače.

Metanolni ekstrakt pulpe pokazao je veći stepen inhibicije α -Amy, dok su vrednosti inhibicije α -Gls bile slične kod oba nusproizvoda, što može biti povezano sa visokim sadržajem LBP u pulpi (266). Inhibicija antidiabetesnih enzima utvrđena je za nusproizvode grožđa (α -amilaza IC_{50} 60,2 μ g/mL i α -glukozidaza IC_{50} 62,5 μ g/mL) (301) i borovnice (302).

Metanolni ekstrakt pulpe je pokazao izraženiju TIA inhibitornu aktivnost (IC_{50} 8,89 mg/mL) u poređenju sa metanolnim ekstraktom pogače (IC_{50} 17,08 mg/mL). Dobijeni rezultati su izraženiji u poređenju sa rezultatima inhibicije tirozinaze pod dejstvom ekstrakata nusproizvoda belog grožđa (IC_{50} 243,3-686,3 mg/L) (303), ali višestruko slabiji u odnosu na nusproizvode nara (IC_{50} 3,66-114,9 μ g/mL) (304). Polifenolna jedinjenja se smatraju izraženim inhibitorima tirozinaze (305).

Metanolni ekstrakti oba nusproizvoda pokazuju dozno zavisnu inhibiciju enzima AChE, pri čemu pulpa ima izraženiji efekat (IC_{50} 3,11 mg/mL) u odnosu na pogaču (IC_{50} 5,44 mg/mL). Aktivnost ekstrakata sporednih proizvoda plodova godži može se uporediti sa inhibitornim efektom nusproizvoda grožđa na aktivnost enzima acetilholinesteraze (IC_{50} 1,71-2,05 mg/g) (306).

4.4.6. Optimizacija procesa ekstrakcije pogače

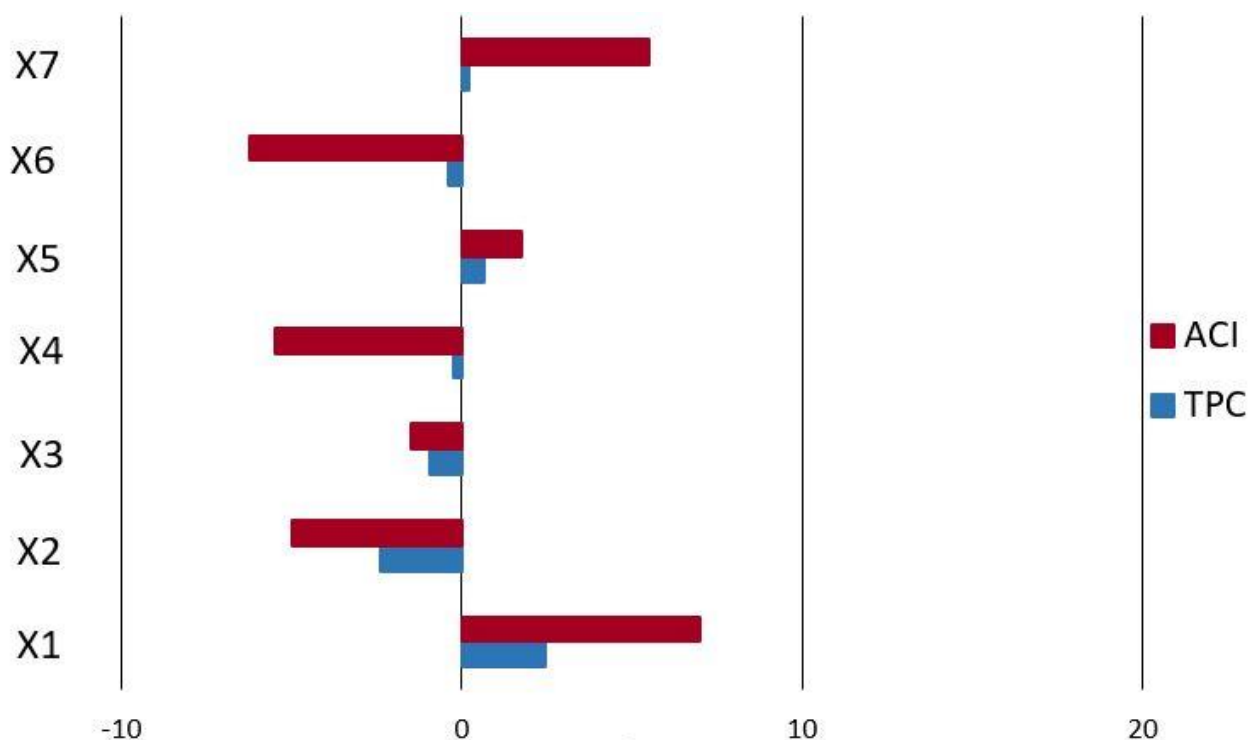
4.4.6.1. Skrining faktora koji utiču na ekstrakciju TPC i ACI u pogači

Skrining test je sproveden sa ciljem identifikacije glavnih faktora koji utiču na sadržaj ukupnih polifenola (TPC) i na testove *in vitro* antioksidativne aktivnosti za uzorak pogače, gde je na osnovu dobijenih rezultata izračunat antioksidativni kompozitni indeks (ACI). Rezultati su prikazani u **Tabeli 35** i grafički (**Slika 37**).

Tabela 35. Sadržaji TPC i ACI u fazi skrininga za pogaču

X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	TPC	ACI
-1	-1	-1	1	-1	1	1	1,23	23
1	-1	-1	-1	1	-1	1	1,07	35
1	1	-1	-1	-1	1	-1	1,63	25
-1	1	1	-1	-1	-1	1	3,89	76
1	-1	1	1	-1	-1	-1	4,37	80
-1	1	-1	1	1	-1	-1	0,79	31
-1	-1	1	-1	1	1	-1	0,83	39
1	1	1	1	1	1	1	3,10	85

X₁ – temperatura; X₂ – vreme; X₃ – odnos između droge i rastvarača; X₄ – koncentracija etanola; X₅ – tretman ultrazvukom; X₆ – veličina čestica; X₇ – mešanje; TPC–sadržaj ukupnih polifenola (mg GAE/g); ACI–antioksidativni kompozitni indeks (%)



Slika 37. Uticaj ispitivanih faktora (X₁ – temperatura, X₂ – vreme, X₃ – odnos između droge i rastvarača, X₄ – koncentracija etanola, X₅ – tretman ultrazvukom, X₆ – veličina čestica, X₇ – mešanje) na TPC i ACI za pogaču

Dobijeni rezultati su pokazali da je povećanje temperature (X₁) pozitivno uticalo na ekstrakciju fenolnih jedinjenja, što se može objasniti narušavanjem strukture ćelijskih zidova i povećanom difuzijom u rastvarač (280). Međutim, važno je napomenuti da porast temperature ne sme dovesti do degradacije termolabilnih fenolnih jedinjenja (283). Ovi rezultati dodatno potvrđuju korelaciju između TPC i antioksidativne aktivnosti, pri čemu faktori koji utiču na TPC istovremeno utiču i na ACI. Vreme ekstrakcije (X₂), i odnos droga/rastvarač (X₃) su negativno uticali na prinos TPC, kao i na antioksidativnu aktivnost. Eksperimentalni rezultati potvrđuju da primena ultrazvuka (X₅) pojačava ekstrakciju, kroz proces kavitacije i formiranje mehurića, što stvara pritisak koji narušava ćelijske zidove i omogućava povećanu ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja (307).

Nasuprot tome, veća koncentracija etanola (X₄) i smanjenje veličine čestica (X₆) pokazuju negativan uticaj na TPC i antioksidativnu aktivnost. Povećanje koncentracije etanola može negativno uticati na sadržaj ukupnih polifenola usled denaturacije ili precipitacije određenih polifenolnih jedinjenja, što smanjuje njihovu rastvorljivost. Istraživanja na ekstraktima nusproizvoda brusnice pokazale su najveći TPC pri nižoj koncentraciji etanola i većem odnosu biljnog materijala prema rastvaraču, što ukazuje na prednosti ovih uslova za optimalnu ekstrakciju (298). Proces mešanja (X₇) tokom ekstrakcije dodatno doprinosi povećanju sadržaja TPC i antioksidativnoj aktivnosti.

Na osnovu rezultata dobijenih u toku faze skrininga, kao faktori koji su imali najveći uticaj na ekstrakciju TPC i antioksidativnu aktivnost, izabrani su koncentracija etanola (X₄), temperatura (X₁), vreme trajanja ekstrakcije (X₂) i odnos droga/rastvarač (X₃) koji su dalje optimizovani korišćenjem metodologije površine odgovora.

4.4.6.2. Optimizacija ekstrakcije primenom metodologije površine odgovora

4.4.6.2.1. Statistička procena modela

Statistička analiza značajnosti modela, sprovedena primenom analize varijanse (ANOVA), omogućila je procenu značajnih faktora, što je prikazano u **Tabeli 36**. Kvadratni modeli koji opisuju uticaj ispitivanih faktora na ekstrakciju ukupnih polifenola (TPC), flavonoida (TFC) i antioksidativni kompozitni indeks (ACI) u pogači pokazali su se kao statistički značajni ($p < 0,05$). Visok koeficijent determinacije (R^2) modela za TPC (0,93), TFC (0,63) i ACI (0,71) ukazuje na dobro slaganje između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti. Pored toga, statistički neznačajni rezultati za „*Lack of Fit*“ test ($p > 0,05$) potvrđuju da ovi modeli adekvatno opisuju zavisnost između ispitivanih faktora i odgovora.

Tabela 36. Statistički parametri nakon prilagođavanja eksperimentalnih podataka kvadratnim modelima za pogaču

	df	Suma kvadrata	Srednji kvadrat	F-vrednost	p-vrednost
TPC					
Model	6	1,95	0,326	45,16	<0,0001
A – Koncentracija etanola	1	1,32	1,32	183,67	<0,0001
B – Temperatura	1	0,056	0,056	7,81	0,0112
D – Odnos droga/rastvarač	1	0,033	0,033	4,50	0,0466
A ²	1	0,236	0,236	32,68	<0,0001
B ²	1	0,107	0,107	14,85	0,0010
D ²	1	0,064	0,064	8,92	0,0073
Ukupna greška	20	0,144	0,007		
<i>Lack of Fit</i>	18	0,132	0,007	1,21	0,5469
Eksperimentalna greška	2	0,012	0,006		
Ukupno	26	2,10			
R ²	0,93				
TFC					
Model	1	1008,73	1008,73	42,68	<0,0001
A – Koncentracija etanola	1	1008,73	1008,73	42,68	<0,0001
Ukupna greška	25	590,86	23,63		
<i>Lack of Fit</i>	23	529,34	23,01	0,7482	0,7176
Eksperimentalna greška	2	61,52	30,76		
Ukupno	26	1599,59			
R ²	0,63				
ACI					
Model	8	2244,70	280,59	5,47	0,0014
A – Koncentracija etanola	1	0,2755	0,2755	0,0054	0,9424
B – Temperatura	1	261,55	261,55	5,10	0,0366
C – Vreme	1	155,08	155,08	3,02	0,0993
D – Odnos droga/rastvarač	1	937,12	937,12	18,26	0,0005
A ²	1	318,28	318,28	6,20	0,0228
B ²	1	419,61	419,61	8,17	0,0104
C ²	1	656,98	656,98	12,80	0,0022
D ²	1	299,54	299,54	5,84	0,0266

Ukupna greška	18	923,92	51,33		
<i>Lack of Fit</i>	16	681,11	42,57	0,3506	0,9128
Eksperimentalna greška	2	242,81	121,41		
Ukupno	26	3168,62			
R ²	0,71				

Rezultati eksperimenata u skladu sa BBD dizajnom za TPC, TFC, LBP, TCC i ACI za uzorak pogače su predstavljeni u **Tabeli 37**.

Tabela 37. Rezultati optimizacije ekstrakcije u skladu sa BBD dizajnom za pogaču

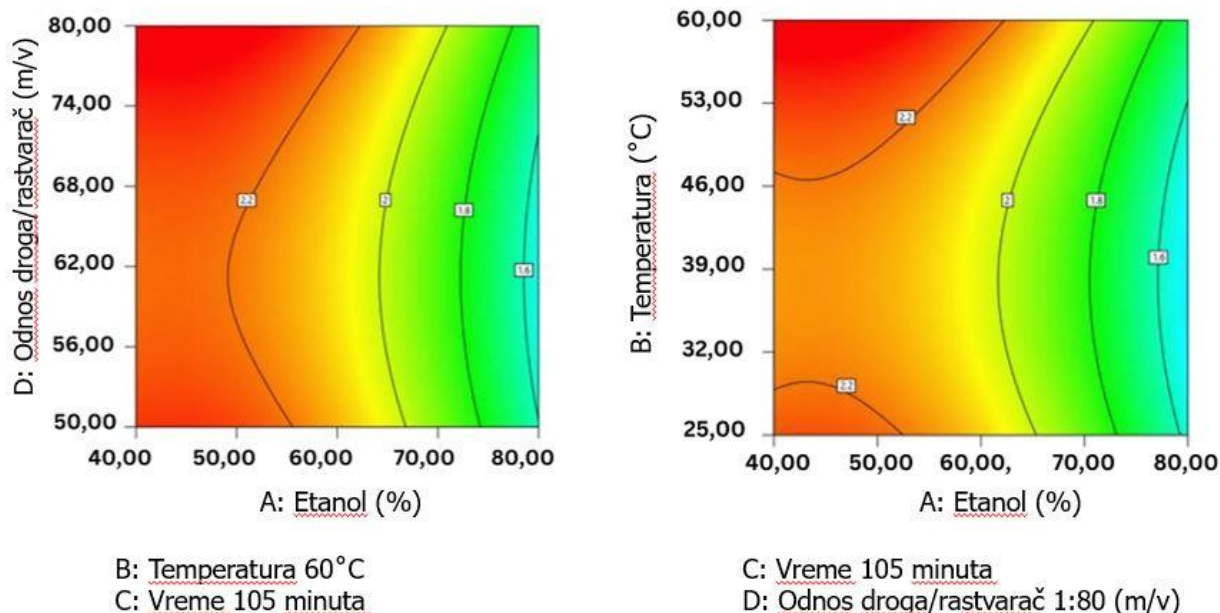
N°	Nezavisne varijable				Zavisne varijable				
	A	B	C	D	TPC	TFC	LBP	TCC	ACI
1	40	25	105	65	2,19	8,38	146,13	18,38	69,84
2	80	25	105	65	1,36	38,02	155,01	3,23	68,11
3	40	60	105	65	2,25	9,91	151,01	50,09	82,55
4	80	60	105	65	1,56	35,34	129,07	4,74	81,09
5	60	42,5	30	50	1,89	9,38	115,03	9,84	60,91
6	60	42,5	180	50	2,01	13 13	131,30	16,57	63,44
7	60	42,5	30	80	2,01	11,77	130,83	7,95	85,32
8	60	42,5	180	80	2,03	13,08	147,02	9,12	83,93
9	40	42,5	105	50	2,07	8,70	126,58	32,13	61,61
10	80	42,5	105	50	1,47	18,02	115,88	19,27	59,15
11	40	42,5	105	80	2,10	8,28	151,75	20,52	71,75
12	80	42,5	105	80	1,51	25,71	145,14	3,57	73,12
13	60	25	30	65	1,99	10,05	143,28	8,29	53,59
14	60	60	30	65	2,09	15,92	147,92	10,33	59,66
15	60	25	180	65	1,98	10,99	296,69	6,95	60,45
16	60	60	180	65	1,90	15,75	199,88	12,46	72,92
17	40	42,5	30	65	1,93	7,41	145,66	15,58	59,14
18	80	42,5	30	65	1,26	20,66	131,15	2,18	62,59
19	40	42,5	180	65	2,04	8,37	139,78	21,12	72,29
20	80	42,5	180	65	1,42	23,34	117,08	3,52	71,31
21	60	25	105	50	1,84	12,00	124,69	11,54	52,56
22	60	60	105	50	2,19	12,82	131,53	15,28	66,51
23	60	25	105	80	2,13	12,21	153,91	8,75	79,12
24	60	60	105	80	2,32	16,06	142,58	13,56	76,98
25	60	42,5	105	65	1,83	11,59	124,55	9,01	75,08
26	60	42,5	105	65	1,93	11,79	127,44	11,34	86,59
27	60	42,5	105	65	1,98	21,30	130,80	9,19	97,11

A–koncentracija etanola (%); B – temperatura (C); C–vreme (min); D –odnos droga rastvarač; TPC –sadržaj ukupnih polifenola (mg GAE/g); TFC–sadržaj ukupnih flavonoida (mg CE/g); LBP–sadržaj ukupnih polisaharida (mg Glu/g); TCC–sadržaj ukupnih karotenoida (mg/g); ACI–antioksidativni kompozitni indeks (%)

4.4.6.2.2. Analiza uticaja odabranih nezavisnih varijabli na sadržaj TPC u pogači

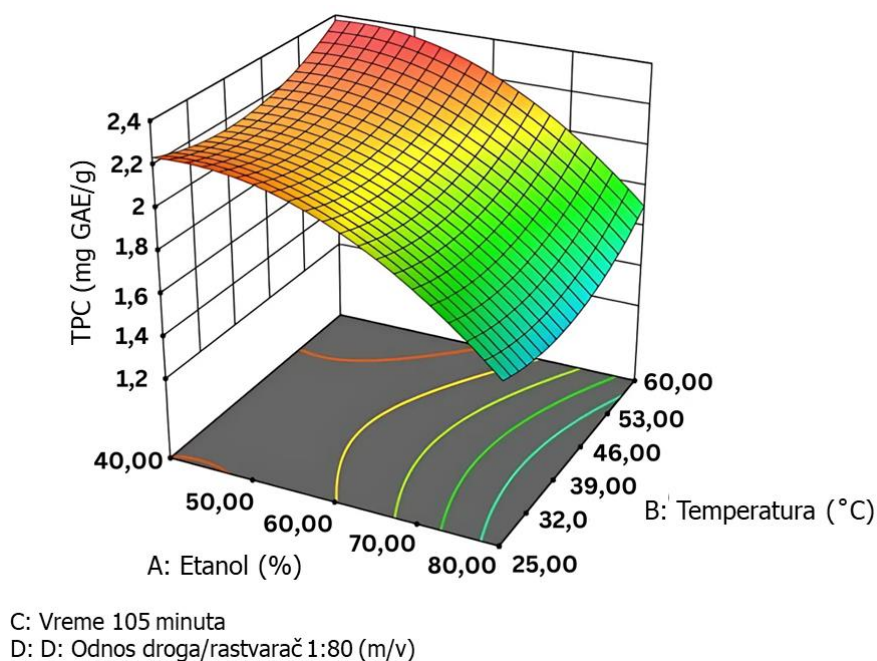
Analiza uticaja različitih faktora na ekstrakciju TPC u pogači pokazala je da je prinos bio između 1,36 i 2,32 mg GAE/g. Najveći prinos TPC ostvaren je pri upotrebi 60% (v/v) etanola, tokom trajanja ekstrakcije od 105 minuta, na 60°C, sa odnosom droga/rastvarač od 1:80 (m/v) (Tabela 37).

Uticaj faktora na sadržaj TPC u pogači je grafički predstavljen na Slici 38.



Slika 38. Uticaji nezavisnih varijabli na TPC u pogači

Na Slici 39 je prikazan 3D prikaz uticaja temperature i etanola na TPC u pogači.



Slika 39. 3D prikaz uticaja nezavisnih varijabli na TPC u pogači

Matematička jednačina, koja opisuje ovu zavisnost korišćenjem kodiranih vrednosti faktora, glasi:

$$TPC(mg\ GAE/g) = 1,88 - 0,33A + 0,07B + 0,05D - 0,20A^2 + 0,13B^2 + 0,10D^2 \quad (30)$$

Rezultati su pokazali značajan uticaj koncentracije etanola, temperature i odnosa droga/rastvarač, kao i njihovih kvadratnih efekata na vrednosti TPC. Koncentracija etanola je imala negativan uticaj na sadržaj TPC, za razliku od odnosa droga/rastvarač i temperature. Sva tri uticaja su bila nelinearne prirode.

4.4.6.2.3. Analiza uticaja odabranih nezavisnih varijabli na sadržaj TFC u pogači

Analiza uticaja različitih faktora na ekstrakciju TFC u pogači je pokazala da je njihov sadržaj varirao između 7,41 i 38,02 mg CE/g. Najveći prinos TFC ostvaren je pri upotrebi 80% (v/v) etanola, tokom trajanja ekstrakcije od 105 minuta, na 25°C, sa odnosom droga/rastvarač od 1:65 (m/v) (Tabela 37).

Matematička jednačina, koja opisuje ovu zavisnost korišćenjem kodiranih vrednosti faktora, glasi:

$$TFC\ (mg\ CE/g) = 15,18 + 9,17 \times A \quad (31)$$

Rezultati su pokazali da je jedini značajan faktor koji pozitivno utiče na sadržaj TFC u pogači koncentracija etanola. Ovi rezultati su u skladu sa studijom sprovedenom na nusproizvodima jabuke, koja je pokazala da veća koncentracija etanola, u kombinaciji sa dužim trajanjem ekstrakcije, dovodi do povećanja sadržaja TFC (308).

4.4.6.2.4. Analiza uticaja odabranih nezavisnih varijabli na ACI pogače

Analiza uticaja različitih faktora na rezultate testova antioksidativne aktivnosti i vrednosti izračunatog ACI pogače pokazala je varijacije u ACI između 52,56 i 97,11 %. Najveća vrednost ACI dobijen je upotrebom 60% (v/v) etanola, tokom trajanja ekstrakcije od 105 minuta, na 42,5°C, pri odnosu droga/rastvarač od 1:65 (m/v) (Tabela 37).

4.4.6.2.5. Analiza uticaja odabranih nezavisnih varijabli na LBP i TCC u pogači

Za sadržaje LBP i TCC, test "*Lack of Fit*" pokazuje značajnost, što ukazuje na određene nedostatke u usklađenosti modela sa eksperimentalnim podacima. Matematičke jednačine, koje opisuju ovu zavisnost korišćenjem kodiranih vrednosti faktora su:

$$LBP\ (mg\ Glu/g) = 119,58 + 9,81B + 18,16C - 25,36BC + 32,80B^2 + 23,29C^2 \quad (32)$$

Na osnovu prethodne jednačine je evidentno da na sadržaj LBP trajanje ekstrakcije utiče pozitivno i da postoji interakcija između vremena trajanja procesa ekstrakcije i temperature. Produženo trajanje ekstrakcije omogućava duži kontakt između rastvarača i biljnog materijala, što omogućava difuziju i potpuniju ekstrakciju polisaharida. Zbog složenosti strukture i velike molekulske mase, potrebno je duže vremena za ekstrakciju, u poređenju sa molekulima manjih molekulskih masa (309). *Yin i Dang* su takođe pokazali pozitivan uticaj trajanja procesa ekstrakcije

i temperature, gde je nakon 5,5 sati prinos ušao u fazu dinamičke ravnoteže, uprkos daljem produžavanju vremena ekstrakcije (184). Sa povećanjem temperature povećava se difuzija polisaharida u rastvarač, ali povećanje temperature preko 60°C dovodi do smanjenja prinosa ekstrakcije (283).

$$TCC (mg/g) = 13,13 - 10,11 \times A + 4,11 \times B - 3,43 \times D \quad (33)$$

Povećanje koncentracija etanola negativno je uticalo na sadržaj TCC, jer su karotenoidi nepolarna jedinjenja, te je ekstrakcija etanolom otežana. Veće koncentracije etanola smanjuju rastvorljivost karotenoida, pa je ekstrakcija efikasnija ukoliko se ekstrakcija vrši uz dodatak nekog nepolarnog rastvarača (310). Sa druge strane, značajna upotreba etanola pod visokim pritiskom, može biti efikasna zamena za aceton u ekstrakciji karotenoida. Ovo je važno jer prekomerna upotreba organskih rastvarača predstavlja ozbiljan ekološki problem (279).

4.4.7. Optimizacija procesa ekstrakcije pulpe

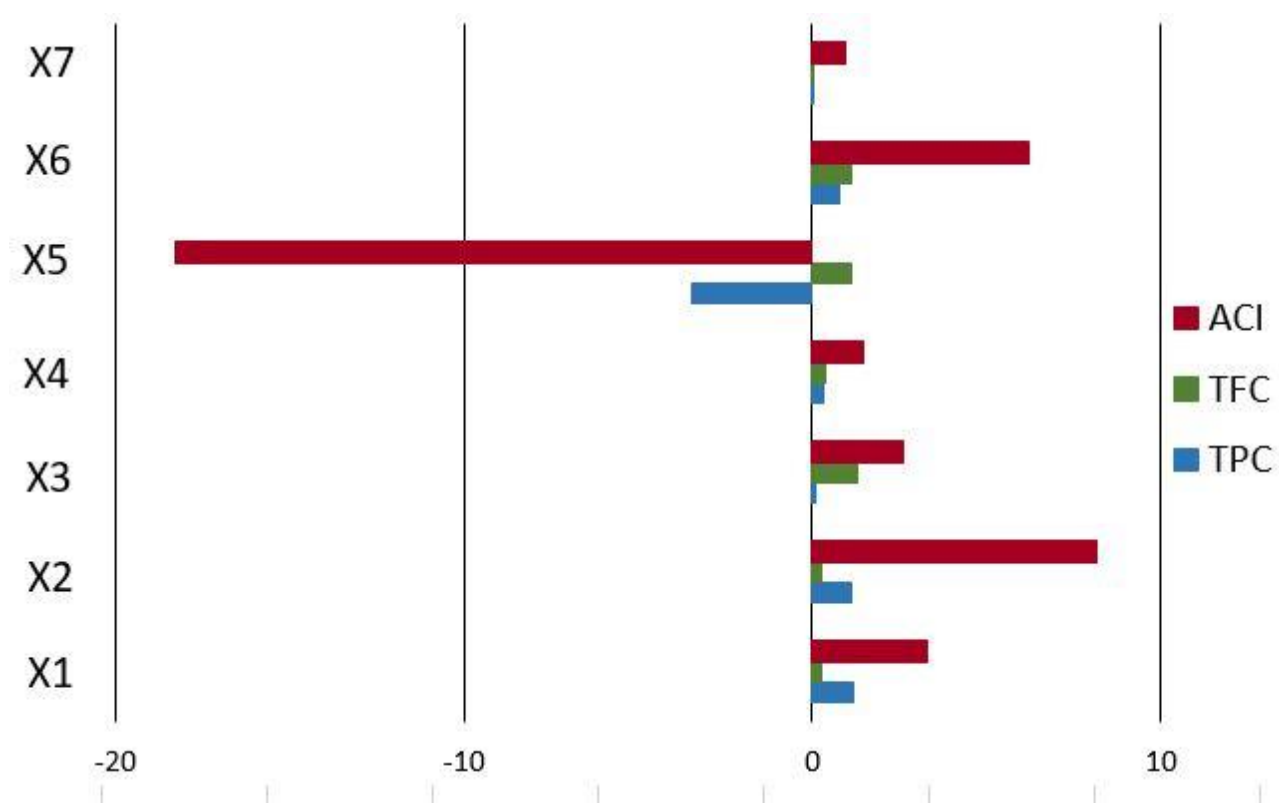
4.4.7.1. Skrining faktora koji utiču na ekstrakciju TPC, TFC i ACI u pulpi

Skrining test je sproveden sa ciljem identifikacije glavnih faktora koji utiču na sadržaj ukupnih polifenola (TPC) i flavonoida (TFC), kao i na testove *in vitro* antioksidativne aktivnosti, gde je na osnovu dobijenih rezultata izračunat antioksidativni kompozitni indeks (ACI) za pulpu. Dobijeni rezultati su predstavljeni u **Tabeli 38** i grafički na **Slici 40**.

Tabela 38. Sadržaji TPC, TFC i ACI u toku faze skrininga za pulpu

X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	TPC	TFC	ACI
-1	-1	-1	1	-1	1	1	8,82	0,49	75,63
1	-1	-1	-1	1	-1	1	1,96	0,12	36,13
1	1	-1	-1	-1	1	-1	12,82	0,82	99,53
-1	1	1	-1	-1	-1	1	8,95	0,61	77,19
1	-1	1	1	-1	-1	-1	9,82	1,38	62,63
-1	1	-1	1	1	-1	-1	2,58	1,01	41,11
-1	-1	1	-1	1	1	-1	1,46	4,58	34,91
1	1	1	1	1	1	1	6,62	6,40	56,88

X₁–temperatura; X₂–vreme; X₃–odnos između droge i rastvarača; X₄–tretman ultrazvukom; X₅–koncentracija etanola; X₆–mešanje; X₇–prethodna maceracija; TPC – sadržaj ukupnih polifenola (mg GAE/g); TFC–sadržaj ukupnih flavonoida (mg CE/g); ACI –antioksidativni kompozitni indeks (%)



Slika 40. Uticaj ispitivanih faktora (X_1 –temperatura, X_2 –vreme, X_3 –odnos između droge i rastvarača, X_4 –tretman ultrazvukom, X_5 –koncentracija etanola, X_6 –mešanje, X_7 –prethodna maceracija) na ekstrakciju TPC, TFC i ACI u pulpi

Na osnovu rezultata dobijenih u toku faze skrininga, kao faktori koji su imali najveći uticaj na ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja (TPC i TFC) i antioksidativnu aktivnost pulpe, izabrani su vreme trajanja ekstrakcije (X_2), odnos droga/rastvarač (X_3) i koncentracija etanola (X_5), koji su dalje optimizovani korišćenjem metodologije površine odgovora. Nakon prethodne maceracije od 30 minuta, eksperimenti su vršeni na konstantnoj temperaturi od 40°C i uz mešanje.

4.4.7.2. Optimizacija ekstrakcije primenom metodologije površine odgovor

4.4.7.2.1. Statistička procena modela

Statistička analiza značajnosti modela, sprovedena primenom analize varijanse (ANOVA), omogućila je procenu značajnih faktora, što je prikazano u **Tabeli 39**. Kvadratni modeli koji opisuju uticaj ispitivanih faktora na ekstrakciju ukupnih polifenola (TPC), flavonoida (TFC) i antioksidativni kompozitni indeks (ACI) u pulpi pokazali su se kao statistički značajni ($p < 0,05$). Visok koeficijent determinacije (R^2) modela za TPC (0,93) i TFC (0,99) ukazuje na dobro slaganje između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti. Pored toga, statistički neznačajni rezultati za „Lack of Fit“ test ($p > 0,05$) potvrđuju da ovi modeli adekvatno opisuju zavisnost između ispitivanih faktora i odgovora.

Tabela 39. Statistički parametri nakon prilagođavanja eksperimentalnih podataka za pulpu

	df	Suma kvadrata	Srednji kvadrat	F-vrednost	p-vrednost
TPC					
Model	4	16,46	4,12	34,45	<0,0001
A – Koncentracija etanola	1	2,78	2,78	23,31	0,0007
B – Odnos droga/rastvarač	1	12,30	12,30	102,98	<0,0001
A ²	1	0,88	0,88	7,40	0,0216
B ²	1	0,59	0,59	4,92	0,0509
Ukupna greška	10	1,19	0,12		
<i>Lack of Fit</i>	8	1,16	0,15	8,95	0,1044
Eksperimentalna greška	2	0,032	0,016		
Ukupno	14	17,66			
R ²	0,93				
TFC					
Model	7	1,07	0,15	73,21	<0,0001
A – Koncentracija etanola	1	0,66	0,66	315,37	<0,0001
B – Odnos droga/rastvarač	1	0,17	0,17	83,74	<0,0001
C – Vreme	1	2,81*10 ⁻³	2,81*10 ⁻³	1,35	0,2829
AB	1	0,031	0,031	14,73	0,0064
A ²	1	0,027	0,027	12,83	0,0089
B ²	1	0,13	0,13	62,45	<0,0001
C ²	1	0,041	0,041	19,58	0,0031
Ukupna greška	7	0,015	2,08*10 ⁻³		
<i>Lack of Fit</i>	5	0,011	2,27*10 ⁻³	1,42	0,4626
Eksperimentalna greška	2	3,20*10 ⁻³	1,60*10 ⁻³		
Ukupno	14	1,08			
R ²	0,99				

Rezultati eksperimenata u skladu sa BBD dizajnom za TPC, TFC i ACI za uzorak pulpe su predstavljeni u **Tabeli 40**.

Tabela 40. Rezultati optimizacije ekstrakcije u skladu sa BBD dizajnom za pulpu

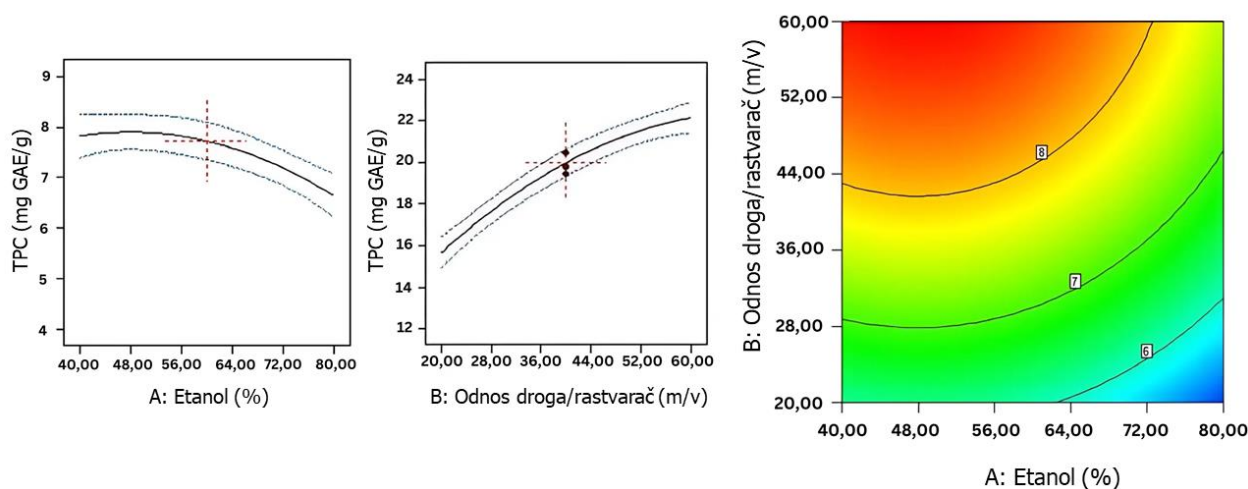
N°	Nezavisne varijable			Zavisne varijable		
	A	B	C	TPC	TFC	ACI
1	40	20	60	6,32	0,77	50,70
2	80	20	60	4,75	1,11	45,90
3	40	60	60	8,20	0,87	87,56
4	80	60	60	7,64	1,56	90,19
5	40	40	30	7,55	0,83	78,73
6	80	40	30	6,86	1,42	70,84
7	40	40	90	8,43	0,86	75,71
8	80	40	90	6,53	1,53	72,54
9	60	20	30	5,82	0,72	49,53
10	60	60	30	8,77	1,05	99,88
11	60	20	90	6,47	0,74	50,95
12	60	60	90	8,67	1,04	90,92
13	60	40	60	7,64	1,14	71,20
14	60	40	60	7,66	1,18	71,51
15	60	40	60	7,43	1,22	72,19

A– koncentracija etanola (%); B–odnos droga rastvarač (m/v); C– vreme (min); TPC– sadržaj ukupnih polifenola (mg GAE/g); TFC–sadržaj ukupnih flavonoida (mg CE/g); ACI–antioksidativni kompozitni indeks (%)

4.4.7.2.2. Analiza uticaja odabranih nezavisnih varijabli na TPC u pulpi

Analiza uticaja različitih faktora na ekstrakciju ukupnih polifenola u pulpi pokazala je da je sadržaj TPC bio između 4,75 i 8,77 mg GAE/g. Najveća vrednost TPC dobijena je pri upotrebi 60% (v/v) etanola, tokom 30 minuta, sa odnosom droga/rastvarač od 1:60 (m/v) (**Tabela 40**).

Uticaj faktora na sadržaj TPC u pulpi je grafički predstavljen na **Slici 41**.



Slika 41. Uticaji koncentracije etanola i odnosa droga/rastvarač na TPC u pulpi

Matematička jednačina, koja opisuje ovu zavisnost korišćenjem kodiranih vrednosti faktora, glasi:

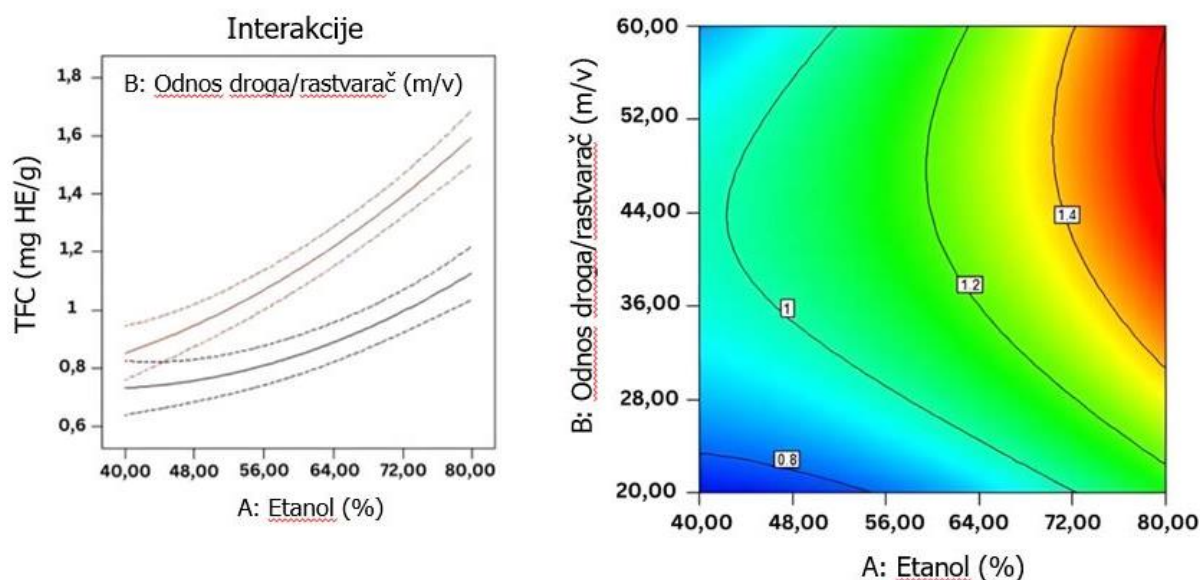
$$TPC (mg\ GAE/g) = 7,72 - 0,59 \times A + 1,24 \times B - 0,49 \times A^2 - 0,40 \times B^2 \quad (34)$$

Rezultati su pokazali da značajan uticaj na sadržaj TPC pulpe imaju koncentracija etanola, odnos droga/rastvarač i njihov kvadratni efekat vremena. Odnos droga/rastvarač je imao značajan pozitivan uticaj, dok je povećanje koncentracije etanola negativno uticalo na sadržaj TPC. Drugi autori su takođe utvrdili najveći sadržaj TPC pri koncentraciji etanola od 60%, gde je daljim porastom sadržaj opadao (209).

4.4.7.2.3. Analiza uticaja odabranih nezavisnih varijabli na TFC u pulpi

Analiza uticaja različitih faktora na ekstrakciju TFC u pulpi pokazala je da je njihov sadržaj bio između 0,72 i 1,56 mg CE/g. Najveći TFC ostvaren je pri upotrebi 80% (v/v) etanola, tokom 60 minuta, sa odnosom droga/rastvarač 1:60 (m/v) (Tabela 40).

Uticaj faktora na sadržaj TFC u pulpi, kao i interakcije su grafički predstavljene na Slici 42.



Slika 42. Uticaji koncentracije etanola i odnosa droga/rastvarač, kao i njihove interakcije na TFC u pulpi

Matematička jednačina, koja opisuje ovu zavisnost korišćenjem kodiranih vrednosti faktora, glasi:

$$TFC (mg/g) = 1,18 + 0,29A + 0,15B + 0,019C + 0,088AB + 0,085A^2 - 0,19B^2 - 0,11C^2 \quad (35)$$

Rezultati su pokazali značajan uticaj koncentracije etanola, odnosa droga/rastvarač, vremena, kao i njihovih kvadratnih efekata na sadržaj TFC u pulpi. Pored toga, uočene su interakcije između koncentracije etanola i odnosa droga rastvarač. Koncentracija etanola, odnos droga/rastvarač, i njihova interakcija, kao i faktor vremena trajanja ekstrakcije su imali pozitivan uticaj na sadržaj TFC.

4.4.7.2.4. Antienzijske aktivnosti optimizovanog ekstrakta pulpe

Antienzijske aktivnosti pripremljenog 60 % etanolnog ekstrakta pulpe, sa odnosom droga/rastvarač 1:60 (*m/v*), i vremenom trajanja ekstrakcije od 30 minuta su predstavljeni u **Tabeli 41**.

Tabela 41. Antienzijske aktivnosti optimizovanog ekstrakta pulpe (IC_{50} mg/mL)

Enzim			
<i>α</i> -amilaza	<i>α</i> -glukozidaza	tirozinaza	acetilholinesteraza
3,59 + 0,11	10,47 + 0,35	2,77 + 0,05	7,48 + 0,04

Dobijeni rezultati potvrđuju antienzijski potencijal optimizovanog ekstrakta pulpe, sa najizraženijom inhibitornom aktivnošću na enzim tirozinazu. Utvrđena anti-tirozinazna aktivnost ekstrakta pulpe dobijena pod optimizovanim uslovima ekstrakcije (IC_{50} 2,77 mg/mL) je oko tri puta izraženija u odnosu na prethodni dobijeni rezultat za metanolni ekstrakt pulpe (IC_{50} 8,89 mg/mL). Međutim, u odnosu na metanolni ekstrakt pulpe (IC_{50} 3,11 mg/mL), ekstrakt pulpe pod optimizovanim uslovima ekstrakcije je pokazao za oko dva puta slabiju acetilholinesteraznu inhibitornu aktivnost (IC_{50} 3,11 mg/mL).

5. ZAKLJUČAK

5.1. Zaključci prve faze istraživanja

U okviru prve faze istraživanja izvršena je analiza hemijskog sastava svežih plodova *L. barbarum* „No.1” (LB), *L. barbarum* var. *auranticarpum* „Amber Sweet Goji” (LBa) i *L. ruthenicum* (LR), prikupljenih sa plantaže u Nišu (južna Srbija), kao i hemijskog sastava liofilizovanih plodova *L. barbarum* prikupljenih sa plantaža iz različitih regiona Srbije: Vojvodina (Subotica i Ruma), južna Srbija (Niš), beogradski region (Beograd i Smederevo) i zapadna Srbija (Požega). Ispitivanje je obuhvatilo određivanje osnovnih nutritivnih parametara i izračunavanje energetske vrednosti, zatim analizu fizičko-hemijskih parametara, kao i hemijsku karakterizaciju ispitivanih uzoraka u pogledu sadržaja mineralnih materija, masnih kiselina, fitosterola, provitamina vitamina C (AA-2 β G), kao i sadržaja ukupnih polisaharida, ukupnih karotenoida i polifenolnih jedinjenja. Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Analiza osnovnog nutritivnog sastava je pokazala da su sveži plodovi LB imali značajno veći sadržaj ukupnih masti, dostupnih ugljenih hidrata, dok se vrednosti sadržaja ukupnih proteina i ukupnog pepela nisu značajno razlikovale među plodovima različitih *Lycium* vrsta. Energetska vrednost svežih plodova LR je bila za 38 % niža od plodova LB i oko 30 % od plodova LBa. Sadržaj ukupnih dijetnih vlakana je bio sličan u svežim plodovima LB i LBa i značajno je bio veći od sadržaja u svežim plodovima LR.
- Rezultati fizičko-hemijskih parametara (TSS, TA, odnos (TSS/TA) i pH vrednosti), kao indikatora senzornog kvaliteta, ukazali su na izraženiji sladak ukus plodova LB u odnosu na plodove LR.
- Sadržaj kalcijuma i gvožđa u plodovima LB je bio oko dva puta veći u odnosu na plodove LBa. Osim natrijuma i kalcijuma, sadržaj minerala u plodovima LR je bio niži u poređenju sa plodovima LB i LBa.
- Najzastupljenije masne kiseline u analiziranim svežim plodovima godži su bile linolna, oleinska, palmitinska i stearinska kiselina, koje su činile oko 95 % od ukupnih masnih kiselina. Plodovi LR su imali najveći sadržaj ZMK, dok su plodovi LBa imali najveći sadržaj PNMK.
- U svežim plodovima LB određen je veći sadržaj AA-2 β G u odnosu na sveže plodove LBa, dok njegovo prisustvo nije utvrđeno u plodovima LR.
- Sadržaj ukupnih polifenola (TPC) i ukupnih tanina (TT) svežih plodova LR je bio oko dva puta veći u poređenju sa plodovima LB i LBa. Plodovi LR su imali najniži sadržaj ukupnih flavonoida (TFC). Za razliku od plodova LR, prisustvo antocijana nije utvrđeno u plodovima LB i LBa.
- U ekstraktima liofilizovanih plodova LB utvrđeno je prisustvo ukupno sedam fenolnih jedinjenja. Najzastupljenije fenolkarboksilne kiseline su bile hlorogenska i galna, dok je prisustvo ferulinske kiseline (SU, PŽ, BG), kemferola (SD, BG, NI, RU) i kvercetina (SU, PŽ, BG, NI) utvrđeno samo u nekim uzorcima.
- U metanolnom ekstraktu liofilizovanih plodova LR identifikovano je prisustvo šest glikozida antocijana, uključujući delfinidin, malvidin, i četiri derivata petunidina, kao i hlorogenske i dikafeoilhininske kiseline.

- U liofilizovanim plodovima LB sa različitih lokaliteta u Srbiji identifikovano je i kvantifikovano deset fitosterola, od kojih su najzastupljeniji bili β -sitosterol (18–26 %), Δ^5 -avenasterol (15–20 %) i 24-metildezmosterol (13–17 %).
- U liofilizovanim plodovima LB iz Srbije, po prvi put je utvrđeno prisustvo 24-metildezmosterola, što može biti potencijalni marker za identifikaciju plodova LB poreklom iz Srbije.
- Nutritivni sastav i sadržaj bioaktivnih jedinjenja se značajno razlikovao između liofilizovanih uzoraka LB prikupljenih sa različitih lokaliteta.

5.2. Zaključci druge faze istraživanja

U okviru druge faze istraživanja izvršena je analiza *in vitro* bioloških aktivnosti vodenometanolnih ekstrakata svežih plodova godži različitih *Lycium* vrsta i liofilizovanih plodova *L. barbarum* prikupljenih sa različitih lokaliteta u Srbiji. Antioksidativna aktivnost vodenometanolnih ekstrakata svežih i/ili liofilizovanih plodova godži izvršena je ispitivanjem antiradikalske i redukcionne sposobnosti, kao i ispitivanjem inhibicije lipidne peroksidacije. Antienzimski potencijal vodenometanolnih ekstrakata liofilizovanih plodova LB i LR procenjen je na osnovu sposobnosti inhibicije enzima: α -amilaze, α -glukozidaze, tirozinaze i acetilholinesteraze. Takođe, izvršena je analiza antimikrobne aktivnosti svežih i liofilizovanih plodova godži. Dodatno, za liofilizovani vodenometanolni ekstrakt plodova LR izvršena je analiza inhibicije enzima 15-lipooksigenaze, kao i ispitivanje prebiotske aktivnosti. Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Vodenometanolni ekstrakti plodova LR su pokazali najizraženiju redukcionu aktivnost (FRAP, CUPRAC) i sposobnost neutralizacije slobodnih radikala (DPPH, ABTS), dok je za ekstrakte plodova LB i LBa utvrđen veći kapacitet inhibicije lipidne peroksidacije.
- Antioksidativni kompozitni indeks (ACI) za vodenometanolni ekstrakt plodova LR je bio oko 1,7 puta veći u odnosu na vodenometanolne ekstrakte plodova LB i LBa.
- Vodenometanolni ekstrakti uzoraka liofilizovanih plodova LB u kojima je utvrđen najveći sadržaj TPC, kao i prisustvo hlorogenske kiseline, kafene kiseline i derivata kvercetina, pokazali su izraženije antioksidativne efekte.
- Vodenometanolni ekstrakti liofilizovanih plodova LB su pokazali oko dva puta izraženiji inhibitorni potencijal prema α -amilazi (IC_{50} je bio u rasponu od 1,68 do 2,83 mg/mL) u poređenju sa α -glukozidazom (IC_{50} je bio u rasponu između 5,32 do 6,88 mg/mL), ali slabije efekte u poređenju sa akarbozom za koju su IC_{50} vrednosti iznosile 5,27 μ g/mL za α -amilazu i 110 μ g/mL za α -glukozidazu.
- Vodenometanolni ekstrakti liofilizovanih plodova LB pokazali su antitirozinaznu aktivnost (IC_{50} vrednosti su bile u rasponima od 3,96 do 4,85 mg/mL) i acetilholinesteraznu aktivnost (IC_{50} vrednosti su bile u rasponu od 4,84 do 6,20 mg/mL), ali slabiju u odnosu na kojičnu kiselinu (IC_{50} = 16,43 μ g/mL) i galantamin (IC_{50} = 0,45 μ g/mL), kao pozitivne kontrole.
- Najizraženija antimikrobna aktivnost utvrđena je za vodenometanolni ekstrakt plodova LBa, koji je u koncentraciji od 2 mg/mL inhibirao rast tri Gram-negativne bakterije (*C. pneumoniae*, *S. aboni* i *P. aeruginosa*), kao i gljivicu *C. albicans*.

- Za razliku od vodenometanolnih ekstrakata plodova LB i LBa, ekstrakt plodova LR, koji je bogat antocijanima, nije pokazao inhibitory efekat na rast mikroorganizama, u ispitivanim koncentracijama (0,125–2 mg/mL).
- Vodenometanolni ekstrakt plodova LR u koncentracijama od 0,3 do 5,0 mg/mL, na dozno-zavisani način promovisao je rast probiotskih sojeva mikroorganizama, u rasponu od 111,4 % do 229,2 % u odnosu na kontrolu. Posebno izražen prebiotski potencijal je utvrđen na rast *Saccharomyces boulardii*, čiji je rast stimulisan 2,8 puta u poređenju sa kontrolom.

5.3. Zaključci treće faze istraživanja

- U okviru treće faze istraživanja izvršena je optimizacija ekstrakcije, nakon čega je u ekstraktima liofilizovanih plodova LB povećan sadržaj ukupnih polifenola i ukupnih flavonoida, uz istovremeno povećanje antioksidativnog potencijala.
- Primenom *Plackett-Burman* dizajna identifikovani su ključni parametri ekstrakcije: vreme, odnos droga/rastvarač i koncentracija etanola, čiji je uticaj dalje optimizovan korišćenjem centralnog kompozitnog dizajna i analizom metodologije površine odgovora.
- Optimalni uslovi za ekstrakciju obuhvatali su upotrebu 60% etanola (v/v), odnos droga/rastvarač 1:60 (m/v) i vreme ekstrakcije od 30 minuta.
- Ekstrakti pripremljeni pod prethodno definisanim uslovima, uz prethodnu maceraciju od 30 minuta na konstantnoj temperaturi od 40°C uz kontinuirano mešanje, pokazali su izraženiju antienzimsku aktivnost u poređenju sa ekstraktima iz prethodne faze istraživanja, što ukazuje na adekvatnost modela ekstrakcije.

5.4. Zaključci četvrte faze

U okviru četvrte faze istraživanja izvršena je analiza hemijskog sastava i *in vitro* antioksidativne i antienzimске aktivnosti sporednih proizvoda prerade plodova LB (pulpa i pogača), kao i optimizacija ekstrakcije njihovih bioaktivnih jedinjenja. Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Sadržaj ukupnog pepela, koji ukazuje na sadržaj minerala, značajno je veći u pulpi, nego u pogači. Ukupni sadržaj masti u pogači je bio oko 3,5 puta veći nego u pulpi. Sadržaj ukupnih proteina u pulpi je iznosio 16,8 %, dok je u pogači bio 19,6 %.
- Sadržaj NDV i RDV u pulpi i pogači iznosio je 6,51 % i 44,66 %, odnosno 7,44 % i 52,40 %, što ove nusproizvode svrstava u kategoriju „bogatih izvora vlakana“.
- Pulpa je sadržala veći udeo palmitinske i oleinske kiseline u poređenju sa pogačom, dok je pogača imala značajno veći udeo linolne kiseline.
- Utvrđene su značajne razlike u mineralnom sastavu i sadržaju bioaktivnih jedinjenja između sporednih proizvoda prerade plodova gođi.
- Veći sadržaj TPC i LBP je određen u ekstraktima pulpe u poređenju sa ekstraktima pogače.

- Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti vodenih, etanolnih i metanolnih ekstrakata nusproizvoda pokazala su značajne razlike između pulpe i pogače, čime se potvrđuju razlike između nusproizvoda, ali i uticaj različitih rastvarača.
- Analiza inhibicije enzima pokazala je razlike u antienzimskoj aktivnosti između nusproizvoda plodova godži, pri čemu su ekstrakti pulpe pokazali snažniji antienzimski potencijal na sve ispitivane enzime u poređenju sa ekstraktima pogače.
- Optimizacija ekstrakcije pokazala je da izbor rastvarača značajno utiče na efikasnost izolacije bioaktivnih jedinjenja, pri čemu se voda pokazala najefikasnijom za ekstrakciju polifenola iz pulpe, a kombinacija vode i metanola za pogaču.
- Optimalni uslovi za ekstrakciju obuhvatali su upotrebu 60 % etanola (v/v), odnos droga/rastvarač 1:60 (m/v) i vreme ekstrakcije od 30 minuta.
- Utvrđena anti-tirozinazna aktivnost ekstrakta pulpe dobijena pod optimizovanim uslovima ekstrakcije (IC_{50} = 2,77 mg/mL) je bila oko tri puta izraženija u odnosu na antitirozinaznu aktivnost za metanolni ekstrakt pulpe (IC_{50} = 8,89 mg/mL).

5.5. Sveobuhvatni zaključak

U okviru ove doktorske disertacije izvršena je analiza hemijskih i nutritivnih karakteristika, kao i *in vitro* bioloških aktivnosti plodova svežih i/ili liofilizovanih plodova *L. barbarum* i *L. ruthenicum*, kao i sporednih proizvoda prerade plodova *L. barbarum*, sa posebnim fokusom na optimizaciju ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja. Rezultati istraživanja su potvrdili značajne razlike u hemijskom sastavu između plodova različitih vrsta *Lycium* gajenih u Srbiji. Razlike u nutritivnim karakteristikama, sadržaju bioaktivnih jedinjenja i posledično biološkim aktivnostima između plodova godži prikupljenih sa različitih lokaliteta, ukazuju na značajan uticaj klimatskih uslova, kao i primenjenih agrotehničkih mera. Sporedni proizvodi prerade plodova godži, pulpa i pogača, predstavljaju potencijalne nove izvore proteina, vlakana, kao i drugih bioaktivnih jedinjenja. Optimizacija procesa ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja, poput ukupnih polifenola, flavonoida i polisaharida, uz povećanje antioksidativnog i antienzimskog potencijala dobijenih ekstrakata, može uticati na potencijalnu primenu plodova i sporednih proizvoda prerade plodova godži u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

6. LITERATURA

1. Tudor AD, Bolohan C, Tudor V, Teodorescu IR. Main active components of goji berry and their nutritional importance - A review. *J Appl Life Sci Environ*. 2023 Feb 28;55(2 (190)):111–32.
2. Vidović BB, Milinčić DD, Marčetić MD, Djuriš JD, Ilić TD, Kostić AŽ, et al. Health benefits and applications of goji berries in functional food products development: A review. *Antioxidants*. 2022 Jan 27;11(2):248.
3. Yao R, Heinrich M, Weckerle CS. The genus *Lycium* as food and medicine: A botanical, ethnobotanical and historical review. *J Ethnopharmacol*. 2018 Feb;212:50–66.
4. Cárdenas PD, Sonawane PD, Heinig U, Bocobza SE, Burdman S, Aharoni A. The bitter side of the nightshades: Genomics drives discovery in Solanaceae steroidal alkaloid metabolism. *Phytochemistry*. 2015 May;113:24–32.
5. Ghatak A, Chaturvedi P, Paul P, Agrawal GK, Rakwal R, Kim ST, et al. Proteomics survey of Solanaceae family: Current status and challenges ahead. *J Proteomics*. 2017 Oct;169:41–57.
6. Donno D, Beccaro GL, Mellano MG, Cerutti AK, Bounous G. Goji berry fruit (*Lycium* spp.): Antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation. *J Funct Foods*. 2015 Oct;18:1070–85.
7. Kulczyński B, Gramza-Michałowska A. Goji berry (*Lycium barbarum*): Composition and health effects – A review. *Pol J Food Nutr Sci*. 2016 Jun 30;66(2):67–75.
8. Yao R, Heinrich M, Wang Z, Weckerle CS. Quality control of goji (fruits of *Lycium barbarum* L. and *L. chinense* Mill.): A value chain analysis perspective. *J Ethnopharmacol*. 2018 Oct;224:349–58.
9. Sharma R, Raghuvanshi R, Kumar R, Thakur MS, Kumar S, Patel MK, et al. Current findings and future prospective of high-value trans Himalayan medicinal plant *Lycium ruthenicum* Murr: A systematic review. *Clin Phytoscience*. 2022 Dec;8(1):3.
10. Byambasuren SE, Wang J, Gaudel G. Medicinal value of wolfberry (*Lycium barbarum* L.). *J Med Plants Stud*. 2019;7(4):90–7.
11. Wang Y, Chen H, Wu M, Zeng S, Liu Y, Dong J. Chemical and genetic diversity of wolfberry. In: Chang RCC, So KF, editors. *Lycium barbarum* and human health [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2015 [cited 2024 Dec 10]. p. 1–26. Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-94-017-9658-3_1
12. Zeng S, Liu Y, Wu M, Liu X, Shen X, Liu C, et al. Identification and validation of reference genes for quantitative real-time PCR normalization and its applications in *Lycium*. *PLoS ONE*. 2014 May 8;9(5):e97039.
13. Yu J, Yan Y, Zhang L, Mi J, Yu L, Zhang F, et al. A comprehensive review of goji berry processing and utilization. *Food Sci Nutr*. 2023 Dec;11(12):7445–57.
14. Yu Z, Xia M, Lan J, Yang L, Wang Z, Wang R, et al. A comprehensive review on the ethnobotany, phytochemistry, pharmacology and quality control of the genus *Lycium* in China. *Food Funct*. 2023;14(7):2998–3025.
15. Yao R, Heinrich M, Zou Y, Reich E, Zhang X, Chen Y, et al. Quality variation of goji (fruits of *Lycium* spp.) in China: A comparative morphological and metabolomic analysis. *Front Pharmacol*. 2018 Feb 26;9:151.
16. Chen J, Chao CT, Wei X. Gojiberry breeding: Current status and future prospects. In: Soneji JR, Nageswara-Rao M, editors. *Breeding and health benefits of fruit and nut crops* [Internet]. InTech; 2018 [cited 2024 Dec 10]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/breeding-and-health-benefits-of-fruit-and-nut-crops/gojiberry-breeding-current-status-and-future-prospects>

17. Zhang Q, Chen W, Zhao J, Xi W. Functional constituents and antioxidant activities of eight Chinese native goji genotypes. *Food Chem.* 2016 Jun;200:230–6.
18. Lu Y, Guo S, Zhang F, Yan H, Qian D wei, Shang E xin, et al. Nutritional components characterization of goji berries from different regions in China. *J Pharm Biomed Anal.* 2021 Feb;195:113859.
19. Wang H, Li J, Tao W, Zhang X, Gao X, Yong J, et al. *Lycium ruthenicum* studies: Molecular biology, phytochemistry and pharmacology. *Food Chem.* 2018 Feb;240:759–66.
20. Montesano D, Rocchetti G, Cossignani L, Lucini L, Simonetti MS, Blasia F. Italian *Lycium barbarum* L. berry: Chemical characterization and nutraceutical value. *Nat Prod Commun.* 2018 Sep;13(9):1934578X1801300.
21. Skenderidis P, Lampakis D, Giavasis I, Leontopoulos S, Petrotos K, Hadjichristodoulou C, et al. Chemical properties, fatty-acid composition, and antioxidant activity of goji berry (*Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill.) fruits. *Antioxidants.* 2019 Mar 10;8(3):60.
22. Wojdyło A, Nowicka P, Bąbalewski P. Phenolic and carotenoid profile of new goji cultivars and their anti-hyperglycemic, anti-aging and antioxidant properties. *J Funct Foods.* 2018 Sep;48:632–42.
23. Mocan A, Moldovan C, Zengin G, Bender O, Locatelli M, Simirgiotis M, et al. UHPLC-QTOF-MS analysis of bioactive constituents from two Romanian goji (*Lycium barbarum* L.) berries cultivars and their antioxidant, enzyme inhibitory, and real-time cytotoxicological evaluation. *Food Chem Toxicol.* 2018 May;115:414–24.
24. Kosińska-Cagnazzo A, Weber B, Chablais R, Vouillamoz JF, Molnár B, Crovadore J, et al. Bioactive compound profile and antioxidant activity of fruits from six goji cultivars cultivated in Switzerland. *J Berry Res.* 2017 Mar 22;7(1):43–59.
25. Pires TCSP, Dias MI, Barros L, Calhella RC, Alves MJ, Santos-Buelga C, et al. Phenolic compounds profile, nutritional compounds and bioactive properties of *Lycium barbarum* L.: A comparative study with stems and fruits. *Ind Crops Prod.* 2018 Oct;122:574–81.
26. Covaci E, Senila M, Leopold LF, Olah NK, Cobzac C, Ivanova-Petropulos V, et al. Characterization of *Lycium barbarum* L. berry cultivated in North Macedonia: A chemometric approach. *J Berry Res.* 2020 Jun 1;10(2):223–41.
27. Mikulic-Petkovsek M, Schmitzer V, Slatnar A, Stampar F, Veberic R. Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. *J Food Sci* [Internet]. 2012 Oct [cited 2024 Dec 10];77(10). Available from: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1750-3841.2012.02896.x>
28. Vulić JJ, Čanadanović-Brunet JM, Četković GS, Djilas SM, Tumbas Šaponjac VT, Stajčić SS. Bioactive compounds and antioxidant properties of goji fruits (*Lycium barbarum* L.) cultivated in Serbia. *J Am Coll Nutr.* 2016 Nov 16;35(8):692–8.
29. Teixeira F, Silva AM, Delerue-Matos C, Rodrigues F. *Lycium barbarum* berries (Solanaceae) as source of bioactive compounds for healthy purposes: A review. *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 1;24(5):4777.
30. Bucheli P, Gao Q, Redgwell R, Vidal K, Wang J, Zhang W. Biomolecular and clinical aspects of Chinese wolfberry. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. *herbal medicine: biomolecular and clinical aspects* [Internet]. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011 [cited 2024 Dec 10]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92756/>
31. Gao Y, Wei Y, Wang Y, Gao F, Chen Z. *Lycium Barbarum*: A traditional Chinese herb and a promising anti-aging agent. *Aging Dis.* 2017;8(6):778.
32. Chinese Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China.* Vol. 1. Beijing: China Medical Science Press; 2015

33. Potterat O. Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity. *Planta Med.* 2010 Jan;76(01):7–19.
34. Council of Europe. *European Pharmacopoeia* (2020), 10th ed.; (Ph. Eur. 10); Council of Europe: Strasbourg, France, 2020.
35. International Organization for Standardization (ISO). *ISO 23193:2020 - Traditional Chinese Medicine — Lycium barbarum and Lycium chinense Fruit*. Geneva, Switzerland: ISO; 2020.
36. Lopatriello A, Previtera R, Pace S, Werner M, Rubino L, Werz O, et al. NMR-based identification of the major bioactive molecules from an Italian cultivar of *Lycium barbarum*. *Phytochemistry*. 2017 Dec;144:52–7.
37. Tang P, Giusti MM. Black goji as a potential source of natural color in a wide pH range. *Food Chem.* 2018 Dec;269:419–26.
38. Uasuf CG, De Angelis E, Guagnano R, Pilolli R, D’Anna C, Villalta D, et al. Emerging allergens in goji berry superfruit: The identification of new IgE binding proteins towards allergic patients’ Sera. *Biomolecules*. 2020 Apr 29;10(5):689.
39. Silva AM, Costa PC, Delerue-Matos C, Latocha P, Rodrigues F. Extraordinary composition of *Actinidia arguta* by-products as skin ingredients: A new challenge for cosmetic and medical skincare industries. *Trends Food Sci Technol.* 2021 Oct;116:842–53.
40. Ivanović N, Ilić T, Zrnić-Ćirić M, Todorović V, Đuričić I, Dabetić N. Agri-food by-products as a source of sustainable ingredients for the production of functional foods and nutraceuticals. *Arh Za Farm.* 2023;73(3):190–204.
41. Bora P, Ragaei S, Abdel-Aal ESM. Effect of incorporation of goji berry by-product on biochemical, physical and sensory properties of selected bakery products. *LWT.* 2019 Sep;112:108225.
42. Ravindran R, Jaiswal AK. Exploitation of food industry waste for high-value products. *Trends Biotechnol.* 2016 Jan;34(1):58–69.
43. Peydayesh M, Bagnani M, Soon WL, Mezzenga R. Turning food protein waste into sustainable technologies. *Chem Rev.* 2023 Mar 8;123(5):2112–54.
44. Kumar K, Srivastav S, Sharanagat VS. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrason Sonochem.* 2021 Jan;70:105325.
45. Ma ZF, Zhang H, Teh SS, Wang CW, Zhang Y, Hayford F, et al. Goji berries as a potential natural antioxidant medicine: An insight into their molecular mechanisms of action. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Jan 9;2019:1–9.
46. Pedro AC, Sánchez-Mata MC, Pérez-Rodríguez ML, Cámara M, López-Colón JL, Bach F, et al. Qualitative and nutritional comparison of goji berry fruits produced in organic and conventional systems. *Sci Hortic.* 2019 Nov;257:108660.
47. Zhang WP, Chen C, Pan Z, Xiao HW, Xie L, Gao ZJ, et al. Design and performance evaluation of a pilot-scale pulsed vacuum infrared drying (PVID) system for drying of berries. *Dry Technol.* 2020 Jul 1;38(10):1340–55.
48. Niro S, Fratianni A, Panfili G, Falasca L, Cinquanta L, Alam MR. Nutritional evaluation of fresh and dried goji berries cultivated in Italy. *Ital J Food Sci* [Internet]. 2017 Feb 26 [cited 2024 Oct 15];29(3). Available from: <https://doi.org/10.14674/1120-1770/ijfs.v649>
49. Jiao Y, Liu G. Goji Berry: A novel nutraceutical ‘superfruit’ for Florida master gardeners. *EDIS* [Internet]. 2020 Oct 23 [cited 2024 Dec 10];2020(5). Available from: <https://journals.flvc.org/edis/article/view/122449>
50. Zhao J, Li H, Xi W, An W, Niu L, Cao Y, et al. Changes in sugars and organic acids in wolfberry (*Lycium barbarum* L.) fruit during development and maturation. *Food Chem.* 2015 Apr;173:718–24.

51. Liu Z, Liu B, Wen H, Tao Y, Shao Y. Phytochemical profiles, nutritional constituents and antioxidant activity of black wolfberry (*Lycium ruthenicum* Murr.). *Ind Crops Prod.* 2020 Oct;154:112692.
52. Zhao D, Li S, Han X, Li C, Ni Y, Hao J. Physico-chemical properties and free amino acids profiles of six wolfberry cultivars in Zhongning. *J Food Compos Anal.* 2020 May;88:103460.
53. Ioniță-Mîndrican CB, Ziani K, Mititelu M, Oprea E, Neacșu SM, Moroșan E, et al. Therapeutic benefits and dietary restrictions of fiber intake: A state of the art review. *Nutrients.* 2022 Jun 26;14(13):2641.
54. WHO. WHO updates guidelines on fats and carbohydrates. 2023; Available from: <https://www.who.int/news/item/17-07-2023-who-updates-guidelines-on-fats-and-carbohydrates>
55. Hu J, Wang J, Li Y, Xue K, Kan J. Use of dietary fibers in reducing the risk of several cancer types: An umbrella review. *Nutrients.* 2023 May 30;15(11):2545.
56. Uredba CE 1924/2006. Regulation (EC) No 1924/2006 of the European parliament and of the council: Nutrition and health claims made on foods [Internet]. Available from: <https://www.legislation.gov.uk/eur/2006/1924/contents>
57. Chen D, Guo S, Zhou J, Zhu Y, Zhang F, Zeng F, et al. Chemical constituents from *Lycium barbarum* (Solanaceae) and their chemophenetic significance. *Biochem Syst Ecol.* 2021 Aug;97:104292.
58. Djuricic I, Calder PC. Beneficial outcomes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on human health: An update for 2021. *Nutrients.* 2021 Jul 15;13(7):2421.
59. Zhao X, Dong B, Li P, Wei W, Dang J, Liu Z, et al. Fatty acid and phytosterol composition, and biological activities of *Lycium ruthenicum* Murr. seed oil. *J Food Sci.* 2018 Oct;83(10):2448–56.
60. Blasi F, Montesano D, Simonetti MS, Cossignani L. A simple and rapid extraction method to evaluate the fatty acid composition and nutritional value of goji berry lipid. *Food Anal Methods.* 2017 Apr;10(4):970–9.
61. Cossignani L, Blasi F, Simonetti MS, Montesano D. Fatty acids and phytosterols to discriminate geographic origin of *Lycium barbarum* berry. *Food Anal Methods.* 2018 Apr;11(4):1180–8.
62. Guerrero-Castillo P, Reyes S, Acha O, Sepulveda B, Areche C. Agro-industrial waste seeds from *Peruvian Pouteria lucuma* as new source of phytosterols. *LWT.* 2021 Jun;144:111259.
63. Berger A, Jones PJ, Abumweis SS. Plant sterols: Factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids Health Dis.* 2004;3(1):5.
64. Li X, Xin Y, Mo Y, Marozik P, He T, Guo H. The bioavailability and biological activities of phytosterols as modulators of cholesterol metabolism. *Molecules.* 2022 Jan 14;27(2):523.
65. Jarouche M, Suresh H, Hennell J, Sullivan S, Lee S, Singh S, et al. The quality assessment of commercial *Lycium* berries using LC-ESI-MS/MS and chemometrics. *Plants.* 2019 Dec 13;8(12):604.
66. Nicolov M, Cocora M, Buda V, Danciu C, Duse AO, Watz C, et al. Hydrosoluble and liposoluble vitamins: New perspectives through ADMET analysis. *Medicina (Mex).* 2021 Nov 4;57(11):1204.
67. Fatchurrahman D, Amodio ML, Colelli G. Quality of goji berry fruit (*Lycium barbarum* L.) stored at different temperatures. *Foods.* 2022 Nov 18;11(22):3700.
68. Fenech M, Amaya I, Valpuesta V, Botella MA. Vitamin C content in fruits: Biosynthesis and regulation. *Front Plant Sci.* 2019 Jan 24;9:2006.

69. Lee SK, Kader AA. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol Technol*. 2000 Nov;20(3):207–20.
70. Uredba EU 1169/2011. Regulation (EU) No 1169/2011 of the European parliament and of the council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32011R1169>
71. Kafkaletou M, Christopoulos MV, Tsaniklidis G, Papadakis I, et al. Nutritional value and consumer-perceived quality of fresh goji berries (*Lycium barbarum* L. and *L. chinense* L.) from plants cultivated in Southern Europe. *Fruits*. 2018 Feb 1;73(1):5–12.
72. Toyada-Ono Y, Maeda M, Nakao M, Yoshimura M, Sugiura-tomimori N, Fukami H, et al. A novel vitamin C analog, 2-O-(β -D-glucopyranosyl)ascorbic acid: Examination of enzymatic synthesis and biological activity. *J Biosci Bioeng*. 2005 Apr;99(4):361–5.
73. Toyoda-Ono Y, Maeda M, Nakao M, Yoshimura M, Sugiura-Tomimori N, Fukami H. 2-O-(β -D-glucopyranosyl)ascorbic acid, a novel ascorbic acid analogue isolated from *Lycium* fruit. *J Agric Food Chem*. 2004 Apr 1;52(7):2092–6.
74. He L, Ji J, Sun J, Pengjuan Z, Zhai L, Tang D, et al. Facile and improved synthesis of the 2-O- β -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid. *Tetrahedron Lett*. 2023 Jan;115:154314.
75. Wojcieszek J, Kwiatkowski P, Ruzik L. Speciation analysis and bioaccessibility evaluation of trace elements in goji berries (*Lycium barbarum*, L.). *J Chromatogr A*. 2017 Apr;1492:70–8.
76. Bertoldi D, Cossignani L, Blasi F, Perini M, Barbero A, Pianezze S, et al. Characterisation and geographical traceability of Italian goji berries. *Food Chem*. 2019 Mar;275:585–93.
77. Yossa Nzeuwa IB, Guo B, Zhang T, Wang L, Ji Q, Xia H, et al. Comparative metabolic profiling of *Lycium* fruits (*Lycium barbarum* and *Lycium chinense*) from different areas in China and from Nepal. *J Food Qual*. 2019 Feb 17;2019:1–6.
78. Kulaitienė J, Vaitkevičienė N, Jarienė E, Černiauskienė J, Jeznach M, Paulauskienė A. Concentrations of minerals, soluble solids, vitamin C, carotenoids and toxigenic elements in organic goji berries (*Lycium barbarum* L.) cultivated in Lithuania. *Biol Agric Hort*. 2020 Apr 2;36(2):130–40.
79. Oğuz İ, Değirmenci İ, Kafkas E. Determination of the total phenolic and anthocyanin contents, as well as the total antioxidant capacity, of black wolfberry (*Lycium ruthenicum*) fruits. *J Process Energy Agric*. 2019;23(4):158–61.
80. Talay R, Erdoğan Ü, Turan M. Physico-chemical properties, mineral matter, organic acid, amino acid, and plant hormones content of goji berry (*Lycium barbarum* L.) grown in Turkey. *Turk J Agric - Food Sci Technol*. 2021 Nov 2;9(10):1889–94.
81. Magwaza LS, Opara UL. Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products—A review. *Sci Hort*. 2015 Mar;184:179–92.
82. Cheng J, Zhou SF, Zhou ZW, Sheng HP, He LJ, Fan XW, et al. An evidence-based update on the pharmacological activities and possible molecular targets of *Lycium barbarum* polysaccharides. *Drug Des Devel Ther*. 2014 Dec;33.
83. Ma RH, Zhang XX, Thakur K, Zhang JG, Wei ZJ. Research progress of *Lycium barbarum* L. as functional food: Phytochemical composition and health benefits. *Curr Opin Food Sci*. 2022 Oct;47:100871.
84. Wu DT, Guo H, Lin S, Lam SC, Zhao L, Lin DR, et al. Review of the structural characterization, quality evaluation, and industrial application of *Lycium barbarum* polysaccharides. *Trends Food Sci Technol*. 2018 Sep;79:171–83.
85. Xie J, Wu D, Li W, Ning C, Tang Y, Zhao J, et al. Effects of polysaccharides in *Lycium barbarum* berries from different regions of China on macrophages function and their correlation to the glycosidic linkages. *J Food Sci*. 2017 Oct;82(10):2411–20.

86. Wang Y, Jin H, Dong X, Yang S, Ma S, Ni J. Quality evaluation of *Lycium barbarum* (wolfberry) from different regions in China based on polysaccharide structure, yield and bioactivities. *Chin Med*. 2019 Dec;14(1):49.
87. Masci A, Carradori S, Casadei MA, Paolicelli P, Petralito S, Ragno R, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides: Extraction, purification, structural characterisation and evidence about hypoglycaemic and hypolipidaemic effects. A review. *Food Chem*. 2018 Jul;254:377–89.
88. Eggersdorfer M, Wyss A. Carotenoids in human nutrition and health. *Arch Biochem Biophys*. 2018 Aug;652:18–26.
89. Amagase H, Farnsworth NR. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (goji). *Food Res Int*. 2011 Aug;44(7):1702–17.
90. Liu Y, Zeng S, Sun W, Wu M, Hu W, Shen X, et al. Comparative analysis of carotenoid accumulation in two goji (*Lycium barbarum* L. and *L. ruthenicum* Murr.) fruits. *BMC Plant Biol*. 2014 Dec;14(1):269.
91. Inbaraj BS, Lu H, Hung CF, Wu WB, Lin CL, Chen BH. Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC–DAD–APCI–MS. *J Pharm Biomed Anal*. 2008 Aug;47(4–5):812–8.
92. Hempel J, Schädle CN, Sprenger J, Heller A, Carle R, Schweiggert RM. Ultrastructural deposition forms and bioaccessibility of carotenoids and carotenoid esters from goji berries (*Lycium barbarum* L.). *Food Chem*. 2017 Mar;218:525–33.
93. Murillo A, Hu S, Fernandez M. Zeaxanthin: Metabolism, properties, and antioxidant protection of eyes, heart, liver, and skin. *Antioxidants*. 2019 Sep 11;8(9):390.
94. Lu Y, Guo S, Zhang F, Yan H, Qian DW, Wang HQ, et al. Comparison of functional components and antioxidant activity of *Lycium barbarum* L. fruits from different regions in China. *Molecules*. 2019 Jun 14;24(12):2228.
95. Peng Y, Ma C, Li Y, Leung KSY, Jiang ZH, Zhao Z. Quantification of zeaxanthin dipalmitate and total carotenoids in *Lycium* fruits (fructus *Lycii*). *Plant Foods Hum Nutr*. 2005 Dec;60(4):161–4.
96. Wang CC, Chang SC, Inbaraj BS, Chen BH. Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity. *Food Chem*. 2010 May;120(1):184–92.
97. Nimalaratne C, Lopes-Lutz D, Schieber A, Wu J. Effect of domestic cooking methods on egg yolk xanthophylls. *J Agric Food Chem*. 2012 Dec 26;60(51):12547–52.
98. Karioti A, Bergonzi MC, Vincieri FF, Bilia AR. Validated method for the analysis of goji berry, a rich source of zeaxanthin dipalmitate. *J Agric Food Chem*. 2014 Dec 31;62(52):12529–35.
99. Lourenço-Lopes C, Carreira-Casais A, Fraga-Corral M, Garcia-Oliveira P, Soria A, Jarboui A, et al. Carotenoids as natural colorful additives for the food industry. In: A. Prieto M, Otero P, editors. *Natural Food Additives* [Internet]. IntechOpen; 2022 [cited 2024 Oct 24]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/79447>
100. Rocchetti G, Gregorio RP, Lorenzo JM, Barba FJ, Oliveira PG, Prieto MA, et al. Functional implications of bound phenolic compounds and phenolics–food interaction: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2022 Mar;21(2):811–42.
101. Saurina J, Sentellas S. Determination of phenolic compounds in food matrices: Application to characterization and authentication. In: *Fast liquid chromatography–mass spectrometry methods in food and environmental analysis* [Internet]. Imperial college press; 2015 [cited 2024 Dec 10]. p. 517–47. Available from: http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/9781783264940_0013

102. Mocan A, Cairone F, Locatelli M, Cacciagrano F, Carradori S, Vodnar DC, et al. Polyphenols from *Lycium barbarum* (goji) fruit European cultivars at different maturation steps: Extraction, HPLC-DAD analyses, and biological evaluation. *Antioxidants*. 2019 Nov 16;8(11):562.
103. Shamanin VP, Tekin-Cakmak ZH, Gordeeva EI, Karasu S, Pototskaya I, Chursin AS, et al. Antioxidant capacity and profiles of phenolic acids in various genotypes of purple wheat. *Foods*. 2022 Aug 20;11(16):2515.
104. Jiang Y, Fang Z, Leonard W, Zhang P. Phenolic compounds in *Lycium* berry: Composition, health benefits and industrial applications. *J Funct Foods*. 2021 Feb;77:104340.
105. Afnan, Saleem A, Akhtar MF, Sharif A, Akhtar B, Siddique R, et al. Anticancer, cardio-protective and anti-inflammatory potential of natural-sources-derived phenolic acids. *Molecules*. 2022 Oct 26;27(21):7286.
106. Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C, Restani P. Polyphenols and human health: The role of bioavailability. *Nutrients*. 2021 Jan 19;13(1):273.
107. Pedro AC, Maurer JBB, Zawadzki-Baggio SF, Ávila S, Maciel GM, Haminiuk CWI. Bioactive compounds of organic goji berry (*Lycium barbarum* L.) prevents oxidative deterioration of soybean oil. *Ind Crops Prod*. 2018 Feb;112:90–7.
108. Niki E, Noguchi N. Evaluation of antioxidant capacity. What capacity is being measured by which method? *IUBMB Life*. 2000 Oct;50(4–5):323–9.
109. Bastos RDS, Oliveira KKG, Melo EDA, Lima VLAGD. Stability of anthocyanins from agroindustrial residue of isabel grape grown in São Francisco Valley, Brazil. *Rev Bras Frutic*. 2017; 39(1).
110. Bursać Kovačević D, Putnik P, Dragović-Uzelac V, Vahčić N, Babojelić MS, Levaj B. Influences of organically and conventionally grown strawberry cultivars on anthocyanins content and color in purees and low-sugar jams. *Food Chem*. 2015 Aug;181:94–100.
111. Hu N, Zheng J, Li W, Suo Y. Isolation, stability, and antioxidant activity of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murray and *Nitraria Tangutorum* Bobr of Qinghai-Tibetan plateau. *Sep Sci Technol*. 2014 Dec 12;49(18):2897–906.
112. Wu T, Lv H, Wang F, Wang Y. Characterization of polyphenols from *Lycium ruthenicum* fruit by UPLC-Q-TOF/MS^E and their antioxidant activity in Caco-2 cells. *J Agric Food Chem*. 2016 Mar 23;64(11):2280–8.
113. Ma Y, Zhang Y, Su Y. Progress on black goji berry basic research. *J Chin Soil Water Conserv*. 2017;2:46–50.
114. Vidana Gamage GC, Lim YY, Choo WS. Black goji berry anthocyanins: Extraction, stability, health benefits, and applications. *ACS Food Sci Technol*. 2021 Sep 17;1(8):1360–70.
115. Tian Z, Aierken A, Pang H, Du S, Feng M, Ma K, et al. Constituent analysis and quality control of anthocyanin constituents of dried *Lycium ruthenicum* Murray fruits by HPLC–MS and HPLC–DAD. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2016 May 27;39(9):453–8.
116. Sunil L, Shetty NP. Biosynthesis and regulation of anthocyanin pathway genes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2022 Mar;106(5–6):1783–98.
117. Debnath B, Singh WS, Das M, Goswami S, Singh MK, Maiti D, et al. Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. *Mater Today Chem*. 2018 Sep;9:56–72.
118. Muroi A, Ishihara A, Tanaka C, Ishizuka A, Takabayashi J, Miyoshi H, et al. Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 2009 Aug;230(3):517–27.
119. Qian D, Zhao Y, Yang G, Huang L. Systematic review of chemical constituents in the genus *Lycium* (Solanaceae). *Molecules*. 2017 Jun 8;22(6):911.

120. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 2008 Jun;4(2):89–96.
121. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*. 2015 Jan;30(1):11–26.
122. Skenderidis P, Kerasioti E, Karkanta E, Stagos D, Kouretas D, Petrotos K, et al. Assessment of the antioxidant and antimutagenic activity of extracts from goji berry of Greek cultivation. *Toxicol Rep*. 2018;5:251–7.
123. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2007 Nov 1;35(5):1147–50.
124. Carocho M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*. 2013 Jan;51:15–25.
125. Câmara JS, Albuquerque BR, Aguiar J, Corrêa RCG, Gonçalves JL, Granato D, et al. Food bioactive compounds and emerging techniques for their extraction: Polyphenols as a case study. *Foods*. 2020 Dec 24;10(1):37.
126. Clower L, Fleshman T, Geldenhuys WJ, Santanam N. Targeting Oxidative stress involved in endometriosis and its pain. *Biomolecules*. 2022 Jul 29;12(8):1055.
127. Rashmi HB, Negi PS. Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. *Food Res Int*. 2020 Oct;136:109298.
128. Ali SS, Ahsan H, Zia MK, Siddiqui T, Khan FH. Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *J Food Biochem* [Internet]. 2020 Mar [cited 2024 Dec 9];44(3). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfbc.13145>
129. Protti M, Gualandi I, Mandrioli R, Zappoli S, Tonelli D, Mercolini L. Analytical profiling of selected antioxidants and total antioxidant capacity of goji (*Lycium* spp.) berries. *J Pharm Biomed Anal*. 2017 Sep;143:252–60.
130. Islam T, Yu X, Badwal TS, Xu B. Comparative studies on phenolic profiles, antioxidant capacities and carotenoid contents of red goji berry (*Lycium barbarum*) and black goji berry (*Lycium ruthenicum*). *Chem Cent J*. 2017 Dec;11(1):59.
131. Chang SK, Alasalvar C, Shahidi F. Superfruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health effects—A comprehensive review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019 May 31;59(10):1580–604.
132. Li XL, Zhou AG. Evaluation of the antioxidant effects of polysaccharides extracted from *Lycium barbarum*. *Med Chem Res*. 2007 Dec;15(9):471–82.
133. Ren B, Ma Y, Shen Y, Gao B. Protective action of *Lycium barbarum* L. (LbL) and betaine on lipid peroxidation of erythrocyte membrane induced by H₂O₂. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 1995 May;20(5):303–4.
134. Povolito C, Foschini A, Ribaudo G. Optimization of the extraction of bioactive molecules from *Lycium barbarum* fruits and evaluation of the antioxidant activity: A combined study. *Nat Prod Res*. 2019 Sep 17;33(18):2694–8.
135. Cai H, Liu F, Zuo P, Huang G, Song Z, Wang T, et al. Practical application of antidiabetic efficacy of *Lycium barbarum* polysaccharide in patients with type 2 diabetes. *Med Chem*. 2015 Apr 29;11(4):383–90.
136. Zhao Q, Li J, Yan J, Liu S, Guo Y, Chen D, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides ameliorates renal injury and inflammatory reaction in alloxan-induced diabetic nephropathy rabbits. *Life Sci*. 2016 Jul;157:82–90.
137. World Health Organization (WHO). *Health topics: Diabetes*. 2024. Available at: https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1. Accessed [2024 Dec 24].

138. Shi X, Xia H, Xu D, Liu H, Pan D, Sun G. Effects of the mannose, the major component of *Lycium barbarum* polysaccharides, and its potential target metabolite inositol on mouse β -TC6 cells. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2020 May;49(3):458–62.
139. Ciceoi R, Luchian V, Tabacu AF, Gutue M, Stavrescu-Bedivan MM. Goji berry gall mite expansion in Europe, with emphasis on Southeastern part of Romania. *Bull Univ Agric Sci Vet Med Cluj-Napoca Food Sci Technol* [Internet]. 2022 Oct 21 [cited 2024 Oct 16];78(2). Available from: <https://journals.usamvcluj.ro/index.php/fst/article/view/buasvmcnfst%3A2021.0028>
140. Ryu MJ, Kim M, Ji M, Lee C, Yang I, Hong SB, et al. Discrimination of *Lycium chinense* and *L. barbarum* based on metabolite analysis and hepatoprotective activity. *Molecules*. 2020 Dec 10;25(24):5835.
141. Zhu J, Chen C, Zhang B, Huang Q. The inhibitory effects of flavonoids on α -amylase and α -glucosidase. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020 Feb 21;60(4):695–708.
142. World Health Organisation (WHO) *Dementia*. 2023; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
143. Arias-Sánchez RA, Torner L, Fenton Navarro B. Polyphenols and neurodegenerative diseases: Potential effects and mechanisms of neuroprotection. *Molecules*. 2023 Jul 14;28(14):5415.
144. Kelsey N, Hulick W, Winter A, Ross E, Linseman D. Neuroprotective effects of anthocyanins on apoptosis induced by mitochondrial oxidative stress. *Nutr Neurosci*. 2011 Nov;14(6):249–59.
145. Wu X, Li X, Liang S, Liu Y, Dai X, Zheng Q, et al. Neuroprotective effect of anthocyanin extract from *Lycium ruthenicum* Murray in A β 1–42-induced rat model of AD [Internet]. 2017 [cited 2024 Dec 10]. Available from: <http://www.preprints.org/manuscript/201705.0144/v1>
146. Nardi G, Anuário ADF, Freire C, Megiolaro F, Schneider K, Perazzoli MA, et al. Anti-inflammatory activity of berry fruits in mice model of inflammation is based on oxidative stress modulation. *Pharmacogn Res*. 2016;8(5):42.
147. Bennett JM, Reeves G, Billman GE, Sturmborg JP. Inflammation—nature’s way to efficiently respond to all types of challenges: Implications for understanding and managing “the epidemic” of chronic diseases. *Front Med*. 2018 Nov 27;5:316.
148. Singh NK, Rao GN. Emerging role of 12/15-Lipoxygenase (ALOX15) in human pathologies. *Prog Lipid Res*. 2019 Jan;73:28–45.
149. Werz O, Steinhilber D. Development of 5-lipoxygenase inhibitors—lessons from cellular enzyme regulation. *Biochem Pharmacol*. 2005 Aug;70(3):327–33.
150. Peng Q, Liu H, Shi S, Li M. *Lycium ruthenicum* polysaccharide attenuates inflammation through inhibiting TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Int J Biol Macromol*. 2014 Jun;67:330–5.
151. Peng Q, Liu H, Lei H, Wang X. Relationship between structure and immunological activity of an arabinogalactan from *Lycium ruthenicum*. *Food Chem*. 2016 Mar;194:595–600.
152. Kakoullis L, Papachristodoulou E, Chra P, Panos G. Mechanisms of antibiotic resistance in important Gram-positive and Gram-negative pathogens and novel antibiotic solutions. *Antibiotics*. 2021 Apr 10;10(4):415.
153. Rapacka-Zdończyk A, Woźniak A, Michalska K, Pierański M, Ogonowska P, Grinholc M, et al. Factors determining the susceptibility of bacteria to antibacterial photodynamic inactivation. *Front Med*. 2021 May 12;8:642609.
154. Kabir F, Katayama S, Tanji N, Nakamura S. Antimicrobial effects of chlorogenic acid and related compounds. *J Korean Soc Appl Biol Chem*. 2014 Jun;57(3):359–65.

155. Skenderidis P, Mitsagga C, Giavasis I, Petrotos K, Lampakis D, Leontopoulos S, et al. The *in vitro* antimicrobial activity assessment of ultrasound assisted *Lycium barbarum* fruit extracts and pomegranate fruit peels. *J Food Meas Charact*. 2019 Sep;13(3):2017–31.
156. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Aug;14(8):491–502.
157. Yang Y, Chang Y, Wu Y, Liu H, Liu Q, Kang Z, et al. A homogeneous polysaccharide from *Lycium barbarum*: Structural characterizations, anti-obesity effects and impacts on gut microbiota. *Int J Biol Macromol*. 2021 Jul;183:2074–87.
158. Zhu W, Zhou S, Liu J, McLean RJC, Chu W. Prebiotic, immuno-stimulating and gut microbiota-modulating effects of *Lycium barbarum* polysaccharide. *Biomed Pharmacother*. 2020 Jan;121:109591.
159. Faria A, Fernandes I, Norberto S, Mateus N, Calhau C. Interplay between anthocyanins and gut microbiota. *J Agric Food Chem*. 2014 Jul 23;62(29):6898–902.
160. Yan Y, Peng Y, Tang J, Mi J, Lu L, Li X, et al. Effects of anthocyanins from the fruit of *Lycium ruthenicum* Murray on intestinal microbiota. *J Funct Foods*. 2018 Sep;48:533–41.
161. Peng Y, Yan Y, Wan P, Dong W, Huang K, Ran L, et al. Effects of long-term intake of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murray on the organism health and gut microbiota *in vivo*. *Food Res Int*. 2020 Apr;130:108952.
162. Qin X, Luo X, Han J, Chen Y, Zhang K, Hu D. Residual determination of pyrethrins in *Lycium barbarum* (goji) by GC-MS/MS and a dietary risk assessment of Chinese goji consumption. *Food Addit Contam Part A*. 2020 Mar 3;37(3):478–87.
163. Zhang Y, Qin J, Wang Y, Zhou T, Feng N, Ma C, et al. Levels and health risk assessment of pesticides and metals in *Lycium barbarum* L. from different sources in Ningxia, China. *Sci Rep*. 2022 Jan 12;12(1):561.
164. FDA. US Food and Drug Administration, Data from: Import Alerts. 2017; Available from: www.accessdata.fda.gov/cms_ia/default.html
165. RASFF. EU Rapid Alert System for Food and Feed, Data from: Food and feed safety alerts. 2017; Available from: webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal
166. Arroyo-Martinez Q, Sáenz MJ, Arias FA, Acosta MSJ. *Lycium barbarum*: A new hepatotoxic “natural” agent? *Dig Liver Dis*. 2011 Sep;43(9):749.
167. Karaman K, Yalçın Yılmaz D, Özlüer YE, Çanakçı SE, Deniz AT. A new hepatotoxic agent: Goji berry. *J Emerg Med Case Rep*. 2019 Oct 1;10(4):105–7.
168. Carnés J, De Larramendi CH, Ferrer A, Huertas AJ, López-Matas MA, Pagán JA, et al. Recently introduced foods as new allergenic sources: Sensitisation to goji berries (*Lycium barbarum*). *Food Chem*. 2013 Apr;137(1–4):130–5.
169. Bensky D, Gamble A. Chinese herbal medicine: Materia medica. 7. printing. Seattle: Eastland Press; 1986. 723 p.
170. Monzón Ballarín S, López-Matas MA, Sáenz Abad D, Pérez-Cinto N, Carnés J. Anaphylaxis associated with the ingestion of goji berries (*Lycium barbarum*). *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2011;21(7):567–70.
171. Zauli D, Mirarchi MG. Anaphylaxis induced by goji berries. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2015 Jun;114(6):535–6.
172. Zhang J, Tian L, Xie B. Bleeding due to a probable interaction between warfarin and gouqizi (*Lycium Barbarum* L.). *Toxicol Rep*. 2015;2:1209–12.
173. Guzmán CE, Guzmán-Moreno CG, Assad-Morell JL, Carrizales-Sepúlveda EF. Flecainide toxicity associated with the use of goji berries: A case report. *Eur Heart J - Case Rep*. 2021 May 29;5(6):ytab204.

174. Azwanida N. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants* [Internet]. 2015 [cited 2024 Dec 10];04(03). Available from: <http://www.omicsgroup.org/journals/a-review-on-the-extraction-methods-use-in-medicinal-plants-principle-strength-and-limitation-2167-0412-1000196.php?aid=58448>
175. Mohammad Azmin SNH, Abdul Manan Z, Wan Alwi SR, Chua LS, Mustaffa AA, Yunus NA. Herbal processing and extraction technologies. *Sep Purif Rev*. 2016 Oct;45(4):305–20.
176. Krakowska-Sieprawska A, Kielbasa A, Rafińska K, Ligor M, Buszewski B. Modern methods of pre-treatment of plant material for the extraction of bioactive compounds. *Molecules*. 2022 Jan 23;27(3):730.
177. Usman I, Hussain M, Imran A, Afzaal M, Saeed F, Javed M, et al. Traditional and innovative approaches for the extraction of bioactive compounds. *Int J Food Prop*. 2022 Dec 31;25(1):1215–33.
178. Tiwari BK. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends Anal Chem*. 2015 Sep;71:100–9.
179. Hikmawanti NPE, Ramadan D, Jantan I, Mun'im A. Natural Deep Eutectic Solvents (NADES): Phytochemical extraction performance enhancer for pharmaceutical and nutraceutical product development. *Plants*. 2021 Oct 1;10(10):2091.
180. Marcus Y. Extraction by subcritical and supercritical water, methanol, ethanol and their mixtures. *Separations*. 2018 Jan 1;5(1):4.
181. Baş D, Boyacı İH. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J Food Eng*. 2007 Feb;78(3):836–45.
182. Jankovic A, Chaudhary G, Goia F. Designing the design of experiments (DOE) – An investigation on the influence of different factorial designs on the characterization of complex systems. *Energy Build*. 2021 Nov;250:111298.
183. Weremfo A, Abassah-Oppong S, Adulley F, Dabie K, Seidu-Larry S. Response surface methodology as a tool to optimize the extraction of bioactive compounds from plant sources. *J Sci Food Agric*. 2023 Jan 15;103(1):26–36.
184. Yin G, Dang Y. Optimization of extraction technology of the *Lycium barbarum* polysaccharides by Box–Behnken statistical design. *Carbohydr Polym*. 2008 Nov;74(3):603–10.
185. Devesa-Rey R, Arce E, Cartelle A, Suárez-García A. Use of Plackett–Burman and Box–Behnken designs to optimize bioelectricity production from winery residues. *Water*. 2023 Aug 25;15(17):3051.
186. Gan CY, Latiff AA. Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology. *Food Chem*. 2011 Feb;124(3):1277–83.
187. Montgomery DC. Design and analysis of experiments. Tenth edition, EMEA edition. Hoboken, NJ: Wiley; 2020. 1 p.
188. William Horwitz. Official Methods of AOAC International. 17th ed. Arlington, VA, USA; 2000.
189. Lee SC, Prosky L, Vries JWD. Determination of total, soluble, and insoluble dietary fiber in foods—enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: Collaborative study. *J AOAC Int*. 1992 May 1;75(3):395–416.
190. Sl. Glasnik RS, br. 61/2024. Pravilnik o deklarisanju, označavanju i reklamiranju hrane [Internet]. Available from: <https://www.paragraf.rs/propisi/pravilnik-o-deklarisanju-oznacavanju-i-reklamiranju-hrane.html>
191. Djuricic I, Gojkovic T, Antonijevic B, Sobajic S. Lipid profile and health benefit of commonly consumed fresh water and sea water fish species in the population of Serbia. *Vojnosanit Pregl*. 2022;79(1):8–16.

192. FAO/WHO. WHO and FAO Joint Consultation: Fats and oils in human nutrition. *Nutr Rev.* 2009 Apr 27;53(7):202–5.
193. Ulbricht TLV, Southgate DAT. Coronary heart disease: Seven dietary factors. *The Lancet.* 1991 Oct;338(8773):985–92.
194. Gwatidzo L, Botha BM, McCrindle RI, Combrinck S. Extraction and identification of phytosterols in manketti (*Schinziophyton rautanenii*) nut oil. *J Am Oil Chem Soc.* 2014 May;91(5):783–94.
195. Trang, H.K. Development of HPLC methods for the determination of water-soluble vitamins in pharmaceuticals and fortified food products. Ph.D. Thesis, Clemson University, Clemson, SC, USA, 2013.
196. SRPS EN 12143:2005. Serbian standard, 2005. In fruit and vegetable juices: Estimation of soluble solids content-refractometric method; Institute for standardization of Serbia: Belgrade, Serbia, 2005. [Internet]. Available from: https://iss.rs/sr_Cyrl/project/show/iss:proj:17247
197. SRPS EN 12147:2005. Serbian standard, 2005. In fruit and vegetable juices: Determination of titrable acidity; Institute for standardization of Serbia: Belgrade, Serbia, 2005. [Internet]. Available from: https://iss.rs/sr_Cyrl/project/show/iss:proj:17248
198. Nayek S, Choudhury IH. Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Research Journal of Chemical Sciences.* 2014;4(9):63–9.
199. Nagata M, Yamashita I. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* 1992;39(10):925–8.
200. Attard E. A rapid microtitre plate Folin-Ciocalteu method for the assessment of polyphenols. *Open Life Sci.* 2013 Jan 1;8(1):48–53.
201. Shrivastava A, Gupta V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron Young Sci.* 2011;2(1):21.
202. Meyer RS, Whitaker BD, Little DP, Wu SB, Kennelly EJ, Long CL, et al. Parallel reductions in phenolic constituents resulting from the domestication of eggplant. *Phytochemistry.* 2015 Jul;115:194–206.
203. Stanoeva JP, Stefova M, Bogdanov J. Systematic HPLC/DAD/MSn study on the extraction efficiency of polyphenols from black goji: Citric and ascorbic acid as alternative acid components in the extraction mixture. *JBR.* 2021 Dec 15;11(4):611–30.
204. Sun J, Song YL, Zhang J, Huang Z, Huo HX, Zheng J, et al. Characterization and quantitative analysis of phenylpropanoid amides in eggplant (*Solanum melongena* L.) by high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and hybrid ion trap time-of-flight mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2015 Apr 8;63(13):3426–36.
205. Wu SB, Meyer RS, Whitaker BD, Litt A, Kennelly EJ. A new liquid chromatography–mass spectrometry-based strategy to integrate chemistry, morphology, and evolution of eggplant (*Solanum*) species. *J Chromatogr A.* 2013 Nov;1314:154–72.
206. Zheng J, Ding C, Wang L, Li G, Shi J, Li H, et al. Anthocyanins composition and antioxidant activity of wild *Lycium ruthenicum* Murr. from Qinghai-Tibet Plateau. *Food Chem.* 2011 Jun;126(3):859–65.
207. Council of Europe. *European Pharmacopoeia (2011)*, 7th ed.; (Ph. Eur. 7); Council of Europe: Strasbourg, France, 2011.
208. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 1999 Mar;64(4):555–9.
209. He Q, Du B, Xu B. Extraction optimization of phenolics and antioxidants from black goji berry by accelerated solvent extractor using response surface methodology. *Appl Sci.* 2018 Oct 13;8(10):1905.

210. Djordjević B, Šavikin K, Zdunić G, Janković T, Vulić T, Pljevljakušić D, et al. Biochemical properties of the fresh and frozen black currants and juices. *J Med Food*. 2013 Jan;16(1):73–81.
211. Norma PM, Virginia NM, Ral RH, Jos CE, Cristbal NA. A microassay for quantification of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging. *Afr J Biochem Res*. 2014 Jan 31;8(1):14–8.
212. Nakanishi I, Ohkubo K, Ogawa Y, Matsumoto K ichiro, Ozawa T, Fukuzumi S. Aluminium ion-promoted radical-scavenging reaction of methylated hydroquinone derivatives. *Org Biomol Chem*. 2016;14(33):7956–61.
213. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999 May;26(9–10):1231–7.
214. Bedlovičová Z, Strapáč I, Baláž M, Salayová A. A brief overview on antioxidant activity determination of silver nanoparticles. *Molecules*. 2020 Jul 13;25(14):3191.
215. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996 Jul;239(1):70–6.
216. Santos CMM, Silva AMS. The antioxidant activity of prenylflavonoids. *Molecules*. 2020 Feb 6;25(3):696.
217. Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Esin Karademir S, Erçağ E. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *Int J Food Sci Nutr*. 2006 Jan;57(5–6):292–304.
218. Gülçin İ. Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Arch Toxicol*. 2012 Mar;86(3):345–91.
219. Reis FS, Martins A, Barros L, Ferreira ICFR. Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between *in vivo* and *in vitro* samples. *Food Chem Toxicol*. 2012 May;50(5):1201–7.
220. Kiokias S, Varzakas T. Activity of flavonoids and β -carotene during the auto-oxidative deterioration of model food oil-in water emulsions. *Food Chem*. 2014 May;150:280–6.
221. Ahmed MU, Ibrahim A, Dahiru NJ, Mohammed HS. Alpha amylase inhibitory potential and mode of inhibition of oils from *Allium sativum* (garlic) and *Allium cepa* (onion). *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes*. 2020 Jan;13:117955142096310.
222. Lankatillake C, Luo S, Flavel M, Lenon GB, Gill H, Huynh T, et al. Screening natural product extracts for potential enzyme inhibitors: Protocols, and the standardisation of the usage of blanks in α -amylase, α -glucosidase and lipase assays. *Plant Methods*. 2021 Jan 6;17(1):3.
223. Indrianingsih AW, Tachibana S, Itoh K. *In vitro* evaluation of antioxidant and α -glucosidase inhibitory assay of several tropical and subtropical plants. *Procedia Environ Sci*. 2015;28:639–48.
224. Badawy MEI, El-Aswad AF. Bioactive paper sensor based on the acetylcholinesterase for the rapid detection of organophosphate and carbamate pesticides. *Int J Anal Chem*. 2014;2014:1–8.
225. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961 Jul;7(2):88–95.
226. Hassani S, Gharechaei B, Nikfard S, Fazli M, Gheibi N, Hardré R, et al. New insight into the allosteric effect of *L*-tyrosine on mushroom tyrosinase during *L*-dopa production. *Int J Biol Macromol*. 2018 Jul;114:821–9.
227. No JK, Soung DY, Kim YJ, Shim KH, Jun YS, Rhee SH, et al. Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sci*. 1999 Oct;65(21):PL241–6.

228. Garssen GJ, Vliegthart JFG, Boldingh J. An anaerobic reaction between lipoxygenase, linoleic acid and its hydroperoxides. *Biochem J.* 1971 Apr 1;122(3):327–32.
229. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: EUCAST. Available online: <https://eucast.org/> (accessed on 3 September 2020).
230. Pedro AC, Pérez-Rodríguez ML, Sánchez-Mata MC, Bisinella RZ, De Oliveira CS, Schnitzler E, et al. Biological activities, chromatographic profile and thermal stability of organic and conventional goji berry. *J Food Meas Charact.* 2022 Apr;16(2):1263–73.
231. Golovinskaia O, Wang CK. Review of functional and pharmacological activities of berries. *Molecules.* 2021 Jun 25;26(13):3904.
232. Rybicka I, Kiewlicz J, Kowalczewski PŁ, Gliszczynska-Świgło A. Selected dried fruits as a source of nutrients. *Eur Food Res Technol.* 2021 Oct;247(10):2409–19.
233. Endes Z, Uslu N, Özcan M, Er F. Physico-chemical properties, fatty acid composition and mineral contents of goji berry (*Lycium barbarum* L.) fruit. *J Agroaliment Processes Technol.* 2015;21(1):36–40.
234. Plaha NS, Kaushik N, Awasthi S, Singh M, Kaur V, Langyan S, et al. Comparison of nutritional quality of fourteen wild *Linum* species based on fatty acid composition, lipid health indices, and chemometric approaches unravelling their nutraceutical potential. *Heliyon.* 2023 Nov;9(11):e21192.
235. Ferreyra R, Sellés G, Saavedra J, Ortiz J, Zúñiga C, Troncoso C, et al. Identification of pre-harvest factors that affect fatty acid profiles of avocado fruit (*Persea americana* Mill) cv. ‘Hass’ at harvest. *South Afr J Bot.* 2016 May;104:15–20.
236. Bajramova A, Spégel P. A comparative study of the fatty acid profile of common fruits and fruits claimed to confer health benefits. *J Food Compos Anal.* 2022 Sep;112:104657.
237. Yan Y, Ran L, Cao Y. Nutritional, phytochemical characterization and antioxidant capacity of Ningxia wolfberry (*Lycium barbarum* L.). *J Chem Soc Pak.* 2014;36(6):1079–87.
238. Zhang Z, Liu X, Zhang X, Liu J, Hao Y, Yang X, et al. Comparative evaluation of the antioxidant effects of the natural vitamin C analog 2-O-β-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid isolated from goji berry fruit. *Arch Pharm Res.* 2011 May;34(5):801–10.
239. Ruffo M, Parisi O, Amone F, Malivindi R, Gorgoglione D, De Biasio F, et al. Calabrian goji vs. Chinese goji: A comparative study on biological properties. *Foods.* 2017 Apr 10;6(4):30.
240. Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J Agric Food Chem.* 2006 May 1;54(11):4069–75.
241. Yan Y, Nisar T, Fang Z, Wang L, Wang Z, Gu H, et al. Current developments on chemical compositions, biosynthesis, color properties and health benefits of black goji anthocyanins: An updated review. *Horticulturae.* 2022 Nov 4;8(11):1033.
242. Wang M, Zhang Z, Sun H, He S, Liu S, Zhang T, et al. Research progress of anthocyanin prebiotic activity: A review. *Phytomedicine.* 2022 Jul;102:154145.
243. Wang Y, Fu J, Yang D. *In situ* stability of anthocyanins in *Lycium ruthenicum* Murray. *Molecules.* 2021 Nov 23;26(23):7073.
244. Weremczuk-Jeżyna I, Gonciarz W, Grzegorzczak-Karolak I. Antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolic acid-rich extract from hairy roots of *Dracocephalum moldavica*. *Molecules.* 2023 Sep 22;28(19):6759.
245. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004 May;79(5):727–47.
246. Yossa Nzeuwa IB, Xia Y, Qiao Z, Feng F, Bian J, Liu W, et al. Comparison of the origin and phenolic contents of *Lycium ruthenicum* Murr. by high-performance liquid chromatography fingerprinting combined with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and chemometrics. *J Sep Sci.* 2017 Mar;40(6):1234–43.

247. Yossa Nzeuwa IB, Nea F, Maemteu J, Ngandeu Neubi GM, Mabou FD, Noumedem Kenfack JA, et al. Comparative study of polyphenols quantification, total phenolic content, and antioxidant activities of the fruits of three plants of the family of Solanaceae: *Lycium ruthenicum*, *Lycium barbarum*, and *Lycium Chinense*. *Investig Med Chem Pharmacol*. 2022 Dec 31;5(2):1–5.
248. Zhang QW, Lin LG, Ye WC. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chin Med*. 2018 Dec;13(1):20.
249. Dzhugalov H, Denev P. Growth, reproductive characteristics and antioxidant activity of four goji berry (*Lycium barbarum* L.) cultivars. *Agric Sci/Agrarni Nauk*. 2020;12:86–91.
250. Cui ZW, Xu SY, Sun DW. Effect of microwave-vacuum drying on the carotenoids retention of carrot slices and chlorophyll retention of Chinese chive leaves. *Dry Technol*. 2004 Jan 4;22(3):563–75.
251. Ferreyra RM, Viña SZ, Mugridge A, Chaves AR. Growth and ripening season effects on antioxidant capacity of strawberry cultivar Selva. *Sci Hortic*. 2007 Mar;112(1):27–32.
252. Xin G, Zhu F, Du B, Xu B. Antioxidants distribution in pulp and seeds of black and red goji berries as affected by boiling processing. *J Food Qual*. 2017 Oct 24;2017:1–8.
253. Chen S, Hu N, Wang H, Wu Y, Li G. Bioactivity-guided isolation of the major anthocyanin from *Lycium ruthenicum* Murr. fruit and its antioxidant activity and neuroprotective effects *in vitro* and *in vivo*. *Food Funct*. 2022;13(6):3247–57.
254. Czapski GA, Czubowicz K, Strosznajder JB, Strosznajder RP. The lipoxygenases: Their regulation and implication in Alzheimer's disease. *Neurochem Res*. 2016 Feb;41(1–2):243–57.
255. Lončarić M, Strelec I, Moslavac T, Šubarić D, Pavić V, Molnar M. Lipoxygenase inhibition by plant extracts. *Biomolecules*. 2021 Jan 25;11(2):152.
256. Peng Y, Yan Y, Wan P, Chen D, Ding Y, Ran L, et al. Gut microbiota modulation and anti-inflammatory properties of anthocyanins from the fruits of *Lycium ruthenicum* Murray in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Free Radic Biol Med*. 2019 May;136:96–108.
257. Magalhães V, Silva AR, Silva B, Zhang X, Dias ACP. Comparative studies on the anti-neuroinflammatory and antioxidant activities of black and red goji berries. *J Funct Foods*. 2022 May;92:105038.
258. Kruczek A, Ochmian I, Krupa-Mańkiewicz M, Lachowicz S. Comparison of morphological, antidiabetic and antioxidant properties of goji fruits. *Acta Univ Cibiniensis Ser E Food Technol*. 2020 Jun 1;24(1):1–14.
259. Wang Z, Sun L, Fang Z, Nisar T, Zou L, Li D, et al. *Lycium ruthenicum* Murray anthocyanins effectively inhibit α -glucosidase activity and alleviate insulin resistance. *Food Biosci*. 2021 Jun;41:100949.
260. Wang ZC, Tanzeela N, Sun L, Fang Z, Yan Y, Li D, et al. Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the composition and bioactivity of anthocyanins in the fruits of cultivated *Lycium ruthenicum* Murray. *CyTA - J Food*. 2019 Jan 1;17(1):552–62.
261. Zhao SS, Li S, Luo ZH, Zhou ZQ, Li N, Wang Y, et al. Bioactive phenylpropanoid derivatives from the fruits of *Lycium ruthenicum* Murr. *Bioorganic Chem*. 2021 Nov;116:105307.
262. Wu Z, Qin D, Li H, Guo D, Cheng H, Sun J, et al. Physicochemical and functional properties of *Lycium ruthenicum* pectin by different extraction methods. *Front Nutr*. 2022 Aug 9;9:946606.
263. Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*. 2007 Apr;14(4):289–300.

264. Bonesi M, Xiao J, Tundis R, Aiello F, Sicari V, Loizzo MR. Advances in the tyrosinase inhibitors from plant source. *Curr Med Chem*. 2019 Sep 2;26(18):3279–99.
265. Shen M, Liu K, Liang Y, Liu G, Sang J, Li C. Extraction optimization and purification of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. and evaluation of tyrosinase inhibitory activity of the anthocyanins. *J Food Sci*. 2020 Mar;85(3):696–706.
266. Kou R, Zuo G, Liu J, Di D, Guo M. Structural properties and hypoglycaemic activity of polysaccharides extracted from the fruits of *Lycium barbarum* L. using various extraction media. *Ind Crops Prod*. 2022 Nov;188:115725.
267. Mocan A, Zengin G, Simirgiotis M, Schafberg M, Mollica A, Vodnar DC, et al. Functional constituents of wild and cultivated goji (*L. barbarum* L.) leaves: Phytochemical characterization, biological profile, and computational studies. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2017 Jan 1;32(1):153–68.
268. Orhan DD, Özçelik B, Özgen S, Ergun F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiol Res*. 2010 Aug;165(6):496–504.
269. Pedro AC, Bach F, Stafussa AP, Menezes LRA, Barison A, Maciel GM, et al. ¹H NMR and Raman spectroscopy of oils and extracts obtained from organic and conventional goji berries: Yield, fatty acids, carotenoids and biological activities. *Int J Food Sci Technol*. 2019 Jan;54(1):282–90.
270. Morais CA, De Rosso VV, Estadella D, Pisani LP. Anthocyanins as inflammatory modulators and the role of the gut microbiota. *J Nutr Biochem*. 2016 Jul;33:1–7.
271. FadiLoglu EE, Çoban MZ. The effects of goji berry (*Lycium barbarum* L.) extract on some chemical, microbiological and sensory characteristics of liquid smoked Common Carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) sausages. *Üzüncü İl Üniversitesi Tarım Bilim Derg*. 2019 Dec 31;29(4):702–10.
272. Gibson GR, Scott KP, Rastall RA, Tuohy KM, Hotchkiss A, Dubert-Ferrandon A, et al. Dietary prebiotics: Current status and new definition. *Food Sci Technol Bull Funct Foods*. 2010 May;7(1):1–19.
273. Catalkaya G, Venema K, Lucini L, Rocchetti G, Delmas D, Daglia M, et al. Interaction of dietary polyphenols and gut microbiota: Microbial metabolism of polyphenols, influence on the gut microbiota, and implications on host health. *Food Front*. 2020 Jun;1(2):109–33.
274. Pap N, Fidelis M, Azevedo L, Do Carmo MAV, Wang D, Mocan A, et al. Berry polyphenols and human health: Evidence of antioxidant, anti-inflammatory, microbiota modulation, and cell-protecting effects. *Curr Opin Food Sci*. 2021 Dec;42:167–86.
275. Plamada D, Vodnar DC. Polyphenols—Gut microbiota interrelationship: A transition to a new generation of prebiotics. *Nutrients*. 2021 Dec 28;14(1):137.
276. Peng Y, Yan Y, Wan P, Chen C, Chen D, Zeng X, et al. Prebiotic effects *in vitro* of anthocyanins from the fruits of *Lycium ruthenicum* Murray on gut microbiota compositions of feces from healthy human and patients with inflammatory bowel disease. *LWT*. 2021 Sep;149:111829.
277. Liu P, Zhou W, Xu W, Peng Y, Yan Y, Lu L, et al. The main anthocyanin monomer from *Lycium ruthenicum* Murray fruit mediates obesity via modulating the gut microbiota and improving the intestinal barrier. *Foods*. 2021 Dec 30;11(1):98.
278. Li N, Liu X, Zhang J, Lang YZ, Lu L, Mi J, et al. Preventive effects of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murray in high-fat diet-induced obese mice are related to the regulation of intestinal microbiota and inhibition of pancreatic lipase activity. *Molecules*. 2022 Mar 26;27(7):2141.

279. Kang JH, Kim S, Moon B. Optimization by response surface methodology of lutein recovery from paprika leaves using accelerated solvent extraction. *Food Chem.* 2016 Aug;205:140–5.
280. Jovanović AA, Đorđević VB, Zdunić GM, Pljevljakušić DS, Šavikin KP, Gođevac DM, et al. Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. *Sep Purif Technol.* 2017 May;179:369–80.
281. Majeed M, Hussain AI, Chatha SAS, Khosa MKK, Kamal GM, Kamal MA, et al. Optimization protocol for the extraction of antioxidant components from *Origanum vulgare* leaves using response surface methodology. *Saudi J Biol Sci.* 2016 May;23(3):389–96.
282. Chemat F, Vian MA, Cravotto G. Green extraction of natural products: Concept and principles. *Int J Mol Sci.* 2012 Jul 11;13(7):8615–27.
283. Skenderidis P, Petrotos K, Giavasis I, Hadjichristodoulou C, Tsakalof A. Optimization of ultrasound assisted extraction of goji berry (*Lycium barbarum*) fruits and evaluation of extracts' bioactivity. *J Food Process Eng.* 2017 Oct;40(5):e12522.
284. Govender S, Pillay V, Chetty DJ, Essack SY, Dangor CM, Govender T. Optimisation and characterisation of bioadhesive controlled release tetracycline microspheres. *Int J Pharm.* 2005 Dec;306(1–2):24–40.
285. Mirabella N, Castellani V, Sala S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: A review. *J Clean Prod.* 2014 Feb;65:28–41.
286. Čechovičienė I, Šlepetienė A, Gumbytė M, Paulauskienė A, Tarasevičienė Ž. Composition and physicochemical properties of pomace of various cultivars of blackberry (*Rubus fruticosus* L.). *Horticulturae.* 2023 Dec 30;10(1):38.
287. Tagliani C, Perez C, Curutchet A, Arcia P, Cozzano S. Blueberry pomace, valorization of an industry by-product source of fibre with antioxidant capacity. *Food Sci Technol.* 2019 Sep;39(3):644–51.
288. Adam Yahya Abdulrahman M, Ma H, Zhou C, Ahmed Yagoub AE, Ali AO, Tahir HE, et al. Postharvest physicochemical properties of the pulp and seed oil from *Annona squamosa* L. (gishta) fruit grown in Darfur region, Sudan. *Arab J Chem.* 2019 Dec;12(8):4514–21.
289. Albergamo A, Potortí AG, Di Bella G, Amor NB, Lo Vecchio G, Nava V, et al. Chemical characterization of different products from the Tunisian *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. *Foods.* 2022 Jan 7;11(2):155.
290. Carmona-Jiménez Y, Igartuburu JM, Guillén-Sánchez DA, García-Moreno MV. Fatty acid and tocopherol composition of pomace and seed oil from five grape varieties Southern Spain. *Molecules.* 2022 Oct 17;27(20):6980.
291. Ilić T, Đuričić I, Kodranov I, Ušjak L, Kolašinac S, Milenković M, et al. Nutritional value, phytochemical composition and biological activities of *Lycium barbarum* L. fruits from Serbia. *Plant Foods Hum Nutr.* 2024 Sep;79(3):662–8.
292. Shahidi F, Zhong Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chem Soc Rev.* 2010;39(11):4067.
293. Spinei M, Oroian M. The potential of grape pomace varieties as a dietary source of pectic substances. *Foods.* 2021 Apr 15;10(4):867.
294. Kumar H, Guleria S, Kimta N, Nepovimova E, Dhalalaria R, Dhanjal DS, et al. Selected fruit pomaces: Nutritional profile, health benefits, and applications in functional foods and feeds. *Curr Res Food Sci.* 2024;9:100791.
295. Wei P, Zhao F, Wang Z, Wang Q, Chai X, Hou G, et al. Sesame (*Sesamum indicum* L.): A comprehensive review of nutritional value, phytochemical composition, health benefits, development of food, and industrial applications. *Nutrients.* 2022 Sep 30;14(19):4079.

296. Kopriva S. Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: Interaction with N and C metabolism. *J Exp Bot.* 2004 Jul 2;55(404):1831–42.
297. Ilić T, Dodevska M, Marčetić M, Božić D, Kodranov I, Vidović B. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial properties of goji berries cultivated in Serbia. *Foods.* 2020 Nov 6;9(11):1614.
298. Roopchand DE, Krueger CG, Moskal K, Fridlender B, Lila MA, Raskin I. Food-compatible method for the efficient extraction and stabilization of cranberry pomace polyphenols. *Food Chem.* 2013 Dec;141(4):3664–9.
299. Saratale GD, Saratale RG, Kim DS, Kim DY, Shin HS. Exploiting fruit waste grape pomace for silver nanoparticles synthesis, assessing their antioxidant, antidiabetic potential and antibacterial activity against human pathogens: A novel approach. *Nanomaterials.* 2020 Jul 25;10(8):1457.
300. Benchennouf A, Grigorakis S, Loupassaki S, Kokkalou E. Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Lycium barbarum* (goji) cultivated in Greece. *Pharm Biol.* 2017 Jan;55(1):596–602.
301. Cisneros-Yupanqui M, Lante A, Mihaylova D, Krastanov AI, Rizzi C. The α -amylase and α -glucosidase inhibition capacity of grape pomace: A review. *Food Bioprocess Technol.* 2023 Apr;16(4):691–703.
302. Flores FP, Singh RK, Kerr WL, Pegg RB, Kong F. Antioxidant and enzyme inhibitory activities of blueberry anthocyanins prepared using different solvents. *J Agric Food Chem.* 2013 May 8;61(18):4441–7.
303. Ferri M, Rondini G, Calabretta MM, Michelini E, Vallini V, Fava F, et al. White grape pomace extracts, obtained by a sequential enzymatic plus ethanol-based extraction, exert antioxidant, anti-tyrosinase and anti-inflammatory activities. *New Biotechnol.* 2017 Oct;39:51–8.
304. Fawole OA, Makunga NP, Opara UL. Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract. *BMC Complement Altern Med.* 2012 Dec;12(1):200.
305. Chang TS. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2009 May 26;10(6):2440–75.
306. Marinaccio L, Gentile G, Llorent-Martínez EJ, Zengin G, Masci D, Flamminii F, et al. Valorization of grape pomace extracts against cranberry, elderberry, rose hip berry, goji berry and raisin extracts: Phytochemical profile and *in vitro* biological activity. *Food Chem.* 2025 Jan;463:141323.
307. Yang P, Li D, Jin S, Ding J, Guo J, Shi W, et al. Stimuli-responsive biodegradable poly(methacrylic acid) based nanocapsules for ultrasound traced and triggered drug delivery system. *Biomaterials.* 2014 Feb;35(6):2079–88.
308. Egués I, Hernandez-Ramos F, Rivilla I, Labidi J. Optimization of ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from apple pomace. *Molecules.* 2021 Jun 22;26(13):3783.
309. Huang Y, Chen H, Zhang K, Lu Y, Wu Q, Chen J, Li Y, Wu Q, & Chen Y. Extraction, purification, structural characterization, and gut microbiota relationship of polysaccharides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2022; 213: 967–986.
310. Saini RK, Keum YS. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chem.* 2018 Feb;240:90–103.

7. BIOGRAFIJA AUTORA

Tijana D. Ilić rođena je 11.09.1994. godine u Smederevu. Osnovnu školu „Dositej Obradović“ završila je u Smederevu, a srednju Farmaceutsko-fizioterapeutsku školu u Beogradu, obe kao nosilac Vukove diplome.

Školske 2013/14. godine upisala je integrisane akademske studije Farmacija-medicinska biohemija na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. U toku studiranja bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, Fonda za mlade talente Republike Srbije (stipendija Dositeja), Fondacije Studenica, CEEPUS programa, kao i grada Smedereva. Bila je član Studentskog parlamenta Farmaceutskog fakulteta, predstavnik studenata smera Farmacija-medicinska biohemija i član Komisije za akreditaciju studijskog programa Farmacija-medicinska biohemija. Deo eksperimentalnog završnog rada po nazivom „Uticaj oksidativnog stresa i životnih navika na dužinu telomera kod zdravih osoba“ uradila je na Katedri za kliničku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Ljubljani, u okviru srednjoevropskog programa za razmenu studenata i nastavnog osoblja (CEEPUS). Završni rad je odbranila u septembru 2018. godine sa ocenom 10 i prosečnom ocenom tokom studiranja 9,64. Po obavljenom pripravničkom stažu u laboratoriji Specijalne bolnice za cerebrovaskularne bolesti “Sveti Sava” u Beogradu, položila je stručni ispit u julu 2019. godine.

Doktorske akademske studije na Univerzitetu u Beogradu-Farmaceutskom fakultetu, modul Bromatologija, upisala je akademske 2018/19. godine i položila je sve ispite sa prosečnom ocenom 10.

Na osnovu rezultata konkursa Drugog poziva za uključivanje 100 talentovanih mladih istraživača-studenata doktorskih akademskih studija za učešće na naučnoistraživačkim projektima, od februara 2019. godine, u zvanju istraživač-pripravnik, zaposlena je na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Tokom 2019. godine, bila je angažovana na projektu „Unapređenje i razvoj higijenskih i tehnoloških postupaka u proizvodnji namirnica životinjskog porekla u cilju dobijanja kvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na svetskom tržištu“, III46009, finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Nakon prijavljene teme doktorske disertacije pod nazivom “Hemijski sastav i biološka aktivnost plodova *Lycium barbarum* L. i *L. ruthenicum* Murr. (Solanaceae) gajenih u Srbiji”, od marta 2022. godine, u zvanju je istraživač-saradnik.

Autor je i koautor radova saopštenih na naučnim skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja štampani u izvodu, od čega je 7 radova objavljeno u časopisima sa SCI liste

Osim istraživačkog rada, učestvuje u realizaciji praktične nastave na obaveznim i izbornim predmetima Katedre za bromatologiju. U anketama studentskog vrednovanja pedagoškog rada nastavnika i saradnika ocenjivana je najvišim ocenama. Bila je član komisija za izradu i odbranu više od 80 završnih radova na integrisanim akademskim studijama farmacije i farmacije-medicinske biohemije. Član je Društva za ishranu Srbije i Saveza farmaceutskih udruženja Srbije.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Tijana Ilić

Broj indeksa 24/2018

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Hemijski sastav i biološka aktivnost plodova *Lycium barbarum* L. i *L. ruthenicum* Murr. (Solanaceae) gajenih u Srbiji

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu,

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Tijana Ilić

Broj indeksa: 24/2018

Studijski program: Doktorske akademske studije – bromatologija

Naslov rada: Hemijski sastav i biološka aktivnost plodova *Lycium barbarum* L. i *L. ruthenicum* Murr. (Solanaceae) gajenih u Srbiji

Mentor: dr sc. Bojana Vidović, vanredni profesor

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci u vezi sa dobijanjem akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu,

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Hemijski sastav i biološka aktivnost plodova *Lycium barbarum* L. i *L. ruthenicum* Murr. (Solanaceae) gajenih u Srbiji“
koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
- ③ 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.
Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu,
